

# 右美托咪定对小鼠皮肤 / 肌肉切口牵拉所致持续性术后疼痛的作用

杨娟 周璟 郭小文

**【摘要】** 目的 通过疼痛行为学检测评估小鼠皮肤 / 肌肉切口牵拉模型是否造模成功并观察右美托咪定对该模型小鼠疼痛行为学的影响。方法 (1)将实验鼠随机分为皮肤 / 肌肉切口牵拉组(SMIR 组)和皮肤 / 肌肉只切开不牵拉组(Sham 组),在术前 1d、术后第 1、3、7、10、14、18 天检测其机械缩足反射阈值及热缩足潜伏期,评估该模型是否造模成功。(2)观察右美托咪定对 SMIR 小鼠疼痛行为学的影响;于术后第 3 天腹腔注射不同剂量右美托咪定(0.4、2、10 $\mu$ g/kg)及 0.9%氯化钠注射液,观察其对 SMIR 小鼠触诱发痛的影响;于术后第 4 天腹腔注射 10 $\mu$ g/kg 右美托咪定,观察是否引起 SMIR 小鼠条件性位置偏爱以检测右美托咪定对 SMIR 小鼠自发痛的影响。结果 (1)与 Sham 组相比,SMIR 组造模前后机械痛阈值从术后 1d 开始明显下降,至少持续到术后第 14 天,术后第 18 天恢复正常;热痛潜伏期无明显变化。(2)与 0.9%氯化钠注射液相比,右美托咪定可以提高 SMIR 小鼠机械痛阈值并呈剂量依赖性;且 10 $\mu$ g/kg 右美托咪定能改善 SMIR 小鼠的自发痛。结论 小鼠 SMIR 建立持续性术后疼痛模型简单易行且具有一定的稳定性;右美托咪定可以改善 SMIR 小鼠的触诱发痛及自发痛。

**【关键词】** 持续性术后疼痛 自发痛 条件性位置偏爱 右美托咪定

Effect of dexmedetomidine on persistent postoperative pain induced by skin/muscle incision and retraction in mice YANG Juan, ZHOU Jing, GUO Xiaowen. Department of Anesthesiology, Zhejiang Provincial Hospital of TCM, Hangzhou 310006, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of dexmedetomidine on persistent postoperative pain induced by skin/muscle incision and retraction(SMIR) in mice. **Methods** Mice were randomly assigned to 2 groups: skin/muscle incision and retraction (SMIR) group and skin/muscle incision without retraction (Sham) group. Paw withdrawal thresholds (PWT) to mechanical stimuli and heat stimuli were recorded at d1 before surgery, d1, d3, d7, d10, d14 and d18 after surgery. Dexmedetomidine (0.4, 2, 10 $\mu$ g/kg) was injected on d3 after surgery, the pain was assessed by mechanical PWT. The effect of dexmedetomidine on the spontaneous pain was evaluated by using a conditional place preference (CPP) behavioral paradigm. The mice were systemically injected with dexmedetomidine(10 $\mu$ g/kg) on d4 after surgery, then CPP was observed. **Results** SMIR-evoked mechanical hypersensitivity was observed at postoperative d1, persisted until at least postoperative d14, and had dissipated by postoperative d18. SMIR did not evoke significant heat hyperalgesia. Systemic injection of dexmedetomidine raised the PWT in SMIR mice in a dose-dependent manner. Systemic injection of 10 $\mu$ g/kg dexmedetomidine alleviated spontaneous pain in the CPP test. **Conclusion** The study suggests that skin/muscle incision and retraction model in mice evokes a persistent pain syndrome. Dexmedetomidine can relieve the evoked pain and spontaneous pain in mice.

**【Key words】** Persistent postsurgical pain Spontaneous pain Conditioned place preference Dexmedetomidine

持续性术后疼痛(persistent postsurgical pain, PPSP)是手术后并发的一类疼痛综合征。PPSP 的发生率可能比人们想象中的要高,大约为 10%~50%,其中重度疼

痛占 2%~20%<sup>[1]</sup>。为研究 PPSP 的发生机制,Flatters 等<sup>[2]</sup>于 2008 年制作了大鼠皮肤/肌肉切口牵拉(skin/muscle incision and retraction, SMIR)模型,该模型是模拟临床切口牵拉手术的一种新型 PPSP 模型。此外,临床上 PPSP 大多数是持续性的、没有外界刺激的、自发性的<sup>[3]</sup>,而传统的慢性疼痛模型,多数测试机械性、冷或热触诱发痛,很难对动物的自发痛行为进行测量和评价<sup>[4]</sup>。既

