

纳布啡抑制瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏

庞红利, 李洪影*, 何东海, 许远征, 郑孝振
(河南大学第一附属医院 麻醉科, 河南 开封 475000)

摘要:目的 研究纳布啡预处理对瑞芬太尼诱发痛觉过敏反应的影响及其可能的机制。方法 将大鼠随机分为对照组、瑞芬太尼组(R组)、切口痛模型组(M组)、瑞芬太尼+切口痛模型组(RM组)及纳布啡预处理组(N+RM组)。R组、RM组和N+RM组静脉输注瑞芬太尼 $1.0 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, M组、RM组和N+RM组施足底切口术建立切口痛模型, N+RM组于瑞芬太尼输注前静脉注射纳布啡 $0.6 \text{ mg}/\text{kg}$ 。分别于造模前24 h(T-1)、造模后2 h(T1)、6 h(T2)、24 h(T3)和48 h(T4)测定热刺激缩足潜伏期(PWL)和机械刺激缩足阈值(PWT)。用蛋白免疫印迹法检测造模后48 h脊髓组织 NR1、NR2A、NR2B、ERK1/2 和 p-ERK1/2 的表达水平。结果 与对照组相比, 各组 PWL 和 PWT 均显著降低($P < 0.05$), NR1、NR2B 和 p-ERK1/2 表达及 p-ERK/ERK 升高($P < 0.05$); 与 M 组相比, RM 组 PWL 和 PWT 均显著降低($P < 0.05$), NR1、NR2B 和 p-ERK1/2 表达及 p-ERK/ERK 升高($P < 0.05$); 与 RM 组相比, N+RM 组 PWL 和 PWT 升高($P < 0.05$), NR1、NR2B 和 p-ERK1/2 表达及 p-ERK/ERK 显著降低($P < 0.05$)。结论 纳布啡可拮抗瑞芬太尼诱导的大鼠痛觉过敏。

关键词: 纳布啡; 瑞芬太尼; 痛觉过敏; 切口痛; ERK

中图分类号: R971⁺.2 文献标志码: A

Nalbuphine inhibits remifentanil-induced hyperalgesia in rats

PANG Hong-li, LI Hong-ying*, HE Dong-hai, XU Yuan-zheng, ZHENG Xiao-zhen
(Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of nalbuphine on hyperalgesia induced by remifentanil and its mechanism. **Methods** Rats were divided into the control group, remifentanil group (R group), incisional pain model group (M group), remifentanil and incisional pain model group (RM group), nalbuphine pretreatment group (N+RM group). The R group, RM group, N+RM group were intravenously infused with remifentanil $1.0 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, the M group, RM group and N+RM group were constructed incisional pain model by pelvic incision operation and the N+RM group was intravenously injected with nalbuphine $0.6 \text{ mg}/\text{kg}$ before remifentanil. The paw withdrawal thermal latency (PWL) and paw withdrawal mechanical threshold (PWT) were measured 24 hours before modeling (T-1), 2 hours after modeling (T1), 6 hours after modeling (T2), 24 hours after modeling (T3) and 48 hours after modeling (T4). Western blot was conducted to detect the expression of NR1, NR2A, NR2B, ERK1/2 and p-ERK1/2 at T4. **Results** Compared with the control group, the PWL and PWT, the expression of NR1, NR2B, p-ERK1/2 and p-ERK/ERK increased significantly in all other groups ($P < 0.05$). Compared with the M group, the PWL and PWT, the expression

收稿日期: 2019-09-02 修回日期: 2020-01-15

基金项目: 河南省科技发展计划科技攻关(192102310367)

* 通信作者 (corresponding author): Researcherli_mzk@163.com

of NR1, NR2B, p-ERK1/2 and p-ERK/ERK increased significantly in RM group ($P < 0.05$). Compared with the RM group, the PWL and PWT, the expression of NR1, NR2B, p-ERK1/2 and p-ERK/ERK decreased significantly in N+RM group ($P < 0.05$). **Conclusions** Nalbuphine can antagonize hyperalgesia induced by remifentanyl.

