

阿替美唑对小型猪特异性麻醉剂诱导大鼠 大脑皮质内 Fos 蛋白表达的影响

尹柏双^{1,2}, 石星星¹, 李小波¹, 李志强¹, 范宏刚¹, 高利¹, 王洪斌^{1*}

(1. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; 2. 吉林农业科技学院动物医学院, 吉林 132101)

摘要: 研究阿替美唑对小型猪特异性麻醉剂(XFM)麻醉下大鼠大脑皮质 Fos 蛋白表达的影响, 探讨阿替美唑颞颥 XFM 催醒大鼠与大脑皮质 *c-fos* 基因的关系。将 72 只 SD 纯种大鼠随机分为 XFM 对照组、XFM+阿替美唑组、XFM+生理盐水组, 每组又按采脑时间点分成 4 个亚组。采用蛋白质印迹法检测大脑皮质内 Fos 蛋白表达量。结果表明: XFM 麻醉大鼠大脑皮质内 Fos 蛋白表达量逐渐增加, 与给药后 10 min 比较差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); XFM 麻醉大鼠腹腔注射生理盐水, 各时间点 Fos 蛋白表达量与对照组间比较无显著差异($P > 0.05$); 阿替美唑注射后引起 XFM 麻醉大鼠大脑皮质 Fos 蛋白表达量减少, 与 XFM 对照组比较差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结果提示, 大脑皮质 *c-fos* 基因参与了阿替美唑颞颥 XFM 麻醉作用。阿替美唑抑制 XFM 诱导大鼠大脑皮质 Fos 蛋白表达, 可能是阿替美唑催醒 XFM 麻醉大鼠的重要机理之一。

关键词: 阿替美唑; 小型猪特异性麻醉剂; *c-fos* 基因; 蛋白质印迹

中图分类号: S859.791

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)05-0821-05

Effect of Atipamezole on the Expression of Fos Protein Induced by Specificity Anesthetic for Miniature Pigs in the Rat Cerebral Cortex

YIN Bai-shuang^{1,2}, SHI Xing-xing¹, LI Xiao-bo¹, LI Zhi-qiang¹,
FAN Hong-gang¹, GAO Li¹, WANG Hong-bin^{1*}

(1. College of Animal Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Department of Animal Medicine, Jilin Agriculture Science and Technology College, Jilin 132101, China)

Abstract: The research was conducted to investigate relationship atipamezole woke up rat anesthetized by XFM to *c-fos* oncogene, by study on effect of atipamezole on the expression of Fos protein induced by XFM in the rat cerebral cortex. 72 SD rats were divided randomly into XFM group, XFM add atipamezole group, XFM add saline group. The content of *c-fos* protein in cerebral cortex was measured by western blot. The Fos protein contents were obviously increased in the XFM anesthesia group as compared with 10 min after XFM administrated ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The Fos protein contents was never obviously changed after saline administrated as compared with control group ($P > 0.05$). The Fos protein contents was significantly decreased after atipamezole administrated as compared with control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). These results indicated that atipamezole palinesthesia action was concerned with *c-fos* oncogene in cerebral cortex. Atipamezole attenuates expression of Fos protein induced by XFM in the rat cerebral cortex, it may be an important mechanism of atipamezole wake up rat anaesthetized by XFM.

收稿日期: 2011-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671552; 30972227)

作者简介: 尹柏双(1978-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 讲师, 博士生, 主要从事于动物外科疾病及动物麻醉方向的教学与研究工作, E-mail: ybs3421@126.com

* 通讯作者: 王洪斌, E-mail: hbwang@neau.edu.cn

Key words: atipamezole; XFM; *c-fos* oncogene; Western blot

c-fos 基因是一种即刻早期原癌基因,其表达的 FOS 蛋白作为第三信使与 JUN 蛋白结合后回到核内调节其它靶基因转录,将外界信号和基因的表型改变偶联,参与许多生理、病理活动的调节^[1]。中枢部位 *c-fos* 基因的表达作为药物作用位点已被广泛研究,其中麻醉剂对中枢脑区 *c-fos* 表达影响已经是麻醉剂引起麻醉机制的研究热点。近来研究发现硫喷妥钠^[2]、氧氟烷^[3]、异丙酚^[4]、氯胺酮^[5]、替来他明^[6]等麻醉剂对大鼠脑区 *c-fos* 表达影响显著。

