

坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠右美托咪啶鞘内注射的镇痛作用

邓海洪, 马松梅, 肖晓山(广东省第二人民医院麻醉科, 广东省广州市 510317)

文章亮点:

实验通过动态观测鞘内注射右美托咪啶的坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠, 证实鞘内注射右美托咪啶通过激动脊髓内的 α_2 肾上腺素能受体, 降低脊髓背角神经型一氧化氮合酶的表达, 从而减轻病理性神经痛引起的痛觉超敏, 起到明显的镇痛作用。

关键词:

实验动物; 组织构建; 神经型一氧化氮合酶; 脊髓背角神经元; 鞘内注射; 右美托咪啶; 肾上腺素; 神经病理性疼痛; 疼痛

主题词:

一氧化氮合酶; 右美托咪啶; 疼痛; 肾上腺素

基金资助:

广东省医学自然科学基金立项资助科研课题(A2012146)

邓海洪, 男, 1973年生, 广东省五华人, 汉族, 广东医学院在读硕士, 副主任医师, 广东省第二人民医院麻醉科, 主要从事麻醉和疼痛医学研究。

通讯作者: 肖晓山, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 广东省第二人民医院麻醉科主任, 广东省广州市 510317

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.27.015
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)27-04355-07
稿件接受: 2014-06-01

摘要

背景: 右美托咪啶是一种高效、高选择性的 α_2 肾上腺素受体激动剂, 具有镇静、镇痛、抗焦虑等作用, 对呼吸影响小。

目的: 观察鞘内注射右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠的镇痛作用。

方法: 雄性 SD 大鼠 36 只按随机数字表法分为正常对照组、生理盐水组和右美托咪啶组, 后 2 组结断腓总神经和胫神经建立坐骨神经分支选择性损伤大鼠模型, 右美托咪啶组在坐骨神经分支选择性损伤后 14 d 内每天鞘内注射右美托咪啶 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 生理盐水组大鼠注射生理盐水。

结果与结论: 与生理盐水组相比, 右美托咪啶组大鼠给药后的机械性缩足反射阈值与热缩足潜伏期显著性升高($P < 0.05$), 脊髓背角中神经型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白的表达水平明显降低($P < 0.05$), 脊髓背角神经元损伤程度明显减轻, 且在给药 14 d 时脊髓背角神经型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白的表达水平及脊髓背角神经元损伤情况与正常对照组接近。提示鞘内注射右美托咪啶可抑制脊髓背角神经型一氧化氮合酶的表达, 减轻大鼠坐骨神经损伤引起的疼痛。

邓海洪, 马松梅, 肖晓山. 坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠右美托咪啶鞘内注射的镇痛作用[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(27):4355-4361.

Analgesic effect of intrathecal injection of dexmedetomidine on selective damage of sciatic nerve branch in a rat model

Deng Hai-hong, Ma Song-mei, Xiao Xiao-shan (Department of Anesthesiology, Guangdong Provincial Second People's Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Dexmedetomidine is an effective high-selectivity α_2 -adrenoceptor agonist that has sedative, analgesic, anxiolytic effects, but slightly affects respiration.

OBJECTIVE: To observe the analgesic effect of dexmedetomidine on selective damage of sciatic nerve branch in a rat model by intrathecal injection.

METHODS: A total of 36 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group, physiological saline group and dexmedetomidine group. A rat model of selective damage of sciatic nerve branch was established by knotting off the common peroneal nerve and tibial nerve in the physiological saline group and dexmedetomidine group. Rats in the dexmedetomidine group were daily injected with dexmedetomidine 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ by intrathecal injection within 14 days after injury. Rats in the physiological saline group were injected with physiological saline.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the physiological saline group, the mechanical withdrawal threshold and the thermal withdrawal latency were significantly increased in the dexmedetomidine group ($P < 0.05$). Neuronal nitric oxide synthase mRNA and protein expression levels were significantly decreased in the spinal dorsal horn ($P < 0.05$). The injury to spinal dorsal horn neurons was obviously lessened. Moreover, neuronal nitric oxide synthase mRNA and protein expression levels and the injury to spinal dorsal horn neurons were similar between 14 days after administration and normal control group. Results indicated that intrathecal injection of dexmedetomidine could inhibit the expression of neuronal nitric oxide synthase in the spinal dorsal horn and relieve the pain induced by sciatic nerve injury.

Deng Hai-hong, Studying for master's degree, Associate chief physician, Department of Anesthesiology, Guangdong Provincial Second People's Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

Corresponding author: Xiao Xiao-shan, Master, Professor, Chief physician, Master's supervisor, Department of Anesthesiology, Guangdong Provincial Second People's Hospital, Guangzhou 510317, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-06-01

Subject headings: nitric oxide synthase; dexmedetomidine; pain; epinephrine
Funding: the Medical Scientific Research Project of Guangdong Province, No. A2012146

Deng HH, Ma SM, Xiao XS. Analgesic effect of intrathecal injection of dexmedetomidine on selective damage of sciatic nerve branch in a rat model. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(27):4355-4361.

