

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.36.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 36-0007-05

静脉或鞘内注射盐酸奈福泮对大鼠 甲醛炎性痛的影响及机制探讨*

彭志锋, 马国英, 杨靖辉

(山西大同大学医学院 生理教研室, 山西 大同 037009)

摘要: 目的 评估盐酸奈福泮静脉或鞘内注射的镇痛效果及脊髓多巴胺能神经传递在其中的作用。**方法** 复制大鼠甲醛炎性痛模型, 然后进行微透析研究, 检测盐酸奈福泮注射后大鼠脊髓背角细胞外多巴胺浓度变化。通过预先注射舒必利, 多巴胺 D2 受体拮抗剂, 观察多巴胺水平变化与盐酸奈福泮镇痛的关系。**结果** 静脉注射盐酸奈福泮, 可抑制甲醛诱导的 I 期退缩反应, 但对 II 期退缩反应无影响。鞘内注射盐酸奈福泮可减少 I 和 II 期退缩反应, 并呈剂量依赖性。微透析研究发现, 鞘内注射盐酸奈福泮引起大鼠脊髓多巴胺水平增加。预处理舒必利不影响静脉或鞘内注射盐酸奈福泮的镇痛作用。**结论** 无论是静脉和鞘内注射盐酸奈福泮均有效缓解大鼠炎性痛。盐酸奈福泮镇痛机制可能不涉及脊髓水平多巴胺能神经传递。

关键词: 神经痛; 盐酸奈福泮; 甲醛炎性痛; 大鼠

中图分类号: R364

文献标识码: A

Effect of intrathecal or intravenous injection of Hydrochloride Nefopam on rat model of formalin induced pain*

Zhi-feng Peng, Guo-ying Ma, Jing-hui Yang

(Department of Physiology, School of Medicine, Shanxi Datong University,
Datong, Shanxi 037009, China)

Abstract: Objective To investigate the role of the spinal dopaminergic neurotransmission in Hydrochloride Nefopam mediated antinociceptive effect. **Methods** Rat model of formalin induced pain was established. Concentration of dopamine in spinal dorsal horn was measured after intravenous or intrathecal administration of Hydrochloride Nefopam. Pretreatment of Sulpiride, a dopaminergic D2 receptor antagonist, was performed to determine association of dopamine with Hydrochloride Nefopam mediated analgesia. **Results** Intravenous injection of Hydrochloride Nefopam inhibited the flinching responses in phase I but not in phase II. Intrathecally injected Hydrochloride Nefopam reduced the flinching responses in both phase I and phase II in a dose dependent manner. Micro-dialysis study revealed a significant increase of dopamine in the spinal cord by intrathecal administration of Hydrochloride Nefopam but not with intravenous injection. Analgesic effects of intrathecally injected Hydrochloride Nefopam was not affected by pretreatment with Sulpiride. **Conclusions** Administration of Hydrochloride Nefopam relieves inflammatory pain in rats; analgesic mechanism of Hydrochloride Nefopam may not involve the dopaminergic transmission at the spinal level.

Keywords: neuralgia; Hydrochloride Nefopam; formalin inflammatory pain; rat

收稿日期: 2018-04-05

* 基金项目: 山西大同大学博士科研启动经费 (No: 2015-B-01)

奈福泮是一种非阿片和甾体类镇痛药物。奈福泮镇痛作用机制目前尚不明确,但以往研究提示,奈福泮可能通过抑制中枢神经系统单胺类神经递质再摄取,发挥镇痛作用^[1]。最近的一项研究提示,奈福泮通过调节脊髓去甲肾上腺素水平在大鼠炎性痛模型中发挥镇痛作用^[2]。此外,奈福泮镇痛机制也可能涉及多巴胺的传递^[3]。因为多巴胺耗竭可减小奈福泮在大鼠热板试验中的镇痛作用^[4]。相反,多巴胺 D2 受体拮抗剂舒必利不影响奈福泮在小鼠扭体试验中的镇痛作用,但可抑制奈福泮在甲醛试验的镇痛作用^[5]。目前奈福泮通过抑制多巴胺再摄取发挥镇痛作用未见相关报道。本研究目的是评估多巴胺能神经传递在奈福泮镇痛中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

