聚知刊出版社
JZK publishing

铁死亡在瑞芬太尼诱导术后痛觉过敏和急性疼痛作用的研究

李爱芝 谢永刚 李杰 李志 徐伟伟[通讯作者]

烟台毓璜顶医院，山东省烟台市，264000；

摘要：目的：探究铁死亡在瑞芬太尼诱导术后痛觉过敏和急性疼痛作用。方法：将 20 只 SD 雄性大鼠分为对照组 10 只，另 10 只建立大鼠切口痛模型，模拟手术创伤：所有的大鼠左足爪部行手术切口。建立瑞芬太尼致术后痛觉过敏模型：以 1.0ug/kg.min 速率静脉输注瑞芬太尼（60min），开始后 10min 行足爪部切口痛手术。利用免疫荧光技术与 Westernblot 分析，对大鼠脊髓背角铁死亡相关标志性蛋白——谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）和长链脂酰辅酶 A 合成酶 4（ACSL4）的表达水平进行检测，能够揭示铁死亡的状况，从而确证铁死亡的发生。此外，运用过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法来定量丙二醛（MDA）的含量；同时，采用黄嘌呤氧化酶方法对超氧化物歧化酶（SOD）的活性进行测定，以此证明铁死亡过程中机体遭受的氧化损伤反应。结果：给药后 6h、24h、48h 后，研究组相关蛋白 GPX4/ACSL4 水平高于对照组(P<0.05)。研究组铁含量，MDA 含量、SOD 活性高于对照组(P<0.05)。结论：铁死亡在瑞芬太尼诱导术后痛觉过敏和急性疼痛中具有重要作用，值得临床推广与使用。

关键词:铁死亡；瑞芬太尼；痛觉过敏；急性疼痛

DOI:10.69979/3029-2808.24.4.033

引言

术后痛觉过敏和急性疼痛是临床中医生面临的普遍难题，这些症状严重阻碍了患者的术后康复和生活品质[1]。瑞芬太尼因起效迅速、代谢快等优势，在全身麻醉手术中广泛用作镇痛药物。然而，瑞芬太尼的使用会在术后引发阿片类药物引起的痛觉过敏和急性疼痛问题，给术后疼痛管理带来了挑战，亟需找到解决办法[2]。铁死亡是一种不同于凋亡、坏死、自噬的细胞死亡模式，其主要特征包括细胞内铁代谢失衡、脂质过氧化加剧和线粒体功能异常，其在神经系统疾病、心血管疾病、肿瘤等多种疾病的进程中有重要作用，在疼痛研究领域的关注度也在逐渐提升[3-4]。但探究铁死亡在瑞芬太尼诱导的痛觉过敏和急性疼痛机制尚不完全清楚，基于此，本文探究铁死亡在瑞芬太尼诱导术后痛觉过敏和急性疼痛作用。

1. 对象与方法

1.1 对象

SD 雄性大鼠 20 只，体质量为 180～210g，所有大鼠均在湿度 40%~70%，温度 21℃~25℃，12 小时的光照环境下正常喂养 1 周，健康状况良好。本文研究遵循动物实验 3-R 原则，且通过我院动物伦理委员会认可。

试剂与抗体：GPX-4(B-12):Santa 公司，美国；FACSL4:Abcam 公司,美国；组织铁检测试剂盒：南京建成生物工程研究所，中国；MDA 检测试剂盒：碧云天，中国；SOD 检测试剂盒：贝博生物科技有限公司，中国。

1.2 方法

将 20 只 SD 雄性大鼠分为对照组 10 只，大鼠禁食 8 h 后，经鼻吸入 3%七氟醚麻醉（实验中 1.5%）。在诱导完成后对照组输注等量生理盐水 30min，另 10 只建立大鼠切口痛模型，模拟手术创伤：所有的大鼠左足爪部行手术切口。建立瑞芬太尼致术后痛觉过敏模型：以 1.0 ug/kg.min 的速率静脉输注瑞芬太尼（60min），在开始后 10min 进行足爪部切口痛手术。

痛觉行为测定：运用机械缩足反射阈值（MWT）和热缩足反射潜伏期（TWL）对大鼠的机械性痛阈和热痛阈变化进行检测，以评估瑞芬太尼是否成功构建术后痛觉过敏模型。在给予瑞芬太尼静脉注射前 24 小时及注射后的 6、24、48 小时分别测量机械刺激引起的缩爪阈值和热刺激引起的缩爪潜伏期。MWT 值下降，表明机械性疼痛反应加剧；TWL 值降低，则意味着疼痛反应加重。

1.3 观察指标

1.3.1 两组脊髓背角铁死亡相关蛋白 GPX4/ACSL4 水平比较

采用免疫荧光法、Westernblot 检测大鼠脊髓背角的铁死亡相关 GPX4、ACSL4 的表达。

1.3.2 两组大鼠的脊髓背角组织铁含量，MDA 含量、SOD 活性比较

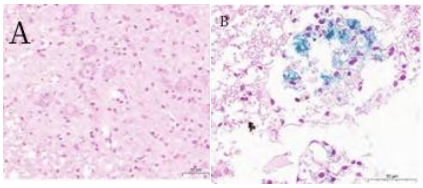
采用过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法测定 MDA 含量；采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性。

