

• 论 著 •

经皮椎间孔注射多柔比星与多柔比星脂质体对大鼠后肢行为学影响的比较 *

李丽梅^{1,2} 陈 军³ 郑宝森⁴ 王慧星⁵ 张志利² 孙 薇³ 杨 帆³
王晓亮³ 喻文立^{6△} 杜洪印^{1△}

(¹ 天津医科大学一中心临床学院, 天津 300192; ² 秦皇岛市第一医院疼痛科, 秦皇岛 066000; ³ 空军军医大学唐都医院疼痛生物医学研究所, 西安 710038; 天津市第一中心医院⁴ 疼痛科; ⁶ 麻醉科, 天津 300192;
⁵ 天津医科大学第二医院疼痛治疗中心, 天津 300211)

摘 要 目的: 比较经皮椎间孔注射多柔比星与多柔比星脂质体 (pegylated liposome doxorubicin, PLD) 对成年大鼠后肢行为学的影响, 探讨多柔比星脂质体对背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 的镇痛作用。**方法:** 健康雄性 SD 大鼠 52 只采用随机数字表法分为 4 组 ($n=13$): 生理盐水组 (Vehicle 组)、隐形脂质体组 (Liposome 组)、0.2% 多柔比星组 (DOX 组) 及 0.2% 多柔比星脂质体组 (PLD 组)。各组均采用经皮椎间孔注射方法, 于大鼠左侧 L₄₋₅、L₅₋₆ 椎间孔分别注射生理盐水、隐形脂质体注射液、0.2% 多柔比星及 0.2% 多柔比星脂质体 10 μ l。分别于注药前及注药后 1 天、3 天、5 天、7 天、14 天、21 天、28 天测定大鼠机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL), 并观察注药后大鼠后肢的运动情况。注药后 3 天, DOX 组和 PLD 组随机各抽取 3 只大鼠, 观察多柔比星自发荧光情况。**结果:** 荧光显微镜显示, DOX 组和 PLD 组大鼠注药侧 DRG 内均可见大量红色多柔比星自发荧光分布。与 Vehicle 组和 Liposome 组相比, DOX 组注药后 1 周内、PLD 组注药后 2 周内 MWT 值下降, 与基础值比较差异无统计学意义; 之后呈逐渐上升趋势, 至注药后 28 天增高最明显 ($P < 0.05$); DOX 组和 PLD 组注药后 1 天 TWL 值下降, 与基础值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 余各时点组内及组间比较差异均无统计学意义。注药后 28 天, DOX 组轻微跛行率为 30%, 其余各组大鼠后肢运动功能均正常。**结论:** 经皮椎间孔注射 0.2% 多柔比星脂质体对大鼠背根神经节能够产生和多柔比星相似的镇痛作用, 且不影响下肢运动功能。

关键词 多柔比星; 脂质体; 背根神经节; 自发荧光; 行为学

Comparison of the effect of percutaneous intervertebral foramen injection of doxorubicin or pegylated liposome doxorubicin on hind limb behavior in rats *

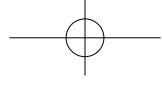
LI Limei^{1,2}, CHEN Jun³, ZHENG Baosen⁴, WANG Huixing⁵, ZHANG Zhili², SUN Wei³, YANG Fan³,
WANG Xiaoliang³, YU Wenli^{6△}, DU Hongyin^{1△}

(¹ The First Central Clinical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; ² Department of Pain, The First Hospital of Qinhuangdao, Qinhuangdao 066000, China; ³ Institute for Biomedical Sciences of Pain, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, China; ⁴ Department of Pain; ⁶ Department of Anesthesiology, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; ⁵ Pain Management Center, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To compare the effects of percutaneous intervertebral foramen injection of doxorubicin or pegylated liposomes doxorubicin (PLD) on the behavior of hind limbs in adult rats, and to

* 基金项目: 天津市医学重点学科 (专科) 建设项目 (TJYXZDXK-045A); 天津市卫生健康科技项目 (ZC20058)

