

右美托咪定鞘内注射对慢性神经痛模型大鼠行为能力、疼痛程度和脊髓背角蛋白激酶 C 表达的影响

孙 虎¹, 张 亮², 徐志新¹

(1. 海南医学院第二附属医院麻醉科, 海口 570311; 2. 广州医科大学附属第四医院麻醉科, 广州 511447)

【摘要】 目的 分析右美托咪定鞘内注射对于慢性神经痛模型鼠的行为、疼痛程度脊髓背角蛋白激酶 C (protein kinase C, 即 PKC) 的影响, 初步探讨右美托咪定的镇痛机制。**方法** 将 50 只成功建立模型的大鼠随机分为观察组、模型组, 另选取 25 只健康大鼠作为对照组, 观察组和模型组大鼠建立慢性坐骨神经损伤模型, 在建模后, 观察组应用右美托咪定鞘内注射干预, 模型组应用生理盐水注射, 对照组不接受干预, 在建模前、给药后 3、5、7、14 d 时分别进行行为能力评价 (累积评分法和运动功能评价) 和疼痛程度评价 (机械性缩足反射法和热缩足反射潜伏期法检测痛阈值), 同时进行 PKC 免疫染色评分 (免疫组化 SABC 法)、PKCmRNA 检测 (RT-PCR 法) 和 PKC 蛋白 (Western blot 法) 表达, 利用统计方法分析组间数据。**结果** (1) 建模前, 各组大鼠行为累积评分、运动功能评分、机械性缩足反射法 (MWT)、热缩足反射潜伏期法 (TWL) 差异无显著性 ($P > 0.05$), 在建模后, 模型组和观察组大鼠累积评分和运动功能评分显著升高, MWT 和 TWL 明显下降, 其中观察组变化幅度显著低于模型组, 建模后, 组间累积评分、运动功能评分、MWT、TWL 具有明显差异 ($P < 0.05$); (2) 对照组 PKC 为阴性表达, 模型组 PKC 呈强阳性表达, 观察组建模后初期 PKC 为强阳性, 随着治疗时间延长, PKC 表达强度降低, 第 14 天时 PKC 为弱阳性表达; (3) 建模后, 观察组和模型组 PKCmRNA 和 PKC 蛋白表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); 随着不断给药, 观察组 PKCmRNA 和 PKC 下降, 在给药 14 d 时, PKCmRNA 和 PKC 接近对照组, 建模后 3 d 起, 在相同时间点, 观察组 PKC 表达量显著低于模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定鞘内注射能够改善慢性神经痛模型大鼠行为能力、降低疼痛程度, 可能与其抑制脊髓背角蛋白激酶 C 的表达相关。

【关键词】 鞘内注射; 右美托咪定; 慢性神经痛; 脊髓背角蛋白激酶 C

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0006-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.06.002

Effect of intrathecal injection of dexmedetomidine on the behavioral activity, pain degree and expression of protein kinase C in the spinal dorsal horn in rat models of chronic neuropathic pain

SUN Hu¹, ZHANG Liang², XU Zhi-xin¹

(1. Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570311, China;

2. Department of Anesthesiology, Fourth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, 511447)

【Abstract】 Objective To analyze the effect of intrathecal injection of dexmedetomidine on the behavioral activity, pain degree and expression of protein kinase C in spinal dorsal horn of rat models of chronic neuropathic pain, and to