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.19.2018-1491

作者单位:310006 杭州,浙江省中医院麻醉科

通信作者:郭小文, E-mail: guoxiaowen1315@hotmail.com

往已有报道将条件性位置范式中的条件性位置偏爱 (conditioned place preference, CPP) 用于动物模型自发痛的研究<sup>[5]</sup>。右美托咪定是一种新型  $\alpha_2$  肾上腺受体 ( $\alpha_2$ -adrenergic receptor,  $\alpha_2$ -AR) 激动剂, 是近来颇受麻醉界关注的药物<sup>[6-7]</sup>, 且有实验证明右美托咪定可以引起实验大鼠的 CPP<sup>[8]</sup>。本研究采用 CPP 研究小鼠 SMIR 模型的自发痛, 并探讨右美托咪定对 SMIR 小鼠触诱发痛及自发痛的影响。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 健康成年雄性 C57BL/6 小鼠 107 只, 6~8 周龄, 体重 20~35g, 由浙江大学实验动物中心提供。饲养于温度 (25±1)℃、湿度 (60±5)%、昼夜交替环境中, 自由进食饮水。实验前, 所有小鼠至少提前 3d 适应实验环境, 提前 30min 适应行为学测试环境。

1.2 主要试剂和器材 0.9% 氯化钠注射液 (浙江慈溪制药厂); 戊巴比妥钠 (中国医药集团上海公司); 右美托咪定 (江苏恒瑞医药股份有限公司); von Frey 纤毛刺激仪 (阿根廷 North Coast Medical 公司); 辐射热痛敏刺激仪 (上海玉研科学仪器有限公司); 电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 造模方法 SMIR 模型制备模拟 Flatter 等<sup>[2]</sup>大鼠造模方法。具体方法如下: 小鼠腹腔注射戊巴比妥钠 40mg/kg 麻醉后置于仰卧位固定, 剔除小鼠右侧后肢中部手术区域鼠毛, 75% 乙醇反复擦拭手术区域显现隐静脉, 在隐静脉内侧 3mm 处作一长 1.0~1.3cm 的皮肤切口, 暴露浅层股薄肌, 钝性分离浅层肌肉, 见到白色内收肌群肌腱筋膜, 置入自制宽为 1cm 显微牵开器。拉开皮肤肌肉, 可见白色内收肌群筋膜, 持续牵开 1h。在牵拉过程中, 隐神经被牵开器拉伸并移位, 但由于其处于肌肉表层而并没有受坚硬物体如骨头等压迫。牵开期间切口用无菌生理盐水纱布保湿, 1h 后缝合皮肤肌肉, 注意术中保温。假手术组 (Sham 组) 仅分离暴露肌肉 1h, 不用牵开器牵拉, 其余步骤相同。

1.3.2 实验动物分组 按照实验设计将实验分为以下 3 部分: (1) 将 18 只小鼠随机分为 SMIR 组及 Sham 组, 各 9 只; 两组小鼠分别于术前 1d、术后第 1、3、7、10、14、18d 进行机械痛阈值测试 (paw withdrawal threshold, PWT) 和热缩足潜伏期测试 (paw withdrawal latency, PWL) 测试。(2) 另选取 75 只小鼠随机分为 SMIR 组及 Sham 组, 术后第 3 天行 PWT 测试后, SMIR 组分别腹腔注射右美托咪定 0.4 $\mu$ g/kg (10 只)、2 $\mu$ g/kg (10 只)、

10 $\mu$ g/kg (9 只) 和 0.9% 氯化钠注射液 10ml/kg (10 只); Sham 组分别腹腔注射右美托咪定 0.4 $\mu$ g/kg (9 只)、2 $\mu$ g/kg (9 只)、10 $\mu$ g/kg (8 只) 和 0.9% 氯化钠注射液 10ml/kg (10 只); 两组小鼠给药 0.5h 后再次行 PWT 测试。(3) 另选取 14 只小鼠随机分为 SMIR 组 8 只及 Sham 组 6 只, 术后第 4 天行 CPP 实验: SMIR 组及 Sham 组腹腔注射右美托咪定 10 $\mu$ g/kg。

### 1.4 行为学测试

1.4.1 PWT 将实验小鼠放入有机玻璃隔间 (10cm×10cm×10cm), 间距为 1cm, 置于距离桌面 40cm 的孔径 2mm×2mm 金属网格平台上。实验动物在测试开始前 3d 适应实验环境, 每天在测试环境中放置 0.5h。适应 3d 后用, 依照 Dixon 等<sup>[9]</sup>报道的“up and down”法进行, 能够使 50% 小鼠产生缩足反射的强度即为小鼠机械缩足反射阈值。

