

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00077

## 犬急性膝关节炎炎症期滑膜组织 $\mu$ -阿片受体的表达

袁红斌\*, 蒋京京, 刘 虎, 田谋利, 何星颖, 宋哲明

第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

**[摘要]** **目的:**观察犬急性膝关节炎炎症期滑膜组织  $\mu$ -阿片受体(mu-opioid receptors, MOR)表达的变化,探讨急性炎症外周局部应用阿片类药物镇痛的可行性。**方法:**17只 Beagle 犬随机分为正常对照组( $n=8$ )和急性感染性炎症组( $n=9$ ),取各组犬膝关节滑膜组织,采用免疫组织化学及 real-time PCR 方法检测滑膜组织 MOR 蛋白及 mRNA 的表达。**结果:**急性感染性炎症组犬膝关节滑膜组织 MOR mRNA 相对表达量明显高于正常对照组 $[(34.40 \pm 5.48) \% \text{ vs } (16.54 \pm 8.03) \%]$ ,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫组化染色见炎症滑膜组织 MOR 染色阳性产物较正常对照颗粒增粗、着色加深、染色带增宽、数量增多;与正常滑膜组织相比,急性感染性炎症组滑膜组织 MOR 阳性细胞免疫组化指数显著增高 $[(323\ 175.00 \pm 92\ 614.94) \text{ vs } (175\ 444.10 \pm 75\ 149.06)]$ ,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**犬膝关节滑膜组织中存在 MOR,且在急性感染性炎症早期其表达显著增强。

**[关键词]** 炎症;膝关节;滑膜; $\mu$ -阿片受体

**[中图分类号]** R 684.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0077-03

### Expression of $\mu$ -opioid receptor in synovium tissue in acute inflamed knee joint of dogs

YUAN Hong-bin\*, JIANG Jing-jing, LIU Hu, TIAN Mou-li, HE Xing-ying, SONG Zhe-ming

Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the changes of mu-opioid receptors (MOR) expression in acute inflamed knee joint synovium tissue of dogs, so as to discuss the feasibility of using peripheral local opioid for analgesia in acute inflammation. **Methods:** Knee joint synovium tissues were taken from 9 dogs with acute arthritis and 8 dogs with normal knee joints. The expression of MOR protein and mRNA was examined by immunohistochemistry and real-time quantitative PCR. **Results:** The expression of MOR mRNA in the acute inflamed group was significantly higher than that in the normal control group  $[(34.40 \pm 5.48) \% \text{ vs } [16.54 \pm 8.03] \%, P < 0.05]$ . Immunohistochemical result showed more positive staining of MOR particles and stronger signal in the acute arthritis group than in normal control group. The immunohistochemical index of MOR positive cells in the acute arthritis was significantly higher than that in normal control group  $[(323\ 175.00 \pm 92\ 614.94) \text{ vs } [175\ 444.10 \pm 75\ 149.06], P < 0.05]$ . **Conclusion:** MOR exists in the knee joint synovium tissue of dogs, and acute inflammation can enhance the expression of MOR.

**[KEY WORDS]** inflammation; knee joint; synovial membrane; mu-opioid receptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 77-79]

随着疼痛治疗方法的不断发展,对阿片类药物作用途径和机制的研究日趋深入。国外研究<sup>[1-3]</sup>证实阿片类药物可以在外周炎症组织中产生局部镇痛效果,并认为该效应可能与外周组织中存在阿片受体有关。我们前期研究<sup>[4-5]</sup>证实成人膝关节滑膜组织中存在  $\mu$ -阿片受体(mu-opioid receptors, MOR),且在慢性炎症状态下表达上调,提示外周局部应用

阿片类药物能够缓解慢性炎症的疼痛。为进一步评价外周局部应用阿片类药物对急性炎症的镇痛效果,本研究以急性感染性膝关节炎犬模型为背景,测定急性炎症条件下外周局部组织中 MOR 蛋白及 mRNA 表达的变化,为探讨急性炎症外周局部应用阿片类药物镇痛的可行性奠定实验基础,为急性感染性关节创伤的疼痛治疗提供新途径。

**[收稿日期]** 2007-09-03 **[接受日期]** 2007-11-20

**[基金项目]** 军队“十一五”面上项目(06MB223);长征医院“三重三优”人才建设基金。Supported by the Military “Eleventh Five-Year” Plan (06MB223) and the Key Superior Program of Changzheng Hospital.

