

· 药 理 ·

氧自由基致痛、痛敏及其与 阿斯匹林、吲哚美辛镇痛的关系

王 洁 (中国医学科学院药物研究所, 北京, 100050)

宋必卫 陈志武 李前进 马传庚 徐叔云 (安徽医科大学药理教研室, 合肥 230032)

摘要 采用光照核黄素(LRF)产生氧自由基(OFR), 观察后者在外周和脊髓水平对疼痛的影响。发现 在外周, 小鼠足跖部皮下注射(ipl)LRF 0.067, 0.67 mmol·mouse⁻¹ 有致痛作用; 脊髓水平, 小鼠鞘内注射 LRF 0.106~0.665 nmol·mouse⁻¹ 有致痛敏作用; 进一步研究发现 OFR 的脊髓痛敏与 Ca²⁺ 有密切关系, 用 维拉帕米、尼莫地平、EGTA 可拮抗 OFR 的痛敏作用。并证明阿斯匹林、吲哚美辛的镇痛作用与清除 OFR 有关。

关键词 氧自由基 光照核黄素 阿斯匹林 吲哚美辛

近年来, 有关氧自由基(Oxygen free radicals, OFR)对衰老、细胞损伤(尤其是心、脑血管内皮)及炎症等方面的研究日趋活跃^[1], 作为炎症介质之一, 我们推测 OFR 亦可能参与疼痛的产生与传递, 清除 OFR 则有助于镇痛^[2]。为此, 本文采用光照核黄素产生 OFR 的经典方法, 在外周和脊髓水平对 OFR 与疼痛和部分非甾体抗炎药的关系进行了研究, 具体内容包括: ① OFR 对痛觉的影响; ② OFR 致痛与 Ca²⁺ 的关系; ③ 阿斯匹林、吲哚美辛的镇痛与 OFR 的关系。

1 实验材料与方法

1.1 药品与试剂 核黄素, 上海化学试剂采购分装厂; 超氧化物歧化酶(SOD), 中国医药公司上海市分公司; 盐酸维拉帕米注射液, 天津和平制药厂; 尼莫地平, 上海化学试剂公司; 阿斯匹林, 中国医药公司上海市公司; 吲哚美辛, 上海市十二制药厂; 硫代巴比妥酸, 上海生化试剂厂; 细胞色素C, 上海东风生化试剂厂

1.2 动物 18~22 g 昆明种小白鼠, 由实验动物中心提供。

1.3 OFR 产生体系^[3] 在暗光下将核黄素(Riboflavin, RF)配成水溶液后分2份, 1份严密遮光, 作对照, 用于RF组; 另1份在40W日光灯下相距10 cm处照射12 min, 以产生 OFR, 用于

LRF(lighted riboflavin, LRF)组。

OFR定量方法: 用细胞色素C(Cytochrome c, Cyt-C)法间接测定 O₂⁻^[4]。操作如下: 顺次在试管内加入磷酸缓冲液1.95 ml(0.13 mmol)、Cyt-C 0.04 ml(24 nmol)、RF 0.01 ml(浓度由 2 mg·100 ml⁻¹~12.5 mg·100 ml⁻¹), 摇匀后立即光照, 并随即在550 nm 和 557 nm 处以1 cm 厚比色皿比色, 空气调零, 得 ΔA(550~557 nm), 并根据公式 $C = \frac{\Delta A}{\Sigma \cdot D}$ 得出 Cyt-C 被还原的量, 以此间接表

示 O₂⁻ 的产生情况, 式中O为比色皿厚度(cm), Σ为消光系数, 恒等于21.0 nmol·cm⁻¹, 结果如下: ($\bar{x} \pm s$, n=8)

核黄素浓度为:

① 12.5 mg·100 ml⁻¹ 时, $C = 9.0 \times 10^{-4} \pm 0.22 \times 10^{-4}$ nmol

② 5 mg·100 ml⁻¹ 时, $C = 2.9 \times 10^{-4} \pm 0.18 \times 10^{-4}$ nmol

③ 2.5 mg·100 ml⁻¹ 时, $C = 0.95 \times 10^{-4} \pm 0.14 \times 10^{-4}$ nmol

1.4 清醒小鼠鞘内注射法(intrathecal injection, ith)^[4]

按压小鼠腰骶两侧, 固定后自L5、L6间隙进针, 以鼠尾出现突然侧向运动为成功标志, 注射容

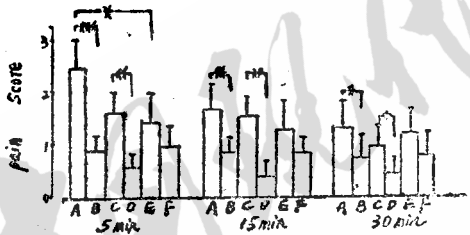
积 $\leq 5 \mu\text{l} \cdot \text{只}^{-1}$ 。

1.5 测痛方法 仿福尔马林法^[5]、压尾法^[6]、热水缩尾法^[6]、热板法^[6]等均参照有关文献进行。

1.6 血、腹腔冲洗液中 OFR 的测定 小鼠经酒石酸锑钾致痛后 10 min, 眼球摘除, 采血、离心, 得血浆约 $0.2 \sim 0.3 \text{ ml} \cdot \text{只}^{-1}$; 再脱臼处死, 打开腹腔, 用生理盐水(NS) 0.15 ml 冲洗, 收集腹腔液约 $0.3 \sim 0.4 \text{ ml} \cdot \text{只}^{-1}$, 所得血、腹腔冲洗液均以硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid, TBA)法测丙二醛(Malondialdehyde, MDA)值^[7]。

2 实验结果

2.1 仿福尔马林法 小鼠一侧后足足跖部分别皮下注射(intraplantar injection, ipl) LRF 0.67 mmol/只 和 0.067 mmol/只 , 结果疼痛分值增加; 25°C 时, SOD 与 LRF 共温 10 min 后再 ipl (每只 LRF 0.67 mmol , SOD 0.91 pmol), 则疼痛分值下降。如图 1 所示, 表明 OFR 在外周组织有镇痛作用。



- A: LRF 0.67 mmol/只
 B: RF 0.67 mmol/只
 C: LRF 0.067 mmol/只
 D: RF 0.067 mmol/只
 E: SOD 0.91 pmol/只 + LRF (0.67 mmol/只)
 F: SOD 0.91 pmol/只 + RF (0.67 mmol/只)
 *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

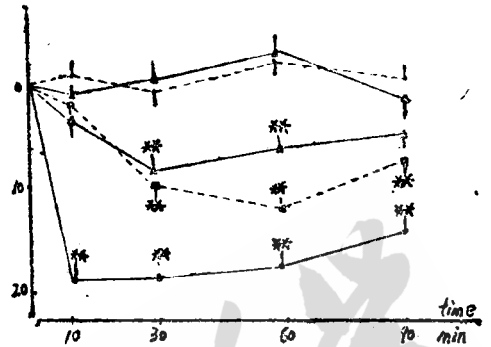
图 1 小鼠右后爪 ipl LR 致痛作用 $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

2.1.2 小鼠近尾尖约 1.0 cm 处 s. c LRF $0.67 \text{ mmol} \cdot \text{只}^{-1}$, 采用热水缩尾模型。于注射前, 注射后立即, 10 min, 30 min 测量缩尾潜伏期。发现注射后潜伏期明显缩短 ($P < 0.05 \sim 0.01$), 表明 OFR 有镇痛作用。