0 引言 Introduction

在2011年国际疼痛学会神经病理性疼痛学组对神经病理性疼痛疾病进行了重新定义:“神经病理性疼痛是由躯体感觉神经系统的损伤和疾病而直接造成的疼痛。”神经病理性疼痛属于慢性疼痛,表现为自发性疼痛、痛觉过敏、异常疼痛和感觉异常等临床特征,病情反复甚至加重,目前缺乏有效治疗方法,探讨其机制和治疗措施具有重要临床意义^[1-3]。有研究表明,发生慢性神经痛时,P物质、降钙素基因相关肽、一氧化氮合酶等多种与疼痛有关的信息物质也会发生变化^[4],但具体机制未明确。一氧化氮合酶是体内催化合成一氧化氮的主要酶类,可以间接反映一氧化氮的作用,包括神经型一氧化氮合酶(主要存在于脑和神经细胞的细胞质内)、诱导型一氧化氮合酶(存在于各种类型的细胞中)还有内皮型一氧化氮合酶(主要存在于血管内皮细胞的细胞膜上)3种,神经型一氧化氮合酶可调节多种生理和病理过程诸如炎性痛和神经病理性疼痛。坐骨神经结扎损伤模型大鼠脊髓背角中神经型一氧化氮合酶活性出现显著增加,且一氧化氮合酶/一氧化氮可能参与坐骨神经结扎损伤大鼠痛敏的形成^[5]。

右美托咪啶是新型高选择性的 α_2 肾上腺素能受体激动剂,与 α_2 , α_1 肾上腺素能受体结合的比例均为1 600:1,具有抗交感、镇静和镇痛的作用^[6-8],现已广泛用于麻醉科、重症加强护理病房的镇静、镇痛^[9-11]。而脊髓及其外周的 α_2 肾上腺素能受体是右美托咪啶镇痛作用的主要受体,鞘内给药可提高脊髓 α_2 肾上腺素能受体的药物浓度,椎管内使用右美托咪啶无论对急性、慢性炎性还是肿瘤疼痛治疗效果均有高于全身用药^[12-13],研究表明大剂量右美托咪啶(3 $\mu\text{mol/L}$)能够诱导强大而持久的 K^+ 电流,由此出现的细胞膜超级化,可以显著降低细胞的兴奋性^[14],鞘内注射右美托咪啶3 $\mu\text{g/kg}$ 对大鼠可产生最强抗伤害效应^[15],因此实验拟通过鞘内注射右美托咪啶检测右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠的镇痛作用。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年6月至2013年8月在南方医科大学实验动物中心完成。

材料:

动物: 清洁级雄性SD大鼠36只,鼠龄6周,体质量180-220 g,由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号: No.4402101601。每笼3只群养,层流实验室恒温恒湿环境,光照时间为8:00-18:00,温度为(23±1)℃,湿

度55%-60%。实验前适应性饲养3 d,自由获得饲料和饮水。所有操作和动物处理遵循了国家卫生机构制定的实验室动物指南。

药物: 盐酸右美托咪啶注射液,化学名为(+)-4-(S)-[1-2, 3-二甲基苯基)乙基]-1H-咪唑盐酸盐,分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$,相对分子质量为236.7,购自江苏恒瑞医药股份有限公司,药物批准文号:国药准字H20090248,批号:13020534。

检测坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠镇痛效果使用的主要实验试剂及仪器:

试剂与仪器	来源
Trizol试剂盒, SuperScript First-Strand Synthesis System试剂盒	Invitrogen公司
SYBR Green I	Applied BioSystems公司
兔抗大鼠一氧化氮合酶一抗, 羊抗兔二抗, 兔抗大鼠微管蛋白一抗	sigma公司
37400-002型接触刺激仪	意大利BASILE公司
BME-410A型热痛刺激仪	中国医学科学院生物工程研究所
石蜡切片机	莱比信生物公司

方法:

实验动物分组: 将36只SD大鼠按随机数字表法分为3组($n=12$): 正常对照组、生理盐水组和右美托咪啶组。生理盐水组和右美托咪啶组鞘内置管后作坐骨神经分支选择性损伤模型,正常对照组只消毒和麻醉。

鞘内置管: 适应性喂养3 d后,腹腔注射体积分数10%水合氯醛300 mg/kg麻醉,参照Yaksh等^[16]的方法,术野备皮、碘伏消毒、铺巾,灭菌手术器械,沿大鼠两耳中点连线纵向切开1.5-2.0 cm切口,钝性分离皮下组织和颈部肌肉,暴露寰枕后膜,用针尖挑破寰枕后膜和硬脊膜,可见澄清脑脊液流出并且液面随呼吸节律上下波动。将无菌PE-10导管(长约14 cm)缓慢置入鞘内至腰膨大处(深度约8 cm)。导管插入后,火烧封闭外端,逐层缝合,盘绕5 cm导管于皮下以补充注药后封管消耗,外露1 cm固定导管以供注药。肌注青霉素 $5 \times 10^4 \text{ U}$ 预防感染。取无运动障碍的大鼠于置管后3 d经导管给予2%利多卡因20 μL ,若注药后30 s内大鼠出现双后肢麻痹现象表明导管位置正确。大鼠分笼独养观察7 d,大鼠出现以下情况不纳入实验统计:有任何神经病理性损伤感觉和运动丧失,如尾麻痹、瘫痪、下肢跛行、单或双侧后肢麻痹拖曳者;局部感染;导管脱落或堵塞不能注药;取标本时发现导管不在鞘内。

坐骨神经分支选择性损伤模型的建立: 鞘内置管成功的生理盐水组和右美托咪啶组大鼠,参照Bennett方法^[17]

