

鞘内预注布托啡诺与吗啡对炎性痛大鼠痛觉及脊髓c-fos蛋白表达的影响

周婧 谈大海 金毅

[摘要] **目的** 观察鞘内预先注射布托啡诺与吗啡对福尔马林诱导的炎性痛大鼠疼痛行为学及脊髓c-fos蛋白表达的影响。**方法** 大鼠被随机分为布托啡诺组、吗啡组及对照组,每组8只。布托啡诺组鞘内预先注射布托啡诺10 μg,吗啡组鞘内预先注射吗啡10 μg,对照组鞘内预先注射0.9%氯化钠注射液,然后在三组大鼠的左后足掌面皮下注射福尔马林致痛,观察各组大鼠行为学变化并通过免疫组化法测定大鼠腰4~6节段脊髓背角c-fos受体的表达。**结果** 与对照组比,吗啡组和布托啡诺组没有明显的福尔马林致痛双相反应,且福尔马林致痛大鼠腰4~6脊髓背角浅层及深层fos样免疫反应神经元(FLIN)数量明显减少(q 分别=5.65、4.78;5.85、6.27, P 均<0.05),而与吗啡组比较,布托啡诺组大鼠行为学表现更安静,疼痛加权评分减低,脊髓背角浅层及深层FLIN数量也明显减少(q 分别=9.53、6.37, P 均<0.05)。**结论** 鞘内预先注射布托啡诺与吗啡能够对福尔马林致痛大鼠产生明显的抗伤害和镇痛作用,且布托啡诺的镇痛效果优于吗啡。

[关键词] 布托啡诺; 吗啡; 福尔马林; c-fos受体

Effect of intrathecal preinjection of butorphanol and morphine on the expression of c-fos protein and pain behavior in the spinal cord of rats with inflammatory pain

ZHOU jing, TAN Dahai, JIN Yi. Department of Anesthesia, Hangzhou Cancer Hospital, Hangzhou 310002, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of intrathecal injection of butorphanol and morphine on pain behavior of rats with inflammatory pain induced by formalin, and compare their analgesic effect. **Methods** All rats were randomly divided into 3 groups, 8 rats in each group: butorphanol group (intrathecal preinjection of butorphanol 10 μg), morphine group (intrathecal preinjection of morphine 10 μg) and control group (intrathecal preinjection of physiological saline). After the formalin were injected, the behavior of rats were observed. And the expression of c-fos receptor in the Loin4~6 spinal dorsal horn in rats were determined by immunohistochemical method. **Results** Compared with control group, the morphine group and butorphanol group had not obvious pain in the two phase reaction, and the expression of c-fos receptor in the loin4~6 spinal dorsal horn in rats was significantly lower ($q=5.65, 4.78; 5.85, 6.27, P<0.05$). Compared with morphine group, the behavior of rats in butorphanol group was more quiet, the pain score decreased and c-fos receptor expression was significantly decreased ($q=9.53, 6.37, P<0.05$). **Conclusion** Intrathecal injection of butorphanol and morphine could play obvious anti-injury and analgesic effect on the pain induced by formalin, and the analgesic effect of butorphanol was better than morphine.

[Key words] butorphanol; morphine; formalin; c-fos receptor

布托啡诺和吗啡均为阿片类镇痛药,吗啡是纯粹的阿片受体激动剂,可激动μ、δ及κ型受体,布托啡诺为混合型阿片受体激动-拮抗药,主要激动

κ受体,而对μ受体既有激动又有拮抗作用,因此布托啡诺因激动μ受体所产生的呼吸抑制、恶心呕吐和皮肤瘙痒等不良反应相对较少,因而在临床上有着前景更广泛的应用。本次研究通过鞘内预注布托啡诺与吗啡,观察大鼠行为学和脊髓c-fos蛋白表达的变化,探究布托啡诺与吗啡对福尔马林致

