

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.09.007

褪黑素通过改善神经元树突棘可塑性在瑞芬太尼诱发大鼠痛觉过敏机制中的作用*

吕晓敏¹ 陈红² 薛朝霞³ 王丽斯¹ 刘奇⁴

(1 内蒙古自治区人民医院手术麻醉三科 内蒙古 呼和浩特 010017;

2 内蒙古自治区人民医院生殖医学中心 内蒙古 呼和浩特 010017;

3 山西医科大学第一医院疼痛科 山西 太原 030001; 4 中南大学湘雅医学院麻醉学 湖南 长沙 410008)

摘要 目的:探究褪黑素通过改善神经元树突棘可塑性在瑞芬太尼诱发大鼠痛觉过敏机制中的作用。**方法:**30只8~10周龄的SD大鼠(175~200g),根据研究目的随机分为三组:对照组((大鼠足底进行切口手术,生理盐水处理,n=10),模型组(大鼠足底进行切口手术,静脉滴注瑞芬太尼,n=10),治疗组(在模型组的基础上行褪黑素处理,n=10)。通过机械诱发痛和热缩足检测不同组处理后2h、2d、3d和7d大鼠的爪缩回阈值,通过RT-qPCR分析大鼠中IL-1、TNF- α 和IL-1 β 的mRNA表达,通过蛋白印迹检测大鼠体内AMPA和Kalirin-7的蛋白表达,通过观察组织切片比较不同组大鼠的脊柱密度和长度,通过低感光电荷耦合设备的摄像头监视器分析单个神经元的电生理。**结果:**在第2h、2d、3d和7d的测试中,相比于对照组,模型组痛缩足阈值降低($P<0.05$),热缩足潜伏时间缩短($P<0.05$),IL-1、TNF- α 、IL-1 β 的mRNA表达、AMPA和Kalirin-7的蛋白表达均升高($P<0.05$),脊柱密度、脊柱长度升高($P<0.05$),电流幅度升高($P<0.05$),电流间隔降低($P<0.05$)。治疗组较模型组的痛缩足阈值升高($P<0.05$),热缩足潜伏时间延长($P<0.05$),IL-1、TNF- α 和IL-1 β 的mRNA表达、AMPA和Kalirin-7的蛋白表达均降低($P<0.05$),脊柱密度、脊柱长度降低($P<0.05$),电流幅度降低($P<0.05$),电流间隔升高($P<0.05$)。**结论:**褪黑素通过抑制AMPA和Kalirin-7的蛋白表达改善神经元树突棘可塑性,从而降低瑞芬太尼诱发的大鼠痛觉过敏。

关键词:褪黑素;神经元树突棘;瑞芬太尼;痛觉过敏

中图分类号: R-33; Q593.2; Q576; R614 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)09-1633-06

The Role of Melatonin in Improving the Plasticity of Neuronal Dendritic Spines in the Mechanism of Remifentanyl Induced Hyperalgesia in Rats*

LV Xiao-min¹, CHEN Hong², XUE Zhao-xia³, WANG Li-si¹, LIU Qi⁴

(1 Department of Surgical Anesthesia, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia, 010017, China;

2 Reproductive Medicine Center, People's Hospital of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot, Inner Mongolia, 010017, China;

3 Department of Pain, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi, 030001, China;

4 Class 1801 of Anesthesiology, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China)

ABSTRACT Objective: To explore the role of melatonin in the mechanism of remifentanyl-induced hyperalgesia in rats by improving the plasticity of neuronal dendritic spines. **Methods:** Purchase 30 SD rats (175~200 g) aged 8-10 weeks. According to the purpose of the study, all rats were randomly divided into three groups: control group (rats undergoing incision surgery on the soles of rats, treated with saline, n=10), model group (rats undergoing incisions on the soles of rats, sutured intravenously remifentanyl, n=10), treatment group (melatonin treatment on the basis of the model group, n=10). Shrinkage feet reflection of rats in different groups at 2 h, 2 d, 3 d and 7 d after treatment was detected by the paw withdrawal threshold and the paw withdrawal latency time. The mRNA expression of IL-1, TNF- α and IL-1 β in rats was analyzed by RT-qPCR. The protein expression of AMPA and Kalirin-7 in rats was detected by Western blot. The heat sensitivity of rats was evaluated by a hot-plate biological instrument. The density and length of the spine of rats in different groups were compared by observing tissue sections. The electrophysiology of a single neuron is analyzed by the camera monitor of a low-sensitivity charge-coupled device. **Results:** In the 2 h, 2 d, 3 d and 7 d tests, comparing with the control group, the paw withdrawal threshold was lower ($P<0.05$), the paw withdrawal latency time was shorter ($P<0.05$), the mRNA expression of IL-1, TNF- α , IL-1 β and the protein expression of AMPA and Kalin-7 was higher ($P<0.05$) in the model group. And the spine density and length and the current amplitude was higher ($P<0.05$), the current interval was lower ($P<0.05$) in the model group. Comparing with the model group, the paw withdrawal threshold was higher ($P<0.05$), the paw withdrawal latency time was longer ($P<0.05$), the mRNA expression of IL-1, TNF- α , IL-1 β and the protein expression of AMPA and Kalin-7 was lower ($P<0.05$) in the treatment group. And the spine density and length and