制作坐骨神经分支选择性损伤模型。体积分数10%水合氯醛300 mg/kg腹腔注射麻醉, 俯卧固定于操作台。备皮、碘伏消毒、铺巾后, 在左大腿后外侧作一纵形切口, 逐层钝性分离肌肉, 充分暴露坐骨神经及其3个末端分支: 腓肠神经, 腓总神经和胫神经, 用5-0丝线把腓总神经和胫神经分别紧结扎, 在靠近结扎的远端切断, 保留2-4 mm的远侧残端; 保持腓肠神经完整然后分层缝合肌肉和皮肤, 选择左侧后肢, 充分暴露坐骨神经及其3个末端分支: 腓肠神经, 腓总神经和胫神经, 用5-0丝线分别结扎并切断腓总神经和胫神经, 保留2-4 mm残端, 保持腓肠神经完整, 分层缝合肌肉和皮肤, 肌注青霉素 5×10^4 U预防感染。大鼠分笼独养。

鞘内注射右美托咪啶: 在坐骨神经分支选择性损伤后14 d内, 右美托咪啶组每天鞘内注射右美托咪啶3 μ g/kg, 生理盐水稀释至10 μ L, 然后用生理盐水10 μ L冲管, 生理盐水组鞘内注射10 μ L生理盐水, 然后用生理盐水10 μ L冲管。

行为学检测: 参照文献[5, 18], 于药物注射前和注射后2, 7, 14 d, 测定大鼠机械性缩足反射阈值和热缩足潜伏期。

用Von Frey 纤维丝测定机械性缩足反射阈值。使用接触刺激仪测定大鼠缩爪阈值。造模前测定足底基础痛阈值, 将刺激仪细纤维接触大鼠双侧足底中部, 持续时间 ≤ 4 s, 大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应, 否则为阴性反应。每侧足底测试5次, 两次测试至少间隔8-10 min, 去掉最大和最小值, 取3次平均值。

用热辐射法测定大鼠热缩足潜伏期。仪器参数设定: 红外强度(IR)50 W, 切断时间20 s。将大鼠放在足底热痛测定仪的透明隔断箱, 待大鼠适应环境后, 将热源对准损伤后肢足底中部, 启动光热源, 当鼠足因热而出现抬足躲避或离开舔足行为时, 仪器自动记录自加热至抬足的潜伏期。每只大鼠测量5次, 每次间隔至少5 min, 去掉最大和最小值, 计算3次热缩足潜伏期平均值。

实时反转录RT-PCR检测大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶mRNA的表达: 行为学检测后, 采用急性失血法处死, 取大鼠L₄₋₆脊髓组织, 经液氮冷冻碾磨后, 用Trizol试剂盒提取总RNA, 用SuperScript First-Strand Synthesis System试剂盒进行反转录成cDNA, 随后用SYBR Green I进行实时荧光定量PCR, 神经型一氧化氮合酶特异性引物序列为: 正义链: 5'-CTG AAG GCT GGC ATC TGG AA-3', 反义链: 5'-TTC ACA CGA GGG AAC TTG GG-3'; 管家基因GAPDH作为内参, 其引物序列为: 正义链: 5'-AAA CCC ATC ACC ATC TTC C-3', 反义链: 5'-GAC TCC ACG ACA TAC TCA GC-3'。

Western blot检测大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶的表达: 行为学检测后, 取新鲜未固定的大鼠脊髓组织经冷冻碾磨后, 加标本缓冲液裂解, 12 000 r/min离心10 min去沉淀, 98 $^{\circ}$ C煮10min变性, SDS-PAGE电泳,

200 mA转膜, 5%的脱脂奶粉室温封闭1 h, 兔抗大鼠神经型一氧化氮合酶一抗(1:500) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育45 min, TBST洗膜3次, 每次15 min, ECL化学发光。兔抗大鼠 α -微管蛋白一抗(1:1 000)为内参。用BIO-RAD公司的ChemiDoc XRS化学发光仪来检测条带。

苏木精-伊红染色检测大鼠脊髓组织中病理变化: 取大鼠L₄₋₆新鲜组织(约2 mm³)投入体积分数4%甲醛。用由低浓度到高浓度乙醇脱水, 再于二甲苯中透明: 将已透明的组织块置于已溶化的石蜡中包埋, 将包埋好的蜡块切成5.0-6.0 μ m厚, 再贴到载玻片上, 放45 $^{\circ}$ C恒温箱中烘干。将切好的切片放入苏木精水溶液中染色3 min。盐酸乙醇分化10 s, 流水冲洗1 h后, 用体积分数70%和90%乙醇中脱水各10 min, 乙醇伊红染色液染色2.0-3.0 min。染色后的切片经纯乙醇脱水, 再经二甲苯使切片透明。最后用中性树胶封固。

免疫组化染色检测大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶的表达: 行为学检测后, 将大鼠L₄₋₆脊髓取出后立即放40 g/L多聚甲醛灌注固定, 石蜡包埋, 每例标本于石蜡切片机上切取5张厚度为2 mm的切片。柠檬酸盐缓冲液高压修复抗原, 滴加山羊血清封闭液, 室温孵育20 min, 加兔抗大鼠神经型一氧化氮合酶一抗(1:100) 4 $^{\circ}$ C过夜。加通用型生物素化抗兔IgG室温孵育20 min; 辣根酶标记链霉卵白素工作液室温孵育20 min, DAB显色。苏木精复染, 乙醇梯度脱水透明, 中性树胶封固。阴性对照片用PBS代替一抗。

主要观察指标: 大鼠L₄₋₆脊髓中的神经型一氧化氮合酶表达情况。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件(美国SPSS公司)进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内比较采用自身配对t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 总共饲养53只SD大鼠, 36只纳入实验, 17只不纳入实验统计: 鞘内置管后死亡4例, 出现神经病理性损伤感觉和运动丧失12例, 导管脱落1例。