[作者简介] 孙虎 (1980 -), 男, 主要研究方向: 临床麻醉与疼痛治疗, E-mail: sunhu09@163.com。

[通讯作者] 徐志新 (1963 -), 男, 博士研究生, 主任医师, 麻醉学教授, 硕士生导师。E-mail: droxuzhixin@tom.com。

investigate the analgesic mechanism of dexmedetomidine. **Methods** 75 healthy male rats were randomly divided into observation group, model group and control group, 25 rats in each group. Chronic sciatic nerve injury model was established in the observation group and model group. After modeling, intrathecal dexmedetomidine intervention was used in the observation group. The model group was treated with saline injection and there was no intervention in the control group. Before the modeling (BM) and at 3 (D3), 5 (D5), 7 (D7), and 14 (D14) days after medicine administration, the behavioral capacity was evaluated by cumulative evaluation method and movement function evaluation, and the assessment of pain degree (mechanical withdrawal method and thermal withdrawal latency pain threshold detection method), PKC staining score (immunohistochemical SABC method), PKC mRNA assay (RT-PCR method) and PKC protein expression (Western blot) were conducted and the data were statistically analyzed. **Results** ① Before modeling, the behavior, the cumulative scores of motor function, MWT, and TWL showed no significant differences between the different groups ($P > 0.05$). After modeling, the model group and observation group showed that the cumulative scores and motor function scores were increased significantly, MWT and TWL decreased significantly, and the changes in the observation group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). After modeling, the cumulative scores, motor function scores, MWT, and TWL were significantly different between the groups ($P < 0.05$). ② The expression of PKC was negative in the control group and positive in the model group. In the observation group, after the initial establishment of model, the PKC was strongly positive, and along with the prolonged treatment, the PKC expression intensity was decreased, and only weakly positively expressed at 14 d. ③ After modeling, the observation group and model group showed that the PKC mRNA and PKC protein expression levels were significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). With the continuous drug administration, the PKC mRNA and PKC in the observation group were decreasing, and reached a level close to that of the control group at 14 d of drug administration. From the third day after modeling, at the same time points, the amount of PKC expression in the observation group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Intrathecal injection of dexmedetomidine can improve the behavior of rat models with chronic neuropathic pain, and reduce the degree of pain. It may be related to the inhibition of protein kinase C expression in the spinal dorsal horn.

【Key words】 Dexmedetomidine; Intrathecal injection; Chronic neuropathic pain; Spinal dorsal horn; Protein kinase C; Sprague-Dawley rats

脊髓背角蛋白激酶 C (protein kinase C) (PKC) 作为细胞内重要信号转导分子, 在细胞中分布极为广泛, 由于组成 PKC 的同工酶在生物学功能有一定的差异性, 因此, PKC 的生物学功能极为复杂。近年来, 随着 PKC 研究的不断深入, 普遍认为^[1,2] PKC 可能与机体痛敏具有一定关联, 其能够通过干预激素表达、调节传到疼痛活性参与疼痛发病机制。右美托咪啶作为新型镇痛药物, 临床实践虽然证实了其对于慢性神经痛具有高效镇痛效果, 但是相关作用机制的研究却十分少见。因此, 本实验通过对不同干预下慢性神经痛模型大鼠的行为能力、痛阈、PKC 表达进行观察分析, 旨在初步确定右美托咪啶的镇痛机制及其对 PKC 的干预效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物选择和分组

选取健康清洁级成年雄性 SD 大鼠, 体重 (200 ~ 250) g, 由广州中医药大学实验动物中心提供, 动物生产许可证号【SCXK (粤) 2013 - 0034】, 使用许

可证号【SYXK (粤) 2010 - 0104】, 适应性饲养 (自由进食、温度 22℃ ~ 25℃, 湿度 55% 左右, 昼夜比为 1 : 1) 7 d 后, 根据随机原则, 选取 25 只正常对照组不接受任何干预, 在建模后将建模成功大鼠随机选取 50 只分为 2 组, 每组各 25 只, 模型组和观察组均需建立慢性神经痛模型并在建模后给予相应干预措施。各组间在鼠龄、体质量、饲养条件方面均无明显差异 ($P > 0.05$)。

1.2 主要试剂和仪器

Invitrogen 公司生产的 Trizol 试剂; Takara 公司生产的 SYB PremixTM II 试剂盒; 购自于北京海诚远宏公司的 RIPA 蛋白裂解液; 美国 Sigma 公司生产的 PKC 单克隆抗体 (一抗和二抗); 购自于天津灏洋公司的免疫组化 LAB-SA 试剂盒和 DAB 显色剂 (浓缩型); 意大利 IITC Life Science Inc 公司制造的 I2390 Series von Frey 测痛仪; 中国医学科学院设计制造的热痛刺激仪 (型号为 BME-410A); 莱比信生物技术公司制造的石蜡切片机; GAPDH 内参和正反向引物序列合成由上海生工生物工程公司完成。

