

[文章编号] 1000-4718(2008)04-0802-03

· 短篇论著 ·

蛋白激酶 C 在大鼠甲醛内脏炎症痛过程中作用的行为学观察

张颜波¹, 周卫华², 高翠英³, 巩克瑞³, 吕国蔚³

(¹ 泰山医学院附属医院神经内科, 山东 泰山 271000; ² 吉首大学医学院, 湖南 吉首 416000; ³ 首都医科大学神经生物学系, 北京 100054)

[摘要] 目的: 本实验用甲醛复制的内脏炎症痛模型, 经腹腔注射给予蛋白激酶 C 抑制剂氯丙嗪 (CP), 通过行为学方法观察其在内脏炎症痛中的作用。方法: 实验选用成年健康 Wistar 大鼠, 随机分 3 组: 单纯甲醛直肠致炎组 (F); 腹腔内注射生理盐水组 (F + NaCl); 腹腔内注射 CP 组 (F + CP)。记录 3 组大鼠的疼痛行为反应, 致痛后以 15 min 为 1 个时间段, 共记录 8 个时段, 计 2 h, 分别计算疼痛分数。结果: F + NaCl 组与 F 组相比无显著差异 ($P > 0.05$); F + CP 组与 F 组相比在前 90 min 内有显著差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 蛋白激酶 C 可能在甲醛致内脏炎症痛感受中起重要作用。

[关键词] 大鼠; 蛋白激酶 C; 甲醛; 内脏; 疼痛

[KEY WORDS] Rats; Protein C; Formaldehyde; Viscera; Pain

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

内脏痛是临床上常见的 1 种复杂的病理生理现象, 具有急性、慢性和复发性多种表现形式, 其所产生的社会负担甚至超过躯体疼痛。其定位不清晰, 描述欠清晰, 给临床内脏痛的诊断及治疗带来很大困难。所以内脏痛发生、发展机制的研究正日益受到重视, 对内脏痛的信号转导方面的探索显得尤为重要^[1]。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是 1 类可使底物蛋白内丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化的蛋白激酶超家族, 其作为 1 种信号转导蛋白是目前痛觉研究热点之一^[2]。但迄今为止, PKC 在内脏痛觉传递和调制中的作用国内、外鲜有报道。所以本实验在用甲醛复制的内脏炎症痛模型^[3]上, 经腹腔注射给予 PKC 抑制剂 CP, 用行为学的方法观察其对内脏炎症痛反应的影响。

材 料 和 方 法

1 实验动物

实验选用成年健康 Wistar 大鼠 24 只, 体重 200 - 250 g, 雌雄不拘 (由首都医科大学动物科学部提供)。

2 试剂与材料

氯丙嗪 (CP, 天津药业集团有限公司), 甲醛 (formalin, 北京西中化工厂), 生理盐水 (0.9% NaCl, 北京双鹤药业股份有限公司), 有机玻璃行为学观察箱 (首都医科大学神经生物研究室制)。

3 方法

3.1 实验分组 实验随机分如下 3 组: 单纯甲醛直肠致炎组 (F); 甲醛直肠致炎、腹腔内注射生理盐水组 (F + NaCl); 甲

直肠致炎、腹腔内注射 CP 组 (F + CP)。

3.2 甲醛直肠内致炎及行为观察 成年 Wistar 大鼠, 在室温 18 - 20 °C, 隔绝噪音条件下, 乙醚持续麻醉, 用 37 °C 温热蒸馏水灌肠, 然后经肛门插入特制的直肠窥器, 在目视条件下, 距肛门约 35 mm 处用针长 8 cm 的 1 mL 注射器于直肠黏膜下注射 100 μL 5% 的甲醛。注射完毕后缓缓退出直肠窥器, 撤去乙醚麻醉, 将大鼠置于 30 cm × 30 cm × 30 cm 大小的透明有机玻璃行为学观察箱中观察。3 - 5 min 大鼠恢复清醒状态后, 开始记录大鼠各种行为反应的次数, 每 15 min 为 1 个时段, 共记录 2 h, 8 个时段。

3.3 腹腔内给药 本实验中 F + NaCl、F + CP 2 组, 分别在甲醛直肠致炎前 30 min 经腹腔分别注射生理盐水 (0.4 mL/kg) 或 25 g/L 氯丙嗪 (0.4 mL/kg)。

