

新型 CDK5 抑制剂 Dinaciclib 对幼年大鼠急性切口痛行为学的影响

张莉¹, 王军^{2*}, 肖杭², 石林玉¹, 杨磊¹, 屈美敏¹, 贾建¹

¹南京医科大学附属儿童医院麻醉科, 江苏 南京 210008; ²南京医科大学公共卫生学院神经毒理研究室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 观察鞘内给予新型细胞周期依赖性激酶5(cyclin-dependent kinases 5, CDK5)抑制剂 Dinaciclib后, 幼年大鼠急性切口痛疼痛行为学的变化。方法: 45只SD清洁级7~21 d幼年大鼠(简称幼鼠)随机分为3组, 空白对照组(C组)、切口痛组(I组)、切口痛给药组(D组), 每组15只。除C组外, I组及D组均做切口痛模型; 各组均在造模前1 d同一时间行鞘内穿刺给药。各处理组分别在造模前24 h(T0)、造模后2 h(T1)、造模后6 h(T2)、造模后12 h(T3)、造模后24 h(T4)检测幼鼠术侧机械缩足阈值(paw mechanical withdrawal threshold, PMWT)及热缩足潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL)。结果: 各组造模前基础PMWT和PWTL比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与C组及造模前相比, I组造模后2 h、6 h术侧PMWT和PWTL显著降低($P < 0.05$); 与I组相比, D组大鼠在造模后2 h, PMWT和PWTL开始升高($P < 0.05$)。结论: 鞘内预先注入新型CDK5抑制剂Dinaciclib可有效缓解幼鼠术后急性切口痛。

[关键词] 新型CDK5抑制剂; Dinaciclib; 幼年大鼠; 急性切口痛; 疼痛行为学

[中图分类号] R614.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)09-1212-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20180908

疼痛是与实际或潜在组织损伤相关联的不愉快的感觉和情绪体验。临床上, 作为特殊群体的小儿尤其是婴幼儿, 虽不具备完整的交流能力, 但手术疼痛实际存在。这种疼痛将会产生术后恢复期长期的行为学改变及对疼痛的耐受力降低^[1]。细胞周期依赖性激酶5(cyclin-dependent kinases 5, Cdk5)与神经系统发育、神经系统的突触可塑性及神经元正常功能的维持密切相关^[2]。有研究显示, 初级感觉神经元和脊髓背角神经元中Cdk5的过表达在疼痛中起重要作用^[3]。本研究团队成员既往研究发现, 鞘内注射Cdk5特异性抑制剂Roscovitine可有效缓解背根神经节慢性压迫模型(chronic compression of DRG, CCD)大鼠的疼痛^[4], 但Cdk5在急性疼痛中的作用及机制尚需进一步探讨。本研究以伤害性信息传入的第1站脊髓背角为研究部位, 采用出生7~21 d幼鼠经典Brennan切口痛模型^[5], 模拟1~3岁儿童术后疼痛状态, 通过鞘内注射Cdk5新型拮抗剂Dinaciclib, 以机械性和热刺激痛敏方法观察幼鼠术后疼痛的行为学变化。

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2015NJMUZD054)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangjun@njmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

Dinaciclib(selleck chemicals公司, 美国), 溶于0.1%的DMSO。造模前按照Hylden等^[6]描述的方法进行鞘内注射, 在幼鼠脊柱L4~5或L5~6水平用微量进样器将药液注射到鞘内。七氟醚(批号: 11123131, 江苏恒瑞医药股份有限公司)、von Frey纤毛(Stoelting公司, 美国), ME-410A型热辐射刺激仪(中国医学科学院生物医学研究所)。

幼年(出生7~21 d)健康SD清洁级雄性大鼠45只, 体重50~65 g(北京维通利华动物技术有限公司)。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(12 h光照/12 h黑暗), 每日光照时间8:00至20:00, 幼鼠自由饮食饮水, 隔音条件下饲养^[7]。实验前适应饲养1周。