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2017.01.003

作者单位:310002 浙江杭州,杭州市肿瘤医院麻醉科(周婧、谈大海);南京军区南京总医院疼痛科(金毅)

痛大鼠的抗伤害作用并比较两者的镇痛效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验时间为2015年2月至3月,选取杭州市肿瘤医院实验室饲养的雄性Wistar大鼠,体质量240~280 g,单笼饲养,饲养环境温度恒定为23℃~27℃,无噪音、强光刺激,实验在大鼠适应环境4 d后进行。按照国际疼痛协会的伦理学标准执行本次动物实验性研究^[1]。排除鞘内置管不成功的大鼠,共24只大鼠符合实验标准,随机分为布托啡诺组、吗啡组、对照组,每组8只。三组大鼠比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠鞘内置管 实验大鼠采取改良Yaksh法进行鞘内置管^[1,2],腹腔注射10%水合氯醛300 mg/kg麻醉后,常规消毒后于后枕部正中线切开皮肤,分离肌肉,暴露寰枕膜,针头刺开寰枕膜,置入聚氨基甲酸乙酯鞘内微导管6 cm至脊髓腰段,外端与聚乙烯管连接,固定缝合后肌注青霉素4万U以预防感染。置管2 d后取无运动障碍的大鼠鞘内注射2%利多卡因20 μ l,如注药后30 s内双下肢麻痹则置管正确,否则被剔除出实验。置管成功后,对照组在鞘内预先注射0.9%氯化钠注射液,吗啡组在鞘内预先注射吗啡10 μ g,布托啡诺组在鞘内预先注射布托啡诺10 μ g,三组的注射容量都为10 μ l,所有药物都用0.9%氯化钠注射液稀释。

1.2.2 福尔马林致痛模型的制备 大鼠单笼饲养4 d后进行福尔马林试验,将大鼠置于观察台上的玻璃观察箱(带有一面呈45°放置的镜子),以便观察大鼠行为变化,待大鼠适应环境30 min后,用微量进样器在大鼠足底部注射5%福尔马林100 μ l制备疼痛模型。

1.2.3 免疫组织化学检测 所有大鼠在福尔马林注射后1 h被处死。取出腰4~6脊髓节段固定于4%的多聚甲醛液8 h后石蜡包埋。每个标本同一部位于石蜡切片机上切取5张,片厚5 μ m。收集于pH 6.0的0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液中,滴加5%牛血清白蛋白封闭液,室温20 min后加一抗(1:1 000兔抗c-fos多克隆抗体),37℃孵育1 h后,4℃过夜;室温下30 min后,加即用型二抗(生物素化兔抗鼠IgG),37℃孵育30 min;加链霉亲和素-生物素复合物试剂,37℃孵育30 min,二氨基联苯胺显色。阴性对照用枸橼酸盐缓冲液代替一抗。

1.3 大鼠行为学观察及疼痛加权评分 福尔马林

疼痛模型制作成功后立即记录大鼠每5分钟的疼痛行为时间直到满1 h。大鼠疼痛行为分为四级:0级,大鼠活动无异常;1级,注射足轻微接触地面,活动时时有跛行;2级,注射足抬起,不接触地面;3级,舔咬或抽动注射足。采用疼痛加权评分(pain intensity scoring, PIS)法评估大鼠受伤害程度,公式:

$$PIS=(T_1+2T_2+3T_3)/300$$

其中 T_1 、 T_2 、 T_3 分别为大鼠5 min时间内出现疼痛行为1、2、3级的时间^[3]。

1.4 免疫组化的观察指标 在CMIAS系列数码医学图像与分析系统下观察大鼠脊髓切片,记录fos样免疫反应神经元(fos-like immunoreactivity neuron, FLIN)数量,阳性细胞细胞核内可见棕褐色颗粒。按照Rexed法将脊髓灰质从背侧到腹侧分为I~X层,分别记录脊髓背角I~II层、V~VI层FLIN的数量。

