

鞘内注射右美托咪定干预慢性神经痛模型大鼠脊髓背角蛋白激酶C的表达

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:

实验探讨鞘内注射右美托咪定对坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠的镇痛效果及机制。结果显示右美托咪定在给药后第2天大鼠脊髓组织蛋白激酶C表达有所下降, 随着给药时间的延长, 其表达持续下降, 在14 d时达到最低, 与正常对照组表达相当。提示鞘内注射右美托咪定可减轻坐骨神经分支选择性损伤模型引起的痛敏, 可能与其抑制脊髓背角蛋白激酶C的表达相关。

关键词:

组织构建; 组织工程; 鞘内注射; 右美托咪定; 脊髓背角; 慢性神经痛; 蛋白激酶C

主题词:

脊髓; 神经痛; 蛋白激酶C

基金资助:

广东省医学科研基金立项资助科研课题(A2012146)

摘要

背景: 右美托咪定是一种高效、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定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60只, 随机均分为3组。除正常对照组外, 另2组大鼠建立坐骨神经分支选择性损伤模型, 右美托咪定组在造模后14 d内每天鞘内注射右美托咪定 $3 \mu\text{g/kg}$, 生理盐水组在同时注射等容量的生理盐水。于坐骨神经分支选择性损伤模型前、术后鞘内给药前和鞘内给药后2, 7, 14 d测定大鼠热刺激缩足反射潜伏期和机械刺激缩足反射痛阈值, 并在术后第2, 7, 14天鞘内注射药物后, 每组每个时间点分别处死4只大鼠, 取其L₄₋₆脊髓, RT-PCR及Western blot法分别检测脊髓背角蛋白激酶C mRNA及蛋白水平的表达情况, 苏木精-伊红染色检测脊髓背角神经元形态学变化, 免疫组织化学法检测脊髓背角蛋白激酶C蛋白表达的水平及分布情况。

结果与结论: 与正常对照组比较, 给药前、给药后各时点生理盐水组和右美托咪定组热刺激缩足反射潜伏期和机械刺激缩足反射痛阈值均明显降低($P < 0.05$); 与生理盐水组比较, 给药后各时点右美托咪定组热刺激缩足反射潜伏期延长和机械刺激缩足反射痛阈值均明显升高($P < 0.05$); 右美托咪定组脊髓背角蛋白激酶C表达明显明显低于生理盐水组, 且在给药14 d时达到最低接近于正常对照组。右美托咪定组脊髓背角神经元凋亡程度也较生理盐水组轻微, 在给药14 d时神经元形态基本接近正常对照组。提示鞘内注射右美托咪定可减轻坐骨神经分支选择性损伤模型引起的痛敏, 可能与其抑制脊髓背角蛋白激酶C的表达相关。

邓海洪, 马松梅, 肖晓山. 鞘内注射右美托咪定干预慢性神经痛模型大鼠脊髓背角蛋白激酶C的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(29):4683-4688.

Effect of intrathecal injection of dexmedetomidine on protein kinase C expression of spinal dorsal horn neurons in a rat model of chronic neuralgia

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

Abstract

BACKGROUND: Dexmedetomidine is an efficient, highly selective α_2 -adrenergic receptor agonist, with sedative, analgesia and anti-anxiety effects, it has little impact on the respiration.

OBJECTIVE: To observe the analgesic effect induced by intrathecal injection of dexmedetomidine in rat model of spared nerve injury.

METHODS: A total of 60 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=12$): normal control group, dexmedetomidine group and saline group. Except for the normal control group, spared nerve injury model was established in the rats of dexmedetomidine group and saline group. Dexmedetomidine group was treated with intrathecal injection of dexmedetomidine $3 \mu\text{g/kg}$ every day within 14 days after injury. Saline group was given equal volume of saline for 14 days. The thermal withdrawal latency and mechanical withdrawal threshold were measured respectively before injury, after injury, before injection, and 2, 7, 14 days after intrathecal injection. Four rats were sacrificed in each group at day 2, 7 and 14 after injection, and the lumbar segments (L₄₋₆) of the spinal cord were removed. Real-time RT-PCR and western blot analysis were used to determine the expression of protein kinase C mRNA and protein in the spinal dorsal horn neurons. Hematoxylin-eosin staining was performed to detect the morphology of the spinal dorsal horn neurons and

邓海洪, 男, 1973年生, 广东省五华县人, 汉族, 广东医学院在读硕士, 副主任医师, 主要从事麻醉和疼痛医学的研究。

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, 广东省广州市 510317

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.29.016

[http://www.crter.org]

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)29-04683-06

稿件接受: 2014-05-27

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

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

Accepted: 2014-05-27

immunohistochemistry staining was carried out to assess the expression level and distribution of protein kinase C.

