

# Akt 抑制剂IV对瑞芬太尼痛觉过敏的预防和治疗作用

隽立芹 马正良 顾小萍

**【摘要】** 目的 观察造模前后鞘内注射 Akt 抑制剂IV对切口痛瑞芬太尼痛觉过敏小鼠痛行为学的影响。方法 C57BL/6 小鼠 40 只, 随机分为 5 组: 切口痛+DMSO 组 (I 组,  $n=8$ )、瑞芬太尼+DMSO 组 (R 组,  $n=8$ ) 造模前给予 Akt 抑制剂IV 0.08  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  组 (A1 组,  $n=8$ )、造模后 6 h 给予 Akt 抑制剂IV 0.08  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  组 (A2 组,  $n=8$ )、造模后 1 d 给予 Akt 抑制剂IV 0.08  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  组 (A3 组,  $n=8$ )。所有分组均在右侧足做切口痛, R 组和各 A 组同时皮下泵注瑞芬太尼 (0.04 mg/kg) 30 min。R 组和各 A 组分别在术前 30 min、术后 6 h、1 d 鞘内给予 10% 二甲基亚砷 (DMSO) 和 Akt 抑制剂IV 10  $\mu\text{l}$ 。于术前 1 d 及术后 6 h、1、2、3、5、7 d 检测各组小鼠右侧后足热缩足潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWTL) 及机械缩足阈值 (paw mechanical withdrawal threshold, PMWT)。结果 与 I 组和基础值比较, R 组术后各时间除术后 7 d 外 PMWT 和 PWTL 均降低 ( $P<0.05$ ); 与 R 组相比, A1、A2 组术后 6 h、1 d、2 d 及 A3 组术后 1 d、2 d 的 PMWT 和 PWTL 明显升高 ( $P<0.05$ ); A1、A2、A3 组的各时间点的 PMWT 和 PWTL 有统计学差异 ( $P<0.05$ )。结论 Akt 参与瑞芬太尼诱导的痛觉过敏, 预先和造模后鞘内注射 Akt 抑制剂IV都能够有效缓解瑞芬太尼诱发的痛觉过敏。

**【关键词】** Akt; 芬太尼; 疼痛, 手术后; 痛觉过敏

**Effects of Akt inhibitor IV on prevention and treatment the hyperalgesia induced by remifentanyl** JUAN Li-qin\*, MA Zheng-liang, GU Xiao-ping. \*Department of Anesthesiology, Drum Tower Hospital, Medical Department of Nanjing University, Nanjing 221002, China

Corresponding author: GU Xiao-ping, Email: xiaopinggu1@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of intrathecal injection of Akt inhibitor IV on the hyperalgesia induced by remifentanyl in a incision pain model. **Methods** Forty C57BL/6 male mice were randomly divided into 5 groups ( $n=8$ ): incision pain+DMSO group (group I), incision pain+remifentanyl+DMSO group (group R), before modeling Akt inhibitor IV 0.08  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  group (group A1), 6h after modeling Akt inhibitor IV 0.08  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  group (group A2), 1d after modeling Akt inhibitor IV 0.08  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  group (group A3). All groups were made model of incisional pain in the right paw, in group R and group A1, A2, A3, remifentanyl (0.04 mg/kg) were infused subcutaneously 30 min at the moment of surgery. All groups were respectively intrathecal injected 10  $\mu\text{l}$  DMSO (10%) and the corresponding concentration of the Akt inhibitor IV 10  $\mu\text{l}$ . Each mouse received tests of the paw mechanical withdrawal threshold (PMWT) and the paw withdrawal thermal latency (PWTL) at the times of 24 h before and 6 h, 1 d, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d after surgery. **Results** Compared with group I and the baseline value, PMWT and PWTL were significantly decreased after surgery except 7 d in group R ( $P<0.05$ ); Compared with group R, PMWT and PWTL were significantly increased after 6 h, 1 d, 2 d of surgery in groups A1, A2 and in group A3 (1 d, 2 d) ( $P<0.05$ ); While there was statistical difference among group A1, A2, A3 ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Intrathecal injection of Akt inhibitor IV can effectively relieve the hyperalgesia induced by remifentanyl on before and after modeling.

