

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.003

文章编号: 1005-8982(2017)27-0012-05

右美托咪定对神经病理性痛大鼠脊髓背角 COX-2 和 c-fos 表达的影响*

秦梦婷¹, 邱忠鹏², 王业忠¹

(石河子大学第一附属医院 1.重症医学一科, 2.骨二科, 新疆 石河子 832008)

摘要:目的 探讨右美托咪定对神经病理性痛大鼠脊髓背角 COX-2 和 c-fos 表达的影响。**方法** 90 只健康成年雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组($n=30$)、神经病理性痛组($n=30$)和右美托咪定组($n=30$),利用坐骨神经结扎的方法复制神经病理性痛模型,右美托咪定组大鼠于术后即刻开始至处死前 1 天,每天腹腔注射 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 右美托咪定,1 次/d,其他两组大鼠给予等容量生理盐水腹腔注射。分别于术前 1 d(T_0)、术后 3 d(T_1)、术后 7 d(T_2)和术后 14 d(T_3)对造模大鼠热痛阈(TWL)和机械痛阈(MWT)进行测定,分别于 T_1 、 T_2 和 T_3 时测定完 TWL 和 MWT 后,处死并取脊髓组织,利用实时荧光定量 PCR 检测大鼠脊髓背角中 COX-2 mRNA 和 c-fos mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较,神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 $T_1\sim T_3$ 时 TWL 均缩短, MWT 均降低,差异有统计学意义($P<0.05$),与神经病理性痛组比较,右美托咪定组大鼠 $T_1\sim T_3$ 时 TWL 均延长,而 MWT 均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与假手术组比较,神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 $T_1\sim T_3$ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$),与神经病理性痛组相比,右美托咪定组大鼠 $T_1\sim T_3$ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 右美托咪定可有效抑制神经病理性痛大鼠中枢痛觉敏化,其机制可能与下调脊髓背角 COX-2 和 c-fos 表达有关。

关键词: 右美托咪定;神经病理性痛;大鼠;环氧合酶-2;c-fos

中图分类号: R791.2

文献标识码: A

Effect of Dexmedetomidine on spinal expression of COX-2 and c-fos in rat models of neuropathic pain*

Meng-ting Qin¹, Zhong-peng Qiu², Ye-zhong Wang¹

(1. Department of Critical Medicine, 2. Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Dexmedetomidine on spinal expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2) and c-fos in spinal dorsal horns of rat models of neuropathic pain. **Methods** A total of 90 healthy adult male Wistar rats were randomly divided into sham group ($n=30$), neuropathic pain group ($n=30$) and Dexmedetomidine group ($n=30$). Rat models of neuropathic pain were established by sciatic nerve ligation. Sham operated rats received all procedure except for sciatic nerve ligation. Dexmedetomidine was intraperitoneally injected (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) daily in the Dexmedetomidine group. Vehicle saline were administered into the remaining animals. Thermal pain threshold (TWL) and mechanical pain threshold (MWT) were measured 1 day before operation (T_0), and the 3th d (T_1), 7th d (T_2) and 14th d (T_3) after surgery, then spine were harvested immediately. COX-2 and c-fos in spinal cord dorsal horns were determined by real-time quantitative PCR. **Results** Compared with the sham group, TWL and MWT in the neuropathic pain group and Dexmedetomidine group decreased significantly at $T_1\sim T_3$ ($P<0.05$); TWL and MWT in the Dexmedetomidine group increased. at $T_1\sim T_3$ ($P<0.05$) compared with the neuropathic pain group. Expression levels of COX-2

收稿日期:2017-05-30

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81360185)

mRNA and c-fos mRNA in the neuropathic pain group and the Dexmedetomidine group were increased at T_1 - T_3 dramatically ($P < 0.05$), but was alleviated by treatment of Dexmedetomidine compared between the neuropathic pain group and Dexmedetomidine group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine inhibits central neuropathic hyperalgesia in rat models of neuropathic pain, which may be related to down-regulation of COX-2 and c-fos.

