

· 基础研究 ·

罗哌卡因对 CCI 模型鼠 DRG 神经元 GABA 激活膜电流的影响*

杨 越^{1,4}, 樊 超^{1,4}, 司军强^{1,2,3}, 马克涛^{1,2}, 李 丽^{1,2,Δ}

(1. 新疆地方病与民族高发病教育部重点实验室, 新疆石河子 832002; 2. 石河子大学医学院生理教研室, 新疆石河子 832002; 3. 武汉大学基础医学院生理教研室 430071; 4. 石河子大学医学院第一附属医院麻醉科, 新疆石河子 832002)

摘要:目的 观察罗哌卡因对坐骨神经慢性压榨损伤(CCI)模型大鼠的背根神经节(DRG)神经元 γ -氨基丁酸(GABA)激活膜电流的影响,探讨罗哌卡因可能存在的镇痛机制。方法 运用全细胞膜片钳技术,分3组记录CCI模型大鼠手术侧、手术对侧及假手术组急性新鲜分离的DRG神经元在预灌注罗哌卡因30 s后,GABA受体激活电流(I_{GABA})的变化。结果 (1)与手术对侧、假手术组及对照组比较,CCI模型大鼠手术侧组的热缩足潜伏期显著缩短($P < 0.05$);(2)CCI手术对侧组DRG神经元上不同浓度(0.1~1 000 $\mu\text{mol/L}$)GABA激活电流幅值显著大于手术侧组和假手术组;(3)预灌注罗哌卡因(0.1~1 000 $\mu\text{mol/L}$)后CCI模型大鼠手术侧组、手术对侧及假手术组DRG神经元对100 $\mu\text{mol/L}$ GABA激活电流均表现为不同程度的增强作用,并且CCI手术对侧组的增强幅度显著大于手术侧组和假手术组;(4)预灌注100 $\mu\text{mol/L}$ 的罗哌卡因后CCI模型大鼠手术侧组DRG神经元GABA(0.1~1 000 $\mu\text{mol/L}$)激活电流的量效曲线左移,两 EC_{50} 之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 罗哌卡因对CCI模型大鼠DRG神经元GABA激活电流具有增强作用,可能是罗哌卡因产生麻醉和镇痛作用的原因之一。

关键词:罗哌卡因;神经病理痛;背根神经节; γ -氨基丁酸;全细胞膜片钳

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.27.028

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)27-3278-03

Effects of ropivacaine on GABA-activated membrane currents in isolated dorsal root ganglion neurons in CCI model rats*

Yang Yue^{1,4}, Fan Chao^{1,4}, Si Junqiang^{1,2,3}, Ma Ketao^{1,2}, Li Li^{1,2,Δ}

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 2. Department of Physiology, Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China; 3. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430070, China; 4. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of ropivacaine on gamma-aminobutyric acid(GABA)-activated membrane currents in isolated dorsal root ganglion(DRG) neurons of the rats with ischiadic nerve chronic constriction injury(CCI) and to discuss the possible analgesia mechanism of ropivacaine. **Methods** The whole-cell patch clamp technique was used to record and compare the changes of GABA receptor activation currents of acute isolated DRG neurons after 30 s of ropivacaine preperfusion in the operating side and the operative opposite side of the CCI model rats and the sham-operation group. **Results** (1) Compared with the operative opposite side, the sham-operation group and the control group, the thermal withdrawal latency in the operative side group of the CCI model rats was notably shortened($P < 0.05$); (2) the amplitude of GABA-activated currents with different concentration GABA(0.1~1 000 $\mu\text{mol/L}$) in the operative opposite side group of the CCI operation was significantly greater than that of the operative side group and the sham-operation group; (3) DRG neurons after ropivacaine preperfusion (0.1~1 000 $\mu\text{mol/L}$) showed varying degrees of enhancement effect on the 100 $\mu\text{mol/L}$ GABA-activated currents, the enhancement amplitude in the CCI operative opposite side group was significantly greater than that in the operative side group and the sham-operation group; (4) The dose-response curve of DRG neurons GABA(0.1~1 000 $\mu\text{mol/L}$) activated current in the operative side group of the CCI rats after ropivacaine pre-perfusion (100 $\mu\text{mol/L}$) was shifted to the left, the difference between two EC_{50} had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Ropivacaine has the enhancement effect on GABA activated currents in the DRG neurons of the CCI model rats, which could be one of reasons for ropivacaine producing the anesthetic and analgesic effect.

