

·基础研究·

双氯芬酸钠对大鼠神经病理性疼痛的疗效及机制*

于翠萍¹ 王琦¹ 何明伟¹ 杨立强¹ 安建雄² 倪家骧^{1,3}

摘要 目的:观察不同剂量双氯芬酸钠灌胃对坐骨神经结扎(CCI)大鼠机械痛阈、背根神经节(DRG)及脊髓背角P物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)表达及胃肠黏膜的影响。方法:SD大鼠随机分为坐骨神经结扎后慢性缩窄性损伤(CCI)组(n=32)和假手术组(n=8)。自术后第8天分别给予不同剂量双氯芬酸钠灌胃,测定灌胃前及灌胃第1、3、5、7天时大鼠右后肢机械刺激缩足反射阈值(PWMT)及用药7d后测定L4/5背根神经节细胞及腰膨大处(L4/5节段)脊髓背角SP和CGRP表达。结果:①对照组、2mg/kg组、4mg/kg组、10mg/kg组在用药前及用药后各时间点的右后肢PWMT与假手术组相比显著降低。4mg/kg组在用药第5、7天时右后肢PWMT与用药前及对照组相比显著增加;10mg/kg组用药后各时间点右后肢PWMT与用药前及对照组相比显著增加。②对大鼠背根神经节及脊髓背角SP、CGRP表达的影响。对照组、2mg/kg组、4mg/kg组、10mg/kg组SP及CGRP表达的平均光密度值均明显高于假手术组。4mg/kg组、10mg/kg组SP及CGRP表达的平均光密度值明显低于对照组。③用药后,4mg/kg与10mg/kg两组可见胃肠黏膜损伤,而2mg/kg组则无。结论:一定剂量双氯芬酸钠灌胃能够减轻CCI大鼠机械性痛敏反应,但对胃肠黏膜有一定损伤,两者均具有剂量依赖效应。

关键词 双氯芬酸钠;背根神经节;背角;神经病理性疼痛;P物质

中图分类号:R36 文献标识码:A 文章编号:

The efficacy and mechanism of diclofenac sodium on the neuropathic pain in rats/YU Cuiping, WANG Qi, HE Mingwei, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009,

Abstract Objective: To observe the effects of diclofenac sodium on mechanical hyperalgesia, substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) expressions in dorsal root ganglion (DRG) neurons and dorsal horn, as well as the structure of gastrointestinal mucosa in chronic constriction injury (CCI) rats after ligation of sciatic nerve. **Method:** Forty male SD rats were randomly divided into 5 groups: sham operation group, control group (CCI, ligation only), diclofenac sodium 2mg/kg group, diclofenac sodium 4mg/kg group and diclofenac sodium 10mg/kg group. From the 8th day post-ligation, different doses of diclofenac sodium were administered by injecting into gastric cavity twice per day for 7 days in different groups respectively. Before and the 1st, 3rd, 5th, 7th day after drug injection, the posterior paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) was measured by Von Frey hair, and at the 7th day after injection expressions of SP and CGRP in L4/5 dorsal root ganglion neurons and dorsal horn were detected by immunohistochemistry method. **Result:** ①Pre-drug and at different time points post-drug, the right posterior PWMTs in control group and three diclofenac sodium groups decreased significantly compared with that in sham operation group. At the 5th and 7th day post-drug, the PWMTs in 4mg/kg group increased significantly compared with that in pre-drug and control group. At different time points post-drug, the PWMTs in 10mg/kg group increased significantly compared with that in pre-drug and control group. ②At the 7th day post-drug, in control group and three diclofenac sodium groups, the average optical density (OD) of SP and CGRP in right L4-5 DRG and dorsal horn neurons increased significantly compared with that in sham operation group. ③There were structure injury of gastrointestinal mucosa in 4mg/kg and 10mg/kg groups, and no injury in 2mg/kg group. **Conclusion:** Diclofenac sodium can dose-dependently decrease the mechanical hyperalgesia and cause structure injury of gastrointestinal mucosa. The mechanism might be reducing SP and CGRP expressions in DRG neurons and dorsal horn in CCI rats.