1.4.2 PWL 将有机玻璃箱置于 3mm 玻璃板上, 小鼠适应环境 30min 后用卤钨丝灯发出的热痛刺激仪 (10V, 50W, 光斑直径 0.8cm) 照射小鼠足底。照射开始至小鼠出现抬腿回避时为 PWL 值。自动切断时间为 20s, 以防止组织烫伤。热刺激强度在整个实验过程中保持一致, 并保持玻璃板干燥, 控制检测室内温度 (20±2)℃, 保持环境安静。每只小鼠测试 3 次, 每次间隔 3min, 取 3 次平均值为大鼠 PWL 值, 该值表示小鼠热缩足潜伏期。

1.4.3 CPP 小鼠造模后, 放置于 CPP 三箱中自由适应 2d, 每天适应 30min。第 3 天对小鼠进行 15min 的监控录像, 行 CPP 测试: 倘若每只小鼠在单侧条件箱停留时间超过总时间 (900s) 的 80% (720s) 或者少于总时间的 20% (180s), 即视为初始有偏爱状态而被淘汰。第 4 天对经过筛选的小鼠行药物与条件箱配对。上午小鼠腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液后, 立即放入固定的一侧条件箱 15min。经过 4h 后, 小鼠腹腔注射特定药物后立即放入固定的另一侧条件箱 15min。结束后立即取出放回原来鼠笼并放入鼠房。20h 后再次对小鼠进行 15min 的偏爱测试, 统计小鼠在两侧条件箱中的停留时间, 其差值即为偏爱指数。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件及绘制直方图。计量资料以 mean±SEM 表示, 组间比较采用 two way RM ANOVA 检验, 两两比较采用 SNK-*q* 检验和 Tukey's 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠皮肤/肌肉切口牵拉模型疼痛行为学测试

2.1.1 两组小鼠不同时点 PWT 的比较 两组小鼠术前 1d PWT 无统计学差异; 与 Sham 组相比, SMIR 组 PWT 术后第 1 天即发生显著降低, 持续降低至术后第 10 天, 之后逐渐增高, 至术后第 18 天几乎恢复正常水平。Sham 组大鼠同侧足底术后 PWT 与术前相比无统计学差异, 见表 1。

2.1.2 两组小鼠不同时点 PWL 的比较 两组小鼠术前 PWL 比较无统计学差异。SMIR 组小鼠术后第 1、3、7、10、14、18 天 PWL 与术前及 Sham 组相比均无统计学差异(均  $P > 0.05$ ), 见表 2。

2.2 右美托咪定对 SMIR 小鼠术后疼痛的影响

2.2.1 触诱发痛 生理盐水对照组中给予 0.9% 氯化钠注射液前后 PWT 比较无统计学差异(图 1a)。给予右美托咪定 0.4 $\mu$ g/kg、2 $\mu$ g/kg 0.5h 后, SMIR 小鼠 PWT 与给药前相比均无统计学差异; Sham 组也无统计学差

异(图 1b、c)。给予 10 $\mu$ g/kg 右美托咪定后 SMIR 组 PWT 与给药前相比有统计学差异; 而 Sham 组给药前后 PWT 无统计学差异(图 1d)。

2.2.2 自发痛 Sham 组小鼠给药前右美托咪定配对箱和生理盐水配对箱停留时间差值为(-35.6 $\pm$ 58.1)s, 给药后右美托咪定配对箱和 0.9% 氯化钠注射液配对箱停留时间差值为(-16.7 $\pm$ 61.5)s(图 2a); 两者差值相比无统计学差异(图 2b)。SMIR 组小鼠给药前右美托咪定配对箱和 0.9% 氯化钠注射液配对箱停留时间差值为(-61.5 $\pm$ 40.6)s, 给药后右美托咪定配对箱和 0.9% 氯化钠注射液配对箱停留时间差值为(75.9 $\pm$ 48.7)s(图 2c); 两者差值相比有统计学差异(图 2d)。

3 讨论

研究术后疼痛的模型常用足底切口模型<sup>[10]</sup>, 然而

表 1 两组小鼠不同时点 PWT 的比较(g)