RESULTS AND CONCLUSION: The thermal withdrawal latency and mechanical withdrawal threshold in dexmedetomidine group and saline group were significantly decreased compared with normal control group before or after injection ($P < 0.05$). However, both the thermal withdrawal latency and mechanical withdrawal threshold in dexmedetomidine group after intrathecal injection were significantly higher than those in saline group ($P < 0.05$). The protein kinase C expression in spinal dorsal horn neurons was significantly decreased in dexmedetomidine group compared with saline, and reached to the most lowest levels as normal control group on 14 days after injection. Moreover, the apoptosis of spinal dorsal horn neurons in dexmedetomidine group was lighter than that in saline group, and was similar to the morphology of neurons in normal control group on 14 days after injection. Intrathecal injection of dexmedetomidine could attenuate the hyperalgesia induced by spared nerve injury, which might be associated with the inhibition of protein kinase C expression in spinal dorsal horn.

Subject headings: spinal cord; neuralgia; protein kinase C

Funding: Medical Sciences Foundation of Guangdong Province, No. A2012146

Deng HH, Ma SM, Xiao XS. Effect of intrathecal injection of dexmedetomidine on protein kinase C expression of spinal dorsal horn neurons in a rat model of chronic neuralgia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(29):4683-4688.

0 引言 Introduction

在2011年国际疼痛学会(IASP)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”。包括周围性神经痛,继发于肿瘤浸润的神经病、痛性糖尿病神经病、幻肢痛、疱疹后疼痛、乳腺切除术后疼痛、三叉神经痛、中枢性神经痛综合征、脊髓损伤疼痛等,临床常称为慢性神经痛。其主要表现为痛觉的高反应性,以自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏等为特征,可持续数天至数年。

神经病理痛的致病因素广泛,病理机制复杂,临床症状表现具多样性和差异性,疗效不满意^[1]。一旦产生了神经性疼痛,神经系统的多个层面包括周围神经、中枢神经和交感神经都是被涉及的对象,成熟神经元结构、神经元之间的连接以及神经递质、受体、离子通道数量和质量均会发生改变。如何从信号转导通路中将庞杂的分子变化串联起来解释神经性疼痛的发生,找到神经性疼痛发病过程中的关键分子,以便有针对性地设计不良反应尽可能少的有效药物,是近年来疼痛学研究的一项挑战性课题及研究热点,也是未来药物开发的重要方向。

研究表明神经病理痛可能与蛋白激酶C等细胞内信号转导分子的异常激活密切相关^[2]。蛋白激酶C广泛分布于多种组织、器官和细胞,蛋白激酶C是G蛋白偶联受体系统中的效应物,是一种细胞质酶,在非活性状态下是水溶性的,游离存在于胞质溶胶中,激活后成为膜结合的酶,能激活细胞质中的酶,参与生化反应的调控,同时也能作用于细胞核中的转录因子,参与基因表达的调控,是一种多功能的酶。蛋白激酶C的活性依赖于钙离子和磷脂的存在,但只有在磷脂代谢中间产物二酰甘油存在下,生理浓度的钙离子才起作用,当细胞受到刺激后,蛋白激酶C以 Ca^{2+} 依赖的形式从胞浆中移位到细胞膜上,此过程称之为转位,一般将蛋白激酶C的转位作为蛋白激酶C激活的标志。