45 只雄性 SD 大鼠 (225 ~ 250 g) 购于山西医科大学动物中心。室内温度保持在 22 ~ 23℃ 左右,湿度在 50% 左右。明暗周期 12 h, 自由饮水和进食。按静脉注射方式将大鼠分成对照组、盐酸奈福泮组 (1 或 3 mg/kg) 及盐酸奈福泮 (3 mg/kg) + 舒必利 (3 mg/kg) 组 (奈福泮 + 舒必利组), 对照组尾静脉注射等量生理盐水, 每组 5 只大鼠。按鞘内注射方式将大鼠分成对照组、盐酸奈福泮组 (3、10 或 30 μg) 及盐酸奈福泮 (30 μg) + 舒必利 (100 μg) 组, 注射溶液均为 10 μl, 对照组鞘内注射等量生理盐水。

1.2 实验仪器和试剂

盐酸奈福泮 (重庆西南药业股份有限公司), 舒必利 (美国 Sigma 公司), 甲醛 (美国 Sigma 公司), 立体定位仪 (北京拜安吉科技有限公司), 液相色谱仪 (南京科捷分析仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 复制大鼠炎性痛模型 限制大鼠后, 用注射器在各组大鼠后肢足底单次注射 5% 甲醛溶液 50 μl。

1.3.2 大鼠鞘内插管 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠 (0.06 g/kg), 颈后部剪毛、消毒, 在两耳连线中央做纵向切口, 暴露枕骨寰枕膜, 然后从此处插入 PE-10 管, 深 6 cm, 最终达到蛛网膜下池, 固定 PE-10 管。甲醛注射前 10 min 通过静脉或鞘内注射不同剂量盐酸奈福泮; 舒必利组在盐酸奈福泮静脉或鞘内注射前 10 min 注射舒必利。

1.4 大鼠痛行为检测

大鼠注射甲醛后表现出特有的退缩反应, 分为两期, 其中 I 期是急性伤害性反应 (0 ~ 9 min), 直接刺激外周伤害性感受器引起; 接着是 II 期 (10 ~ 60 min), 由脊髓背角及外周神经元敏感化所致。单位时间内大鼠注射足退缩反应次数作为观察指标。给予大鼠甲醛后即开始计时, 每间隔 5 min 观察 1 次, 持续 60 min。

1.5 微透析分析

首先麻醉大鼠, 右股静脉插管注射乳酸林格液 (1 ml/h), 胸腰椎椎板切除术后暴露脊髓 L₃ ~ L₅ 段, 大鼠固定于立体定位仪上。按照以往文献描述, 打开硬膜后, 微透析探针推进到脊髓背角浅层, 通过微量注射泵灌注 Ringer 平衡盐溶液 (1 μl/min), 120 min 持续灌注后, 连续采集 2 个样本, 通过高效液相层析法检测透析液中多巴胺浓度^[6]。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 或百分数表示。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验对数据进行正态性分析。多组间比较采用重复测量设计的方差分析, 然后进行 Bonferroni 事后检验, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 静脉及鞘内注射盐酸奈福泮对大鼠退缩反应的影响

对照组与静脉注射不同剂量盐酸奈福泮组大鼠的退缩反应次数, 采用重复测量设计的方差分析。结果: ①不同时间点大鼠退缩反应次数有差异 ($F = 13.738$, $P = 0.007$); ②对照组与不同剂量盐酸奈福泮组退缩反应次数有差异 ($F = 10.482$, $P = 0.012$), 对照组退缩反应次数高于不同剂量盐酸奈福泮组; ③对照组与不同剂量盐酸奈福泮组退缩反应次数变化趋势有差异 ($F = 9.061$, $P = 0.025$)。与对照组比较, 静脉注射盐酸奈福泮 (3 mg/kg) 可使甲醛诱导的 I 期退缩反应次数降低 60%, 而 II 期退缩反应次数无变化 (见图 1)。对照组与不同剂量鞘内注射盐酸奈福泮组大鼠的退缩反应次数, 采用重复测量设计的方差分析。结果: ①不同时间点大鼠退缩反应次数有差异 ($F = 15.846$, $P = 0.006$); ②对照组与不同剂量盐酸奈福泮有差异 ($F = 14.085$, $P = 0.008$), 对照组退缩反应次数高于不

同剂量盐酸奈福泮组; ③对照组与不同剂量盐酸奈福泮组退缩反应次数变化趋势有差异 ($F=12.972, P=0.012$)。鞘内注射盐酸奈福泮可使甲醛诱导的 2 个阶段退缩反应降低。其中 $30 \mu\text{g}$ 盐酸奈福泮使 I 期和 II 期退缩反应次数降低 49% 和 44% (见图 2)。

