

# 急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达的影响

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵

## ■背景资料

机体遭受严重的创伤应激后,常出现与胃肠道功能紊乱有关的许多症状。消化系统疾病一直是历次战争中的高发疾病,军事应激导致的损伤是部队非战斗减员的主要原因之一。疼痛是战争创伤引起的常见症状,特别是慢性疼痛,也是近年来影响人们身心健康的主要因素之一,但其对消化系统功能的影响仍没有系统的研究。

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵, 中国人民解放军南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所 江苏省南京市 210002

国家自然科学基金资助项目, No. 30770801

全军“十一五”医药卫生科研基金资助项目, No. 06H011

作者贡献分布: 课题设计由姚兵与卢坤刚完成; 研究操作由卢坤刚、韩雪峰及时姗姗完成; 数据分析由卢坤刚、张艳梅、柳海燕及陶晓倩完成; 研究所用试剂及仪器设备由姚兵提供。

通讯作者: 姚兵, 教授, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 中国人民解放军南京军区南京总医院解放军临床检验医学研究所. yaobingliang@yahoo.com.cn

电话: 025-80860174

收稿日期: 2009-08-28 修回日期: 2009-10-29

接受日期: 2009-11-02 在线出版日期: 2009-11-18

## Formalin-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats

Kun-Gang Lu, Xue-Feng Han, Yan-Mei Zhang, Shan-Shan Shi, Hai-Yan Liu, Xiao-Qian Tao, Bing Yao

Kun-Gang Lu, Xue-Feng Han, Yan-Mei Zhang, Shan-Shan Shi, Hai-Yan Liu, Xiao-Qian Tao, Bing Yao, Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30770801; and the Military Medical and Health Research Program during the Eleventh Five-Year Plan Period, No. 06H011

Correspondence to: Professor Bing Yao, Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese, 305 Zhongshan East Road, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. yaobingliang@yahoo.com.cn

Received: 2009-08-28 Revised: 2009-10-29

Accepted: 2009-11-02 Published online: 2009-11-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the effects of formalin-induced acute pain on the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of Sprague-Dawley (SD) rats.

**METHODS:** Acute pain was induced in SD rats by subcutaneous injection of 2 mL of 50 g/L formalin into the plantar surface of the left hind-paw. Control rats were injected with equal vol-

ume of normal saline solution. The samples of the stomach and submandibular gland were collected under terminal anaesthesia with ketamine (40 mg/kg) at 1, 6, 24 and 72 h after formalin injection. The expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland was analyzed by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR).

**RESULTS:** Fluorescent quantitative PCR showed that the expression of annexin 5 mRNA in the stomach significantly increased at 1 h after formalin injection compared to that in control mice ( $7.43 \pm 2.67$  vs  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ), and then decreased to basic level at 6 h ( $P > 0.05$ ). In the submandibular gland, the expression of annexin 5 mRNA also increased at 1 h after formalin injection ( $4.33 \pm 1.50$  vs  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ), and returned to normal level at 72 h ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Formalin injection-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats. Annexin 5 may be an acute stress response protein in the digestive system.

**Key Words:** Pain induction; Stomach; Submandibular gland; Annexin 5; Fluorescent quantitative PCR

Lu KG, Han XF, Zhang YM, Shi SS, Liu HY, Tao XQ, Yao B. Formalin-induced acute pain upregulates the expression of annexin 5 mRNA in the stomach and submandibular gland of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(32): 3328-3331

## 摘要

**目的:** 研究在甲醛(formalin)致炎的急性疼痛应激状态下SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达水平的变化。

**方法:** 单侧后足底皮下注射0.2 mL, 甲醛溶液(50 g/L), 建立SD大鼠的急性疼痛应激模型, 对照组注射等量的生理盐水。实验组与其相应的对照组大鼠分别在注射后1、6、24和72 h用氯胺酮(50 mg/kg)麻醉处死。通过荧光定量

