

大鼠鞘内阿米洛利及混合可乐定对神经病理性疼痛的作用

陈祥楠^{1,2}, 邢蔚¹, 曾维安¹, 欧阳汉栋¹, 李强¹, 王培宗¹, 刘先国³

(1. 华南肿瘤重点实验室//中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060; 2. 广东省妇幼保健院, 广东 广州 510010; 3. 中山大学中山医学院疼痛研究中心, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】探讨大鼠鞘内阿米洛利及混合可乐定对神经病理性疼痛的治疗效能。【方法】102只SD大鼠, 体质量(250~300 g), 随机分成17组($n=6$): 对照组、阿米洛利组、可乐定组、混合药物组、拮抗组等。鞘内置管后7 d制作大鼠神经病理性疼痛模型(SNL模型)。建立疼痛模型前(基础值)、建立疼痛模型后1, 3, 5, 7 d及鞘内给药后测定大鼠机械性缩足反应阈值。计算各药物的半数有效剂量(ED₅₀)及95%的可信区间。使用Isobolographic评价药物的相互作用。【结果】鞘内单独注射阿米洛利(12.5~100 μg)或可乐定(0.5~10 μg)可产生时间、剂量依赖性的抗神经病理性疼痛的作用($P < 0.05$); 鞘内阿米洛利和可乐定混合, 可以产生明显的协同效应; 鞘内育亨宾(20 μg)预处理可以拮抗鞘内阿米洛利、可乐定及阿米洛利混合可乐定的抗神经病理性疼痛的作用($P < 0.05$)。【结论】鞘内单独注射阿米洛利、可乐定可以产生明显的时间、剂量依赖性的抗神经病理性疼痛的作用; 鞘内注射阿米洛利可以增强可乐定的抗神经病理性疼痛的作用。

关键词: 神经病理性痛; 阿米洛利; 可乐定; 协同作用

中图分类号: R61 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)-0274-04

Effects of Intrathecal Amiloride and Its Interaction with Clonidine on Treatment of Neuropathic Pain in Rats

CHEN Xiang-nan^{1,2}, XING Wei¹, ZENG Wei-an¹, OUYANG Han-dong¹, LI Qiang¹,
WANG Pei-zong¹, LIU Xian-guo³

(1. State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060; 2. Guangdong Women and Children's Hospital and Health Institute, Guangzhou 510010; 3. Pain Research Center, Zhongshan School of Medicine, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of intrathecal amiloride and its interaction with clonidine on the treatment of neuropathic pain in a rat model. 【Methods】 One hundred and two male SD rats weighing 250~300 g were randomly divided into seventeen groups ($n=6$): control group; amiloride group; clonidine group; amiloride + clonidine group, and yohimbine group (amiloride + clonidine + yohimbine). Seven days after intrathecal catheter placement, neuropathic pain model (spinal nerve ligation, SNL model) rats were developed. Paw withdrawal threshold were measured before SNL (baseline), 1, 3, 5, and 7 days after SNL and after intrathecal drug treatment. Median effective dose (ED₅₀) values and 95% confidence intervals were calculated. Isobolographic analysis of the amiloride and clonidine interaction was conducted. 【Result】 Intrathecal amiloride (12.5~100 μg) or clonidine (0.5~10 μg) alone produced a time- and dose-dependent treatment effect of neuropathic pain ($P < 0.05$). The enhancing effects were found between intrathecal amiloride and clonidine. Intrathecal pretreatment with yohimbine (20 μg) antagonized the treatment effects of amiloride, clonidine and the combination of amiloride and clonidine ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Intrathecal amiloride and clonidine alone produced a time- and dose-dependent treatment effects on neuropathic pain. The enhancing effects were found between intrathecal amiloride and clonidine.