1.4 统计学处理

应用 SPSS24.0 软件进行统计学处理，计数数据用例数（n）和（%）表示，通过卡方检验、Fisher 精确检验，呈正态分布计量数据用均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，以 t 检验。各组免疫组化染色片中阳性表达率采用方差分析(ANOVA)，组间两两比较。P＜0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普鲁士蓝（Prussianblue）染色



注：A 为对照组，脊髓组织内无铁沉积；B 为研究组，脊髓组织内发现大量铁沉积。

2.2 两组脊髓背角铁死亡相关蛋白 GPX4/ACSL4 水平比较

如表 1 所示，24h 前，两组相关蛋白 GPX4/ACSL4 水平无差异（P>0.05）；给药后 6h、24h、48h 后，研究组相关蛋白 GPX4/ACSL4 水平高于对照组，有差异（P<0.05）。

表 1 两组脊髓背角铁死亡相关蛋白 GPX4/ACSL4 水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	GPX4				ACSL4			
		24h 前	给药后 6h	给药后 24h	给药后 48h	24h 前	给药后 6h	给药后 24h	给药后 48h
对照组	10	2.03±0.15	1.65±0.20	1.24±0.14	0.62±0.03	0.24±0.04	0.29±0.05	0.50±0.01	0.70±0.12
模型组	10	2.01±0.10	1.98±0.23	1.43±0.18	0.89±0.06	0.23±0.03	0.42±0.09	0.68±0.10	0.96±0.15
t 值		0.350	3.424	2.638	12.730	13.529	3.993	5.664	4.280
P 值		0.729	0.001	0.016	0.001	0.001	0.008	0.002	0.004

2.3 两组大鼠的脊髓背角组织铁含量，MDA 含量、SOD 活性比较

如表 2 所示，24h 前，两组铁含量，MDA 含量、SOD 活性无差异（P>0.05）；给药后 6h、24h、48h 后，研究组铁含量，MDA 含量、SOD 活性高于对照组，有差异（P<0.05）。

表 2 两组大鼠的脊髓背角组织铁含量，MDA 含量、SOD 活性比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	例数	铁含量				MDA 含量			
		24h 前	给药后 6h	给药后 24h	给药后 48h	24h 前	给药后 6h	给药后 24h	给药后 48h
对照组	10	5.12±0.23	5.68±1.02	13.25±1.25	17.78±1.35	5.02±0.35	7.68±0.48	13.38±1.02	17.87±1.42
模型组	10	5.10±0.20	8.74±1.26	16.34±1.35	23.36±1.45	5.00±0.30	10.05±0.56	16.37±1.30	19.94±1.56
t 值		0.207	5.969	5.311	8.907	0.137	10.160	5.722	3.103
P 值		0.837	0.001	0.004	0.001	0.892	0.001	0.002	0.006

组别	例数	SOD			
		24h 前	给药后 6h	给药后 24h	给药后 48h
对照组	10	1252.30±135.54	1135.02±120.10	867.48±71.25	568.65±55.02
模型组	10	1250.56±130.50	968.78±102.02	654.12±65.25	324.16±12.35
t 值		0.736	6.984	3.336	3.516
P 值		0.470	0.002	0.003	0.002

3 讨论

脊髓背角是疼痛信号传导的关键中枢，正常情况下，其对疼痛信号能进行有效处理，但术后痛觉过敏和急性疼痛较为常见，严重影响恢复[5]。而瑞芬太尼作为术后镇痛药，其诱导的痛觉过敏和急性疼痛可能与脊髓背角神经元的损伤有关。脊髓背角神经元损伤可能导致神经元兴奋性增加，痛阈降低，从而产生痛觉过敏和急性疼痛，而铁死亡在痛觉过敏的发生过程中发挥重要作用，铁死亡通过促进脊髓背角神经元内脂质过氧化，降低神经元抗氧化能力，从而增加神经元兴奋性，导致痛觉过敏[6-7]。铁死亡还可通过促进脊髓背角神经元内游离铁的释放，加剧脂质过氧化反应，从而加重急性疼痛。

铁死亡是细胞程序性死亡的一种形式，其主要特征包括线粒体外膜的破裂、内膜密度的增加和嵴减少等，并且在代谢过程中表现为铁沉积及 GSH 的减少等[8]。临床调查显示，Ferroptosis 由 Erastin 类小分子激活，关键在于抑制 GPX4/ACSL4 活性。GPX4 降低导致 ROS 增加，促进脂质过氧化，诱发铁死亡，因此 GPX4/ACSL4 是铁死亡的关键蛋白，可作为检测标志[9-10]。本文研究结果显示，研究组 GPX4/ACSL4 水平较高，说明瑞芬太尼可降低脊髓背角 GPX4 的表达，导致 ROS 积累，促进铁死亡，瑞芬太尼还可上调脊髓背角 ACSL4 的表达，促进脂质过氧化，诱发铁死亡。

