

· 基础研究 ·

坐骨神经旁注射右美托咪啉对福尔马林致痛小鼠痛行为及脊髓背角 c-fos 表达的影响*

武静茹¹, 党秀静¹, 宿世玉¹, 王 杰^{2△}

(1. 徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室, 江苏徐州 221000; 2. 徐州医学院药学院, 江苏徐州 221000)

摘要:目的 探讨坐骨神经旁注射右美托咪啉对福尔马林致痛小鼠痛行为学及脊髓 c-fos 表达的影响。方法 雄性成年昆明小鼠 32 只, 体质量 20~25 g, 随机分为 4 组, 每组 8 只。A 组在小鼠右侧坐骨神经旁注射生理盐水; B 组在小鼠右足底皮下注射 5% 福尔马林 (10 μ L), 建立急性炎性痛模型; C 组在小鼠致痛前 15 min 预先在右侧坐骨神经旁注射右美托咪啉 0.1 μ g; D 组在小鼠右侧坐骨神经旁注射右美托咪啉 0.1 μ g。观察各组小鼠 I、II 时相舔咬足时间, 在 2 h 时间点处死小鼠, 取腰 L₄₋₅ 段脊髓, 行免疫荧光检测 c-fos 的表达。结果 与 A 组比较, B 组小鼠在 I、II 时相出现明显的舔咬足行为, 疼痛评分明显增高, 脊髓 c-fos 的表达明显增多 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, C 组舔咬足时间明显缩短, 疼痛评分明显降低, 脊髓 c-fos 的表达明显减少 ($P < 0.05$); A、C、D 组疼痛评分和脊髓 c-fos 的表达差异无统计学意义。结论 坐骨神经旁注射右美托咪啉能够减轻小鼠足底注射福尔马林引起的急性炎性痛, 并且降低脊髓 c-fos 的表达。

关键词: 右美托咪啉; 福尔马林致痛; 脊髓; c-fos

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.33.031

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)33-4053-03

The effect of sciatic nerve injection of dexmedetomidine on the nociceptive behavior and spinal c-fos expression in formalin mice*

Wu Jingru¹, Dang Xiuqing¹, Su Shiyu¹, Wang Jie^{2△}

(1. Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China;

2. School of Pharmacy, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of sciatic nerve injection of dexmedetomidine on the nociceptive behavior and spinal c-fos expression in formalin mice. **Methods** Adult male Kunming mice, 20–25 g, were divided into 4 groups randomly; mice in group A and D were given an injection of NS (10 μ L) and 0.1 μ g dexmedetomidine in 10 μ L adjacent to the right sciatic nerve, separately. Mice in group B received intracutaneous injection of 10 μ L formalin (5%) in the right hindpaws. Mice in group C were given an injection of 0.1 μ g dexmedetomidine in 10 μ L adjacent to the right sciatic nerve 15 min before formalin injection in the right hindpaws. Paw licking/biting time was counted every 5 min for an hour after hindpaw injections, calculated pain score. 1 hour after behavior tests, the L₄₋₅ of spinal cord were harvested to immunofluorescence for c-fos expression in the dorsal corn of spinal cord. **Results** Mice in group A, C and D showed no obvious foot licking/biting behaviors and a low level of c-fos expression in the dorsal corn of spinal cord. Compared with group A, mice in group B displayed obvious two phases foot licking/biting behaviors ($P < 0.05$, both in Phase I and Phase II) and a significant increasing expression of c-fos ($P < 0.05$). Compared with group B, dexmedetomidine injected to the adjacent of right sciatic nerve decreased the pain score and spinal c-fos expression in group C ($P < 0.05$). **Conclusion** Injection of dexmedetomidine to the right sciatic nerve alleviated intraplantar injected formalin-induced acute inflammatory pain, and reduced the expression of spinal c-fos protein.

Key words: dexmedetomidine; formalin-induced pain; spinal cord; c-fos

右美托咪啉 (dexmedetomidine, DEX) 是高选择性 α_2 肾上腺素受体激动剂, 具有镇静、抗焦虑和镇痛作用^[1-2]。研究表明, 作为辅助用药, DEX 能延长局麻药神经阻滞 (硬膜外、蛛网膜下隙、骶管、臂丛等) 的时间, 改善镇痛效果, 提高患者满意度^[3]。但是目前尚无 DEX 单独用于神经阻滞的研究, 因此本研究拟观察坐骨神经旁单独注射 DEX 对福尔马林致痛小鼠的影响, 以期为单独使用 DEX 进行神经阻滞提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂 5% 福尔马林, 兔抗 c-fos (货号: SAB4500993)、羊抗兔-FITC 均购自美国 Santa 公司; DEX 购自江苏恒瑞制药有限公司 (批号: 11110834)。

