

本文引文格式:吴丹,南丽婷,李莎莎,等. AMPK介导的角叉菜胶炎性痛大鼠镇痛机制的研究[J]. 右江民族医学院学报, 2023, 45(3): 435-438.

【论著与临床报道】

AMPK介导的角叉菜胶炎性痛大鼠镇痛机制的研究

吴丹¹, 南丽婷¹, 李莎莎¹, 姚天韵¹, 余双全²

(1. 右江民族医学院研究生学院, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院基础医学院生理学教研室, 广西 百色 533000)

摘要:目的 研究腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)在角叉菜胶诱导的炎性痛晚期是否发挥镇痛作用。方法 在大鼠左后爪足底皮下注射1%角叉菜胶以建立炎性痛动物模型,测量左后爪热痛阈值、机械痛阈值和爪体积。2 d后大鼠左后爪足底皮下注射AMPK抑制剂化合物C(150 μg),测量左后爪热痛阈值和机械痛阈值。结果 足底注射角叉菜胶后,在炎症早期阶段(角叉菜胶注射后1 d之内),大鼠出现痛敏和足肿胀;在炎症晚期阶段(角叉菜胶注射1 d后),大鼠痛敏消失,但足肿胀继续存在,6 d后才消失。在注射角叉菜胶2 d后,足底注射化合物C,大鼠恢复出现痛敏。结论 在角叉菜胶炎症晚期,大鼠炎症部位AMPK可能上调以发挥镇痛作用。

关键词:角叉菜胶;炎性痛;足肿胀;腺苷酸活化蛋白激酶;镇痛

中图分类号:R614 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-5817(2023)03-0435-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.03.011

AMPK-mediated analgesic mechanism in rats with carrageenan-induced inflammatory pain

Wu Dan¹, Nan Liting¹, Li Shasha¹, Yao Tianyun¹, Yu Shuangquan²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

2. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study whether AMP-activated protein kinase (AMPK) plays an analgesic role in the late stage of carrageenan-induced inflammatory pain. **Methods** This study established the animal model of inflammatory pain by intraplantar injection of 1% carrageenan into the left hind paw of rats and measured the paw withdrawal thermal latency, the paw withdrawal mechanical threshold, and the volume of the left hind paw. Two days later, the rats were injected intraplantarly with AMPK inhibitor compound C (150 μg) into the left hind paw and the paw withdrawal thermal latency and the paw withdrawal mechanical threshold of the left hind paw were measured. **Results** After intraplantar injection of carrageenan, hyperalgesia and paw swelling occurred in the early stage of inflammation (within 1 day after carrageenan injection). In the late stage of inflammation (1 day after carrageenan injection), the hyperalgesia disappeared, but the paw swelling continued until 6 days later. 2 days after the carrageenan injection, the rats were injected intraplantarly with compound C, and the hyperalgesia reappeared. **Conclusion** In the late stage of carrageenan-induced inflammation, AMPK may be up-regulated at the inflammatory site of rats to play an analgesic role.

Key words: carrageenan; inflammatory pain; paw swelling; AMP-activated protein kinase; analgesia

基金项目:右江民族医学院科研项目(yy2016bsky01)

第一作者简介:吴丹(1997-),女,在读硕士研究生,研究方向:慢性疼痛,E-mail:1364215078@qq.com

通讯作者简介:余双全(1965-),男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:慢性疼痛,E-mail:yushuangquan@sina.com

角叉菜胶诱导的大鼠足肿胀呈现出典型的炎症临床表现:红、肿、热、痛和功能障碍,使得该模型作为一个炎性痛动物模型,广泛用于抗炎药和镇痛药的开发研究^[1-2]。一般认为,此模型出现的痛敏只持续数小时,很少有继续观察致炎 1 d 后的表现^[3]。本次研究试图在时间-效应关系方面完善这一炎性痛模型,将观察时间延长到致炎后几天,以便观察完整的足肿胀和痛敏的产生和消退情况。在角叉菜胶炎症早期(角叉菜胶注射后几小时内),可以观察到痛敏和足红肿并存;但在角叉菜胶炎症晚期(角叉菜胶注射 1 d 后),本次研究意外发现虽疼痛消失但红肿依然存在。这种疼痛与红肿不一致的现象产生的原因是否是在角叉菜胶炎症晚期产生内源性炎性镇痛物质,从而使痛敏消失?