△ 通信作者 杜洪印 duhongyintj@163.com; 喻文立 yuwenlitj@163.com



explore the analgesic effect of doxorubicin liposomes on dorsal root ganglion (DRG). **Methods:** Fifty-two healthy male SD rats were randomly divided into 4 groups ($n = 13$): normal saline group (Vehicle group), stealth liposome group (Liposome group), 0.2% doxorubicin group (DOX group) and 0.2% pegylated liposomes doxorubicin group (PLD group). According to the different groups, normal saline, stealth liposome, doxorubicin and pegylated liposomes doxorubicin 10 μ l were injected respectively into the intervertebral foramen of the left L₄₋₅ and L₅₋₆ of rats by percutaneous intervertebral foramen injection. Three days after administration, 3 rats in DOX group and PLD group respectively were randomly selected to observe the spontaneous fluorescence of doxorubicin. The paw mechanical withdrawal threshold (MWT) and paw thermal withdrawal latency (TWL) of rats were measured before and after administration at 1, 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days, and the movement of hind limbs of rats after administration was also observed. **Results:** Fluorescence microscope showed that a large number of red doxorubicin autofluorescence distribution could be seen in the DRG on the injection side of DOX group and PLD group. Compared with Vehicle group and Liposome group, MWT value in DOX group decreased within 1 week after administration, while that within 2 weeks in PLD group after administration, and there were no significant differences compared with the basic value; then, the MWT showed a gradual upward trend, and the increase was most obvious at 28 days after administration ($P < 0.05$); TWL value of DOX group and PLD group decreased at the first day after administration, and the difference was statistically significant compared with the basic value ($P < 0.05$), and there was no statistically significant difference between the other time points. On the 28th day after injection, the slight claudication rate in DOX group was 30%, and the motor function of hind limbs in other groups was normal after administration. **Conclusion:** Percutaneous injection of pegylated liposomes doxorubicin into intervertebral foramen of rats can produce similar analgesia effect as doxorubicin, and does not affect the motor function of hind limbs.

Keywords doxorubicin; liposome; dorsal root ganglion; spontaneous fluorescence; ethology

背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 是包括疼痛传递在内的感觉传导和调节的重要解剖结构, 在慢性疼痛的发生和维持中发挥重要作用, DRG 的解剖和生理特点使其成为慢性疼痛治疗的理想靶标^[1]。临床上针对 DRG 进行的神经调控 (电刺激、脉冲射频) 和药物注射 (激素、臭氧、干扰素等) 用于治疗神经病理性疼痛屡见报道^[2-4], 这些治疗方式均可不同程度的降低病人的疼痛评分、改善睡眠及提高生活质量, 但仍有许多难治性神经病理性疼痛发生。国内学者孜孜以求, 突破了多柔比星作为抗癌药物只用于肿瘤化疗的传统观念, 利用 DRG 血管高渗透特性, 椎间孔注射多柔比星产生选择性感觉神经节化学切除作用, 用于治疗临床上一些难治性神经病理性疼痛, 如三叉神经痛、带状疱疹后神经痛等, 并取得了良好的治疗效果^[5-7]。既往基础研究发现, 多柔比星对 DRG 的破坏作用与注药浓度呈正相关, 低浓度 (0.33%) 以破坏 DRG 小神经元为主, 高浓度 ($> 0.5\%$) 对大、小神经元均有破坏, 呈浓度依赖性^[8]。但低于 0.33% 浓度的多柔比星是否仍具有镇痛作用尚未见报道。

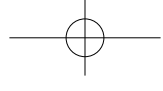
近年来, 随着多柔比星新剂型-多柔比星脂质

体 (pegylated liposome doxorubicin, PLD) 的成功研发和应用, 其将多柔比星包封于聚乙二醇化脂质体中制成脂质体制剂, 与传统剂型相比, 具有更好的靶向性、缓释作用、良好的组织相容性等优点, 可保留或提高药物疗效, 有效降低药物不良反应, 在临床抗肿瘤治疗方面已显示出一定优势^[9]。多柔比星脂质体为溶液制剂, 5 ml 脂质体溶液内含多柔比星 10 mg, 相当于 0.2% 多柔比星, 目前尚未见该浓度多柔比星镇痛作用的基础研究文献, 亦无经皮椎间孔注射 PLD 对大鼠行为学影响的研究报道。本研究在传统多柔比星对 DRG 研究基础上, 比较经皮椎间孔注射多柔比星和多柔比星脂质体对大鼠行为学的影响, 探讨多柔比星的最低有效镇痛浓度及多柔比星脂质体对 DRG 的镇痛作用, 从而为临床研究提供依据。

方 法

1. 实验材料

实验动物: 选取健康成年雄性 SD 大鼠 52 只, 体重 200g~250 g, 由空军军医大学实验动物中心



提供。所有动物实验操作均严格遵守空军军医大学生物医学伦理委员会相关规定。动物的使用经过空军军医大学动物保护和使用委员会的审查和批准(伦理批号 20190150)。大鼠被安置在一个温度控制的房间(22℃~26℃),光照/黑暗循环 12 h/12 h,自由获取食物和水。实验前将大鼠置于实验观察箱中至少适应 30 min。

实验药品:多柔比星(广东深圳万乐药业有限公司,每支 10 mg,批准文号:国药准字 H440-24359);多柔比星脂质体(石药集团欧意药业有限公司,10 mg/5 ml,批准文号:国药准字 H20163178)。