阿替美唑是一种高效性、特异性、专一性强的 α_2 -肾上腺素能受体拮抗剂。研究表明,阿替美唑对 α_2 -肾上腺素能受体亲和性是苯恶唑和育亨宾的 100 倍,对 α_2/α_1 受体的选择比率是苯恶唑和育亨宾的 200 倍^[7]。阿替美唑可使去甲肾上腺素释放增加,引起 α_2 -肾上腺素能受体阻断,人类医学上将其用于治疗精神错乱状的帕金森病人^[8]。阿替美唑也可增强活体鼠下丘脑释放去甲肾上腺素,影响组织胺释放,兴奋去甲肾上腺素系统提高鼠认知和记忆能力^[9]。

阿替美唑在兽医临床中被广泛应用于催醒 α_2 -肾上腺素能受体激动剂麻醉的猫、老虎等多种动物^[10-11]。本实验室将阿替美唑作为主要成分研制合成了小型猪麻醉剂(XFM)的特异性拮抗剂,临床试验结果表明研制的拮抗剂对 XFM 麻醉小型猪及大鼠催醒效果显著,对麻醉动物心、脑、血液生理指标无不良影响^[12-14],但阿替美唑对 XFM 麻醉催醒机理未见报道。本试验利用蛋白质印迹(Western blot)方法研究阿替美唑对大鼠大脑皮质 *c-fos* 基因表达的影响,探讨阿替美唑对 XFM 催醒的部分机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

阿替美唑购于美国辉瑞动物保健公司;替来他明-唑拉西洋购自法国维克公司;隆朋原粉由高利教授惠赠。一抗为兔抗 *c-fos* IgG(货号:SC-52),兔抗 β -actin IgG(货号:TA-09),二抗为辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG(货号:ZB-2305)均购于美国 Santa 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010S),BeyoECL 发光试剂盒(货号:P0018),RIPA 裂解(货号:P0013E)购于碧云天生物技术研究;PVDF

膜购于 Sigma 公司。蛋白质电泳及转印仪(Bio-Rad,美国);凝胶成像分析仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 实验动物及分组

SD 纯种大鼠,72 只,雌雄兼备,体质量(220±20) g,12~15 周,购自黑龙江省哈尔滨市汉方实验鼠类养殖所。随机分为 XFM 对照组、XFM+阿替美唑组、XFM+生理盐水组,每组 24 只。每组大鼠按采样时间点被随机分成 4 个亚组,每个亚组 6 只。实验动物在室温为(20±2) °C 的环境中饲养 2 周。每天日照 12 h(07:00-19:00),自由进食和饮水。试验前将大鼠安置在安静、避强光的环境中饲养 24 h 以上。XFM 对照组大鼠分别腹腔注射 XFM(34.62 mg·kg⁻¹),在给药翻正反射(XFM 麻醉 SD 大鼠平均出现翻正反射时间为给药后 10 min)后 10、20、40、60 min 设为 4 个亚组。XFM+阿替美唑组、XFM+生理盐水组大鼠,先腹腔注射 XFM,待翻正反射出现时即刻分别腹腔注射阿替美唑(0.522 mg·kg⁻¹)和等量生理盐水,分别在第 2 次给药后 10、20、40、60 min 设为 4 个亚组。

1.3 样品采集

XFM 对照组大鼠腹腔注射 XFM 合剂,XFM+生理盐水组、XFM+阿替美唑组大鼠,先腹腔注射 XFM,待翻正反射出现时即刻分别注射生理盐水和阿替美唑,分别在上述 4 个时间点断头取脑。在生理盐水冰面上迅速分离大脑皮质,称重,装入冻存管后投入液氮中保存。

1.4 检测方法

1.4.1 脑组织总蛋白提取及浓度测定 液氮中取出脑组织,称重后剪碎放入玻璃研磨器中,按照每 20 mg 组织加入 150~250 μ L 裂解液的比例加入 RIPA 裂解液,4 °C 静止 20~30 min,充分裂解,转入 EP 管中,12 000 g 离心 5 min,取上清。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。

