

甲苯噻嗪通过抑制超极化激活环核苷酸门控 离子通道电流产生镇痛作用机制研究*

陈烽烽¹, 黎 磊¹, 陈向东^{2△}, 周 诚³, 廖大清³

1. 四川大学华西医院 华西磁共振研究中心(成都 610041);
2. 华中科技大学同济医学院协和医院 麻醉与危重病医学研究所 麻醉科(武汉 430022);
3. 四川大学华西医院 麻醉与危重急救研究室(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨甲苯噻嗪(xylazine, Xyl)通过抑制超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated, HCN)电流产生镇痛作用的机制。**方法** 对 HCN 亚型通道 1(HCN1)基因敲除小鼠(HCN1^{-/-})及 HCN1 野生型小鼠(HCN1^{+/+})分别腹腔注射生理盐水及 Xyl(10、20、30 和 40 mg/kg),通过进行机械痛觉测试及甩尾试验方法检测 Xyl 的镇痛效果,计算出最大镇痛效应百分比(percent maximum possible effect, %MPE);HEK 293 细胞转染 HCN1 质粒和 HCN 亚型通道 2(HCN2)质粒,分为对照组及不同浓度 Xyl(12.5、25、50 和 100 μ mol/L)实验组,利用全细胞膜片钳记录表达 HCN1 和 HCN2 离子通道的 HEK 293 细胞超极化激活电流(hyperpolarization-activated currents, I_h),计算 Xyl 对 I_h 的抑制率。**结果** HCN1^{+/+}小鼠和 HCN1^{-/-}小鼠注射 Xyl 后对机械痛觉刺激和热辐射刺激反应的 %MPE 均为随着 Xyl 质量浓度增加而加大,当 Xyl 质量浓度为 30 mg/kg 及 40 mg/kg 时,HCN1^{-/-}小鼠机械痛觉刺激测试的 %MPE 为(62.06 $\pm$ 14.72)%和(69.92 $\pm$ 16.09)%;甩尾试验 %MPE 为(52.50 $\pm$ 1.97)%和(64.74 $\pm$ 6.34)%。HCN1^{+/+}小鼠机械痛觉刺激测试的 %MPE 为(75.47 $\pm$ 8.06)%和(86.35 $\pm$ 11.31)%;甩尾试验 %MPE 为(57.83 $\pm$ 4.82)%和(74.98 $\pm$ 9.35)%,等量 Xyl 对 HCN1^{+/+}小鼠与 HCN1^{-/-}小鼠的镇痛作用(机械痛觉刺激和甩尾试验)差异有统计学意义($P<0.05$)。全细胞膜片钳试验结果显示,Xyl 对 HCN1 及 HCN2 离子通道电流均产生了抑制作用,Xyl(12.5~100 μ mol/L)对 HCN1 的 I_h 的抑制率为(24.62 $\pm$ 23.62)%~(62.40 $\pm$ 15.48)%;HCN1 的半数激活电压($V_{1/2}$)为:(-79.58 $\pm$ 1.56) mV~(-98.95 $\pm$ 3.57) mV。Xyl 对 HCN2 的 I_h 的抑制率为(29.19 $\pm$ 17.82)%~(80.02 $\pm$ 6.64)%;HCN2 的 $V_{1/2}$ 为:(-102.17 $\pm$ 1.36) mV~(-117.48 $\pm$ 2.38) mV。**结论** Xyl 对 HCN1^{+/+}小鼠的镇痛效果比 HCN1^{-/-}小鼠更好。Xyl 可能是通过抑制 HCN 离子通道电流,从而产生镇痛作用。

【关键词】 甲苯噻嗪 超极化激活环核苷酸门控离子通道 α_2 -肾上腺素受体激动剂 镇痛

Xylazine Produced Analgesic Effect via Inhibits Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Ion Channels Currents CHEN Feng-feng¹, LI Lei¹, CHEN Xiang-dong^{2△}, ZHOU Cheng³, LIAO Da-qing³. 1. *Huaxi MR Research Center (HMRRC), West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;* 2. *Department of Anesthesiology, Institute of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China;* 3. *Laboratory of Anesthesia and Critical Care Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

