

DOI: 10.3969/j.issn.1005- 8982.2017.06.006

文章编号: 1005- 8982 (2017) 06- 0027- 05

右美托咪定对神经病理性痛大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体表达的影响*

陈桂玲¹, 张加强²

(1. 河南省义马市义煤总医院, 河南 义马 472300; 2. 河南省人民医院, 河南 郑州 450003)

摘要:目的 探讨右美托咪定对神经病理性痛大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体表达的影响。**方法** 60 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、神经病理性痛组 (NP 组) 和右美托咪定干预组 (DI 组), 复制神经病理性痛大鼠模型。于模型复制即刻, DI 组大鼠腹腔注射 40 μ g/kg 右美托咪定, 间隔 24 h 给药 1 次, 连续进行至模型复制成功后 14 d, Sham 组和 NP 组给予等量生理盐水腹腔注射。分别于复制模型前 (T_0)、复制模型后 24 h (T_1)、72 h (T_2)、7 d (T_3) 和 14 d (T_4), 对大鼠机械缩足阈值 (MWT) 和热缩足潜伏期 (TWL) 进行测定。Western blot 检测大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白的表达。**结果** 与 Sham 组比较, NP 组和 DI 组大鼠 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 时 MWT 和 TWL 降低; 与 NP 组比较, DI 组大鼠 T_2 、 T_3 、 T_4 时 MWT 和 TWL 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 Sham 组比较, NP 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白升高; 与 NP 组相比, DI 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定可有效改善神经病理性痛大鼠痛觉过敏症状, 可能与抑制脊髓中 P2X3 和 P2X4 受体蛋白的表达有关。

关键词: 右美托咪定; 神经病理性痛; P2X3 受体; P2X4 受体

中图分类号: R741

文献标识码: A

Effects of Dexmedetomidine on expressions of P2X3 and P2X4 receptors in spinal cord of rats with neuropathic pain*

Gui-ling Chen¹, Jia-qiang Zhang²

(1. General Hospital of Yima Coal Industry Group, Yima, Henan 472300, China; 2. People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou, Henan 450003, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Dexmedetomidine on the expressions of P2X3 receptor and P2X4 receptor in the spinal cord of rats with neuropathic pain. **Methods** Sixty healthy male SD rats were randomly divided into sham operation group (sham group), neuropathic pain group (NP group) and Dexmedetomidine intervention group (DI group). The neuropathic-pain rat models were constructed. At the start of model construction, the rats in the DI group were intraperitoneally injected with 40 μ g/kg Dexmedetomidine, which was repeated at 24-h intervals till 14 d after the models were successfully constructed. The rats in the sham group and the NP group were given intraperitoneal injection of normal saline. Mechanical withdraw threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) of the rats were detected before model construction (T_0) and 24 h (T_1), 72 h (T_2), 7 d (T_3) and 14 d (T_4) after model construction. The expressions of total proteins and membrane proteins of P2X3 receptor and P2X4 receptor in the spinal cord of the rats were detected using Western blot. **Results** Compared with the sham group, the MWT and TWL in the NP group and the DI group were decreased at T_{1-4} ; compared with the NP group, the MWT and TWL in the DI group were increased at T_{2-4} , the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the expressions of total proteins and membrane proteins of P2X3 receptor and P2X4 receptor in the spinal cord of the rats in the NP group were increased; compared with the NP group, the expressions of total proteins and

收稿日期: 2016-08-01

* 基金项目: 河南省 2015 科技发展计划项目 No: 152300410163)

membrane proteins of P2X3 receptor and P2X4 receptor in the spinal cord of the rats in the DI group were decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** Dexmedetomidine could effectively improve the symptoms of neuropathic hyperalgesia in the neuropathic-pain rats. It might be related with the inhibition of the expressions of P2X3 receptor and P2X4 receptor proteins in the spinal cord.

