

- Neuropharmacology 2004, 47(1): 136—145.
- [8] Baines CP, Zhang J, Wang GW, et al Mitochondrial PKC epsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart enhanced mitochondrial PKC epsilon—MAPK interactions and differential MAPK activation in PKC epsilon—induced cardioprotection [J]. Circ Res 2002, 90(4): 390—397.
- [9] Ohnuma Y, Mium T, Miki T, et al Opening of mitochondrial K (ATP) channel occurs downstream of PKC—epsilon activation in the mechanism of preconditioning [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002, 283(1): H440—H447.
- [10] 朱子龙, 王世民. 热休克蛋白 70 与脑缺血 [J]. 天津医科大学学报, 2004, 10(增刊): 121—123.
- [11] Wang W, Jia L, Wang T, et al Endogenous calcitonin gene—related peptide protects human alveolar epithelial cells through protein kinase epsilon and heat shock protein [J]. J Biol Chem 2005, 280(21): 20325—20330.
- 收稿日期: 2008—02—20 修回日期: 2008—05—08
本文编辑: 王卿

腹腔注射肉毒毒素 A 抑制 CCI 模型大鼠机械性触诱发痛和热痛觉过敏的形成

张井浪¹, 申文², 苏小虎¹, 唐元章¹

(1. 江苏省麻醉学重点实验室, 江苏省麻醉医学研究所, 江苏 徐州 221002;

2. 徐州医学院附属医院麻醉科)

摘要:目的 研究肉毒毒素 A (Btx-A) 对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用, 并探讨其可能机制。方法 采用大鼠坐骨神经结扎 (CCI) 模型, 雄性 SD 大鼠 50 只随机分为 5 组 (n=10): ① sham + saline 组, 行假手术, 腹腔内注射生理盐水; ② sham + Btx-A 组, 行假手术, 腹腔内注射 Btx-A (30 U/kg); ③ CCI + saline 组; ④ CCI + Btx-A (15 U/kg) 组; ⑤ CCI + Btx-A (30 U/kg) 组; 其中③~⑤组制作 CCI 模型。各组皆于术后即刻腹腔给药, 于术前和术后 1、3、5、7、14 天观察机械缩足反射阈值和热刺激反射潜伏期的变化。结果 神经病理性疼痛模型组大鼠术后第 4 天形成稳定的机械性触诱发痛和热痛觉过敏, 腹腔给予肉毒毒素 A 大鼠机械缩足反射阈值和热刺激反射潜伏期与 sham + saline 组相比无显著性差异。结论 腹腔给予肉毒毒素 A 能抑制神经病理性疼痛大鼠机械性触诱发痛和热痛觉过敏的形成。

关键词: 肉毒毒素 A; 机械性触诱发痛; 热痛觉过敏; 腹腔注射; 神经病理性疼痛; 大鼠

中图分类号: R614 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000—2065 (2008) 05—0289—03

Peritoneal injection of botulinum toxin type A inhibited the development of mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain

ZHANG Jinglang¹, SHEN Wen², SU Xiaohu¹, TANG yuanchang¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou, Jiangsu 221002, China;

2. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College)

Abstract: Objective To evaluate the analgesic effects of peritoneal injection of botulinum toxin type A (Btx-A) in rat model of neuropathic pain. Methods 50 male Sprague—Dawley rats were randomly assigned to five groups for varied purposes: sham—NS, sham—Btx-A, CCI—NS, CCI—Btx-A 15 mg/kg and CCI—Btx-A 30 mg/kg. Chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve was performed in rats to form the model of neuropathic pain. With Btx-A or NS ip given immediately after the surgery. Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were tested before surgery and 1, 3, 5, 7, 11 and 14 days afterwards. Results Btx-A ip after the surgery reduced or completely abolished the enhanced sensitivity associated with the neuropathy. This reduction was significant on 5 d (anti—allodynic) and 7 d (anti—hyperalgesia). Conclusion Peritoneal injection of Btx-A can inhibit the development of mechanical allodynia and

thermal hyperalgesia in the rat model of neuropathic pain as an analgesic agent

Key words: botulinum toxin type A (Btx-A); mechanical allodynia; thermal hyperalgesia; peritoneal injection; neuropathic pain; rat

肉毒毒素 A 由肉毒杆菌产生,属于外毒素,是生物制剂当中毒性极强的毒素。肉毒毒素 A 和位于运动神经末梢上的受体结合后,进入末梢神经抑制乙酰胆碱的释放从而使肌肉松弛^[1]。利用这一原理,临床上将肉毒毒素 A 用于治疗因肌肉过度收缩的疾病。近年来将肉毒毒素 A 用于神经病理性疼痛的治疗,诸如带状疱疹后遗神经痛、偏头痛、侧索硬化症等疾病。大鼠坐骨神经结扎 (chronic constriction injury of sciatic nerve CCI)模型是目前公认的神经病理性疼痛模型,本实验通过腹腔注射肉毒毒素 A 对 CCI模型大鼠行为学的影响,来探讨肉毒毒素 A 对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用。