1.2 方法

1.2.1 切口痛模型的建立

参照Brennan的方法制备切口痛模型。幼鼠吸入1%七氟醚麻醉后, 俯卧位固定, 右后爪跖肌外进行碘伏消毒, 铺无菌洞单准备, 用11号刀片从足底近端0.5 cm处向趾部纵向作一长0.7~1.0 cm的切口, 切开皮肤后, 用眼科镊挑起足底肌肉并纵向切

割,但保持肌肉的起止及附着完整。按压止血后用5-0尼龙丝线缝合皮肤。整个手术过程约5 min。手术切口以碘伏消毒并覆盖金霉素软膏抗感染,幼鼠置于安静、温暖、避强光的环境中喂养。

1.2.2 实验分组及处理

采用随机数字表法将45只幼鼠分为3组,每组15只。对照组(C组):鞘内注射0.1% DMSO 5 μ L;切口痛组(I组):鞘内注射0.1% DMSO 5 μ L,于注射后30 min制备切口痛模型;切口痛给药组(D组):鞘内注射含5 μ g Dinaciclib的0.1% DMSO 5 μ L,于注射后30 min制备切口痛模型。鞘内注射方法:幼鼠背部碘伏消毒后,经L4~5或L5~6椎间隙行鞘内穿刺给药,以幼鼠出现特征性甩尾提示穿刺成功。

1.2.3 痛阈的测定

术前5~7 d将幼鼠置于行为学实验观察箱中适应环境,每次30 min,每天1次。于造模前24 h(T0)、造模后2 h(T1)、造模后6 h(T2)、造模后12 h(T3)和造模后24 h(T4)时测定痛阈。测试前幼鼠均置于测试箱中适应至少30 min。参照Chaplan等^[8]的方法测定机械缩足阈(paw mechanical withdrawal threshold, PMWT)。纤毛垂直针刺幼鼠趾部皮肤,力量要足够使纤毛弯曲,维持6~8 s,刺激间隙至少为15 s。脚爪的迅速回缩认为是1次阳性反应。根据贯序地增加或降低刺激强度确定幼鼠的PMWT(up-and-down法)。每个刺激强度测试5次,3次或以上阳性反应的最小纤毛强度作为PMWT值。参照Hargreaves等^[9]方法测定热缩足阈(paw withdrawal thermal latency, PWTL)。幼鼠置于底部玻璃板为8.5 cm \times 11.5 cm \times 14.0 cm的透明有机玻璃箱中,热辐射刺激仪照射幼鼠足底紧贴玻璃板部位,记录照射开始至幼鼠出现抬足或者舔舐的时间,切断时间定为20 s。重复测试5次,至少间隔5 min,取平均值为PWTL值。

1.3 统计学方法

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

2 结果

2.1 PMWT检测

在造模前1 d(T0)行疼痛行为学测试,3组之间PMWT差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后T1及T2时,I组幼鼠的PMWT均较T0降低($P < 0.05$),T3

时恢复到T0水平($P > 0.05$),说明模型构建成功。

D组造模后2 h PMWT为(6.71 \pm 1.10)g,与C组比差异有统计学意义($P < 0.05$);造模后6 h增加到(12.83 \pm 2.19)g,造模后12 h PMWT为(12.88 \pm 2.42)g,造模后24 h PMWT为(14.83 \pm 3.01)g,与C组水平相当($P > 0.05$)。提示D组造模后T1时PMWT较造模前降低,T2时就恢复到造模前水平(图1A)。