Author's address Xuanwu Hospital Attached To Capital Medical University, Beijing, 100053

Key words diclofenac sodium; dorsal root ganglion; dorsal horn; neuropathic pain; substance P

神经病理性疼痛是指由于外周或中枢神经系统结构损伤或功能紊乱所致的病理性疼痛。严重影响患者的生存质量,治疗比较困难。疗效尚不理想的部分原因是对其病理生理机制还不很清楚。坐骨神经

* 基金项目:北京市科委课题项目(Y0204003040631)

1 首都医科大学宣武医院疼痛科,北京,100053

2 清华大学第二医院麻醉科

3 通讯作者

作者简介:于翠萍,硕士研究生,现在清华大学第二医院麻醉科工作

收稿日期:2009-03-08

结扎引起慢性缩窄性损伤 (chronic constriction injury, CCI) 模型^[1]是当前神经病理性疼痛研究中应用最广泛的动物模型之一, 通过适度的结扎坐骨神经选择性损伤有髓鞘的粗纤维, 保留大部分传递痛觉的 C 类纤维的研究神经病理性疼痛的常用模型, 能较好地模拟临床神经损伤后的痛觉过敏现象^[2]。

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂(非甾体抗炎药)在神经病理性疼痛的治疗方面尚处于起步阶段。多数研究认为局部使用 COX 抑制剂(受损局部或神经内注射)可缓解神经病理性疼痛的机械和热痛敏, 而有关全身应用(口服、肌注)COX 抑制剂是否对治疗神经病理性疼痛有效存在争议, 同时它的胃肠道副作用也比较常见。因此本实验观察了双氯芬酸钠(非选择性非甾体抗炎药)灌胃对 CCI 大鼠神经病理性疼痛形成过程中(CCI 后 7d)机械痛阈的影响, 并应用免疫组织化学等方法研究了背根神经节和脊髓背角 P 物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)表达的改变及胃肠黏膜受到的影响, 探讨口服双氯芬酸钠对治疗神经病理性疼痛的疗效和可能机制, 及其对胃肠道的副作用, 为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 240—260g, 由首都医科大学宣武医院实验动物中心提供。保证 12h 明暗交替光照, 自由饮食和饮水, 适应环境 1 周后, 随机分为 5 组($n=8$)。实验组(双氯芬酸钠 2mg/kg 组、4mg/kg 组、10mg/kg 组)坐骨神经结扎 1 周后分别灌胃给予不同剂量的双氯芬酸钠; 对照组坐骨神经结扎 1 周后灌胃给予生理盐水 1ml; 假手术组仅暴露分离坐骨神经干, 不予结扎, 1 周后灌胃给予生理盐水 1ml。

1.2 实验方法

1.2.1 CCI 大鼠模型的制备:参照 Bennett 和 Xie 方法建立 CCI 模型^[1]。10%水合氯醛(400 mg/kg, 腹腔注射)麻醉下, 于股骨后暴露右侧坐骨神经, 在接近分叉之前游离出约 7mm 的神经, 用 4—0 铬制肠线间隔 1mm 松扎 4 处(以不影响神经外膜的血运为度, 即以引起小腿肌肉轻度颤动反应为宜), 然后逐层缝合切口。假手术组仅暴露分离坐骨神经干, 不予结扎。CCI 模型成功的指标是术后第 7 天时右下肢对 Von-Frey 纤毛机械刺激器已表现为痛觉过敏。

1.2.2 给药方法:从建立 CCI 术后第 8 天, 根据不同分组分别给予生理盐水 1ml、双氯芬酸钠 2mg/kg(浓

度为 0.5mg/ml)、4mg/kg(浓度为 1mg/ml)、10mg/kg(浓度为 2.5mg/ml)灌胃, 每日 7 点及 19 点给予, 术后连续 7d。

1.2.3 机械缩足反射阈值 (paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)的测定:所有大鼠在灌胃前、灌胃第 1、3、5、7 天时测定机械缩足反射阈值。将一有机玻璃箱(22×12×22cm)置于金属筛网上, 待大鼠在箱中适应 15min 后, 用自制的 Von-Frey 纤毛机械刺激器垂直刺激大鼠后肢足底中部, 持续时间 $\leq 4s$, 大鼠出现抬足或舔足行为视为阳性反应, 否则为阴性反应。刺激由小到大, 每个强度反复刺激 10 次(次—次间隔 3—5s), 将出现缩足反射 5 次左右的强度定为 PWMT。