Key words: nalbuphine; remifentanyl; hyperpathia; incisional pain; ERK

瑞芬太尼 (remifentanyl) 是一种 μ 型阿片受体激动剂, 与其他芬太尼 (fentanyl) 相比见效快、代谢速度快, 是临床常用的麻醉与镇痛药物之一^[1]。但瑞芬太尼引起痛觉过敏 (hyperpathia) 的发生率明显高于其他阿片类镇痛药^[2], 其机制尚不清楚, 因此限制了其进一步的临床应用。纳布啡 (nalbuphine) 是一种新型混合型阿片类受体激动剂/抑制剂, 发挥镇痛作用的同时抑制 μ 型阿片受体引起的胃肠道不适及呼吸抑制等不良作用^[3]。有报道其可能对瑞芬太尼导致的痛觉过敏有一定抑制作用^[4], 但目前尚未见相关基础或临床大样本研究。本研究拟采用纳布啡预处理切口痛大鼠模型, 初步探讨其是否可以抑制瑞芬太尼引起的痛觉过敏及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 30 只 SPF 级 6 周龄 SD 大鼠, 雄性, 体重 (200±15) g [郑州大学实验动物中心, 动物检疫许可证号 SYXK(豫)-2011-0001]。

1.1.2 试剂: 注射用盐酸瑞芬太尼和盐酸纳布啡 (宜昌人福药业有限责任公司); NR1、NR2A、NR2B、ERK 和 p-ERK 兔抗鼠多克隆一抗 (Abcam 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及处理: 将大鼠分为对照组, 瑞芬太尼组 (R 组), 切口痛模型组 (M 组), 瑞芬太尼+切口痛模型组 (RM 组) 和纳布啡预处理组 (N+RM 组), 每组 $n = 6$ 。所有大鼠经七氟醚麻醉后 (3% 诱导, 1% 保持) 尾静脉置管, 其中 R 组、RM 组和 N+RM 组静脉输注瑞芬太尼 $1.0 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{min})$, 对照组及 M 组输注同体积 0.9% 氯化钠溶液; 输注 5 min 后对 M 组、RM 组及 N+RM 组参考文献 [5] 施左后足底切口术建立 Brennan 切口痛模型, 对照组及 R 组仅仰卧固定至手术台相同时间。N+RM 组在瑞芬太尼输注前 3 min 静脉注射纳布啡 $0.6 \text{ mg}/\text{kg}$, 其他组注射同体积 0.9% 氯化钠溶液。

1.2.2 痛觉行为学的检测: 分别于造模前 24 (T-1)、造模后 2 h (T1)、6 h (T2)、24 h (T3) 和 48 h (T4) 进行痛觉行为学测定, 每次测定前大鼠置于测定环境中适应性活动 10 min。采用热刺痛仪 (XR-YLS-22A, Xmaze) 测定大鼠热痛敏反应指标——热刺激缩足潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWL), 间隔 10 min 测量 3 次取平均值。潜伏期以秒 (second, sec) 记录。采用 von Frey 纤维丝测定机械痛敏反应指标——机械刺激缩足阈值 (paw withdrawal mechanical threshold, PWT), 间隔 10 min 测量 3 次取平均值。阈值以克 (gram, g) 记录压力。

1.2.3 蛋白免疫印迹法检测 NR1、NR2A、NR2B、p-ERK1/2 及 ERK1/2 蛋白表达: 最后 1 次行为学检测后所有大鼠在麻醉状态下颈椎脱臼处死, 迅速纵向剪开椎弓根暴露脊髓组织, 取左侧 L4-6 脊髓背角组织保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 批量检测。采用 Western blot 检测脊髓背角组织中 NR1、NR2A、NR2B、p-ERK1/2 及 ERK1/2 蛋白的表达: 组织加入一定比例的细胞裂解液后研磨成匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 取上清液, BCA 法检测蛋白浓度, 而后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜及封闭, 加入兔抗鼠一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 液洗涤 3 次 $\times 5 \text{ min}/\text{次}$ 后加入羊抗兔二抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次后滴加 ECL 显影液, 显影后采用 Image J 计算吸光度值比 (以 β -actin 为内参)。

1.3 统计学分析

所有计量数据采用均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组数据比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内多次测量比较采用重复测量分析。

2 结果

2.1 痛觉行为学指标的变化

与对照组相比, 各组 T1-T4 PWL 和 PWT 均显著降低 ($P < 0.05$); 与 M 组相比, RM 组 T1-T4 PWL 和 PWT 均显著降低 ($P < 0.05$); 与 RM 组相比, N+RM 组 T2-T4PWL 及 T1-T4 PWT 均显著升高 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 纳布啡对 NMDA 受体蛋白表达的影响

与对照组相比,各组 NR1 及 NR2B 均表达上调;与 M 组相比,RM 组 NR1 及 NR2B 均表达上调;与 RM 相比,N+RM 组 NR1 及 NR2B 均表达下调 ($P<0.05$) (图 1,表 2)。

2.3 纳布啡抑制 ERK 信号通路激活

与对照组相比,各组 p-ERK1/2 与 p-ERK/ERK1/2 均显著升高;与 M 组相比,RM 组 p-ERK1/2 与 p-ERK/ERK 1/2 显著升高;与 RM 相比,N+RM 组 p-ERK1/2 和 p-ERK/ERK 显著降低 ($P<0.05$) (图 2)。