2.2 一般行为学变化 纳入实验大鼠实验过程中健康状况良好, 体质量无明显减轻, 觅食和饮水基本正常。坐骨神经分支选择性损伤麻醉清醒后即出现疼痛表现, 损伤侧足趾并拢并轻度内收, 伴有舔足、踮地行走及自发甩腿等反应, 损伤侧足趾承重能力下降, 术侧足翘起不着地, 没有出现自噬现象。右美托咪啶组大鼠注药后2 d左足疼痛较生理盐水组明显改善, 舔足、踮地行走明显减少, 左足翘起不着地或着地不负重的次数也减少。正常对照组活动如常, 未出现舔足、踮地行走及自发甩腿反应, 双后爪着地且负重。

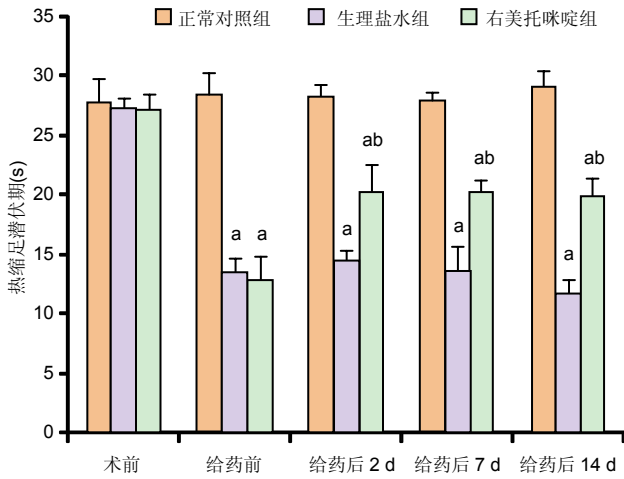


图1 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤大鼠痛阈的影响

Figure 1 Effects of intrathecal injection of dexmedetomidine on pain threshold of rats with selective damage of sciatic nerve branch

图注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与生理盐水组比较, ^b $P < 0.05$ 。术前、给药前和给药后 2 d 每组检测 12 只大鼠; 给药后 7 d 每组检测 8 只大鼠; 给药后 14 d 每组检测 4 只大鼠。

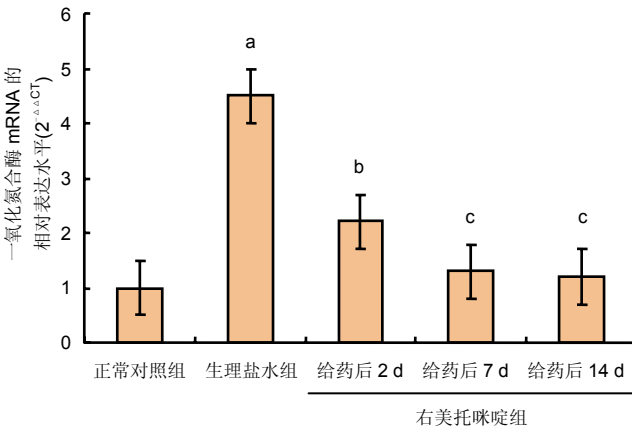
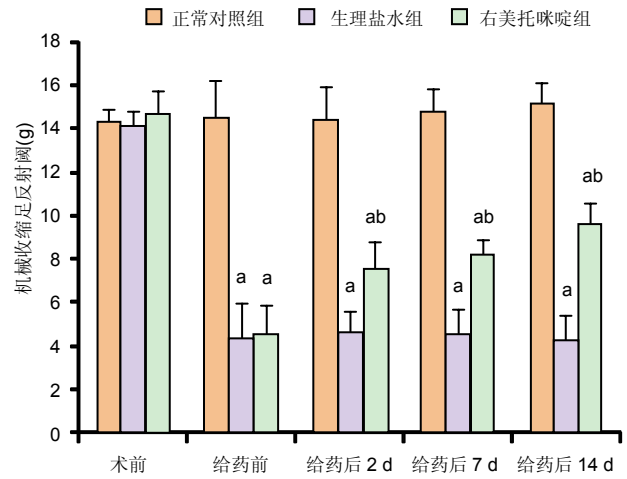


图2 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓组织中一氧化氮合酶 mRNA 表达水平的影响

Figure 2 Effects of intrathecal injection of dexmedetomidine on nitric oxide synthase mRNA expression in the spinal cord of rats with selective damage of sciatic nerve branch

图注: 与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与生理盐水组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。术前、给药前和给药后 2 d 每组检测 12 只大鼠; 给药后 7 d 每组检测 8 只大鼠; 给药后 14 d 每组检测 4 只大鼠。

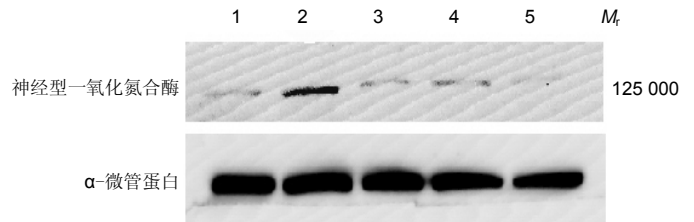


图3 Western blot 检测的鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤脊髓组织中神经型一氧化氮合酶表达水平的影响

Figure 3 Western blot assay for effects of intrathecal injection of dexmedetomidine on neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal cord of rats with selective damage of sciatic nerve branch
图注: 1 为正常对照组; 2 为生理盐水组; 3-5 分别为右美托咪啶组给药后 2, 7, 14 d。