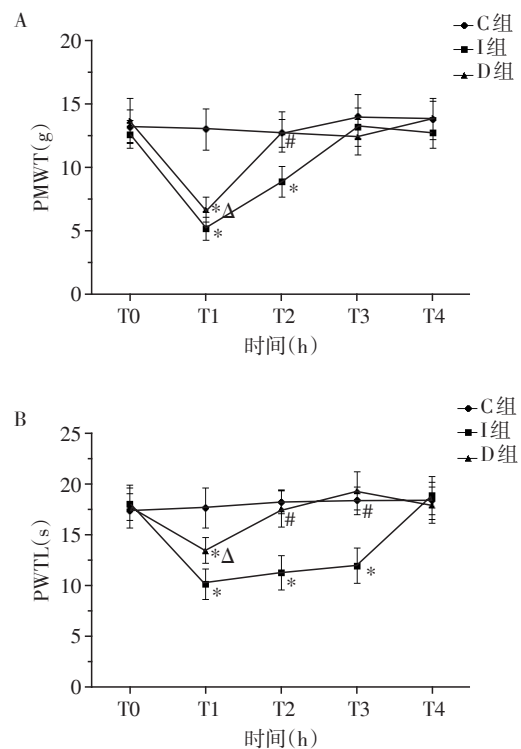
2.2 PWTL检测

在造模前1 d(T0)行疼痛行为学测试,3组之间PMTL差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后T1~T3时,I组幼鼠的PWTL均较T0水平降低($P < 0.05$),T4时恢复到T0水平($P > 0.05$),说明模型构建成功。

D组造模后2 h PWTL为(13.41 \pm 2.18)s,与C组比差异有统计学意义($P < 0.05$);造模后6 h PWTL延长到(17.55 \pm 2.07)s,造模后12 h为(19.38 \pm 3.12)s,造模后48 h后PWTL为(17.90 \pm 2.28)s,与C组差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示D组造模后T1时PWTL较造模前降低,T2时起恢复至造模前水平(图1B)。

3 讨论

儿童术后疼痛会导致恢复期后长期的行为学



A: 各组PMWT比较; B: 各组PWTL比较。与C组比较,* $P < 0.05$; 与I组相应时间点比较,# $P < 0.05$; 与D组T0时间点比较, $\Delta P < 0.05$ 。

图1 鞘内注射Dinaciclib对切口痛幼鼠PMWT和PWTL的影响

改变及对疼痛耐受力降低。目前,对儿童术后疼痛的研究较少,因此研究儿童的疼痛机制具有临床现实意义。

有关小儿术后急性切口痛的发病机制目前仍不清楚。除外科伤口对神经末梢的机械性损伤引起的伤害性感受外,组织损伤后周围和中枢神经系统敏感性改变也是引起术后疼痛的主要原因^[10]。手术切开刺激可激活脊髓背角神经元细胞,术后持续性疼痛状态与中枢神经元的长时间变化有关。因此抑制脊髓背角神经元的敏化,是有效减轻术后疼痛的理想方向。

Cdk5属细胞周期素依赖性蛋白激酶家族成员,可磷酸化丝氨酸和苏氨酸残基,与神经系统发育、神经元正常功能的维持密切相关,参与发育过程中神经元迁移、神经突起生长、轴突运输、胞吐及药物成瘾等过程。Cdk5大部分以单体形式存在,没有激酶活性,只有与调节因子p35结合才表现激酶活性^[11]。Cdk5/p35在初级感觉神经元和脊髓背角神经元中都有表达,可调节突触前和突触后信号转导通路。Cdk5与其许多底物存在相互作用,Shah等^[12]报道了Cdk5/p35不仅对疼痛过程中MEK-ERK通路有显著影响,而且还发现在信号转导中Cdk5与MAPK间的相互作用。CaMK II在伤害性疼痛的传导过程中起重要作用^[13],而Cdk5与其信号转导通路有关^[14]。Cdk5通过磷酸化NMDA受体和TRPV1来调节痛觉过敏中出现的钙内流^[15],表明Cdk5/p35依赖性的因子参与了急性疼痛信号。