神经损伤使得细胞内的P物质大量释放,并且激活磷脂酶C,水解膜磷脂,使细胞内的三磷酸肌醇和二酰甘油浓度增加。二酰甘油能使无活性的蛋白激酶C由胞浆转移

至胞膜从而活化。激活的蛋白激酶C使一氧化氮合酶等钙调蛋白磷酸化,引起脊髓的可塑性变化,是信息得以长久维持,从而导致中枢的敏感化^[3]。

研究发现,脊髓背角蛋白激酶C γ 的激活使N-甲基-D-天氨酸受体通道打开后导致痛觉过敏的形成是炎性疼痛和神经病理性疼痛的机制之一^[4];酪氨酸蛋白激酶受体B的表达也随脑源性神经营养因子的增加而上调脊髓背角的脑源性神经营养因子与突触后神经元上的酪氨酸蛋白激酶受体B结合,通过激活蛋白激酶C途径从而引起痛觉过敏^[5];大鼠足底注射甲醛后,脊髓后角神经元内蛋白激酶C可被激活并发生膜转移^[6];在正常大鼠脊髓内给予蛋白激酶C激动剂,可使大鼠产生自发痛和痛觉过敏^[7];而蛋白激酶C γ 基因敲除小鼠则对伤害性刺激几乎不发生痛反应^[8]。在组织损伤或炎症诱导的自发性痛及痛觉过敏产生中,脊髓传导伤害性信息神经元中蛋白激酶C激活起重要作用^[9],而鞘内应用右美托咪定能在脊髓水平抑制蛋白激酶C γ 表达,缓解大鼠骨癌模型的疼痛。

右美托咪定是新型高选择性的 α_2 肾上腺素能受体激动剂,与 α_2 肾上腺素能受体、 α_1 肾上腺素能受体结合的比例为1 600:1,由于其具有抗交感、镇静和镇痛的作用,无呼吸抑制,能稳定血流动力学,现已广泛用于麻醉科、重症监护病房的镇静。鞘内注射右美托咪定可减轻小鼠急性炎性痛和减轻坐骨神经结扎损伤(CCI)模型大鼠的机械和热痛敏^[10-12],产生明显镇痛效应^[13],其镇痛作用的主要受体是脊髓及其外周的 α_2 肾上腺素能受体,鞘内给药可提高脊髓 α_2 肾上腺素能受体的药物浓度,减少药物对大脑中枢的影响。根据文献报道,实验通过鞘内注射右美托咪定3 $\mu\text{g/kg}$ 探讨右美托咪定的镇痛效应及其对脊髓背角神经元蛋白激酶C表达的影响^[14-15]。本实验之所以选择坐骨神经保留性神经损伤模型,是因为该模型操作简单、产生疼痛需要的时间短、疼痛程度的个体差异性小^[16]。

1 材料和方法 Materials and methods

设计:随机对照动物实验。

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

材料:

实验动物与分组: 清洁级6周龄雄性SD大鼠60只, 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)。采用随机数字表法分为3组($n=20$): 正常对照组、生理盐水组、右美托咪定组, 每组在鞘内注射药物后即日和第2, 7, 14天分别处死4只大鼠, 各组根据处死时点分4个亚组: 给药后即日组(D0, $n=20$), 给药后2 d组(D2, $n=16$), 给药后7 d组(D7, $n=12$), 给药后14 d组(D14, $n=8$)。右美托咪定组在坐骨神经分支选择性损伤模型术后14 d内每天鞘内注射右美托咪定3 $\mu\text{g/kg}$, 生理盐水稀释至10 μL , 然后用生理盐水10 μL 冲管; 生理盐水组鞘内注射等容量生理盐水。

右美托咪定影响大鼠脊髓背角蛋白激酶C表达实验所用药物及仪器:

试剂及仪器	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 PKC 一抗, 羊抗兔二抗, 兔抗大鼠 Tubulin 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

实验方法:

鞘内置管: 参照Yaksh等^[17]法经枕环孔将PE-10导管置入鞘内至腰膨大处, 肌注青霉素(4.0–5.0) $\times 10^4$ U预防感染, 分笼独养5 d, 以下弃用: 运动丧失, 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。

坐骨神经分支选择性损伤模型模型建立: 生理盐水组、右美托咪定组参照Bennett方法^[18]制作坐骨神经分支选择性损伤模型模型, 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远端残端, 保持腓肠神经完整, 分层缝合肌肉和皮肤, 肌注青霉素(4.0–5.0) $\times 10^4$ U预防感染。正常组不做处理。

行为学实验: 参照文献[19]各组大鼠于药物注射前、注射后2, 7和14 d, 测定机械性缩足反射阈值和热缩足潜伏期。

Real-Time RT-PCR: 取自大鼠的脊髓组织经液氮冷冻法碾磨后, 用Trizol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。