1.5 统计学方法 采用SPSS 13.0统计软件。计量资料数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,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。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为学观察及PIS评分结果 对照组大鼠福尔马林注射后,立即出现致痛侧的跛行、抬腿、舔足等行为,持续约5 min,相对安静约10 min,再次出现上述伤害性行为表现,持续约40 min。吗啡组和布托啡诺组大鼠与对照组比较,吗啡、布托啡诺组大鼠行为学表现安静,跛行和后足抬起时间短,几乎不出现舔咬和抽动,没有明显的福尔马林致痛双相反应。三组大鼠各时段PIS评分结果见表1。

表1 三组大鼠各时段PIS评分结果/分

时间/min	布托啡诺组	吗啡组	对照组
0~	0.94 \pm 0.07	1.19 \pm 0.12	1.53 \pm 0.21
5~	0.93 \pm 0.05	0.96 \pm 0.04	0.77 \pm 0.05
10~	1.03 \pm 0.12	1.16 \pm 0.10	0.80 \pm 0.19
15~	1.05 \pm 0.10	1.31 \pm 0.21	1.65 \pm 0.30
20~	1.11 \pm 0.14	1.13 \pm 0.09	1.99 \pm 0.11
25~	1.12 \pm 0.09	1.21 \pm 0.14	2.03 \pm 0.19
30~	0.95 \pm 0.09	1.17 \pm 0.16	2.22 \pm 0.17
35~	0.92 \pm 0.10	1.21 \pm 0.10	2.26 \pm 0.21
40~	1.01 \pm 0.11	1.29 \pm 0.11	2.09 \pm 0.12
45~	0.96 \pm 0.13	1.30 \pm 0.09	2.10 \pm 0.15
50~	0.99 \pm 0.15	1.19 \pm 0.17	2.12 \pm 0.10
55~60	0.97 \pm 0.10	1.23 \pm 0.15	2.07 \pm 0.19

由各时间段组间 PIS 比较,吗啡组、布托啡诺组与对照组有明显差异性(P 均 <0.05);布托啡诺组与吗啡组比较,布托啡诺组大鼠行为学表现更安静,两组 PIS 比较有明显差异(P 均 <0.05)。各统计值详见图 1

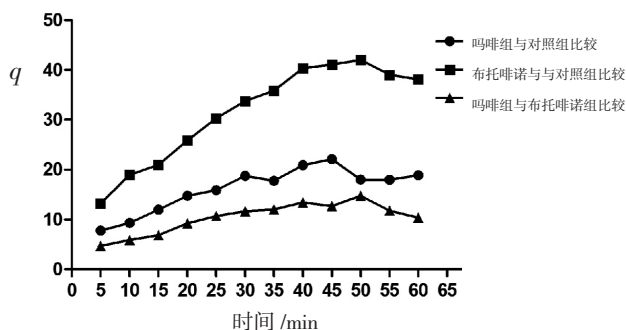


图1 各时间段组间q值比较图

2.2 大鼠脊髓背角 FLIN 数量比较 显微镜下观察,c-fos 阳性细胞中等大小,呈圆形或椭圆形,免疫反应阳性物质产物主要集中在细胞核,着色较深,二氨基联苯胺呈棕黄色,胞浆未着色。对照组的阳性细胞数目最多,吗啡组的阳性细胞数目有所减少,布托啡诺组的阳性细胞数目更加减少。三组大鼠脊髓背角浅层及深层 FLIN 数量比较见表 2。

表2 三组大鼠脊髓背角浅层及深层FLIN数量比较

组别	布托啡诺组	吗啡组	对照组
浅层(I ~ II层)	21.20 ± 1.84*#	37.60 ± 1.99*	61.20 ± 2.14
深层(V ~ VI层)	16.40 ± 1.52*#	25.80 ± 1.65*	36.40 ± 1.86

