

## 关节腔注射吗啡、胍丁胺对大鼠慢性关节炎镇痛效果的协同作用

苏丹<sup>1</sup>, 刘超<sup>1</sup>, 顾玲<sup>1</sup>, 阳露<sup>1</sup>, 杨森<sup>1</sup>, 周卿云<sup>1</sup>, 陈秀侠<sup>2\*</sup>

(1. 徐州医科大学麻醉学院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院麻醉科, 江苏 徐州 221002)

**摘要:**目的 观察胍丁胺和吗啡关节腔注射对大鼠慢性关节炎镇痛效果。方法 将40只清洁级SD大鼠随机分为5组( $n=8$ ):正常(N)组、模型对照(C)组、吗啡(M)组、胍丁胺(A)组和吗啡胍丁胺(M+A)组。通过关节腔内注射弗氏完全佐剂建立大鼠慢性关节炎模型,建模20d后进行关节腔内给药。通过热缩足反应潜伏期(TWL)、机械缩足反应阈值(MWT)以及关节炎指数等指标观察各组大鼠建模情况以及不同药物的抗炎镇痛作用。结果 与C组相比,M组在给药3h后TWL和MWT均明显增高( $P<0.01$ ),在造模后第24天关节炎评分降低( $P<0.05$ );M+A组在给药3h后TWL和MWT均明显增高( $P<0.01$ ),在造模后第24天关节炎评分明显降低( $P<0.01$ );A组在给药3h后TWL升高( $P<0.05$ )。与M组相比,M+A组在给药3h后TWL和MWT均明显增高( $P<0.01$ ),在造模后第24天关节炎评分有所降低( $P<0.05$ )。结论 吗啡和胍丁胺关节腔内注射对大鼠踝关节炎均具有一定的镇痛作用,而两者合用能够显著增强镇痛作用。

**关键词:**关节炎;吗啡;胍丁胺;疼痛;大鼠

中图分类号:R965.1 文献标志码:A 文章编号:2096-3882(2019)06-0416-04

DOI:10.3969/j.issn.2096-3882.2019.06.06

## Synergistic effect of intraarticular injection of morphine and agmatine in rats with chronic arthritis

SU Dan<sup>1</sup>, LIU Chao<sup>1</sup>, GU Ling<sup>1</sup>, YANG Lu<sup>1</sup>, YANG Sen<sup>1</sup>, ZHOU Qingyun<sup>1</sup>, CHEN Xiuxia<sup>2\*</sup>

(1. School of Anesthesiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002)

**Abstract; Objective** To observe the analgesia effect of intraarticular injection of morphine and agmatine in rats with chronic arthritis. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into 5 groups: group N(Normal), group C(control), group A(agmatine), group M(morphine), and group M+A(morphine+agmatine). The models of chronic arthritis were established with intraarticular injection with complete Freund's adjuvant, and each group underwent intraarticular injection with respective medicines 20 days later. Thermal withdrawal latency (TWL), mechanical withdrawal threshold (MWT) and arthritis index of each group were measured to evaluate the establishment of models and observe the analgesia effect of medicines on rats with chronic arthritis. **Results** Compared with group C, group M presented obviously prolonged TWL and MWT( $P<0.01$ ) at 3 h after administration and a lower arthritis index score ( $P<0.05$ ) at 24 d after modeling, while group M+A showed significantly increased TWL and MWT ( $P<0.01$ ) at 3 h after administration and a much lower arthritis index score ( $P<0.01$ ) at 24 d after modeling. The TWL of group A was obviously longer than group C ( $P<0.05$ ) at 3 h after administration. In contrast with group M, group M+A showed significantly increased TWL and WMT ( $P<0.01$ ) at 3 h after administration as well as a lower arthritis index score ( $P<0.05$ ) at 24 d after modeling. **Conclusions** Intraarticular injection of morphine and agmatine both have analgesia effect in rats with chronic arthritis and the anti-nociception function can be greatly increased with concomitant use.