1.2 动物与分组 本研究经徐州医学院动物实验伦理委员会批准。雄性成年昆明小鼠 32 只, 体质量 20~25 g, 由徐州医学

院实验动物中心提供。所有动物于 24 $^{\circ}$ C 下和昼夜交替的环境中饲养, 自由摄食、饮水, 适应环境 7 d 后进行实验。采用随机数字表法, 将小鼠分为 4 组, 每组 8 只。A 组在正常小鼠右侧坐骨神经旁注射生理盐水; B 组在小鼠右足底皮下注射 5% 福尔马林, 建立急性炎性痛模型; C 组在小鼠致痛前 15 min 预先在同侧坐骨神经旁注射 DEX 0.1 μ g; D 组在小鼠坐骨神经旁注射 DEX 0.1 μ g。

1.3 模型制备及疼痛评分测定 根据文献^[4], 在小鼠右足底皮下注射 5% 福尔马林 10 μ L, 每 5 分钟为一时间段, 观察各级伤害性行为持续的时间 (s): A 为双足着地, 体质量均匀分配; B 为注射足轻着地; C 为抬起注射足; D 为舔咬注射足。连续观察 60 min。0~5 min 为 I 相反应, 20~60 min 为 II 相反应。按照公式换算成 5 min 内的疼痛分数 (pain score, S) = (1B +

2C+3D)/300,其中 B、C、D 为 5 min 内评级对应的伤害性行为所持续的累计时间(s),1、2、3 为各级相对应的权重。分别计算两时相的疼痛分数。

1.4 坐骨神经旁注射 依照文献[5]所示方法,从腓窝处垂直皮肤进针至碰到骨面后回抽无血注射 DEX(0.1 μ g,10 μ L)。

1.5 脊髓 c-fos 测定 小鼠行为学观察完 1 h 之后进行腹腔麻醉,依次灌注生理盐水 20 mL、4%多聚甲醛 20 mL,灌毕取脊髓腰膨大置于 4%多聚甲醛在室温下固定 6 h,转至 30%蔗糖溶液中 4 $^{\circ}$ C 脱水至组织沉底。连续冰冻冠状切片,片厚 30 μ m。切片漂洗 3 次(0.01 mol/L PBS,pH=7.4),各 5 min。5%羊血清(0.01 mol/L PBS,0.3% Triton X-100,pH=7.4)室温孵育封闭 1 h;加 c-fos 一抗(1:100)4 $^{\circ}$ C 湿孵 48 h;PBS 漂洗 3 次 5 min,再加羊抗兔-FITC(1:100)4 $^{\circ}$ C 过夜;漂洗 3 次,各 5 min。贴片,风干,封片。用激光共聚焦显微镜摄片,每只动物取 5 张脊髓片用于脊髓背角的 c-fos 计数。

1.6 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件作统计学处理,数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组内、组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

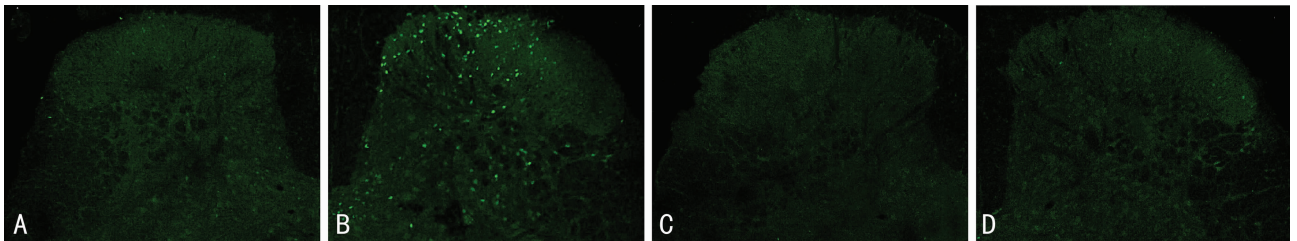
2.1 福尔马林致痛模型小鼠痛行为变化 A、C、D 组小鼠无明显的舔咬足行为。B 组小鼠右足皮下注射 5%福尔马林后,均出现患肢完全抬起、肢体颤抖、跛行、舔/咬注射足等行为,并呈现明显的两时相性反应。见表 1。

2.2 小鼠脊髓背角 c-fos 变化 与 A 组比较,B 组小鼠脊髓背角 c-fos 表达明显增加;C 组与 B 组比较脊髓背角 c-fos 表达明显减少,D 组与 A 组、C 组比较,脊髓 c-fos 表达无明显变化。见图 1、表 1。

表 1 各组小鼠疼痛分数与脊髓背角 c-fos 比较($\bar{x}\pm s,n=8$)