组别	n	术前	术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 7 天	术后第 10 天	术后第 14 天	术后第 18 天
SMIR 组	9	41.6 $\pm$ 4.0	3.0 $\pm$ 0.5**	4.8 $\pm$ 0.5**	4.6 $\pm$ 0.5**	4.4 $\pm$ 0.5**	23.5 $\pm$ 3.9*	30.7 $\pm$ 3.1
Sham 组	9	36.7 $\pm$ 3.7	32.0 $\pm$ 2.7	30.0 $\pm$ 3.5	35.6 $\pm$ 3.9	35.3 $\pm$ 3.8	32.0 $\pm$ 2.7	28.0 $\pm$ 3.3

注: 与 Sham 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

表 2 两组小鼠不同时点 PWL 的比较(s)

组别	n	术前	术后第 1 天	术后第 3 天	术后第 7 天	术后第 10 天	术后第 14 天	术后第 18 天
SMIR 组	9	14.3 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.6	14.0 $\pm$ 0.8	14.3 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 0.6	14.3 $\pm$ 0.4	14.4 $\pm$ 0.6
Sham 组	9	14.2 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 0.5	14.5 $\pm$ 0.8	14.5 $\pm$ 0.7	13.8 $\pm$ 0.5	14.2 $\pm$ 0.5	14.2 $\pm$ 0.7

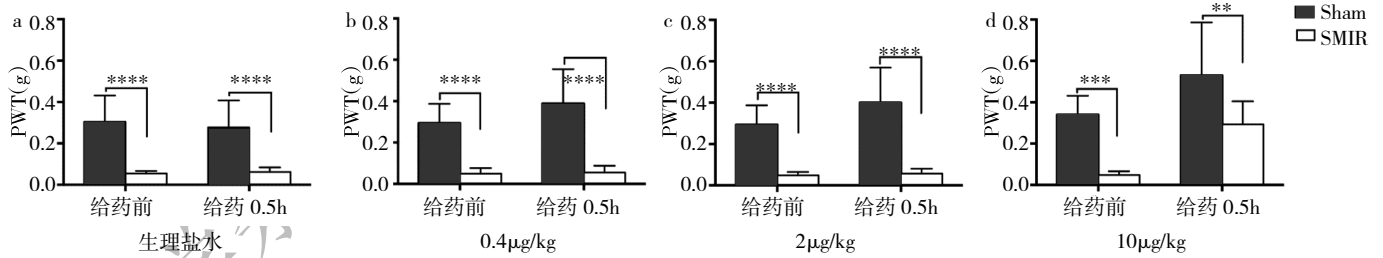


图 1 腹腔注射不同剂量右美托咪定前后 Sham 组和 SMIR 组小鼠 PWT 的变化及比较(a:生理盐水;b:0.4 $\mu$ g/kg;c:2 $\mu$ g/kg;d:10 $\mu$ g/kg; 与 Sham 组比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

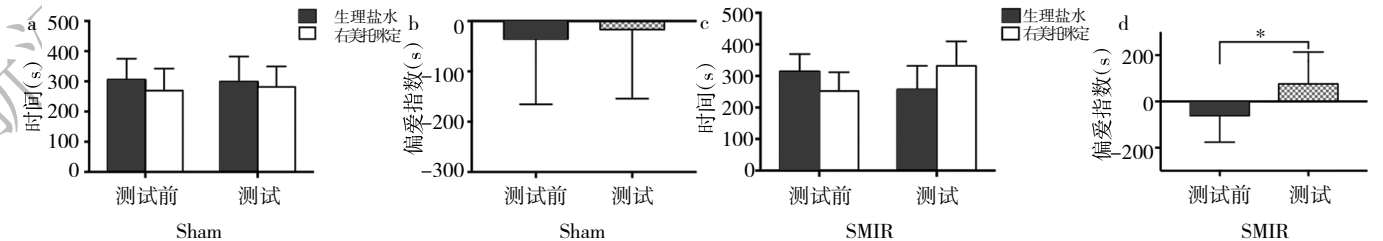


图 2 腹腔注射 0.9% 氯化钠注射液及右美托咪定前后 SMIR 小鼠 CPP 的变化及比较 (a、b: Sham 组小鼠没有出现 CPP; c、d: SMIR 组小鼠出现 CPP; \* $P < 0.05$ )