Cdk5抑制剂在术后疼痛中的作用报道较少,尤其在小儿术后疼痛方面。本课题组前期研究发现,对CCD大鼠鞘内注射Cdk5特异性抑制剂Roscovitine,可减轻其慢性病理性疼痛。但Roscovitine仅在动物实验中证实存在疼痛抑制作用,尚未应用于临床。Dinaciclib(SCH727965)是2013年研制出的一种新型有效的Cdk5抑制剂,IC₅₀为1 nmol/L,具有比Roscovitine更强的Cdk5抑制作用及更小的不良反应,临床上已将其用于肿瘤治疗,但其在急性疼痛中的作用尚缺乏研究。

本研究中幼鼠于手术后表现出自发性痛、触诱发痛和痛觉过敏,与临床术后疼痛相似。幼鼠在足底切开后,切口周围皮肤充血、肿胀,表现出不同程度的舔足或抬足行为。3组幼鼠造模前PMWT及PWTL比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后2 h起切口痛组(I组)PMWT及PWTL均出现降低,说明急性切口产生了疼痛,并随时间延长疼痛行为

学逐渐缓解,PMWT造模后12 h恢复到基础水平,PWTL造模后24 h恢复到基础水平。鞘内注射5 μ g Dinaciclib后,造模后2 h切口痛给药组(D组)幼鼠PMWT及PWTL均较基础水平降低,造模后6 h时就恢复到造模前水平,提示Dinaciclib对于切口痛有缓解作用,揭示了Cdk5在切口痛中的重要作用。

针对急性切口痛的研究显示,急性切口痛的产生与脊髓多种兴奋性氨基酸受体和神经递质有密切关系。NMDA受体(NMDA receptor, NR)作为兴奋性氨基酸受体的主要亚型,在组织损伤、炎症及外周神经损伤引起的疼痛中起重要作用^[16]。有研究证实NMDA受体2B亚基(NMDA receptor 2B subunit, NR2B)在疼痛中枢敏化的形成中起重要作用,痛觉过敏与脊髓的NR2B水平密切相关,疼痛发生后脊髓背角NR2B和p-NR2B表达增高^[17]。而课题组前期研究发现,在CCD大鼠中,可通过抑制脊髓背角NMDA受体2A亚基(NMDA receptor 2A subunit, NR2A)表达水平上调来缓解其慢性病理性疼痛^[4]。在脊髓水平, NR主要存在于背角的胶状质,在灰质中表达较低^[18],因而,本研究选择脊髓背角为研究部位。本研究下一步将通过在鞘内注射Cdk5新型拮抗剂Dinaciclib后,取幼鼠脊髓组织进行免疫组化及Western blot,观察脊髓背角NR表达及磷酸化水平的变化,探讨NR与Cdk5的关系。

总之该研究结果提示,Cdk5可能参与术后疼痛的信号转导机制,鞘内注射新型Cdk5的特异性拮抗剂Dinaciclib可对幼鼠切口痛起缓解作用,从而为临床治疗小儿术后疼痛提供新思路,但其作用机制和途径仍需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Rybojad B, Goniewicz M, Sieniawski D. Pediatric pain management-what are we able to do in polish emergency medical services[J]. *Wiad Lek*, 2016, 69(3):548-554
- [2] Xu BZ, Kumazawa A, Kobayashi S, et al. Cdk5 activity is required for Purkinje cell dendritic growth in cell-autonomous and non-cell-autonomous manners[J]. *Dev Neurobiol*, 2017, 77(10):1175-1187
- [3] Mushtaq G, Greig NH, Anwar F, et al. Neuroprotective mechanisms mediated by CDK5 inhibition[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(5):527-534
- [4] Yang L, Gu X, Zhang W, et al. Cdk5 inhibitor roscovitine alleviates neuropathic pain in the dorsal root ganglia by downregulating N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2A [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(9):1365-1371

(下转第1239页)