组别	疼痛分数		c-fos 计数
	第 I 时相	第 II 时相	
A 组	0.04 \pm 0.01	0.27 \pm 0.08	1.17 \pm 0.75
B 组	2.50 \pm 0.36*	15.39 \pm 0.91*	122.67 \pm 29.14*
C 组	0.80 \pm 0.26*#	4.68 \pm 1.52*#	3.17 \pm 2.48#
D 组	0.12 \pm 0.04	0.54 \pm 0.12	2.08 \pm 1.22

*: $P<0.05$,与 A 组比较;#: $P<0.01$,与 B 组比较。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 1 各组脊髓背角 c-fos 表达变化($\times 100$)

3 讨 论

α_2 受体激动剂可乐定应用于临床慢性疼痛的治疗已有近 30 年的历史^[6-7]。可乐定主要通过激活 α_2 受体发挥镇痛作用,但其并非只是 α_2 受体选择性激动剂,也可激活部分 α_1 受体(α_2 受体和 α_1 受体激活比例为 200:1)^[3]。最近研究表明, α_1 受体激活可以抵消 α_2 受体激活引起的镇痛作用,因此 α_2 受体选择性高的激动剂可能发挥更好的镇痛作用^[8]。

DEX 是上世纪 90 年代开发的新型 α_2 受体激动剂,对 α_2 受体具有更高的选择性(α_2 受体和 α_1 受体激活比例为 1 620:1)^[3]。近来有研究发现:DEX 复合左旋布比卡因应用于臂丛神经阻滞,增强了镇痛效果,延长了镇痛时程;DEX 作为局麻药的辅助药物用于其他神经阻滞也取得了类似效果,如腰麻、硬膜外麻醉和骶管麻醉等。但是尚没有关于 DEX 单独用于神经阻滞的报道^[3]。本研究采用基础研究中常用的福尔马林模型,观察了坐骨神经旁注射 DEX 对小鼠炎性痛的影响。

福尔马林炎性痛属于无菌性炎性模型,其疼痛反应具有双相性:第 I 时相为急性疼痛期(0~5 min),由福尔马林直接刺激神经末梢疼痛感受器^[9],通过 A δ 纤维介导信息传入引起;第 II 时相为强直期(20~60 min),由逐渐减弱的外周疼痛感受器传入刺激、局部组织不断活化和释放炎性介质导致的中枢敏化引起的^[10],主要通过 C 纤维介导刺激传递的继发炎性疼痛,二者之间约有 15 min 的间歇期^[8]。本实验观察到注射福尔马林的小鼠出现舔、咬足底和抬腿等行为,具有典型的两时相和间歇期,说明疼痛模型的复制是成功的。

为了检测坐骨神经旁注射 DEX 的镇痛作用,本研究在福

尔马林模型制作前 15 min 在坐骨神经旁注射 DEX 0.1 μ g。结果发现,预先注射 DEX 可以明显减轻福尔马林引起的 I 时相和 II 时相疼痛行为,并且对 I 时相和 II 时相痛行为均有镇痛作用。坐骨神经旁单独注射 DEX 对福尔马林引起的急性炎性疼痛具有镇痛作用,也提示神经旁注射 DEX 可能对多种机制产生的疼痛具有一定的镇痛作用。

脊髓是参与疼痛过程的重要结构,在联系外周和脑内中枢神经系统中发挥着中转站的作用^[11]。c-fos 基因是一种原癌基因,广泛存在于真核细胞基因组中,在中枢神经系统内的表达与痛觉密切相关。研究发现,机体在受到外周伤害性刺激后,c-fos 基因被激活,其表达增加。c-fos 蛋白是 c-fos 的表达产物,是目前最常用的中枢神经元活化的标志物^[12]。脊髓背角主司感觉,腹角主司运动,因此近 30 年来,脊髓背角 c-fos 蛋白一直被作为疼痛状态下脊髓神经元活化的标志物使用。当机体受到伤害性刺激后 30~60 min 脊髓 c-fos 蛋白开始增加,2 h 达到高峰^[11]。为了进一步从分子学水平证实坐骨神经旁注射 DEX 的镇痛作用,本研究观察了其对福尔马林致痛小鼠脊髓 c-fos 表达的影响,结果与行为学一致:福尔马林致痛组小鼠脊髓 c-fos 表达明显增加,且主要分布在脊髓背角浅层;预先在坐骨神经旁注射 DEX 则可以减少福尔马林引起的 c-fos 表达。

动物研究发现 DEX 不管经什么途径给药均会产生一定的镇静作用,药物的镇静镇痛往往互相促进、发挥协同作用,因此 DEX 的镇静作用可能也是其强大镇痛作用的一个原因^[3]。但研究发现神经周围注射 DEX 引起的镇静作用并不影响运动功能^[13],因此与局麻药的非选择性神经阻滞不同,DEX 可能选

