

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.34.005

鞘内注射右美托咪定对大鼠吗啡耐受及脊髓炎性反应的影响^{*}

巩红岩¹, 郑芳², 左志超¹, 刘景景¹, 王庆志³, 赵国安^{1△}

(1. 新乡医学院第一附属医院麻醉科, 河南新乡 453000; 2. 新乡医学院第一附属医院医学影像中心, 河南新乡 453000; 3. 新乡医学院基础医学院, 河南新乡 453000)

[摘要] **目的** 探讨鞘内注射右美托咪定对大鼠吗啡耐受及脊髓炎性反应的影响。**方法** 采用随机数字表法将 33 只体质量 180~200 g 雄性 SD 大鼠, 分为 3 组($n=11$): 对照组(NS 组)、吗啡组(M 组)、右美托咪定+吗啡组(Dex 组)。NS 组鞘内注射无菌生理盐水 10 μ L, 1 次/d, 共 7 d; M 组鞘内注射吗啡 15 μ g, 1 次/d, 共 7 d; Dex 组鞘内注射 15 μ g 吗啡和 1.5 μ g 右美托咪定, 1 次/天, 共 7 d。于吗啡鞘内注射第 1、3、5、7 天给药前和给药后 30 min 测定大鼠的热痛阈。Western blot 法检测脊髓中小胶质细胞标记物 Iba-1、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和磷酸化 p38MAPK(p-p38) 的蛋白表达水平。免疫组织化学法检测脊髓 Iba-1 阳性细胞密度。**结果** 随着吗啡鞘内注射次数增加, M 组和 Dex 组热水甩尾实验最大镇痛效应百分比(MPE)逐渐下降($P<0.05$)。与 NS 组比较, M 组甩尾实验 MPE 在吗啡注射的第 1、3、5、7 天较高($P<0.05$); 与 M 组比较, Dex 组甩尾实验 MPE 于吗啡注射的第 3、5、7 天较高($P<0.05$)。与 NS 组比较, M 组大鼠脊髓 Iba-1 阳性细胞密度及 Iba-1、IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$); 与 M 组比较, Dex 组大鼠脊髓 Iba-1 阳性细胞密度及 Iba-1、IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论** 鞘内注射右美托咪定可缓解吗啡耐受的形成, 其机制可能与抑制脊髓小胶质细胞介导的炎性反应相关。

[关键词] 右美托咪定; 吗啡; 药物耐受性; 小胶质细胞; 炎症

[中图法分类号] R641 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)34-4771-03

Effects of intrathecal administration of dexmedetomidine on morphine tolerance and inflammatory response in rats^{*}

Gong Hongyan¹, Zheng Fang², Zuo Zhichao¹, Liu Jingjing¹, Wang Qingzhi³, Zhao Guoan^{1△}

(1. Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China; 2. Medical Imaging Center, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China; 3. School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of intrathecal dexmedetomidine administration on the development of morphine tolerance and spinal inflammatory responses. **Methods** Thirty-three male SD rats weighing 180~200 g were randomly divided into 3 groups ($n=11$): Saline group (group NS), Morphine group (group M) and Dexmedetomidine group (group Dex). Animals of group NS were intrathecally injected with 10 μ L of saline daily for seven days; Animals in group M were intrathecally injected with 15 μ g of morphine daily for seven days; Animals in group Dex were intrathecally injected with a mixture of 15 μ g morphine and 1.5 μ g dexmedetomidine daily for seven days. At 1, 3, 5 and 7 day of intrathecal injection, hot water tail-flick test were used to evaluate analgesic response to thermal stimuli. After the last episode of behavioral test, Western blot analysis was applied to determine the protein levels of Iba-1 (microglial marker), IL-1 β , TNF- α and phospho-p38MAPK (p-p38) in the spinal cord. In addition, microglia in the spinal cord was immuno-stained with anti-Iba-1 antibody and the densities of microglia were calculated. **Results** In group M and Dex, the values of maximal possible effect (MPE) in tail-flick test decreased gradually along with repeated morphine administration ($P<0.05$). Compared with group NS, the values of MPE in tail-flick test at 1, 3, 5 and 7 day of morphine tolerance were higher in group M ($P<0.05$). Compared with group M, the values of MPE in tail-flick test at 3, 5 and 7 day of morphine tolerance were higher in group Dex ($P<0.05$). Compared with group NS, the spinal protein levels of Iba-1, IL-1 β , TNF- α and p-p38 as well as the density of Iba-1 positive cells in group M were increased ($P<0.05$). However, Compared with group M, the of Iba-1, IL-1 β , TNF- α and p-p38 as well as the density of Iba-1 positive cells were decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Intrathecal dexmedetomidine administration can attenuate morphine tolerance by inhibiting microglia-mediated inflammatory responses in the spinal cord.