**Key words:** agmatine; morphine; intraarticular injection; chronic arthritis; rats

基金项目:江苏省大学生实践创新训练计划(201710313001)

\* 通信作者, E-mail: cxlxly@sina.com

骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种中老年人常见的, 主要侵害关节软骨、骨和滑膜组织, 导致关节疼痛、畸形和功能障碍的退行性关节疾病。研究表明, 65 岁以上的老年人中, 有半数以上存在 OA 的临床或影像学证据, 而 75 岁以上的老年人中几乎每个人至少有 1 个关节具有 OA 的表现, 这造成了巨大的社会经济负担<sup>[1]</sup>。

OA 经典的镇痛药物主要包括对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药、阿片类镇痛药等。研究表明, 长期应用对乙酰氨基酚所引起的肝毒性及多器官功能衰竭等不良反应的风险远大于收益。非甾体抗炎药无法有效地缓解疼痛且存在严重的不良反应, 因而其临床应用同样受到了限制<sup>[2]</sup>。外周给予阿片类镇痛药不仅能发挥强大的镇痛作用且较少引起恶心呕吐、呼吸抑制以及成瘾和耐受等中枢性不良反应, 是近年来研究的热点之一<sup>[3]</sup>。通过药物的合理配伍使用, 可以增强阿片类镇痛药的镇痛作用, 同时减轻其不良反应。胍丁胺是由精氨酸经细胞线粒体膜上的精氨酸脱羧酶作用转化而来的一种内源性生物活性物质。大量研究表明, 胍丁胺能够增强吗啡的镇痛作用, 其确切机制尚不完全清楚, 可能涉及  $\alpha_2$ -肾上腺素能受体、咪唑啉受体、N-甲基-门冬氨酸 (NMDA) 受体和一氧化氮合酶等多个靶点<sup>[4-5]</sup>。本研究拟制备 OA 大鼠模型, 观察关节腔内注射吗啡和胍丁胺的抗炎镇痛效果, 为临床用药提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 体重 180 ~ 220g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 自由摄食、饮水。

1.2 实验药品和仪器 弗氏完全佐剂 (美国 Sigma 公司, 批号: 068K8761), 盐酸吗啡注射液 (沈阳第一制药有限公司, 批号: 130406), 胍丁胺硫酸盐粉末 (美国 Sigma 公司, 批号: MKBW7569V), BME-410C 型全自动热痛刺激仪 (北京凯辉盛达科技发展有限公司), BME-404 型电子式机械测痛仪 (北京凯辉盛达科技发展有限公司)。

1.3 动物分组及处理 将 40 只清洁级 SD 大鼠随机分为 5 组 ( $n=8$ ): 正常 (N) 组、模型对照 (C) 组、吗啡 (M) 组、胍丁胺 (A) 组和吗啡胍丁胺 (M+A) 组。C 组、M 组、A 组和 M+A 组大鼠右足底皮垫处注射 0.1 ml 弗氏完全佐剂, N 组大鼠右足底皮垫下注入生理盐水 0.1 ml。建模后第 20 天, 各组大鼠予

以关节腔内给药, N 组和 C 组注射生理盐水 80  $\mu$ l; M 组注射 1 mg/kg 吗啡 80  $\mu$ l; A 组注射 80 mg/kg 胍丁胺 80  $\mu$ l; M+A 组注射 2 mg/kg 吗啡 40  $\mu$ l 以及 160 mg/kg 胍丁胺 40  $\mu$ l。分别于建模当天以及建模后 6、12、18 和 24 d 进行关节炎指数评分, 以动态评价弗氏完全佐剂建立大鼠慢性关节炎模型的效果并观察各组药物的抗炎作用。在建模后第 20 天, 分别于给药前、给药后 3 h 对各组大鼠进行热缩足反应潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 和机械缩足反应阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 的测定, 以观察各组药物对慢性关节炎模型大鼠的镇痛作用。