Keywords: Dexmedetomidine; neuropathic pain; cyclooxygenase-2; c-fos

右美托咪定是一种美托咪定的右旋异构体,可高选择性激动 α_2 肾上腺素能受体,在镇痛、镇静及抗交感神经活性等方面发挥重要作用^[1],有研究指出^[2],右美托咪定可有效缓解神经病理性疼痛。但具体作用机制尚未完全研究清楚。有研究指出^[3],外周神经发生损伤后,环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2)在脊髓背角中的表达上调,通过一系列细胞级联反应而使脊髓神经元敏化,引发并维持神经病理性疼痛。c-fos 基因在细胞分化、繁殖、生长及信息传递等过程中发挥重要作用^[4],其在正常生理状态下在神经元细胞中呈极低表达水平,但当外界出现机械或物理性刺激时,会导致脊髓中 c-fos 大量表达,从而导致脊髓神经元可塑性变化,可能是引起中枢敏化的原因之一^[5]。本研究拟探讨右美托咪定对神经病理性痛大鼠脊髓背角 COX-2 和 c-fos 表达的影响,分析其镇痛的可能机制,以期为临床实践提供理论基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

90 只健康成年雄性 Wistar 大鼠,由河南省实验动物中心提供,体重 185 ~ 220 g,7 周龄,饲养于 24℃ 室温条件下,相对湿度 50% ~ 60%,自由摄食和饮水。利用随机数字表随机分为假手术组($n=30$)、神经病理性痛组($n=30$)和右美托咪定组($n=30$)。

1.2 模型复制及处理

按照文献[6]的步骤复制大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤模型:利用 40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后,将右后肢股骨中段皮肤切开,对肌肉进行分离,使坐骨神经暴露,利用 4-0 丝线在坐骨神经干上松扎 4 道,每道间隔 1 mm 左右,保证神经外膜稍微受压但又不让血管完全阻断,结扎过程可见大鼠肢体轻微发生抽动。操作完毕,用 2 mg 青霉素对切口进行外敷以防感染。假手术组大鼠仅对坐骨神经进行分离但不行结扎,右美托咪定组大鼠于术后即刻开始至处死前 1 天,每天腹腔注射 50 μ g/kg 右美托咪定(批准文号:国药准字 H20090248,生产

单位:江苏恒瑞医药股份有限公司),1 次/d,其他两组大鼠给予等容量生理盐水腹腔注射。

分别于术前 1 d(T_0)、术后 3 d(T_1)、术后 7 d(T_2)和术后 14 d (T_3)对造模大鼠热痛阈(thermal pain threshold, TWL)和机械痛阈(mechanical pain threshold, MWT)进行测定。利用 XR1102 热刺痛仪(购自上海欣软信息科技有限公司)对热痛阈进行测定,大鼠置于厚度为 3 mm 的玻璃板上,利用热辐光源对右后肢足底部进行照射,对从开始照射至出现缩足反应的时间进行记录,单次照射时间在 20 s 以内,连续进行 3 次,每次间隔 5 min,求均值。利用 von Frey 纤维丝(购自美国 Stoelting 公司)对机械痛阈进行测定,将大鼠置于透明玻璃箱内,分别选取压力为(0.41、0.52、0.87、1.16、2.05、3.61、5.50、8.28、10.33 和 16.73 g)的 von Frey 纤维丝,利用初始刺激压力为 2.05 g 的纤维丝垂直缓慢地对大鼠右后肢足底部进行刺激,每次间隔 >30 s,以大鼠出现躲避、抬足或舔足反应为阳性,以纤维丝发生 90° 弯曲而无反应为阴性,采取序贯法^[7]对 MWT 进行计算,并分别在阈值上下刺激 5 次,求均值。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测

分别于 T_1 、 T_2 和 T_3 时随机从各组选取 10 只大鼠,测定完 TWL 和 MWT 后,腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,断头处死。快速取出 L_4 ~ L_6 节段脊髓组织,放入已冷冻的冻存管内,再保存于液氮中以备检。利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法对大鼠脊髓中 COX-2 mRNA 和 c-fos mRNA 表达水平进行检测,COX-2、c-fos 及内参引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计及合成。COX-2 引物:正向 5'-CTGTATCCC GCCCTGCTGGTG-3',反向 5'-ACTTGCGTTGATGGTGGCTGTCTT-3';c-fos 引物:正向 5'-CGGGTTTCAACGCGGACTAC-3',反向 5'-GTTGGCACTAGAGACGGACAGA-3'。取脊髓背角组织放入研钵内进行迅速研磨,利用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(购自美国 C&M biolabs 公司)对组织中总 RNA 进行提取,并测定 RNA 纯度,取 A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 的标本作为合格标本。分别取 2 μ l 总