2.2 小鼠鞘内注射(ith) LRF 对疼痛的影响

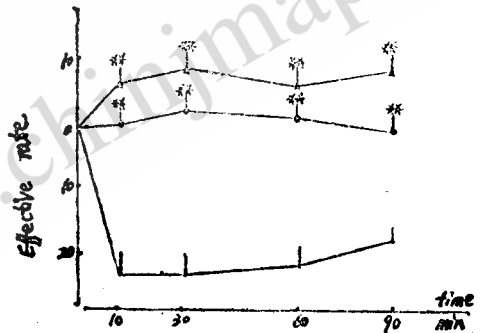
小鼠分别 ith LRF 0.106 nmol/只 , $0.265 \text{ nmol} \cdot \text{只}^{-1}$, 0.665 nmol/只 均可降低压尾痛阈, 有剂量和时间依赖性。ith 10 min 后达峰效应(图

2)。若 ith OFR 清除剂 SOD 或 VitE, 5 min 后再 ith LRF, 则可取消 OFR 的作用, 见图 3。



- LRF $0.665 \text{ nmol} \cdot \text{只}^{-1}$
 ■—LRF $0.106 \text{ nmol} \cdot \text{只}^{-1}$
 NS
 △—LRF $0.265 \text{ nmol} \cdot \text{只}^{-1}$
 ▲—RF $0.665 \text{ nmol} \cdot \text{只}^{-1}$
 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs RF group

图 2 小鼠 ith LRF 后在压尾模型上的时效曲线
 $n = 10$ $\bar{x} \pm s$

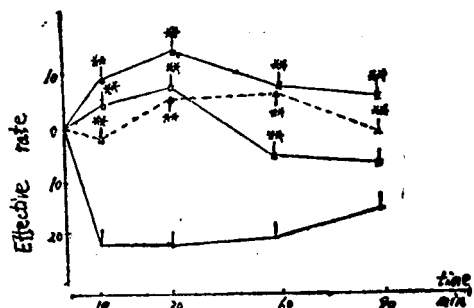


- LRF $0.665 \text{ nmol} \cdot \text{只}^{-1}$
 ○—○ SOD 0.07 pmol/只 + LRF 0.665 nmol/只
 △—△ VitE 0.371 nmol/只 + LRF 0.665 nmol/只
 ** $P < 0.01$ vs LRF group

图 3 压尾模型上, VitE 和 SOD 取消 LRF 的脊髓痛敏作用 $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

55°C 热板法表明, 小鼠分别 ith LRF 0.106 nmol/只 , 0.265 nmol/只 , 0.665 nmol/只 亦可显著降低痛阈 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。10 min 起效, 30 min 时痛阈降至最低点, 最大下降幅度达 34%。其中高剂量组作用维持时间超过 90 min。

2.3 Ca^{2+} 与 OFR 致痛敏的研究 图 4 表明 ith



●—●LRF 0.66nmol/只
□—□EGTA 10μmol/只+LRF 0.665nmol/只
△—△Nim 2nmol/只+LRF 0.665nmol/只
■—■Ver 10nmol/只+LRF 0.665nmol/只
**P<0.01, *P<0.05

图4 压尾模型上, EGTA和Ver& Nin对LRF致脊髓痛敏的影响n=10 $\bar{x} \pm s$

Ca²⁺ 络合剂 EGTA 或 Ca²⁺ 拮抗剂维拉帕米、尼莫地平均能对抗 OFR 的致痛敏作用, 提示 OFR 致脊髓痛敏可能与增加神经细胞 Ca²⁺ 内流有关。

2.4 化学致痛对内源性 OFR 生成的影响 取小鼠 20 只, 随机分为 2 组, 分别 ip NS 0.2 ml/只和酒石酸锑钾 0.12 μmol/只, 随即记录 10 min 内扭体数。10 min 后取血及腹腔冲洗液, 测 MDA, 结果发现酒石酸锑钾(Potassium antimony tartrate, PA)致痛组小鼠 MDA 值明显升高, 见表 I。

2.5 阿斯匹林(Asp)和吲哚美辛(Ind)镇痛作用与 OFR 的关系 小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 分别灌服 Asp, Ind, 30 min 后均 ip PA 0.12 μmol。