1.4.2 蛋白质印迹 试验方法参照 Niles 方法^[15],略加改进。蛋白样品用上样缓冲液(组成:1 mol·L⁻¹ Tris-HCL pH 6.8,50% 丙三醇;10% SDS;10 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇;0.05% 溴酚蓝)按照 4:1 浓度稀释后,煮沸 5 min。采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶(12% 的分离胶和 5% 的积层胶)电泳分离蛋白,每个泳道中加入 40 mg 处理后的蛋白样品,样品在 45 V 电压下进入积层胶后,将电压调制 80 V

下电泳,当溴酚蓝前沿进入分离胶后,提高电压到 120 V,继续电泳直至溴酚蓝到达分离胶底部,关闭电源。取出电泳后的凝胶,在转膜缓冲液(组成:25 mmol·L⁻¹ Tris; 20 mmol·L⁻¹甘氨酸; 20%甘氨酸; pH 8.3)中平衡 10 min,采用湿转方法(恒流 150 mA,时间 170 min)将凝胶中分离的蛋白转移到 PVDF 膜上。转膜结束后将 PVDF 膜放入封闭液中(组成:5% 奶粉;50 mmol·L⁻¹ Tris;150 mmol·L⁻¹ NaCl;0.2% Tween 20;pH 8.5),室温摇床封闭 2 h,兔抗大鼠一抗(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)孵育 4 ℃过夜,摇床漂洗 3 次(5 min·次⁻¹),辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)孵育 1 h,摇床漂洗 3 次(5 min·次⁻¹)。ECL 化学发光试剂盒荧光检测目的蛋白,暗室下曝光、显影,显影胶片在扫描仪上扫描。结果用 Syngene 凝胶成像分析系统对胶片上的每一电泳条带进行光密度扫描定量,结果用检测蛋白光密度与内参蛋白光密度之比表示,即 c-fos/ β -actin 来表示。

1.5 统计分析

试验数据以“平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”表示,用 SPSS 13.0 数据统计分析软件对试验数据进行统计分析,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠大脑皮质 c-fos/Actin 蛋白免疫印迹结果

大鼠大脑皮质组织总蛋白提取,浓度测定后,10、20、40、60 min 四期蛋白分别添加上样液煮沸处理后 40 mg 上样电泳,转膜,转移后的 PVDF 膜经抗体孵育后发光自显影、曝光的 X 光片结果见图 1、

2。Actin 蛋白在 55 ku 处显影,c-fos 蛋白在 62 ku 处显影,条带清晰,背景干扰小。

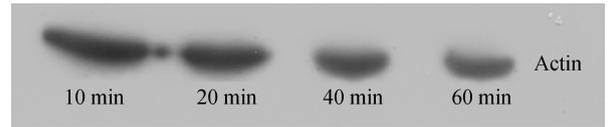


图 1 大鼠大脑皮质内 β -actin 内参蛋白免疫印迹
Fig. 1 Western blot result of β -actin gene expression in the cerebral cortex

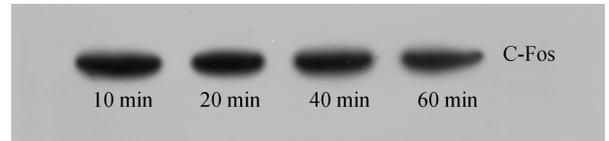


图 2 大鼠大脑皮质内 C-fos 蛋白免疫印迹
Fig. 2 Western blot result of c-fos gene expression in the cerebral cortex

2.2 阿替美唑对大鼠大脑皮质 c-fos 蛋白表达的影响

如表 1 所示,XFM 对照组大鼠在给药后不同时间点 c-fos 蛋白表达量逐渐增加,与给药后 10 min 比较差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);阿替美唑注射后引起 XFM 麻醉大鼠大脑皮质 c-fos 蛋白表达量减少,与 XFM 对照组比较差异显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);XFM 麻醉大鼠腹腔注射生理盐水,各时间点 c-fos 蛋白与对照组蛋白表达变化趋势相似,各时间点 c-fos 蛋白表达量与对照组间比较无显著差异($P > 0.05$),表明第 2 次注射刺激对大鼠麻醉后 c-fos 蛋白表达无显著影响,证明阿替美唑对 c-fos 表达的影响与第 2 次注射刺激无关,完全是阿替美唑作用引起的。