* 基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08088)

作者简介:吕晓敏(1986-),女,硕士研究生,主治医师,研究方向:麻醉学,电话:15332913307,E-mail:lvxiaomin11111@126.com

(收稿日期:2020-11-24 接受日期:2020-12-18)

the current amplitude was lower ($P<0.05$), the current interval was increased ($P<0.05$) in the model group. **Conclusion:** Melatonin improves the plasticity of neuronal dendritic spines by inhibiting the protein expression of AMPA and Kalirin-7, thereby reducing remifentanyl-induced hyperalgesia in rats.

Key words: Melatonin; neuronal dendritic spines; Remifentanyl; Hyperalgesia

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q593.2; Q576; R614 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2021)09-1633-06

前言

痛觉过敏的发生可能会减慢手术后患者的康复速度,阻止及时出院,不仅会因疼痛评分较高而引起不适,而且还会产生更多的镇痛药和与给药有关的副作用^[1]。瑞芬太尼是一种非常有效的超短效阿片类药物,广泛用于全身麻醉以及重症监护室的镇静作用^[2],但大量输注瑞芬太尼可引起痛觉过敏。 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸(AMPA)受体是由四个独立的亚基(GluA1-4)组成的离子型谷氨酸受体^[3]。它通过改变其数量,组成和易位到中枢神经系统中的突触而与兴奋性突触可塑性有关^[4]。几项研究概括了外周炎症和神经损伤均触发了脊髓背突触中含有 GluA1 的 AMPA 受体膜运输。角神经元可能引起急性和持续性炎症以及神经性疼痛^[5]。蛋白激酶 M ξ 是非典型蛋白激酶 C 的 N 端截短和组成型活性形式,可以通过增加和维持突触 AMPA 受体来维持突触增强作用^[6]。通过减少前扣带回皮层中突触后 GluA1 的水平来抑制蛋白激酶 M ξ 来减轻神经性疼痛^[7]。Kalirin-7 是 Rho 鸟嘌呤核苷酸交换因子的同种型,因其对兴奋性突触的结构和功能可塑性具有关键影响而被公认^[8]。Kalirin-7 依赖性树突棘的形成和扩大对于调节突触强度至关重要。褪黑素是一种由松果体和其他组织产生的化学介质^[9]。褪黑素的经典功能与昼夜节律的控制和下丘脑-垂体-性腺轴的调节有关,褪黑素已被证明具有抗氧化能力,既可以作为自由基清除剂,又可以作为神经元的保护剂^[10]。褪黑素在神经变性中的神经保护作用引起了人们的极大关注。本研究探讨褪黑素通过改善神经元树突棘可塑性在瑞芬太尼诱发的大鼠痛觉过敏机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 实验动物

1.1.1 实验大鼠 从动物研究所购买 30 只 8~10 周龄的 SD 大鼠(175~200 g)。在 12 h 的光照/黑暗周期下,每个笼子饲养 5 只大鼠,自由饮食。开始实验前,大鼠适应环境一周。

1.1.2 实验分组 根据研究目的将所有大鼠随机分为三组,各 10 只:对照组(大鼠足底进行切口手术,用生理盐水处理),模型组(大鼠足底进行切口手术,同时静脉滴注瑞芬太尼),治疗组(在模型组的基础上进行褪黑素治疗处理)。