Keywords: Dexmedetomidine; neuropathic pain; P2X3 receptor; P2X4 receptor

神经病理性痛作为临床上常见的疼痛类型,发病机制较为复杂,患者常表现为自发痛、痛觉过敏等,尚无特效治疗手段,且发病率较高,给患者身心带来巨大痛苦^[1]。三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 作为机体能量供应物质,亦具有神经递质功能。研究表明,ATP 参与神经病理性痛发病过程^[2]。P2X 受体是配体门控阳离子通道受体,是 ATP 主要受体。研究表明,神经病理性痛大鼠背根神经节中 P2X3 和 P2X4 受体表达上调^[3-4]。右美托咪定是临床上常用的 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体激动剂,具有高度选择性,是常用的镇静、镇痛药物^[5],但其具体的镇痛机制尚未明确,本研究尝试利用右美托咪定对神经病理性痛大鼠进行镇痛,观察其镇痛效果,探讨其可能的作用机制,以期为临床实践提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 60 只,购自河南省实验动物中心[合格证号:SCXK(豫)2011-0003],体重 180~220 g,饲养于标准条件下,自由摄食、进水。利用随机数字表随机分为假手术组 (Sham 组)、神经病理性痛组 (NP 组) 和右美托咪定干预组 (DI 组),每组 20 只。所有大鼠实验前在独立环境中适应 1 周。

1.2 实验方法

1.2.1 神经病理性痛大鼠模型的复制 参照文献^[6]中的方法复制大鼠神经病理性痛模型。腹腔注射 80 mg/kg 巴比妥钠麻醉后,对右后肢大腿进行备皮,消毒后,将皮肤沿右股骨下缘切开,对肌肉进行钝性分离使坐骨神经充分暴露,于坐骨神经分叉前,用 4 号铬制羊肠线连打 4 个松结,结与结间隔 1 mm,让神经外膜轻微受压,力度以足指轻微抽动为准。将肌肉、筋膜及皮肤进行缝合后,将鼠重新放回笼子进行饲养,大鼠出现跛行、舔舐及悬空后肢等说明模型复制成功。Sham 组大鼠将坐骨神经暴露 3~4 min,不进行打结。

1.2.2 干预措施 于神经病理性痛模型复制即刻,DI 组大鼠腹腔注射 40 μ g/kg 右美托咪定 (江苏恒瑞

医药股份有限公司,国药准字:H20090251),间隔 24 h 给药 1 次,连续进行至建模后 14 d,Sham 组和 NP 组给予等量生理盐水腹腔注射,实验过程中各组大鼠未出现死亡。

1.2.3 机械缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 测定 分别于复制模型前 (T_0)、复制模型后 24 h (T_1)、72 h (T_2)、7 d (T_3) 和 14 d (T_4),对大鼠 MWT 和 TWL 进行测定。将大鼠置于有机玻璃罩中,待其适应、安静后,用美国 Stoelting 公司生产的 Von Frey 纤维丝,由小到大施加不同垂直压力刺激大鼠左后脚掌第 3、4 趾间皮肤,直到出现抬足或舔足行为,重复测 3 次,每次间隔 5 min,取均值作为 MWT。大鼠在有机玻璃箱内适应 20 min 后,用北京凯辉盛达科技发展有限公司生产的热痛刺激仪照射大鼠足底,记录大鼠从开始照射到出现抬腿回避的时间,连续测 3 次,每次间隔 5 min,取均值作为 TWL。

1.2.4 Western blot 检测大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白的表达 于复制模型后 14 d 测定 MWT 和 TWL,将大鼠进行麻醉,处死后留取脊髓 L_{4-6} 节段,10 只大鼠的脊髓样品用于总蛋白提取。样品充分研磨后加入细胞裂解液 (上海瑞齐生物科技有限公司) 和蛋白酶抑制剂,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,用二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 法对获得的总蛋白定量。另外 10 只大鼠的脊髓样品用于膜蛋白提取。脊髓样品用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次后,用膜蛋白抽提试剂盒 (上海励瑞生物科技有限公司) 提取细胞膜蛋白,用 BCA 法对获得的细胞膜蛋白定量。分别取 30 μ g 总蛋白和膜蛋白,用聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至聚偏氟乙烯膜上,用 3% 胎牛血清封闭 2 h,分别将兔抗大鼠 P2X3 受体、P2X4R 多克隆抗体 (美国 Sigma 公司,1:500 稀释) 加入,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,用三羟甲基胺-盐酸缓冲盐溶液 (Tris-HCl buffer saline, TBS) 缓冲液冲洗 3 次,将辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2000 稀释) 加入,室温下孵育 60 min,用 TBS 缓冲液冲洗