1.2.4 取材:各组大鼠于实验后第 15 天, 在 10%水合氯醛腹腔深度麻醉下, 开胸暴露心脏, 于心尖处剪开一小口, 用生理盐水约 200ml 经主动脉灌注, 右心耳引流, 再用 4%的多聚甲醛约 300ml 灌注固定。切除胸段至骶段脊柱, 于 L4/5 椎间孔分离取出右侧背根神经节, 截取腰膨大处(L4/5 节段)脊髓, 分别放入 4%多聚甲醛溶液中。开腹取胃及一段空肠, 用生理盐水冲洗浆膜面, 然后沿胃大弯剪开。取损伤最明显处胃窦部、腺体部组织一小部分空肠置入 4%多聚甲醛固定, 病理检查。

1.2.5 胃肠黏膜病理形态学观察:胃窦部、腺体部黏膜及空肠组织经 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片行 HE 染色, 光镜下观察。

1.2.6 免疫组织化学 ABC 法:将各个脊髓进行冰冻连续横切片, 片厚 35 μm , 每隔 5 张收取一张, 每例动物收取 16 张切片; 各背根神经节进行冰冻连续纵切片, 片厚 50 μm , 收取所有完整的切片。分别置入 0.01mol/LPBS 中备用。免疫组化采用 ABC 法染色。

1.3 图像分析及统计学分析

每只动物随机取 5 张背根神经节及脊髓免疫组化染色切片, 显微镜下观察并拍照。应用 IP 图像分析系统, 在同一放大倍数(脊髓切片 10×20, 背根神经节切片为 10×20)同一光强度下, 每张切片随机取 3 个视野, 分别测定每个视野相同面积的测量框(6600 μm^2)内 SP、CGRP 阳性产物的平均光密度值(OD 值)。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS11.5 进行统计学处理, 组内比较采用配对 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 以最小显著差法行两两比较, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

在本实验中所有大鼠术后无一例出现感染和自

残现象。假手术组大鼠术后未出现术侧爪内收和运动障碍,CCI大鼠术后均出现术侧爪内收,后足轻度外翻和跛行。

2.1 对大鼠机械痛阈的影响

假手术组及对照组在用药前和用药后各时间点的右后肢 PWMT 差异无显著性 ($P>0.05$)。而对照组、2mg/kg 组、4mg/kg 组、10mg/kg 组在用药前和用药后各时间点的右后肢 PWMT 与假手术组相比显著降低 ($P<0.01$)。2mg/kg 组用药后各时间点的右后肢 PWMT 与用药前及对照组相比无显著差异 ($P>0.05$); 而 10mg/kg 组用药后各时间点的右后肢 PWMT 与用药前及对照组相比显著增加 ($P<0.01$); 4mg/kg 组在用药第 5、7 天时右后肢 PWMT 与用药前及对照组相比显著增加 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。在用药后各时间点, 4mg/kg 组与 10mg/kg 组的右后肢 PWMT 有显著差异 ($P<0.05$); 在用药后第 5、7 天时, 2mg/kg 组与 4mg/kg 组的右后肢 PWMT 有显著差异 ($P<0.05$); 呈现剂量依赖效应(表 1)。

2.2 对大鼠胃、空肠黏膜结构的影响

肉眼观察各组用药后大鼠胃窦部、腺体部及空肠黏膜均未见溃疡和出血。假手术组、对照组病理切片光镜下观胃及空肠黏膜结构完整, 未见明显的炎性细胞浸润。2mg/kg 组病理切片光镜下观胃黏膜腺体略有增厚; 空肠腺体未见明确变化。4mg/kg 组观胃黏膜腺体变少; 腺壁变薄; 肠绒毛变少、变短, 杯状细胞减少。10mg/kg 组观胃黏膜腺体增生、变厚、染色变深; 肠绒毛变少、变短, 肠嗜酸性细胞多, 有炎症改变, 图 1—2, 见彩色插图。

2.3 对大鼠背根神经节 SP、CGRP 表达的影响

镜下可见背神经节(dorsal root ganglion, DRG) SP、CGRP 免疫阳性神经元大小不等以中、小型细胞居多, 免疫反应阳性产物呈细颗粒状或均质状分布于胞浆内。计算机图像分析检测结果显示对照组、2mg/kg 组、4mg/kg 组、10mg/kg 组 SP 及 CGRP 表达的平均光密度值明显高于假手术组 ($P<0.01$)。2mg/kg 组 SP 及 CGRP 表达的平均光密度值(OD)与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。4mg/kg 组、10mg/kg 组 SP 及 CGRP 表达的平均光密度值明显低于对照组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 且呈现剂量依赖效应(表 2)。