1.3 建立慢性神经痛模型

依据临床公认的 Bennet 法^[3]建立慢性神经痛动物模型,具体步骤如下:经腹腔注射戊巴比妥钠(剂量为 40 mg/kg),麻醉起效后,以侧卧位(术侧在上)固定 SD 大鼠,常规消毒术区,距离股骨下 1 cm 处沿着股骨走形切开皮肤,通过股二头肌的肌肉间隙对肌组织进行钝性分离以充分显露术侧坐骨神经,用玻璃钩针缓慢、轻轻的分离将坐骨神经和周围组织,将坐骨神经主干分叉部位以前神经游离 8 mm,并在神经起始点上 2 mm 位置利用含铬羊肠线将坐骨神经结扎(4 道,每道相隔 1 mm),局部注射生理盐水冲洗,将肌肉、筋膜、皮下组织、皮肤进行间断缝合。为了避免人为因素感染,所有上述操作均由研究者一人独立完成。实验以小鼠出现缩足、舔尾等行为学疼痛阳性反应为建模成功标准。

1.4 鞘内注射

参照张世栋等^[4]记录的鞘内注射给药方法对慢性神经痛模型大鼠进行鞘内置管给药,所有建模成功的大鼠,在建模后 2 h 以吸入异氟烷麻醉满意后,呈俯卧位摆放,触摸到两侧髂棘,对术区进行备皮和消毒,选取 L₃ 与 L₄ 间隙作为切口位置,纵形切口长度为 3 cm 左右,钝性分离肌肉组织,显露示 L₃ - L₄ 的脊突间隙,利用 25G 针刺穿黄韧带和硬脊膜,待清亮液体(即脑脊液)流出后视为穿刺成功。将导管经硬脊膜口缓慢插入 8 cm 左右,将开口端固定在 L₁ - L₂,另一端经皮下隧道在颈背部引出,在外露出 2 cm 后将导管口夹闭并固定。待大鼠麻醉失效后,微量注射 10 μ L 利多卡因,以 10 s 内双肢出现无法负重、无逃避反应且在 20 min 可恢复为实验成功。本实验中未见脱管情况出现。

1.5 观察指标及评价方法

在建模前、给药后 3 d、5 d、7 d、14 d 时分别对各组 SD 大鼠的行为学效应进行评价,同时在各时间点每组分别处死 5 大鼠,进行 PKC 表达水平测定。

1.5.1 行为学能力评分:行为能力评价采用累积评分法(Cumulative scoring)和运动功能评分(Motor function score)进行。累积评分具体方法^[5]为:根据大鼠的后爪着地和负重水平进行计分,其中后爪压迫变白代表负重,采取 0 - 2 计分法,2 分为后爪不着地且不负重;1 分为后爪不负重但可着地;0 分为后爪着地且负重,每 5 min 评鉴一次,将 1 h 内术侧和检测累积分数差即为最后的累积疼痛评分。运

动功能评分依照 Hwang 法^[6]:0 分为运动功能无改变,可以正常行走;1 分为运动轻度受限,足底刺激可出现正常缩爪反应;2 分为自主运动能力减低,中度运动受限,虽能正常行走,但是足底刺激缩爪反应减弱;3 分为自主活动完全受限,无法行走,出现明显的拖爪现象,足底刺激无反应。

1.5.2 痛阈值检测:机械性缩足反射法^[7](即 MWT):将大鼠放置在金属网格网上并盖上透明有机玻璃罩,升高网格网,适应 30 min 后,在下方用纤维细丝垂直刺激大鼠的手术侧的足底中部,不断加大刺激力度,记录大鼠出现抬腿、舔足行为情况是测痛仪显示的数值,每只动物测 5 次(间隔 60 s),将取平均值作为最终结果。热缩足反射潜伏期法^[8](即 TWL):把老鼠放置在有机玻璃箱之中,将玻璃箱放置到玻璃板上,适应 30 min 后,通过仪器中的红外线光束对大鼠术侧足底中部进行照射,从开始照射计时,至大鼠表现出逃避性行为截止,热刺激基础强度设定 10 s,自动切断时间设定 20 s,每只大鼠分测 5 次,间隔时间为 5 min,将平均值作为结果。