**[作者简介]** 袁红斌,博士,副教授、副主任医师。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25073525, E-mail:yuan-hongb@sina.com

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 将金黄色葡萄球菌临床分离株溶于生理盐水,由麦氏比浊仪比浊后制成密度相当于 $1 \times 10^8$ /ml的金黄色葡萄球菌悬液,密闭于试管中。山羊抗人 MOR 多克隆抗体(稀释度 1:200, Santa Cruz Co.),兔抗山羊 IgG(稀释度 1:200, Dako Co.)。TRIzol 试剂盒(Gibco 公司),PCR 试剂盒(Promaga 公司),DEPC(博彩生物技术公司),Taq DNA 聚合酶及其缓冲液(Gibco 公司),ddH<sub>2</sub>O、氯仿、异丙醇等购自中国医药集团上海化工试剂公司。Real-time PCR 检测仪(7300 Sequence Detection System, ABI-7300, 美国),Olympus-BH-2 光学显微镜(日本),MIAS-2000 病理图像分析仪(四川大学图像图形研究所)。

1.2 动物分组及处理 17 只健康 Beagle 犬,体重 10~12 kg,雌雄不限,购自上海虹湾犬类养殖场。随机分为急性感染性炎症组( $n=9$ )和正常对照组( $n=8$ )。急性感染性炎症组犬麻醉后双侧后肢膝关节腔内注射金黄色葡萄球菌悬液 1 ml,建立急性感染性炎症动物模型,正常饲养;正常对照组不作处理。24 h 后取双侧后肢膝关节腔内滑膜组织及关节液,离体后迅速将滑膜组织标本置液氮中保存备用。关节腔内抽取液培养出金黄色葡萄球菌,则为急性感染性炎症模型制备成功。

1.3 实时聚合酶链反应(real-time quantitative PCR, QT-PCR)测定膝关节滑膜组织 MOR mRNA 的表达

1.3.1 引物和探针 MOR 上游引物 F:5'-TCT TCT ATA CTC TTC GAG CCT ATG C-3',下游引物 R:5'-TCT ATC CAC AGG TCC TCC TTC AG-3';MOR 探针 5'-FAM-CGG CTT GAG TTC ACC ACC TAC CTC TTC GG-TAMRA-3'。以上引物及探针均由广州达安基因公司合成。

1.3.2 TRIzol 法提取组织总 RNA 组织块置匀浆器,加入 1 ml TRIzol 液,匀浆;22℃ 静置 5 min;加入氯仿 0.2 ml,颠倒 15 s;22℃ 静置 3 min;4℃ 12 000×g 离心 15 min;取上清液 0.5 ml,加入 0.5 ml 异丙醇,混匀;22℃ 静置 10 min;4℃ 12 000×g 离心 10 min;弃上液,加入 1 ml 4℃ 75%乙醇;4℃ 10 000×g 离心 5 min;弃上液,真空干燥 5 min。用 25 μl DEPC 处理水溶解 RNA,-70℃ 保存备用。

1.3.3 逆转录 cDNA 37℃ 1 h,95℃ 5 min;灭活 MMLV。

1.3.4 TaqMan real-time PCR 检测 构建扩增体

系:5×PCR buffer 10 μl,上游引物 F 0.5 μl,下游引物 R 0.5 μl,dNTPs 0.5 μl,标记荧光探针 0.5 μl,Taq 酶 1 μl,ddH<sub>2</sub>O 32 μl,cDNA 模板 5 μl,总体积 50 μl,放入 PCR 仪板槽中;依扩增条件行 PCR 反应。扩增条件:93℃ 2 min;93℃ 45 s,55℃ 1 min,10 个循环;93℃ 30 s,55℃ 45 min,30 个循环。反应完保存数据。每个样品靶基因的相对 mRNA 表达水平 =  $2^{-\Delta Ct} \times 100\%$ ,其中  $\Delta Ct$  (threshold cycle) 值 = 靶基因 Ct 值 - GAPDH 或  $\beta$ -actin Ct 值。