**【Key words】** Akt; Remifentanyl; Incisional pain; Hyperalgesia

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.088

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81171047/H0903); 江苏省自然科学基金项目 (BK2010105); 江苏省卫生厅课题项目 (RC2011006)

作者单位: 221002 南京大学医学院附属鼓楼医院麻醉科

通讯作者: 顾小萍, Email: xiaopinggu1@gmail.com

阿片类药物已成为最主流的镇痛药物,其除了产生镇痛作用之外,还能激活体内的促伤害机制,导致机体对疼痛的敏感性增加诱发痛觉过敏(opioid-induced hyperalgesia, OIH),尤其是术中最常用的超短效阿片受体激动剂瑞芬太尼<sup>[1]</sup>。目前对OIH的发生机制还不明确,但随着对OIH机制研究的进展,OIH治疗方法也日益增多,很多药物如NMDA受体拮抗剂<sup>[2]</sup>,一氧化氮合成酶抑制剂、环氧化酶抑制剂、硫酸镁、氯胺酮、右美托咪啶等都被研究过,但因各种原因都不能在临床中常规应用。PI3K/Akt信号通路在辣椒辣素所致的炎性痛,热痛觉过敏,机械性痛觉过敏<sup>[3]</sup>以及神经结扎和神经生长因子<sup>[4]</sup>等诱发的神经病理性疼痛中有重要作用,但是PI3K/Akt信号通路是否参与瑞芬太尼诱导的痛觉过敏尚未见报道。本实验拟通过观察在造模前后鞘内注射Akt抑制剂IV后瑞芬太尼痛觉过敏小鼠痛行为学的变化来探索Akt在OIH中的作用,也为改善OIH提供新的潜在靶点。

## 材料与方 法

### 一、材料

1. 实验动物:SPF级健康雄性C57BL/6小鼠40只(南京市鼓楼医院实验动物中心提供),体重20~25g,7~8周龄,所有实验动物均在层流无菌环境下分笼饲养,室温24~25℃,饲养室采用日光灯照射(12h光照/12h黑暗),每日光照时间8:00~20:00,小鼠自由饮食饮水。所有动物适应喂养1周后进行实验。所有实验严格遵守南京大学动物保护和规定。

2. 主要试剂和仪器:Von Frey纤毛(Stoelting公司,美国);全自动热辐射刺激仪(UGO BASILE 37370 Plantar Test Apparatus,意大利);瑞芬太尼(宜昌人福药业有限责任公司,生产批号1110104);七氟醚(上海恒瑞医药有限责任公司,生产批号1909);Akt抑制剂IV粉剂(1mg/瓶,生产批号D00131472,Merck公司,美国)。

### 二、方法

1. 实验分组:将40只C57BL/6小鼠按随机数字表法分为5组,每组8只。(1)切口痛组(I组)。(2)瑞芬太尼组(R组)。(3)造模前给予Akt抑制剂IV组(A1组)。(4)造模后6h给予Akt抑制剂IV组(A2组)。(5)造模后1d给予鞘内注射Akt抑制剂IV组(A3组)。所有分组右侧足底做切口痛模型,后五组小鼠在造模同时腹部皮下泵注瑞芬太尼(0.04mg/kg)30min,各组小鼠分别在造模前后相应的时间点鞘内注射10% DMSO或者Akt抑制剂IV。

2. 切口痛模型制备和鞘内给药:C57BL/6小鼠七

氟醚麻醉后,仰卧位固定,右后爪消毒、铺单。参照Célrier等<sup>[5]</sup>所描述的方法,用11号刀片在右后爪距脚后跟处做一0.3~0.7cm长的纵向切口,挑起足底的肌肉和筋膜,但保证肌肉的起止及附着完整,轻压止血后,用5-0尼龙丝线缝合皮肤,切口部位涂抹金霉素软膏抗感染。在造模前30min,参照文献介绍的方法,于L5~6棘突间隙进行鞘内穿刺给药,出现特征性甩尾时表明鞘内穿刺成功。