择性地作用于感觉神经而对运动神经不产生或只产生较小的影响,提示其作为镇痛药物可能具有一定优势。但是在广泛应用于临床之前,仍需对 DEX 的神经毒性进行全面的评估^[3]。

综上所述,坐骨神经注射 DEX 能够有效减少福尔马林致痛小鼠的疼痛行为,并降低脊髓 c-fos 的表达。本研究为 DEX 作为镇痛药物应用于神经阻滞提供了直接的动物实验依据。

参考文献:

- [1] Gupta P, Whiteside W, Sabati A, et al. Safety and efficacy of prolonged dexmedetomidine use in critically ill children with heart disease[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2012, 13(6):660-666.
- [2] Schnabel A, Reichl SU, Poepping DM, et al. Efficacy and safety of intraoperative dexmedetomidine for acute post-operative pain in children: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Paediatr Anaesth*, 2013, 23(2):170-179.
- [3] Grosu I, Lavand'homme P. Use of dexmedetomidine for pain control[J]. *F1000 Med Rep*, 2010, 2:90.
- [4] Souslova V, Cesare P, Ding Y, et al. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors[J]. *Nature*, 2000, 407(6807):1015-1017.
- [5] Liu H, Zhang HX, Hou HY, et al. Acid solution is a suitable medium for introducing QX-314 into nociceptors through TRPV1 channels to produce sensory-specific analgesic effects[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12):e29395.
- [6] Ayad AE, Masry A. Epidural steroid and clonidine for chronic intractable post-thoracotomy pain: a pilot study[J]. *Pain Pract*, 2012, 12(1):7-13.

- [7] Neil MJ. Clonidine: clinical pharmacology and therapeutic use in pain management[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2011, 6(4):280-287.
- [8] Gil DW, Cheevers CV, Kedzie KM, et al. Alpha-1-adrenergic receptor agonist activity of clinical alpha-adrenergic receptor agonists interferes with alpha-2-mediated analgesia[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(2):401-407.
- [9] McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat[J]. *Neurosci Lett*, 1996, 208(1):45-48.
- [10] Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, et al. Evidence for tonic activation of NK-1 receptors during the second phase of the formalin test in the Rat[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(15):6588-6598.
- [11] Gao YJ, Ji RR. C-fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury[J]. *Open Pain J*, 2009, 2(1):11-17.
- [12] Ruan JP, Zhang HX, Lu XF, et al. EphrinBs/EphBs signaling is involved in modulation of spinal nociceptive processing through a mitogen-activated protein kinases-dependent mechanism[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(5):1234-1249.
- [13] Fairbanks CA, Kitto KF, Nguyen HO, et al. Clonidine and dexmedetomidine produce antinociceptive synergy in mouse spinal cord[J]. *Anesthesiology*, 2009, 110(3):638-647.

(收稿日期:2013-07-07 修回日期:2013-08-08)

(上接第 4052 页)

- [2] Chen PJ, Yeh SH, Liu WH, et al. Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lungcancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2012, 56(2):632-643.
- [3] 侯宝华,简志祥,崔鹏,等. miR-216a 在胰腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(11):1628-1631.
- [4] Link A, Becker V, Goel A, et al. Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8):e42933.
- [5] Ali S, Banerjee S, Logna F, et al. Inactivation of Ink4a/Arf leads to deregulated expression of miRNAs in K-Ras transgenic mouse model of pancreatic cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(10):3373-3380.
- [6] Chen PJ, Yeh SH, Liu WH, et al. Androgen pathway stimulates microRNA-216a transcription to suppress the tumor suppressor in lungcancer-1 gene in early hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2012, 56(2):632-643.
- [7] Yu J, Li A, Hong SM, et al. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(4):981-992.
- [8] Kang JH, Toita R, Kim CW, et al. Protein kinase C (PKC)

isozyme-specific substrates and their design[J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6):1662-1672.

- [9] Hanauske AR, Sundell K, Lahn M. The role of protein kinase C-alpha (PKC- α) in cancer and its modulation by the novel PKC- α -specific inhibitor aprinocarsen [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(20):1923-1936.
- [10] Chandanos E, Lagergren J. Oestrogen and the enigmatic male predominance of gastric cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(16):2397-2403.
- [11] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(1):69-90.
- [12] Tang H, Bian Y, Tu C, et al. The miR-183/96/182 cluster centralizes to regulate oxidative apoptosis and sensitizes cells to chemotherapy in gastric cancers [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2013, 13(2):221-231.
- [13] Li Y, Guessous F, Zhang Y, et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19):7569-7576.
- [14] Ruan BF, Zhu HL. The chemistry and biology of the bryostatins: potential PKC inhibitors in clinical development [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(25):2652-2664.

(收稿日期:2013-07-15 修回日期:2013-08-13)