△ Corresponding author, E-mail: xiangdongchen2013@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the analgesic mechanism of xylazine by inhibiting the activation of hyperpolarized cyclic nucleotide-gated (HCN) ion channels. **Methods** HCN subchannel 1 (HCN1) knockout mice (HCN1^{-/-}) and HCN1 wild type mice (HCN1^{+/+}) were intraperitoneally injected with physiological saline and xylazine (10, 20, 30, and 40 mg/kg). Mechanical pain test and tail flick test were used to test the analgesic effect of xylazine by using the percentage of the maximal possible effect (%MPE); The control group and test groups of different concentrations of xylazine (12.5, 25, 50, and 100 μ mol/L) were set up using HEK 293 cells transfected HCN1 plasmid and HCN subchannel 2 (HCN2) plasmid, respectively. The activated current of hyperpolarized HEK 293 cells expressing HCN1 and HCN2 ion channels and the inhibition rate of xylazine on hyperpolarization-activated currents were recorded using a whole cell patch clamp. **Results** The results demonstrated that %MPE of the mechanical pain stimuli test and the thermal radiation stimuli test increased with the higher concentration of xylazine injected for both HCN1^{+/+} mice and HCN1^{-/-} mice. When injecting xylazine by 30 mg/kg and 40 mg/kg,

* 国家自然科学基金(No. 81401139)资助

△ 通信作者, E-mail: xiangdongchen2013@163.com

the %MPE of mechanical pain stimuli test for HCN1^{-/-} mice were %MPE=(62.06±14.72)% and %MPE=(69.92±16.09)%, respectively; and the percentages of tail flick tests were (52.50±1.97)% and %MPE=(64.74±6.34)%, respectively. But for HCN1^{+/+} mice, the percentages of mechanical pain stimuli test were %MPE=(75.47±8.06)% and %MPE=(86.35±11.31)%; respectively, and the percentage of tail flick tests were %MPE=(57.83±4.82)% and (74.98±9.35)%. The analgesic effect results of the mechanical pain test and tail flick test of HCN1^{+/+} mice were significantly different from HCN1^{-/-} mice ($P<0.05$). Whole-cell patch clamp test results showed that xylazine had inhibitory effects on the currents of HCN1 and HCN2 ion channels, and the hyperpolarization-activated currents inhibition rate of HCN1 by xylazine (12.5-100 μmol/L) was between (24.62±23.62)%-(62.40±15.48)%; $V_{1/2}$ of HCN1 was between (-79.58±1.56) mV-(-98.95±3.57) mV. The I_h inhibition rate of HCN2 by xylazine (12.5-100 μmol/L) was between (29.19±17.82)%-(80.02±6.64)%; with $V_{1/2}$ of HCN2 between (-102.17±1.36) mV-(-117.48±2.38) mV. **Conclusion** Xylazine showed better analgesic effect on HCN1^{+/+} mice than HCN1^{-/-} mice. Xylazine can produce analgesic effect by inhibiting HCN ion channel currents.

【Key words】 Xylazine Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels α₂-adrenergic receptor agonist Analgesia

甲苯噻嗪(Xylazine, Xyl)是一种具有镇静、镇痛及中枢性肌肉放松作用的 α₂-肾上腺素受体激动剂^[1],是动物常用的制动剂和麻醉诱导剂。α₂-肾上腺素受体激动剂因其具有神经保护、心脏保护及镇静镇痛等作用,并能增强其它注射麻醉剂和吸入麻醉剂的麻醉效果,故在临床麻醉的应用越来越广泛^[2]。α₂-肾上腺素受体广泛分布于外周神经及中枢神经系统,而目前对 α₂-肾上腺素受体激动剂通过对中枢神经系统的离子通道产生镇静、镇痛的作用机制还不是非常明确。超极化激活环核苷酸门控离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated, HCN)因其独特的电生理学特性,在心脏的起搏和神经系统中起着重要作用^[3]。相关研究表明,麻醉药品可通过抑制 HCN 离子通道电流,从而产生麻醉效用^[4]。为了解 Xyl 是否通过 HCN 离子通道发挥镇痛作用,本研究通过对 HCN 亚型通道 1(HCN1)基因敲除小鼠(HCN1^{-/-})及 HCN1 野生型小鼠(HCN1^{+/+})腹腔注射 Xyl,观察其对小鼠的镇痛效果,并利用全细胞膜片钳技术,观察 Xyl 对表达 HCN1 和 HCN 亚型通道 2(HCN2)的 HEK 293 细胞超极化激活电流(hyperpolarization-activated currents, I_h)抑制率的影响,进一步探讨 Xyl 镇痛作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

HCN1 基因敲除小鼠(HCN1^{-/-})和 HCN1 野生型小鼠(HCN1^{+/+})通过由 HCN1^{+/-}小鼠^[5-6](美国弗吉尼亚大学药理学系馈赠)与 C57BL/6 小