有研究报道,激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)可以缓解疼痛,而抑制 AMPK 的活性会引起痛觉过敏^[4-5],这提示 AMPK 在炎性疼痛的发生发展中可能起重要调控作用。因此本次研究提出假设,注射角叉菜胶 48 h 后的大鼠不产生痛敏的原因可能是 AMPK 表达水平出现上调。本研究一方面对角叉菜胶致炎后大鼠红肿和痛觉变化进行长时间观察,以探索角叉菜胶炎性痛模型的相对完整的时间-效应关系;另一方面通过在角叉菜胶注射 48 h 后的大鼠中抑制 AMPK 而观察痛觉变化,以揭示 AMPK 是否在角叉菜胶炎症晚期发挥镇痛作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 32 只,体重 200~220 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司。动物饲养在温度(23~26℃)、湿度(50%~60%)和光照控制(12 h 光照/黑暗循环)的房间中。食物和水可随意获取。所有动物实验均遵守相关伦理审批要求。

1.2 主要试剂和仪器 角叉菜胶(Sigma 公司,产品号:2204905G-F),使用时用 0.9%生理盐水配制成 1%浓度;化合物 C(Compound C),6-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基苯基-3-(4-吡啶基)吡啶并[1,5-A]嘧啶二盐酸盐,一种 AMPK 抑制剂(阿拉丁公司,产品号:D129758),使用时用 0.9%生理盐水配制成 1.5 mg/mL 浓度;足底热辐射测痛仪(Ugo Basile 公司,型号:37370);动态足底测痛仪(Ugo Basile 公司,型号:37400);足趾容积测量仪(成都泰盟软件有限公司,型号:PV-200)。

1.3 动物分组与给药 在现象实验(炎性痛模型实验)中,将动物分为角叉菜胶组和对照组,每组 8 只大鼠。角叉菜胶组大鼠左后爪足底皮下注射 1%角叉菜胶 100 μ L,对照组大鼠左后爪足底皮下注射生理盐水 100 μ L。随后每 2 h 测量 1 次大鼠热痛阈值、机械痛阈值和后爪体积,24 h 后改为每 2 d 测量 1 次大鼠热

痛阈值、机械痛阈值和后爪体积。在机制研究实验(AMPK 研究实验)中,动物分为化合物 C 组和生理盐水组,每组 8 只大鼠,两组大鼠都进行左后爪足底皮下注射 1%角叉菜胶 100 μ L,2 d 后,化合物 C 组大鼠左后爪足底皮下注射化合物 C(150 μ g/100 μ L),生理盐水组左后爪足底皮下注射 100 μ L 生理盐水,随后每隔 10 min 测量 1 次大鼠热痛阈值和机械痛阈值。

1.4 热刺激缩爪潜伏期(paw withdrawal latency to radiant heat)测定 大鼠后爪热刺激缩爪反应潜伏期采用足底热辐射测痛仪测量,作为热痛阈指标。大鼠于测量前 3 d 进行适应性训练。测量时,将大鼠置于透明观察箱内,大鼠安静后,仪器发射红外光,经玻璃板直接照射大鼠后足底,记录从开始照射至出现逃避性缩爪反应的时间,作为热痛阈(s)。测量 3 次,前后两次测量间隔时间为 5 min,取平均值作为热痛阈值。

1.5 机械刺激缩爪反射阈值(paw withdrawal threshold to mechanical force)测定 大鼠后爪机械刺激缩爪反应阈值采用动态足底测痛仪测量,作为机械痛阈指标。大鼠于测量前 3 d 进行适应性训练。测量时,将大鼠置于底部为铁丝网的透明观察箱内,大鼠安静后,用纤丝刺激大鼠后爪足底,刺激强度逐渐增大,记录大鼠出现逃避性缩爪反应的刺激强度,作为机械痛阈(g)。测量 3 次,前后两次测量间隔时间为 5 min,取平均值作为机械痛阈值。

1.6 鼠爪体积测量 鼠爪体积(mL)采用足趾容积测量仪测量,表示鼠爪的肿胀程度。测量过程中鼠爪保持不动,测量 3 次,取平均值作为测量值。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析,本实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内不同时间点比较采用重复测量方差分析,检验水准: $\alpha=0.05$,双侧检验。

2 结果

2.1 角叉菜胶炎性痛大鼠在炎症发生发展过程中热痛的变化 足底注射 1%角叉菜胶后,与对照组相比,角叉菜胶组的热痛阈值降低,第 4 小时降幅最显著,热痛阈值降低持续 12 h($P < 0.05$);1 d 后热痛阈值回升到正常值范围,并在 7 d 之内都维持在正常值范围($P > 0.05$)。即大鼠在注射角叉菜胶后出现持续 12 h 的热痛敏;1 d 后热痛敏消失,热痛觉恢复正常且至少维持 7 d,见表 1。