实验仪器: von Frey 针刺痛觉测试套件(Anesthesio, 美国),辐射热刺激仪(Stoelting 52771, 美国),冰冻切片机(CM1900, Leica, 德国),共聚焦显微镜(Olympus FV1000, 日本)。

2. 实验方法

实验分组:采用完全随机数字表法将 52 只大鼠随机分为 4 组($n = 13$):生理盐水(Vehicle 组)、隐形脂质体组(Liposome 组)、多柔比星组(DOX 组)及多柔比星脂质体组(PLD 组),标记后分笼饲养。

经皮椎间孔注射:戊巴比妥钠 50 mg/kg,腹腔注射麻醉后,剃掉大鼠下背部的皮毛,将大鼠放置在一个小圆柱体上抬高腰部区域。按照 Ferrari 等^[10]和 Luo 等^[11]描述的经皮椎间孔注射方法,皮肤穿刺点的定位在脊柱中线旁开 1.5 cm,偏尾侧约 0.5 cm,绕过髂嵴上边界。先用稍粗穿刺针(25×10, 19G)刺破皮肤,再用普通牙龈针(30G)经破口处穿过皮肤,向 L₄₋₅、L₅₋₆ 椎间隙插入,直至针头触及椎体外侧区域。为了到达 L₄₋₅、L₅₋₆ 椎间孔横突之间的间隙,针要进行精细的移动,直到骨阻力减小,并观察到大鼠足掌退缩反射即认为椎间孔 DRG 的标志穿刺成功。各组均采用经皮椎间孔注射方法,于大鼠左侧 L₄₋₅、L₅₋₆ 椎间孔分别注射生理盐水、隐形脂质体注射液、0.2% 多柔比星及 0.2% 多柔比星脂质体 10 μl。

3. 观察指标

观察实验大鼠注药前及注药后第 1 天、3 天、5 天、7 天、14 天、21 天、28 天机械刺激缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)和热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL),并观察大鼠下肢运动情况。荧光显微镜观察注药后注药侧和非注药侧 DRG 多柔比星自发荧光情况。

(1) MWT 测定:在高出实验平台 30 cm 的金属铁丝网上,将大鼠逐个放入不同的 20 cm×20 cm×

25 cm 的有机玻璃盒中,玻璃盒的四面用白纸遮住,避免邻近大鼠对测试过程的影响。待大鼠在玻璃盒内适应 30 min 后,采用不同刺激强度的 von Frey 纤维丝(2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、45 和 60 g)从下向上分别垂直刺激大鼠双侧后足底的中央部位,观察大鼠的抬足、缩足或舔足反应。从最小刻度起,每个刻度重复刺激大鼠后足底 10 次,每次刺激持续 3 s 左右,刺激间隔大于 5 s,左右侧后足刺激间隔不少于 5 min,若能引起 5 次或者 5 次以上的抬足、缩足或舔足反应,即认为此刻度是大鼠该侧后足的 MWT。

(2) TWL 测定:在高出实验平台 30 cm 的 2 mm 厚的透明玻璃平板上,将大鼠逐个放入不同的 20 cm×20 cm×25 cm 的有机玻璃盒中,玻璃盒的四面用白纸遮住,避免测试过程中临近大鼠之间的相互影响。测试时,保证测试间温度在 24~26℃。待大鼠在玻璃盒内适应 30 min 后,将辐射热刺激仪的光照对准大鼠后足底的中央部位进行照射。当大鼠照射侧出现抬足、缩足或舔足反应时,立即关闭热刺激仪,记录从开始照射直至停止照射之间的时间,该时间即为大鼠的 TWL。每侧大鼠后足照射 5 次,且间隔时间不少于 10 min。取后 3 次 TWL 的平均值,算出大鼠最终 TWL。

(3) 运动功能程度:大鼠后肢运动功能程度采用改良描述法^[12]。在宽阔场地观察其自发活动,并作如下评分:0 级:无负重情况下,大鼠无后肢运动;1 级:无负重情况下,罕见幅度微弱的后肢运动;2 级:无负重情况下,大鼠后肢可见频繁和/有力的运动;3 级:后肢可负重,可行走 1~2 步;4 级:轻微跛行;5 级:正常行走。正常大鼠双侧后肢评分均为 5 级。