1.1.3 瑞芬太尼诱导痛觉过敏模型 5%水合氯醛(350 mg/kg)皮下注射麻醉,开始静脉滴注瑞芬太尼 1.3 μ g/(kg·min),药物浓度 20 μ g/mL,同时做切口:穿过足底的皮肤和筋膜做一个 1 cm 的纵向切口,从脚跟边缘开始 0.5 cm 处开始,并向左后爪的脚趾延伸。使用镊子抬高肌肉,保持肌肉起源。压迫止血后,用 4-0 丝线缝合皮肤,用红霉素软膏覆盖以防止感染。所有方案均得到医科大学机构动物护理和使用委员会的批准。该程序

是根据美国国立卫生研究院实验动物的护理和使用指南进行。

1.2 方法

1.2.1 大鼠行为测试 测试机械敏感性,将大鼠限制在带有丝网底部的高架笼中,并使其适应环境 1 h。垂直应用电子冯·弗雷丝(BSEVF3,哈佛仪器公司,美国)刺激切口。在每个时间点以 3 min 的间隔重复进行 3 次实验。将爪子退缩阈值确定为三项试验的平均压力(g):大鼠摇动,撤回或舔食时爪子。用热板(YLS-6B,中国正化生物仪器设备有限公司)评估热敏性。每隔 5 min 测量大鼠在 52 $^{\circ}$ C 的加热板上缩足的时间,切断时间为 30 s,以免损坏后爪,记录爪子抽出,摇动或舔动的时间,共测量 5 次,取后三次平均值。

1.2.2 树突棘图像分析 在透射光显微镜下检查从腰椎肿大获取的高尔基染色的冠状脊髓组织切片。五个标准对标本进行采样和分析:(1)神经元位于第 4 层和第 5 层;(2)高尔基染色的神经元必须具有完全浸渍的树突和棘突,以连续的长度出现;(3)至少一个枝晶相对于细胞体的起源延伸到相邻的薄片;(4)至少一半的初级树突分支保留在组织切片的厚度内,使得其末端没有被切开,而是逐渐变细为末端;(5)池体直径在 20~50 μ m 之间。需要注意的是,这些标准并不意味着我们分析的神经元的生理特征,而是控制脊髓背角神经元的形态多样性。为了分析和重建背角神经元的完整外观,我们使用 Neurolucida 软件,并对所得的背角神经元三维重建进行了脊柱密度和脊柱分布分析。为每个细胞制作了两个神经元痕迹。首先,绘制包含每个已识别细胞的冠状脊髓截面和背角周围的轮廓线。将这些细胞的位置标记在脊髓轮廓图上。脊柱密度表示为脊柱数/微米树突长度。为了确定两组之间相对于细胞体的脊柱分布变化,使用 Neurolucida 软件进行改进的 Sholl 分析。在细胞体周围形成七个宽 50 μ m 的球形箱,测量每个箱内的脊柱密度,并在治疗组中平均每个箱中的数据,并将平均值与各组中的等效箱进行比较。为了确定脊柱尺寸的变化,从每个治疗组中任意选择五个神经元,并测量可见的脊柱的脊柱长度和脊柱头部直径。脊柱的长度定义为从脊柱的尖端到脊柱与母体树突分支交界处的距离。脊柱头部直径定义为垂直于母树突分支长度绘制的最长线。

1.2.3 电生理功能 麻醉下从大鼠无菌取出脊髓节段(L₄至L₅),并用振动切片机切成横向切片(350 μ m)。将切片在 22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 的预氧化人工脑脊液溶液中孵育,该溶液由 126 μ M NaCl, 2 μ M MgCl₂, 3.5 μ M KCl, 1.25 μ M NaH₂PO₄, 26 μ M NaHCO₃, 2 μ M CaCl₂ 和 10 μ M d-葡萄糖组成。随后,将每个切片转移到记录室中,将其放置在配备有立式显微镜(BX51W1;日本奥林巴斯)上,并用含氧的人工脑脊液连续灌注。通过连接到低感光电荷耦合设备的摄像头(710 M;DVC,美国)上的电视监视器来识别单个神经元。从垂直电极拉拔器(PIP5;HEKA,德国)购

买的硼硅酸盐玻璃贴片微电极用于全细胞膜片钳记录,尖端开口为 1~2 μm ,串联电阻为 3~5 $\text{m}\Omega$ 。将微电极充满细胞内溶液(pH 7.3)。在(2R)-氨基-5-磷酸戊酸(40 μM),士丁宁(2 μM),河豚毒素(0.5 μM)和双瓜氨酸(5 μM)的存在下,分离出 AMPA 受体介导的微型兴奋性突触后电流。使用 Clampfit 9.0(Axon Instruments,美国)分析记录数据。