2.4 对大鼠脊髓背角 I、II 层 SP、CGRP 表达的影响

镜下可见 SP、CGRP 免疫阳性纤维和终末密集分布于脊髓背角 I 层和 II 层, 尤以 II 层腹侧部为甚。计算机图像分析检测结果显示对照组、2mg/kg 组、4mg/kg 组、10mg/kg 组 SP 及 CGRP 表达的平均光密

度值明显高于假手术组 ($P<0.01$)。2mg/kg 组 SP 及 CGRP 表达的平均光密度值与对照组相比无显著差异 ($P>0.05$)。4mg/kg 组、10mg/kg 组 SP 及 CGRP 表达的平均光密度值明显低于对照组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 且呈现剂量依赖效应(见表 3)。

表 1 双氯芬酸钠灌胃对 CCI 大鼠

PWMT 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	用药前	用药后(d)			
		1	3	5	7
假手术组	13.0±1.1 ^④	14.0±1.5 ^④	13.3±1.5 ^④	13.5±1.4 ^④	12.8±1.5 ^④
对照组	3.0±1.5 ^②	2.8±1.0 ^②	3.0±1.1 ^②	3.3±1.0 ^②	3.3±1.5 ^②
2mg/kg 组	3.5±1.4 ^②	3.3±1.0 ^②	4.0±1.5 ^②	3.5±1.4 ^②	4.0±1.1 ^②
4mg/kg 组	3.3±1.5 ^②	3.5±1.4 ^②	4.3±1.3 ^②	5.8±1.3 ^{①②④}	5.5±1.4 ^{①②③}
10mg/kg 组	3.3±1.5 ^②	5.5±1.4 ^{①②④}	6.3±1.3 ^{①②④}	7.5±1.4 ^{①②④}	7.3±1.0 ^{①②④}

与用药前比较: ① $P<0.01$; 与假手术组比较: ② $P<0.01$; 与对照组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

表 2 各组 DRG 的 SP、CGRP 免疫阳性

神经元平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	SP	CGRP
假手术组	0.107±0.015 ^④	0.115±0.019 ^④
对照组	0.215±0.031 ^②	0.219±0.031 ^②
2mg/kg 组	0.213±0.032 ^②	0.218±0.030 ^②
4mg/kg 组	0.171±0.031 ^{②④}	0.184±0.040 ^{②③}
10mg/kg 组	0.149±0.030 ^{②④}	0.151±0.027 ^{①④}

与假手术组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$; 与对照组比较: ③ $P<0.05$, ④ $P<0.01$

表 3 各组脊髓背角的 SP、CGRP 免疫阳性

神经纤维平均光密度值比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	SP	CGRP
假手术组	0.202±0.026 ^③	0.352±0.027 ^③
对照组	0.323±0.038 ^①	0.577±0.041 ^①
2mg/kg 组	0.317±0.029 ^①	0.572±0.038 ^①
4mg/kg 组	0.283±0.031 ^{①②}	0.485±0.037 ^{①③}
10mg/kg 组	0.252±0.023 ^{①③}	0.446±0.032 ^{①③}

与假手术组比较: ① $P<0.01$; 与对照组比较: ② $P<0.05$, ③ $P<0.01$

3 讨论

神经病理性疼痛是由于外周或中枢神经系统损伤或疾病引起的疼痛综合征, 主要表现为痛觉过敏和痛觉超敏。研究发现, 结扎坐骨神经后 3d 左右, 大鼠就可出现典型的慢性疼痛表现, 并能持续到术后 28—35d^[1,3]。本实验中所有 CCI 大鼠在术后第 7 天时均已有痛反应, 且对照组大鼠在术后第 14 天时仍表现为机械性痛敏, 与文献报道一致。