3 讨论

瑞芬太尼已被证实是引起痛觉过敏和其他不良反应的阿片类受体麻醉药之一^[6],目前常采用与其

他药物联用的麻醉方案。纳布啡是一种混合型阿片类受体调控剂^[7],可以在激活 κ 型阿片受体的同时拮抗 μ 受体,从而达到镇痛且减轻 μ 受体激动剂不良反应的效果^[8]。目前关于纳布啡在痛觉过敏抑制中的研究较少,但有研究显示纳布啡可以预防瑞芬太尼全麻患者术后寒颤等不良反应的发生,可推荐为预防痛觉过敏的一线镇痛药物^[9]。本研究显示,纳布啡预处理的痛觉过敏模型大鼠在造模后 2~48 h,热敏痛及机械敏痛参数均显著高于未处理组,提示纳布啡对于瑞芬太尼诱导的痛觉过敏有一定抑制作用。NMDA 受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NR) 是痛觉产生及痛觉过敏中最重要的神经兴奋性神经递质受体^[10],其亚基 NR1、NR2A 和 NR2B 的磷酸化可以作为痛觉及痛敏的标志。笔者

表 1 各组大鼠不同时间点 PWL 及 PWT 比较

Table 1 Comparison of PWL and PWT among all groups at different time points ($\bar{x}\pm s, n=6$)

test/group	T-1	T1	T2	T3	T4
PWL/sec					
control	16.5±1.0	16.8±1.2	17.3±0.8	17.2±0.8	16.8±0.8
R	16.8±1.2	14.8±1.5	14.2±1.5*	10.8±1.0*	9.7±1.6*
M	16.5±1.0	14.2±1.8*	13.8±2.1*	10.5±1.9*	9.8±1.7*
RM	16.5±1.0	12.3±1.8**#	11.3±1.4**#▲	8.2±1.5**#▲	7.3±1.0**#▲
N+RM	17.0±1.4	13.3±2.2*	13.5±1.6*△	10.0±1.4*△	9.0±0.9*△
PWT/g					
control	21.0±1.4	20.7±1.0	21.3±1.0	20.8±1.0	20.8±1.2
R	21.5±2.1	16.5±1.4*	15.8±1.9*	13.7±1.8*	13.0±1.7*
M	21.0±1.4	15.2±1.8*	14.8±2.1*	12.5±1.8*	11.7±2.4*
RM	21.2±1.8	12.3±1.8**#▲	11.8±1.7**#▲	7.5±1.9**#▲	6.5±1.0**#▲
N+RM	21.0±2.4	14.5±1.5**#△	14.2±1.5*△	10.5±1.4**#▲△	9.7±2.1**#△

sec. second; g. gram; * $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with R group; ▲ $P<0.05$ compared with M group; △ $P<0.05$ compared with RM group.

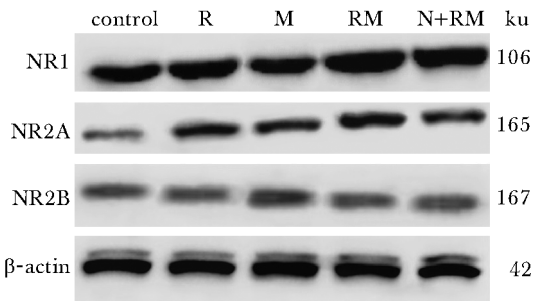


图 1 各组脊髓背角总蛋白中 NR1、NR2A 及 NR2B 表达

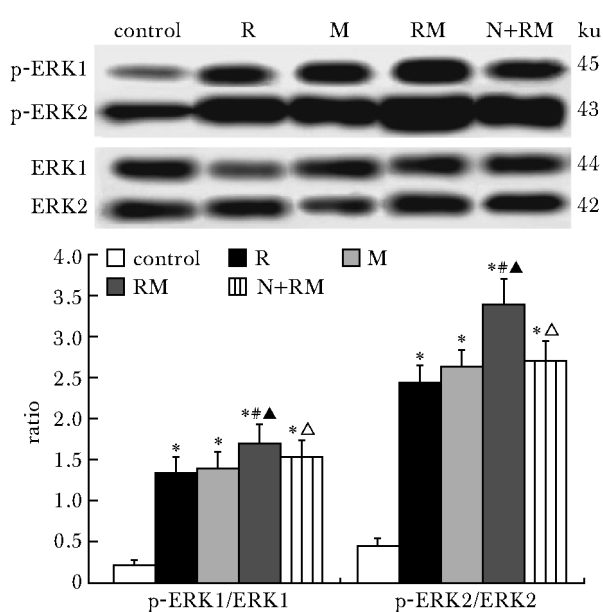
Fig 1 Expression of NR1, NR2A and NR2B in the spinal cord dorsal horn ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表 2 各组脊髓背角总蛋白中 NR1、NR2A 及 NR2B 表达水平比较