Key words: ropivacaine; neuropathic pain; dorsal root ganglion; GABA; whole-cell patch clamp

罗哌卡因作为一种新型、长效酰胺类局麻药和镇痛药,因其中枢神经系统和心血管系统低毒性,及低浓度时出现感觉-运动神经阻滞分离的特点而广泛应用于临床麻醉和术后镇痛等领域^[1-5]。但对于罗哌卡因产生镇痛作用的药理学机制,国内外迄今仍存在多种不同观点。 γ -氨基丁酸(GABA)是脊髓中重要的抑制性神经递质,在脊髓背角,GABA通过突触前抑制作用减少初级传入神经元兴奋性神经递质的释放,参与疼痛的作用机制。本研究选取神经病理性痛大鼠(CCI模型鼠)的

DRG神经元作为反映痛觉初级传入终末的动物模型,应用全细胞膜片钳技术观察GABA激活电流的变化及罗哌卡因对GABA激活电流的影响,探讨罗哌卡因发挥镇痛作用的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心动物饲养科提供的SD大鼠,体质量150~200 g,分在3组:A组(假手术组)、B组(CCI手术侧组)、C组(CCI手术对侧组)。

1.2 试剂 罗哌卡因、GABA、胶原酶、胰蛋白酶、EGTA、

HEPES 均为 Sigma 公司产品,其余均为国产分析纯试剂。

1.3 液体配制 玻璃微电极内液成分为(mmol/L):KCl 140; MgCl₂ 2; CaCl₂ 1; HEPES 10; EGTA 11,电极电阻 3~10 MΩ。灌流外液成分为(mmol/L):KCl 5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 2.5; NaCl 150; HEPES 10; D-glucose 10。

1.4 CCI 模型制备 大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,固定于手术台上,手术区备皮消毒。下肢背侧沿肌肉纹理走行做斜行切口,经股二头肌肌间行钝性分离至暴露坐骨神经主干,用铬制羊肠线做间距为 1 mm 的 4 道结扎,结扎线松紧度以不影响神经外膜的血运为宜,然后逐层缝合,手术野消毒。假手术组不做铬肠线结扎,其余方法同上。术毕单独饲养,笼底铺锯末,12 h 明暗交替光照,保证充足的水源和饲料。

1.5 热板实验 对 CCI 模型大鼠和假手术大鼠行热板实验测其热缩足潜伏期的变化。将白色手术托盘置于预设温度为 60 ℃ 的恒温水浴锅里,上置顶部敞开的透明有机玻璃罩,构成 20×20×15 cm 的透明观测盒。自大鼠后肢与托盘低接触起秒表开始计时,至 CCI 模型鼠手术侧、手术对侧和假手术组术侧出现踏脚、回缩、舔足、挣扎计为大鼠热缩足反射潜伏期(PWTL),作为后肢痛阈检测的指标。为避免组织损伤,检测时间不得超过 30 s。每次测量 3 次,取平均值。所有测试在上午 10:00~13:00 间取术前 1 d、术后 1、3、7、12、14 d 进行。

1.6 膜片钳记录 取术后 12 d 大鼠,断头后迅速分别取出术侧及手术对侧 L4~L6 段 DRG,在镜下剪除多余纤维组织后剪碎清除干净的 DRG,以胶原酶 1.5 mg/mL,胰蛋白酶 0.6 mg/mL 在 37 ℃ 恒温箱内消化 12 min,每 4 min 吹打 30 下后以适量大豆胰蛋白酶抑制剂终止酶消化。离心,静置 30 min 待细胞贴壁后行膜片钳记录。