只⁻¹, 并立即开始记录扭体数, 再取血及腹腔冲洗液测 MDA 值。结果扭体数及 MDA 值均较 PA 致痛组为低(见表 I)。另由图 5 可见, ith Asp 1.1 μmol/只, Ind 0.013 μmol/只, 在压尾法上有明显的镇痛作用。预先 ith Asp, Ind 后 5 min, 再 ith LRF 0.665 nmol/只, 则 Asp, Ind 与 LRF 的作用相互抵消, 提示清除 OFR 可能参与 Asp, Ind 的脊髓镇痛机制。

3 讨论

OFR 作为一种炎症介质, 可增加炎症反应, 清除 OFR 则有助于抗炎^[2,8]。为探讨 OFR 与疼痛和痛敏作用的关系, 本文采用一定量的核黄素光照, 严格控制时间和光照距离, 以产生恒量的 OFR。为避免失效, 迅速(<30S)将其注入受试动物体内。结果发现, 在外周和脊髓水平, OFR 均有致痛和痛敏作用。我们推测 OFR 致痛和痛敏的原因是由于 OFR 攻击细胞膜上的蛋白质与脂质, 导致(1)生物膜上的多种离子转运机制活性降低, Na⁺-K⁺-ATPase 活性降低, 使细胞内 Na⁺-Ca²⁺ 交换增加; 胞内的 Ca²⁺ 又无法经 Ca²⁺ 泵泵出, 故胞浆内 Ca²⁺ 浓度大量增加^[9]。胞外 Ca²⁺ 涌入胞内, 激活了磷脂酶 A₂, 使膜磷脂降解, 释放花生四烯酸, 分解代谢为白三烯(LTs)、前列腺素(PGs), 产生致痛和痛敏作用。细胞内 Ca²⁺ 增多, 可降低痛觉神经的兴奋阈值, 也有痛敏作用。本实验采用维拉帕米、尼莫地平钙通道阻滞剂抑制细胞外 Ca²⁺ 进入细胞内, 降低细胞内 Ca²⁺, 采用 EGTA, 降低细胞外 Ca²⁺, 发现它们均可拮抗 OFR 的致痛敏作用, 进一步说明 OFR 致痛和痛敏与 Ca²⁺ 有关。

表 I 酒石酸锑钾(PA)和Asp&Ind+PA对血、腹腔冲洗液中MDA值的影响(n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 μmol/只	给药途径	扭体数	MDA(nmol/ml)	
				血	腹腔冲洗液
NS	—	ip	—	16.5±3.2	6.2±2.1
PA	0.12	ip	35.5±10.5**	31.0±2.1**	12.4±3.8**
Asp+PA		ig+ip			
1	11±0.12		14.8±8.5**	15.4±1.8**	6.8±1.9**
2	5.5±0.12		21.5±11.5**	22.3±2.5**	9.6±2.4**
Ind+PA		ig+ip			
1	0.55±0.12		11.6±7.4**	14.2±1.7**	4.9±2.0**
2	0.28±0.12		25.0±7.3**	18.5±2.3**	9.8±1.8**

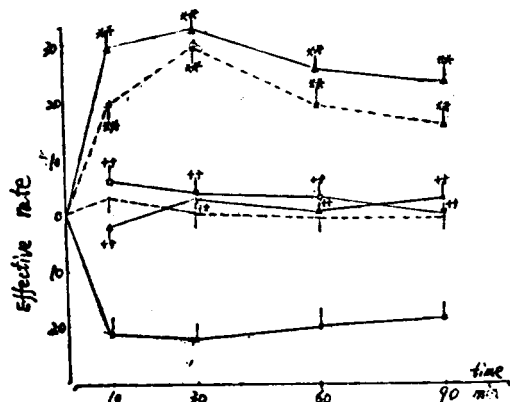
++P<0.01 vs NS group

**P<0.01 vs PA group

抗剂或络合剂对抗, Asp, Ind 亦可对抗该作用。并发现 Asp, Ind 镇痛同时, 内源性 OFR 减少, 提示 OFR 参与了 Asp, Ind 的镇痛机制。