Table 2 Comparison of NR1, NR2A and NR2B of spinal dorsal horn total proteins among all groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

group	NR1	NR2A	NR2B
control	0.95±0.05	0.44±0.05	0.52±0.06
R	1.23±0.10*	0.46±0.05	0.72±0.05*
M	1.19±0.09*	0.47±0.05	0.73±0.06**
RM	1.42±0.10**#▲	0.49±0.06	0.93±0.07**#▲
N+RM	1.28±0.09**#▲△	0.46±0.05	0.85±0.06**#▲△

* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with R group; ▲ $P<0.05$ compared with M group; △ $P<0.05$ compared with RM group.



* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with R group; $\Delta P < 0.05$ compared with M group; $\triangle P < 0.05$ compared with RM group

图2 各组 ERK1/2 信号通路蛋白表达

Fig 2 Expression of ERK1/2 signal pathway related proteins among all groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

预实验已证实,瑞芬太尼诱发痛觉过敏效应在术后 24~48 h 达到高峰,而后逐渐衰弱并趋于正常,因此本研究选择术后 2~48 h 检测大鼠的痛敏指标,术后 48 h 时痛敏高峰时检测脊髓组织中 NMDA 受体的表达。结果显示,纳布啡可降低 NR1 及 NR2B 表达,表明纳布啡可以抑制瑞芬太尼诱导的痛觉过敏。

ERK1/2 是促分裂原活化的蛋白激酶之一,是介导痛觉传递和维持痛觉过敏的重要信号通路之一^[11]。ERK 信号通路激活后,p-ERK 可以促使神经细胞兴奋并持续传递伤害刺激信号,同时影响突触重塑降低疼痛阈值和痛觉耐受力^[12]。有报道 ERK1/2 参与大鼠术后切口疼痛的形成,阻断该信号通路的激活可以有效预防痛觉过敏^[13]。本结果显示,痛觉过敏大鼠 p-ERK 显著升高,提示痛觉过敏反应中 ERK 信号通路被激活,而纳布啡组 p-ERK 显著低于痛觉过敏大鼠,提示纳布啡可能通过抑制 ERK 信号通路的激活,从而抑制痛觉过敏的发生。

综上所述,本研究表明纳布啡可以抑制痛觉过敏的发生,其机制可能与其对 ERK 信号通路的抑制有关,详细机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Anderson B. The use of remifentanyl as the primary agent for analgesia in parturients [J]. Crit Care Nurs Clin North Am, 2017, 29: 495-517.
- [2] Kim SH, Stoicea N, Soghomonyan S, et al. Remifentanyl-acute opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: a systematic review [J]. Am J Ther, 2015, 22: e62-74.
- [3] 周据津. 纳布啡与舒芬太尼用于剖宫产术后镇痛临床效果的比较 [D]. 河南: 郑州大学, 2017.
- [4] 张瑜, 何万友, 梁顺萍, 等. 纳布啡预防瑞芬太尼诱发术后痛觉敏化的效果评价 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25: 2688-2691.
- [5] Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain [J]. Pain, 1996, 64: 493-501.
- [6] Kim SH, Stoicea N, Soghomonyan S, et al. Remifentanyl-acute opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia: a systematic review [J]. Am J Ther, 2015, 22: e62-74.
- [7] 王敦亮, 王秘群, 申荣, 等. 盐酸纳布啡注射液用于剖宫产术后镇痛的临床研究及其对产后抑郁的预防作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33: 782-785.
- [8] Narver HL. Nalbuphine, a non-controlled opioid analgesic, and its potential use in research mice [J]. Lab Anim (NY), 2015, 44: 106-110.
- [9] Jannuzzi RG. Nalbuphine for treatment of opioid-induced pruritus: A systematic review of literature [J]. Clin J Pain, 2016, 32: 87-93.
- [10] Li XH, Miao HH, Zhuo M. NMDA receptor dependent long-term potentiation in chronic pain [J]. Neurochem Res, 2019, 44: 531-538.
- [11] Borges G, Berrocoso E, Mico JA, et al. ERK1/2: function, signaling and implication in pain and pain-related anxiety-depressive disorders [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2015, 60: 77-92.
- [12] Roeckel LA, Le Coz GM, Gavériaux-Ruff C, et al. Opioid-induced hyperalgesia: cellular and molecular mechanisms [J]. Neuroscience, 2016, 338: 160-182.
- [13] Van den Heuvel I, Reichl S, Segelcke D, et al. Selective prevention of mechanical hyperalgesia after incision by spinal ERK1/2 inhibition [J]. Eur J Pain, 2015, 19: 225-235.