2.2 角叉菜胶炎性痛大鼠在炎症发生发展过程中机械痛的变化 足底注射 1%角叉菜胶后,与对照组相比,角叉菜胶组的机械痛阈值降低,第 4 小时降幅最显著,机械痛阈值降低持续 10 h($P < 0.05$);1 d 后机械痛阈值回升到正常值范围,并在 7 d 之内都维持在正常值范围($P > 0.05$)。即大鼠在注射角叉菜胶后出

现持续 10 h 的机械痛敏;1 d 后机械痛敏消失,机械痛觉恢复正常且至少维持 7 d,见表 2。

表 1 角叉菜胶炎性痛大鼠在炎症发生发展过程中热痛的变化

时间	n	对照组	角叉菜胶组	t	P
第 0 小时	8	7.67±0.45	7.47±0.64	0.724	0.481
第 2 小时	8	7.64±0.29	3.87±0.27	26.846	<0.001
第 4 小时	8	7.60±0.74	2.59±0.55	15.374	<0.001
第 6 小时	8	7.64±0.56	3.72±0.38	16.350	<0.001
第 8 小时	8	7.48±0.52	4.53±0.41	12.525	<0.001
第 10 小时	8	7.57±0.61	5.66±0.29	7.951	<0.001
第 12 小时	8	7.48±0.31	6.62±0.19	6.762	<0.001
第 1 天	8	7.48±0.27	7.43±0.45	0.270	0.791
第 2 天	8	7.30±0.27	7.40±0.46	-0.485	0.635
第 3 天	8	7.20±0.39	7.40±0.42	-0.959	0.354
第 4 天	8	7.39±0.30	7.34±0.43	0.267	0.794
第 5 天	8	7.35±0.39	7.47±0.47	-0.559	0.585
第 6 天	8	7.28±0.58	7.31±0.61	-0.112	0.912
第 7 天	8	7.32±0.27	7.10±0.39	1.342	0.201

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

表 2 角叉菜胶炎性痛大鼠在炎症发生发展过程中机械痛的变化

时间	n	对照组	角叉菜胶组	t	P
第 0 小时	8	24.44±1.52	25.43±1.18	-1.470	0.164
第 2 小时	8	24.53±3.64	13.69±1.34	7.903	<0.001
第 4 小时	8	24.36±2.87	11.18±1.23	11.949	<0.001
第 6 小时	8	24.03±1.58	14.05±1.50	12.969	<0.001
第 8 小时	8	24.22±2.03	16.98±1.53	8.052	<0.001
第 10 小时	8	24.53±2.86	20.24±1.59	3.703	0.002
第 12 小时	8	24.48±2.10	23.49±1.47	1.095	0.292
第 1 天	8	23.12±2.02	23.33±1.90	-0.208	0.838
第 2 天	8	23.73±0.92	23.59±1.88	0.191	0.851
第 3 天	8	24.33±2.03	24.06±1.88	0.268	0.792
第 4 天	8	23.92±2.73	23.42±3.31	0.329	0.747
第 5 天	8	24.10±3.05	24.75±2.54	-0.463	0.650
第 6 天	8	24.38±2.43	23.93±1.65	0.434	0.671
第 7 天	8	22.96±2.79	24.98±3.52	-1.268	0.226

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

2.3 角叉菜胶炎性痛大鼠在炎症发生发展过程中足肿胀的变化 足底注射 1%角叉菜胶后,与对照组相比,角叉菜胶组的鼠后爪体积增大,大鼠产生足肿胀,足肿胀在第 4 小时最为显著($P<0.05$),足肿胀在 24 h 后并不消失,只是慢慢变小($P<0.05$),第 7 天才消失($P>0.05$),见表 3。

2.4 化合物 C 对角叉菜胶炎性痛大鼠热痛的影响 注射角叉菜胶后第 2 天,足底注射 AMPK 抑制剂化合物 C,与生理盐水组相比,化合物 C 组大鼠热痛阈值降低,持续至少 60 min,即大鼠出现持续至少 60 min 的热痛敏($P<0.05$),见表 4。