3 次,用增强化学发光试剂盒(上海通善生物科技有限公司)发光显像,用 Quantity One 图像分析软件进行分析,分别获得脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素分析或重复测量设计的方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠的行为表现

3 组大鼠在复制模型中和复制模型后均未出现死亡及术侧后肢感染、自噬、运动功能丧失等。Sham

组大鼠复制模型前后术侧后肢运动未表现出现明显异常,NP 组和 DI 组大鼠复制模型后出现术侧后肢内收、外翻及跛行,DI 组大鼠在给予干预 3 d 后运动症状改善。

2.2 3 组大鼠不同时间 MWT 和 TWL 的变化

2.2.1 3 组大鼠 MWT 比较 Sham 组、NP 组和 DI 组 T₁、T₂、T₃、T₄ 的 MWT 比较,采用重复测量数据的方差分析,结果:①不同时间的 MWT 有差异 $F=43.857, P=0.000$ 。② Sham 组、NP 组及 DI 组的 MWT 有差异 ($F=109.642, P=0.000$),NP 组、DI 组较 Sham 组的 MWT 低,DI 组较 NP 组的 MWT 高,右美托咪定可改善机械缩足阈值。③ Sham 组、NP 组及 DI 组的 MWT 变化趋势有差异 $F=22.943, P=0.000$ 。见表 1 和图 1。

表 1 3 组大鼠不同时间 MWT 比较 (n=20,g, $\bar{x} \pm s$)

组别	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Sham 组	14.214± 1.605	13.816± 1.307	13.708± 1.437	14.106± 1.572	13.926± 1.419
NP 组	13.919± 1.434	5.624± 1.116	4.538± 0.817	3.217± 0.628	2.935± 0.705
DI 组	14.037± 1.317	5.443± 0.937	7.141± 1.206	7.934± 1.143	8.616± 1.062

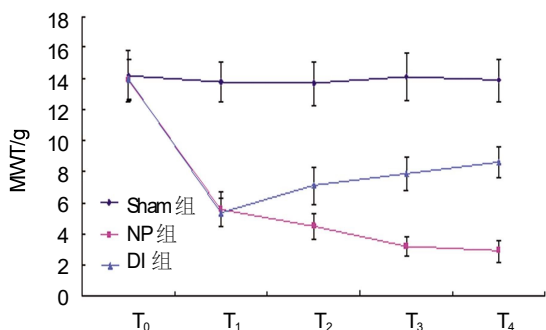


图 1 3 组大鼠 MWT 不同时间变化趋势

2.2.2 3 组大鼠 TWL 比较 Sham 组、NP 组和 DI 组 T₁、T₂、T₃、T₄ 的 TWL 比较,采用重复测量数据的方差分析,结果:①不同时间点的 TWL 有差异 $F=39.672, P=0.000$ 。② Sham 组、NP 组及 DI 组的 TWL 有差异 $F=91.628, P=0.000$,NP 组、DI 组较 Sham 组的 TWL 低,DI 组较 NP 组的 TWL 高,右美托咪定可改善热缩足潜伏期。③ Sham 组、NP 组及 DI 组的 TWL 变化趋势有差异 $F=22.943, P=0.000$ 。见表 2 和图 2。

表 2 3 组大鼠不同时间 TWL 比较 (n=20,s, $\bar{x} \pm s$)