鼠杂交繁殖后,获得的同窝次小鼠,并通过利用实时定量 PCR 技术^[7]鉴定区别 HCN1^{-/-}小鼠或 HCN1^{+/+}小鼠。小鼠体质量 20~25 g,8~12 周龄。小鼠饲养条件为每笼 5 只,室温(22±3)℃,湿度为 40%~60%,12 h 的黑白交替群居饲养,自由摄入食物和水。

1.2 细胞和主要试剂

HEK 293 细胞、HCN1 质粒和 HCN2 质粒(美国弗吉尼亚大学药理学系馈赠)。DMEM/F12 细胞培养基、Lipofectamine 2000、胎牛血清、GFP 质粒(Gibco 公司)。实验中的动物用药品均使用生理盐水溶解。Xyl、进行全细胞膜片钳电生理记录实验时使用的化学试剂均购自 Sigma 公司。

1.3 动物分组及给药

HCN1^{-/-}小鼠和 HCN1^{+/+}小鼠均随机分为 5 组(每组 8 只):Xyl 10、20、30、40 mg/kg 组和生理盐水组,小鼠按分组分别腹腔注射给药。

1.4 机械痛觉测试

通过使用 Von Frey 纤维丝(Ugo Basile, Comerio, Italy)对受试小鼠进行测试,评估动物的机械触诱发痛阈。受试小鼠分别被单独放在腹侧可允许通过 Von Frey 纤维丝的金属网,其它侧面为透明有机玻璃的盒子内(盒子规格:9 cm×7 cm×11 cm)。在进行测试前,提前 30 min 将老鼠放置好以便其适应实验环境。实验根据 up-down 法推算 50%缩足反射阈值^[8],利用 Von Frey 纤维丝垂直刺激小鼠右侧后肢足底中间部位,持续时间≤5 s。老鼠出现抬足、挥动后肢或舔足现象,则判定为阳性反应。测试首先从最小刺激强度 4.08 mN(1 g)开始,

如若不能引起阳性反应,则改为相邻大一级力度的刺激;如出现阳性反应则改为相邻小一级力度的刺激,反复连续测试,直至出现第一次阳性和阴性反应的骑跨,连续测定3次,每次间隔5 min,取平均值为阈值。机械痛觉阈值结果换算成最大镇痛效应百分比(percent maximum possible effect, %MPE),换算公式:%MPE=(实测值-基础值)/(最大值-基础值)×100%。为了避免老鼠足底受到伤害,如果老鼠足底受到5.07 mN(10 g)刺激仍无阳性反应,则终止机械刺激,最高值记为5.07 mN(10 g)。

1.5 甩尾测试

通过甩尾实验(tail flick test)评估动物对热刺激疼痛反应。老鼠尾部被轻放在甩尾测试设备上(Ugo Basile, Comerio, Italy),辐射热源会产生光束照射到老鼠尾巴上,热刺激使其产生疼痛感,从刺激开始记录老鼠甩尾反应的时间,作为痛阈指标。实验动物提前30 min放置实验场地适应。参照之前实验^[9],热源强度90,为了避免实验动物组织受到损伤,当动物在受到刺激时间达到12 s时,仍无甩尾反应,则终止热源刺激,最终记录为12 s。连续刺激3次,每次间隔5 min,取平均值作为阈值强度。甩尾测试潜伏时间结果换算成%MPE,方法与1.4所述相同。

1.6 构建HCN离子通道

培养HEK 293细胞,利用Lipofectamine 2000,结合GFP质粒,HCN1质粒和HCN2质粒分别通过瞬时转染构建HCN离子通道^[10]。在转染12~24 h后,利用全细胞膜片钳记录HEK 293细胞HCN离子通道电流。

1.7 膜片钳电流记录

在室温条件下,利用标准微电极(3~5 MΩ)和Axopatch 200B放大器对转染好的HEK 293细胞进行全细胞膜片钳记录实验^[11]。细胞外液(mmol/L):140 NaCl,3 KCl,10 HEPES,2 MgCl₂,2 CaCl₂,10 glucose,利用NaOH将pH值调至7.3,并保证细胞外液以2 mL/min的速度对测试细胞持续进行流动灌注;细胞内液(mmol/L):4 NaCl,120 KCH₃SO₃,10 EGTA,10 HEPES,1 MgCl₂,0.5 CaCl₂,3 Mg-ATP,0.3 GTP-Tris,利用KOH将pH值调至7.2。选取有绿色荧光,表面光滑,稳定不动的细胞进行记录。