4 内脏痛行为指标及评分办法

采用 Marcol (1994) 所用的一系列能够反映内脏痛强度的行为指标, 按照疼痛由低到高的顺序分别是 (1) 腹部舔食和轻咬 (L); (2) 伸展身体, 特别是后肢向后伸展 (B); (3) 腹部收缩、侧扭, 有时身体发展成伸展姿势 (C); (4) 全身收缩, 后背扭曲站立, 并通常伴腹部痉挛 (W)。根据此疼痛程度依次评分为: L 为 1 分; B 为 2 分; C 为 3 分; W 为 4 分, 每 15 min 进行 1 次疼痛计分 (S), 其公式是 $S = 1L + 2B + 3C + 4W$, 其中, L、B、C、W 分别代表 15 min 内记录到的各种行为反应的次数^[3]。

5 统计学处理

3 个实验组均以 15 min 为 1 时段共 8 个时段分别记录疼痛反应。实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。每个时段

[收稿日期] 2006-09-13 [修回日期] 2006-12-31

Tel: 0538-6237428; E-mail: clark4846@sina.com

内的 3 组疼痛分数差异用 SPSS 12.0 软件包中的单因素方差分析(ANOVA)处理。

结 果

直肠黏膜下注射甲醛致炎后,在乙醚麻醉恢复后大鼠立即会出现内脏疼痛的行为反应,前 60 min 内行为表现主要以 W、C、B 反应为主;而在后 60 min 内主要以 L 反应为主,4 种

疼痛反应见图 1。分别对 3 个实验组 8 个时段内大鼠疼痛分数进行统计计算,3 个实验组大鼠在注射甲醛后 30 min 均达到疼痛评分的最大值,从注射甲醛后 45 min 至 120 min 内,疼痛评分逐渐降低。F + NaCl 组 F 组相比无显著差异 ($P > 0.05$);F + CP 组与 F 组相比,在致炎后 90 min 内有显著差异 ($P < 0.01$),结果见表 1。

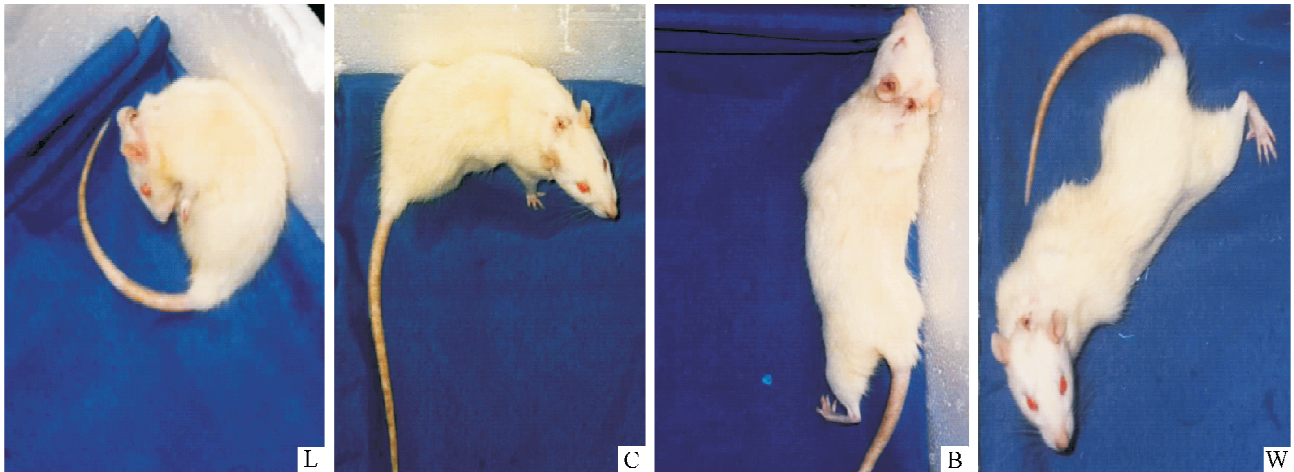


Fig 1 Four formalin - induced painful behaviors. L: abdominal licking and nibbling; C: contraction of the flanks, sometimes evolving to a stretching attitude; B: body stretching, ie, backward extension of the hind limbs; W: whole body contraction, rat standing with its back curved, occasionally with spasms running along the flanks.

