

## 噻吩诺啡抑制阿片及非阿片类物质诱导的急性抓挠行为

马芳<sup>1,2</sup>, 周培岚<sup>1,2\*</sup>, 苏瑞斌<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 军事科学院军事医学研究院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 北京 100850)

**摘要:** 本文旨在用急性阿片及非阿片类物质建立小鼠瘙痒模型, 探究阿片受体部分激动剂噻吩诺啡对致痒物质所致急性瘙痒行为的影响, 揭示噻吩诺啡改善急性瘙痒的作用机制。本文用无侵害性小鼠抓挠行为分析系统测试瘙痒行为。C57 BL/6J 小鼠分别给予吗啡、蛙皮素 (鞘内注射, i.t) 或 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、氯喹 (皮内注射, i.d), 建立瘙痒模型, 探究噻吩诺啡 (0.75、1.5、3 mg·kg<sup>-1</sup>) 对致痒物质所致急性瘙痒行为的作用和机制。采用 Western blot 检测噻吩诺啡对致痒物质诱导的小鼠脊髓段蛋白激酶 C  $\delta$  (protein kinase C  $\delta$ , PKC  $\delta$ ) 蛋白表达的影响。实验中所有操作均获得军事医学研究院实验动物伦理委员会批准 (批准号: IACUC-2021-017W)。结果显示, 吗啡 (1 nmol)、蛙皮素 (0.3 nmol)、5-HT (5 nmol)、氯喹 (20 nmol) 分别给药后皆能显著增加小鼠的抓挠行为。噻吩诺啡 (1.5 mg·kg<sup>-1</sup>) 能够显著抑制阿片类药物吗啡和非阿片类物质蛙皮素、5-HT、氯喹诱导的抓挠行为, 并且噻吩诺啡能够明显逆转阿片类药物吗啡和非阿片类致痒物质 5-HT 诱导的 PKC  $\delta$  蛋白表达的变化。本研究表明, 阿片受体部分激动剂噻吩诺啡具有广谱抗瘙痒作用, 能够通过不同途径逆转 PKC  $\delta$  而抑制阿片类和非阿片物质诱导的瘙痒行为, 为探究和治疗瘙痒提供了新的思路。

**关键词:** 噻吩诺啡; 瘙痒; 阿片类; 非阿片类; 蛋白激酶 C  $\delta$ ; 瘙痒治疗

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0965-07

## Thienorphine inhibited acute scratching behavior induced by opioids and non-opioids

MA Fang<sup>1,2</sup>, ZHOU Pei-lan<sup>1,2\*</sup>, SU Rui-bin<sup>1,2\*</sup>

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. State Key Laboratory of Toxicology and Medical Countermeasures, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** The study established a mouse itch model induced by acute opioid and non-opioid pruritogens. The effects and mechanism of partial opioid agonist thienorphine on acute scratching behavior caused by opioid and non-opioid pruritogens was demonstrated. The noninvasive scratching behavior analysis system was established to test scratching behavior induced by morphine, bombesin, 5-hydroxytryptamine (5-HT) or chloroquine in C57 BL/6J mice. The effect of thienorphine (0.75, 1.5, 3 mg·kg<sup>-1</sup>) on acute itch caused by above pruritogens were studied. The expression of protein kinase C  $\delta$  (PKC  $\delta$ ) in mouse spinal cord was detected by Western blot after pruritogens addition with or without thienorphine pretreatment. All operations in the experiment were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Academy of Military Medical Sciences (IACUC-2021-017W). The scratching behavior increased significantly under morphine (1 nmol, i. t), bombesin (0.3 nmol, i. t), 5-HT (5 nmol, i. d) or chloroquine (20 nmol, i. d) treatment, respectively. Thienorphine (1.5 mg·kg<sup>-1</sup>) significantly

收稿日期: 2023-11-17; 修回日期: 2024-01-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82273909).

\*通讯作者 E-mail: zhoupeilan0502@sina.com; ruibinsu@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1297

inhibited the scratching behavior induced by the morphine, bombesin, 5-HT and chloroquine. Thienorphine significantly reversed the changes in PKC  $\delta$  protein expression induced by morphine or 5-HT. In conclusion, the partial opioid agonist thienorphine could inhibit scratching behavior induced by opioid and non-opioid pruritogens. It might reverse PKC  $\delta$  through different pathways to inhibit opioids and non-opioids induced scratching behavior, which provided a new idea for exploring and treating itch.