1.5.3 PKC 免疫染色:获取 L₅ 节段进行固定、石蜡包埋、切片等处理后,应用免疫组化 SABC 法进行组织染色处理,将 PKC 单克隆抗体作为一抗(配比为 1:50),将 PBS 作为阴性对照,利用电子显微镜和医用图像分析系统进行图像分析。在高倍镜下($\times 200$)抽取 6 个视野,分别计数 PKC 阳性细胞数(计数 100 个),阳性者在胞浆内可见黄色或棕黄色颗粒,根据参考文献^[9]通过双盲法,依照阳性细胞比(10% 以下计 0 分,10% ~ 30% 计 1 分,31% ~ 50% 计 2 分,51% ~ 70% 计 3 分,70% 以上计 4 分)和染色强度(未见黄色颗粒 0 分,黄色 1 分,深黄色 2 分,棕黄色 3 分)进行 PKC 免疫组化评分(二者相乘),其中 0 分代表(-),1 ~ 4 分代表(+),5 ~ 8 分代表(++),9 ~ 12 分代表(+++)。

1.5.4 RT-PCR(实时定量 PCR 检测):在各检测点,分别提取大鼠脊髓背角组织,通过液氮冷冻法进行碾磨之后,添加 Trizol 试剂进行总 RNA 提取,严格依照试剂盒完成反转录制取 cDNA,添加 SYBR green I,对组织 PKC mRNA 进行 RT-PCR 检测。

1.5.5 Western blot:取新鲜脊髓背角组织,无需固定处理,直接进行冷冻碾磨,添加蛋白裂解液,高速离心去除沉淀,高温煮 10 min 完成蛋白质变性,接受电泳、转膜、封闭处理后,添加 PKC 一抗(配比 1:500)在 4℃ 环境中孵育 12 h,取出后添加二抗(配比

为 1:2000),在室温下再次孵育 45 min,利用 TBS 进行洗膜,添加 ECL 进行化学发光。内参为 Tubulin (配比为 1:1000)。

1.6 统计学方法

双输入方法建立实验电子数据信息,利用 SPSS 19.0 统计程序完成数据分析,方差检验齐性后,组间计量资料比较为单因素方差分析,组内前后比较为配对 *t* 检验,若 *P* < 0.05,则差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组间行为学能力评分和痛阈值比较

建模前,各组大鼠的行为学评价指标差异无显著性 (*P* > 0.05),在建模后,模型组和观察组大鼠的行为能力显著降低,且模型组大鼠的行为能力破坏更为严重,组间累积评分、运动功能评分、MWT、TWL 差异显著 (*P* < 0.05), (表 1)。

2.2 三组 PKC 免疫染色结果

建模前,各组均未见明显的 PKC 阳性表达,且对照组神经元细胞在实验无明显变化,PKC 阳性细胞极少,为阴性表达,模型组在建模后,细胞内可见大量棕黄色颗粒,PKC 呈强阳性表达,观察组在建模后虽然 PKC 同样为强阳性,但是随着治疗时间递增,表达强度不断降低,在第 14 天时转变为弱阳性表达,与模型组 PKC 表达强度差异具有显著性 (*P* < 0.05)。详见图 1 和表 2。

2.3 三组 PKC 表达水平比较

对照组可检测到极少量 PKC 蛋白表达,观察组和模型组在建模后,PKC 表达水平显著升高,与对照组相比,差异明显 (*P* < 0.05);但是,随着不断的给药,观察组的 PKC 表达量不断下降,且在给药 14 d 时,PKC 表达量降至接近对照组水平,在相同时间点(给药 3 d 之后),观察组 PKC 表达量显著低于模型组 (*P* < 0.05)。详见表 3,图 2,图 3。

表 1 组间行为学评价结果比较
Tab.1 Comparison of behavioral evaluation results between the groups