(4) 免疫组织荧光染色:注药后 3 天,DOX 组和 PLD 组随机抽取 3 只大鼠,行免疫荧光染色。戊巴比妥钠(50 mg/kg,腹腔注射)麻醉,4% 多聚甲醛升主动脉灌流后,取双侧 L₄₋₅、L₅₋₆ DRG,4% 多聚甲醛后固定,30% 蔗糖沉糖,待取材组织沉至容器底部时即可进行冰冻切片。冰冻切片机行 DRG 15 μm 冰冻切片,0.01M PBS 液漂洗,1N HCL 抗原修复 30 min,3% H₂O₂ 浸泡 10 min 灭活内源性过氧化物酶,1% 的牛血清白蛋白进行封闭 30 min。封闭后组织切片进行一抗孵育:鼠源性 NF200 抗体(1:200, Sigma 公司),4℃ 过夜。次日 0.01M PBS 漂洗后加入对应的二抗进行孵育:488 驴抗鼠 IgG(1:400, Jackson)室温孵育 2~4 h,0.01M PBS 液漂洗,避光条件下裱片,抗荧光淬灭剂进行封片。

利用激光扫描共聚焦显微镜 (Olympus FV1000, 日本) 观察拍片。

4. 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件对资料进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 不同时间点比较采用重复测量方差分析, 跛行率比较采用卡方检验, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结 果

1. 经皮椎间孔注药后各组大鼠后肢运动功能变化

与注药前比较, 经皮椎间孔注射后2周内, 各组均未出现后肢跛行, 运动功能分级均为5级。DOX组注药后28天, 大鼠30% (3/10) 出现轻微跛行, 运动功能分级4级; Vehicle组、Liposome组及PLD组均未出现跛行, 运动功能分级均为5级, 跛行阳性率组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. 多柔比星自发荧光情况

共聚焦荧光显微镜显示, 注射0.2%多柔比星和0.2%多柔比星脂质体的DRG内, 神经丝蛋白200 (NF200) 标记的DRG大细胞周围可见多柔比星强阳性红色自发荧光分布 (见图1A, B), 而非注药侧DRG内无自发荧光出现。DOX组和PLD组

NF200细胞数量和多柔比星自发荧光强度比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图1C, D)。

3. 经皮椎间孔注药后各组大鼠注药侧与非注药侧 MWT 变化

检测大鼠注药侧与非注药侧不同时间点MWT, 判定机械痛阈值变化情况。与Vehicle组相比, Liposome组注药后各时间点MWT和TWL无明显变化 ($P > 0.05$); 与Vehicle和Liposome组相比, DOX组注药后1周内、PLD组注药后2周内MWT值降低, 但与注药前相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 之后呈逐渐上升趋势, 至注药后28天增高最明显 ($P < 0.05$, 见表1); 而非注药侧各时间点MWT无明显差异 ($P > 0.05$)。MWT在DOX组和PLD组两组间不同时间点比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见表2)。

4. 经皮椎间孔注药后各组大鼠注药侧与非注药侧 TWL 变化

检测大鼠注药侧与非注药侧不同时点TWL, 判定热痛阈值变化情况。注药后1天, 注药侧TWL值在DOX组和PLD组下降, 与基础值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余各时间点组间及组内比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$, 见表3)。非注药侧TWL值在各时间点均无明显差异 ($P > 0.05$, 见表4)。