蛋白激酶C特异性引物序列为: sense, 5'-CTC CCA TTC CTT CTC CAT CC-3'; anti-sense, 5'-CAT CAC CTT CCC AAA ACT GC-3'; 管家基因GAPDH作为内对照, 其引物序列为: sense, 5'-AAA CCC ATC ACC ATC TTC C-3';

anti-sense, 5'-GAC TCC ACG ACA TAC TCA GC-3'。

Western blot: 取新鲜未固定的脊髓组织经冷冻碾磨后, 加sample buffer裂解, 12 000 r/min离心10 min去沉淀, 98 $^{\circ}\text{C}$ 煮10 min变性, SDS-PAGE电泳, 200 mA转膜, 5%的脱脂奶室温封闭1 h, 兔抗鼠蛋白激酶C一抗(1:500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育45 min, TBST洗膜3次, 15 min/次, ECL化学发光。Tubulin(1:1 000)作为内参。

免疫组织化学染色技术: 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, 加一抗蛋白激酶C(1:100, 兔抗, Sigma), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。加通用型二抗(生物素化抗兔IgG), 室温孵育20 min; 再加三抗(辣根过氧化物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: ①3组痛阈的变化。②光镜下各组脊髓病理学变化。③各组蛋白激酶C mRNA表达水平变化。④Western blot检测各组蛋白激酶C蛋白表达水平。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 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, $P < 0.05$ 差异为有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验分批进行, 脱落动物在下一批随机分组补充。总共饲养69只SD大鼠, 60只纳入实验, 9只不纳入实验统计: 鞘内置管后死亡2例, 出现神经病理性损伤感觉和运动丧失5例, 导管脱落2例。

2.2 三组大鼠痛阈的变化 造模前3组大鼠热刺激缩足反射潜伏期、机械刺激缩足反射痛阈值差异无显著性意义。与正常对照组比较, 给药前和给药后各时点生理盐水组和右美托咪定组热刺激缩足反射潜伏期、机械刺激缩足反射痛阈值均明显缩短($P < 0.05$)。与生理盐水组比较, 右美托咪定组在给药后各时点热刺激缩足反射潜伏期、机械刺激缩足反射痛阈值均明显延长($P < 0.05$), 见表1。

2.3 光镜下各组脊髓病理学变化 正常对照组神经元细胞未见明显病理改变; 生理盐水组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, 甚至变性坏死, 细胞内尼氏体聚集成团块状或溶解消失; 右美托咪定组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1)。

2.4 各组蛋白激酶C mRNA表达水平变化 RT-PCR检测结果显示, 与正常对照组相比, 生理盐水组蛋白激酶C mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$), 而右美托咪定组在给药后第2天其表达水平明显低于生理盐水组, 并随着给药天

表 1 正常对照组、生理盐水组及右美托咪定组大鼠各时点热刺激缩足反射潜伏期、机械刺激缩足反射痛阈值比较
Table 1 The thermal withdrawal latency and mechanical withdrawal threshold in three groups at each time point ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	术前(n=20)	给药前(n=20)	给药后		
				2 d(n=16)	7 d(n=12)	14 d(n=8)
热刺激缩足反射潜伏期(s)	正常对照组	27.7±2.1	28.5±1.8	28.3±1.1	28.0±0.7	29.1±1.4
	生理盐水组	27.2±1.0	13.0±1.2 ^a	14.5±1.0 ^a	13.6±2.1 ^a	11.6±1.4 ^a
	右美托咪定组	26.9±1.6	12.0±2.2 ^a	19.6±3.1 ^{ab}	20.2±1.2 ^{ab}	19.9±1.6 ^{ab}
机械刺激缩足反射痛阈值(g)	正常对照组	14.3±0.7	14.5±1.8	14.4±1.6	14.8±1.1	15.2±1.0
	生理盐水组	14.1±0.8	4.0±1.7 ^a	4.6±1.0 ^a	4.5±1.2 ^a	4.2±1.3 ^a
	右美托咪定组	14.7±1.1	4.0±1.4 ^a	7.5±1.3 ^{ab}	8.2±0.7 ^{ab}	9.6±1.0 ^{ab}

表注：生理盐水组比较，右美托咪定组在给药后各时点热刺激缩足反射潜伏期、机械刺激缩足反射痛阈值均明显延长。与正常对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与生理盐水组比较，^b $P < 0.05$ 。