1.8 数据采集及分析

通过利用pCLAMP软件和Digidata 1322A数字转换器(Axon instruments, Foster City, CA,

USA)进行数据采集及分析。保持电位为-40 mV,由-40 mV开始,每隔3~4 s增加-10 mV,利用电压钳记录随时间变化的 I_h ,随后立刻将电压固定在-90 mV,记录尾电流。在完整记录了基础电流后,分别给予浓度为12.5、25、50和100 μmol/L的Xyl,记录药品对 I_h 电流的抑制情况,并计算出不同浓度的药品对 I_h 抑制率,抑制率=(给药前 I_h -给药后 I_h)/给药前 I_h 。在超极化电压步骤结束后,每一个电势下的电流幅值被看作是随时间变化的电流,超极化电压最高升至-130 mV。完整的测量尾电流,在其最大值及最小值之间进行归一化处理,并代入Boltzmann曲线方程,用于激活参数半数激活电压($V_{1/2}$)和曲线斜率因子(k)的推导^[11]。

1.9 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素、双因素方差分析, t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Xyl对HCN1^{+/+}和HCN1^{-/-}小鼠机械刺激痛觉的影响

见图1A、图1B。HCN1^{+/+}小鼠在注射Xyl 30 min内、HCN1^{-/-}小鼠在45 min内对机械刺激痛觉阈值增高,然后逐渐下降。HCN1^{+/+}小鼠在注射Xyl 120 min时间内,除Xyl质量浓度为10 mg/kg、在第120 min时痛觉阈值与生理盐水组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余不同质量浓度Xyl组HCN1^{+/+}小鼠、不同时间点痛觉阈值与生理盐水组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而HCN1^{-/-}小鼠在注射Xyl 10 mg/kg和20 mg/kg组、注射后105 min及120 min时间点,痛觉阈值与生理盐水组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

HCN1^{+/+}小鼠和HCN1^{-/-}小鼠注射Xyl后对Von Frey纤维丝机械刺激反应的%MPE均为随着Xyl质量浓度增加而加大,在Xyl质量浓度为30、40 mg/kg时,HCN1^{+/+}小鼠%MPE为(75.47 ± 8.06)%和(86.35 ± 11.31)%,高于HCN1^{-/-}小鼠的(62.06 ± 14.72)%和(69.92 ± 16.09)%,差异有统计学意义($P < 0.05$),其余两组比较差异无统计学意义。HCN1^{+/+}小鼠各浓度组组内比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而HCN1^{-/-}小鼠组内不同Xyl浓度组间比较,仅Xyl质量浓度为30、40 mg/kg与10 mg/kg组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图1C。

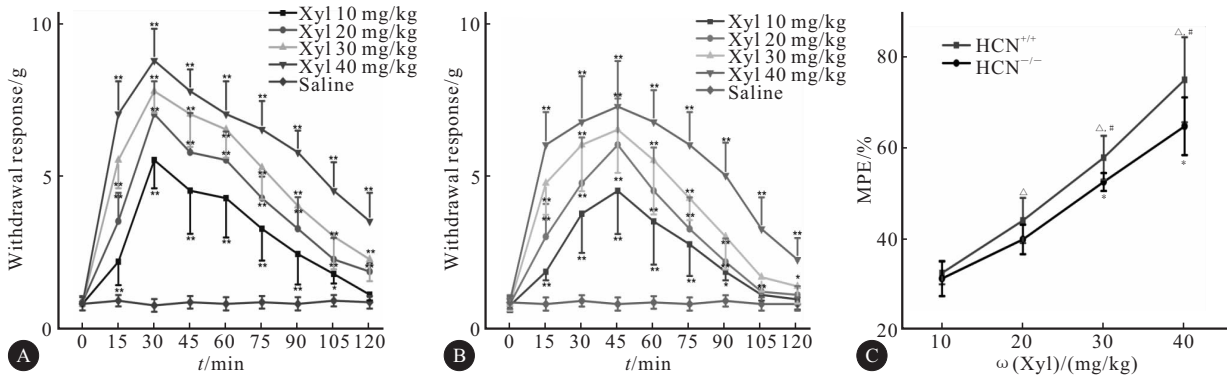


图 1 Xyl 对小鼠机械痛觉阈值和 %MPE 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig 1 Effect of Xyl on mechanical pain threshold and %MPE in mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

A: HCN1^{+/+} mice; B: HCN1^{-/-} mice. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. saline group. C: %MPE. $\triangle P<0.01$, vs. adjacent concentration interval in the same groups; # $P<0.01$, vs. HCN1^{-/-} group in same concentration; * $P<0.01$, vs. 10 mg/kg Xyl in the same group