RNA 进行逆转录 cDNA。利用美国 ABI 7500 型 qRT-PCR 仪(购自美国 ABI 公司)进行 PCR 扩增, 扩增条件:95℃ 预变性 30 s,94℃ 10 s,74℃ 15 s, 60℃ 15 s, 连续进行 35 个循环。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 COX-2 mRNA 和 c-fos mRNA 在脊髓背角组织中的表达水平进行分析。

1.4 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, 多组间和组内比较用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组大鼠建模后情况

3 组大鼠建模后均未见切口感染。假手术组大鼠未见明显异常, 神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠右后肢足趾出现并拢, 轻度外翻状, 常表现悬空、抬足等异常行为。右美托咪定组大鼠在给药后有轻度嗜睡现象, 但容易被唤醒, 醒后仍然可站立。

2.2 3 组大鼠 TWL 和 MWT 情况

T_0 时, 3 组大鼠 TWL 和 MWT 差异无统计学意

义 ($P > 0.05$); 与假手术组比较, 神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 $T_1 \sim T_3$ 时 TWL 均缩短, MWT 均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与神经病理性痛组比较, 右美托咪定组大鼠 $T_1 \sim T_3$ 时 TWL 均延长, 而 MWT 均升高; 与 T_0 时比较, 神经病理性痛组和右美托咪定组 $T_1 \sim T_3$ 时 TWL 均缩短, MWT 均降低, 与 T_1 时比较, 神经病理性痛组和右美托咪定组 $T_2 \sim T_3$ 时 TWL 均缩短, MWT 均降低, 与 T_2 时比较, 神经病理性痛组和右美托咪定组 T_3 时 TWL 均延长, MWT 则升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 3 组大鼠不同时点脊髓背角组织中 COX-2 mRNA 和 c-fos mRNA 相对表达量

与假手术组比较, 神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 $T_1 \sim T_3$ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与神经病理性痛组比较, 右美托咪定组大鼠 $T_1 \sim T_3$ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 T_1 时比较, 神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 $T_2 \sim T_3$ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均升高, 差异有统计学意义 ($P <$

表 1 3 组大鼠不同时间 TWL 和 MWT 比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	$T_0(n=30)$	$T_1(n=30)$	$T_2(n=20)$	$T_3(n=10)$
TWL/s	假手术组($n=10$)	16.7 ± 1.1	15.7 ± 1.0	15.3 ± 0.9	16.2 ± 1.2
	神经病理性痛组($n=10$)	16.5 ± 0.9	11.2 ± 0.6 ¹⁾³⁾	9.1 ± 0.5 ¹⁾³⁾⁴⁾	9.6 ± 0.6 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
	右美托咪定组($n=10$)	16.0 ± 1.1	12.3 ± 0.5 ¹⁾²⁾³⁾	9.9 ± 0.7 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	11.2 ± 0.4 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
	F 值	1.140	386.187	786.553	243.898
	P 值	0.324	0.000	0.000	0.000
MWT/g	假手术组($n=10$)	19.5 ± 1.2	20.3 ± 1.5	19.9 ± 1.3	21.1 ± 1.7
	神经病理性痛组($n=10$)	20.2 ± 1.3	9.4 ± 0.6 ¹⁾³⁾	7.2 ± 0.4 ¹⁾³⁾⁴⁾	8.6 ± 0.3 ¹⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
	右美托咪定组($n=10$)	19.9 ± 1.4	12.6 ± 0.8 ¹⁾²⁾³⁾	8.9 ± 0.6 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	10.1 ± 0.5 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
	F 值	0.979	1 063.892	1 752.670	453.681
	P 值	0.380	0.000	0.000	0.000

注: 1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与神经病理性痛组比较, $P < 0.05$; 3)与同组内 T_0 时比较, $P < 0.05$; 4)与同组内 T_1 时比较, $P < 0.05$; 5)与同组内 T_2 时比较, $P < 0.05$