**Key words:** thienorphine; itch; opioid; non-opioid; protein kinase C  $\delta$ ; itch treatment

瘙痒是一种令人不愉快和产生抓挠冲动的主观感觉,可由多种内源性和外源性的因素引发。化学性瘙痒分为非组胺和组胺能瘙痒,分别由胃泌素释放肽 (gastrin-releasing peptide, GRP) 或神经介素 B (neuromedin B, NMB) 编码<sup>[1]</sup>。痒觉刺激由皮肤接收后通过微小的、瘙痒选择性的无髓鞘 C 纤维传递,主要由脊髓背角中表达胃泌素释放肽受体 (gastrin-releasing peptide receptors, GRPR) 的神经元 (GRPR 神经元) 或 NMBR 神经元整合瘙痒信息发送给中枢,引发瘙痒<sup>[2]</sup>,因此脊髓在瘙痒等感觉信息的加工传递中至关重要。由于瘙痒的发病机制复杂多样,目前临床上还没有一种公认的方案能够治疗所有的瘙痒。

阿片类药物是临床常见的镇痛药物,长期使用会伴随依赖耐受,短期或急性使用会出现恶心呕吐和瘙痒等不良反应,尤其是鞘内或硬膜外给药,瘙痒发生率高达 60%~85%<sup>[3]</sup>,这不仅限制了它的应用,也严重增加了患者的身心负担。除阿片类药物之外,非阿片类的蛙皮素、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT)、氯喹 (chloroquine, CQ) 等多种致痒物质也会不同程度地引发急慢性的瘙痒。因此,寻找一种有效的广谱瘙痒治疗药物成为了当前研究的一个热点。

基于目前的研究, $\mu$ 阿片受体 ( $\mu$  opioid receptor, MOR) 拮抗剂、 $\kappa$ 阿片受体 ( $\kappa$  opioid receptor, KOR) 激动剂及混合型阿片受体激动剂-拮抗剂已广泛在临床用于预防和治疗阿片类药物引起的瘙痒<sup>[4]</sup>。多项研究表明,混合型阿片受体激动剂-拮抗剂布托诺啡、纳布啡是 KOR 完全激动剂、MOR 部分拮抗剂,在多种瘙痒,包括胆汁淤积症、尿毒症引起的瘙痒方面具有良好的治疗作用<sup>[5,6]</sup>,但仍会产生依赖耐受等不良反应。噻吩诺啡 (thienorphine) 是军事医学研究院毒物药物研究所自主研发的一种用于阿片类药物滥用者的戒毒防复吸新药<sup>[7]</sup>。噻吩诺啡作为丁丙诺啡 (buprenorphine) 的衍生物,与其他同类型药物相比,具有更强的镇痛效果和更长效的药理作用,且口服生物利用度更高<sup>[8,9]</sup>,目前正在进行 II 期临床试验。噻吩诺啡作为混合型阿片受体激动剂,对  $\kappa$  和  $\delta$  阿片受体有较强的激活作用,而对  $\mu$  阿片受体激活作用较弱,对多种疼痛模型有效,且无依赖性<sup>[10]</sup>。噻吩诺啡对瘙痒的作用目前尚未研

究。本文建立了阿片类和非阿片类药物诱导的小鼠瘙痒模型,探讨了噻吩诺啡在两类致痒物质诱导的 C57 BL/6J 小鼠抓挠行为中的作用,并对噻吩诺啡抑制瘙痒的机制进行了初步探讨。

## 材料与方法

**试剂与耗材** 盐酸吗啡 (青海制药厂); 噻吩诺啡、丁丙诺啡由军事医学研究院毒物药物研究所提供; 蛙皮素 (bombesin, 批号: 147461)、5-HT (批号: 132087)、氯喹 (批号: 158695), 上海陶素生化科技有限公司; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (批号: INAG0430), 北京伊诺凯科技有限公司; Cocktail (04693116001)、PhosStop (4906845001), Roche 公司; RIPA 裂解液 (C1053-100)、BCA 蛋白定量试剂盒 (P1511), 北京普利莱基因技术有限公司; 蛋白上样缓冲液 (PA124-01), 北京博迈德基因技术有限公司; 蛋白激酶 C  $\delta$  (protein kinase C  $\delta$ , PKC  $\delta$ ) (K1122), Santa Cruz 公司; GAPDH (5174S), Cell Signaling Technology 公司; 显影液 (P90720), Millipore 公司。生理盐水, 石家庄四药有限公司; 盐酸吗啡、蛙皮素和磷酸氯喹用生理盐水溶解, 噻吩诺啡、丁丙诺啡、5-HT 用含 2% DMSO 的生理盐水溶解。

**实验器材** 20/50  $\mu$ L 微量注射器, 上海安亭微量进样器厂, 消毒纱布若干。小鼠抓挠行为分析系统, 上海欣软信息科技有限公司; 手术剪 (直)、眼科镊 (弯)、咬骨钳、咬骨剪、手术刀, 张家港市浦伦医疗器械有限公司; 高通量组织研磨器 (TissueLyser II), QIAGEN 公司; DYY-8C 型电泳仪 (2085943), 北京市六一仪器厂; 显影仪 (5200), 上海天能科技有限公司。