Key words: neuropathic pain; amiloride; clonidine; synergistic effect

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2008, 29(3): 274-277]

收稿日期: 2008-01-03

基金项目: 国家自然科学基金(30571794); 国家自然科学基金(C03030301)

作者简介: 陈祥楠(1980-), 男, 山东临沂人, 硕士, E-mail: chenxiangnancn@yahoo.com.cn; 曾维安, 通讯作者, E-mail: zengwa@mail.sysu.edu.cn

神经病理性疼痛在临床上尚无特效的治疗药物和治疗方法。阿米洛利是一种保钾利尿剂,具有抑制细胞膜上的 Na^+ 通道和 Ca^{2+} 通道,以及抑制 Na^+ , K^+ -ATP 酶和 Na^+ - H^+ 交换等作用。我们的前期研究表明椎管内注射 Na^+ , K^+ -ATP 酶抑制剂哇巴因可产生抗伤害作用^[1-3]。Ferreira 等^[4]报道小鼠腹腔、椎管内、脑室注射阿米洛利具有抗炎性疼痛效果。然而,鞘内应用阿米洛利治疗神经病理性疼痛国内外未见报道。本研究拟在经典的神经病理性疼痛动物模型上应用鞘内长期置管注药法,评价鞘内阿米洛利及混合可乐定对神经病理性疼痛的治疗效能。

1 材料与方 法

1.1 动物选择及分组

雄性 SD 大鼠(250~350 g)由中山大学动物中心提供,随机分为 17 组($n=6$):对照组,阿米洛利组(12.5、25、50、100 μg)、可乐定组(0.5、1、2、5、10 μg)、混合药物组(阿米洛利 25 μg +可乐定 2 μg 、阿米洛利 12.5 μg +可乐定 1 μg 、阿米洛利 6.25 μg +可乐定 0.5 μg 、阿米洛利 3.125 μg +可乐定 0.25 μg)、拮抗组(育亨宾 20 μg +可乐定 10 μg 、育亨宾 20 μg +阿米洛利 100 μg 、育亨宾 20 μg +阿米洛利 25 μg +可乐定 2 μg)。

1.2 鞘内置管

采用 Zeng 等^[1]的方法。

1.3 神经病理性疼痛模型的制备

鞘内置管后 7 d,参照文献^[5]的方法,制作大鼠 L5 脊神经结扎神经病理性模型(SNL)。

1.4 药物实验

实验药物为 Sigma 产品 (St Louis, USA)。所有药物于实验前用生理盐水溶解,配成 10 μL 溶液。在鞘内注射阿米洛利 100 μg 、可乐定 10 μg 及阿米洛利 25 μg +可乐定 2 μg 前 10 min,鞘内注射育亨宾 20 μg 。所有药物注药后用 10 μL 的生理盐水冲管。

1.5 行为学测试

将大鼠置于金属笼中,通过网孔用 von Frey hair 对大鼠足底部皮肤施加机械性刺激。按 Chaplan 等人^[6]报道的“up-down”方法测量大鼠 50%机械性缩足阈值(g)。抗伤害效果评定应用最大效应百分比(%MPE)=(给药后压力阈值-基础

压力阈值)/(15-基础压力阈值) \times 100%。药物的相互作用评价,使用 Isobolographic 分析表示。

1.6 实验数据统计方法

使用 SPSS13.0 统计软件对实验组大鼠手术前后和给药前后缩足阈值进行对比分析,并进行组间差异的比较:50%缩足阈值(g)使用配对秩和检验。计量资料数据用均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm s$)表示, $P < 0.05$ 认为有统计学差异。

2 结 果

鞘内单独注射 12.5 μg 及 25 μg 的阿米洛利及 0.5 μg 、1 μg 和 2 μg 的可乐定可产生弱的抗神经病理性疼痛的作用,但无明显的统计学意义($P > 0.05$)。鞘内单独注射 50 μg 及 100 μg 阿米洛利后 15 min 即产生明显抗神经病理性疼痛的作用($P < 0.01$),在注药后 60 min 达到最大的抗神经病理性疼痛作用。其抗神经病理性疼痛的作用可持续到注药后 120 min(图 1)。