3. 行为学检测:术前7d,将小鼠置于测行为学的试验箱中适应环境,每次1h,每天1次。每次测试行为学前将小鼠置于试验箱中适应至少30min。机械敏测试根据Tal等描述的方法进行。小鼠置于8.5cm×11.5cm×14.0cm的透明有机玻璃箱内,放置于30cm高的铁丝网(网格1cm×1cm)架子上,小鼠于其中自由活动。约1h待小鼠安静后以不同折力的von-Frey纤毛刺激小鼠足底(0.16~1.40g),持续6~8s,刺激间隔至少15s。小鼠后肢出现迅速畏缩、撤回、舔舐,认为是阳性反应。以up-down法计算阈值,根据公式[50%机械缩足阈值=大值-(大值-小值)×(大阳性率-0.5)/(大阳性率-小阳性率)]计算出50%反应阈值。热缩足潜伏期采用Hargreaves等所描述的方法进行检测。小鼠置于底部后玻璃板为8.5cm×11.5cm×14.0cm的透明有机玻璃箱中,用UGO BASILE 373730全自动热辐射刺激仪检测。初次使用前,调节I.R(红外)光源强度,本实验定在I.R=50,使术前小鼠基础缩足阈值在5~15s内。切断时间定为20s。防止组织损伤。光透过玻璃板照射于小鼠后足,当出现下肢的特征性甩动、提足或者舔舐时,记录时间。每只小鼠测试5次,取平均值评估热痛敏的缩足阈值。两次刺激间至少间隔5min。

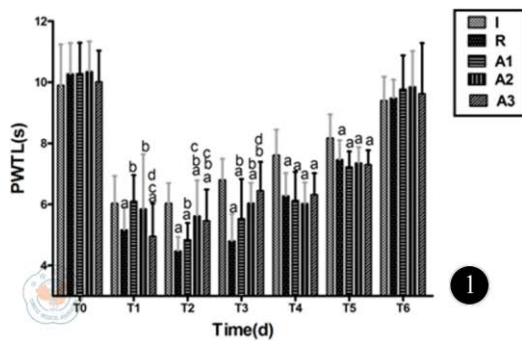
### 三、统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 结 果

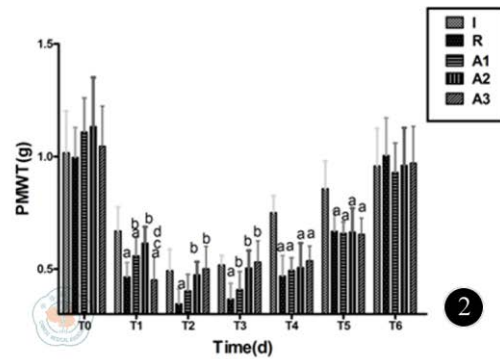
行为学测试时间点术前24h及术后6h、1d、2d、3d、5d、7d分别用T<sub>0</sub>、T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、T<sub>5</sub>、T<sub>6</sub>表示。

1. 小鼠热缩足潜伏期(PWTL)的变化(图1):各组小鼠T<sub>0</sub>和T<sub>6</sub>时的PWTL差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与I组比较,R、A3组T<sub>1</sub>~T<sub>5</sub>时和A1、A2组的T<sub>2</sub>~T<sub>5</sub>时的PWTL值均降低( $P < 0.05$ )。与R组相比,A1、A2、A3组T<sub>1</sub>~T<sub>3</sub>时的PWTL值明显升



注: a: 与I组相比,  $P < 0.05$  b: 与R组相比,  $P < 0.05$   
c: 与A1组相比,  $P < 0.05$  d: 与A2组相比,  $P < 0.05$   
小鼠热缩足阈值的变化 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

图1 各组小鼠不同时间点的PWTL



注: a: 与I组相比,  $P < 0.05$  b: 与R组相比,  $P < 0.05$   
c: 与A1组相比,  $P < 0.05$  d: 与A2组相比,  $P < 0.05$   
小鼠机械缩足阈值的变化 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

图2 各组小鼠不同时间点的PMWT

高 ( $P < 0.05$ )。

2. 小鼠机械缩足反射阈值 (PMWT) 的变化 (图2): 各组小鼠  $T_0$  和  $T_6$  时的 PMWT 之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 I 组比较, R、A1 组的  $T_1 \sim T_5$  时和 A2、A3 组的  $T_2 \sim T_5$  时的 PMWT 值均降低 ( $P < 0.05$ )。与 R 组相比, A1、A2、A3 组  $T_1 \sim T_3$  时的 PMWT 值明显升高 ( $P < 0.05$ )。