**实验动物** 8 周龄 SPF 级雄性 C57 BL/6J 小鼠, 体重 20~23 g, 北京斯贝福生物技术有限公司, 动物许可证号: SCXK (京) 2019-0010。所有动物在温度 25  $^{\circ}$ C、湿度 40%~60% 的环境中饲养, 12 h 明暗交替 (光照时间: 8:00 am~8:00 pm), 每笼 6 只小鼠, 自由摄食和饮水。实验过程中所有操作均获军事医学研究院实验动物伦理委员会许可 (批准号: IACUC-2021-017W)。

**动物瘙痒模型建立** 小鼠随机分为对照组

(control)、模型组(吗啡、蛙皮素、5-HT、氯喹)、每组8~10只小鼠。吗啡、蛙皮素以鞘内注射(intrathecal injection, i.t)方式造模: 清醒小鼠呈俯卧位放置, 于小鼠头侧盖一块消毒纱布, 左掌于其上轻轻握住鼠身, 食指和拇指按压髂骨两侧固定。右手中指于小鼠背部进行定位, 小鼠髂嵴水平对应L6棘突, 向上可触及L5~L6间隙, 即为进针位置。右手持50  $\mu\text{L}$  微量注射器, 与脊柱约成80~90度进针, 触及骨质间隙后, 将针倾斜至与脊柱成30度左右, 继续缓慢推进, 鼠尾突然出现侧向摆动为成功标志。鼠尾出现侧摆后停止继续进针, 缓慢注入吗啡或蛙皮素(每只5  $\mu\text{L}$ ), 注射时间不短于5 s, 注射完成后边旋转边缓慢拔针。组胺、5-HT、氯喹以皮内注射(intradermal injection, i.d)方式模型: 小鼠提前一天剃除颈背部毛, 实验时提前10 min用25  $\mu\text{L}$  微量注射器水平进针进行皮内注射给药(每只10  $\mu\text{L}$ )。

**分组及给药** C57 BL/6J 小鼠随机分组, 每组8~10只。瘙痒模型建立, 吗啡(0、0.1、0.3、1、2 nmol)、蛙皮素(0、0.03、0.3、1 nmol)、5-HT(0、0.5、5、50 nmol)、氯喹(0、20、200、400 nmol)。噻吩诺啡对阿片类致痒作用的影响, 分为模型组(吗啡1 nmol)、噻吩诺啡(0.75、1.5、3.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + 模型组。噻吩诺啡对非阿片类致痒作用影响, 分为模型组(蛙皮素0.15 nmol、5-HT 5 nmol、氯喹20 nmol)、噻吩诺啡(1.5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) + 模型组。Western blot实验, 分为control组、模型组、噻吩诺啡 + 模型组。吗啡、蛙皮素(5  $\mu\text{L}$ ) 使用鞘内注射(i.t)方式给药, 5-HT、氯喹(10  $\mu\text{L}$ ) 使用皮内注射(i.d)方式给药, 联合噻吩诺啡进行实验时, 噻吩诺啡(10  $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 均提前15 min腹腔注射(intraperitoneal injection, i.p)给药。

**小鼠抓挠行为测定** 按上述方法给药完成后, 立即放入抓挠行为测试观察盒, 通过电脑VisuScratch抓挠行为视频分析系统实时记录分析小鼠的抓挠行为。抓挠行为定义为小鼠后爪对背部、颈部、耳后一次或连续多次搔抓, 后爪抬起搔抓一次或多次至后爪着地, 记作抓挠回合, 后爪每搔抓一次记作抓挠次数。

小鼠抓挠行为实验行为检测装置主要包括: 小鼠四通道抓挠行为观察盒(25 cm  $\times$  25 cm  $\times$  32 cm)、放置观察盒的红外灯板、红外摄像机、高约2 m的组装架和控制电脑4个部分。红外板安置在组装架上提供恒定的白色视频背景, 抓挠行为观察盒置于红外灯板上, 灯板上方1 m左右位置安置红外摄像头记录实验过程。实验过程中, 通过电脑VisuScratch抓挠行为视频分析系统实时记录小鼠的抓挠回合数、抓挠次数。

**取材及蛋白样品制备** C57 BL/6J 小鼠按上述方法给药10 min后取材, 将小鼠俯卧放置在冰上, 使用

消毒手术器械沿背部中切开皮肤, 切断棘突两侧肌肉, 自颈椎向下依次剪断各脊椎两侧椎弓根, 暴露脊髓, 小心取出全脊髓, 剪下L4~L6段的脊髓, 用冰的PBS冲洗, 滤纸吸干多余水分, 放入冻存管后液氮临时保存, 再转移至-80  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取上述脊髓组织样品, 加RIPA裂解液(含Cocktail和PhosStop), 每管加入3颗研磨小钢珠, 于组织研磨器中充分破碎。在冰上静置30 min充分裂解后4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min, 取少部分上清用BCA法测定蛋白浓度。取其余上清加入等体积2 $\times$ 蛋白上样缓冲液煮沸5 min, 进行蛋白检测, 或-20  $^{\circ}\text{C}$ 短期存放, 不超过两周。