1.2.4 RT-qPCR 分析促炎因子 总 RNA(1 μg)被用作 cDNA 合成的模板。使用 PrimeScript RT 试剂盒制备 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq II 在 TP800 热循环仪切丁实时系统(Takara-Bio,东京,日本)中,PCR 反应的总体积为 25 μL ,2x SYBR Premix Ex Taq II (12.5 μL),正向和反向引物 10 μM ,AMTN 为 50 ng cDNA,GAPDH 为 10 ng cDNA。制备包含除 cDNA 以外的所有试剂的 PCR 预混液,并将其等分到 0.2 mL PCR 管中。热循环的条件是在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下为 10 s,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下为 5 s 的 40 个循环,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下为 30 s 的 40 个循环。PCR 后的解链曲线证实了单靶扩增的特异性,确定了基因相对于 GAPDH 的表达。

1.2.5 蛋白质印迹 经过适当的存活时间后,麻醉下对动物实施安乐死。快速去除 L4-L5 脊髓节段并在液氮中速冻。在含有苯甲磺酰氟的冰冷却放射免疫沉淀测定缓冲液中将左背角机械均质化(Abcam,英国)。离心裂解物,并收集上清液作为总蛋白。使用膜室蛋白质提取试剂盒(美国美国生物链研究所)来提取背角的膜部分。使用二辛可宁酸测定法测定蛋白质含量。将样品在 10 %SDS-PAGE 凝胶上分离,转移到硝酸纤维素膜上,并用针对抗 AMPA 和抗 Kalirin-7,与辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育。用增强的化学发光法(Thermo Scientific,美国)使膜

结合的二抗可视化,并使用 Gene Tools Match 软件(Syngene,英国)定量。将蛋白质量计算为内源性对照(β -肌动蛋白)的百分比,然后从治疗中获得的蛋白质水平表示为与对照条件相比的百分比。

1.3 统计分析

以 SPSS 23.0 对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 t 检验,计数资料采用率(%)表示,计量资料使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 褪黑素提高大鼠的爪缩回阈值

通过机械敏感性检测不同组处理后 2 h~7 d 大鼠的爪缩回阈值,在第 2 h、2 d、3 d 和 7 d 的测试中,模型组较对照组的阈值降低($P < 0.05$),治疗组较模型组的阈值升高($P < 0.05$),见图 1,表 1。

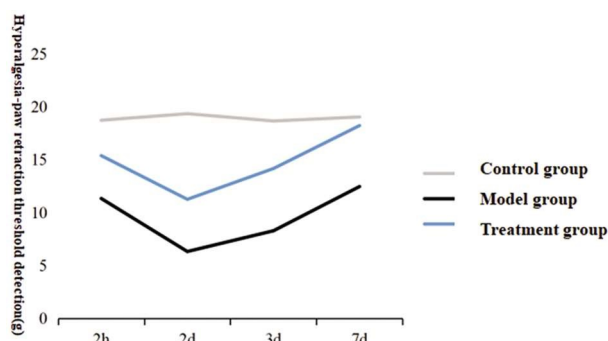


图 1 痛觉过敏性 - 爪缩回阈值检测

Fig.1 Hyperalgesia-paw retraction threshold detection

表 1 痛觉过敏性 - 爪缩回阈值检测(g)

Table 1 Hyperalgesia-paw retraction threshold detection (g)

Groups	2 h	2 d	3 d	7 d
Control group	18.73 $\pm$ 2.64	19.35 $\pm$ 2.80	18.66 $\pm$ 2.75	19.04 $\pm$ 2.79
Model group	11.34 $\pm$ 1.04*	6.33 $\pm$ 0.51*	8.29 $\pm$ 1.11*	12.47 $\pm$ 1.25*
Treatment group	15.39 $\pm$ 1.43*#	11.26 $\pm$ 1.05*#	14.17 $\pm$ 1.66*#	18.23 $\pm$ 2.01*#
F	12.302	11.719	10.036	13.251
P	0.015	0.026	0.033	0.028

Note: * compared to the control group, $P < 0.05$; #compared to the model group, $P < 0.05$.