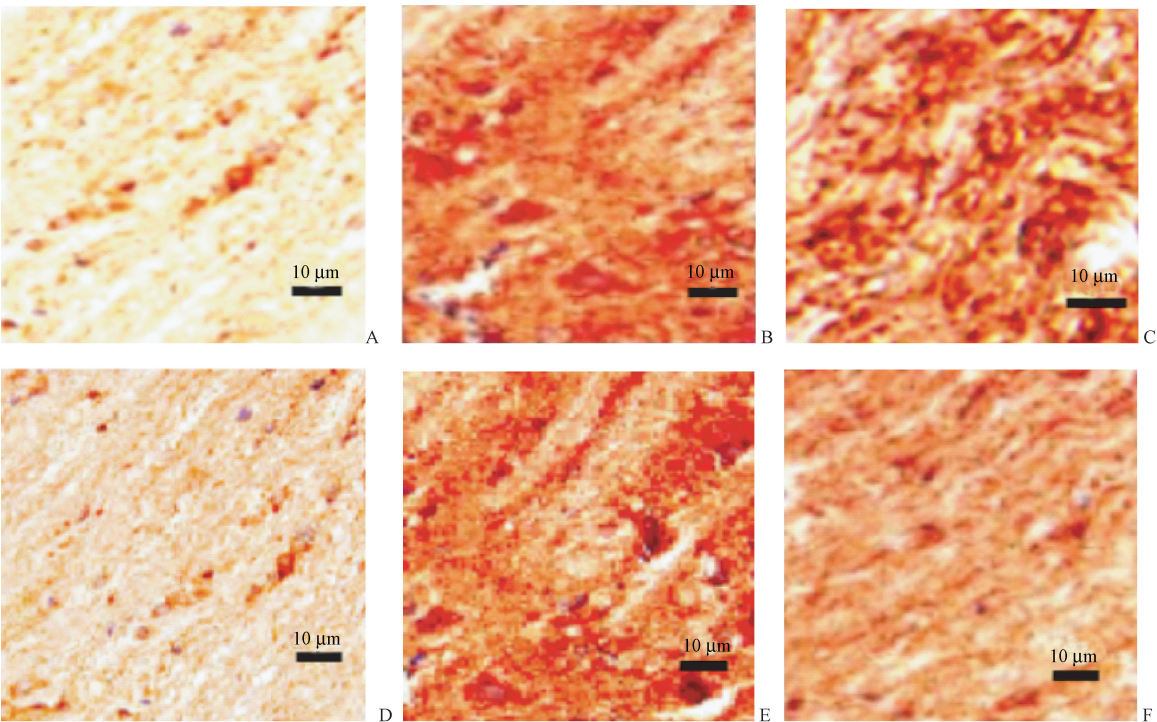
组别 Groups	建模时间 Time	累积评分(分) Cumulative scoring(score)	运动功能(分) Motor function (score)	机械性缩足反射(g) MWT (g)	热缩足反射潜伏期(s) TWL (s)
对照组 Group C	建模前	0	0	14.52 ± 1.12	27.32 ± 2.26
	Before modeling				
	给药后 3 d (D3)	0	0	14.38 ± 1.09	28.42 ± 2.32
	给药后 5 d (D5)	0	0	14.63 ± 1.11	27.95 ± 2.37
	给药后 7 d (D7)	0	0	14.71 ± 1.14	28.16 ± 2.41
模型组 Group M	给药后 14 d (D14)	0	0	14.61 ± 1.13	28.37 ± 2.59
	建模前 (BM)	0	0	5.25 ± 1.36	27.15 ± 2.31
	给药后 3d (D3)	4.21 ± 1.05 ^{ac}	2.85 ± 1.13 ^{ac}	4.63 ± 1.29 ^{ac}	14.59 ± 2.64 ^{ac}
	给药后 5d (D5)	4.02 ± 1.02 ^{ac}	2.62 ± 1.21 ^{ac}	4.74 ± 1.32 ^{ac}	13.57 ± 2.58 ^{ac}
	给药后 7 d (D7)	3.37 ± 1.03 ^{ac}	2.59 ± 0.99 ^{ac}	4.59 ± 1.31 ^{ac}	12.62 ± 2.57 ^{ac}
观察组 Group O	给药后 14 d (D14)	3.41 ± 1.01 ^{ac}	2.24 ± 1.10 ^{ac}	4.62 ± 1.28 ^{ac}	11.95 ± 2.71 ^{ac}
	建模前 (BM)	0	0	14.59 ± 1.30	27.34 ± 2.28
	给药后 3d (D3)	3.31 ± 1.02 ^{abc}	2.15 ± 1.14 ^{abc}	10.12 ± 1.21 ^{abc}	17.62 ± 2.54 ^{abc}
	给药后 5d (D5)	2.55 ± 0.89 ^{abc}	1.72 ± 1.20 ^{abc}	9.69 ± 1.23 ^{abc}	19.57 ± 2.69 ^{abc}
	给药后 7 d (D7)	2.03 ± 0.88 ^{abc}	1.59 ± 0.98 ^{abc}	8.03 ± 1.18 ^{abc}	20.87 ± 2.82 ^{abc}
	给药后 14 d (D14)	1.19 ± 0.86 ^{abc}	0.94 ± 0.62 ^{abc}	7.11 ± 1.16 ^{abc}	21.63 ± 2.72 ^{abc}

注:相同点,与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与组内建模前比较,^c*P* < 0.05。
Note. The same time points, compared with the control group, ^a*P* < 0.05; compared with the model group, ^b*P* < 0.05; compared with the same group before modeling, ^c*P* < 0.05.