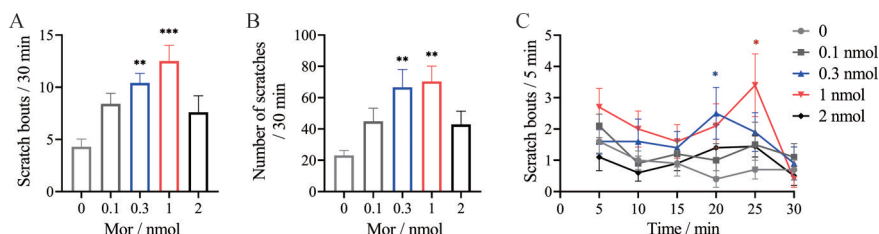
**Western blot实验** 取制备好的蛋白样品进行蛋白检测(每孔上样量为30  $\mu\text{g}$ ), 通过10% SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白质转移到PVDF膜上, 用3% BSA室温封闭1 h后, 加入PKC  $\delta$  (1:500稀释) 抗体, 并在4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜, 用TBST洗涤3次后, 将膜与二抗室温孵育1 h, 用TBST洗涤3次后, 使用ECL显影液进行曝光显影。显影后的同一张PVDF膜用洗膜液洗膜5 min, 抗体换为GAPDH (1:1 000稀释) 后进行与上同样的操作, 然后显影。使用Image J软件分析条带灰度。

**统计学分析** 使用GraphPad Prism 8.0软件进行数据处理和作图。结果均以 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示, 采用 $t$ 检验进行两组数据的比较分析, 进行多组数据间比较时, 数据符合正态分布通过单因素方差分析(ANOVA)进行分析, 数据不符合正态分布时使用非参数检验, 以 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 阿片类药物吗啡诱导小鼠产生抓挠反应

本研究成功建立对动物无侵害的小鼠瘙痒模型。鞘内注射不同剂量的吗啡(0.1、0.3、1、2 nmol) 观察C57 BL/6J小鼠在30 min内的抓挠行为(抓挠次数、回合), 结果发现随吗啡剂量的增加抓挠行为呈现先增后减的趋势, 量效曲线为倒“U”型曲线, 0.3和1 nmol吗啡均能显著增加小鼠的抓挠行为(图1A、B)。其中, 1 nmol吗啡诱导的抓挠回合数平均10次以上, 抓挠次数平均60次以上( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 诱导小鼠产生抓挠行为的能力最强, 因此, 后续实验中吗啡均使用1 nmol的剂量。鞘内注射不同剂量吗啡后, 记录30 min内每5 min小鼠的抓挠回合数, 结果自15 min起小鼠的抓挠回合数比对照组均有不同程度增加。0.3和1 nmol吗啡分别在20和25 min显著增加小鼠的抓挠行为, 且30 min内小鼠呈现间歇性瘙痒反应(图1C)。



**Figure 1** Morphine (Mor) induced scratching behavior in C57 BL/6J mice. The total scratch bouts (A) and number of scratches (B) within 30 min after intrathecal injection (i.t) of different doses of Mor in mice; C: Time course within 30 min after i.t injection of Mor in wild-type mice.  $n = 10, \bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

## 2 非阿片类药物诱导小鼠产生抓挠反应

非阿片类药物蛙皮素、5-HT 及氯喹均能显著增强 C57 BL/6J 小鼠的搔痒反应 (图 2)。C57 BL/6J 小鼠分别鞘内注射不同剂量蛙皮素 (0.03、0.3、1 nmol), 在极低剂量 0.03 nmol 就能够引起小鼠的抓挠反应, 0.3 和 1 nmol 蛙皮素极显著增加小鼠的抓挠行为, 30 min 内抓挠回合数达 300~400 次 (图 2A,  $P < 0.001$ )。5-HT (0.5、5、50 nmol) 皮内注射后, 5 和 50 nmol 组小鼠抓挠行为明显增加, 30 min 内抓挠回合数达 70 次 (图 2B,  $P < 0.001$ )。氯喹 (20、200、400 nmol) 皮内注射后剂量依赖性增加小鼠的抓挠反应, 30 min 内抓挠回合高达 100 次 (图 2C,  $P < 0.001$ )。