1.7 统计学处理 应用 Clampfit 10.2 和 SPSS17.0 软件进行数据分析,两组间数据采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析进行数据处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热痛敏测定结果 手术前 1 d 行热板实验,剔除对热感觉不敏感大鼠($t > 30$ s)。行为学表现:CCI 模型制备术前 1 d 至术后 14 d 内观察大鼠无伤口感染,无伤体自噬现象。术侧下肢不持重或轻微持重,跛行。热板实验结果,见表 1,CCI 模型鼠手术侧组术后 1~14 d 热缩足反射潜伏期较手术对侧、假手术组及正常对照组均缩短($P < 0.01$);假手术组热缩足反射潜伏期差异无统计学意义($P > 0.05$);CCI 模型组手术侧热缩足反射潜伏期术前 1 d 与术后 1、3、7、12、14 d 比较差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 大鼠热缩足潜伏期数值($\bar{x} \pm s, s$)

组别	手术前 1 d	手术后				
		1 d	3 d	7 d	12 d	14 d
对照组	20.4±2.38	21.5±1.29	22.0±1.82	20.5±2.08	21.7±0.96	21.1±1.87
A 组	20.3±1.26	18.8±1.71	19.3±0.95	20.3±1.71	21.3±2.22	22.0±0.82
B 组	22.0±1.83	13.5±2.38*#	13.3±1.71*	12.8±1.50*#	15.0±0.82*#	14.0±1.83*#
C 组	23.8±1.71	21.3±0.5	22.0±0.82	21.8±1.71	21.8±0.96	20.3±1.5

: $P < 0.01$, 与对照组、A 组、C 组比较; * : $P < 0.01$, 手术前和手术后的 B 组比较。

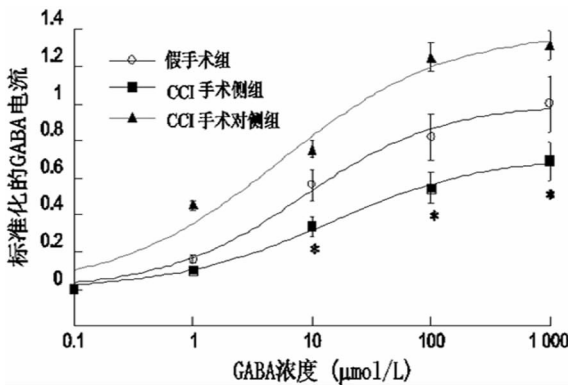


图 1 DRG 神经元 GABA 激活的量效反应曲线

2.2 膜片钳实验结果

2.2.1 GABA 激活电流特点 实验所检测大鼠分为 A、B、C 组,各组新鲜分离的 L4~L6 段 DRG 神经元均呈圆形或椭圆形,直径在 17~35 μm 之间。实验共检测了 124 个 DRG 神经元,其中 72.6%(90/124)对外加 GABA 敏感,产生具有浓度依赖性和明显去敏感作用的内向电流。不同浓度(0.1~1 000 μmol/L)GABA 激活电流的变化见图 1。由图 1 量效曲线可见,同一浓度 GABA 激活电流幅值 CCI 术侧组较假手术组明显减小,而 CCI 手术对侧组较假手术组明显增强,此结果与本实验室以往结果一致^[6-7]。浓度为 1 000 μmol/L 的 GABA 激活膜电流的幅值在 B 组、C 组、A 组分别为(720±135)、(2 015±330)、(1 690±210)pA。3 组之间的所产生的电流幅

值比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。3 组的 EC₅₀ 分别是(5.41±3.62)、(14.15±4.60) μmol/L 及(8.39±2.65) μmol/L,3 组间 EC₅₀ 比较,CCI 手术对侧组与其他两组间差异有统计学意义($P > 0.05$)。