表 2 三组免疫 PKC 免疫组化评分比较
Tab.2 Comparison of PKC scores in three groups. Immunohistochemical staining.

组别 Groups	建模前 (BM)	给药后 3 d (D3)	给药后 5 d (D5)	给药后 7 d (D7)	给药后 14 d (D14)
对照组 Group C	0	0	0	0	0
模型组 Group M	0	10.25 ± 1.25 ^{ac}	10.73 ± 1.16 ^{ac}	11.23 ± 1.21 ^{ac}	10.98 ± 1.34 ^{ac}
观察组 Group O	0	7.66 ± 1.29 ^{abc}	7.21 ± 1.12 ^{abc}	6.35 ± 0.97 ^{abc}	1.15 ± 0.88 ^{abc}
F	—	0.681	36.597	41.637	39.542
P	—	> 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:相同点,与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与组内建模前比较,^c*P* < 0.05。
Note. The same time points, compared with the control group, ^a*P* < 0.05; compared with the model group, ^b*P* < 0.05; compared with the same group before modeling, ^c*P* < 0.05.



A:对照组 3 d;B:模型组 3 d; C:观察组 3 d; D:对照组 14 d; E:模型组 14 d; F:观察组 14 d(200 × ,标尺 = 10 μm)

图 1 PKC 免疫染色结果

A:Group C 3 d. B:Group M 3 d. C:Group O 3 d. D:Group C 14 d. E:Group M 14 d. F:Group O 14 d(200 × ,Bar = 10μm)

Fig. 1 Expression of PKC in the brain tissues in the groups of Immunohistochemical staining

表 3 三组 PKC 表达量比较

Tab.3 Comparison of relative expression of PKC mRNA in the three groups

组别 Groups	建模前 Before modeling	给药后 3 d (D3)	给药后 5 d (D5)	给药后 7 d (D7)	给药后 14 d (D14)
对照组 Group C	0.0041 ± 0.0011	0.0041 ± 0.0012	0.0039 ± 0.0011	0.0040 ± 0.0014	0.0041 ± 0.0013
模型组 Group M	0.0039 ± 0.0013 ^{ac}	0.0157 ± 0.0045 ^{ac}	0.0155 ± 0.0041 ^{ac}	0.0149 ± 0.0043 ^{ac}	0.0153 ± 0.0042 ^{ac}
观察组 Group O	0.0040 ± 0.0012 ^{abc}	0.0121 ± 0.0042 ^{abc}	0.0108 ± 0.0026 ^{abc}	0.0085 ± 0.0028 ^{abc}	0.0062 ± 0.0019 ^{abc}
F	0.624	26.351	22.531	23.691	52.315
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:相同点,与对照组比较,^a*P* < 0.05;与模型组比较,^b*P* < 0.05;与组内建模前比较,^c*P* < 0.05。
Note. The same time points, compared with the control group, ^a*P* < 0.05; compared with the model group, ^b*P* < 0.05; compared with the same group before modeling, ^c*P* < 0.05.

3 讨论

PKC 作为磷脂依赖性重要酶类,能够被 Ca²⁺ 活化,活化后的 PKC 能够参与细胞增殖、凋亡、骨架蛋白重塑、离子通道调节等多种生物学效应^[10,11]。PKC 在中枢神经传导通路中具有第二信使的作用,刺激信号经过活性 NMDA 受体能够开启 Ca²⁺ 通道,导致 Ca²⁺ 在细胞内不断聚集增多,PKC 受控区域与 Ca²⁺ 结合后其构象发生转变而启动催化区,从而 PKC 活性被激活,此外有害神经刺激能够刺激 P 物质释放,激活脊髓背角 NK1 受体进而 PLC(磷脂