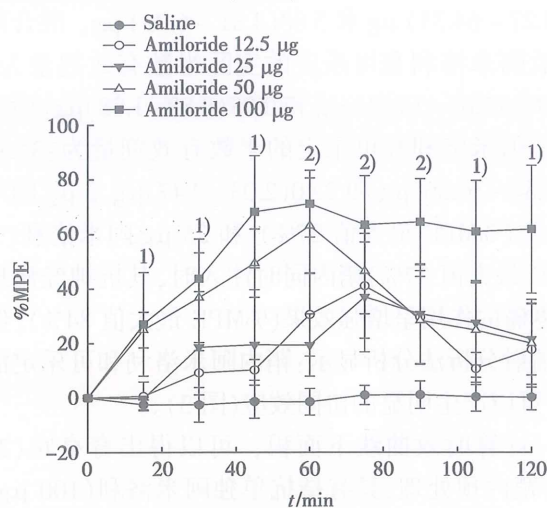


图 1 鞘内单独注射阿米洛利所产生的抗神经病理性疼痛作用的时间、剂量曲线

Fig.1 Time course of the maximum antinociception effect (%MPE) of intrathecally administered amiloride in spinal nerve ligation neuropathic pain model

Each point represents mean \pm SEM from 6 rats; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$ compared with the saline.

鞘内单独注射 5 μg 及 10 μg 可乐定后 20 min 即产生明显抗神经病理性疼痛的作用 ($P < 0.01$),在注药后 30 min 达到最大的抗神经病理性疼痛作用。其抗神经病理性疼痛的作用可持续到注药后 60 min(图 2)。

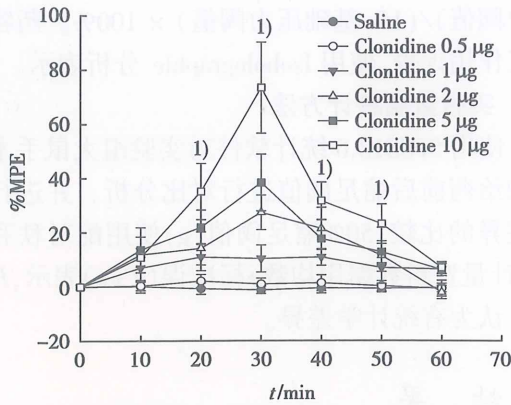


图 2 鞘内单独注射可乐定所产生的抗神经病理性疼痛作用的时间、剂量曲线

Fig.2 Time course of the maximum antinociception effect (%MPE) of intrathecally administrated clonidine in spinal nerve ligation neuropathic pain model

Each point represents mean \pm SEM from 6 rats; 1) $P < 0.01$ compared with the saline.

鞘内单独注射阿米洛利和可乐定的半数有效剂量 (ED_{50}) 及 95% 的可信区间 CI 分别是: 53.81 (43.27 ~ 64.35) μg 和 5.88 (4.81 ~ 6.95) μg 。混合药物后阿米洛利和可乐定的实际半数有效剂量为: 12.97 (11.63 ~ 14.31) μg 和 0.98 (0.88 ~ 1.08) μg 。而理论上阿米洛利和可乐定的半数有效剂量为: 31.75 (26.84 ~ 36.66) μg 和 2.40 (2.03 ~ 2.47) μg 。2 μg 的可乐定 (%MPE 最大值 27%) 和 25 μg 阿米洛利 (%MPE 最大值 37%) 鞘内同时注入时, 其抗神经病理性疼痛的作用呈增强效果 (%MPE 最大值 84%)。经等辐射分析法分析显示: 鞘内阿米洛利和可乐定混合, 可以产生明显的协同效应 (图 3)。

计算时效曲线下面积, 可以得出育亨宾 (20 μg) 鞘内预处理, 具有拮抗单独阿米洛利 (100 μg) 或可乐定 (10 μg) 的抗神经病理性疼痛的作用以及可乐定 (2 μg) 混合阿米洛利 (25 μg) 的抗神经病理性疼痛的作用 (图 4)。

3 讨论

Ferreira 等^[4]报道小鼠腹腔、椎管内、脑室注射阿米洛利具有抗炎性疼痛的作用。最近研究表明, 阿米洛利存在剂量依赖性抗伤害作用^[7]。本研究表明鞘内阿米洛利可以产生剂量依赖性的抗神经病理性疼痛的作用。Leppik 等^[8]研究表明阿米洛利通过 α_2 -肾上腺受体变构位点, 发挥变构激动调