表 2 3 组大鼠不同时间脊髓背角组织中 COX-2 mRNA 和 c-fos mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	T_1	T_2	T_3
COX-2 mRNA	假手术组($n=10$)	1.05 ± 0.04	1.09 ± 0.06	1.07 ± 0.10
	神经病理性痛组($n=10$)	3.61 ± 0.14 ¹⁾	7.43 ± 0.25 ¹⁾⁴⁾	5.38 ± 0.20 ¹⁾⁴⁾
	右美托咪定组($n=10$)	2.08 ± 0.07 ¹⁾²⁾	5.52 ± 0.13 ¹⁾²⁾⁴⁾	2.94 ± 0.16 ¹⁾²⁾⁴⁾
	F 值	2033.126	5256.238	1857.225
	P 值	0.000	0.000	0.000

续表 2

指标	组别	T ₁	T ₂	T ₃
COX-2 mRNA	假手术组(n=10)	1.05 ± 0.04	1.09 ± 0.06	1.07 ± 0.10
	神经病理性痛组(n=10)	3.61 ± 0.14 ¹⁾	7.43 ± 0.25 ¹⁾⁴⁾	5.38 ± 0.20 ¹⁾⁴⁾
	右美托咪定组(n=10)	2.08 ± 0.07 ¹⁾²⁾	5.52 ± 0.13 ¹⁾²⁾⁴⁾	2.94 ± 0.16 ¹⁾²⁾⁴⁾
	F 值	2 033.126	5 256.238	1 857.225
	P 值	0.000	0.000	0.000
c-fos mRNA	假手术组(n=10)	0.89 ± 0.19	0.85 ± 0.16	0.78 ± 0.13
	神经病理性痛组(n=10)	1.46 ± 0.21 ¹⁾	1.86 ± 0.25 ¹⁾⁴⁾	1.62 ± 0.19 ¹⁾⁴⁾
	右美托咪定组(n=10)	1.06 ± 0.17 ¹⁾²⁾	1.59 ± 0.22 ¹⁾²⁾⁴⁾	1.28 ± 0.16 ¹⁾²⁾⁴⁾
	F 值	32.882	43.405	106.622
	P 值	0.000	0.000	0.000

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与神经病理性痛组比较, $P < 0.05$; 3)与同组内 T₁ 时比较, $P < 0.05$; 4)与同组内 T₂ 时比较, $P < 0.05$

0.05);与 T₂ 时比较,神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 T₃ 时 COX-2 mRNA 相对表达和 c-fos mRNA 相对表达量均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

神经病理性痛作为常见的慢性疼痛,患者常出现异常疼痛、痛觉过敏或感觉异常等症状,给患者生存质量带来严重影响^[9],本研究复制神经病理性痛大鼠模型,结果显示,神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠右后肢足趾出现并拢,轻度外翻状,常表现悬空、抬足等异常行为,且与假手术组比较,神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 T₁ ~ T₃ 时 TWL 均缩短, MWT 均降低,说明制备的神经病理性痛大鼠模型复制成功。

本研究结果显示,与假手术组比较,神经病理性痛组和右美托咪定组大鼠 T₁ ~ T₃ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均升高,说明神经病理性痛发生与脊髓背角中 COX-2 和 c-fos 表达上调有关,且随时间表达变化情况与痛阈变化相一致,提示 COX-2 和 c-fos 参与神经病理性痛的发生及进展过程,分析原因,当外周神经发生损伤时,会特异性激活胞内型磷脂酶 A2 活性,激发脊髓磷脂酶 - 环氧化酶 - 前列腺素级联通路级联放大反应^[9],使 COX-2 表达升高、前列腺素物质释放增多,从而使谷氨酸等末梢神经兴奋物质释放增加^[10],进而激活脊髓背角神经元 NMDA 受体,导致 Ca²⁺ 内流增加^[11],而神经元内增高的 Ca²⁺ 又可促使 cAMP 生成,导致 AMP 反应元件结合蛋白磷酸化而被激活,

进一步与 cAMP 反应元件结合而促使 c-fos 基因大量表达,产生的 c-fos 蛋白则可与 c-jun 蛋白结合形成复合物,通过激活目的基因而促使炎症因子合成及释放,从而引起痛觉过敏^[12]。