酶 C)的活性,而活化后的 PLC 能够通过对膜磷脂进行水解而释放 DAG (即二酰甘油),而 DAG 是公认的 PKC 活化因子,因此,在神经遭受有害刺激后,体内 PKC 能够通过多种途径被活化,而活性 PKC 能够导致 NMDAR 等钙调节蛋白发生磷酸化,从而导致脊髓可塑性转变,增加中枢敏感性。国内学者杨勇等^[9]铜鼓实验发现 PKC 阳性细胞主要分布于脊髓背角浅层,其能够参与中枢伤害信号传递,参与中枢敏感化机制。
右美托咪定作为临床常用的镇痛药物,其能够通过增强信号转导通路的背角神经元抑制作用、抑

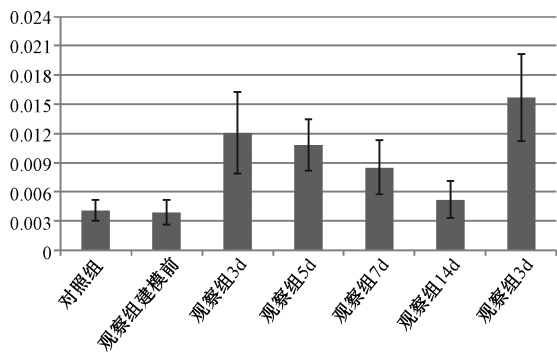


图2 各组 PKC mRNA 表达水平比较

Fig.2 Comparison of PKC mRNA expression levels in the 3 groups

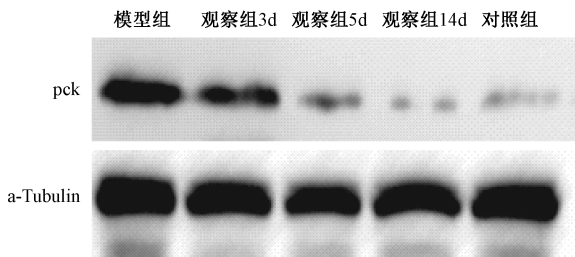


图3 各组 PKC 蛋白的 Western blot 检测结果

Fig.3 Western blotting results of PKC protein in the different groups

制钙内流、减少神经递质释放等发挥生物效应。国内实验发现右美托咪定能够抑制脊髓背角处神经元的凋亡程度,影响神经性疼痛的痛敏机制^[12]。但是目前关于 PKC 表达在慢性神经痛中的临床价值研究以及右美托咪定对于神经痛 PKC 影响的研究仍然十分少见,相关生物学机制更是存有较大空白。本实验中,在利用坐骨神经损伤法建立慢性神经痛模型后,通过对不同干预方法下,各组大鼠的行为学效应进行观察发现,模型组和观察组的运动功能评分、累积疼痛评分显著高于对照组,MWT 痛阈值、TWL 痛阈值结果均显著低于对照组,说明与对照组相比,慢性神经痛模型大鼠均出现中枢痛敏化效应,其已经形成痛觉超敏,进一步对比模型组和观察组数据显示,观察组行为学效应异常情况显著轻与模型组,说明右美托咪定对于痛敏效应形成能够产生一定的抑制作用。利用现代化研究技术对脊髓 PKC 进行检测,发现对照组仅有极少量 PKC 阳性细胞存在,其 PKC mRNA 相对表达量和 PKC 蛋白表达水平显著低于其他两组,说明在正常生理情况下,脊髓内 PKC 含量极低,但是当发生神经损伤后,脊髓内 PKC 含量显著升高,在脊髓背角处呈明

显的阳性表达,表明 PKC 不仅参与了神经损伤、疼痛信息的传递过程,而且可能参与痛敏形成过程,对疼痛敏感性具有重要影响。此外,本实验结果还显示,观察组 PKC 阳性表达强度、PKC mRNA、PKC 蛋白水平显著低于对照组,且上述指标的表达水平随着右美托咪定使用时间增加而降低,说明右美托咪定对于 PKC 形成具有显著的抑制作用,其可能通过抑制 PKC 释放发挥镇痛作用。PKC 在动物体内具有 12 种亚型,每种亚型的功能、结构也不尽相同,本实验虽然证实了 PKC 参与了慢性神经痛病理机制,但是尚未设计 PKC 不同亚型表达水平、作用效应的研究,且观察时间有限,对于右美托咪定对于慢性神经痛远期干预效果未进行分析总结,实验仍存在一定缺陷,需要进一步改进和深入研究。总而言之,PKC 参与了慢性神经痛痛敏形成过程,是对于慢性神经痛发病机制具有重要影响,右美托咪定作为常用镇痛药物,经鞘内注射给药能够减轻慢性神经痛痛敏程度,其镇痛机制可能为抑制脊髓背角 PKC 表达。