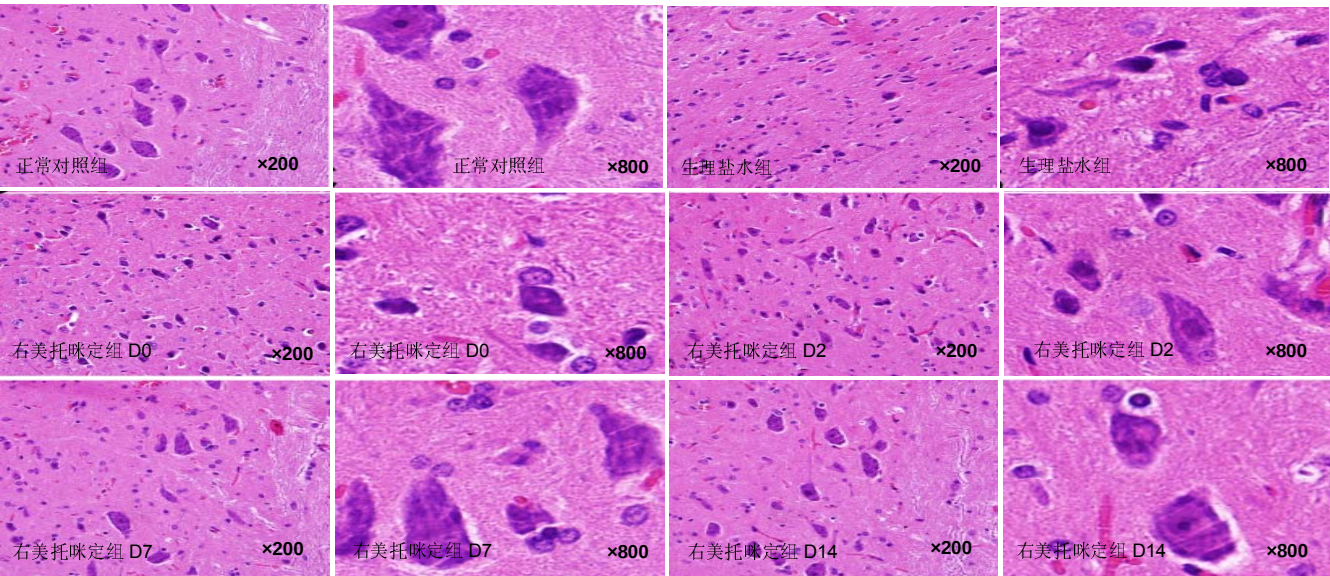


图 1 大鼠脊髓背角神经元中神经元的分布情况(苏木精-伊红染色)
Figure 1 Distribution of spinal dorsal horn neurons in rats (hematoxylin-eosin staining)
图注：右美托咪定组在给药前脊髓背角神经元变性坏死及尼氏体凝固、溶解情况与生理盐水组相似，但随着给药天数的增加逐渐减轻直至 14 d 接近正常。D0：给药后即日组，D2：给药后 2 d 组，D7：给药后 7 d 组，D14：给药后 14 d 组。

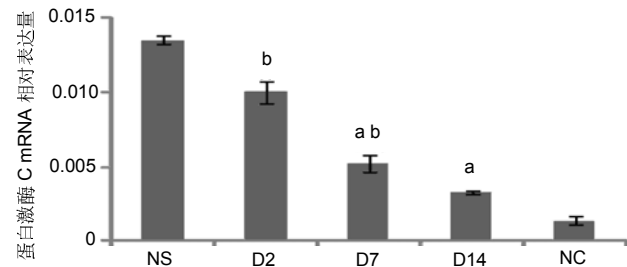


图 2 荧光定量 PCR 检测大鼠脊髓组织蛋白激酶 C 的 mRNA 相对表达水平
Figure 2 Protein kinase C mRNA expression levels in spinal cord of rats as detected by fluorescent quantitative PCR
图注：随着右美托咪定给药天数的增加蛋白激酶 C mRNA 表达持续降低。与正常对照组比较，^a $P < 0.05$ ，与生理盐水组比较，^b $P < 0.05$ 。NC：正常对照组，NS：生理盐水组，D0：右美托咪定给药后即日组，D2：右美托咪定给药后 2 d 组，D7：右美托咪定给药后 7 d 组，D14：右美托咪定给药后 14 d 组。