### 讨论

本实验采用研究广泛、技术相对成熟, 而且一些疼痛敏感性特点与人类极为相似, 能够部分模拟开腹和人类急性疼痛模型的切口痛-瑞芬太尼痛觉过敏模型, 为解决临床问题提供更直接有效的证据。活化的 Akt 通过激活或抑制下游靶蛋白, 如  $I\kappa\beta$  激酶 (IKK)、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS)、糖原合成酶激酶 3 (glycogen synthase kinase 3, GSK3) 等, 调节细胞功能。PI3K/Akt 信号通路在神经系统中的作用日益受到关注。发现 PI3K/Akt 信号通路参与了长时程增强 (long term potentiation, LTP) 和长时程抑制 (long term depression, LTD) 的突触重塑<sup>[6]</sup>及神经损伤的疼痛超敏反应, 磷酸化 Akt (p-Akt) 可以作为 DRG 伤害性神经元的激活标志。瑞芬太尼诱发的切口痛模型中是否存在 PI3K/Akt 信号通路的改变, 是本研究将要明确的问题之一。

实验结果显示, 与 I 组相比, R、A1、A2、A3 组术后 PMWT 和 PWTL 均降低, 表明切口痛瑞芬太尼痛觉过敏模型制备成功。与 R 组相比, A1、A2、A3 组术后 3 d 内的痛行为学数值均明显升高, 说明 Akt 抑制剂 IV 可以有效地预防和改善瑞芬太尼诱发的痛觉过敏。A1、A2、A3 组术后 3 d、5 d 的 PWTL 和 PMWT 与 R 组无差异, 提示 Akt 抑制剂的作用时间大约持续 2 d。Akt 抑制剂能完全逆转机械痛敏但只能部分缓解

热痛敏, 提示 Akt 在机械痛敏和热痛敏中发挥的作用不完全相同。总之行为学的结果证明造模前后鞘内给予 Akt 抑制剂 IV 都能明显缓解瑞芬太尼所致的痛觉过敏。

NMDA 受体参与神经病理性痛的形成和维持<sup>[7]</sup>, 其 NR2B 亚基的磷酸化对突触可塑性和 LTP 的发生有重要影响, 而 LTP 与 OIH 有共同的药理学和信号转导路径<sup>[8]</sup>。也有研究证实瑞芬太尼所致术后痛敏与 NMDA 受体有关<sup>[9]</sup>, 瑞芬太尼作用于  $\mu$  受体后通过激活蛋白激酶 C 而活化 NMDA 受体, 瑞芬太尼也可直接激活 NMDA 受体<sup>[10]</sup>。NMDA 受体可以激活 Akt<sup>[11]</sup>, p-Akt 亦能增强 NMDA 受体的功能<sup>[12]</sup>, 而且 Akt 还调节下游多种疼痛相关物质。还发现 Akt 能激活 eNOS 上的 Ser-1179 位点, 使对 LTP 有诱导作用的 NO 的产生增加, 而 NO 参与了 OIH 的形成和维持<sup>[13]</sup>。另外 Akt 能诱导 cAMP 反应原件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 的磷酸化和 CREB 靶基因的表达<sup>[14]</sup>, 促进 NR2B 亚基转录。还有实验证实 GSK-3 $\beta$  参与 NMDA 受体的胞膜转运过程, 应用 GSK-3 $\beta$  抑制剂可以部分逆转瑞芬太尼导致的痛觉过敏<sup>[15]</sup>, 我们猜测鞘内注射 Akt 抑制剂 IV 可能是通过减少 eNOS、CREB 和 GSK-3 $\beta$  等的磷酸化最终降低 NMDA 受体的数量和活性, 减轻痛觉过敏。