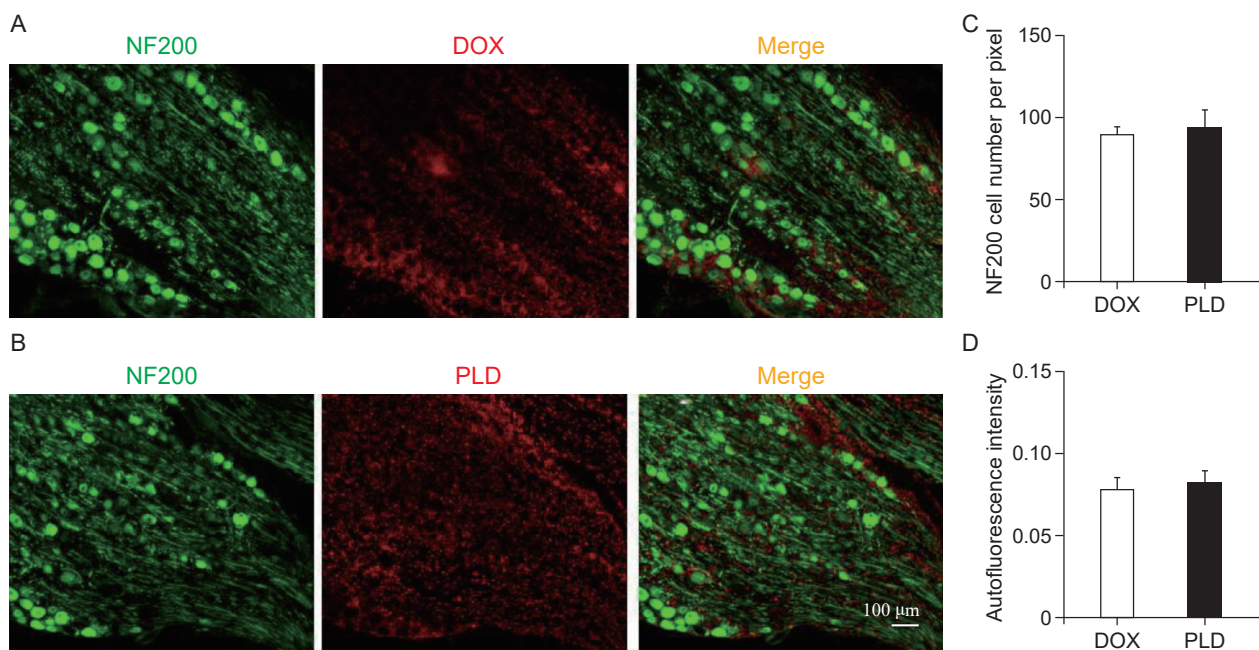


图1 (A, B) 荧光显微镜注药侧DRG可见大量多柔比星红色荧光分布 (标尺 = 100 μm); (C, D) DOX组和PLD组NF200细胞数量和多柔比星自发荧光强度比较

Fig. 1 (A, B) Fluorescence microscope showed the distribution of red doxorubicin autofluorescence in DRG (Scale bar = 100 μm); (C, D) The comparison of NF200 cells number and autofluorescence intensity between DOX group and PLD group.

表 1 各组大鼠注药侧不同时间点 MWT 的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

Table 1 Comparison of ipsilateral paw mechanical withdrawal threshold in rats ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

组别 Group	注药前 Pre-injection	注药后 1 天 After-injection 1 d	注药后 3 天 After-injection 3 d	注药后 5 天 After-injection 5 d	注药后 7 天 After-injection 7 d	注药后 14 天 After-injection 14 d	注药后 21 天 After-injection 21 d	注药后 28 天 After-injection 28 d
Vehicle	21.00±6.00	21.33±5.43	21.50±4.40	18.5±4.42	21.17±4.22	21.83±5.31	19.83±3.87	21.17±4.22
Liposome	21.00±6.00	20.33±4.93	20.67±3.61	21.33±3.01	20.17±3.49	20.17±3.49	20.00±2.53	21.00±2.45
DOX	21.33±5.43	16.17±4.22	16.83±3.43	17.17±3.20	19.00±3.63	23.00±3.29	38.67±16.62*#	45.00±12.25*#
PLD	20.00±5.48	17.33±4.97	17.83±4.07	16.17±3.66	17.00±4.60	19.83±4.58	41.00±15.43*#	53.33±10.33*#

* $P < 0.05$, 与 Vehicle 组、Liposome 组相比; # $P < 0.05$, 与注药前、注药后 1 天、3 天、5 天、7 天、14 天相比
* $P < 0.05$, compared with group Vehicle and Liposome; # $P < 0.05$, compared with pre-injection and 1 day, 3 days, 5 days, 7 days, 14 days after-injection.

表 2 各组大鼠非注药侧不同时间点 MWT 的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

Table 2 Comparison of contralateral paw mechanical withdrawal threshold in rats ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

组别 Group	注药前 Pre-injection	注药后 1 天 After-injection 1 d	注药后 3 天 After-injection 3 d	注药后 5 天 After-injection 5 d	注药后 7 天 After-injection 7 d	注药后 14 天 After-injection 14 d	注药后 21 天 After-injection 21 d	注药后 28 天 After-injection 28 d
Vehicle	21.33±5.35	20.83±4.79	21.16±4.54	20.50±4.42	20.17±3.60	20.50±3.83	21.00±4.29	21.50±4.68
Liposome	21.00±6.00	19.83±5.34	20.50±4.89	20.67±4.13	21.00±4.38	20.83±3.87	21.50±4.59	20.83±4.40
DOX	20.83±6.05	20.33±3.93	20.33±4.93	21.17±4.22	20.67±4.32	21.17±3.49	20.50±4.46	21.67±4.41
PLD	20.00±5.48	19.50±4.37	20.00±4.34	20.33±3.93	19.83±4.40	19.83±3.76	20.17±3.66	21.33±4.18

$P > 0.05$, 组间及组内各时间点相比; $P > 0.05$, comparison of different time points with group and among groups.