1 材料和方法

1.1 动物和模型制备 Sprague-Dawley 大鼠,体重 220 g 左右,由徐州医学院实验动物中心提供。参照 Bennett 等方法建立 CCI 模型。大鼠在戊巴比妥麻醉下,于左侧大腿中部切开,暴露坐骨神经,于坐骨神经干上用 4-0 丝线结扎 4 道松紧适中的结,以不影响神经的血液循环为原则,每 2 道之间间隔 1 mm,然后生理盐水冲洗切口,逐层缝合切口。假手术组仅暴露坐骨神经不作结扎^[2]。

1.2 药品、试剂及仪器 肉毒毒素 A 购于兰州生物制品研究所 (GMPNOS C0868, S10970037, 2002501),每支含纯肉毒毒素 A 制剂 100 U。麻醉用水合氯醛购于美国 Sigma 公司。用于测定机械性触诱发痛的 Von Frey 细丝购于美国 Stoelting 公司。热刺激仪 BME2410A,中国医学科学院生物研究所生产。

1.3 动物分组及给药 SD 大鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,即:①假手术 + 生理盐水组 (sham + saline 组);②假手术 + 肉毒毒素 A 组 (30 U/kg) (sham + Btx-A 组);③ CCI + 生理盐水组 (CCI + saline 组);④ CCI + 肉毒毒素 A (15 U/kg) 组 [CCI + Btx-A (15 U/kg) 组];⑤ CCI + 肉毒毒素 A (30 U/kg) 组 [CCI + Btx-A (30 U/kg) 组]。给药组均于 CCI 模型建立后即时给药。

1.4 行为学测定 分别用 von Frey 细丝测定大鼠的机械性缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold MWT) 和热辐射法测定大鼠热缩足反射

潜伏期 (thermal withdrawal latency TWL) 以评价大鼠机械性触诱发痛和热痛觉过敏。分别在术前当天和术后 1、3、5、7、14 天测定 MWT 和 TWL。每一次都是先测定机械性缩足反射阈值,再测定热缩足反射潜伏期 (因 von Frey 细丝对大鼠是非伤害刺激)。

1.4.1 MWT 的测定 用 von Frey 细丝以 up-and-down 法推算 50% 缩足阈值;将一有机玻璃箱 (22 cm × 12 cm × 22 cm) 置于金属筛网上,安静 15 min 后用 von Frey 细丝垂直刺激大鼠后肢手术侧足底中部,持续时间 ≤ 4 s 大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应,反之为阴性反应^[3]。测定首先从 2 g 开始,当此力度的刺激不能引起阳性反应,则给予相邻大一级力度的刺激;如出现阳性反应则给予相邻小一级力度的刺激,如此连续进行,直至出现第 1 次阳性反应和阴性反应的交界值,再连续测定 4 次。最大力度为 60 g 每次间隔时间为 30 s。

1.4.2 TWL 的测定 将有机玻璃箱置于 3 mm 厚的玻璃板上,按 Hargreaves 法用热刺激仪照射大鼠足底。照射开始至大鼠出现抬腿回避时为热缩足反射潜伏期 (TWL)。自动切断时间为 30 s 以防止组织损伤。每只大鼠测定 5 次,每次间隔 3 min 取后 3 次平均值为大鼠 TWL 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MWT 测定结果 与假手术组相比,CCI + saline 组在术后第 4 天到 14 天 MWT 明显下降,差异有统计学意义。CCI + Btx-A (15 U/kg) 组和 CCI + Btx-A (30 U/kg) 组 MWT 升高,与 CCI + saline 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 TWL 测定结果 与假手术组相比,CCI + saline 组在术后第 4 天到 14 天 TWL 明显下降,差异具有统计学意义,CCI + Btx-A (15 U/kg) 组和 CCI + Btx-A (30 U/kg) 组随着时间的延长 TWL 逐渐升高,与 CCI + saline 组相比有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 每组大鼠各时点 MWT($\bar{x}\pm s$ g)

分 组	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
sham + saline组	17.8±2.72	16.6±2.14	17.2±1.03	18.0±2.05	17.3±1.68	17.6±2.12
sham + Btx-A (30 U/kg)组	17.1±1.03	17.2±1.06	17.2±1.13	17.3±1.01	17.2±1.24	17.0±0.98
CCI + saline组	17.1±1.01	10.7±1.06*	6.9±1.17**	7.3±1.05**	6.3±1.08**	7.1±1.21**
CCI + Btx-A (15 U/kg)组	17.6±1.01	15.9±1.05*	12.8±1.09*	10.6±1.05**	12.0±1.08*	11.9±2.14*
CCI + Btx-A (30 U/kg)组	16.6±2.05	14.7±1.06*	13.9±1.17*	14.3±1.05*	15.3±1.08*	16.1±1.21