[Key words] dexmedetomidine; morphine; drug tolerance; drug tolerance; inflammatory

吗啡在神经病理性痛和晚期癌痛等慢性疼痛的治疗中应用广泛, 但长期反复使用可诱发药物耐受现象^[1-2]。最近的研究表明, 吗啡耐受的形成机制可能与脊髓小胶质细胞激活相关^[1-3]。激活的小胶质细胞可诱发促炎因子的释放, 干扰脊髓神经元的正常功能甚至导致神经元凋亡。而右美托咪定是临床上广泛应用的镇静药物。动物实验表明, 右美托咪定可抑制

脊髓损伤诱发的小胶质细胞激活和炎症因子释放^[4-5]。因此, 本实验拟探讨鞘内注射右美托咪定对吗啡耐受形成及脊髓炎性反应的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料和设备 右美托咪定(批号 90619DK, Abbott 公司, 美国), 吗啡(批号 070901, 沈阳第一制药厂), BCA 试剂

^{*} 基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(201204026)。 作者简介: 巩红岩(1980—), 副主任医师, 硕士, 主要从事临床麻醉学研究。

[△] 通信作者, E-mail: 13462371221@163.com。

盒(批号 AR1110,武汉博士德生物工程有限公司),抗小胶质细胞标记物 Iba-1 抗体(批号 016-20001,Wako 公司,日本),磷酸化 p38MAPK(p-p38)抗体(批号 ab178867,Abcam 公司,美国),肿瘤坏死因子 α (TNF- α)抗体(批号 ab6671,Abcam 公司,美国),白细胞介素 1 β (IL-1 β)抗体(批号 sc-7884,Santa Cruz 公司,美国), β -actin 抗体(批号 BM0627,武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 实验分组 33 只体质量 180~200 g 雄性 SD 大鼠,购自新乡医学院实验动物中心。采用随机数字表法,分为 3 组($n=11$):对照组(NS 组)、吗啡组(M 组)、右美托咪定+吗啡组(Dex 组)。NS 组鞘内注射无菌生理盐水 10 μ L,1 次/d,共 7 d;M 组鞘内注射吗啡 15 μ g(溶于生理盐水),1 次/d,共 7 d,以建立吗啡耐受模型^[6];Dex 组鞘内注射 15 μ g 吗啡和 1.5 μ g 右美托咪定^[7],1 次/d,共 7 d。于吗啡鞘内注射第 1、3、5、7 天给药前和给药后 30 min 行痛阈测定。

1.3 鞘内置管 参照文献[4-5],于吗啡注射前行鞘内置管术。腹腔注射戊巴比妥钠 30 mg/kg,于正中线 L₄₋₅ 间隙处切开皮肤,分离周围软组织,经椎间隙轻轻刺破硬脊膜及蛛网膜,可见清亮的脑脊液流出,之后将 PE-10 导管置入约 8 cm。置管后仔细固定导管并缝合伤口。鞘内试验性注射 1%利多卡因 20 μ L(利多卡因实验),如 30 s 后大鼠出现双后肢瘫软,则表明鞘内置管成功。利多卡因实验阴性或术后出现四肢瘫痪、单侧肢体瘫痪者则不纳入后续实验。