表 3 各组大鼠注药侧不同时间点 TWL 的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

Table 3 Comparison of ipsilateral paw thermal withdrawal latency in rats ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

组别 Group	注药前 Pre-injection	注药后 1 天 After-injection 1 d	注药后 3 天 After-injection 3 d	注药后 5 天 After-injection 5 d	注药后 7 天 After-injection 7 d	注药后 14 天 After-injection 14 d	注药后 21 天 After-injection 21 d	注药后 28 天 After-injection 28 d
Vehicle	19.69±6.64	18.83±5.54	18.16±4.76	18.62±4.98	18.92±6.05	18.84±6.15	18.63±4.99	19.42±5.32
Liposome	18.38±6.78	18.68±6.76	18.98±6.54	17.99±6.67	17.97±5.77	18.74±6.36	17.67±5.68	17.33±6.47
DOX	19.76±3.73	17.06±3.83*	18.57±2.84	19.65±4.22	19.57±3.39	19.51±2.79	19.88±3.78	19.69±3.76
PLD	19.14±6.25	16.97±5.85*	17.47±4.90	19.75±6.35	18.75±5.28	19.60±5.03	20.02±5.68	19.49±5.15

* $P < 0.05$, 与注药前相比; * $P < 0.05$, compared with pre-injection time point.

表 4 各组大鼠非注药侧不同时间点 TWL 的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

Table 4 Comparison of contralateral paw thermal withdrawal latency in rats ($n = 10, \bar{x} \pm SD$)

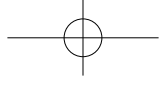
组别 Group	注药前 Pre-injection	注药后 1 天 After-injection 1 d	注药后 3 天 After-injection 3 d	注药后 5 天 After-injection 5 d	注药后 7 天 After-injection 7 d	注药后 14 天 After-injection 14 d	注药后 21 天 After-injection 21 d	注药后 28 天 After-injection 28 d
Vehicle	17.72±5.95	17.79±4.85	17.37±5.67	16.60±4.69	16.51±4.28	17.24±6.48	18.12±3.88	17.31±5.42
Liposome	17.60±5.61	18.81±4.93	17.92±5.06	17.60±6.48	17.84±6.49	18.42±5.87	19.41±4.69	18.58±5.05
DOX	20.11±3.41	19.38±2.19	19.89±1.97	19.49±2.06	19.99±2.56	19.00±2.31	20.58±3.00	20.12±2.45
PLD	19.79±5.74	18.42±5.71	19.22±4.12	20.14±5.56	19.06±4.58	19.82±4.08	20.63±6.00	19.47±4.53

$P > 0.05$, 不同时间点相比; $P > 0.05$, comparison among different time points.

讨 论

DRG 是初级神经元的胞体汇聚之地, 有孔毛
细血管滋养 DRG, 这种高渗透性血管的存在, 使血
源性分子、抗原、炎性因子、神经毒素很容易进入
DRG 与不同的代谢或免疫细胞相互作用^[13]。DRG
这一重要的解剖特点也为其靶向镇痛治疗提供了天然

的治疗条件, 并成为近年来疼痛治疗研究的热点^[14]。
多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是一种经典的蒽环类
广谱抗肿瘤药物, 具有广泛的细胞毒性和神经毒性
作用^[15]。既往研究结果显示, 家兔椎旁注射不同浓
度多柔比星 (0.1%、0.25%、0.33%、0.5%、0.75%、
1% DOX) 均可选择性进入 DRG, 1~8 周可引起
DRG 细胞不可逆的变性、坏死, 对 DRG 产生选择



性感觉神经切除作用^[16,17]，并呈浓度依赖性，DOX 浓度越高，对 DRG 的破坏作用越大^[18,19]。在传统多柔比星椎旁注射研究的基础上，结合 PLD 自身溶液剂型和固定浓度特性，本研究采用经皮椎间孔注射 0.2% DOX 和 0.2% PLD，观察其对大鼠后肢行为学的影响。研究结果显示，与注药前比较，注射 DOX 或 PLD 侧短期内（DOX 组 1 周内、PLD 组 2 周内）MWT 值下降，TWL 值注药后 1 天降低，考虑可能与 DOX 诱导 DRG 神经毒性早期致氧化应激或与穿刺对 DRG 的局部刺激有关^[20]。随着时间延长，MWT 值呈逐渐上升趋势，至注药后 28 天达高峰，DOX 组和 PLD 组组间比较差异无统计学意义；而 TWL 值在注药后 3、5、7、14、21、28 天组内及组间比较均无统计学差异；非注药侧各观察指标组间及组内比较亦无明显差异，表明 0.2% DOX 和 0.2% PLD 可提高大鼠机械性痛阈值，产生相似的镇痛作用，且具有时间依赖性，时间越长，镇痛效果越明显，而对热痛阈值无明显影响；同时行为学测定结果显示，经皮椎间孔注射 PLD 仅作用于注药侧 DRG，对非注药侧大鼠痛阈无明显影响，该结果与既往研究结果一致^[18]。