2.2 褪黑素提高大鼠的热痛过敏性

通过热板生物仪器评估大鼠处理后的 2 h、2 d、3 d 和 7 d

的热敏性,模型组较对照组在热板上停留的时间缩短($P < 0.05$),治疗组较模型组在热板上停留的时间延长($P < 0.05$),见表 2。

表 2 痛觉过敏性 - 热痛过敏性检测(s)

Table 2 Hyperalgesia-Heat Hyperalgesia Test (s)

Groups	2 h	2 d	3 d	7 d
Control group	16.39 $\pm$ 3.47	15.93 $\pm$ 3.22	16.04 $\pm$ 3.11	15.82 $\pm$ 3.17
Model group	9.25 $\pm$ 1.30*	4.37 $\pm$ 0.64*	7.34 $\pm$ 0.95*	11.25 $\pm$ 1.44*
Treatment group	12.46 $\pm$ 1.82*#	9.83 $\pm$ 1.22*#	12.46 $\pm$ 2.85*#	13.84 $\pm$ 2.88*#
F	13.047	12.116	10.472	9.353
P	0.018	0.025	0.036	0.027

2.3 褪黑素对神经元中的树突棘重塑

对照组中约 50 μm 的树突状部分,瑞芬太尼诱导后脊柱密度增加,并且出现较大的脊柱头部结构。褪黑素治疗减少了棘的数目,并减少了诱导后的棘突的整体尺寸。通过观察组织切

片比较不同组大鼠的脊柱密度和长度,模型组较对照组的脊柱密度、脊柱长度升高($P<0.05$),治疗组较模型组的脊柱密度、脊柱长度降低($P<0.05$),见图 2,表 3。

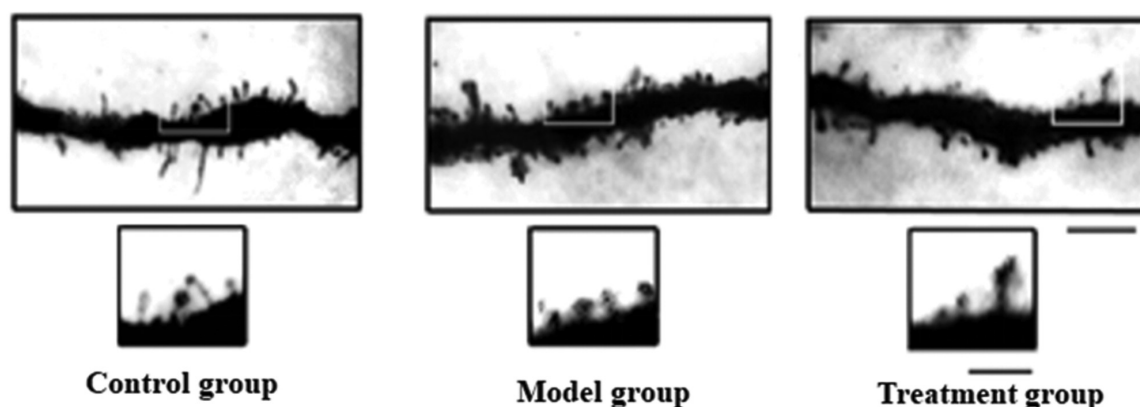


图 2 树突棘图像分析

Fig.2 Image analysis of dendritic spines

表 3 树突棘的变化

Table 3 Changes in dendritic spines

Groups	Spinal density (10 μm per cut)	Length of spine (μm)
Control group	2.63 $\pm$ 0.37	0.43 $\pm$ 0.05
Model group	12.45 $\pm$ 2.18*	1.38 $\pm$ 0.16*
Treatment group	8.37 $\pm$ 1.04*#	0.84 $\pm$ 0.11*#
F	12.339	12.116
P	0.024	0.025

2.4 褪黑素调节痛觉过敏中脊髓的电生理功能

通过低感光电荷耦合设备的摄像头监视器分析单个神经元的电生理,模型组较对照组电流幅度升高($P<0.05$);治疗

组较模型组电流幅度降低($P<0.05$),电流间隔升高($P<0.05$),见表 4。

表 4 脊髓电生理检测

Table 4 Spinal cord electrophysiological test

Groups	Current amplitude	Current intervals($\times 10^2$)
Control group	18.26 $\pm$ 2.44	5.73 $\pm$ 1.28
Model group	74.41 $\pm$ 8.33*	1.24 $\pm$ 0.35*
Treatment group	36.51 $\pm$ 4.71*#	4.13 $\pm$ 1.02*#
F	11.201	9.573
P	0.035	0.024