组别	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
Sham 组	17.416± 1.772	16.919± 1.462	17.335± 1.629	17.148± 1.536	17.275± 1.362
NP 组	17.238± 1.515	10.518± 1.372	8.275± 1.262	7.318± 1.098	6.719± 0.885
DI 组	17.619± 1.838	10.353± 1.142	12.415± 1.336	13.109± 1.243	13.918± 0.962

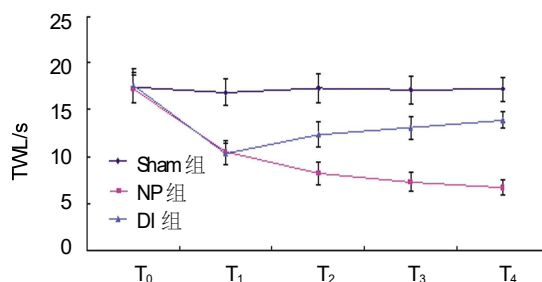


图 2 3 组大鼠 TWL 不同时间变化趋势

2.3 3 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白表达

NP 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白与 Sham 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),NP 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白升高。DI 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白与 NP 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),DI 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白

降低。见表 3。

表 3 3 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白的表达 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	P2X3 受体		P2X4 受体	
	总蛋白	膜蛋白	总蛋白	膜蛋白
Sham 组	0.582± 0.074	0.634± 0.122	0.613± 0.115	0.794± 0.081
NP 组	1.074± 0.113 ^①	1.113± 0.091 ^①	1.125± 0.134 ^①	1.185± 0.063 ^①
DI 组	0.695± 0.083 ^②	0.782± 0.062 ^②	0.724± 0.093 ^②	0.832± 0.054 ^②
F 值	54.536	53.011	74.023	118.234
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 NP 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

神经病理性痛作为临床上常见的慢性顽固性疼痛,病情迁延反复,目前尚无有效的治疗手段,给患者生活质量造成严重影响。坐骨神经挤压伤模型作为经典的神经病理性痛动物模型,可模拟人类神经病理性痛表现,应用较为广泛。本研究显示, NP 组和 DI 组大鼠模型复制成功后出现术侧后爪内收、外翻及跛行;与复制模型时比较, NP 组和 DI 组大鼠复制模型后 MWT 和 TWL 均降低,说明大鼠出现机械痛敏及热痛敏,表现出神经病理性痛症状,提示成功复制神经病理性痛大鼠模型。

右美托咪定作为新型的高选择性 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体激动剂,可作用于神经元 $\alpha 2A$ 受体而发挥镇痛功能^[7]。本研究显示, DI 组大鼠在给予干预 3 d 后运动症状改善,与 NP 组比较, DI 组大鼠 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 时 MWT 和 TWL 升高,说明右美托咪定可有效改善神经病理性痛大鼠疼痛症状。ATP 作为重要的能力供应物质,亦可与细胞表面受体结合而发挥信号传导的功能,在疼痛产生过程中发挥重要调控作用^[8]。P2X 受体是 ATP 主要的受体类型, P2X3 受体在与伤害性信息传递相关的中枢及外周神经细胞中分布广泛,在疼痛信息传递及调控中发挥重要作用^[9]。有研究指出, P2X3 受体在坐骨神经结扎引起的神经性痛大鼠背根神经节中表达上调^[10]。特异性抑制 P2X3 受体表达对大鼠的镇痛功能^[11]。P2X4 受体作为 ATP 受体类型之一,主要在脊髓小胶质细胞中表达,参与神经病理性疼痛发生过程^[12]。本研究显示,与 Sham 组比较, NP 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白均升高,说明 P2X3 和 P2X4 受体均参与神经病理性疼痛发生过程。分析其原因,可能是在外周神经受损后,