1.4 关节炎指数评分 观察各组大鼠关节红肿情况, 进行关节炎指数评分, 每只足爪的标准如下: 0 分, 正常; 1 分, 踝关节出现红斑和轻微肿胀; 2 分, 踝关节到跖关节或掌关节出现红斑和轻微肿胀; 3 分, 踝关节到跖趾关节或掌关节出现红斑和中度肿胀; 4 分, 踝关节到趾关节出现红斑和重度肿胀。四肢累计评分总和为该只大鼠关节炎指数, 总分不大于 12 分。

1.5 热缩足反应潜伏期测试 将大鼠放入有机玻璃笼中, 待其充分安静后, 用照射参数为 100 W/10 V、光圈直径 6 mm 的热光源透过玻璃台照射大鼠右足底 (大鼠如排尿, 需即刻擦拭干净, 否则将导致 TWL 数值偏大)。记录从开始照射至出现缩足反应的时间为 TWL, 为防止组织灼伤, 当 30 s 仍未出现缩足反应时则停止照射并记录 TWL 为 30 s。重复测量 5 次, 取平均值。

1.6 机械缩足反应阈值测试 将大鼠放入有机玻璃笼中, 待其充分安静后, 用电子 von-frey 针刺激大鼠右足底最肿胀处, 力度逐渐加重, 直至大鼠出现典型缩足反应。记录屏幕上压力的峰值为 MWT, 每只大鼠测量重复 5 次, 取平均值。

1.7 统计学处理 各组数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理, 组间比较采用单因素方差分析及 LSD 检验, 组内比较采用配对  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 关节炎指数评分 见表 1。与 N 组相比, C 组、M 组、A 组、M+A 组在第 6、12、18、24 天的关节炎指数均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与 C 组相比, M 组在第 24 天的关节炎指数有所降低 ( $P < 0.05$ ); M+A 组则明显降低 ( $P < 0.01$ ); A 组在第 24 天的关节

炎指数有所降低,但无统计学差异( $P > 0.05$ )。与 M 组相比,M + A 组在第 24 天的关节炎指数有所降

低( $P < 0.05$ )。与 A 组相比,第 24 天 M + A 组的关节炎指数有所降低( $P < 0.05$ )。

表 1 各组关节炎指数 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 6 天	第 12 天	第 18 天	第 24 天
N 组	0.25 ± 0.46	0.13 ± 0.35	0.375 ± 0.74	0.25 ± 0.46
C 组	4.00 ± 0.76**	6.75 ± 0.71**	8.75 ± 0.71**	10.63 ± 0.74**
M 组	3.63 ± 0.92**	7.00 ± 0.93**	8.88 ± 0.83**	9.38 ± 1.06**#
A 组	3.75 ± 0.71**	6.25 ± 0.86**	8.63 ± 1.06**	9.75 ± 1.34**
M + A 组	4.13 ± 0.64**	6.63 ± 0.74**	8.00 ± 0.53**	8.25 ± 1.28**##&@

与 N 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 C 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与 M 组比较: & $P < 0.05$ ;与 A 组比较: @ $P < 0.05$

2.2 热缩足反应潜伏期测试 见表 2。与 N 组相比,C 组、M 组、A 组和 M + A 组 TWL 在给药前均明显降低( $P < 0.01$ )。与 C 组相比,M 组和 M + A 组 TWL 在给药 3 h 后均明显升高( $P < 0.01$ );A 组 TWL 在给药 3 h 后升高( $P < 0.05$ )。与 M 组相比,M + A 组 TWL 在给药 3 h 后明显升高( $P < 0.01$ )。与 A 组相比,M 组和 M + A 组 TWL 在给药 3 h 后明显升高( $P < 0.01$ )。

表 2 各组热缩足反应潜伏期 ( $n=8, \bar{x} \pm s, s$ )