多柔比星脂质体 (PLD) 是多柔比星新载体剂型，系将多柔比星 (DOX) 通过与聚乙二醇的表面结合包封于脂质体中，改变了传统多柔比星的药物动力学和生物分布，可以减少单核巨噬细胞的吞噬，延长其在血液循环中的时间，在肿瘤治疗方面已显示出一定优势，例如可提高在肿瘤组织的靶向性，降低血浆中游离多柔比星的水平，减轻对心脏损害和骨髓抑制，同时保持多柔比星的抗肿瘤作用^[21]。研究表明，PLD 的半衰期比 DOX (73.9 h vs. 10 min) 长得多，这使得肿瘤对 PLD 的摄取增加，抗肿瘤作用增强^[22]。本研究观察了成年大鼠椎间孔注射 PLD 后 28 天的行为学变化，但 PLD 的镇痛作用持续时间是否较 DOX 更具优势，仍需后期进一步延长观察时间来证实。PLD 中的隐形脂质体是由氢化大豆磷脂酰胆碱、胆固醇及聚乙二醇磷脂酰乙醇胺组成，无毒、无免疫源性，可体内降解^[23,24]。本研究中，与生理盐水组相比，隐形脂质体组注药后各时间点 MWT 和 TWL 无明显变化，表明隐形脂质体对大鼠机械痛阈值和热痛阈值均无明显影响，可排除脂质体自身对实验结果的干扰。本研究结果显示，注药后 28 天，DOX 组大鼠有 3 只出现轻微跛行，运动功能分级 4 级，跛行率为 30% (3/10)，PLD 组及其余各组大鼠均未出现跛行，运动功能分级均为 5 级正常，组间比较差异虽无统计学意义，但仍需扩大

样本量、延长观察时间来进一步验证。

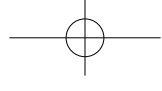
Bigotte 等^[25]曾报道，静脉注射抗肿瘤剂量的多柔比星后在周围神经系统双侧 DRG 内显示高度聚集的多柔比星自发荧光。Kato 等^[26]在猫的三叉神经分支注射不同浓度 DOX (1%~10%)，注射后 24~48 h 三叉神经感觉诱发电位消失，结果表明多柔比星是一种具有自发荧光和逆行运输特性的蒽环类抗生素。本研究采用经皮椎间孔注射多柔比星和多柔比星脂质体，荧光显微镜显示，DOX 组和 PLD 组注药侧 DRG 内 NF200 标记的大细胞周围可见强阳性红色多柔比星自发荧光分布，而非注药侧无自发荧光出现，且 DOX 组和 PLD 组的 NF200 细胞数量及自发荧光强度差异无统计学意义，证实多柔比星的自发荧光特性和逆行运输作用与既往研究相同，进一步说明经皮椎间孔注射 PLD 通过释放 DOX 对 DRG 产生选择性作用，不会通过局部吸收入血作用于对侧 DRG 导致全身神经毒性作用；同时表明经皮椎间孔注射方法可选择性进入注药侧 DRG，仅用一根很细的穿刺针即可，整个操作仅数分钟即可完成，简便易行，不用做切开注射，更能模拟临床注药方式，且可减少手术创伤对大鼠行为学的影响。注药后所有大鼠均未出现明显运动功能障碍，该结果与既往相关研究结果一致。

综上所述，经皮椎间孔注射 0.2% 多柔比星脂质体对 DRG 能够产生与 0.2% 多柔比星相似的镇痛作用，且不影响下肢运动功能。多柔比星脂质体与传统多柔比星相比，在镇痛作用持续时间上是否具有优势，且其对 DRG 镇痛作用的具体机制如何，今后需延长观察时间，并从 DRG 细胞形态学和分子水平来进一步验证和深入研究。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Esposito MF, Malayil R, Hanes M, *et al.* Unique characteristics of the dorsal root ganglion as a target for neuromodulation[J]. *Pain Med*, 2019, 20(Suppl 1):S23-S30.
- [2] D'Souza RS, Kubrova E, Her YF, *et al.* Dorsal root ganglion stimulation for lower extremity neuropathic pain syndromes: an evidence-based literature review[J]. *Adv Ther*, 2022, 39(10):4440-4473.
- [3] Ma L, Yao M. Safety and efficacy of CT-guided pulsed radiofrequency combined with steroid and ozone injection-treated cervical 3-8 herpes zoster neuralgia using a posterior and upper quarter of the cervical foramina puncture approach[J]. *J Pain Res*, 2022, 15:23-32.