## ■同行评议者

季国忠, 教授, 南京医科大学第二附属医院消化科; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

PCR分析急性疼痛应激对大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达水平的影响。

**结果:** 荧光定量PCR结果表明, 在甲醛注射后1 h胃中annexin 5 mRNA水平与对照组相比显著升高( $7.43 \pm 2.67$  vs  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ), 至6 h恢复到正常水平( $P > 0.05$ ); 注射后1 h, 颌下腺中annexin 5 mRNA水平也显著升高( $4.33 \pm 1.50$  vs  $1.00 \pm 0.00$ ,  $P < 0.01$ ), 并持续到24 h, 至72 h恢复到正常水平。

**结论:** annexin 5可能是消化系统应激反应蛋白, 急性疼痛可能通过annexin 5影响胃及颌下腺的功能。

**关键词:** 疼痛应激; 甲醛; 胃; 颌下腺; annexin 5; 荧光定量PCR

卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 时姗姗, 柳海燕, 陶晓倩, 姚兵. 急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(32): 3328-3331  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3328.asp>

## 0 引言

应激状态下机体的消化和免疫系统将受到很大的影响, 应激性肠胃病是部队非战斗减员一个重要原因, 且以功能性胃肠病为主。研究表明身心应激能引起胃肠道即刻早期基因mRNA水平显著升高<sup>[1]</sup>, 这些基因的迅速表达可能启动应激诱导的黏膜损伤的修复机制, 也可能使胃肠道对应激源产生适应。因此, 研究这些基因在应激状态下表达变化将有助于探讨应激对消化功能影响的具体机制。疼痛是由伤害性刺激引起的一种应激反应, 也是战争创伤引起的常见症状。因此, 我们建立急性疼痛模型模拟战争创伤并研究SD大鼠胃及颌下腺中潜在相关基因表达变化, 为研究功能性胃肠病提供新的线索。annexin 5是一种Ca<sup>2+</sup>依赖的磷脂酰丝氨酸结合蛋白, 并参与形成磷脂膜及Ca<sup>2+</sup>通道, 有研究表明annexin 5具有抗炎和抗凝血作用, 能抑制PKC的活性。我们之前的研究表明, 甲醛注射能诱导SD大鼠胃及颌下腺中annexin 5蛋白水平的升高, 因此, annexin 5可能参与了胃及颌下腺对急性疼痛应激的反应。本研究在此基础上进一步探讨annexin 5 mRNA水平在急性疼痛应激状态下的变化, 有助于了解急性疼痛应激影响消化系统annexin 5表达的机制。

## 1 材料和方法

1.1 材料 清洁级SD ♂ 大鼠60只, 由中国人民解放军

放军南京军区南京总医院动物比较医学科提供, 体质量310-350 g, 随机分为5组, 每组各12只。动物实验房实验前清洁、消毒。温度22℃±2℃; 光控为07:00-19:00光照, 19:00-次日07:00黑暗。TRIzol试剂(Invitrogen公司), 焦炭酸二乙酯(Amrscos公司), 反转录试剂盒(Promega公司), 即用型Taq酶PCR试剂盒(上海GeneRay Biotech公司), 引物及Taqman探针(上海英骏生物公司合成), 异丙醇、氯仿、无水乙醇均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 引物及Taqman探针的设计与合成: 参照Barlow *et al*<sup>[2]</sup>的研究, 在GenBank上查找大鼠annexin 5及Rpl19的mRNA序列, 取其保守区, 使用Premier Primer 5.0设计引物及Taqman探针(5'FAM、3'TAMRA双标记), 由上海英俊生物技术有限公司合成。annexin 5(产物长度94 bp): 上游引物: 5'-GAGACCCTGACACTGCAATTG-3', 下游引物: 5'-TCATCCGTCCCCCACTTC-3', Taqman探针: 5'-CTCAGGCATTGTTCCAGGCTGGAGA-3'; Rpl19(产物长度96 bp): 上游引物: 5'-CATGAGTATGCTTAGGCTACAGAAG-3', 下游引物: 5'-GCGATTTTCGTTGGTTTCATT-3', Taqman探针: 5'-CGCTGTGGTAAAAAGAAGGTGTGGTTG-3'。