组别	给药前	给药后 3 h
N 组	10.85 ± 1.63	11.08 ± 1.55
C 组	6.36 ± 1.59**	6.63 ± 1.17
M 组	7.14 ± 1.30**	12.41 ± 1.27##&@
A 组	6.67 ± 1.90**	8.26 ± 1.29#
M + A 组	7.28 ± 2.05**	14.97 ± 0.96##&&@&@

与 N 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 C 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与 M 组比较: && $P < 0.01$ ;与 A 组比较: @ $P < 0.01$

2.3 机械缩足反应阈值测试 见表 3。与 N 组相比,C 组、M 组、A 组和 M + A 组 MWT 在给药前明显降低( $P < 0.01$ )。与 C 组比较,M 组和 M + A 组 MWT 在给药后 3 h 均明显升高( $P < 0.01$ )。与 M 组相比,M + A 组 MWT 在给药后 3 h 明显升高( $P < 0.01$ )。与 A 组相比,M 组和 M + A 组 MWT 在给药 3 h 后明显升高( $P < 0.01$ )。

表 3 各组机械缩足反应阈值 ( $n=8, \bar{x} \pm s, s$ )

组别	给药前	给药后 3h
N 组	20.79 ± 0.60	20.44 ± 0.78
C 组	8.72 ± 0.98**	10.17 ± 0.48
M 组	8.20 ± 1.50**	17.27 ± 0.93##&@
A 组	8.68 ± 2.03**	10.62 ± 1.88
M + A 组	9.19 ± 1.91**	26.01 ± 2.61##&&@&@

与 N 组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与 C 组比较: ## $P < 0.01$ ;与 M 组比较: && $P < 0.01$ ;与 A 组比较: @ $P < 0.01$

### 3 讨论

SD 大鼠关节炎模型的病程主要包括急性炎症反应期以及随后的慢性炎症期两个阶段。注射部位的急性炎症反应一般发生在 1 周内,以滑膜纤维素沉着、滑膜炎及关节囊肿胀为主要病理特征;而慢性炎症期通常出现在 2~3 周之后,此阶段关节肿胀趋于稳定<sup>[6]</sup>。在本研究中,经弗氏完全佐剂致敏的大鼠右足出现红肿热痛并有一定程度功能丧失,关节炎指数评分逐渐增加并于第 3 周趋于稳定。与 N 组相比,C 组、M 组、A 组和 M + A 组大鼠 TWL 和 MWT 在给药前均明显增加( $P < 0.01$ ),并不同程度地出现活动量逐渐减少、食欲下降、毛发脱落、精神萎靡等表现,提示慢性关节炎大鼠模型制备良好。

作为经典的阿片类镇痛药,吗啡具有强大的镇痛作用且无明显的内脏毒性,但其显著的呼吸抑制效应以及长期应用的耐受性和依赖性 etc 中枢不良反

应限制了其临床应用。传统观念认为吗啡主要通过激活中枢神经系统的  $\mu$  型阿片受体发挥镇痛作用,但随着研究的不断深入,人们发现位于外周(包括脊髓背根神经节、初级传入神经的中枢突和周围突)的阿片受体同样能够发挥强有力的镇痛作用却不会引起各种严重的中枢不良反应<sup>[7]</sup>。此外,外周吗啡受体还具有较强的抗炎作用。当外周部位发生炎症时,机体能够通过轴浆运输以及表达增加等多种方式上调炎症局部吗啡受体的数量;与此同时,炎症激活的免疫细胞会释放更多的内源性阿片类物质并通过抑制钙离子依赖的致痛物质的释放从而发挥局部抗炎镇痛作用<sup>[8]</sup>。这为关节腔注射吗啡发挥镇痛作用提供了理论基础。本研究结果显示,与 C 组比较, M 组在给药 3 h 后 TWL 和 MWT 均明显增高( $P < 0.01$ ),在造模后第 24 天关节炎评分有所降低( $P < 0.05$ ),这与已知吗啡较强的抗炎镇痛作用相一致。