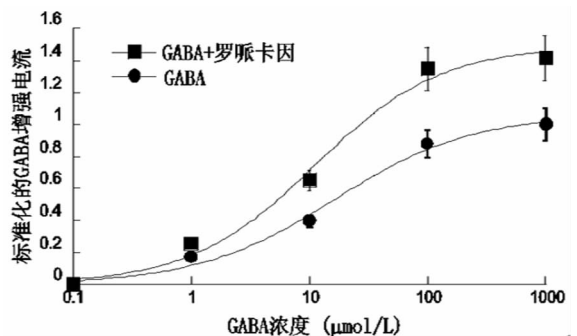


图 2 罗哌卡因对 B 组 DRG 神经元 GABA 激活的量效反应曲线

2.2.2 罗哌卡因对 GABA 激活电流的增强作用 本研究选取 B 组的 DRG 神经元进行膜片钳记录,预加罗哌卡因 10 μmol/L(接近罗哌卡因临床用药浓度所达到的人体血药浓度计量)后 GABA 激活电流明显增强,这种增强作用可以被细胞外液洗脱,预加罗哌卡因(10 μmol/L)后 GABA 激活电流与外加 GABA 本身激活电流的量效曲线比较,曲线明显上移,二者 GABA 幅值比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。其 EC₅₀ 分别为(11.18±4.09) μmol/L 和(16.36±6.39) μmol/L,二者差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。灌流罗哌卡因后 GABA

激活电流的最大值较之对照增强约(153±4.13)%。

2.2.3 不同浓度罗哌卡因对 CCI 模型鼠同一浓度 GABA 激活电流的增强作用 对 A 组、B 组及 C 组的 DRG 神经元分别预灌流罗哌卡因(浓度为 0.01、0.1、1、10、100、1 000 $\mu\text{mol/L}$), 30 s 后 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 GABA 激活的膜电流与 GABA 本身激活电流幅值比较, 见图 3。罗哌卡因的增强作用表现出这样的特点: C 组明显高于 A 组, 而 B 组明显低于 A 组。3 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。预灌流罗哌卡因在 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 时, 3 组的 GABA 激活电流增强比率下降, 但仍表现为增强作用。各浓度点记录 DRG 神经元个数均为 5。

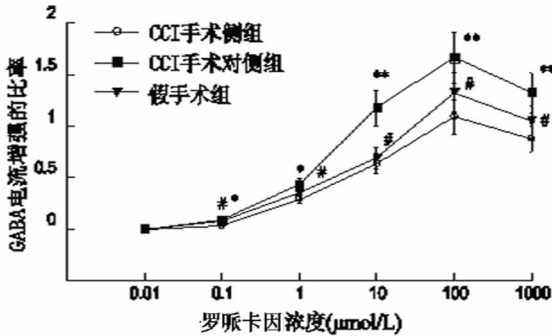


图 3 不同浓度罗哌卡因对 3 组 DRG 神经元 GABA 激活及增强比率折线图

3 讨论

本研究运用全细胞膜片钳技术记录 CCI 模型手术侧组、手术对侧组及假手术组大鼠 DRG 神经元 GABA 受体激活电流, 发现 CCI 手术侧组 DRG 神经元 GABA 激活电流幅值明显小于假手术组, 而 CCI 手术对侧组 DRG 神经元 GABA 激活电流幅值明显大于假手术组 DRG 神经元, 提示坐骨神经慢性压榨性损伤不仅改变了损伤侧 GABA 受体的功能, 还导致了损伤对侧 GABA 受体功能的代偿性增强。而 CCI 手术对侧组这种代偿性作用在热板实验结果中并未显现出来。表明损伤对侧 DRG 神经元 GABA 受体参与了 CCI 大鼠痛敏的形成, 而对热痛敏影响不大。本实验室尚媛媛^[8]等应用免疫荧光技术发现这一现象与 GABA_A 受体 α_2 亚基表达量有关, 证明其参与了 CCI 模型鼠痛觉的传导。而不同浓度的罗哌卡因对以上 3 组大鼠 DRG 神经元 I_{GABA} 均表现为显著的增强作用, 由此表明罗哌卡因发挥其增强 GABA 受体介导的膜电流作用的位点可能在 GABA_A 受体上。GABA_A 受体是氯离子(Cl^-)通道的门控受体, 有 GABA 结合位点及变构剂结合位点, 罗哌卡因使神经元膜上 Cl^- 外流增加, 提示罗哌卡因可能与 GABA 位点特异性结合易化了 GABA 受体活性, 或者参与了 GABA_A 受体的变构从而增加了氯离子通道的平均开放时间或开放频率而增强了 GABA 作用于受体的效能。由图 3 可以看到, 随着预灌流罗哌卡因浓度增加, 其对 GABA 激活电流的增强作用也加大, 但在灌流高浓度(1 000 $\mu\text{mol/L}$)罗哌卡因时其增强 GABA 激活膜电流的作用强度下降, 但仍表现为显著的增强作用, 故认为罗哌卡因发挥增强 GABA_A 介导膜电流的最大效应大概出现在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时。