注: *:与对照组比较, $P < 0.05$; #:与吗啡组比较, $P < 0.05$ 。

由表 2 可见,三组大鼠脊髓背角浅层及深层 FLIN 数量比较,差异均有统计学意义(F 分别=10.81、9.76, P 均 <0.05)。与对照组比较,吗啡组和布托啡诺组脊髓背角浅层及深层 FLIN 数量明显减少(q 分别=5.65、4.78;5.85、6.27, P 均 <0.05),布托啡诺组脊髓背角浅层及深层 FLIN 数量也明显小于吗啡组(q 分别=9.53、6.37, P 均 <0.05)。

3 讨论

布托啡诺是一种混合型阿片受体激动-拮抗剂,主要激动 κ 受体,对 μ_2 受体有拮抗作用,而对 μ_1 受体既有激动又有拮抗作用,同时又是 δ 受体的激动剂^[4-6]。体外试验已证实其与阿片受体 μ 、 δ 、 κ 的亲合力为 1:4:25,其可以在未引起显著致幻效应剂量下,产生高效镇痛作用,且镇痛持续时间长^[7]。吗啡是纯粹的阿片受体激动剂,可激动 μ 、 δ 及 κ 型受体,主要通过激动脊髓胶质区、丘脑

内侧、脑室及导水管周围灰质等部位的 μ 受体而产生镇痛作用。鞘内给药具有高选择性、使用剂量小和不良反应少的优点,这是其他疼痛治疗方式所不能代替的。

本次研究所采用福尔马林致痛反应在临床疼痛研究方面被认为是可靠的动物模型^[8,9],结果显示吗啡、布托啡诺组大鼠没有明显的福尔马林致痛双相反应,表明预先鞘内注射布托啡诺或吗啡可以抑制福尔马林致痛大鼠的双相伤害反应。和以往实验证实吗啡可以抑制福尔马林致痛大鼠的双相伤害反应的结果是一致的^[10]。本次研究鞘内注射布托啡诺后大鼠行为学表现更安静,PIS 评分进一步减低,表明布托啡诺及其主要代谢产物激动 κ -阿片肽受体,并与中枢神经系统中相关受体相互作用,其产生的中枢性镇痛作用强于吗啡。这进一步提示布托啡诺在临床上用于炎症痛的治疗效果很可能优于吗啡。

c-fos 蛋白是一种即刻早期反应基因,和机体受到的各种刺激高度相关。当细胞接收到伤害性刺激时可启动中枢神经系统多种细胞 c-fos 基因的表达^[11]。c-fos 蛋白作为伤害性刺激的标志性产物,可以用来显示伤害性刺激信号的传导路径^[12,13]。脊髓灰质按 Rexed 法可分为 10 层, Hunt 发现受到伤害性刺激时,主要在大鼠脊髓的 I、II、V 层产生 c-fos 蛋白的表达,V、VI 层则在伤害性和非伤害性初级传入中发挥重要作用^[14,15]。所以本次研究重点比较了脊髓 I、II、V 和 VI 层 c-fos 蛋白在不同实验组中的表达。

大鼠鞘内注射吗啡能减轻福尔马林引起的双相疼痛,但吗啡剂量高于 10 μ g 时,不良反应也随之增加。因此本次研究大鼠鞘内注射采用 10 μ g 吗啡和 10 μ g 布托啡诺。

本次实验结果显示,对照组的 FLIN 阳性细胞数目最多,预先鞘内注射布托啡诺或吗啡后,大鼠脊髓背角浅层(I ~ II 层)及深层(V ~ VI 层)FLIN 数量明显减少,据报道,福尔马林致痛模型行为学改变主要发生在福尔马林刺激后 0~1 h,而且在 1 h 的时间范围内,FLIN 数量并没有明显的变化,这说明鞘内注射布托啡诺和吗啡能避免大鼠的双相伤害性反应,具有明显的抗伤害和镇痛作用。尤其是布托啡诺,能有效抑制脊髓内 c-fos 的表达,结合大鼠行为学观察结果,其抗伤害和镇痛效果要优于吗啡。因此推测布托啡诺可能更有效地抑制脊髓浅层(I ~ II)及深层(V ~ VI)的 c-fos 蛋白的表达,因