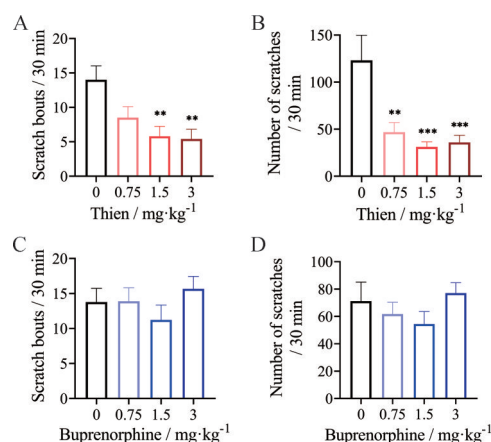
## 3 噻吩诺啡对吗啡致痒作用的影响

噻吩诺啡 (0、0.75、1.5、3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p) 预先 15 min 给药后, 给予吗啡 (1 nmol, i.t), 与对照组相比, 可显著减少吗啡诱导的小鼠抓挠行为。噻吩诺啡 (1.5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 对吗啡诱导的小鼠抓挠回合和抓挠次数抑制作用最为显著, 抑制率高于 50% (图 3A、B)。丁丙诺啡 (0、0.75、1.5、3  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p) 预先 15 min 给药后, 对吗啡 (1 nmol, i.t) 诱导的小鼠抓挠回合数和抓挠次数均无明显影响 (图 3C、D)。

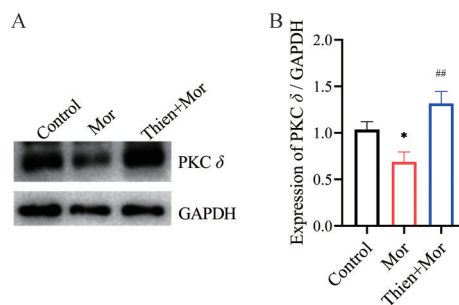
## 4 噻吩诺啡逆转吗啡诱导的 PKC $\delta$ 蛋白表达

小鼠鞘内注射吗啡 (1 nmol) 10 min 后, 取材脊髓段, 通过蛋白免疫电泳检测 PKC  $\delta$  蛋白表达, 可见吗啡给药后 PKC  $\delta$  蛋白含量较对照组显著降低 ( $P < 0.05$ ), 噻吩诺啡 (1.5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , i.p) 预防给药后, 再给予吗啡 (1 nmol, i.t), 小鼠脊髓段 PKC  $\delta$  蛋白表达较单独给

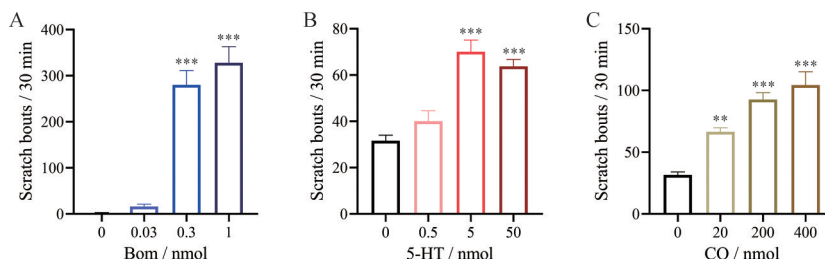
予吗啡组显著升高 ( $P < 0.01$ ), 和对照组水平相当 (图 4)。



**Figure 3** Thienorphan (Thien, A and B) and buprenorphine (C and D) inhibited Mor-induced scratching behavior.  $n = 10, \bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group



**Figure 4** Thien reversed Mor-induced protein kinase C ( $\delta$ ) protein expression.  $n = 5, \bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs Mor group



**Figure 2** Non-opioids induced an increase in scratching behavior in C57 BL/6J mice. Effect of bombesin (Bom, A), 5-hydroxytryptamine (5-HT, B) and chloroquine (CQ, C) on scratching behavior in mice.  $n = 8, \bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

### 5 噻吩诺啡抑制非阿片类致痒物质诱导的瘙痒反应

噻吩诺啡 ( $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p) 预先 15 min 给药后, 给予蛙皮素 ( $0.15 \text{ nmol}$ , i.t), 与单给蛙皮素组相比, 噻吩诺啡 + 蛙皮素组小鼠的抓挠回合数和抓挠次数明显降低 ( $P < 0.001$ , 图 5A、B)。同样地, 噻吩诺啡 ( $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p) 预先给药也能够明显抑制 5-HT ( $5 \text{ nmol}$ , i.d) 诱导的小鼠抓挠回合数 ( $P < 0.05$ , 图 5C、D); 噻吩诺啡 ( $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p) 对皮内注射氯喹 ( $20 \text{ nmol}$ ) 诱导的小鼠抓挠回合和抓挠次数皆有明显抑制作用 ( $P < 0.01$ , 图 5E、F)。

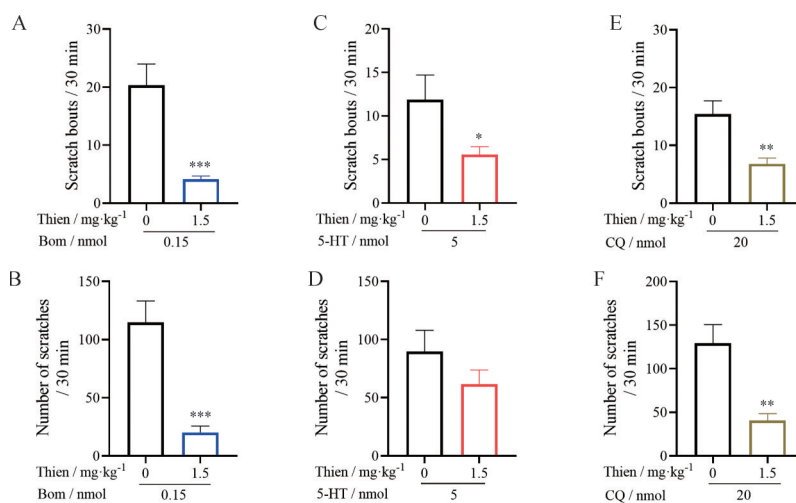
### 6 噻吩诺啡对非阿片类物质诱导的 PKC $\delta$ 蛋白表达的影响