综上所述, Akt 参与瑞芬太尼诱导的痛觉过敏过程, 造模前后鞘内注射 Akt 抑制剂 IV 都能有效的改善瑞芬太尼诱发的痛觉过敏, Akt 可能是治疗 OIH 的潜在靶点之一。但研究还发现吗啡可以通过 PI3K/Akt 信号通路的激活对 P2X4 受体信号的调制导致在痛觉过敏中发挥重要作用的小胶质细胞的迁移<sup>[16]</sup>, Akt 还能激活 NF- $\kappa$ B, 而阻断 NF- $\kappa$ B 可以减轻慢性压迫性神经损伤后的疼痛行为学和炎症反应<sup>[17]</sup>, NF- $\kappa$ B 也调节很多基因的表达, 如细胞因子、iNOS 等参与炎症、中枢

神经系统损伤和神经病理性疼痛。所以对于 Akt 在瑞芬太尼诱发的痛觉过敏中复杂的调控机制还有待更进一步的研究探索。

### 参 考 文 献

- [1] Chu LF, Cun T, Ngai LK, et al. Modulation of remifentanyl-induced postinfusion hyperalgesia by the  $\beta$ -blocker propranolol in humans. *Pain*, 2012, 153: 974-981.
- [2] 刘玥, 郑亚国, 顾小萍, 等. NMDA 受体拮抗剂预防瑞芬太尼诱发术后痛觉过敏的效果: Meta 分析. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31: 1170-1174.
- [3] Cunha TM, Souza GR, Domingues AC, et al. Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3K $\gamma$ /AKT/nNOS/NO signaling pathway. *Mol Pain*, 2012, 8: 10.
- [4] Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, et al. IL-6- and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex. *J Neurosci*, 2010, 30: 15113-15123.
- [5] Célérier E, González JR, Maldonado R, et al. Opioid-induced hyperalgesia in a murine model of postoperative pain: role of nitric oxide generated from the inducible nitric oxide synthase. *Anesthesiology*, 2006, 104: 546-555.
- [6] Racaniello M, Cardinale A, Mollinari C, et al. Phosphorylation changes of CaMKII, ERK1/2, PKB/Akt kinases and CREB activation during early long-term potentiation at Schaffer collateral-CA1 mouse hippocampal synapses. *Neurochem Res*, 2010, 35: 239-246.
- [7] Qu XX, Cai J, Li MJ, et al. Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*, 2009, 215: 298-307.
- [8] Drdla R, Gassner M, Gingl E, et al. Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal. *Science*, 2009, 325: 207-210.
- [9] Gu X, Wu X, Liu Y, et al. Tyrosine phosphorylation of the N-Methyl-D-Aspartate receptor 2B subunit in spinal cord contributes to remifentanyl-induced postoperative hyperalgesia: the preventive effect of ketamine. *Mol Pain*, 2009, 5: 76.
- [10] Hahnenkamp K, Nollet J, Van Aken HK, et al. Remifentanyl directly activates human N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Anesthesiology*, 2004, 100: 1531-1537.
- [11] Wang Y, Wang J, Wang S, et al. Adaptor protein APPL1 couples synaptic NMDA receptor with neuronal prosurvival phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Neurosci*, 2012, 32: 11919-11929.
- [12] Sánchez-Pérez AM, Llansola M, Felipe V. Modulation of NMDA receptors by AKT kinase. *Neurochem Int*, 2006, 49: 351-358.
- [13] Makuch W, Mika J, Rojewska E, et al. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine- and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology*, 2013, 75: 445-457.
- [14] Kato S, Ding J, Du K. Differential activation of CREB by Akt1 and Akt2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354: 1061-1066.
- [15] 元元, 王晶瑶, 苑方, 等. 糖原合成酶激酶-3 $\beta$  在切口痛-瑞芬太尼痛觉过敏大鼠脊髓含 NR1 及 NR2B 亚基的 NMDA 受体转运中的作用. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32: 787-790.
- [16] Horvath RJ, DeLeo JA. Morphine enhances microglial migration through modulation of P2X4 receptor signaling. *J Neurosci*, 2009, 29: 998-1005.
- [17] Niederberger E, Geisslinger G. The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? *FASEB J*, 2008, 22: 3432-3442.

(收稿日期: 2013-09-30)

(本文编辑: 吴莹)

雋立芹, 马正良, 顾小萍. Akt 抑制剂 IV 对瑞芬太尼痛觉过敏的预防和治疗作用 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(23): 10780-10783.

中 华 临 床 医 师 杂 志