1.2.2 甲醛致炎的急性疼痛模型制备: 按照Dubuisson *et al*<sup>[3]</sup>的方法建立疼痛模型并进行评分, 动物实验前先进行30 min适应, 然后, 在大鼠左侧后足底皮下注射50 g/L甲醛0.2 mL, 对照组注射等量的生理盐水。实验动物被放入30 cm×30 cm×30 cm的聚丙烯透明容器内, 并在下面放一面镜子成45度角用于观察大鼠疼痛行为, 并进行评分。评分在注射完毕后立即开始, 持续50 min, 每5 min计算1次。评分方法: 注射足仍能正常支撑体质量, 记为0分; 注射足能支撑一点体质量或不支持, 运动时跛行, 记为1分; 注射足抬起, 悬在空中, 不接触容器, 记为2分; 舔、咬注射足或注射足颤抖, 记为3分。对以上各级评分以5 min为单元作一加权平均, 作为大鼠对注射甲醛的疼痛计分。加权平均(pain score) =  $\sum pt/5$  (即5 min为单元, pt数值相加除5), p为大鼠特定疼痛反应的指数(如上0, 1, 2, 3), t为此行为反应所持续的时间。

1.2.3 取材: 实验组、对照组在相应时间段按50 mg/kg体质量注射盐酸氯胺酮麻醉后, 心脏取血处死。分别取胃及颌下腺组织放入预冷的0.01 mol/L PBS(pH7.4)中冲洗干净后放入液氮内保存。

## ■ 研发前沿

现已证明annexin 5蛋白在消化系统中广泛存在, 且应激状态下其表达水平显著变化, 因此, 研究应激状态下annexin 5表达变化可能有助于解释应激性消化系统疾病发生的机制。

## ■ 相关报道

刘婧 *et al*通过水浸束缚应激模型的研究表明细胞凋亡是急性胃黏膜损伤过程中细胞死亡的重要形式。Veenstra *et al*报道应激引发的胃肠道损伤可能是其引发胃肠道局部缺血所致。许多annexin蛋白家族的成员都参与了机体的应激反应。Wen *et al*报道annexin 5可通过与血管内皮生长因子受体(VEGFR)结合调节信号的传递, 并具有抗凝血作用。

## ■创新盘点

本研究首次在甲醛致炎的急性疼痛模型基础上研究annexin 5在消化器官中的表达,将有助于探讨应激对消化功能影响的具体机制,为研究功能性胃肠病提供新的线索。

表 1 急性疼痛应激后大鼠胃及颌下腺中annexin 5 mRNA相对表达量 ( $n = 5$ , mean  $\pm$  SD)

组织	对照组	实验组			
		1 h	6 h	24 h	72 h
胃	1.00	7.43 $\pm$ 2.67 <sup>b</sup>	1.16 $\pm$ 0.17	1.05 $\pm$ 0.24	0.66 $\pm$ 0.20
颌下腺	1.00	4.33 $\pm$ 1.50 <sup>d</sup>	5.78 $\pm$ 3.00 <sup>d</sup>	9.38 $\pm$ 4.24 <sup>d</sup>	1.75 $\pm$ 1.27

<sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 胃对照组; <sup>d</sup> $P < 0.01$  vs 颌下腺对照组。

**1.2.4 总RNA的提取:** 将胃或颌下腺组织在液氮中磨碎,按每50-100 mg组织加入0.5 mL TRIzol匀浆,最后补加0.5 mL TRIzol,样品的体积不应超过TRIzol体积的10%。然后,于4℃、12 000  $g$ 离心15 min。取上清液置另一EP管中,每管加入0.2 mL氯仿,剧烈震荡15 s混匀。将匀浆的样品在室温下(15℃-30℃)放置3-5 min,使核酸蛋白质复合物完全分离。然后,于4℃、12 000  $g$ 离心15 min,样品分为3层,底层为黄色的有机相,上层为无色的水相和一个中间相。RNA主要存在于水相中,将水相转移到新的EP管中,用异丙醇沉淀水相中的RNA,每用1 mL TRIzol加入0.5 mL的异丙醇,于室温放置10 min。然后于4℃、12 000  $g$ 离心10 min,离心管底部会出现胶状RNA沉淀。移去上清,每管加入1 mL、750 mL/L的乙醇洗涤沉淀并于4℃、12 000  $g$ 离心5 min。移去上清,沉淀在室温下干燥5-10 min,用适量的DEPC水溶解RNA沉淀,用分光光度计测其浓度及纯度。