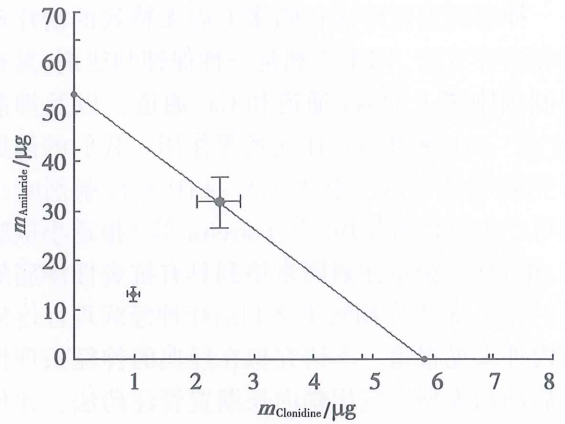


图 3 等辐射分析法分析鞘内混合可乐定和阿米洛利的抗神经病理性疼痛作用

Fig.3 Isobologram for the interaction between clonidine and amiloride in spinal nerve ligation neuropathic pain model

The ED_{50} values for each drug are plotted on the x and y axes, respectively, and the thick line represent the SEM of the ED_{50} . The straight line connecting each ED_{50} values is the theoretical additive line, and the point on the line is the theoretical additive ED_{50} . The experimental ED_{50} point was significantly different from the theoretical ED_{50} point, indicating a synergism.

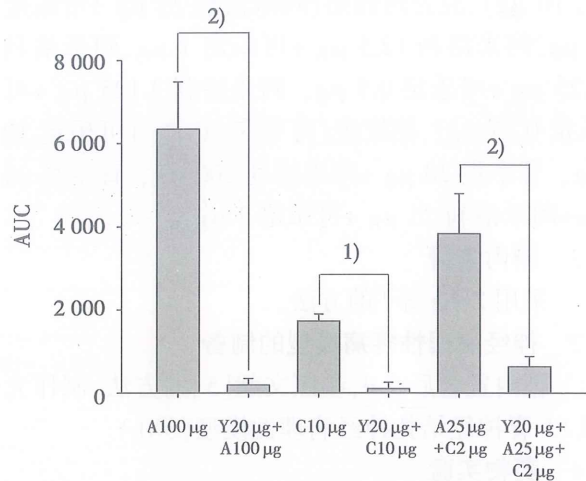


图 4 育亨宾 ([Y]20 μg) 鞘内预处理的拮抗作用

Fig.4 Antagonism effect of intrathecal pretreatment with yohimbine ([Y]20 μg)

To examine the pharmacologic antagonism of the effects of amiloride (A) and clonidine (C) and amiloride-clonidine (A+C), yohimbine (Y) 20 μg was administered intrathecally 10 min before the administration of the agonists; Each bar represents the mean \pm SEM form 6 rats, 1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$; AUC=area under the time-response curve.

节 α_2 -肾上腺受体的作用, 阿米洛利抗神经病理性疼痛的作用可能跟变构激活 α_2 -肾上腺受体有关。本研究中阿米洛利的作用能够被鞘内育亨宾预处理所拮抗, 支持阿米洛利通过 α_2 -肾上腺受体发挥

作用的机制。 Ca^{2+} 在疼痛传递过程中发挥重要作用,阿米洛利是T型 Ca^{2+} 通道阻滞剂^[9],阿米洛利的镇痛作用也可能跟作用在 Ca^{2+} 通道有关。

可乐定是一种选择性 α_2 -肾上腺素受体激动剂,大量临床研究证实可乐定经硬膜外腔或鞘内,胃肠外途径(肌肉和静脉注射)给药均可产生镇痛作用。

Berebaum^[10]认为作用于不同位点的药物可以通过共同的作用通道从而产生协同作用,阿米洛利混合可乐定鞘内注射,两者抗神经病理性疼痛方面产生显著的协同作用,其协同作用能够被鞘内预注 α_2 -受体拮抗剂育亨宾所拮抗,表明阿米洛利和可乐定通过共同作用通路, α_2 -肾上腺素受体发挥协同作用,两者的协同作用还可能跟作用在 Ca^{2+} 通道、 K^+ 通道有关。

结论:(1)阿米洛利和可乐定鞘内单独注射存在剂量依赖性抗神经病理性疼痛作用;(2)阿米洛利混合可乐定鞘内注射产生协同抗神经病理性疼痛作用,其作用能够为 α_2 -受体阻断剂育亨宾所拮抗。