图 1 4 种内脏痛行为反应

表 1 3 组各时段疼痛分数比较

Tab 1 Comparison of pain scores at different time points of three groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Pain scores							
	15 min	30 min	45 min	60 min	75 min	90 min	105 min	120 min
F	58.56 ± 6.99	88.84 ± 8.63	37.50 ± 5.01	14.83 ± 3.99	8.84 ± 1.92	7.17 ± 1.55	3.67 ± 1.01	4.32 ± 1.21
F + NaCl	62.77 ± 7.85	84.17 ± 8.06	34.33 ± 4.88	12.84 ± 3.02	7.56 ± 1.61	6.01 ± 1.33	4.03 ± 1.16	3.56 ± 0.88
F + CP	40.83 ± 5.68 **	63.33 ± 7.96 **	21.00 ± 4.12 **	4.67 ± 1.13 *	2.17 ± 0.70 **	1.36 ± 0.43 **	2.12 ± 0.78	2.87 ± 0.89

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group F.

讨 论

与躯体感觉的研究相比,对内脏感觉中枢表达的研究还处于初级阶段,尽管与躯体感觉表达有一定的相似性,但 2 者毕竟是不同的。本实验应用的是直肠黏膜下注射甲醛复制的内脏炎症痛模型,此模型比较符合临床上常见的由体内致痛物质积聚产生的疼痛。所以研究 PKC 在内脏痛觉中枢传导中的作用具有非常重要的理论和应用意义。我们的实验和以往工作表明,直肠黏膜下注射甲醛可以复制急性内脏炎症痛模型^[3]。

本实验结果发现,对疼痛分数测试的 2 h 内,与 F 相比,F + NaCl 组 8 个时段内的疼痛分数均无显著差异 ($P > 0.05$),说明腹腔内注射对痛反应的评判无任何影响,并且腹腔内注射氯丙嗪的方法比较稳定,药物吸收好,是 1 种准确可行的实验室给药方法。CP 是吩噻嗪类化合物,不但阻断多巴胺受体、肾上腺素 α 受体和 M 胆碱受体,还是 PKC 的非特异性抑

制剂,其血药浓度在 2 - 4 h 时达到高峰。本文应用 CP 主要作为实验的 1 种药物干预措施,进而观察 PKC 在内脏炎症痛中的镇痛作用。在腹腔内注射给予 CP 则显著减轻内脏痛反应,这与 Coderre^[4]在急性体表炎症模型中的实验结果一致,提示 PKC 在甲醛致急性内脏炎症引起痛觉感受增强中起着重要作用。其作用机制可能是,甲醛刺激直肠壁引起的伤害性传入可提高 C 纤维的放电频率,进而使脊髓背角兴奋性氨基酸递质释放量增加,其作用于突触后膜的离子型兴奋性氨基酸受体 (ionotropic N - methyl - D - aspartate receptor, iNMDAR) 和代谢型兴奋性氨基酸受体,导致细胞内 Ca^{2+} 、二酰基甘油 (DAG) 增加,从而激活了包括 PKC 在内的痛觉敏感化通路^[4]。PKC 可能通过磷酸化 γ - 氨基丁酸受体通道而抑制短暂和持续的抑制性 Cl^- 电流和直接磷酸化 NMDA 受体,清除了 Mg^{2+} 对 NMDA 受体通道的阻断作用,使 NMDA 受体通道在低电位的条件下开放并增加通道的离子流量^[5,6]。

(下转第 811 页)

表3 心肌梗死后各组牵张所致心律失常的情况

Tab 3 Stretch induced arrhythmias in different groups

Group	SIA	Normal beats
Sham model	84	728
Control	182 ^{△△}	629
Metoprolol	73 ^{***}	737
Carvedilol	60 ^{△△**}	752

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs sham model group; ^{***} $P < 0.01$ vs control group.

讨 论

肾上腺素能受体介导的儿茶酚胺效应,在心血管功能调节中起着最为重要的作用^[3]。有研究表明 MI 后 12 周大鼠梗死区心肌组织 β_1 受体密度选择性下调, β_2 受体无明显变化^[1],本研究结果与之相符。美托洛尔使 β_1 受体 mRNA 表达水平明显升高,而 β_2 受体所占比例仍升高。卡维地洛也使 β_1 受体 mRNA 表达水平明显升高,但 β_2 受体所占比例下降。这些变化考虑是由于卡维地洛对交感神经系统的过度激活产生全面的阻断作用有关。