1.4 免疫组织化学测定膝关节滑膜组织 MOR 蛋白的表达 取膝关节滑膜组织,制备石蜡切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇溶液室温孵育 30 min 消除内源性过氧化酶活性,1% BSA(或正常山羊血清)37℃ 封闭 30 min 以清除非特异性反应位点。弃血清,滴加山羊抗人 MOR 多克隆抗体,4℃ 过夜。0.01 mol/L PBS 振洗 3 次,每次 5 min,滴加兔抗山羊 IgG,37℃ 孵育 30 min。DAB 显色,终止后,苏木精复染 3 min,常规脱水,透明,封片。在 Olympus-BH-2 型显微镜下观察拍照。镜下观察胞质或胞核有棕色颗粒者为阳性细胞。用 MIAS-2000 病理图像分析系统测定 MOR 颗粒的光密度  $D$  值,计算免疫组化指数,半定量分析 MOR 表达量。免疫组化指数 = 阳性面积 ×  $D$  (总面积 = 351 000 像素点,阳性面积 1 个像素点 =  $0.71 \mu\text{m}^2$ )。

1.5 统计学处理 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行非配对  $t$  检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 膝关节滑膜组织 MOR mRNA 的表达 急性感染性炎症组、正常对照组分别有 2 例、3 例标本的数据因取材不慎致样本检测结果偏差过大而予以剔除。Real-time PCR 检测结果显示:急性感染性炎症组膝关节滑膜组织 MOR mRNA 相对表达量明显高于正常滑膜组织 [ $(34.40 \pm 5.48)\%$  vs  $(16.54 \pm 8.03)\%$ ],差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.2 膝关节滑膜组织 MOR 蛋白的表达 免疫组化染色可见:正常滑膜组织 MOR 染色阳性产物呈点状、串珠状或索状分布(图 1A);炎症滑膜组织 MOR 染色阳性产物较对照组相应部位颗粒增粗、着色加深、数量增多、染色带增宽(图 1B)。与正常滑膜组织相比,急性感染性炎症组滑膜组织 MOR 阳性细胞免疫组化指数显著增高 [ $(323.175.00 \pm 92.614.94)$  vs  $(175.444.10 \pm 75.149.06)$ ],差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

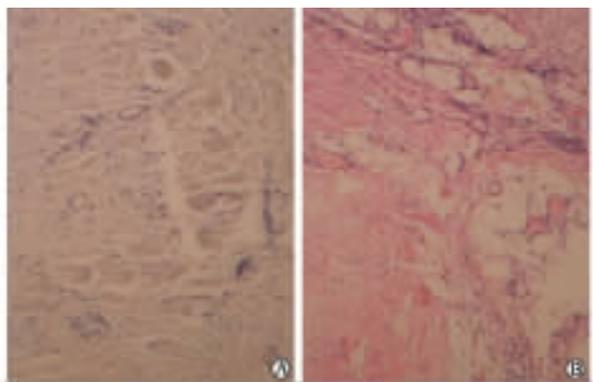


图1 正常对照组(A)和急性感染性炎症组(B)犬膝关节滑膜组织 MOR 蛋白免疫组化染色结果

Fig 1 Immunohistochemical distribution of MOR positive signal in normal control group(A) and acute inflammation group(B)  
Original magnification:  $\times 100$

### 3 讨论

外周部位阿片受体的发现提示局部使用阿片类药物可以达到镇痛的目的。局部应用阿片类药物具有用量少、有效血药浓度高、镇痛效果确切的优点,还可避免全身用药的不良反应(尿潴留、呼吸循环抑制等)。近年来,国内外的动物实验和临床研究<sup>[6-8]</sup>发现,慢性炎症膝关节局部应用小剂量阿片类药物可获得较好的镇痛效果。McDougall 等<sup>[9]</sup>和 Watterson 等<sup>[10]</sup>学者发现,该镇痛效应可能与慢性炎症反应状态外周部位 MOR 数量或亲和力的变化有关,并认为此机制是外周局部应用阿片类药物镇痛的基础之一。然而 Li 等<sup>[11]</sup>的后续研究发现慢性膝关节炎症状态下 MOR 基因表达可下降。因此,我们前期应用免疫组化、流式细胞术及 RT-PCR 技术检测了成人慢性膝关节炎滑膜组织 MOR 蛋白及基因表达情况,发现成人慢性膝关节炎滑膜组织 MOR 蛋白及基因均表达上调<sup>[4]</sup>,进一步将其应用于膝关节镜术后局部镇痛,也取得较好疗效<sup>[8]</sup>。