2.3 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤大鼠痛阈影响 3组大鼠在坐骨神经分支选择性损伤前机械性缩足反射阈值与热缩足潜伏期无显著性差异。坐骨神经分支选择性损伤术后, 手术组与正常对照组比较, 机械性缩足反射阈值及热缩足潜伏期明显降低($P < 0.05$); 与生理盐水组比较, 右美托咪啶组在给药后2, 7, 14 d机械性缩足反射阈值与热缩足潜伏期显著性升高($P < 0.05$); 见图1。

2.4 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓组织中一氧化氮合酶 mRNA 表达水平的影响 与正常对照组相比, 生理盐水组大鼠脊髓组织中一氧化氮合酶 mRNA 表达水平明显升高($P < 0.05$), 而右美托咪啶组在给药后第2天大鼠脊髓组织中一氧化氮合酶 mRNA 的表达

水平明显低于生理盐水组($P < 0.05$), 且随着给药天数的增加大鼠脊髓组织中一氧化氮合酶 mRNA 的表达水平继续降低, 到14 d时大鼠脊髓组织中一氧化氮合酶 mRNA 的表达水平接近正常对照组(图2)。

2.5 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤脊髓组织中神经型一氧化氮合酶表达水平的影响 Western blot 检测结果显示, 正常对照组大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶表达水平较低, 但生理盐水组大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶表达水平明显升高, 给药2 d后右美托咪啶组慢性神经痛大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶表达水平有所下降, 随着给药时间的延长, 右美托咪啶组慢性神经痛大鼠脊髓组织中神经型一氧化氮合酶表达水平持续下降, 至14 d时达到最低, 与正常对照组表达水平接近(图3)。

2.6 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓组织形态及脊髓背角神经元中神经型一氧化氮合酶表达的影响 光镜下观察可见, 正常对照组大鼠脊髓组织中神经元细胞未见明显病理改变; 生理盐水组大鼠脊髓背角神经元数目明显减少, 部分细胞出现皱缩、胞核轮廓不清,

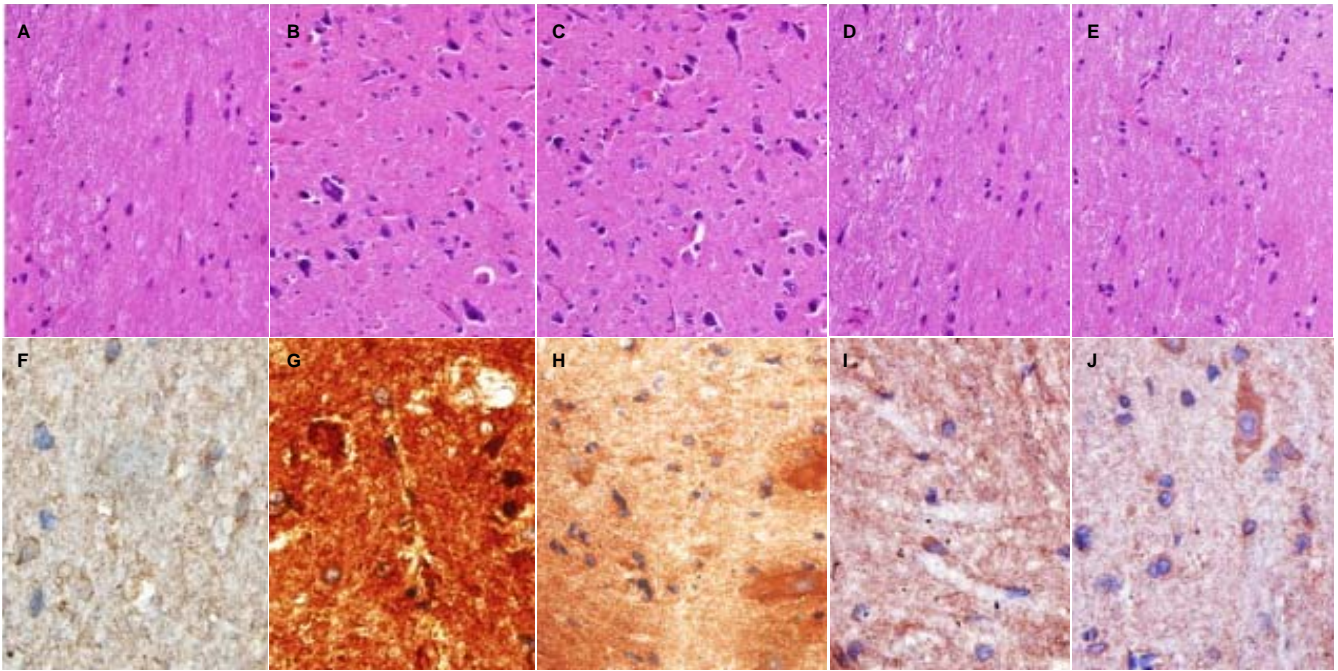


图4 鞘内右美托咪啶对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓组织形态及脊髓背角神经元中神经型一氧化氮合酶表达的影响($\times 200$)

Figure 4 Effects of intrathecal injection of dexmedetomidine on morphology of rat spinal cord and neuronal nitric oxide synthase expression in the spinal dorsal horn neurons of rats with selective damage of sciatic nerve branch ($\times 200$)

图注: 图中 A-E 为苏木精-伊红染色的结果, F-J 为免疫组化染色的结果, 其中 A, F 为正常对照组, B, G 为生理盐水组, C, H 为右美托咪啶组给药后 2 d, D, I 为右美托咪啶组给药后 7 d, E, J 为右美托咪啶组给药后 14 d。