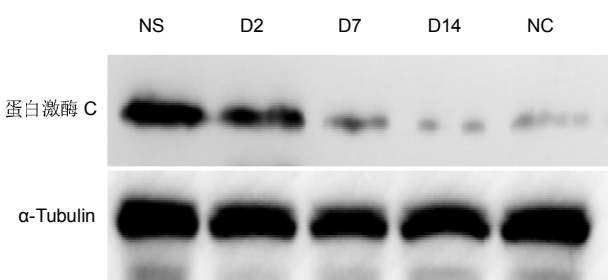


图 3 蛋白免疫印迹检测大鼠脊髓组织蛋白激酶 C 蛋白表达情况
Figure 3 Protein kinase C protein expression levels in spinal cord of rats as detected by western blot analysis
图注：蛋白激酶 C 大小在 $M_r 86\ 000$ ，随着右美托咪定给药天数的增加蛋白激酶 C mRNA 表达持续降低。NC：正常对照组，NS：生理盐水组，D0：右美托咪定给药后即日组，D2：右美托咪定给药后 2 d 组，D7：右美托咪定给药后 7 d 组，D14：右美托咪定给药后 14 d 组。

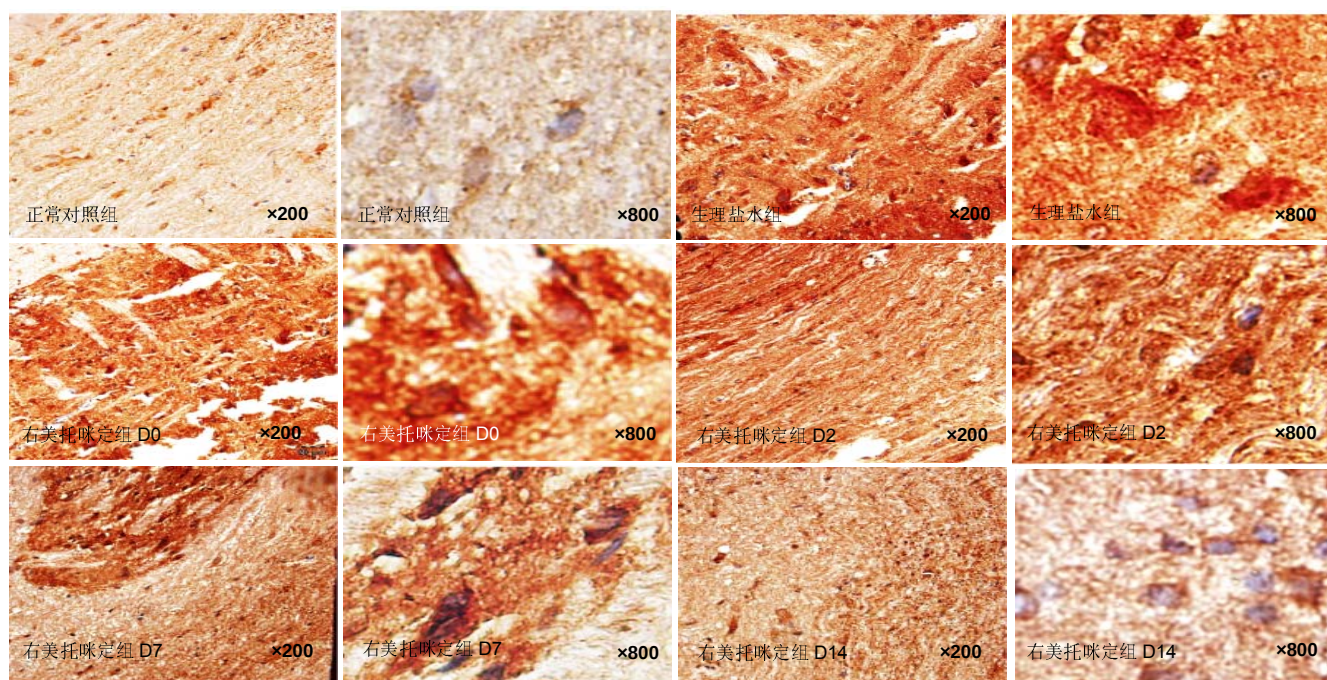


图4 大鼠脊髓背角神经元中蛋白激酶C的表达情况(免疫组织化学染色)

Figure 4 Protein kinase C expression levels in spinal dorsal horn neurons (immunohistochemistry staining)

图注: 右美托咪定组神经元术后蛋白激酶C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。D0: 给药后即日组, D2: 给药后2 d组, D7: 给药后7 d组, D14: 给药后14 d组。