表 3 角叉菜胶炎性痛大鼠在炎症发生发展过程中足肿胀的变化

时间	n	对照组	角叉菜胶组	t	P
第 0 小时	8	1.53±0.07	1.52±0.06	0.497	0.627
第 2 小时	8	1.59±0.09	2.18±0.07	-15.396	<0.001
第 4 小时	8	1.54±0.06	2.34±0.07	-24.505	<0.001
第 6 小时	8	1.54±0.06	2.23±0.05	-25.220	<0.001
第 8 小时	8	1.53±0.06	2.16±0.06	-20.250	<0.001
第 10 小时	8	1.53±0.07	2.07±0.08	-14.554	<0.001
第 12 小时	8	1.52±0.07	2.04±0.08	-13.541	<0.001
第 1 天	8	1.55±0.05	1.97±0.15	-7.631	<0.001
第 2 天	8	1.53±0.06	1.87±0.14	-6.314	<0.001
第 3 天	8	1.53±0.06	1.79±0.11	-6.071	<0.001
第 4 天	8	1.53±0.06	1.69±0.08	-4.659	<0.001
第 5 天	8	1.53±0.06	1.65±0.07	-3.824	0.002
第 6 天	8	1.52±0.05	1.61±0.08	-2.468	0.027
第 7 天	8	1.51±0.07	1.55±0.07	-0.978	0.345

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

表 4 化合物 C 对角叉菜胶炎性痛大鼠热痛的影响

时间/min	n	生理盐水组	化合物 C 组	t	P
0	8	7.50±0.55	7.45±0.60	0.144	0.888
10	8	6.95±1.06	4.83±0.56	5.015	<0.001
20	8	7.46±0.95	4.69±0.54	7.170	<0.001
30	8	7.33±0.80	4.89±0.68	6.572	<0.001
40	8	7.53±0.96	5.15±0.56	6.055	<0.001
50	8	7.68±0.97	5.04±0.58	6.589	<0.001
60	8	7.58±1.17	5.03±0.78	5.142	<0.001

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

2.5 化合物 C 对角叉菜胶炎性痛大鼠机械痛的影响 注射角叉菜胶后第 2 天,足底注射 AMPK 抑制剂化合物 C,与生理盐水组相比,化合物 C 组大鼠机械痛阈值降低,持续至少 60 min,即大鼠出现持续至少 60 min 的机械痛敏($P<0.05$),见表 5。

表 5 化合物 C 对角叉菜胶炎性痛大鼠机械痛的影响

时间/min	n	生理盐水组	化合物 C 组	t	P
0	8	24.50±1.74	24.63±2.26	-0.120	0.906
10	8	22.56±2.65	15.14±2.17	6.129	<0.001
20	8	24.28±4.58	15.66±1.77	4.959	<0.001
30	8	23.43±4.63	16.28±2.51	3.840	0.002
40	8	24.31±4.38	15.94±1.85	4.985	<0.001
50	8	24.78±4.21	16.58±2.86	4.556	<0.001
60	8	24.41±4.25	16.03±2.66	4.726	<0.001

注:表内计量资料数据以($\bar{x}\pm s$)表示。

3 讨论

本研究观察到,大鼠足底注射角叉菜胶后的时间-效应关系可分为明显不同的两个阶段。在早期阶段(角叉菜胶致炎后数小时),有足肿胀,有痛敏;在晚期

阶段(角叉菜胶致炎 1 d 后),有足肿胀,没有痛敏;注射角叉菜胶后,大鼠很快就产生热痛敏、机械痛敏和足肿胀,热痛敏、机械痛敏和足肿胀在第 4 小时达到高峰。热痛敏和机械痛敏可持续 10~12 h,在注射后 24 h 完全恢复正常。足肿胀在注射 24 h 后并不消失,只是慢慢变小,7 d 后才消失。

对角叉菜胶炎症早期阶段的痛敏机制,许多学者做了研究,发现 TRPV1、缓激肽、神经肽 Y 受体等被激活了,导致痛敏^[6-8],但是由于角叉菜胶炎症晚期阶段痛敏消失,尚未见到此阶段关于痛觉调节方面的报道。鉴于角叉菜胶炎症晚期阶段肿胀尚未消失,多种炎性因子可能存在,而许多炎性因子如 TNF- α 、CX-CL1、神经生长因子有致痛作用^[9-11],那么此阶段的大鼠是否同时产生内源性物质以便抵消这些炎性因子的致痛作用?本研究对注射角叉菜胶 2 d 后大鼠再注射 AMPK 抑制剂化合物 C,观察到大鼠恢复出现热痛敏和机械痛敏,说明 AMPK 可能在注射角叉菜胶 2 d 后的大鼠中起镇痛作用,提示 AMPK 可能作为炎症的内源性镇痛物质,在炎症晚期阶段的痛觉调制中发挥重要作用。