胍丁胺是一种广泛存在于哺乳动物体内许多器官和组织的内源性生物活性物质,能够与咪唑啉受体、 $\alpha_2$ 受体、NMDA 受体和 N 型胆碱能受体等多种受体相互作用从而发挥抗抑郁、抗焦虑、抗惊厥以及神经保护等作用<sup>[9]</sup>。本研究结果显示,与 C 组比较, A 组 TWL 在给药后 3 h 增加( $P < 0.05$ ),提示关节腔内注射胍丁胺对大鼠慢性关节炎有一定镇痛效果,可能与其阻滞钙通道并抑制炎症介质释放有关。与 M 组相比, M + A 组在给药 3 h 后 TWL 和 MWT 均显著增加( $P < 0.01$ ),在造模后第 24 天关节炎评分有所降低( $P < 0.05$ ),提示胍丁胺能够明显增强吗啡的镇痛作用,其机制尚不完全清楚。大量研究表明,激活咪唑啉受体和  $\alpha_2$ 受体可能是胍丁胺增强吗啡镇痛作用的重要机制,但其下游通路仍未得到阐明<sup>[10-11]</sup>。此外,胍丁胺还能够通过拮抗 NMDA 受体进而降低神经元兴奋性,阻滞突触前膜钙通道从而减少兴奋性递质的释放以及抑制一氧化氮合酶的活性等多种机制协同阿片受体发挥镇痛作用<sup>[11-12]</sup>。

综上所述,我们得出结论:吗啡和胍丁胺关节腔内注射对大鼠踝关节炎均具有一定的镇痛作用,而两者合用能够使镇痛效果显著增强,其具体作用机制以及最佳配伍剂量仍需要进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 吕苏梅,张瑞丽. 中老年膝骨关节炎的流行病学研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(16): 4133-4135. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2016.16.121.
- [2] 孙晓迪,潘寅兵. 老年骨性关节炎的诊治进展[J]. 实用老年医学, 2017, 31(1): 14-19. DOI: 10.3969/j.issn.1003-9198.2017.01.005.
- [3] Vadivelu N, Mitra S, Hines RL. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review[J]. J Opioid Manag, 2011, 7(1): 55-68.
- [4] Thorn DA, Zhang YN, Peng BW, et al. Effects of imidazoline I receptor ligands on morphine- and tramadol-induced antinociception in rats[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(2/3): 435-440. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.09.173.
- [5] Bhalla S, Andurkar SV, Gulati A. Involvement of  $\alpha_2$ -adrenoceptors, imidazoline, and endothelin-A receptors in the effect of agmatine on morphine and oxycodone-induced hypothermia in mice[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2013, 27(5): 498-509. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2012.01046.x.
- [6] 宋珊珊,张玲玲,魏伟. 实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(12): 1648-1653. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2011.12.006.
- [7] Cunha TM, Roman-Campos D, Lotufo CM, et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the  $PI_3K$ gamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4442-4447. DOI: 10.1073/pnas.0914733107.
- [8] Vadivelu N, Mitra S, Hines RL. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review[J]. J Opioid Manag, 2011, 7(1): 55-68.
- [9] Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential[J]. Pharmacol Ther, 2012, 133(3): 351-365. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.12.005.
- [10] Wu N, Su RB, Li J. Agmatine and imidazoline receptors: their role in opioid analgesia, tolerance and dependence[J]. Cell Mol Neurobiol, 2008, 28(5): 629-641.
- [11] Bhalla S, Rapolaviciute V, Gulati A. Determination of  $\alpha(2)$ -adrenoceptor and imidazoline receptor involvement in augmentation of morphine and oxycodone analgesia by agmatine and BMS182874[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 651(1/2/3): 109-121. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.10.090.
- [12] Gadotti VM, Tibola D, Paszcuk AF, et al. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice[J]. Brain Res, 2006, 1093(1): 116-122.

收稿日期:2018-05-15 修回日期:2018-06-27

本文编辑:程春开