参考文献

- 1 Petcr A, Southern MB. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Proc. 1988; 63, 381—9
- 2 Salim AS. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the treatment of recurrent pain produced by chronic pancreatitis. A new approach. Arch Surg. 1991; 126(9), 1109—14
- 3 徐叔云、卞如濂、陈修主编. 药理 实验方法学. 第二版. 北京, 人民卫生出版社. 1991; 504
- 4 Hyden JLX, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice, a new technique. Eur J Pharmacol. 1980; 67:313
- 5 Wheeler AH, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test. Comparison of noxious agents. Pain. 1990; 40, 229—38
- 6 陈奇主编. 中药药理实验方法学, 第一版, 北京, 人民卫生出版社. 1993; 360
- 7 陈顺志, 金有豫, 李常淳等. 过氧化脂质 TBA 显色的三种方法学比较. 临床检验杂志, 1984; 2 (4), 8
- 8 Peter A. Southern MB. Free radicals in medicine. II. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc. 1988; 63, 390—408
- 9 Chandan KS, Lester P. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. FASEB J. 1996; 10, 709—20
- 10 Annika B, Malmberg TL, Yaksh. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal antiinflammatory agents on the formalin test in the rat. J Pharm Exp Ther. 1992; 263(1), 136



○—○LRF 0.665nmol/只
 ▲—▲Ind 0.013μmol/只
 ■—■Asp 1.1 μmol/只
NS
 □—□Ind 0.013μmol/只 + LRF 0.665nmol/只
 △—△Asp 1.1μmol/只 + LRF 0.665nmol/只
 *P<0.01, *P<0.05 vs NS group
 ++P<0.01 vs LRF group

图5 Asp和Ind对ith LRF致脊髓痛敏的影响。
 n=10, $\bar{x} \pm s$

传统观念认为, 典型非甾体抗炎药(NSAIDs)如 Asp, Ind 的作用部位在外周, 但近来有人报道^[10]NSAIDs 有中枢镇痛作用。我们发现 Asp, Ind 镇痛同时, 血及腹腔冲洗液中 MDA 值降低, 表明 Asp, Ind 镇痛与减少内源性 OFR 有关。这可能是 Asp, Ind 抑制环氧酶, 减少花生四烯酸的分解代谢, 抑制 PGs 的合成; 由于 OFR 可在 PGG₂ 转变为 PGH₂ 的过程中生成, 故内源性 OFR 也相应减少。此外, 在鼠压尾模型中, Asp, Ind ith 后有镇痛作用, 这与抑制 PGs 合成有关; 而预先 ith Asp, Ind 后又可对抗外源性 OFR 的痛敏作用, 提示清除 OFR 参与了 Asp, Ind 的脊髓镇痛机制。关于 PGs 与 OFR 的作用机制之间有何关联, 仍有待进一步研究。

综上所述, OFR 在外周和脊髓水平, 均有致痛和痛敏作用, 该作用与 Ca²⁺ 有关, 可被 Ca²⁺ 拮

收稿日期: 1996—07—29

Studies of the Relationship between the Algesia and Hyperalgesia of OFR and the Analgesia of Aspirin and Indomethacin

Wang Jie, Song Bi-wei, Ma Chuan-gen et al

(Dept. of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract By lighting riboflavin to produce OFR, we studied the role of OFR in spinal and peripheral pain. Intraplantar injection (ipl) LRF at dose of 0.67 mmol/mice or 0.067mmol/mice in one hind paw could induce peripheral pain. Intrathecal injection (ith) LRF 0.106~0.665 nmol/mice could induce spinal hyperalgesia. More research suggest that calcium might mediate the spinal hyperalgesia of OFR and scavenging PFR might involve in the analgesia of ASP, IND.

Key words: oxygen free radicals, lighted riboflavin, aspirin, indomethacin

(on page 8)