甚至变性坏死, 细胞内尼氏体聚集成团块状或溶解消失; 右美托咪啶组大鼠在给药前脊髓背角神经元变性坏死及尼氏体凝固、溶解情况与生理盐水组相似, 但随着给药天数的增加逐渐减轻直至 14 d 接近正常(图4)。

同时, 免疫组化染色结果也显示, 各组一氧化氮合酶蛋白表达比较正常对照组脊髓背角神经型一氧化氮合酶蛋白表达为阴性或弱阳性; 生理盐水组脊髓背角中神经型一氧化氮合酶表达为强阳性; 右美托咪啶组神经元在给药后神经型一氧化氮合酶表达为强阳性, 随着给药天数的增加, 其表达逐渐降低, 到 14 d 表达接近阴性(图4)。

3 讨论 Discussion

神经病理性疼痛是传入神经、脊髓或中枢神经系统等部分功能异常或结构损伤所导致的疼痛, 主要表现为痛觉的高反应性, 呈慢性疼痛状态, 是目前临床治疗的难点之一。脊髓是痛觉传入的第一站, 也是痛觉整合的初级中枢。脊髓背角神经元敏感化是神经病理痛形成的重要机制之一^[19]。外周持续刺激使传入纤维在脊髓背角不断释放神经递质、细胞因子等, 导致背角神经元对外来的传入信号兴奋性增高、感受野扩宽、对伤害或非伤害刺激的反应增强。脊髓内的 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体主要位于突触后膜, 右美托咪啶抗焦虑和较强镇静效果主要是通过与脊髓内的 $\alpha 2$ 受体结合实现的, 激动脊髓内的 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体除了抗焦虑和较强镇静作用外, 还具有较强的镇痛作用^[20]。鞘内注射右美托咪啶可减轻小鼠急性炎性痛和减轻坐骨神经结扎损伤大鼠

的机械和热痛敏, 产生明显镇痛效应^[21-25], 由于坐骨神经分支选择性损伤模型操作简单、产生疼痛需要的时间短、疼痛程度的个体差异性小^[26-27], 所以本实验选择并成功建立了大鼠坐骨神经分支选择性损伤模型, 坐骨神经分支选择性损伤后, 生理盐水组和右美托咪啶组大鼠均出现缩足、舔爪、结扎侧足轻度外翻且有时出现悬空等后肢保护现象的行为学改变, 与正常对照组比较, 机械性缩足反射阈值及热缩足潜伏期明显降低($P < 0.05$), 提示这 2 组大鼠有痛觉超敏的形成; 右美托咪啶组给药后第 2 天起保护性行为学改变逐渐减轻, 第 14 天时大鼠后肢活动基本恢复正常, 右美托咪啶组在给药后 2, 7, 14 d 机械性缩足反射阈值与热缩足潜伏期较生理盐水组显著性升高($P < 0.05$)。提示鞘内注射右美托咪啶激动脊髓内的 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体, 可减轻坐骨神经分支选择性损伤大鼠的机械和热痛敏, 产生明显镇痛效应。

脊髓后角一氧化氮的生成在痛信息传递和痛觉过敏的产生中起着重要的作用^[28-29]许多证据证明^[30-31], 在外周和中枢神经系统中, 一氧化氮合酶在慢性神经病理性疼痛中发挥了重要的作用, 外周神经损伤可导致脊髓背角神经元神经型一氧化氮合酶的过度表达, 同时伴有痛觉过敏和痛觉失常。Makuc 等^[32]发现在皮下注入甲醛前, 先向髓腔内注入一氧化氮合酶抑制剂, 疼痛行为产生明显减弱, 提示一氧化氮合酶/一氧化氮在炎性痛的形成中发挥作用。全身或鞘内注射非特异性一氧化氮合酶抑制剂或选择性一氧化氮合酶抑制剂, 会导致脊神经结扎模型中神经病理性疼痛

的热痛反应减轻, 而一氧化氮合酶敲除小鼠不能显示出神经损伤所诱导的机械痛敏。这些都表明一氧化氮合酶参与了病理性疼痛^[33-37]。

坐骨神经分支选择性损伤后机械性缩足反射阈值与热缩足潜伏期显著降低, 产生痛觉过敏, 可能机制是坐骨神经分支选择性损伤使外周伤害性刺激增强, 引起 Ca^{2+} 异常内流, 激活一氧化氮合酶, 生成大量一氧化氮。实验结果与之相符, 大鼠脊髓组织一氧化氮合酶 mRNA 表达水平、Western blot 检测和免疫组化染色显示, 坐骨神经分支选择性损伤后生理盐水组和右美托咪啶组一氧化氮合酶表达水平明显升高。一氧化氮作为一种生物活性极强的小分子物质, 可产生以下作用^[38-40]: ①作为神经信号因子, 激活可溶性鸟苷酸环化酶, 引发一氧化氮-环鸟苷酸级联放大机制, 易化伤害性神经元的敏感性。②作为第二信使逆行扩散至突触前神经元, 释放兴奋性氨基酸和某些神经肽增多, 导致背角神经元对外来的感受野扩宽和增强传入信号的兴奋性。③弥散至邻近胶质细胞和神经元, 协同谷氨酸破坏抑制性中间神经元, 解除伤害性神经元的抑制, 使中枢敏感受化, 表现为自发痛行为反应、痛觉过敏、痛感受野扩大等。在鞘内注射右美托咪啶后, 右美托咪啶组给药后 2, 7, 14 d 机械性缩足反射阈值与热缩足潜伏期较生理盐水组显著改善, 一氧化氮合酶 mRNA 表达水平、Western blot 检测和免疫组化染色显示随着给药时间的延长右美托咪啶组一氧化氮合酶持续下降, 至 14 d 时接近正常对照组表达水平。实验表明鞘内注射右美托咪啶后一氧化氮合酶出现明显下降, 并且随着给药天数的增加, 脊髓背角神经元内一氧化氮合酶的表达逐渐降低, 与痛阈改善相对应, 提示鞘内注射右美托咪啶减轻坐骨神经分支选择性损伤引起的痛敏与抑制一氧化氮合酶表达有关。