1.4 痛阈测定 参照文献[2-3,8],分别采用热水甩尾实验测量热痛阈。热痛阈测定:将大鼠尾末端 1/3 浸入 50 $^{\circ}$ C 热水中,记录鼠尾浸入水中至出现甩尾反应的时间。为避免鼠尾损伤,限定浸入时间不超过 10 s,如浸入时间达到 15 s 仍不出现甩尾反应,记为 15 s。给药前和给药后 30 min 各进行 3 次甩尾实验,每次间隔 5 min,取平均值作为最终的热痛阈值。计算最大镇痛效应百分比(MPE), $MPE=(\text{给药后热痛阈}-\text{基础热痛阈})/(\text{10.0}-\text{基础热痛阈})\times 100\%$ 。

1.5 Western blot 检测 最后一次痛阈测定后,每组取 6 只大鼠,使用过量的戊巴比妥钠(80 mg/kg)处死,取出 L₄₋₆ 节段的脊髓,采用蛋白提取试剂盒提取脊髓蛋白,并使用 BCA 试剂盒测定样本蛋白浓度。蛋白采用聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至 0.45 μ m 孔径的聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%的脱脂牛奶中室温封闭 1 h 后,加入 β -actin 抗体(1:500)、Iba-1 抗体(1:1 000)、TNF- α 抗体(1:1 000)、磷酸化 p38MAPK 抗体(1:500)或 IL-1 β 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,洗膜后 ECL 显影曝光,采用 Image Lab3.0 软件进行灰度分析。蛋白表达水平以目标蛋白灰度值/ β -actin 蛋白灰度值表示。

1.6 免疫荧光检测 每组取 5 只大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉下,打开胸腔经升主动脉灌注预冷的 4%多聚甲醛 250 mL。取出脊髓 L₄₋₆ 节段,经后固定和蔗糖脱水后制成冰冻切片。经 0.3% TritonX-100 破膜和正常山羊血清室温封闭后,加入抗 Iba-1 抗体(1:600)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,PBS 漂洗后避光加入 Cy3 标记的荧光二抗(1:300)室温孵育 2 h。之后使用 PBS 洗去残余二抗,加入 4',6-二脒基-2-苯基吡啶,其中总细胞数由 DAPI 行核染色,甘油封片后于免疫荧光显微镜下观察技术。Iba-1 阳性细胞密度=Iba-1 阳性细胞数/总细胞数(DAPI)。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,计量资料组间比较采用单因素方差

分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

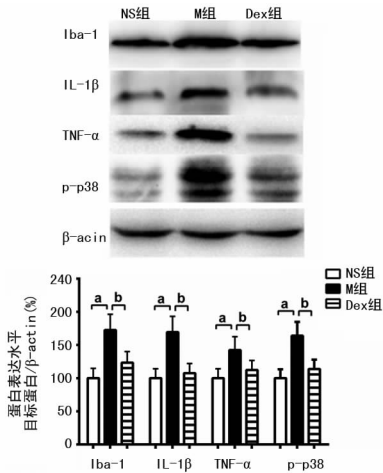
随着吗啡鞘内注射次数增加,M 组和 Dex 组甩尾实验 MPE 逐渐下降($P<0.05$)。与 NS 组比较,M 组甩尾实验 MPE 在注射吗啡的第 1、3、5、7 天较高($P<0.05$);与 M 组比较,Dex 组甩尾实验 MPE 于注射吗啡的第 3、5、7 天均较高($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组不同时间点甩尾实验 MPE 结果($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	1 d	3 d	5 d	7 d
NS 组	11	3.5 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.9
M 组	11	92.6 $\pm$ 7.2 ^a	70.6 $\pm$ 7.2 ^a	48.4 $\pm$ 5.2 ^a	25.8 $\pm$ 3.1 ^a
Dex 组	11	93.6 $\pm$ 8.1	84.5 $\pm$ 5.8 ^b	68.4 $\pm$ 5.3 ^b	56.5 $\pm$ 6.7 ^b