2.2 Xyl 对 HCN1^{+/+} 和 HCN1^{-/-} 小鼠甩尾测试的影响

见图 2A、图 2B。HCN1^{+/+} 小鼠在注射 Xyl 30 min 内、HCN1^{-/-} 小鼠在 45 min 内对热源辐射刺激反应短时间增高,然后逐渐下降。HCN1^{+/+} 小鼠在注射 Xyl 10 mg/kg 与 20 mg/kg 组、注射后 120 min 时,与生理盐水组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。HCN1^{-/-} 小鼠在 Xyl 10 mg/kg 与 20 mg/kg 组、注射后 105 min 和 120 min 时,与生理

盐水组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

HCN1^{+/+} 小鼠和 HCN1^{-/-} 小鼠注射 Xyl 后对热辐射刺激反应的 %MPE 均为随着 Xyl 质量浓度增加而加大,见图 2 C。在 Xyl 质量浓度为 30 mg/kg 和 40 mg/kg 时,HCN1^{+/+} 小鼠 %MPE 为 $(57.83\pm 4.82)\%$ 和 $(74.98\pm 9.35)\%$ 高于 HCN1^{-/-} 小鼠的 $(52.50\pm 1.97)\%$ 和 $(64.74\pm 6.34)\%$,差异有统计学意义($P<0.05$)。HCN1^{+/+} 小鼠和 HCN1^{-/-} 小鼠各浓度组组内对比时,差异

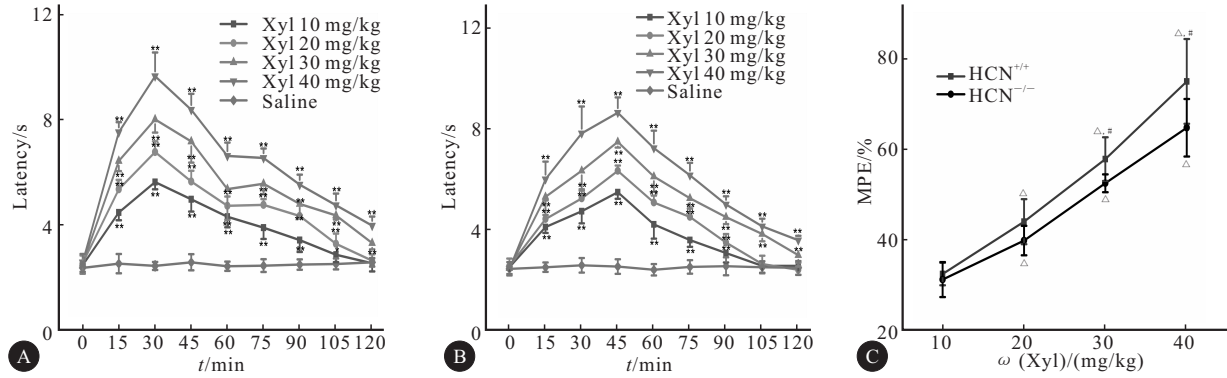


图 2 Xyl 对小鼠甩尾测试和 %MPE 的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Fig 2 Effect of Xyl on the tail swaying test and %MPE in mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

A: HCN1^{+/+} mice; B: HCN1^{-/-} mice; C: %MPE. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, vs. saline group; $\triangle P<0.01$, adjacent concentration interval in the same groups; # $P<0.01$, vs. HCN1^{-/-} group in same concentration

均有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 Xyl 对 HEK 293 细胞 HCN 离子通道电流的影响

HEK 293 细胞的 HCN1、HCN2 离子通道记录见图 3。在给予超极化电压为 -130 mV 时,HCN1 的 I_h 为 (-1391.99 ± 248.76) pA $\sim$ (-467.21 ± 141.28) pA; HCN2 的 I_h 为 (-1165.97 ± 316.36)

pA $\sim$ (-237.80 ± 56.47) pA。见图 4。

Xyl 对 HCN1 和 HCN2 离子通道 I_h 的抑制率见图 5。可见在 Xyl 12.5~100 μ mol/L 浓度范围内,随着 Xyl 浓度加大,对 HCN1 和 HCN2 离子通道 I_h 的抑制率均上升,对 HCN2 离子通道 I_h 的抑制作用大于对 HCN1 离子通道,在 Xyl 50、100 μ mol/L 时两通道 I_h 抑制率差异有统计学意