大量研究表明在外伤、肿瘤以及炎症等损因素所致的神经病理性疼痛动物模型中存在着不同程度的脊髓背角神经元凋亡^[41-43]。同时有研究发现脊髓背角神经元的凋亡是神经病理性疼痛形成的重要因素^[44], 发现那些凋亡的神经元多数为痛觉传导抑制性神经元, 这些抑制性神经元数目的减少可引起脊髓背角的过度兴奋, 参与维持脊髓敏感受化, 在神经病理性疼痛形成中发挥重要作用。实验结果显示, 生理盐水组与右美托咪啶组在造模术后痛敏形成的过程中出现明显的脊髓背角神经元细胞的凋亡, 而正常神经元数量减少, 可能与一氧化氮与过氧化物生成过氧亚硝基阴离子, 通过抑制线粒体呼吸链及强氧化作用, 导致细胞损伤甚至神经元凋亡有关。更值得注意的是, 随着给药天数的增加, 右美托咪啶组大鼠各时点痛敏较生理盐水组有明显得改善, 而脊髓背角神经元的凋亡程度也逐渐减轻直到 14 d 时神经元形态基本恢复正常。该结果提示在坐骨神经分支选择性损伤神经病理性疼痛中脊髓背角神经元的凋亡与痛敏的形成之间可能存在着一定的关系, 鞘内注射右美托咪啶降低脊髓背角一氧化氮合酶的表达, 减少一氧化氮

与过氧化物生成过氧亚硝基阴离子, 从而改善细胞损伤甚至抑制神经元凋亡。

综上所述, 鞘内注射右美托咪啶通过激动脊髓内的 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体, 降低脊髓背角一氧化氮合酶的表达, 从而减轻病理性神经痛引起的痛觉超敏, 起到明显的镇痛作用, 并且抑制一氧化氮合酶表达能减轻坐骨神经分支选择性损伤大鼠模型中神经病理性疼痛引起的神经元损伤程度, 提示鞘内注射右美托咪啶可能通过抑制神经元细胞的凋亡起到镇痛作用。

作者贡献: 邓海洪、肖晓山进行实验设计, 实验实施为邓海洪、马松梅, 实验评估为邓海洪, 资料收集为马松梅, 邓海洪成文, 肖晓山审核, 邓海洪对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 右美托咪啶-是高选择性 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体激动剂, 具有中枢性抗交感作用, 能产生近似自然睡眠的镇静作用; 同时具有一定的镇痛、利尿和抗焦虑作用, 对呼吸无抑制, 还具有对心、肾和脑等器官功能产生保护的毒性。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 李琦, 曾炳芳, 王金武. 神经病理性疼痛研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2007, 13(4): 244-246.
- [2] Bennett GJ. Neuropathic pain: new insights, new interventions. Hosp Pract (1995). 1998;33(10):95-98, 101-104, 107-10 passim.
- [3] Vallejo R, Tilley DM, Williams J, et al. Pulsed radiofrequency modulates pain regulatory gene expression along the nociceptive pathway. Pain Physician. 2013;16(5): E601-613.
- [4] Han G, Li L, Meng LX. Effects of hyperbaric oxygen on pain-related behaviors and nitric oxide synthase in a rat model of neuropathic pain. Pain Res Manag. 2013;18(3): 137-141.
- [5] 仲吉英, 杨承祥, 徐枫, 等. 鞘内注射右美托咪啶对坐骨神经结扎损伤模型大鼠的镇痛作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(9): 916-918.
- [6] Szumita PM, Baroletti SA, Anger KE, et al. Sedation and analgesia in the intensive care unit: evaluating the role of dexmedetomidine. Am J Health Syst Pharm. 2007;64(1): 37-44.
- [7] 陈章玲, 曹德权, 徐军美, 等. 右美托咪啶临床应用新进展[J]. 广东医学, 2012, 33(2): 290-292.
- [8] 苑进革, 陈永学, 赵森明, 等. 右美托咪啶注射液的临床应用进展[J]. 山东医药, 2012, 52(44): 100-102.
- [9] Grewal A. Dexmedetomidine: New avenues. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2011;27(3):297-302.
- [10] Bhana N, Goa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidine. Drugs. 2000;59(2):263-270.
- [11] 周汾, 李肇端, 余剑波. 右美托咪啶临床应用研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 19(2): 215-217.