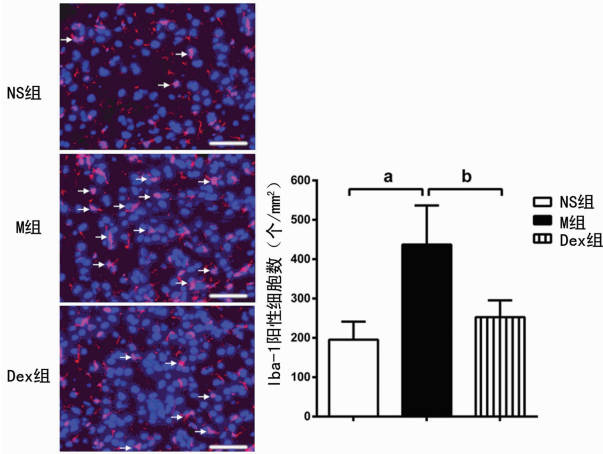
^a: $P<0.05$,与 NS 组比较;^b: $P<0.05$,与 M 组比较

与 NS 组比较,M 组大鼠脊髓 Iba-1、IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),Iba-1 阳性细胞密度也显著增多($P<0.05$);与 M 组比较,Dex 组大鼠脊髓 Iba-1、IL-1 β 、TNF- α 和 p-p38 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),Iba-1 阳性细胞密度明显降低($P<0.05$),见表 2,图 1、2。



^a: $P<0.05$,与 NS 组比较;^b: $P<0.05$,与 M 组比较

图 1 3 组大鼠脊髓 Iba-1、IL-1 β 、TNF- α 和 P-p38 蛋白表达水平检测结果($\bar{x}\pm s, \%$)



白色箭头为 Iba-1(小胶质细胞标记物)阳性细胞(红色荧光);^a: $P<0.05$,与 NS 组比较;^b: $P<0.05$,与 M 组比较

图 2 3 组大鼠脊髓 Iba-1 阳性细胞密度的比较 ($n=5, \bar{x}\pm s, \text{个}/\text{mm}^2$)

表 2 3 组大鼠脊髓 Iba-1、IL-1β、TNF-α 和 p-p38 蛋白表达水平的比较(̄x±s)

组别	Iba-1(ng/L)	IL-1β(ng/L)	TNF-α(ng/L)	p-p38(ng/L)	Iba-1 阳性细胞密度(个/mm²,n=5)
NS 组	100.0±14.8	100.0±14.2	100.0±14.3	100.0±13.4	195.3±46.0
M 组	172.7±23.7 ^a	169.4±23.8 ^a	142.3±20.4 ^a	164.1±20.7 ^a	437.2±99.3 ^a
Dex 组	123.5±16.5 ^b	107.5±14.7 ^b	112.3±14.5 ^b	113.9±14.1 ^b	212.6±42.8 ^b

^a:P<0.05,与 NS 组比较;^b:P<0.05,与 M 组比较

3 讨 论

本实验研究结果表明,鞘内注射右美托咪定可减轻连续注射吗啡诱发的脊髓小胶质细胞增多和炎症因子产生,继而缓解大鼠吗啡耐受。

参照文献[2-3,8-9],本研究采用鞘内连续 7 d 注射吗啡 15 μg 的方法建立大鼠吗啡耐受模型。本实验行为学结果显示,吗啡注射 7 d 内大鼠甩尾实验 MPE 均逐渐下降,提示大鼠吗啡耐受模型建立成功。而与单纯吗啡注射组(M 组)比较,鞘内注射右美托咪定 1.5 μg (1 次/天,共 7 d)减轻了连续注射吗啡所造成的甩尾实验 MPE 下降,说明鞘内注射右美托咪定可缓解吗啡耐受的形