表 1 阿替美唑对大鼠大脑皮质 c-fos 基因表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 1 Effects of Atipamzole on the expression of c-fos gene in the cerebral cortex ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别 Group	10 min	20 min	40 min	60 min
XFM 对照组 Control group	1.06±0.22	1.28±0.14 *	1.43±0.25 * *	1.62±0.16 * *
XFM+生理盐水组 XFM add Nacl group	1.07±0.11	1.29±0.08 *	1.38±0.08 * *	1.54±0.24 * *
XFM+阿替美唑 XFM add Atipamzole group	0.81±0.04▲▲	0.89±0.02▲▲	0.97±0.05▲▲	0.99±0.06▲▲

* *. 表示药物组内各时间点与给药后 10 min 比较差异极显著($P < 0.01$);*. 表示药物组内各时间点与给药后 10 min 比较差异极显著($P < 0.05$);▲▲. 表示药物组与对照组比较差异极显著($P < 0.01$)

* *. Indicates that the difference is extremely significant compared with 10 min in group($P < 0.01$); *. Indicates that the difference is significant compared with 10 min in group($P < 0.05$); ▲▲. Indicates that the difference is extremely significant compared with control group($P < 0.01$)

3 讨论

3.1 动物模型的建立及脑区选择

不同的刺激能诱发 *c-fos* 基因表达, 麻醉作为一种刺激也能引起 *c-fos* 基因的表达。说明对于神经细胞而言, 全麻药对其产生的应该是刺激, 而不是抑制^[16-17]。*c-fos* 基因表达适用于神经系统功能活动的定位研究, 可以检测麻醉药在中枢神经系统的作用部位^[5]。但 *c-fos* 基因的表达对于不同刺激选择性差, 易受其他非试验因素的干扰, 如光线、声音、气味和应激反应等, 因此除了要严格控制合适的试验条件外, 对于如何排除无关因素的干扰以求得结果的正确性至关重要。本试验采取以下措施: ①大鼠于试验前放置在安静、温暖和避强光的饲养环境内 48 h 以上; ②在试验操作时力求轻柔, 尽量保持大鼠基础状态的稳定; ③本试验设置严格的 XFM 对照组, 对照组动物与试验组除缺少第 2 次给药刺激因素不同外其他条件均完全相同; ④试验设立了 XFM-生理盐水组, 通过试验结果判断第 2 次注射刺激是否引起 *c-fos* 表达, 以排除针刺注射对药物作用的影响; ⑤所有的大鼠, 从取材, 蛋白提取, 浓度测定, 再到 Western blot 的操作等过程均由 1 个人完成, 最大限度地减少试验中的操作误差。在本研究中, XFM-生理盐水组大鼠大脑皮质 *c-fos* 表达与对照组比较无显著差异, 说明试验条件控制严格。

动物全身麻醉引起暂时性的疼痛敏感性丧失, 并辅以意识消失及维持植物神经系统反射的完好, 当手术刺激作用于感受器, 伤害性信息就通过外周神经系统和脊髓, 最终传递到大脑^[2, 17], 通过大脑调节机体产生系列反射以适应麻醉需要, 因此本试验以大鼠大脑皮质作为研究部位, 探讨大鼠大脑皮质内 *c-fos* 基因表达在 XFM 麻醉与阿替美唑催醒中的作用。

3.2 *c-fos* 基因表达与麻醉相关性

在神经系统的反射弧中, 不同刺激使神经元兴奋的同时, 引起神经递质(或激素)的分泌, 作为第一信使, 激活细胞内的第二信使, 第二信使作用于相关的蛋白激酶, 在引起细胞瞬时反应的同时, 也可以激活 *c-fos* 基因参与神经细胞内信息的传递, 所以 *c-fos* 表达的核蛋白被称为第三信使^[18]。*c-fos* 通过影响靶基因的转录能将外界信号和基因的表型改变偶联起来, 参与机体生理、病理活动的调节^[1]。