小鼠鞘内给予蛙皮素 ( $0.3 \text{ nmol}$ ) 后, 脊髓 PKC  $\delta$  蛋白表达与对照组比较没有明显改变, 噻吩诺啡预先给药后给予蛙皮素, 检测 PKC  $\delta$  蛋白表达的变化, 发现与对照组及蛙皮素单药组相比, 也没有明显改变 (图

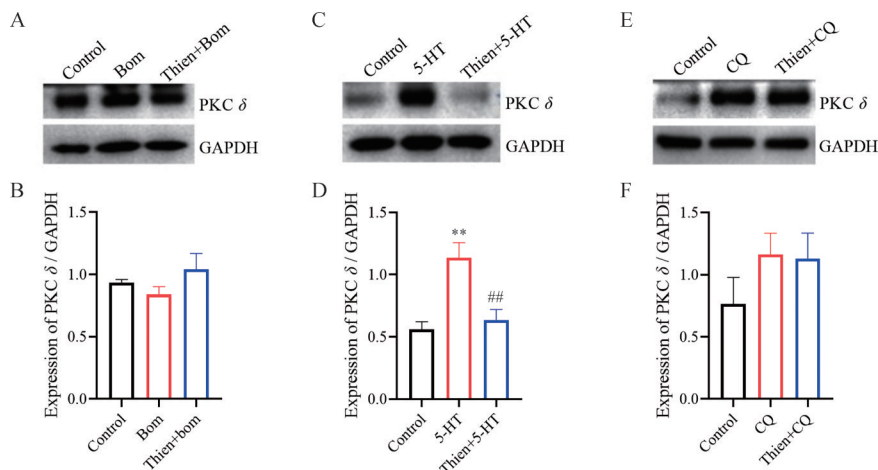
6A、B)。5-HT ( $5 \text{ nmol}$ ) 皮内给药后, PKC  $\delta$  蛋白较对照组有明显升高 ( $P < 0.01$ ), 噻吩诺啡 ( $1.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) 明显降低 5-HT 诱导的 PKC  $\delta$  蛋白增加 ( $P < 0.01$ , 图 6C、D)。氯喹 ( $20 \text{ nmol}$ ) 皮内注射后, PKC  $\delta$  蛋白表达有一定的升高, 而噻吩诺啡对氯喹诱导的 PKC  $\delta$  增加, 对比氯喹单药组没有明显的差异 (图 6E、F)。

### 讨论

皮肤瘙痒是长久以来困扰人类的一大难题, 因此瘙痒治疗药物及机制的研究是近年来研究的热点之一。瘙痒作为阿片类药物严重的不良反应, 降低了患者术后生活质量和使用阿片类镇痛药的意愿。研究证明, 阿片类药物中 MOR 是介导瘙痒的主要原因, 其中, MOR1 是发挥镇痛作用所必需的亚型, 而 MOR1D 亚型与瘙痒特异性受体 GRPR 形成异源二聚体激活磷脂酶 C (phospholipase, PLC)/三磷酸肌醇 (inositol triphos-



**Figure 5** Thien inhibited scratching behavior induced by Bom (A and B,  $n = 9$ ), 5-HT (C and D,  $n = 9$ ), CQ (E and F,  $n = 10$ ) in mice.  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs model group (inject only Bom/5-HT/CQ)



**Figure 6** Effects of Thien on PKC  $\delta$  protein expression induced by Bom (A and B,  $n = 4$ ), 5-HT (C and D,  $n = 7$ ), CQ (E and F,  $n = 4$ ).  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . \*\* $P < 0.01$  vs control group; ## $P < 0.01$  vs 5-HT group