有学者在研究中指出，针对细胞铁死亡的检测同样依据其形态学及代谢性特征，可以通过电子显微镜来观察细胞内线粒体的形态变化[11]。此外，通过测定组织铁含量、细胞内氧化应激相关指标如 MDA 含量以及 SOD 活性等参数，来判别细胞是否发生了铁死亡现象[12-13]。本文研究结果显示，研究组铁含量，MDA 含量、SOD 活性较高，说明铁死亡通过促进脊髓背角神经元内游离铁的释放，导致脊髓背角组织铁含量升高，还通过促进脊髓背角神经元内脂质过氧化反应，使 MDA 含量升高，还可通过降低脊髓背角神经元内 SOD 活性，使神经元抗氧化能力减弱。

综上所述，铁死亡在瑞芬太尼诱导术后痛觉过敏和急性疼痛中发挥重要作用，瑞芬太尼通过影响铁死亡途径，导致术后痛觉过敏和急性疼痛。

参考文献

[1]万志浩,付铭,张玉飞.瑞芬太尼对心肌缺血再灌注损伤及铁死亡过程的影响及机制研究[J].湖北民族大学学报（医学版）,2024,41(2):11-15.

[2]顾喜燕,秦超,张海芳,等.自噬在富氢液减轻瑞芬太尼诱发切口痛大鼠痛觉过敏中的作用[J].中华麻醉学杂志,2024,44(5):599-602.

[3]殷玲,宋振华,靳晓迪,等.S1PR1 在瑞芬太尼诱发切口痛大鼠痛觉过敏中的作用：与背根神经节 KCNQ2/3 钾通道的关系[J].中华麻醉学杂志,2024,44(7):821-825.

[4]舒瑞辰,李媛,张璇,等.nNOS-NOS1AP 复合体在瑞芬太尼诱发大鼠痛觉过敏中的作用[J].中华麻醉学杂志,2024,44(1):66-70.

[5]封雪,赵滨滨,任蓁.瑞芬太尼调节 IL-10/β-内啡肽信号通路对坐骨神经损伤大鼠疼痛的影响[J].河北医药,2024,46(7):988-992.

[6]WuX,GuoL,YeG.Remifentanilamelioratelunginjuryinneonateratswithacuterespiratorydistressbydown-regulatingTIMP1expression.AmJTranslRes.2020Oct15;12(10):6325-6334.

[7]MinerviniV,TyeCB,GhodratiS,etal.Effectsofremifentanil/histaminemixturesinratsrespondingunderachoiceprocedure.BehavPharmacol.2021Jun1;32(4):278-285.

[8]NiXQ,HuZY.Remifentanilimprovesmyocardialisc

hemia-reperfusioninjuryinratsthroughinhibiting IL-18signalingpathway.EurRevMedPharmacolSci.2020Apr;24(7):3915-3922.
[9]LiJ,WangQ,GaoY,etal.BlockingSphK/S1P/S1PR1axissignalingpathwayalleviatesremifentanil-inducedhyperalgesiainrats.NeurosciLett.2023Mar28;801:137131.
[10]CaoD,LiuS,YangM,etal.Remifentanilpreconditioningalleviatesmyocardialischemia/reperfusioninjuryinratsviaactivatingJagged-1/Notchsignalingpathway.BiosciRep.2021May10:BSR20210534.
[11]罗国娅,王晓娥,李林芝,等.瑞芬太尼下调大鼠背根神经节和脊髓背角 GIRK2 的表达[J].中山大学学报（医学科学版）,2023,44(3):361-368.
[12]周瑜,常兰兰,朱魏,等.沉默信息调节因子 2 在瑞芬太尼诱发的大鼠切口痛觉过敏中的作用及其机制研究[J].现代生物医学进展,2024,24(4):601-605,611.
[13]钱玥,王芳,张兢,等.抑制脊髓 NMDAR-cADPR-RyRs 信号通路减弱瑞芬太尼诱发的大鼠术后痛觉过敏[J].基础医学与临床,2023,43(9):1335-1340.

第一作者姓名：李爱芝单位：烟台毓璜顶医院科室：麻醉科邮编：264000 出生年:1963.3
性别：女民族：汉族籍贯(省市)：山东省龙口市学历：本科职称：主任医师研究方向：围术期肾功能保护邮箱地址：645390415@qq.com
通讯作者：姓名：徐伟伟单位：烟台毓璜顶医院科室：麻醉科邮编：264000 出生年：1989.9 性别：女民族：汉族籍贯(省市)：山东省临沂市学历：硕士研究生职称：主治医师研究方向：铁死亡的临床意义邮箱地址：xww130823@163.com

项目基金：2022 年烟台市科技创新发展计划（政策引导类）项目，项目编号 2022YD023。