2.5 褪黑素抑制炎症因子的表达

通过 RT-qPCR 分析大鼠中 IL-1、TNF- α 和 IL-1 β 的 mRNA 表达,模型组较对照组表达升高($P<0.05$),治疗组较模型组表达降低($P<0.05$),见表 5。

2.6 褪黑素抑制 AMPA 和 Kalirin-7 的蛋白表达

通过蛋白印迹检测大鼠体内 AMPA 和 Kalirin-7 的蛋白表达,模型组较对照组表达升高($P<0.05$),治疗组较模型组表达降低($P<0.05$),见表 6。

3 讨论

褪黑激素可以在松果体,视网膜,结肠,卵巢,睾丸和骨髓中产生。在过去大约 10 年的大量研究表明,褪黑素是一种有效清除自由基,并在神经退行性疾病的实验模型中发挥有益作用,例如中风,AD,PD,HD 和肌萎缩性侧索硬化^[12]。此外,褪黑素还在药理学上降低了 AD 模型中 β 淀粉样蛋白形成 β 折叠的能力。最近,褪黑素还被证明可以在各种疾病实体模型(包括

表 5 促炎因子 mRNA 分析

Table 5 mRNA analysis of pro-inflammatory factors

Groups	IL-1	TNF- α	IL-1 β
Control group	1.094 $\pm$ 0.12	0.94 $\pm$ 0.08	1.11 $\pm$ 0.14
Model group	1.87 $\pm$ 0.24*	2.02 $\pm$ 0.54*	1.88 $\pm$ 0.16*
Treatment group	1.26 $\pm$ 0.17*#	1.14 $\pm$ 0.13*#	1.16 $\pm$ 0.13*#
F	11.201	9.573	12.839
P	0.035	0.024	0.004

表 6 蛋白印迹分析

Table 6 Western blot analysis

Groups	AMPA	Kalirin-7
Control group	1.094 $\pm$ 0.12	0.94 $\pm$ 0.08
Model group	1.87 $\pm$ 0.24*	2.02 $\pm$ 0.54*
Treatment group	1.26 $\pm$ 0.17*#	1.14 $\pm$ 0.13*#
F	11.201	9.573
P	0.035	0.024

轻度缺血性中风)中降低颅骨照射对神经发生的抑制作用,并增强内源性神经发生的过程^[13]。据报道,褪黑素具有抗炎和氧化的特性,可有效预防 TBI 引起的认知和运动缺陷^[14]。褪黑素还被证明可以缓解神经兴奋性谷氨酸的过度释放,抑制 γ -氨基丁酸受体。据报道褪黑素可能通过修饰 TBI 小鼠的皮质和海马树突棘形态,海马小胶质细胞增生,神经发生和神经炎症而减轻认知和运动功能障碍^[15]。本研究使用瑞芬太尼诱发的大鼠痛觉过敏模型来研究褪黑素对神经元树突棘可塑性机制性,特别是投射神经元及其树突棘的损伤的神经保护作用^[16]。结果表明,褪黑素治疗逆转了瑞芬太尼造成的树突棘受损,抑制神经性疼痛的发展。神经性疼痛与学习和记忆具有相似的机制。依赖活动的突触可塑性是神经系统重新连接以学习、存储和修改信息的基础。这种动态的突触修饰也发生在与疼痛相关的脊髓中^[17]。高频强直性刺激和低频电刺激引起的急性炎症诱导 c 纤维传入神经和背角伤害感受神经元之间的突触增强,或者中枢或外周损伤也可能导致脊髓背角的突触可塑性并有助于维持疼痛^[18]。脊柱的几何形状调节神经元的反应性和突触输入整合,成熟的棘突与诱发的突触后电位的幅度增加和潜伏期加快有关^[19]。

本研究发现输注 1.3 $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{min})$ 的瑞芬太尼引起了与切口有关的行为痛觉过敏,并促进了 Kalirin-7 和 AMPA 受体的表达,而褪黑素治疗的大鼠中抑制了两种蛋白的表达,并且有效降低了模型组大鼠的痛觉过敏性,褪黑素对大鼠脊髓背角的脊柱结构具有可塑性,褪黑素的干预抑制了瑞芬太尼诱导的背角中突触 AMPA 受体电流的增加,同时也抑制了促炎因子 IL-1、TNF- α 、IL-1 β 的表达。累积证据表明,切口干预上调了脊髓背角中含 GluA1 的 AMPA 受体的表达和运输^[20-22],术中输注瑞芬太尼进一步提高了切口诱导的含 GluA1 的 AMPA 受体的表达和运输。相反,在阿片类药物引起的痛觉过敏的大鼠中,含脊髓 GluA2 的 AMPA 受体的表达和运输保持不变^[23-25]。本研究