本研究结果显示,在给予大鼠腹腔注射右美托咪定后,模型大鼠痛阈增高,神经病理性痛缓解,与神经病理性痛组比较,右美托咪定组大鼠 T₁ ~ T₃ 时 COX-2 mRNA 相对表达量和 c-fos mRNA 相对表达量均降低,提示右美托咪定可通过抑制脊髓背角组织中 COX-2 和 c-fos 的表达,而达到抑制神经病理性痛。分析原因,右美托咪定通过抑制 COX-2 表达及活性,减少前列腺素的产生,引起谷氨酸受体介导的兴奋性突触后电流减少,使突触前膜自发性释放谷氨酸降低^[13],同时,前列腺素水平的降低亦可使突触前膜电压依赖性 Ca²⁺ 内流减少,加之右美托咪定本身可通过特异性激活 α_2 肾上腺素能受体,对脊髓背角神经元 Ca²⁺ 通道进行抑制^[14],从而降低胞内 Ca²⁺ 水平,从而使 cAMP 合成减少,c-fos 基因表达被抑制,炎症因子合成减少,从而抑制痛觉过敏的发生。

综上所述,右美托咪定可有效抑制神经病理性痛大鼠中枢痛觉敏化,其机制可能与下调 COX-2 和 c-fos 表达有关。

参 考 文 献:

- [1] YU C, LI S, DENG F, et al. Comparison of dexmedetomidine/fentanyl with midazolam / fentanyl combination for sedation and analgesia during tooth extraction[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2014, 43(9): 1148-1153.
- [2] LI S S, ZHANG W S, YANG J L, et al. Involvement of protein

- kinase B/Akt in analgesic effect of dexmedetomidine on neuropathic pain[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(5): 364-366.
- [3] MOINI ZANJANI T, AMELI H, LABIBI F, et al. The Attenuation of Pain Behavior and Serum COX-2 Concentration by Curcumin in a Rat Model of Neuropathic Pain[J]. *Korean J Pain*, 2014, 27(3): 246-252.
- [4] CAPUTTO B L, CARDOZO GIZZI A M, GIL G A. c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(9): 1241-1246.
- [5] ABE T, SHIMODA T, URADE M, et al. c-Fos induction in the brainstem following electrical stimulation of the trigeminal ganglion of chronically mandibular nerve-transected rats [J]. *Somatosens Mot Res*, 2013, 30(4): 175-184.
- [6] BENNETT G J, XIE Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107.
- [7] WU H E, GEMES G, ZOGA V, et al. Learned avoidance from noxious mechanical stimulation but not threshold semmes weinstein filament stimulation after nerve injury in rats [J]. *J Pain*, 2010, 11(3): 280-286.
- [8] 吕客, 宋一平, 童迅, 等. 发散式冲击波在腰椎间孔镜术后神经病理性疼痛的临床观察 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2015, 21(3): 238-240.
- [9] HASEGAWA S I, KOHRO Y, SHIRATORI M, et al. Role of PAF receptor in proinflammatory cytokine expression in the dorsal root ganglion and tactile allodynia in a rodent model of neuropathic pain[J]. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10467.
- [10] CUNHA N V, de ABREU S B, PANIS C, et al. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats[J]. *Life Sci*, 2010, 87(11/12): 375-381.
- [11] M?LLER N. COX-2 inhibitors as antidepressants and antipsychotics: clinical evidence[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2010, 11(1): 31-42.
- [12] LEE H P, HUANG S Y, LIN Y Y, et al. Soft coral-derived lemmalol alleviates monosodium urate-induced gouty arthritis in rats by inhibiting leukocyte infiltration and iNOS, COX-2 and c-Fos protein expression[J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(1): 99-113.
- [13] SUKEGAWA S, HIGUCHI H, INOUE M, et al. Locally injected dexmedetomidine inhibits carrageenin-induced inflammatory responses in the injected region[J]. *Anesth Analg*, 2014, 118(2): 473-480.
- [14] KODERA S Y, YOSHIDA M, DEZAKI K, et al. Inhibition of insulin secretion from rat pancreatic islets by dexmedetomidine and medetomidine, two sedatives frequently used in clinical settings[J]. *Endocr J*, 2013, 60(3): 337-346.

(王荣兵 编辑)