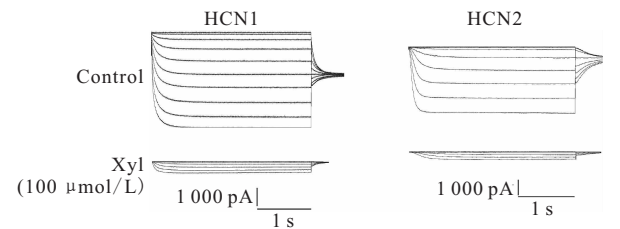
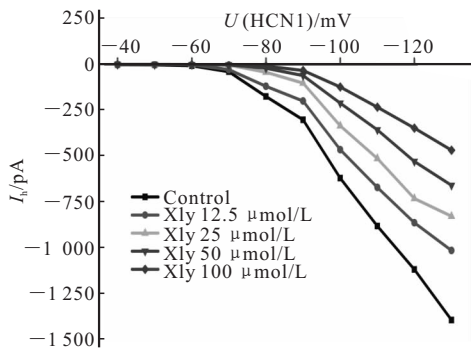


图 3 Xyl 抑制 HEK 细胞 HCN 离子通道电流记录图

Fig 3 The record figure of xylazine inhibits HCN ion channel currents

Sample currents from HEK 293 cells expressing HCN1 and HCN2 channel constructsevokedby hyperpolarizing voltage steps from -40 mV to -130 mV, before (top) and during exposure to $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ xylazine (bottom). Conditioning voltage steps were followed by a step to -90 mV for tail current analysis



义($P<0.05$)。

为了确定 Xyl 对 I_h 电压依赖性激活的影响,通过对尾电流分析,利用 Boltzmann 方程构建激活曲线。在转染了 HCN1 和 HCN2 亚型离子通道的 HEK 293 细胞,加入 Xyl($12.5\sim100\text{ }\mu\text{mol/L}$)后, I_h 激活曲线呈现出与剂量正相关性的往左侧移动的趋势(图 6)。HCN1 的 $V_{1/2}$ 分别为:(-79.58 ± 1.56) mV $\sim$ (-98.95 ± 3.57) mV;而 HCN2 的 $V_{1/2}$ 分别为:(-102.17 ± 1.36) mV $\sim$ (-117.48 ± 2.38) mV。经统计学分析,HCN1 及 HCN2 的 $V_{1/2}$,在给予甲苯噻嗪($12.5\sim100\text{ }\mu\text{mol/L}$)后,与对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。

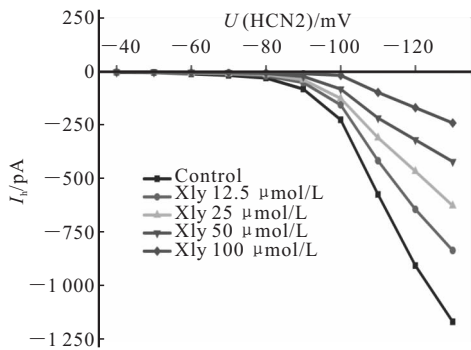


图 4 Xyl 抑制 HEK 细胞 HCN 离子通道的 I-V 曲线 ($n=6$)

Fig 4 I - V curves of xylazine inhibits HCN ion channels ($n=6$)

Steady state I - V curves from currents at the end of the voltage steps under control conditions, and during exposure to $12.5\text{ }\mu\text{mol/L}$ - $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ xylazine for HCN1, HCN2 constructs

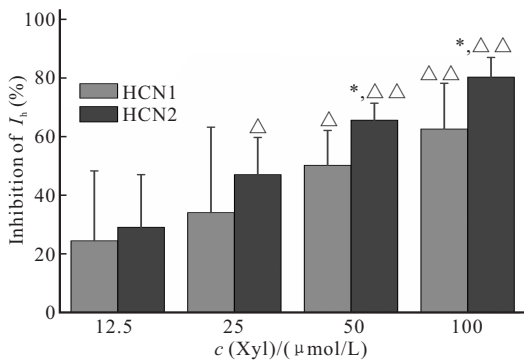


图 5 Xyl 对 HCN 离子通道电流抑制率($n=6$)

Fig 5 The inhibition rate of HCN ion channel by xylazine ($n=6$)

* $P<0.05$, vs. HCN1; $\Delta P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$, adjacent concentration interval in the same groups

3 讨论

本研究首先通过对 HCN1 $^{-/-}$ 和 HCN1 $^{+/+}$ 小鼠

进行动物行为学的机械痛觉阈值测试和甩尾实验,发现在注射了同等剂量的 Xyl 后,与 HCN1 $^{+/+}$ 小鼠相比,HCN1 $^{-/-}$ 小鼠对疼痛的敏感性能在更短的时间内恢复到正常水平。而 HCN1 $^{+/+}$ 小鼠与 HCN1 $^{-/-}$ 小鼠对机械刺激及甩尾实验% MPE 比较,在 Xyl 的注射剂量为 30 mg/kg 及 40 mg/kg 时,差异有统计学意义,结果证明 Xyl 对 HCN1 $^{+/+}$ 小鼠的镇痛效果更好。