参考文献:

[1] Song H, Han Y, Pan C, et al. Activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses neuroinflammation and ameliorates bone cancer pain: Involvement of inhibition on mitogen-activated protein kinase [J]. Anesthesiology, 2015, 123(5): 1170 – 1185.

[2] Miletic G, Hermes JL, Bosscher GL, et al. Protein kinase Cγ-mediated phosphorylation of GluA1 in the postsynaptic density of spinal dorsal horn neurons accompanies neuropathic pain, and dephosphorylation by calcineurin is associated with prolonged analgesia [J]. Pain, 2015, 156(12): 2514 – 2520.

[3] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. Pain, 1988, 33(1): 87 – 107.

[4] 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-γ 表达的影响 [J]. 山东医药, 2013, 53(20): 39 – 42.

[5] 卢波, 黄姣琴, 雷卫平, 等. 导水管周围灰质注射 zeta 假底物抑制肽对大鼠疼痛感觉和疼痛情绪的影响 [J]. 中华医学杂志, 2015, 95(6): 444 – 448.

[6] Hwang JH, Yaksh TL. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat [J]. Pain, 1997, 70(1): 15 – 22.

[7] Sato KL, Johaneck LM, Sanada LS, et al. Spinal cord stimulation reduces mechanical hyperalgesia and glial cell activation in animals with neuropathic pain [J]. Anesth Analg, 2014, 118(2): 464 – 472.

miRNA-based diagnostics for non-cancerous and cancerous diseases[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014,2;61.

[8] Zeng X, Yin F, Liu X, *et al.* Upregulation of E2F transcription factor 3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2014,31(3):1139 – 1146.

[9] Calin G A, Cimmino A, Fabbri M, *et al.* MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008,105(13):5166 – 5171.

[10] Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. *Cell Prolif*, 2003,36(3):131 – 149.

[11] Wang P, Chen S, Fang H, *et al.* miR-214/199a/199a* cluster levels predict poor survival in hepatocellular carcinoma through interference with cell-cycle regulators[J]. *Oncotarget*, 2016,7

(1):929 – 945.

[12] Zhang L L, Guo Y J, Zhao C N, *et al.* Effects and mechanism of miR-214 on hepatocellular carcinoma[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2015,8(5):392 – 398.

[13] 刘浩, 尹华斌, 纪方. MicroRNA 与肿瘤的相关研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012,12(7):1388 – 1390.

[14] Cao T, Li H, Hu Y, *et al.* miR-144 suppresses the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting E2F3[J]. *Tumour Biol*, 2014,35(11):10759 – 10764.

[15] Yang Y, Chang S, Zhao Z, *et al.* MicroRNA-214 suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F3[J]. *Oncol Lett*, 2015,10(6):3779 – 3784.

[修回日期]2016 – 10 – 26

(上接第 11 页)

[8] Johnson RA. Voluntary running-wheel activity, arterial blood gases, and thermal antinociception in rats after 3 buprenorphine formulations [J]. *J Am Assoc Lab Animal Sci*,2016, 55(3): 306 – 311.

[9] 杨勇, 郭曲练, 邹望远, 等. 鞘内注射氯胺酮对甲醛炎性疼痛大鼠脊髓背角蛋白激酶 C 表达的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(3): 461 – 464.

[10] 闫美灵, 李京波. PKC 在心血管疾病中的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(9): 7 – 9.

[11] Li SS, Zhang WS, Yang JL, *et al.* Involvement of protein kinase B/Akt in analgesic effect of dexmedetomidine on neuropathic pain [J]. *Cns Neurosci Therap*, 2013, 19(5): 364 – 366.

[12] 王一涵, 冷玉芳, 李娟, 等. 右美托咪啶对慢性神经病理性痛大鼠脊髓背角神经元凋亡的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(3): 353 – 357.

[修回日期]2016 – 11 – 23