尽管脂质双层膜及其通道蛋白是以前全麻机理研究的主要内容, 但两种学说不足以揭示全麻机理,

结合目前麻醉学基因研究方面的进展, 提出基因学说并对其进行深入的研究有助于揭示全麻的机理。基因是否出现表达, 即是否有新的 mRNA 出现, 这是基因学说是否成立最关键的问题之一。*c-fos* 基因作为麻醉相关基因被广泛研究, 近来研究发现硫喷妥钠能引起中枢神经元多个核团 Fos 蛋白的明显表达, 推论这些核团可能是全麻药物中枢作用点^[2]; 许霁虹^[4]等发现异丙酚能降低应激大鼠海马、大脑皮质、下丘脑 *c-fos* mRNA 表达水平, 并与血浆促肾上腺皮质激素、皮质醇浓度下降一致; Nagata 等^[5]发现氯胺酮降低应激大鼠海马、大脑皮质 *c-fos* mRNA 表达水平, 而对下丘脑 *c-fos* mRNA 的表达无显著影响; 卢德章^[19]研究表明, 替来他明、噻拉嗪、唑拉西洋麻醉下均引起大鼠脑区 Fos 蛋白表达。因此本试验研究阿替美唑催醒 XFM 麻醉大鼠与脑区 *c-fos* 基因表达的关系。

3.3 阿替美唑催醒 XFM 麻醉作用与 *c-fos* 基因表达的关系

阿替美唑是一种特异性、高效性的 α_2 -肾上腺素能受体拮抗剂, 被国内外兽医临床中用于催醒麻醉的动物。曾报道阿替美唑用于颞颥美托米啉麻醉的猫^[20], 以及颞颥美托米啉和咪达唑仑联合麻醉的山羊^[21]及马^[22], 引起镇静回复快速和平稳, 无任何副反应。临床中也将阿替美唑用于颞颥噻拉嗪麻醉的牛^[23], 氯胺酮结合美托米啉麻醉的狮子和老虎^[24], 结果表明阿替美唑对麻醉恢复效果明显, 催醒安全可靠。本试验利用阿替美唑催醒 XFM 麻醉的大鼠, 通过阿替美唑对 XFM 诱导大鼠大脑皮质 *c-fos* 蛋白表达的影响, 探讨阿替美唑催醒 XFM 麻醉大鼠的部分机理。卢德章等^[19]报道了 XFM 麻醉下引起大鼠大脑皮质 *c-fos* 基因表达显著增加, 表明 XFM 引起动物麻醉现象与脑区 *c-fos* 基因的高表达密切相关。本试验结果表明, 阿替美唑注射给药后引起 XFM 诱导大鼠大脑皮质 Fos 蛋白表达量减少, 抑制了 XFM 麻醉剂对大鼠大脑皮质的刺激, 减少 *c-fos* 基因表达, 暂时性地阻断了 Fos 蛋白作为第三信使传递麻醉信号, 而达到催醒作用。

4 结论

本研究表明, 大脑皮质 *c-fos* 基因参与了阿替美唑催醒 XFM 麻醉作用。阿替美唑抑制 XFM 诱导大鼠大脑皮质 Fos 蛋白表达, 阻断 XFM 麻醉剂引起的中枢信号传递, 是阿替美唑催醒 XFM 麻醉大鼠的重要机理之一。

参考文献:

- [1] KONDO T, OHSHIMA T, SATO Y, et al. Immunohistochemical study on the expression of c-Fos and c-Jun in human skin wounds [J]. *Histochem J*, 2000, 32(8): 509-514.
- [2] 徐礼鲜, 傅荣国, 张惠, 等. 硫贲妥钠诱导 c-fos 基因在中枢神经系统的表达[J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(3): 271-273.
- [3] YOSHIDA K, MARUYAMA M, NAGASHIMA K, et al. Fos expression induced by warming the preoptic area in rats [J]. *Brain Res*, 2002, 933(2): 109-117.
- [4] 许雾虹, 王多友, 张铁铮, 等. 异丙酚对应激大鼠脑组织不同区域 c-fos mRNA 表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2001, 21(11): 679-681.
- [5] NAGATA A, NAKAO S, NISHIZAWA N, et al. Xenon inhibits enhances ketamine-induced c-Fos expression in the rat posterior cingulate and retrosplenial cortices [J]. *Anesth Analg*, 2001, 92(2): 362-368.
- [6] 卢德章, 范宏刚, 于世明, 等. 替来他明诱导大鼠中枢神经系统 c-fos 基因的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(7): 878-882.
- [7] HAAPALINNA A, VIITAMAA T, MACDONALD E, et al. Evaluation of the effects of a specific alpha 2-adrenoceptor antagonist, atipamezole, on alpha 1- and alpha 2-adrenoceptor subtype binding, brain neurochemistry and behaviour in comparison with yohimbine [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1997, 356: 570-582.
- [8] HAAPALINNA A, SIRVIÖ J, MACDONALD E, et al. The effects of a specific α_2 -adrenoceptor antagonist, atipamezole, on cognitive performance and brain neurochemistry in aged Fisher 344 rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 387: 141-150.
- [9] YAVICH L, SIRVIÖ J, HAAPALINNA A, et al. Atipamezole, an alpha2-adrenoceptor antagonist, augments the effects of L-DOPA on evoked dopamine release in rat striatum [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 462: 83-89.
- [10] NAOTAMI U, YOSHIKI H. Antagonistic effects of atipamezole, flumazenil and 4-aminopyridine against anaesthesia with medetomidine, midazolam and ketamine combination in cats [J]. *J Feline Med Surg*, 2008, 10: 47-54.
- [11] MILLER M, WEBER M, NEIFFER D, et al. Anaesthetic induction of captive tigers (*Panthera tigris*) using a Medetomidine-ketamine combination [J]. *J Zoo Wild Med*, 2003, 34: 307-308.
- [12] 卢德章. 小型猪特异性麻醉剂的研究及其催醒机理的研究[D]. 哈尔滨, 东北农业大学博士论文, 2011, 6: 119-120.
- [13] 马昆, 张雯松, 卢德章, 等. 小型猪复合麻醉剂特异性镇痛剂对小型猪各项血液指标的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(1): 36-38.
- [14] 谭丽娟, 马昆, 范宏刚, 等. 小型猪特异性麻醉剂复合镇痛剂对小型猪脑电影响的试验[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(4): 23-25.
- [15] NILES P, SMITH L, TENN C. Modulation of c-fos expression in the rat striatum by diazepam [J]. *Neuro Lett*, 1997, 236: 5-8.
- [16] 王晓薇, 邵建林, 黄海琼, 等. 异氟醚诱导大鼠中枢神经系统 c-fos 基因的表达[J]. *昆明医学院学报*, 2004, 3: 4-8.
- [17] 许雾虹, 张铁铮, 刘晓江, 等. 氯胺酮麻醉引起 c-fos 基因在大鼠大脑皮质的表达[J]. *临床麻醉学杂志*, 2005, 21(2): 116-117.
- [18] ZIMITAT C, NIXON P F. Glucose induced IEG expression in the thiamin-deficient rat brain [J]. *Brain Res*, 2001, 892(1): 218-227.
- [19] 卢德章, 范宏刚, 于世明. 隆朋对替来他明/唑拉西洋诱导的大鼠不同脑区 c-fos 基因表达的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(6): 23-25.
- [20] GRANHOLM M, MCKUSICK B, WESTERHOLM F, et al. Evaluation of the clinical efficacy and safety of dexmedetomidine or medetomidine in cats and their reversal with atipamezole [J]. *Vet Anaesth Analg*, 2006, 33: 214-223.
- [21] MPANDUJI D, BITTEGEKO S, BATAMUZI E, et al. Comparison of the effects of atipamezole and tolazoline on analgesia, cardiopulmonary and rectal temperature changes induced by lumbosacral epidural injection of medetomidine in goats [J]. *Small Rumin Res*, 2001, 40(2): 117-122.
- [22] YAMASHITA K, YONEZAWA K, IZUMISAWA Y, et al. Antagonistic effects of atipamezole on medetomidine-induced sedation in horses [J]. *J Vet Med Sci*, 1996, 58(10): 1049-1052.
- [23] LEE N, YAMAGISHI K, OBOSHI, et al. Antagonistic effects of intravenous or epidural atipamezole on xylazine-induced dorsolumbar epidural analgesia in cattle [J]. *Vet J*, 2003, 166(2): 194-197.
- [24] JACQUIER M, AARHAUG P, ARNEMO M, et al. Reversible immobilization of free-ranging African lions (*Panthera leo*) with medetomidine-tiletamine-zolazepam and atipamezole [J]. *J Wild Dis*, 2006, 42: 432-436.