HCN 离子通道家族由 4 个不同亚型组成 (HCN1 $\sim$ HCN4),在神经系统中广泛存在,不同的亚型表现出不同的特性。HCN1 亚型离子通道主要分布在大脑皮质、海马及小脑部位;HCN2 亚型离子通道则在整个大脑区域及脊柱神经均有表达;而 HCN3 及 HCN4 在神经元上分布较少^[4]。疼痛产生的机制比较复杂,而神经元的异常放电是诱发和传导疼痛的主要机制之一。相关的研究表明,HCN 离子通道可以调节神经末梢的放电频率,其

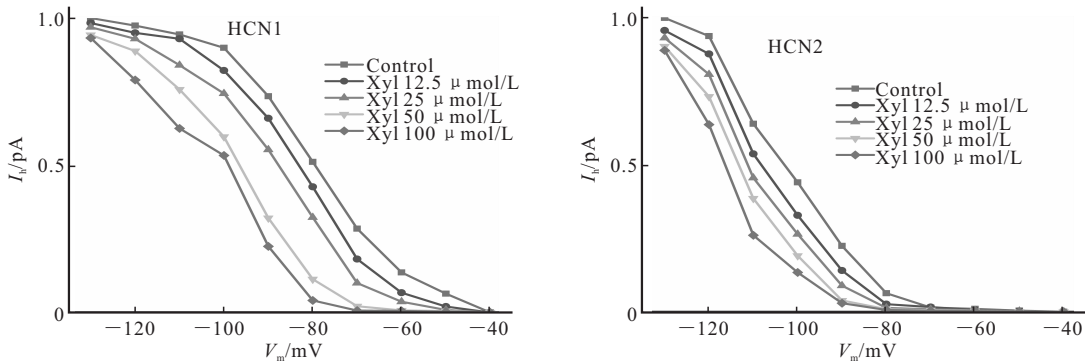


图 6 Xyl 对 HCN 离子通道激活曲线的影响($n=6$)

Fig 6 Effect of xylazine on the HCN ion channel activation curve ($n=6$)

Activation curves were fitted according to the Boltzmann equation to normalized, determine from averaged tailcurrents. The results of the control group and test groups of different concentrations of HCN1^{+/+} mice were significantly different from HCN1^{-/-} mice ($P<0.05$). V_m : Voltage maximum

介导 I_h 可使细胞膜的静息电位受到影响,调节神经元兴奋性,HCN 离子通道在疼痛产生中扮演了关键的角色^[12-13]。JIANG 等^[14]的研究也发现 HCN1 和 HCN2 离子通道在疼痛的发生和发展中起着重要作用,因此在本次研究中我们选择了 HCN1 和 HCN2 两个亚型的离子通道对 Xyl 的镇痛作用机制进行试验。

在全细胞电压膜片钳记录 HCN 离子通道电流的实验中,本研究结果发现,Xyl 使 HCN1 和 HCN2 两个亚型的离子通道电流减小, I_h 激活曲线整体左移,证明 Xyl 对 HCN 离子通道的电流产生了抑制作用。大量的研究^[9,15]发现,当使用 HCN 离子通道特异性阻断剂 ZD7288 对实验对象给药后,镇痛效果有显著改善。而一些临床常见的麻醉、镇痛药如异丙酚、氯胺酮,及属于 α_2 -肾上腺素受体激动剂中的可乐定、右美托咪定等均发现具有抑制的 I_h 作用^[16],这些研究结果认为 I_h 在神经病理性疼痛产生的机制中起着至关重要的作用。本研究中,Xyl 使 I_h 激活曲线整体左移,HCN 离子通道被抑制,意味着减少了 HCN 离子通道在静息状态下打开的可能性,异常放电被抑制,降低了神经元的兴奋性,这与 YAGI 等^[17]利用可乐定抑制抑制超极化激活电流的结果相似。本研究结合电生理试验结果与动物行为学实验发现,Xyl 对 HCN1^{-/-} 和 HCN1^{+/+} 小鼠均有镇痛效果,由于 HCN1^{+/+} 小鼠体内的 HCN1 离子通道被 Xyl 抑制,神经元兴奋性降低,HCN1^{+/+} 小鼠对机械痛觉刺激及热刺激的疼痛敏感性降低,故 Xyl 对 HCN1^{+/+} 小鼠上产生的镇痛效果更好。Xyl 对 HCN1^{-/-} 小鼠的镇痛作用,原因可