炎症介质或损伤通过一系列级联反应而使胞核中转录因子被激活,使 P2X3 和 P2X4 受体被大量转录及翻译而参与痛觉过敏的发生^[13]。而且在生物功能发挥中,只有位于细胞膜上的受体与配体结合才能发挥相应的生物学功能。本研究显示,与 Sham 组比较, NP 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体膜蛋白均升高,说明在外周神经发生损伤后,大量的炎症介质在促使胞核转录的同时,亦诱导溶酶体的胞吐功能,使产生的 P2X3 和 P2X4 受体被转移到细胞膜,从而加速与 ATP 结合而参与痛觉过敏的产生^[14]。本研究显示,与 NP 组比较, DI 组大鼠脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白均降低,说明右美托咪定干预可降低脊髓 P2X3 和 P2X4 受体总蛋白及膜蛋白表达,从而患者疼痛的发生。分析其原因,右美托咪定可特异性与脊髓背角突触前膜 $\alpha 2A$ 受体结合,使突触前抑制,减少钙离子内流,从而减少 ATP 释放,通过一系列级联反应而使胞核中 P2X3 和 P2X4 受体表达减少,从而影响其在疼痛发生中的作用^[15]。

综上所述,右美托咪定可有效改善神经病理性痛大鼠痛觉过敏症状,可能与抑制脊髓细胞中 P2X3 和 P2X4 受体蛋白的表达,并抑制其向胞膜转运减少与配体结合有关。

参 考 文 献:

- [1] FINNERUP N B, ATTAL N, HAROUTOUNIAN S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(2): 162-173.
- [2] KAWANO T. Potentiation of neuronal ATP-sensitive potassium channels as a novel target for neuropathic pain[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2015, 146(1): 10-15.
- [3] ZHOU Y L, JIANG G Q, WEI J, et al. Enhanced binding capability of nuclear factor- κ B with demethylated P2X3 receptor gene contributes to cancer pain in rats[J]. *Pain*, 2015, 156(10): 1892-1905.
- [4] CHEN X M, XU J, SONG J G, et al. Electroacupuncture inhibits excessive interferon- γ evoked up-regulation of P2X4 receptor in spinal microglia in a CCI rat model for neuropathic pain[J]. *Br J Anaesth*, 2015, 114(1): 150-157.
- [5] PENG K, WU S R, JI F H, et al. Premedication with dexmedetomidine in pediatric patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2014, 69(11): 777-786.
- [6] AMIN B, HAJHASHEMI V, HOSSEINZADEH H. Minocycline potentiates the anti-hyperalgesic effect of ceftriaxone in CCI-induced neuropathic pain in rats[J]. *Res Pharm Sci*, 2015, 10(1): 34-42.
- [7] GELEGEN C, GENT T C, FERRETTI V, et al. Staying awake a

- genetic region that hinders $\alpha 2$ adrenergic receptor agonist-induced sleep[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 40(1): 2311-2319.
- [8] 肖智,文松. 右美托咪啶对糖尿病神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015, 21(5): 341-350.
- [9] DI VIRGLIO F. P2X receptors and inflammation[J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(7): 866-877.
- [10] HARHUN M I, SUKHANOVA K, GORDIENKO D, et al. Molecular identification of P2X receptors in vascular smooth muscle cells from rat anterior, posterior, and basilar arteries[J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(6): 1055-1060.
- [11] SUNDUKOVA M, VILOTTI S, ABBATE R, et al. Functional differences between ATP-gated human and rat P2X3 receptors are caused by critical residues of the intracellular C-terminal domain[J]. *J Neurochem*, 2012, 122(3): 557-567.
- [12] CAO Q, ZHONG X Z, ZOU Y, et al. Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion[J]. *J Cell Bid*, 2015, 209(6): 879-894.
- [13] BURNSTOCK G. Physiopathological roles of P2X receptors in the central nervous system[J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(7): 819-844.
- [14] BELE T, FABBRETTI E. P2X receptors, sensory neurons and pain[J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(7): 845-850.
- [15] FARGHALY H S, ABD-ELLATIEF R B, MOFTAH M Z, et al. The effects of dexmedetomidine alone and in combination with tramadol or amitriptyline in a neuropathic pain model [J]. *Pain Physician*, 2014, 17(2): 187-195.

(童颖丹 编辑)