该模型形成的疼痛持续时间比较短暂,只有大约 5d,而临床上胸科手术及腹股沟疝气手术等部分患者会出现长达数月甚至数年的慢性疼痛<sup>[1]</sup>。PPSP 形成机制尚且不清,而临床发病人群庞大,因此急需进一步深入研究。2008 年 Flatters 等<sup>[2]</sup>发明了大鼠 SMIR 模型,但基因敲除大鼠较少,难以在基因层面进行深入研究,因此本实验采用成年雄性 C57BL/6 小鼠,将该 SMIR 模型拓展到小鼠上,检测该模型的稳定性,同时利于后期基因水平深入地研究疾病机制。实验结果与 Flatters 等实验结果相符。说明该模型作为研究 PPSP 具有一定的稳定性。可以进一步在基因水平研究 PPSP 的发生机制。

右美托咪定作为  $\alpha_2$  肾上腺素能受体激动剂,具有镇静、镇痛、抑制交感神经及抗焦虑等多种作用。本研究通过参考以往文献<sup>[12]</sup>及预实验结果选用 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  3 个浓度梯度,实验发现右美托咪定对 SMIR 术后的机械性触诱发痛有明显的缓解作用,且 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  右美托咪定能够诱发出位置偏爱,说明其对自发性、随机性和持久性的自发痛也有镇痛效果。本实验再次验证:右美托咪定不仅具有良好的镇静效果,还具有抑制触诱发痛和自发痛的双重镇痛效果,是一种很有潜力的镇痛药物。

本研究结果显示小鼠行 SMIR 术后与术前相比,机械痛阈明显下降,可以持续至少 14d;右美托咪定可以剂量依赖性地提高 SMIR 小鼠 PWT 值且 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  右美托咪定可以改善 SMIR 小鼠的自发痛。笔者从行为学上研究了右美托咪定对小鼠持续性术后疼痛的镇痛作用,可能需要进一步排除其对模型小鼠记忆力、血脑屏障等相关混杂因素的影响。PPSP 的机制非常复杂,本实验并没有对其进行深入研究;此外,右美托咪定镇痛的电生理学机制、分子生物学机制、细胞内机制并不十分清楚,均有待于我们下一步实验加以深入研究。

#### 4 参考文献

- [1] Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention[J]. *The Lancet*, 2006, 367(9522): 1618–1625. DOI:10.1016/S0140-6736(06)68700-X.
- [2] Flatters SJL. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR)[J]. *PAIN*, 2008, 135(1–2): 119–130. DOI:10.1016/j.pain.2007.05.013.
- [3] Peng Z, Li H, Zhang C, et al. A retrospective study of chronic post-surgical pain following thoracic surgery: prevalence, risk factors, incidence of neuropathic component, and impact on quality of life[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e90014. DOI:10.1371/journal.pone.0090014.
- [4] Mao J. Current challenges in translational pain research[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2012, 33(11): 568–573. DOI:10.1016/j.tips.2012.08.001.
- [5] Zuo ZX, Wang YJ, Liu L, et al. Huperzine A alleviates mechanical allodynia but not spontaneous pain via muscarinic acetylcholine receptors in mice[J]. *Neural Plasticity*, 2015, 2015: 453170. DOI:10.1155/2015/453170.
- [6] Natarajan Surendar M, Kumar Pandey R, Kumar Saksena A, et al. A comparative evaluation of intranasal dexmedetomidine, midazolam and ketamine for their sedative and analgesic properties: a triple blind randomized study[J]. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 2014, 38(3): 255–261. PMID:25095322.
- [7] Huang X, Deng R, Tu W, et al. Dexmedetomidine reduces neuropathic pain in a rat model of skin/muscle incision and retraction[J]. *Asian Journal of Surgery*, 2017, 40(1): 35–40. DOI:10.1016/j.asjsur.2015.10.009.
- [8] Uskur T, Barlas MA, Akkan AG, et al. Dexmedetomidine induces conditioned place preference in rats: Involvement of opioid receptors[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 296: 163–168. DOI:10.1016/j.bbr.2015.09.017.
- [9] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 1994, 53(1): 55–63. DOI:10.1016/0165-0270(94)90144-9.
- [10] Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain[J]. *Pain*, 1996, 64(3): 493–502. DOI:10.1016/0304-3959(95)01441-1.
- [11] Wildgaard K, Ravn J, Kehlet H. Chronic post-thoracotomy pain: a critical review of pathogenic mechanisms and strategies for prevention[J]. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2009, 36(1): 170–180. DOI:10.1016/j.ejcts.2009.02.005.
- [12] Uskur T, Barlas MA, Akkan AG, et al. Dexmedetomidine induces conditioned place preference in rats: Involvement of opioid receptors[J]. *Behavioural Brain Research*, 2016, 296: 163–168. DOI:10.1016/j.bbr.2015.09.017.

(收稿日期:2018-06-13)

(本文编辑:严玮雯)