表明大剂量瑞芬太尼进一步上调了切口相关表达的增加激酶 M ζ 的活性和活性。我们的数据揭示了突触可塑性的分子底物,可导致瑞芬太尼引起的慢性疼痛,显示树突状脊柱重塑。由于脊柱是突触后信号转导中必不可少的结构元素,并且脊柱的形状、密度和分布会直接影响神经元对兴奋性刺激的反应^[26-28],因此我们预期瑞芬太尼造成的脊柱重塑将伴随不利的生理和行为后果。我们的数据证实,模型组大鼠对机械刺激的敏感性增加并且热伤害阈值降低,治疗组较模型组痛觉敏感性降低,这是因为褪黑素降低了脊柱长度,和脊柱密度。树突棘是兴奋性输入的主要突触后位点,主要发现在接受各种输入的神经元上,例如脊髓背角的锥体海马神经元和宽动态范围神经元。突触学习事件后,树突棘重塑,脊柱密度增加,这表明神经元已进入更可塑性的状态,更容易形成新的或更强的突触^[29]。树突棘的形态也与突触的生理功能相关。蘑菇状棘的较大头部结构允许更大的突触后膜受体聚集和数量(即 AMPA 受体),并降低了树突棘头部的阻力负荷。较窄的脊柱颈充当电化学扩散屏障,成熟的棘突加工成蘑菇状的几何形状可导致突触后膜去极化更快,更有效^[30]。我们的研究结果还表明,深背角神经元上的蘑菇脊柱密度增加,表明成熟脊髓数目的神经受损后转移可能有助于增强突触输入,增强传导保真度和电转导,这两者共同作用可能会导致痛觉后感觉信息的病理放大。

综上所述,研究发现褪黑素通过抑制 AMPA 和 Kalirin-7 的蛋白表达改善神经元树突棘可塑性,从而降低瑞芬太尼诱发的大鼠痛觉过敏。

参考文献(References)

- [1] Tuna Edizer D, Dönmez Z, Gül M, et al. Effects of Melatonin and Dexamethasone on Facial Nerve Neurotrophin [J]. J Int Adv Otol, 2019, 15(1): 43-50
- [2] Gil-Martín E, Egea J, Reiter RJ, et al. The emergence of melatonin in oncology: Focus on colorectal cancer [J]. Med Res Rev, 2019, 39(6):