- [12] Kanazi GE, Aouad MT, Jabbour-Khoury SI, et al. Effect of low-dose dexmedetomidine or clonidine on the characteristics of bupivacaine spinal block. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006; 50(2):222-227.
- [13] Shukla D, Verma A, Agarwal A, et al. Comparative study of intrathecal dexmedetomidine with intrathecal magnesium sulfate used as adjuvants to bupivacaine. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2011;27(4):495-499.
- [14] Ishii H, Kohno T, Yamakura T, et al. Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2008;27(12):3182-3190.
- [15] 侯家保,肖兴鹏,夏中元,等.鞘内注射不同剂量右美托咪啶对大鼠的抗伤害效应和脊髓神经毒性[J].*中华麻醉学杂志*,2011,31(6): 710-713.
- [16] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 1976;17(6):1031-1036.
- [17] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988;33(1):87-107.
- [18] 王一涵,冷玉芳,李娟,等.右美托咪啶对慢性神经病理性痛大鼠脊髓背角神经元凋亡的影响[J].*中华麻醉学杂志*,2012,32(3): 353-357.
- [19] 孙瑞卿,王韵,万有,等.神经源性痛的机制研究进展[J].*中国疼痛医学杂志*,2003,9(2):105-110.
- [20] Civantos Calzada B, Aleixandre de Artiñano A. Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol Res*. 2001;44(3): 195-208.
- [21] 韩雪娜,冷玉芳,王一涵,等.右美托咪啶对神经病理性痛大鼠脊髓嘌呤受体P2X4mRNA和p38丝裂原活化蛋白激酶mRNA表达的影响[J].*中华麻醉学杂志*,2012,32(4):440-443.
- [22] 邢艳红,冷玉芳,王殊秀,等.可乐定与右美托咪啶对慢性神经病理性痛大鼠背根神经节生长相关蛋白-43 mRNA表达的影响[J].*中华医学杂志*,2012,92(7):444-447.
- [23] 冯惠民,杜平,李廷坤,等.鞘内注射右美托咪啶对大鼠皮下蜜蜂毒诱导所致的持续性痛反应的抑制作用[J].*上海医学*,2011,34(12): 953-954.
- [24] 张红星,曹学照,周芳翰,等.鞘内注射右美托咪啶对小鼠急性炎症性痛的影响[J].*中华麻醉学杂志*,2011,31(12):1458-1460.
- [25] 梁伟东,陈彦青.右美托咪啶及舒芬太尼联合鞘内注射对CCI模型大鼠的镇痛效应[J].*中国疼痛医学杂志*,2013,19(6): 336-340.
- [26] 金小高,罗爱林,张广雄.三种大鼠神经病理性疼痛模型的制备和效果比较[J].*临床麻醉学杂志*,2005,21(5):338-340.
- [27] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*. 2000;87(2): 149-158.
- [28] Pullen AH, Humphreys P, Baxter RG. Comparative analysis of nitric oxide synthase immunoreactivity in the sacral spinal cord of the cat, macaque and human. *J Anat*. 1997;191 (Pt 2): 161-175.
- [29] 曾静波,李文斌,陈晓玲,等.大鼠甲醛炎症性痛过程中脊髓后角 NOS的变化及其时间过程[J].*中国病理生理杂志*,2000,16(10): 1109-1113.
- [30] Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*. 2000;288(5472):1765-1769.
- [31] 郭建荣,贾东林,喻君,等.鞘内注射GDNF对神经病理性疼痛大鼠脊髓NO含量和NOS活性的影响[J].*中国疼痛医学杂志*,2011, 17(13): 171-175.
- [32] Makuch W, Mika J, Rojewska E, et al. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine- and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology*. 2013;75: 445-457.
- [33] Bobadilla NA, Tapia E, Jiménez F, et al. Dexamethasone increases eNOS gene expression and prevents renal vasoconstriction induced by cyclosporin. *Am J Physiol*. 1999; 277(3 Pt 2):F464-471.
- [34] 袁维秀,张宏,徐娟,等.鞘内注射氯胺酮对慢性神经痛大鼠脊髓背角一氧化氮合酶的影响[J].*中华麻醉学杂志*,2004,24(5): 377-379.
- [35] Schulte D, Millar J. The effects of high- and low-intensity percutaneous stimulation on nitric oxide levels and spike activity in the superficial laminae of the spinal cord. *Pain*. 2003;103(1-2):139-150.
- [36] Yoon YW, Sung B, Chung JM. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. *Neuroreport*. 1998;9(3):367-372.
- [37] Wong CS, Cherng CH, Tung CS. Intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists or nitric oxide synthase inhibitor reduced autotomy behavior in rats. *Anesth Analg*. 1998;87(3):605-608.
- [38] Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994;298 (Pt 2):249-258.
- [39] Schmidt HH, Walter U. NO at work. *Cell*. 1994;78(6):919-925.
- [40] 周初松,高建章,赵定麟,等. L-精氨酸对大鼠急性脊髓压迫损伤早期局部微循环的影响及其意义[J].*中华创伤杂志*,1997,13(2): 102-104 .
- [41] Micale V, Cristino L, Tamburella A, et al. Enhanced cognitive performance of dopamine D3 receptor "knock-out" mice in the step-through passive-avoidance test: assessing the role of the endocannabinoid/endovanilloid systems. *Pharmacol Res*. 2010;61(6):531-536.
- [42] Whiteside GT, Munglani R. Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathic pain. *J Neurosci Res*. 2001; 64(2): 168-173.
- [43] 冷玉芳,金海燕.大鼠坐骨神经慢性压迫损伤后脊髓感觉神经元发生非凋亡性细胞程序性死亡[J].*中国疼痛医学杂志*,2009, 15(1):23-26.
- [44] Appleby VJ, Corrêa SA, Duckworth JK, et al. LTP in hippocampal neurons is associated with a CaMKII-mediated increase in GluA1 surface expression. *J Neurochem*. 2011; 116(4):530-543.