- [4] Fei Y, Huang B, Deng J, *et al.* Efficacy of dorsal root ganglion pulsed radiofrequency combined with paravertebral injection of recombinant human interferon- $\alpha 2b$ in herpetic neuralgia[J]. J Pain Res, 2021, 14: 711-719.
- [5] 李崎, 冯爱敏, 肖红, 等. CT 引导下椎旁阿霉素注射治疗顽固性带状疱疹后神经痛短期及中期疗效的临床观察 [J]. 中南大学学报 (医学版), 2014, 39(9): 930-934.
- [6] 尹立军, 陈学军, 高顺利. 阿霉素椎旁注射对带状疱疹后神经痛病人疼痛程度及血清疼痛递质、细胞因子的影响 [J]. 中国处方药, 2020, 18(9):82-84.
- [7] 杨洋, 刘叶, 王俊华, 等. 多柔比星联合高电压脉冲射频治疗原发性三叉神经痛的临床研究 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2017, 23(3):226-228.
- [8] 李春伟, 梁慧玲, 杨忠荣, 等. 椎间孔内注射不同浓度阿霉素对大鼠痛阈和背根神经节结构的影响 [J]. 山东医药, 2009, 49(39):37-38.
- [9] Hu W, Lv K, Teng R, *et al.* Pegylated liposomal doxorubicin versus epirubicin as adjuvant therapy for stage I-III breast cancer[J]. Frontiers in genetics, 2021, 12:746114.
- [10] Ferrari LF, Cunha FQ, Parada CA, *et al.* A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats[J]. J Neurosci Methods, 2007, 159(2):236-243.
- [11] Luo WJ, Yang F, Yang F, *et al.* Intervertebral foramen injection of ozone relieves mechanical allodynia and enhances analgesic effect of gabapentin in animal model of neuropathic pain[J]. Pain Physician, 2017, 20(5):E673-E685.
- [12] Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms[J]. Front Neurol, 2019,10:282.
- [13] Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, *et al.* Human dorsal root ganglia[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13:271.
- [14] Berger AA, Liu Y, Possoit H, *et al.* Dorsal root ganglion (DRG) and chronic pain[J]. Anesth Pain Med, 2021, 11(2):e113020.
- [15] 刘坤. CT 引导下射频联合背根神经节阿霉素介入治疗带状疱疹后神经痛的研究 [J]. 中国实用医刊, 2022, 49(3):51-54.
- [16] Sidenius P. The effect of doxorubicin on slow and fast components of the axonal transport system in rats[J]. Brain, 1986, (Pt5):885-896.
- [17] 徐金泉, 郑宝森, 薛玉良, 等. 椎旁注射阿霉素对家兔背根神经节的选择性作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2004, 24(9):74-75.
- [18] 刘靖芷, 郑宝森, 史可梅, 等. 家兔坐骨神经内注射阿霉素对后肢感觉和运动功能的影响 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2006, 12(3):156-159.
- [19] 刘靖芷, 薄存菊, 李全波, 等. 椎间孔注射多柔比星对神经病理性痛大鼠痛行为学及背根神经节神经元超微结构的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(6): 665-669.
- [20] Mahmoodazdeh A, Shafiee SM, Sisakht M, *et al.* Adrenomedullin protects rat dorsal root ganglion neurons against doxorubicin-induced toxicity by ameliorating oxidative stress[J]. Iran J Basic Med Sci, 2020, 23(9):1197-1206.
- [21] Ooyama T, Shimoji Y, Nakasone T, *et al.* Effects of Pegylated Liposomal Doxorubicin and CA125 level variability analysis in platinum-refractory/resistant recurrent ovarian cancer[J]. Anticancer Res, 2022, 42(6): 3017-3022.
- [22] Gabizon AA, Patil Y, La-Beck NM. New insights and evolving role of pegylated liposomal doxorubicin in cancer therapy[J]. Drug Resist Updat, 2016, 29:90-106.
- [23] 李红斌, 韩军军, 刘俊霞, 等. 脂质体最新研究进展 [J]. 黑龙江科学, 2021, 12(14):42-43.
- [24] Da Costa O, Firmino P, Strapasson GB, *et al.* One-step production of sterically stabilized anionic nanoliposome using microfluidic device[J]. J Oleo Sci, 2022, 71(4): 515-522.
- [25] Bigotte L, Olsson Y. Retrograde transport of doxorubicin (adriamycin) in peripheral nerves of mice[J]. Neurosci Lett, 1982, 32:217-221.
- [26] Kato S, Yamamoto T, Iwasaki Y, *et al.* Experimental retrograde adriamycin trigeminal sensory ganglionectomy[J]. J Neurosurg, 1988, 69(5):760-765.