参考文献:

- [1] Zeng W, Dohi S, Shimonaka H, et al. Spinal antinociceptive action of Na^+ - K^+ pump inhibitor ouabain and its interaction with morphine and lidocaine in rats [J]. *Anesthesiology*, 1999, 90(2):500-508.
- [2] 曾维安, 何伟雄, 陈祥楠, 等. 大鼠鞘内注射哇巴因及混合新斯地明的抗伤害作用[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2007, 28(3s):1-3.
- [3] Zeng W, Chen X, Dohi S. Antinociceptive synergistic interaction between clonidine and ouabain on thermal nociceptive tests in the rat [J]. *J Pain*, 2007, 8(12): 983-988.
- [4] Ferreira J, Santos ARS, Calixto JB. Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal administration of amiloride in mice [J]. *Life Sci*, 1999, 65(10): 1059-1066.
- [5] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. *Pain*, 1992, 50(3):355-363.
- [6] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63.
- [7] Chanda ML, Mogil JS. Sex differences in the effects of amiloride on formalin test nociception in mice [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, 291(2): 335-342.
- [8] Leppik RA, Birdsall NJ. Agonist binding and function at the human alpha (2A)-adrenoceptor: allosteric modulation by amilorides [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(5):1091-1099.
- [9] Tang CM, Presser F, Morad M. Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel [J]. *Science*, 1988, 240(4849):213-215.
- [10] Berenbaum MC. What is synergy?[J]. *Pharmacol Rev*, 1989, 41(2):93-141.

(编辑 刘清海)

(上接第273页 from page 273)

HepG2.2.15细胞的DNA的复制,从而抑制了肿瘤细胞的增殖,同时通过促进Fas表达,诱导HepG2.2.15细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 毛文君,李翊. 海洋功能食品的研究开发(一)[J]. *中国海洋药物杂志*, 1997, 63(3):53-56.
- [2] 杨宜婷,岑颖洲,肇静娴,等. 麒麟菜中蕨藻红素抗肿瘤活性研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(7): 851-852.
- [3] 龚先玲,揭新明,王秀季. 麒麟菜中微量元素的测定 [J]. *天津药学*. 2005, 17(4):6-8.
- [4] 闫丽佳,裴俊瑞,高琳,等. 硒和维生素E对大鼠的抗氧化作用 [J]. *中国地方病学杂志*, 2007, 26(4):381-383.
- [5] 王传恩,方国源,李彩霞. 猪苓多糖、硒及红细胞对LAK细胞杀伤活性的影响 [J]. *解剖学研究*, 2000, 22(2):104-106.
- [6] 顾公望,孙燕. 硒抗癌机理探究进展 [J]. *中国肿瘤临床*. 1994, 21(2):139-139.
- [7] Li Y, Raffo AJ, Drew L, et al. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143 [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(7):1527-1533.
- [8] 白雪,林晨,江振友,等. 硒化麒麟菜多糖抑制人喉癌细胞株 Hep-2 增殖的作用 [J]. *肿瘤防治研究*, 2007, 34(4):249-252.
- [9] 黄云燕,夏焱,郭海,等. 干扰素 α -5-AZA-CdR对白血病细胞 HL-60 和 K562 的作用 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2007, 28(3):274-278.
- [10] 洪迅,张继红,郭中敏,等. Genistein 调节肝癌 HepG2 细胞 Caspase3 蛋白表达诱导凋亡的作用研究 [J]. *热带医学杂志*, 2007, 7(4):332-334, 338.
- [11] Kerr JFR, Harmon BV, Winterford CM. Apoptosis: its signifi-cance in cancer and cancer therapy [J]. *Cancer*, 1994, 73(8):2013-2016.
- [12] Erb P, Ji J, Wemli M, et al. Role of apoptosis in basal cell and squamous cell carcinoma formation [J]. *Immunol Lett*, 2005, 100(1):68-72.
- [13] 侯劲松,黄洪章,王建广,等. C-Myc/Fas 基因转染对 人 喉 癌 细 胞 移 植 瘤 的 影 响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2006, 27(1):72-75.

(编辑 徐杰)