实验结果发现, 2mg/kg 组在用药后各时间点的机械痛阈与对照组相比无变化; 4mg/kg 组在用药第 5、7 天时机械痛阈升高; 10mg/kg 组从用药第 1 天, 机械痛阈明显升高; 出现了剂量依赖效应。提示口服非甾体抗炎药对治疗神经病理性疼痛有效, 与 Kulkarni^[4]报道的结果一致。对于 2mg/kg 组用药后各时间点及 4mg/kg 组在用药后第 1、3 天机械痛阈无变化, 可能是药物对神经损伤局部未达到足够浓度所致。

研究表明: 周围神经损伤后背根神经节内 CGRP 合成明显上调, 并且向脊髓背角转运和释放增加^[5]。本实验中对照组背根神经节及脊髓背角内 SP、CGRP 表达较假手术组明显增加, 与文献报道一致, 表明 CCI 后大鼠背根神经节及脊髓背角 SP、CGRP 表达增加。

COX-1 在神经病理性疼痛的早期发展中起主要作用, 而 COX-2 与神经病理性疼痛的维持有关^[4]。有报道使用 COX 抑制剂减少 PG 的生成可使 CCI 大鼠脊髓背角 SP、CGRP 表达减少^[6-7]。本实验中 4mg/kg 组与 10mg/kg 组背根神经节及脊髓背角 SP、CGRP 表达较对照组均减少, 且有剂量依赖效应, 表明双氯芬酸钠可能是通过减少背根神经节及脊髓背角 SP、CGRP 表达, 从而减轻机械痛敏。

有人认为 COX 抑制剂通过抑制受损神经及脊髓内高表达的 COX 的活性, 减少 PG 的生成而起到止痛作用。另有研究显示: 减少 PG 的合成所产生的外周、中枢作用并不是 COX 抑制剂的唯一作用点, 其也可直接作用于疼痛产生和传导的途径。

COX 抑制剂抑制环氧合酶活性, 减少前列腺素合成而产生镇痛作用, 抑制正常生理所需要的 PG, 而导致胃肠道上皮细胞表面磷脂颗粒减少及黏膜缺血, 出现胃肠黏膜损伤、溃疡及出血^[8-9]。本实验中 10mg/kg 组出现了较明显的胃肠黏膜损伤, 4mg/kg 组对胃肠黏膜有一定的损伤, 而 2mg/kg 组胃肠黏膜未见明显损伤。提示双氯芬酸钠的有效剂量也会引起胃肠黏膜损害。

本研究结果表明, 一定剂量(4mg/kg、10mg/kg)双氯芬酸钠灌胃能够减轻 CCI 大鼠机械性痛敏反应, 且具有剂量依赖效应。双氯芬酸钠减轻机械痛敏的作用机制可能是使背根神经节和脊髓背角 SP、CGRP 的表达减少。镇痛效果虽有剂量依赖效应, 但

随之副作用也增加, 提示临床应用应严格限制用药剂量。说明双氯芬酸钠治疗神经病理性疼痛的有效剂量同时也会引起胃肠黏膜损害, 还不是治疗神经病理性疼痛的理想药物。

参考文献

- [1] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87—107.
- [2] Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management [J]. *Lancet*, 1999, 353(9168): 1959—1964.
- [3] Attal N, Jazat F, Kayser V, et al. Further evidence for pain-related behaviors in a model of unilateral peripheral mononeuropathy [J]. *Pain*, 1990, 41(2): 235—251.
- [4] Kulkarni SK, Satyanarayana SV. Differential effects of naproxen and rofecoxib on the development of hypersensitivity following nerve injury in rats [J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2004, 79(2): 349—358.
- [5] Miki K, Fukuoka T, Tkunaga A, et al. Calcitonin gene-related peptide increase in the rat spinal dorsal horn and dorsal column nucleus following peripheral nerve injury: up-regulation in a subpopulation of primary afferent sensory neurons [J]. *Neuroscience*, 1997, 82(4): 1243—1252.
- [6] MA W, Eisenach JC. Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance p, Calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation [J]. *Neuroscience*, 2003, 121(3): 681—690.
- [7] 刘国凯, 黄宇光, 罗爱伦. 神经病理性疼痛动物模型及其评价 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(6): 601—603.
- [8] Schafers M, Marziniak M, Sorkin LS, et al. Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury and TNF-induced hyperalgesia in the rat [J]. *Experimental Neurology*, 2004, 185(1): 160—168.
- [9] 米文丽, 王彦青, 吴根成. 环氧合酶 3: 一个新的镇痛靶点 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26(5): 428—431.