本研究发现,MI 后 MAPD、MAPD₅₀ 及 MAPD₉₀ 均有所延长。这是由于 MI 后 8 周,缺血引起的 I_{Ca-L} 的下降逐渐恢复,但钾通道活性的降低,可导致 APD 延长^[4];而 Ito 电流密度下降或电流缺失,导致动作电位平台期延长,梗死区 Ik1 电流密度下降,可导致心肌细胞复极终末相延长^[5]。应用美托洛尔和卡维地洛后,MAPD₅₀ 与 MAPD₉₀ 缩短,与 MI 后 β 受体 mRNA 表达水平变化一致,考虑与其阻断了交感神经过度激活、逆转 MI 后神经重构有关^[6]。

实验发现,用球囊短时间充盈离体大鼠心脏,伴随左心室前负荷显著增加,其心外膜 MAPD₅₀ 和 MAPD₉₀ 缩短,提示可能发生了 MEF。应用美托洛尔、卡维地洛后,各组 MAPD、MAPD₅₀ 和 MAPD₉₀ 变化与 β_2 受体所占比例的变化一致,考虑与卡维地洛的 β_2 受体阻断作用有关。临床研究表^[7],非选择性 β 受体拮抗剂比选择性 β_1 受体拮抗剂能更好地降低 VA 的发生率,估计 β_2 受体在病理情况下 VA 的发生中起到重要作用。由于 MI 后 β_2 受体在 β 受体中所占比例升高,

提示 MI 后交感神经激动对 β_2 受体的依赖程度可能明显增加。

本研究结果提示, β_2 受体可能参与到 MEF 过程中,尤其在 MI 后,这一作用可能更加明显。机械刺激或负荷的增加通过 β 受体途径调整心脏的功能,独立于血流动力学和神经内分泌因素的影响。

[参 考 文 献]

- [1] Anthonio RL, Brodde OE, van Veldhuisen DJ, et al. Beta - adrenoceptor density in chronic infarcted myocardium; a subtype specific decrease of beta1 - adrenoceptor density[J]. Int J Cardiol, 2000,72(2):137 - 141.
- [2] Dincer UD, Bidasee KR, Güner A, et al. The effect of diabetes on expression of β_1 - , β_2 - and β_3 - adrenoreceptors in rat hearts[J]. Diabetes, 2001,50(2):455 - 461.
- [3] 邓亚军,伍 卫,黄至斌,等.心力衰竭大鼠 β_3 - 肾上腺素能受体兴奋对室颤阈值和心室有效不应期的影响[J].中国病理生理杂志,2007,23(5):848 - 852.
- [4] 丁 超,何振山,齐书英,等.兔急性心肌梗死后心室肌细胞 L - 钙离子通道电流的变化[J].心脏杂志,2003,15(2):109 - 112.
- [5] Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri Z, et al. Relationship between K^+ channel down - regulation and $[Ca^{2+}]_i$ in rat ventricular myocytes following myocardial infarction[J]. J Physiol,1999,517(Pt1):229 - 245.
- [6] 喜 杨,曲秀芬,于彦伟,等.心肌梗死后交感神经的重构现象[J].中华心律失常学杂志,2004,8(3):177 - 180.
- [7] Billman GE, Castillo LC, Hensley J, et al. Beta2 - adrenergic receptor antagonists protect against ventricular fibrillation; *in vivo* and *in vitro* evidence for enhanced sensitivity to beta2 - adrenergic stimulation in animals susceptible to sudden death[J]. Circulation, 1997,96(6):1914 - 1922.

(上接第 803 页)

[参 考 文 献]

- [1] 荣培晶,张建梁,张宏启.内脏痛觉的病理生理研究进展[J].中国病理生理杂志,2004,20(2):475 - 480.
- [2] 杨红卫,张红梅,胡晓东,等. PKC 在成年大鼠脊髓背角 C - 纤维诱发电位长时程增强的诱导和维持中的作用[J].中国病理生理杂志,2005,21(2):252 - 255.
- [3] Miampamba M, Chery - croze S, Gorry F. Inflammation of the colonic wall induced by formalin as a model of acute visceral pain[J]. Pain, 1994,57(3):327 - 334.
- [4] Coderre TJ. Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury[J]. Neurosci Lett, 1992, 140(2):181 - 184.
- [5] Leidenheimer NJ, McQuilkin SJ, Hahner LD, et al. Activation of protein kinase C selectively inhibits the gamma - aminobutyric acid A receptor; role of desensitization[J]. Mol Pharmacol, 1992, 41(6):1116 - 1123.
- [6] Zheng X, Zhang L, Wang AP, et al. Ca^{2+} influx amplifies protein kinase C potentiation of recombinant NMDA receptors[J]. J Neurosci, 1997, 17(22):8676 - 8686.