2.2 微透析研究情况

静脉注射盐酸奈福泮后, 对照组与不同剂量盐酸奈福泮组的多巴胺水平比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点多巴胺水平无差异 ($F=3.731, P=0.064$); ②各组的多巴胺水平无差异 ($F=$

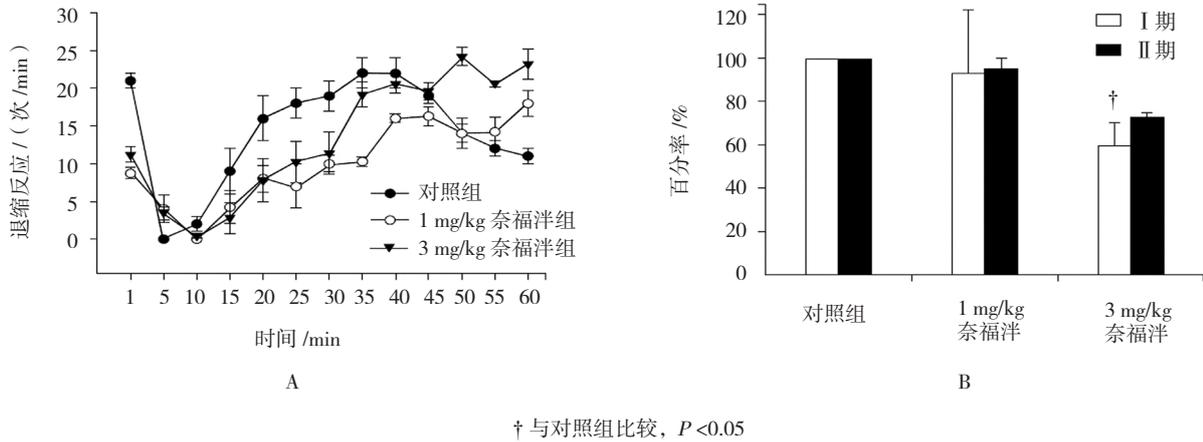


图 1 静脉注射奈福泮对甲醛诱导的大鼠退缩反应的影响

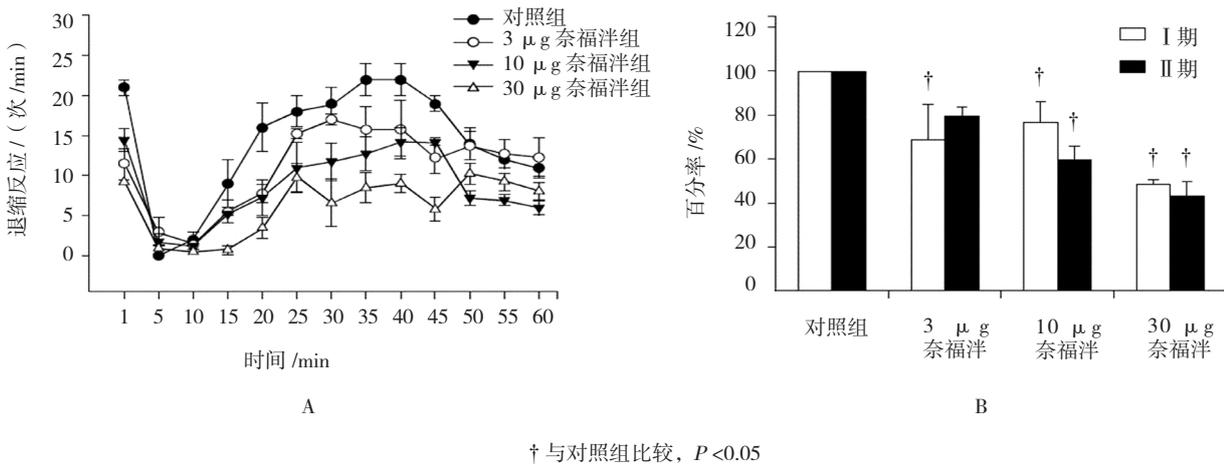


图 2 鞘内注射奈福泮对甲醛诱导的大鼠退缩反应的影响

$3.061, P=0.072$); ③各组多巴胺水平变化趋势无差异 ($F=2.843, P=0.083$)。鞘内注射盐酸奈福泮后, 对照组与不同剂量盐酸奈福泮组不同时间点的多巴胺水平比较, 采用重复测量设计的方差分析。结果: ①不同时间点的多巴胺水平有差异 ($F=13.904, P=0.008$); ②对照组与不同剂量盐酸奈福泮组在甲醛注射后不同时间点多巴胺水平有差异 ($F=11.647, P=0.011$), 对照组多巴胺水平低于盐酸奈福泮组; ③对照组和盐酸奈福泮组多巴胺水平变化趋势有差异 ($F=15.529, P=0.006$)。见图 3。