成。研究表明,吗啡耐受的形

成机制可能与阿片类受体脱敏^[9]、谷氨酸受体或转运体功能障碍^[10]相关。而近期研究表明脊髓小胶质细胞的过度激活可能在吗啡耐受形成中发挥关键作用^[1,3]。而右美托咪定是临床上常用的镇静药物,临床研究表明椎管内注射右美托咪定可减少椎管内局部麻醉药物的用量并增加镇痛效果^[1,3]。同时,动物研究显示,右美托咪定可通过减少小胶质细胞过度激活缓解神经元凋亡^[4]。而本研究表明,鞘内注射右美托咪定,可在缓解吗啡耐受的形成的同时,还可显著减少吗啡诱发的脊髓小胶质细胞标记物 Iba-1 的过度表达和小胶质细胞密度增加,说明右美托咪定缓解吗啡耐受的效果可能与其特异性抑制小胶质细胞的激活相关。

小胶质细胞可通过细胞特异性的 p-p38 信号通路激活^[1,3],分泌促炎因子(如 IL-1β^[1,3]、TNF-α^[11]),干扰脊髓神经元的正常功能,从而参与介导吗啡耐受的形

成。而已有研究表明,右美托咪定抑制脊髓损伤模型中小胶质细胞介导的促炎因子释放^[5]。本研究结果与之一致,鞘内注射右美托咪定可减少吗啡连续注射介导的脊髓促炎因子释放,并抑制 p-p38 信号通路的激活。这提示,右美托咪定可能通过缓解吗啡诱导的小胶质细胞 p-p38 信号通路激活,减少促炎因子的释放,继而缓解吗啡耐受的形

成。

综上所述,鞘内注射右美托咪定可缓解吗啡耐受的形

成,其机制可能与抑制脊髓小胶质细胞介导的炎性反应相关。

参考文献

[1] Cui Y,Liao XX,Liu W,et al. A novel role of minocycline: attenuating morphine antinociceptive tolerance by inhibition of p38 MAPK in the activated spinal microglia[J]. Brain Behav Immun,2008,22(1):114-123.

[2] Zhou D,Chen ML,Zhang YQ,et al. Involvement of spinal microglial P2X7 receptor in generation of tolerance to

morphine analgesia in rats[J]. J Neurosci,2010,30(23): 8042-8047.

[3] Cui Y,Chen Y,Zhi JL,et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia mediates morphine antinociceptive tolerance[J]. Brain Res,2006,1069(1):235-243.

[4] Brissaud O,Lebon S,Schwendimann L,et al. Neuroprotective effects of dexmedetomidine against glutamate agonist-induced neuronal cell death are related to increased astrocyte brain-derived neurotrophic factor expression[J]. Anesthesiology,2013,118(5):1123.

[5] Can M,Gul S,Bektas S,et al. Effects of dexmedetomidine or methylprednisolone on inflammatory responses in spinal cord injury[J]. Acta Anaesthesiol Scand,2009,53(8): 1068-1072.

[6] Wang Z, Ma W, Chabot JG, et al. Calcitonin gene-related peptide as a regulator of neuronal CaMK II -CREB, microglial p38-NFκB and astroglial ERK-Stat1/3 cascades mediating the development of tolerance to morphine-induced analgesia[J]. Pain,2010,151(1):194-205.

[7] Brummett CM,Hong EK,Janda AM,et al. Perineural dexmedetomidine added to ropivacaine for sciatic nerve block in rats prolongs the duration of analgesia by blocking the hyperpolarization-activated cation current[J]. Anesthesiology,2011,115(4):836-843.

[8] 江伟,刘金变,严海. 吗啡耐受大鼠脊髓 NR2B 与 mGluR5 的相互作用[J]. 中华麻醉学杂志,2009,29(2): 136-139.

[9] Lene M,Whistler L. The role of muopioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence[J]. Curr Opin Neurobiol,2007,17(5):556-564

[10] Tai Y, Wang Y, Tsai R, et al. Amitriptyline preserves morphine's antinociceptive effect by regulating the glutamate transporter GLAST and GLT-1 trafficking and excitatory amino acids concentration in morphine-tolerant rats[J]. Pain,2007,129(3):343-354.

[11] Shen C, Tsai R, Wong C. Role of neuroinflammation in morphine tolerance;Effect of tumor necrosis factor-α[J]. Acta Anaesthesiol Taiwan,2012,50(4):178-182.