此,布托啡诺的镇痛效果优于吗啡。

综上所述,福尔马林致痛后,大鼠出现明显伤害性疼痛行为学变化,相对应的脊髓背角 c-fos 蛋白表达明显增多,而鞘内预先注射布托啡诺与吗啡能够对抗福尔马林致痛大鼠的伤害性疼痛行为学变化,减少 c-fos 蛋白表达,而且布托啡诺的镇痛效果优于吗啡。

参考文献

- 1 Yang Y,Guo QL,Zou WY,et al. Effect of intrathecal katemine on the expression of nNOS in spinal dorsal horn in ratswithformalinpain[J]. J Centr South Univ Med Sci,2006,31 (5): 747-751.
- 2 Pelissier T,Laurido C,Kramer V,et al. Antinociceptive interactions of katemine with morphine or methadone in mononeuropathic rats [J]. Eur J Pharmacol,2003,477(1): 23-28.
- 3 江澄川,赵志奇,蒋豪.疼痛的基础与临床[M].上海:复旦大学出版社/上海医科大学出版社,2001.41-46.
- 4 胡兴国,张云翔,曾因明,等.鞘内吗啡对切口疼痛模型大鼠脊髓背角P物质的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2001,21 (11):663-665.
- 5 Thakur BP,Sharma SK,Sharma A,et al. Clinical evaluation of detomidine-butorphanol-guaifenesin-ketamine as short term TIVA in Spiti ponies[J].Pak J Biol Sci,2011,14 (11): 647-652.
- 6 Szabova A,Sadhasivam S,Wang Y,et al.Comparison of postoperative analgesia with epidural butorphanol bupivacaine versus fentanyl/bupivacaine following pediatric urological procedures[J]. J Opioid Manag,2010,6(6): 401-407.
- 7 Yao X,Liu Y,Lei L. Effect of intravenous butorphanol on the side effects associated with epidural morphine in postoperative analgesia[J]. J Clin Anesthesiol,2012,28(9): 58-59.
- 8 Wu Z,Kong M,Wang N,et al. Intravenous butorphanol administration reduces intrathecal morphine-induced pruritus after cesarean delivery:a randomized,double-blind, placebo-controlled study[J]. J Anesth,2012,26(5): 752-757.
- 9 吴歆,朱敏敏,殷曰昊,等.布托啡诺联合恩丹西酮在直肠癌根治术后硬膜外吗啡镇痛中的抗瘙痒以及抗恶心呕吐作用[J].中国临床医学,2010,17(2):405-407.
- 10 Yu K,Li Y,Xu S,et al. Application of postoperative patient-controlled subcutaneous analgesia with butorphanol and morphine[J]. J Yunyang Med Coll,2009,28 (6): 579-581.
- 11 Xiao X,Yang L,Zhu Y. The clinic observation of butorphanol for prevention of itching in postoperative epidural analgesia withmorphine after caesarean section [J]. China Prac Med,2009,4(6):49-51.
- 12 Yi B. Effect of morphine combined with butorphanol for postoperative analgesia[J]. Hebei Med,2009,15(3): 591-593.
- 13 Yokoyama Y,Yokoyama T,Nagao Y,et al. Treatment of epidural morphine induced pruritus with butorphanol (Japanese)[J]. Masui,2009,58(5): 178-182.
- 14 Kumagai H,Ebata T,Takamori K,et al. Effect of a novel kappa-receptor agonist,nalfurafine hydrochloride,on severe itch in 337 haemodialysis patients: a Phase III,randomized,double-blind,placebo-controlled study[J].Nephrol Dial Transplant,2010,25(9): 1251-1257.

(收稿日期 2016-06-11)

(本文编辑 蔡华波)

欢迎投稿

欢迎征订