**1.2.5 反转录:** 使用Promega A3500反转录试剂盒按照操作说明进行反转录反应。反应体系为: 5×AMV Buffer 5.0  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 2.5  $\mu$ L、Olig dT 1.0  $\mu$ L、焦磷酸钠2.5  $\mu$ L、AMV反转录酶1  $\mu$ L(10 U/ $\mu$ L), RNA模板3  $\mu$ g,加无核酶水至25  $\mu$ L。42℃反应60 min, 94℃ 5 min灭活反转录酶,反应产物于-20℃保存待用。

**1.2.6 实时荧光定量PCR:** 使用ABI Prism 7000 PCR仪按照以下条件进行荧光定量PCR反应。反应体系为: 2×Taq酶PCR反应混合液12.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu$ L、引物1(10 pmol/L)1.5  $\mu$ L、引物2(10 pmol/L)1.5  $\mu$ L、Taqman探针(10 pmol/L)1.0  $\mu$ L、cDNA模板2.0  $\mu$ L。反应条件为: 94℃预变性2 min, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40个循环。反应结束后以Rpl19基因为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值法计算annexin 5 mRNA的相对含量。

**统计学处理** 全部数据均用SPSS15.0统计软件进行单因素方差分析,组间比较采用LSD法,  $P$ 值反映各组间的差异,  $P < 0.05$ 表示差异有

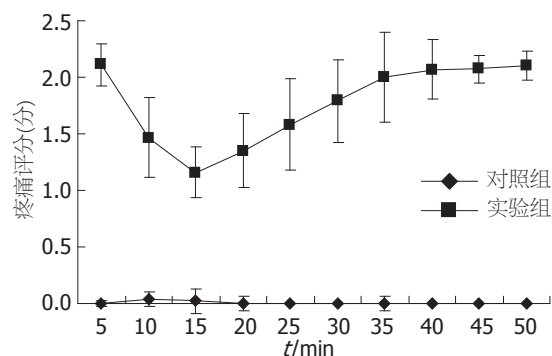


图 1 甲醛注射后对照组与实验组大鼠疼痛评分。

统计学意义。

## 2 结果

**2.1 动物模型制备情况** SD大鼠左后肢足底皮下注射甲醛后,均出现完全抬起,肢体颤抖、跛行,并舔、咬注射足等行为反应。这些行为呈明显的两期性反应。注射足在注射30 min后开始出现红肿,并且持续到第3天红肿仍不退去。对照组注射生理盐水后,无上述明显的疼痛行为反应。实验组大鼠疼痛评分显著高于对照组( $P < 0.05$ , 图1)。

**2.2 实时荧光定量PCR结果** 甲醛注射后1 h,胃组织中annexin 5 mRNA水平显著升高( $P < 0.01$ ),至6 h恢复到正常水平( $P > 0.05$ )。甲醛注射后1 h,颌下腺中annexin 5 mRNA水平也显著升高( $P < 0.01$ ),并持续到24 h,至72 h恢复到正常水平(表1)。

## 3 讨论

甲醛是一种常用的炎性介质,注射甲醛是诱导损伤疼痛及评价镇痛药效的一种常用的方法<sup>[4-5]</sup>。本研究中,甲醛注射后大鼠的疼痛行为呈明显的两相期反应,与前人报道的一致,且实验组大鼠疼痛评分显著高于对照组,表明我们成功建立了甲醛致炎的急性疼痛模型。一般认为I期反应是由于注射器针头刺入皮下后初级传入神经纤维激活所致,II期反应可能是由于局部的一些活性物质,如局部5-HT的释放,导致初



级传入神经纤维敏化及脊髓背角神经元的激活引起的<sup>[6]</sup>。急性应激状态下, HPA轴的激活是应激反应的主要特征, 甲醛注射能引起血清泌乳素(prolactin, PRL)和糖皮质激素(glucocorticoid, GC)短暂而迅速的升高<sup>[7]</sup>。研究表明烧伤应激初期, CCK-8分泌增加<sup>[8]</sup>, CCK-8能增强甲醛诱导的疼痛反应, 并可导致胃动力紊乱<sup>[9]</sup>。因此, 甲醛注射引起的急性疼痛应激可能对消化系统的功能造成一定的影响。