数的增加继续降低, 到14 d其表达水平接近正常对照组, 低于生理盐水组($P < 0.05$), 见图2。

2.5 Western blot检测各组蛋白激酶C蛋白表达水平
Western blot显示, 正常对照组蛋白激酶C蛋白表达较低, 但生理盐水组表达明显升高($P < 0.05$), 给药2 d后右美托咪定组蛋白激酶C表达有所下降, 随着给药时间的延长, 右美托咪定组蛋白激酶C表达持续下降, 在14 d时达到最低, 与正常对照组表达相当, 7, 14 d时与生理盐水组相比差异有显著性意义($P < 0.05$), 见图3。

2.6 免疫组织化学各组蛋白激酶C蛋白表达比较 正常对照组脊髓背角神经元蛋白激酶C蛋白表达为阴性或弱阳性; 生理盐水组脊髓背角神经元中蛋白激酶C表达为强阳性; 右美托咪定组神经元术后蛋白激酶C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

本实验运用坐骨神经分支选择性损伤模型法成功建立了大鼠病理性神经痛模型, 结果表明生理盐水组与右美托咪定组热刺激缩足反射潜伏期和机械刺激缩足反射痛阈值较正常对照组有明显下降, 提示这两组大鼠有痛觉超敏的形成。结果显示, 在运用右美托咪定后, 各时间点机械刺激缩足反射痛阈值和热刺激缩足反射潜伏期又出现不同程度的升高, 说明鞘内注射右美托咪定可以减轻坐骨神经分支选择性损伤模型引起的痛敏。并且随着给药天数的增加, 大鼠机械刺激缩足反射痛阈值和热刺激缩足反射潜伏期逐渐升高, 而脊髓背角神经元内蛋白激酶C的表达逐渐降低, 提示右美托咪定可能参与了蛋白激酶C表达的抑制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。有研究表明, 右美托咪定镇痛的作用机制可能由于其能增强下行抑制通路对背角神经元的作用或者通过作用于钙通道抑制钙内流从而抑制神经递质C纤维肽的释放, 产生抗伤害效应。

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。本实验结果显示, 生理盐水组与右美托咪定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的凋亡, 而正常神经元数量减少。更值得注意的是, 随着给药天数的增加, 右美托咪定注射组大鼠各时点痛敏较生理盐水对照组有明显得改善, 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模型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。

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^[20], 为脊髓敏感化提供了病理性结构基础; 同时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, 参与脊髓敏感化的维持, 在神经病理性疼痛形成中发挥重要作用。

本实验结果显示鞘内注射右美托咪定不仅能降低脊髓背角蛋白激酶C的表达, 同时能减轻坐骨神经分支选择性损伤模型大鼠模型中神经病理性疼痛引起的神经元凋亡程度, 提示右美托咪定可能通过抑制神经元细胞的凋亡起到镇痛作用, 并推测蛋白激酶C可能参与了病理性神经痛中神经元细胞凋亡的分子事件。

蛋白激酶C是细胞内重要的信号转导分子,它的活动依赖于磷脂,可以被 Ca^{2+} 激活。在哺乳动物中蛋白激酶C有12种亚型,它们构成一个丝氨酸/苏氨酸激酶超家族。蛋白激酶C在细胞分裂、增殖、凋亡、细胞骨架蛋白的重塑以及离子通道的调节及细胞分泌等方面发挥着重要的作用^[21-22]。一氧化氮作为一种神经信号传递因子,可导致细胞内 Ca^{2+} 通道开放,使得细胞内 Ca^{2+} 浓度不断增加,并与蛋白激酶C调节区结合发生构象变化从而活化蛋白激酶C^[23-24]。活化的蛋白激酶C使包括N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)、降钙素基因相关肽^[25]、一氧化氮合酶在内的钙调蛋白磷酸化^[26],引起脊髓的可塑性变化,使信息得以长久维持最终导致中枢的敏感化。本实验结果显示,大鼠神经痛敏在造模后24 h内发生并伴随着蛋白激酶C表达的升高,进一步证实了蛋白激酶C的表达在病理性神经痛敏形成机制中的重要作用。

目前常用的大多数强效镇痛药都有呼吸抑制作用。当前的研究显示,右美托咪定对自主呼吸没有抑制作用,可保持用药过程中血流动力学的稳定,减少围术期心肌缺血的发生,在疼痛治疗以及麻醉方面有更广阔用途^[27-28]。