与 sham + saline组同期比较: * P<0.05, ** P<0.01

表 2 每组大鼠各时点 TWL($\bar{x}\pm s$ s)

分 组	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
sham + saline组	8.8±0.72	8.7±0.62	8.6±0.73	8.9±0.69	8.5±0.75	8.6±0.74
sham + Btx-A (30 U/kg)组	8.1±1.03	8.7±0.52	8.7±0.67	8.5±0.68	7.9±0.61	8.9±0.58
CCI + saline组	8.2±1.02	6.7±1.06*	5.9±0.77*	5.3±0.65**	3.8±0.58**	4.1±0.61**
CCI + Btx-A (15 U/kg)组	8.6±1.01	7.9±0.95	7.2±1.01*	6.1±1.05*	5.9±0.88*	6.1±0.84*
CCI + Btx-A (30 U/kg)组	8.2±1.05	7.7±1.06	7.9±1.07	7.8±0.95	8.3±1.08	8.1±1.01

与 sham + saline组同期比较: * P<0.05, ** P<0.01

3 讨 论

肉毒毒素 A 已用于神经病理性疼痛的治疗,如偏头痛、肌肉骨骼性疼痛、难治性三叉神经痛等^[4],取得了满意的临床疗效,然而关于其机制知之甚少。目前研究认为,CCI模型可以引起痛觉过敏(hyperalgesia,简称痛敏)、触诱发痛(allodynia)和自发痛(spontaneous pain)等类似临床的慢性疼痛症状,近年来已成为应用最广泛的神经病理性疼痛模型之一。

在过去的研究中,人们作了大量的研究工作,证实了肉毒毒素 A 外周给药能抑制疼痛的发生,但肉毒毒素 A 是否具有全身作用不得而知。在此背景下,我们开始设计实验观察腹腔注射肉毒毒素 A 的效应。在本研究中,我们观察到腹腔注射肉毒毒素 A 能够抑制大鼠机械性触诱发痛和热痛敏的形成;并且随着剂量的不同,对疼痛的抑制程度也不同。腹腔注射肉毒毒素 A 起到镇痛效应,可能通过以下几条途径起作用:一是肉毒毒素 A 吸收后经血液循环作用于外周伤害性感受器,影响动作电位的发生和传导,从而阻断了疼痛信号的传导,起到抗痛作用;二是肉毒毒素 A 吸收后经血液循环作用于中枢部位,抑制了中枢敏感化,从而使痛阈增高;三是通过干预免疫机制起到抗伤害作用;四是肉毒毒素 A 吸收后经血液循环作用于全身骨骼肌,通过阻断接头前膜乙酰胆碱的释放,使骨骼肌麻痹起作用。在临床工作中,由于肉毒毒素 A 的应用剂量较小,所以通过全身作用的机制起作用的可能性较小。至于其确切镇痛机制,有待于以后的研究与探索。

至于肉毒毒素 A 的作用机制,人们提出了很多

可能的假说,研究发现可能是通过抑制谷氨酸、SP 和降钙素基因相关肽(CGRP)等神经递质的释放,减少了辣椒素受体(TRPV1)的表达,从而抑制了外周敏感化。本实验证实了肉毒毒素 A 能抑制痛敏的形成。也有研究表明,在神经病理性疼痛中免疫系统也起着极为重要的作用。缺乏成熟 T 细胞的大鼠很少发生痛觉过敏。另外,细胞因子、白细胞介素-1、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子-α 在神经病理性疼痛中起作用^[5]。在 CCI 模型中,由于铬制肠线的刺激,产生坐骨神经炎性反应,在该模型中,外来肠线的刺激是惟一的免疫机制。外周神经损伤引发瀑布式的免疫反应,神经损伤导致巨噬细胞浸润, T 细胞激活,促炎性反应细胞因子表达增加。

参考文献:

[1] Klein AW. The therapeutic potential of botulinum toxin[J]. Dermatol Surg 2004, 30(3): 452-455.

[2] Luvisetto S, Marinelli S, Cobiainchi S, et al. Anti-allodynic efficacy of botulinum neurotoxin A in a model of neuropathic pain[J]. Neuroscience 2007, 145(1): 1-4.

[3] 付宝军,朱珊珊,申文,等.鞘内注射米诺四环素对慢性坐骨神经结扎大鼠机械痛敏和热痛敏的影响[J].中国药理学通报,2007,23(7): 921-924.

[4] Park HJ, Lee Y, Lee J, et al. The effects of botulinum toxin A on mechanical and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain[J]. Can J Anesth 2006, 53(5): 470-477.

[5] Zanjani TM, Sabetkasaei M, Mosaffa N, et al. Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain[J]. Eur J Pharmacol 2006, 538(1-3): 66-72.

收稿日期: 2008-03-02 修回日期: 2008-04-20

本文编辑:程春开