- [15] Pomp ER, Rosendaal FR. Smoking increases the risk of venous thrombosis and acts synergistically with oral contraceptive use[J]. *Am J Hematol*, 2008, 83(2):97-102
- [16] Hrdy O, Strazevska E, Suk P, et al. Central venous catheter-related thrombosis in intensive care patients - incidence and risk factors: A prospective observational study [J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2017, 161(4):369-373
- [17] Thomas GM, Brill A, Mezouar S, et al. Tissue factor expressed by circulating cancer cell-derived microparticles drastically increases the incidence of deep vein thrombosis in mice [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(7):1310-1319
- [18] Kim V, Goel N, Gangar J, et al. Risk factors for venous thromboembolism in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chronic Obstr Pulm Dis*, 2014, 1(2):239-249
- [19] 王燕玲,何 丽,王燕燕,等. 非小细胞肺癌合并静脉血栓栓塞症危险因素分析[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2017, 9(8):126-129
- [20] Davidsson E, Murgia N, Ortiz-Villalón C, et al. Mutational status predicts the risk of thromboembolic events in lung adenocarcinoma [J]. *Multidiscip Respir Med*, 2017, 12(1):16
- [21] 潘丽霞,李 娜,高文京,等. 浙江省非小细胞肺癌患者EGFR基因与EML4-ALK融合基因突变的检测及其临床特征[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7):830-834
- [22] Adelborg K, Horvath-Puho E, Sundboll JA, et al. Risk and prognosis of cancer after upper-extremity deep venous thrombosis: A population-based cohort study [J]. *Thromb Res*, 2018, 161:106-110
- [23] 丁宏辉,黄河澄,彭伟鹏,等. 原发性肺癌并发静脉血栓栓塞症临床特征及结局研究[J]. *中国基层医药*, 2015, 22(2):220-223
- [24] Huang H, Korn JR, Mallick R, et al. Incidence of venous thromboembolism among chemotherapy-treated patients with lung cancer and its association with mortality: a retrospective database study [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2012, 34(4):446-456
- [收稿日期] 2018-03-30

(上接第1214页)

- [5] Mamet J, Klukinov M, Yaksh TL, et al. Single intrathecal administration of the transcription factor decoy AYYX1 prevents acute and chronic pain after incisional, inflammatory, or neuropathic injury [J]. *Pain*, 2014, 155(2):322-333
- [6] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice, a new technique [J]. *Eur J Pharmacol*, 1980, 67(2/3):313-316
- [7] 杨 慧,许波进,郑旭琴,等. 多氯联苯118引起大鼠甲状腺炎症反应的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(5):622-625
- [8] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63
- [9] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1):77-88
- [10] Moultrie F, Slater R, Hartley C. Improving the treatment of infant pain [J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2017, 11(2):112-117
- [11] He H, Deng K, Siddiq MM, et al. Cyclic AMP and polyamines overcome inhibition by myelin-associated glycoprotein through eIF5A-mediated increases in p35 expression and activation of Cdk5 [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(10):3079-3091
- [12] Shah K, Lahiri DK. Cdk5 activity in the brain - multiple paths of regulation [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(11):2391-2400
- [13] Harrison BJ, Flight RM, Gomes C, et al. IB4-binding sensory neurons in the adult rat express a novel 3' UTR-extended isoform of CaMK4 that is associated with its localization to axons [J]. *J Comp Neurol*, 2014, 522(2):308-336
- [14] Liang Z, Zhan Y, Shen Y, et al. The pseudokinase CaMKv is required for the activity-dependent maintenance of dendritic spines [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:13282
- [15] Jendryke T, Prochazkova M, Hall BE, et al. TRPV1 function is modulated by Cdk5-mediated phosphorylation, insights into the molecular mechanism of nociception [J]. *Sci Rep*, 2016, 6, 22007
- [16] Mizumura K, Murase S. Role of nerve growth factor in pain [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2015, 227:57-77
- [17] Plattner F, Hernández A, Kistler TM, et al. Memory enhancement by targeting Cdk5 regulation of NR2B [J]. *Neuron*, 2014, 81(5):1070-1083
- [18] Iacobucci GJ, Popescu GK. NMDA receptors, linking physiological output to biophysical operation [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18(4):236-249
- [收稿日期] 2017-07-01