急性炎症状态下,炎症局部组织产生大量炎症细胞因子,伴随相关致痛物质的释放,甚至会诱发疼痛超敏状态<sup>[12]</sup>。此时,局部应用阿片类药物可激活感觉神经末梢分布的阿片受体产生镇痛作用;而局部感觉神经末梢阿片受体短期内的表达增加会进一步促使药物与高密度阿片受体发挥更有效的镇痛作用。本研究采用免疫组化和实时聚合酶链反应方法,测定正常滑膜组织和急性炎症期犬膝关节滑膜组织 MOR 蛋白和 mRNA 的表达变化。结果表明,急性感染性炎症时膝关节滑膜组织内 MOR 蛋白及 mRNA 表达较正常组织显著增高( $P < 0.05$ )。这提示犬膝关节滑膜组织中存在 MOR,且在炎症早期其

表达即显著增强,理论上讲小剂量阿片类药物早期局部应用可缓解急性炎症疼痛。

本研究证实犬膝关节滑膜组织中存在阿片受体,且在急性炎症早期表达明显增加。此结果为临床应用小剂量阿片类药物早期治疗外周急性炎症疼痛提供了理论依据,对于战伤条件下急性感染性关节创伤的救治具有重要意义,可为平、战时疼痛创伤救治提供了一个新的途径。

(志谢 本研究得到上海中医药大学实验动物中心汤家铭教授和第二军医大学基础部组织胚胎学教研室胡世杰老师的支持和帮助,在此一并表示感谢!)

### [参考文献]

- [1] Oeltjenbruns J, Schäfer M. Anwendungsmöglichkeiten und Stellenwert der peripheren opioidanalgesie. [Potential applications and significance of peripheral opioid analgesia][J]. Schmerz, 2005, 19: 447-452, 454-455.
- [2] Oeltjenbruns J, Schäfer M. Peripheral opioid analgesia; clinical applications[J]. Curr Pain Headache Rep, 2005, 9: 36-44.
- [3] Janson W, Stein C. Peripheral opioid analgesia[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2003, 4: 270-274.
- [4] Yuan H B, He X Y, Xu H T, Zhu Q F, Wang Y H, Shi X Y. Expression of mu-opioid receptors in human chronic inflamed knee joint synovium tissue[J]. J Med Coll PLA, 2006, 21: 397-400.
- [5] 袁红斌, 刘 虎, 田谋利, 石学银. 成人慢性膝关节炎滑膜组织中 G 蛋白及 cAMP 的表达变化[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 1027-1028.
- [6] Back S K, Lee J, Hong S K, Na H S. Loss of spinal mu-opioid receptor is associated with mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathy[J]. Pain, 2006, 123(1-2): 117-126.
- [7] Baamonde A, Lastra A, Juarez L, Garcia V, Hidalgo A, Menendez L. Effects of the local administration of selective mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists on osteosarcoma-induced hyperalgesia [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2005, 372: 213-219.
- [8] 袁红斌, 王成才, 傅 强, 胡世杰, 石学银, 王新华. 小剂量吗啡关节内注射用于膝关节镜术后镇痛的临床观察及机制探究[J]. 临床麻醉学杂志, 2003, 19: 667-669.
- [9] McDougall J J, Baker C L, Hermann P M. Attenuation of knee joint inflammation by peripherally administered endomorphin-1 [J]. J Mol Neurosci, 2004, 22(1-2): 125-137.
- [10] Watterson G, Howard R, Goldman A. Peripheral opioids in inflammatory pain[J]. Arch Dis Child, 2004, 89: 679-681.
- [11] Li Z, Proud D, Zhang C, Wiehler S, McDougall J J. Chronic arthritis down-regulates peripheral mu-opioid receptor expression with concomitant loss of endomorphin 1 antinociception[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52: 3210-3219.
- [12] Loria M P, Dambra P, Moretti B, Patella V, Capuzzimati L, Cavallo E, et al. Role of cytokines in gonarthrosis and knee prosthesis aseptic loosening[J]. J Orthop Sci, 2004, 9: 274-279.

[本文编辑] 贾泽军