- 2239-2285
- [3] Li S, Yang S, Sun B, et al. Melatonin attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage by the JAK-STAT signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(3): 909-915
- [4] Hossain MF, Uddin MS, Uddin GMS, et al. Melatonin in Alzheimer's Disease: A Latent Endogenous Regulator of Neurogenesis to Mitigate Alzheimer's Neuropathology [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56 (12): 8255-8276
- [5] Jauhari A, Baranov SV, Suofu Y, et al. Melatonin inhibits cytosolic mitochondrial DNA-induced neuroinflammatory signaling in accelerated aging and neurodegeneration [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(6): 3124-3136
- [6] Huang Y, Li Y, Leng Z. Melatonin inhibits GABAergic neurons in the hypothalamus consistent with a reduction in wakefulness[J]. *Neuroreport*, 2020, 31(2): 92-98
- [7] Tang YL, Sun X, Huang LB, et al. Melatonin inhibits MLL-rearranged leukemia via RBFOX3/hTERT and NF- κ B/COX-2 signaling pathways[J]. *Cancer Lett*, 2019, 443: 167-178
- [8] Wang Y, Wang X, Chen J, et al. Melatonin pretreatment attenuates acute methamphetamine-induced aggression in male ICR mice [J]. *Brain Res*, 2019, 1715: 196-202
- [9] Hidayat M, Chaudhry S, Salman S, et al. Melatonin Prevents Apoptosis In Brains Of Neonates Induced By Maternal Hypothyroidism [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2019, 31(4): 580-585
- [10] Liu ZJ, Ran YY, Qie SY, et al. Melatonin protects against ischemic stroke by modulating microglia/macrophage polarization toward anti-inflammatory phenotype through STAT3 pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(12): 1353-1362
- [11] Wang J, Jiang C, Zhang K, et al. Melatonin receptor activation provides cerebral protection after traumatic brain injury by mitigating oxidative stress and inflammation via the Nrf2 signaling pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131: 345-355
- [12] Muhammad T, Ali T, Ikram M, et al. Melatonin Rescue Oxidative Stress-Mediated Neuroinflammation/ Neurodegeneration and Memory Impairment in Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2019, 14(2): 278-294
- [13] Tamtaji OR, Mirhosseini N, Reiter RJ, et al. Melatonin, a calpain inhibitor in the central nervous system: Current status and future perspectives[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 1001-1007
- [14] Hosseinzadeh A, Kamrava SK, Moore BCJ, et al. Molecular Aspects of Melatonin Treatment in Tinnitus: A Review[J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(11): 1112-1128
- [15] Figueiró PW, Moreira DS, Dos Santos TM, et al. The neuroprotective role of melatonin in a gestational hypermethioninemia model[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2019, 78: 198-209
- [16] Tan HY, Ng KY, Koh RY, et al. Pharmacological Effects of Melatonin as Neuroprotectant in Rodent Model: A Review on the Current Biological Evidence[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(1): 25-51
- [17] Aranarochana A, Chaisawang P, Sirichoat A, et al. Protective effects of melatonin against valproic acid-induced memory impairments and reductions in adult rat hippocampal neurogenesis [J]. *Neuroscience*, 2019, 40(6): 580-593
- [18] Andrabí SS, Vishnoi S, Kaushik M, et al. Reversal of Schizophrenia-like Symptoms and Cholinergic Alterations by Melatonin [J]. *Arch Med Res*, 2019, 50(5): 295-303
- [19] Esparza JL, Gómez M, Domingo JL. Role of Melatonin in Aluminum-Related Neurodegenerative Disorders: a Review [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2019, 188(1): 60-67
- [20] Shukla M, Chinchalongporn V, Govitrapong P, et al. The role of melatonin in targeting cell signaling pathways in neurodegeneration [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2019, 1443(1): 75-96
- [21] Wang C, Xu R, Wang X, et al. Spinal CCL1/CCR8 regulates phosphorylation of GluA1-containing AMPA receptor in postoperative pain after tibial fracture and orthopedic surgery in mice [J]. *Neurosci Res*, 2020, 154(5): 20-26
- [22] Cho JH, Lee DG. Translocation of AMPA Receptors in the Dorsal Horn of the Spinal Cord Corresponding to Long-term Depression Following Pulsed Radiofrequency Stimulation at the Dorsal Root Ganglion[J]. *Pain Med*, 2020, 21(9): 1913-1920
- [23] Wang Z, Tao Y, Song C, et al. Spinal hevin mediates membrane trafficking of GluA1-containing AMPA receptors in remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 722(5): e134855
- [24] Cui W, Li Y, Wang Z, et al. Spinal caspase-6 regulates AMPA receptor trafficking and dendritic spine plasticity through netrin-1 in postoperative pain after orthopedic surgery for tibial fracture in mice[J]. *Pain*, 2020[Online ahead of print]
- [25] Liu P, Song C, Wang C, et al. Spinal SNAP-25 regulates membrane trafficking of GluA1-containing AMPA receptors in spinal injury-induced neuropathic pain in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 715 (1): e134616
- [26] Yasmin F, Colangeli R, Morena M, et al. Stress-induced modulation of endocannabinoid signaling leads to delayed strengthening of synaptic connectivity in the amygdala [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(1): 650-655
- [27] Zieger HL, Kunde SA, Rademacher N, et al. Disease-associated synaptic scaffold protein CNK2 modulates PSD size and influences localisation of the regulatory kinase TNIK [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): e5709
- [28] Simonetti M, Kuner R. Spinal Wnt5a Plays a Key Role in Spinal Dendritic Spine Remodeling in Neuropathic and Inflammatory Pain Models and in the Proalgesic Effects of Peripheral Wnt3a[J]. *J Neurosci*, 2020, 40(35): 6664-6677
- [29] Wang YQ, Wang J, Xia S, et al. Neuropathic pain generates silent synapses in thalamic projection to anterior cingulate cortex [J]. *Pain*, 2020[Online ahead of print]
- [30] Albanesi JP, Barylko B, DeMartino GN, et al. Palmitoylated Proteins in Dendritic Spine Remodeling [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2020, 12 (6): e22