能是由于 Xyl 通过对 HCN1^{-/-} 小鼠的 HCN2 离子通道进行抑制,从而产生镇痛效果。虽然这个推论没有在 HCN2 基因敲除的小鼠身上得到验证,但膜片钳记录在记录 Xyl 作用于 HCN2 离子通道的电流时,确定了其对电流的抑制作用。

HCN 离子通道只有在细胞膜电位超极化时才可能被激活开放,除了膜电位超极化这必要条件外,HCN 离子通道的开放及 I_h 的大小,还受环核苷酸、磷酸肌醇、蛋白激酶、细胞内外离子浓度等多种因素调节^[3]。在本次研究中,我们并没有进行 Xyl 是如何对 HCN 离子通道产生抑制作用的更深入研究,这是本研究的不足之处,尚需进行进一步的研究。但是通过本研究,发现 α_2 -肾上腺素受体激动剂 Xyl 对 HCN 离子通道的 I_h 抑制,从而产生镇痛作用,使我们对 α_2 -肾上腺素受体激动剂这一类药物的镇痛作用机制有了进一步的了解,相信该发现将有助于其成为治疗疼痛的一种新的治疗药品,HCN 离子通道也有望成为未来开发研究镇痛药物新的作用靶点。

参 考 文 献

[1] PARK JW, CHUNG HW, LEE EJ, *et al.* α_2 -Adrenergic agonists including xylazine and dexmedetomidine inhibit norepinephrine transporter function in SK-N-SH cells. *Neurosci Lett*, 2013, 541: 184-189 [2018-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.02.022>.
[2] FARAG E, ARGALIOUS M, SESSLER DI, *et al.* Use of α_2 -agonists in neuroanesthesia; an overview. *Ochsner J*, 2011,11(1):57-69.
[3] BIEL M, WAHL-SCHOTT C, MICHALAKIS S, *et al.* Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to

- function. *Physiol Rev*,2009,89(3): 847-885.
- [4] ZHOU C, LIANG P, LIU J, *et al.* HCN1 channels contribute to the effects of amnesia and hypnosis but not immobility of volatile anesthetics. *Anesth Analg*,2015,121(3):661-666.
- [5] NOLAN MF, MALLERET G, LEE KH, *et al.* The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar Purkinje cells. *Cell*, 2003, 115: 551-564 [2018-04-12]. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00884-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00884-5).
- [6] NOLAN MF, MALLERET G, DUDMAN JT, *et al.* A behavioral role for dendritic integration: HCN1 channels constrain spatial memory and plasticity at inputs to distal dendrites of CA1 pyramidal neurons. *Cell*, 2004, 119(5): 719-732.
- [7] CHEN X, SHU S, KENNEDY DP, *et al.* Subunit-specific effects of isoflurane on neuronal i_h in HCN1 knockout mice. *J Neurophysiol*,2009,101(1):129-140.
- [8] XIANG Y, LIU T, YANG H, *et al.* NRG1-ErbB signalling promotes microglia activation contributing to incision-induced mechanical allodynia. *Eur J Pain*,2015,19(5):686-694.
- [9] ZHOU C, DOUGLAS JE, KUMAR NN, *et al.* Forebrain HCN1 channels contribute to hypnotic actions of ketamine. *Anesthesiology*,2013,118(4):785-795.
- [10] CHEN X, SHU S, BAYLISS DA. Suppression of i_h contributes to propofol-induced inhibition of mouse cortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*,2005,94(6):3872-3883.
- [11] CHEN X, SIROIS JE, LEI Q, *et al.* HCN subunit-specific and camp-modulated effects of anesthetics on neuronal pacemaker currents. *J Neurosci*,2005,25(24):5803-5814.
- [12] AMIR R, KOCIS JD, DEVOR M. Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci*,2005,25(10):2576-2585.
- [13] LEWIS AS, CHETKOVICH DM. HCN channels in behavior and neurological disease: too hyper or not active enough. *Mol Cell Neurosci*,2011,46(2):357-367.
- [14] JIANG YQ, XING GG, WANG SL, *et al.* Axonal accumulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels contributes to mechanical allodynia after peripheral nerve injury in rat. *Pain*,2008,137(3):495-506.
- [15] ZHOU C, KE BW, ZHAO Y, *et al.* Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels may contribute to regional anesthetic effects of lidocaine. *Anesthesiology*,2015,122(3):606-618.
- [16] JIANG YQ, SUN Q, TU HY, *et al.* Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain. *Neurochem Res*,2008,33(10):1979-1789.
- [17] YAGI J, SUMINO R. Inhibition of a hyperpolarization-activated current by clonidine in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol*,1998,80(3):1094-1104.

(2018-08-27 收稿,2018-12-14 修回)

编辑 沈 进