phate, IP3)/Ca<sup>2+</sup>通路诱导瘙痒发生<sup>[11,12]</sup>。本研究通过测试小鼠的抓挠行为,发现阿片类药物吗啡鞘内注射后诱导的瘙痒量效曲线呈倒“U”型,且吗啡在低剂量1 nmol时诱导较为显著的抓挠反应。PKC以Ca<sup>2+</sup>依赖的形式从胞浆中移位到细胞膜上,此过程称之为易位。一般将PKC的易位作为PKC激活的标志。PKC参与受体脱敏、调节膜结构、介导免疫应答、调节细胞生长以及学习和记忆等,这些功能是通过PKC介导的其他蛋白质的磷酸化来实现的<sup>[13]</sup>。KOR和 $\delta$ 阿片受体( $\delta$  opioid receptor, DOR)的激活,会抑制瘙痒,其中的机制可能是KOR/DOR激活后,独立于G蛋白激活PLC,诱导PKC $\delta$ 从胞浆转移到质膜。而通过膜易位的Ca<sup>2+</sup>非依赖性PKC $\delta$ 活化提供了GRPR磷酸化和脱敏的主要机制<sup>[14,15]</sup>,这可能也是吗啡高剂量下瘙痒行为减少的原因。 $\kappa$ 和 $\delta$ 阿片受体对瘙痒的抑制作用,也使阿片受体混合型激动剂-拮抗剂成为了研究治疗瘙痒的新策略,纳布啡是一种混合型KOR激动剂、MOR拮抗剂,鞘内注射纳布啡能够通过抑制小鼠PKC $\beta$ 依赖的小胶质细胞激活和p38磷酸化,减轻吗啡引起的抓挠行为<sup>[16]</sup>。噻吩诺啡是 $\kappa$ 和 $\delta$ 阿片受体的强效激动剂,本课题组猜测其具有类似的瘙痒抑制作用。本研究发现,腹腔注射噻吩诺啡后剂量依赖性降低吗啡诱导的抓挠行为,表明噻吩诺啡对吗啡诱导的瘙痒具有明显改善作用。小鼠脊髓水平的蛋白结果显示,鞘内注射吗啡明显降低PKC $\delta$ 蛋白表达,噻吩诺啡能够逆转吗啡对PKC $\delta$ 的作用,提示噻吩诺啡可能也是通过激活KOR/DOR增加PKC $\delta$ 易位间接抑制GRPR发挥功能,而抑制吗啡诱导的小鼠抓挠行为。另外,噻吩诺啡作为MOR的部分激动剂,可能会占据部分MOR,抑制吗啡对MOR的激活,进一步削弱吗啡对PKC $\delta$ 的抑制作用。

一些研究表明,KOR激动剂能够改善氯喹及一些炎症因子等引发的急慢性瘙痒<sup>[17]</sup>。本研究发现,噻吩诺啡作为 $\kappa$ 阿片受体激动剂,不仅对阿片类药物诱导的小鼠瘙痒反应有显著的抑制作用,对非阿片类物质,蛙皮素、5-HT、氯喹等致痒物质诱导的小鼠抓挠行为也具有显著的抑制作用,表明噻吩诺啡对多种瘙痒模型有治疗效果。与鞘内给药吗啡引起PKC $\delta$ 蛋白明显降低不同,鞘内注射蛙皮素或皮内注射氯喹后,脊髓PKC $\delta$ 蛋白的表达没有明显变化,提示PKC $\delta$ 蛋白可能不直接参与蛙皮素和氯喹诱导的瘙痒,噻吩诺啡可能是通过其他途径缓解二者诱导的瘙痒,具体机制仍需结合国内外相关研究结果作进一步探究。

5-HT是一种炎症介质,由皮肤肥大细胞、血小板和黑色素细胞分泌参与急性和慢性瘙痒。多项研究证

明,5-HT可以促使肥大细胞释放炎症因子或直接激活感觉神经元上的5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5HT<sub>3</sub>、5-HT<sub>7</sub>等多种5-HT受体参与瘙痒<sup>[18]</sup>,其机制较为复杂。令人惊讶的是,本研究皮内给予5-HT 10 min后,小鼠脊髓段PKC $\delta$ 蛋白显著升高,而噻吩诺啡能够明显逆转这一作用。这可能是PKC的催化区或激酶核心能够执行不同的功能,因此对于不同物质的刺激会做出不同的反应。有研究发现5-HT依赖于瞬时受体电位香草素4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)参与过敏症状及瘙痒的产生<sup>[19]</sup>,而TRPV4致敏作用取决于PLC和PKC的激活<sup>[20]</sup>。这就很好地解释了为什么5-HT能够上调小鼠脊髓中的PKC $\delta$ 蛋白的表达,产生与吗啡截然相反的结果。而噻吩诺啡仍然能够逆转5-HT诱导的PKC $\delta$ 上调,本课题组猜测噻吩诺啡在5-HT模型中的止痒作用可能不同于吗啡模型中的KOR/PKC $\delta$ /GRPR机制,多项研究证明阿片受体部分激动剂还可以通过减少炎症因子以及神经递质的释放抑制瘙痒<sup>[6]</sup>,噻吩诺啡可能通过同样的作用减少了PKC $\delta$ 的激活。此外,TRPV4不仅是传递5-HT诱导的瘙痒的关键环节,同时也是介导痛觉的重要靶点<sup>[21]</sup>,而噻吩诺啡作为镇痛药物,对TRPV4的活动也有一定程度的抑制。因此,噻吩诺啡对5-HT模型的止痒作用可能是多个瘙痒环节被抑制的综合结果,具体机制还需要进一步研究,这也为研究阿片受体部分激动剂的止痒作用和5-HT诱导瘙痒的分子机制拓展了新的思路。