在脊髓水平 GABA 能系统对伤害性信息的整合、传递和调控的发挥有重要作用, GABA 转运体(GAT)作为此体系的一部分, 参与了痛觉信息在脊髓水平的发生、发展及传递过程。Miletic 等^[9]在大鼠慢性坐骨神经挤压伤模型上发现, 在坐骨神经结扎后第 7 天, 脊髓背角 GAT-1 水平在模型鼠术侧及术对侧均明显降低, 说明脊髓背角双侧的 GAT-1 在神经病理性疼痛的发生发展中都有参与。而 Hu 等^[10]用 2 种 GAT-1 过表达的转基因小鼠检测 GAT-1 在疼痛中的效应, 结果显示小鼠

表现为明显痛觉过敏。本研究在 CCI 大鼠 DRG 神经元上的实验结果证实, 罗哌卡因对 GABA 受体的功能具有增强作用, 其突触前抑制作用被增强, 可能是在脊髓背角 GABA 神经元数量不变的情况下, 罗哌卡因使 GAT 功能增强, 引起 GABA 水平上调。

总之, 罗哌卡因产生镇痛作用的机制之一可能是由于其增强了 GABA 受体介导的突触前抑制作用。其具体机制可能是: (1) 罗哌卡因通过参与 GABA_A 受体的变构以增加 Cl^- 通道的开放时间和(或)开放频率从而增加 Cl^- 流量; (2) 直接激活 Cl^- 通道引起 Cl^- 外流; (3) 增强 GABA 转运体功能, 使 GABA 水平上调, 从而增强了 GABA 受体介导的突触前抑制效应, 使初级痛觉感觉信息传入神经末梢的动作电位减小, 造成相关神经递质在神经末梢的释放减少, 脊髓背角的痛敏神经元活动减弱从而产生镇痛作用。

参考文献:

- [1] Udelsmann A, Silva WA, deMoraes AC, et al. Hemodynamic effects of ropivacaine and levobupivacaine intravenous injection in swines [J]. Acta Cir Bras, 2009, 24 (4): 296-302.
- [2] Panousis P, Heller AR, Koch T, et al. Epidural ropivacaine concentrations for intraoperative analgesia during major upper abdominal surgery: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled study [J]. Anesth Analg, 2009, 108(6): 1971-1976.
- [3] Yu W, Ma WT. Different concentrations of ropivacaine spinal anesthesia for hip surgery in elderly patients with clinical observation [J]. Pract J Med, 2011, 27 (1): 101-103.
- [4] 苗茜, 闵苏, 魏珂, 等. 罗哌卡因、左旋布卡因复合芬太尼用于剖宫产后镇痛半数有效浓度的研究 [J]. 重庆医学, 2011, 40(30): 3073-3075.
- [5] Hirota K, Browne T, Appadu BL, et al. Do local anaesthetics interact with dihydropyridine binding sites on neuronal L-type Ca^{2+} channels [J]. Br J Anaesth, 1997, 78(2): 185-188.
- [6] 司军强, 李之望, 樊友珍. P 物质对大鼠新鲜分离 DRG 神经元 NMDA 及 GABA 激活电流的调制作用 [J]. 神经科学, 1996, 21(3): 114-119.
- [7] 朱贺, 马克涛, 李丽, 等. 神经病理痛大鼠 DRG 神经元 GABA_A 受体激活电流的变化 [J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(3): 376-379.
- [8] 尚媛媛, 司军强, 李丽, 等. 同型半胱氨酸对自发性高血压大鼠脑动脉平滑肌细胞 BKCa 的增强作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(33): 4118-4121.
- [9] Miletic G, Draganic P, Pankratz MT, et al. Muscimol prevents long-lasting potentiation of dorsal horn field potentials in rats with chronic constriction injury exhibiting decreased levels of the GABA transporter GAT [J]. Pain, 2003, 30(2): 347-353.
- [10] Hu JH, Yang N, Ma YH, et al. Hyperalgesic effects of gamma-aminobutyric acid transporter 1 in mice [J]. J Neurosci Res, 2003, 73(3): 565-572.