AMPK 不是孤立地发挥镇痛作用,可能涉及到其他成分。有研究发现,角叉菜胶炎性痛大鼠背根神经节小神经元中阿片受体数量增加^[12]。在神经病理性疼痛模型中,激活 AMPK 所产生的镇痛作用可被阿片受体拮抗剂所减弱^[13]。有研究报道^[4],在完全弗氏佐剂炎性痛模型中,AMPK 通过抑制 NF- κ B 以及抑制 IL-1 β 表达来发挥镇痛作用。还有研究发现^[14],AMPK 通过负性调控 TRPA1 以缓解机械性异位痛。那么在角叉菜胶炎症晚期阶段,AMPK 是否也是通过激活阿片受体,或者通过抑制 NF- κ B 以及抑制 IL-1 β ,或者通过负性调控 TRPA1,或者通过其他途径发挥镇痛作用?这样比较深入的镇痛机制是值得以后进一步研究的。此外,为了更加明确 AMPK 在角叉菜胶炎症晚期的镇痛作用,后续研究计划在角叉菜胶炎症晚期阶段开展代表性炎性因子的测量、AMPK 长期抑制对痛觉的影响、AMPK 表达水平和活化水平的检测等实验。

总之,角叉菜胶炎症晚期痛敏消失的原因可能是大鼠炎症部位 AMPK 上调。这一结果对以 AMPK 为靶点的镇痛药物的研发可能有参考意义。

参考文献:

[1] MEHRZADI S, KHALILI H, FATEMI I, et al. Zingerone mitigates carrageenan-induced inflammation through antioxidant and anti-inflammatory activities[J]. *Inflammation*, 2021, 44(1): 186-193.

[2] MIYAKE S, HIGUCHI H, HONDA-WAKASUGI Y, et al. Locally injected ivabradine inhibits carrageenan-induced pain and inflammatory responses via hyperpolariza-

tion-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e217209.

[3] LI T, WANG T, WANG L L, et al. Antinociceptive effects of rotigotine-loaded microspheres and its synergistic interactions with analgesics in inflammatory pain in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 891: 173693.

[4] XIANG H C, LIN L X, HU X F, et al. AMPK activation attenuates inflammatory pain through inhibiting NF- κ B activation and IL-1 β expression [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 34.

[5] MAIXNER D W, YAN X S, GAO M, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase regulates interleukin-1 β expression and glial glutamate transporter function in rodents with neuropathic pain [J]. *Anesthesiology*, 2015, 122(6): 1401-1413.

[6] WATANABE M, UEDA T, SHIBATA Y, et al. The role of TRPV1 channels in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice [J]. *Neuroreport*, 2015, 26(3): 173-178.

[7] DE OLIVEIRA FUSARO M C G, PELEGRINI-DA-SILVA A, ARALDI D, et al. P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE₂ or dopamine [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1-3): 177-182.

[8] KOSTIĆ S, PULJAK L, SAPUNAR D. Attenuation of pain-related behaviour evoked by carrageenan injection through blockade of neuropeptide Y Y1 and Y2 receptors [J]. *Eur J Pain*, 2013, 17(4): 493-504.

[9] DO NASCIMENTO F L F, DE FREITAS PIRES A, MOTA M R L, et al. The anti-inflammatory effect of *Andira anthelmia* lectin in rats involves inhibition of the prostanoid pathway, TNF- α and lectin domain [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(9): 8847-8857.

[10] MORAES T R, ELISEI L S, MALTA I H, et al. Participation of CXCL1 in the glial cells during neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 875: 173039.

[11] YUAN H J, DU S B, CHEN L P, et al. Hypomethylation of nerve growth factor (NGF) promotes binding of C/EBP α and contributes to inflammatory hyperalgesia in rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 34.

[12] JI R R, ZHANG Q, LAW P Y, et al. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(12): 8156-8166.

[13] AUGUSTO P S A, BRAGA A V, RODRIGUES F F, et al. Metformin antinociceptive effect in models of nociceptive and neuropathic pain is partially mediated by activation of opioidergic mechanisms [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 858: 172497.

[14] WANG S L, QI S M, KOGURE Y, et al. The ubiquitin E3 ligase Nedd4-2 relieves mechanical allodynia through the ubiquitination of TRPA1 channel in db/db mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2021, 53(6): 1691-1704.

收稿日期:2023-02-15;修回日期:2023-03-28