目前,临床瘙痒治疗药物多数存在很多不良反应,且不具有广谱性。噻吩诺啡在镇痛和抗成瘾的同时,对阿片类及非阿片类物质诱导的瘙痒具有明显的抑制作用,这进一步增加了噻吩诺啡临床适应症,噻吩诺啡可能在接受阿片类药物用于术后镇痛及其他致痒原诱发的瘙痒方面会成为更好的治疗选择。

**作者贡献:** 马芳是本文的主要撰写者,收集资料并分析,完善相关实验;周培岚、苏瑞斌负责技术指导并修改论文。所有作者阅读并认可终稿。

**利益冲突:** 无任何利益冲突。

## References

- [1] Chen ZF. A neuropeptide code for itch [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22: 758-776.
- [2] Chen S, Gao XF, Zhou Y, et al. A spinal neural circuitry for converting touch to itch sensation [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5074.
- [3] Kumar K, Singh S. Neuraxial opioid-induced pruritus: an update [J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 29: 303-307.
- [4] Becker LM, Teunissen AJW, Koopman JSHA. Prevention and treatment of neuraxial morphine-induced pruritus: a scoping

- review [J]. *J Pain Res*, 2022, 15: 1633-1645.
- [5] Boehlke C, Joos L, Coune B, et al. Pharmacological interventions for pruritus in adult palliative care patients [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023, 4: CD008320.
- [6] Inan S, Torres-Huerta A, Jensen LE, et al. Nalbuphine, a kappa opioid receptor agonist and mu opioid receptor antagonist attenuates pruritus, decreases IL-31, and increases IL-10 in mice with contact dermatitis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 864: 172702.
- [7] Yu G, Liu YS, Yan LD, et al. Structure-activity relationships analysis of thienorphine and its derivatives [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2009, 44: 726-730.
- [8] Yu G, Yue YJ, Cui MX, et al. Thienorphine is a potent long-acting partial opioid agonist: a comparative study with buprenorphine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318: 282-287.
- [9] Zhou PL, Li YL, Yan LD, et al. Effect of thienorphine on intestinal transit and isolated guinea-pig ileum contraction [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19: 1444-1450.
- [10] Zhou P, Li Y, Yong Z, et al. Thienorphine induces antinociception without dependence through activation of  $\kappa$ - and  $\delta$ -, and partial activation of  $\mu$ -opioid receptor [J]. *Brain Res*, 2020, 1748: 147083.
- [11] Liu XY, Liu ZC, Sun YG, et al. Unidirectional cross-activation of GRPR by MOR1D uncouples itch and analgesia induced by opioids [J]. *Cell*, 2011, 147: 447-458.
- [12] Wang Z, Jiang C, Yao H, et al. Central opioid receptors mediate morphine-induced itch and chronic itch *via* disinhibition [J]. *Brain*, 2021, 144: 665-681.
- [13] Miao LN, Pan D, Shi J, et al. Role and mechanism of PKC- $\delta$  for cardiovascular disease: current status and perspective [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 816369.
- [14] Munanairi A, Liu XY, Barry DM, et al. Non-canonical opioid signaling inhibits itch transmission in the spinal cord of mice [J]. *Cell Rep*, 2018, 23: 866-877.
- [15] Smith KM, Nguyen E, Ross SE. The delta-opioid receptor bidirectionally modulates itch [J]. *J Pain*, 2023, 24: 264-272.
- [16] Tang Y, Li NQ, Ye LQ, et al. Nalbuphine attenuates morphine-induced scratching by inhibiting PKC $\beta$ -dependent microglial activation and p38 phosphorylation in male mice [J]. *J Neurosci*, 2023, 101: 1289-1304.
- [17] Inan S, Dun NJ, Cowan A. Antipruritic effect of nalbuphine, a kappa opioid receptor agonist, in mice: a pan antipruritic [J]. *Molecules*, 2021, 26: 5517.
- [18] Tian B, Wang XL, Huang Y, et al. Peripheral and spinal 5-HT receptors participate in cholestatic itch and antinociception induced by bile duct ligation in rats [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 36286.
- [19] Akiyama T, Ivanov M, Nagamine M, et al. Involvement of TRPV4 in serotonin-evoked scratching [J]. *J Invest Dermatol*, 2016, 136: 154-160.
- [20] Cenac N, Altier C, Motta JP, et al. Potentiation of TRPV4 signalling by histamine and serotonin: an important mechanism for visceral hypersensitivity [J]. *Gut*, 2010, 59: 481-488.
- [21] Hu X, Du L, Liu S, et al. A TRPV4-dependent neuroimmune axis in the spinal cord promotes neuropathic pain [J]. *J Clin Invest*, 2023, 133: e161507.