我们先前的研究表明, 甲醛注射引起的急性疼痛能诱导大鼠胃和颌下腺中annexin 5蛋白表达水平升高<sup>[10]</sup>。本研究表明, annexin 5的这种变化起始于转录水平, 甲醛注射引起的疼痛应激可能通过迷走神经影响胃肠道的功能<sup>[11]</sup>。甲醛注射1 h后胃和颌下腺中annexin 5 mRNA水平都显著升高, 但高水平的mRNA在胃中只维持1 h, 而在颌下腺中却能持续到24 h, 因此, 颌下腺对甲醛注射引起的急性疼痛较为敏感。这种不同的表达时相表明, 除了参与对疼痛应激的反应, annexin 5在胃及颌下腺中可能具有其他不同的生理功能。颌下腺不仅参与了消化功能, 其合成的生物活性物质, 如脑源性神经生长因子, 表皮生长因子等, 在应激状态下维持机体内环境的稳定及受损组织的修复方面起到重要的作用。

有研究表明去颌下腺大鼠睾丸中annexin 5表达水平升高<sup>[12]</sup>, 甲醛注射后annexin 5 mRNA水平的迅速变化也表明机体对伤害性刺激反应非常迅速, annexin 5可能是消化系统内的应激反应蛋白。胃中annexin 5 mRNA水平在6 h就恢复到正常水平, 72 h略低于对照组, 但统计分析表明其与对照组相比没有显著差异。而蛋白翻译水平6 h后显著增高, 并持续到24 h, 可能与胃消化功能的紊乱有关<sup>[10]</sup>。颈交感干可能是甲醛注射影响颌下腺的分泌功能的途径之一。颌下腺在应激反应中具有独特的作用, 其annexin 5 mRNA水平一直持续到24 h, 这可能与颌下腺维持机体内稳态的功能有关。本研究进一步证明了annexin 5参与了大鼠胃及颌下腺对急性疼痛应激的反应, 且应激状态下annexin 5在mRNA水

平上的迅速反应表明其可能是消化系统的一种急性应激反应蛋白。但疼痛应激影响消化系统内annexin 5表达变化的体液和神经通路及具体的信号通路仍需进一步研究。

#### 4 参考文献

- 1 Ueyama T, Saika M, Koreeda C, Senba E. Water immersion-restraint stress induces expression of immediate-early genes in gastrointestinal tract of rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G287-G295
- 2 Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, Sar M, Gaido KW, Foster PM. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2003; 73: 431-441
- 3 Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174
- 4 Sakiyama Y, Sujaku T, Furuta A. A novel automated method for measuring the effect of analgesics on formalin-evoked licking behavior in rats. *J Neurosci Methods* 2008; 167: 167-175
- 5 McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13525-13530
- 6 Dickenson AH, Sullivan AF. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neurosci Lett* 1987; 83: 207-211
- 7 Mravec B, Bodnár I, Tillinger A, Uherezky G, Kvetnansky R, Palkovits M, Nagy GM. Prolactin response to formalin is related to the acute nociceptive response and it is attenuated by combined application of different stressors. *Neuroendocrinology* 2007; 86: 69-76
- 8 刘婧, 李兆申. 烧伤应激对胃动力的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 134-139
- 9 Torres-López JE, Juárez-Rojop IE, Granados-Soto V, Diaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Ortiz-López JU, Cruz-Vera J. Peripheral participation of cholecystokinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats. *Neuropharmacology* 2007; 52: 788-795
- 10 卢坤刚, 韩雪峰, 张艳梅, 姚兵. 急性疼痛应激对SD大鼠胃及颌下腺组织annexin 5表达的影响. *临床检验杂志* 2009; 27: 212-215
- 11 Khasar SG, Reichling DB, Green PG, Isenberg WM, Levine JD. Fasting is a physiological stimulus of vagus-mediated enhancement of nociception in the female rat. *Neuroscience* 2003; 119: 215-221
- 12 王晨阳, 侯林, 徐会茹, 蒋超, 黄祝, 崔英霞, 戈一峰, 黄宇烽, 恽时锋, 姚兵. 去颌下腺对大鼠睾丸膜联蛋白5表达的影响. *医学研究生学报* 2007; 20: 700-703

#### ■同行评价

本实验设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才