型的镇痛作用。同样, 鞘内注射舒必利, 也不影响盐酸奈福泮对甲醛模型的镇痛作用。见图 4。

2.3 舒必利对盐酸奈福泮镇痛作用的影响

静脉预处理舒必利, 不影响盐酸奈福泮对甲醛模

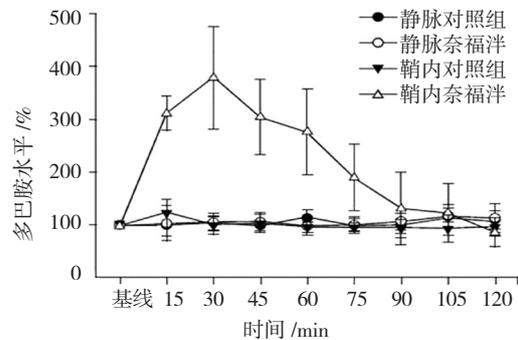


图 3 静脉 (3 mg/kg) 或鞘内 (30 μg) 注射盐酸奈福泮后脊髓背角细胞外多巴胺水平

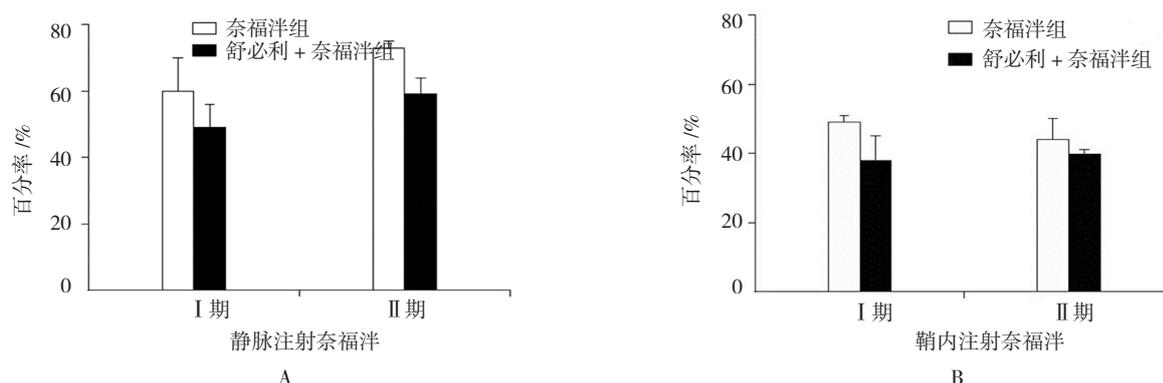


图 4 静脉 (3 mg/kg) 或鞘内 (100 μ g) 预注射舒必利对静脉 (3 mg/kg) 或鞘内 (30 μ g) 注射奈福泮镇痛作用的影响

3 讨论

本研究显示, 静脉或鞘内注射盐酸奈福泮可减少甲醛引起的疼痛行为。微透析检测发现鞘内而不是静脉注射盐酸奈福泮增加脊髓背角细胞外多巴胺水平。然而, 多巴胺 D2 受体拮抗剂舒必利不影响鞘内注射盐酸奈福泮的镇痛效应。本结果表明, 奈福泮镇痛机制可能不涉及脊髓水平多巴胺能传递, 虽然奈福泮进入脊髓后可抑制多巴胺再摄取。

奈福泮一直被认为是单胺类递质 (包括多巴胺) 再摄取的抑制剂^[2]。然而, 本研究首次检测在体大鼠脊髓背角细胞外多巴胺水平的变化。由于奈福泮容易通过血脑屏障进入大脑内, 笔者假定静脉或鞘内注射盐酸奈福泮均会增加中枢中多巴胺水平。然而, 在本研究中, 只有鞘内注射盐酸奈福泮可使多巴胺水平升高, 而静脉给药不能增加多巴胺水平。在预实验中, 静脉注射盐酸奈福泮 (10 mg/kg) 或更高剂量降低甲醛诱导的退缩行为, 同时微透析研究中多巴胺水平也增高, 但经常会出现不良反应, 如呼吸抑制和 (或) 死亡等。因此, 在目前的研究中, 静脉注射盐酸奈福泮剂量是 3 mg/kg, 可能不能完全抑制脊髓多巴胺再摄取。总之, 静脉注射奈福泮不能增加脊髓细胞外多巴胺水平可能由于其注射剂量。另一方面, 多巴胺 D2 受体拮抗剂未减弱鞘内注射盐酸奈福泮的镇痛效应, 虽然鞘内注射盐酸奈福泮可增加脊髓背角细胞外多巴胺水平。因为脊髓多巴胺能系统已被证明通过激活 D2 受体调节伤害性信息的传递^[7]。然而, 众多报道提示, 脑而不是脊髓通路通过多巴胺能神经传递参与痛觉调节^[8-9]。