作者贡献: 设计为邓海洪,肖晓山,实施为邓海洪,马松梅,评估为邓海洪,马松梅,肖晓山,采用盲法评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 蛋白激酶C是G蛋白偶联受体系统中的效应物,在非活性状态下是水溶性的,游离存在于胞质溶胶中,激活后成为膜结合的酶。蛋白激酶C的激活是脂依赖性的,需要膜脂DAG的存在,同时又是 Ca^{2+} 依赖性的,需要胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度的升高。当DAG在质膜中出现时,胞质溶胶中的蛋白激酶C被结合到质膜上,然后在 Ca^{2+} 的作用下被激活。

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] Wilson M. Overcoming the challenges of neuropathic pain. Nursing standard. 2002;16(33):47-53.
- [3] Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science. 1991;251(4989):85-87.
- [4] 秦晓辉,吴宁,苏瑞斌,等.胍丁胺抑制福尔马林诱导的脊髓PKC α , pcREB, c-Fos和c-Jun表达上调[J].中国药理学通报, 2007,23(4): 480-484.
- [5] Coull JA, Boudreau D, Bachand K, et al. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. Nature. 2003;424(6591):938-942.
- [6] Yashpal K, Pitcher GM, Parent A, et al. Noxious thermal and chemical stimulation induce increases in [3H]-phorbol 12,13-dibutyrate binding in spinal cord dorsal horn as well as persistent pain and hyperalgesia, which is reduced by inhibition of protein kinase C. J Neurosci. 1995;15(5 pt 1): 3263-3272.
- [7] Palecek J, Paleckova V, Willis WD. The effect of phorbol esters on spinal cord amino acid concentrations and responsiveness of rats to mechanical and thermal stimuli. Pain. 1999;80(3):597-605.
- [8] Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, et al. Preserved active pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC. Science. 1997;278(5336):279-283.
- [9] 张世栋,田首元,王杰,等.右美托咪啶鞘内注射对骨癌疼痛大鼠同侧脊髓背角PKC α 表达的影响[J].山东医药,2013,53(20):39-42.
- [10] Grewal A. Dexmedetomidine: new avenues. J Anaesthesiol Clin Pharmacol. 2011;27(3):297-302.
- [11] Bhana N, Coa KL, McClellan KJ. Dexmedetomidine. Drugs. 2000;59(2):263-270.
- [12] 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.
- [13] 张红星,曹学照,周芳莉,等.鞘内注射右美托咪啶对小鼠急性炎症痛的影响[J].中华麻醉学杂志,2011,31(12):1458-1460.
- [14] 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.
- [15] Opazo P, Labrecque S, Tigaret CM, et al. CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. Neuron. 2010;67(2):239-252.
- [16] 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.
- [17] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. Physiol Behav. 1976;17(6):1031-1103.
- [18] 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.
- [19] 仲吉英,杨承祥,徐枫,等.鞘内注射右美托咪定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.
- [20] Scholz J, Broom DC, Youn DH, et al. Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. J Neurosci. 2005;25(32):7317-7323.
- [21] Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. Biochem J. 1998;332(Pt 2):281-292.
- [22] Saito N, Kikkawa U, Nishizuka Y, et al. Distribution of protein kinase C-like immunoreactive neurons in rat brain. J Neurosci. 1988;8(2):369-382.
- [23] Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. Science. 1992;256(5060):1217-1221.
- [24] Liu H, Wang H, Sheng M, et al. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(18):8383-8387.
- [25] 王懿春,郭曲练,邹望远,等.鞘内注射PKC抑制剂对神经病理痛大鼠脊髓背角NMDAR、CGRP表达的影响[J].中国疼痛医学杂志, 2009,15(2):95-99.
- [26] 吕兴业.甲醛足底致痛大鼠脊髓后角神经元内蛋白激酶C活性改变对一氧化氮合酶的影响[J].河北医学,2011,33(17): 2568-2572.
- [27] Belleville JP, Ward DS, Bloor BC, et al. Effects of intravenous dexmedetomidine in humans. I. Sedation, ventilation, and metabolic rate. Anesthesiology 1992;77(6):1125-1133.
- [28] Sallinen J, Haapalinna A, Viitamaa T, et al. Adrenergic α_2 -receptors modulate the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and aggression in mice. J Neurosci. 1998; 18(8):3035-3042.