鞘内注射大剂量 D2-受体激动剂仅表现短暂的镇痛作用, 而全身注射低剂量该药物产生的镇痛作用持续超过 48 h^[9]。总的来说, 脑而不是脊髓通路在多

巴胺镇痛作用中发挥重要作用。本研究中鞘内注射 10 μ g 盐酸奈福泮可能仅扩散于脊髓水平^[10]。因此, 鞘内注射盐酸奈福泮不能激活脊髓以上多巴胺通路, 从而影响疼痛。因此, 笔者推测多巴胺能调节可能不参与鞘内注射盐酸奈福泮的镇痛机制。目前多巴胺能系统是否参与奈福泮镇痛机制仍存在争议。有研究指出, 多巴胺 D2 受体拮抗剂舒必利不影响奈福泮在扭体试验中的镇痛作用^[11]。这与本研究的结果一致。在另一项研究中, 3 mg/kg 而不是 10 mg/kg 舒必利阻断奈福泮在小鼠甲醛模型中的镇痛效应。结果差异可能是由于研究方法不一样所致, 比如药物注射途径、给药剂量及疼痛类型等, 从而通过脑和 (或) 脊髓通路发挥作用。

总之, 本研究表明静脉和鞘内注射盐酸奈福泮均可有效缓解福尔马林诱导的大鼠炎性疼, 然而奈福泮镇痛机制可能不涉及脊髓水平多巴胺能传递。

参考文献:

- [1] 李国兰, 贺昌林, 陈光明, 等. 鞘内注射盐酸奈福泮和吗啡的相互作用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(12): 749-751.
- [2] HO J S, HA H B, HONG P S, et al. Spinal noradrenergic modulation and the role of the alpha-2 receptor in the antinociceptive effect of intrathecal nefopam in the formalin test[J]. Korean Journal of Pain, 2014, 27(1): 23-29.
- [3] KIM K H, ABDI S. Rediscovery of nefopam for the treatment of neuropathic pain[J]. Korean Journal of Pain, 2014, 27(2): 103-111.
- [4] NAM J S, CHEONG Y S, KARM M H, et al. Effects of nefopam on streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain in rats[J]. Korean J Pain, 2014, 27(4): 326-333.
- [5] VAN ELSTRAETE A C, SITBON P. Median effective dose (ED50) of paracetamol and nefopam for postoperative pain: isobolographic analysis of their antinociceptive interaction[J]. Minerva Anestesiologica, 2013, 79(3): 232-239.

- [6] LEE H G, CHOI J I, YOON M H, et al. The antiallodynic effect of intrathecal tianeptine is exerted by increased serotonin and norepinephrine in the spinal dorsal horn[J]. *Neuroscience Letters*, 2014(583): 103-107.
- [7] 刘风雨. 腹侧基底丘脑 GABA 能传递的降低参与慢性炎症痛的发病机制 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2017, 23(3): 167.
- [8] POTVIN S, GRIGNON S, MARCHAND S. Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception[J]. *Synapse*, 2009, 63(5): 390-402.
- [9] COBACHO N, JL D L C, PAÍNO C L. Dopaminergic modulation of neuropathic pain: analgesia in rats by a D2-type receptor agonist[J]. *Brain Research Bulletin*, 2014(106): 62-71.
- [10] YAN X, MAIXNER D W, YADAV R, et al. Paclitaxel induces acute pain via directly activating toll like receptor 4[J]. *Molecular Pain*, 2015, 11(1): 1-17.
- [11] LEE H G, KIM W M, KIM J M, et al. Intrathecal nefopam-induced antinociception through activation of descending serotonergic projections involving spinal 5-HT7 but not 5-HT3 receptors[J]. *Neuroscience Letters*, 2015(587): 120.

(王荣兵 编辑)