

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2017) 05-0417-04

## 亚急性酒精中毒戒断对大鼠痛觉时反应量-效关系的影响

葛微微<sup>1,2</sup> 姚俊<sup>1,2</sup> 蔡婷婷<sup>1,2</sup> 周婷婷<sup>1,2</sup> 张艳<sup>1</sup> 汪萌芽<sup>1</sup>

(皖南医学院 1.细胞电生理研究室; 2.启明星小组 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】**目的: 观察亚急性酒精中毒戒断对大鼠光辐射热甩尾反射时反应量-效关系(TDRR)的影响。方法: 取雄性SD大鼠随机分为生理盐水组(NS  $n=9$ )和亚急性酒精中毒组(SA  $n=6$ )。SA组大鼠给予56%乙醇灌胃10 d(15 mL/kg, qd)造模, NS组大鼠给予等容量的生理盐水。停止酒精灌胃后6 h观察戒断症状,并在戒断1 d、3 d、7 d、10 d、14 d应用移动光辐射热甩尾反射法重复检测大鼠光辐射热甩尾反射的潜伏期(TFL)和光照强度(Focus值)之间的TRDD。结果: ①与NS组相比, SA组的体质量增长在造模期间无明显差异,但戒断期间明显受抑( $P<0.05$ )。②SA组在戒断1 d时Focus值为23的TFL比NS组缩短( $P<0.05$ ),且2组大鼠戒断后TFL的TDRR重复测量双因素方差分析显示,光照强度因素、组间因素以及光照强度因素与组间因素的交互作用均有统计学意义( $P<0.01$ )。③对戒断1 d和14 d的2组TDRR进行双曲线型四参数模型 $Y=c^{x+1}/(x-a)^s+b$ 的非线性拟合分析表明, SA组在戒断1 d的参数 $c$ 减小, 3~14 d逐渐恢复。结论: 亚急性酒精中毒戒断第1天出现痛觉敏化,随后逐渐恢复。

**【关键词】**亚急性酒精中毒; 酒精戒断; 痛觉; 时反应量-效关系

**【中图分类号】**R 595.6; R 33-33 **【文献标志码】**A

**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.003

## Withdrawal effects of subacute alcoholism on timed dose-response relationship for pain in rats

GE Weiwei, YAO Jun, CAI Tingting, ZHOU Tingting, ZHANG Yan, WANG Mengya

Cell Electrophysiology Laboratory, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To observe the withdrawal effects of subacute alcoholism on timed dose-response relationship (TDRR) for tail-flick response induced by light radiant heat in rats. **Methods:** Fifteen male SD rats were randomized into normal saline administration group (NS  $n=9$ ) and subacute alcoholism group (SA  $n=6$ ). Rats in SA group were intragastrically given 56% alcohol solution (15 mL/kg) (qd) for 10 days, and those in NS group were administered by saline with corresponding content. Withdrawal symptoms were observed in rats at 6h after cessation. The tail-flick latency (TFL) evoked by diverse light intensity (Focus = 10, 15, 23, 34, 51, 76) was measured with light beam analgesy-meter at moved points of tail on the 1st, 3rd, 7th, 10th and 14th day after withdrawal, and then the TDRR was analyzed between the light intensity and TFL. **Results:** ①Body weight increase remained no notable difference between rats in NS and SA group, yet rats in SA group were less increased after withdrawal ( $P<0.05$ ); ②TFLs at Focus = 23 and 1-day withdrawal were shorter for rats in SA group than NS group ( $P<0.05$ ). Two-way ANOVA analysis of TFL data for rats in two groups showed that factors of light-intensity and group, as well as interaction between group and light-intensity were all significant ( $P<0.01$ ); ③The TDRR data of TFLs at 1-day and 14-day withdrawal for rats in 2 groups were nonlinearly fitted to the hyperbolic 4-parameter model  $Y=c^{x+1}/(x-a)^s+b$ , and the parameters showed that parameter  $c$  in TDRR of 1-day withdrawal in SA group was decreased and then recovered during 3-to 14-day withdrawal. **Conclusion:** The results suggest that withdrawal of subacute alcoholism may dramatically induce pain sensitization in rats, and the pain response tends to recover in 3 to 14 days following withdrawal.

**【Key words】** subacute alcoholism; alcohol withdrawal; pain; timed dose-response relationship

亚急性酒精中毒的病程介于急、慢性酒精中毒之间,是慢性酒精中毒的早期损伤,主要表现为肝功能损伤、营养素代谢紊乱和神经系统损伤等方面<sup>[1]</sup>。大量研究结果显示,长期饮酒不仅对学习记

基金项目: 安徽省大学生创新创业训练计划项目 (AH201410368095); 国家自然科学基金项目 (31271155、31300922)

收稿日期: 2017-04-13

作者简介: 葛微微(1994-),女,2012级临床医学专业本科生,电话) 15755370930 (电子邮箱) 1790183840@qq.com;

汪萌芽,男,教授,博士,硕士生导师,电话) wangmy@wnmc.edu.cn,通信作者。

忆造成损害<sup>[2-4]</sup>,也可影响痛觉,如摄入酒精可以提高痛阈<sup>[5]</sup>,戒断后可诱发痛觉过敏<sup>[6]</sup>,且创伤、压力、伤害等可加强酒精成瘾戒断后诱发的痛觉过敏和痛情绪<sup>[7]</sup>。有关痛觉及其敏化的特性,已有大鼠光辐射热甩尾反应实验的时反应量-效关系(timed dose-response relationship, TDRR)分析报道<sup>[8-10]</sup>,但亚急性酒精中毒戒断对大鼠痛觉及其 TDRR 的影响尚未见报道。本文旨在通过建立亚急性酒精中毒模型,了解和分析亚急性酒精中毒戒断影响大鼠痛觉及其 TDRR 的特性,为进一步研究亚急性酒精中毒戒断影响大鼠痛觉的作用机制奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 动物与分组 取清洁级成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠 15 只,购自浙江省实验动物中心,SCXK(浙)2014-0001,体质量 180~200 g。饲养的明/暗周期为 12 h/12 h,自由饮食和饮水。大鼠按随机数字表进行随机分组,生理盐水组(saline group, NS 组)9 只,亚急性酒精中毒组(subacute alcoholism group, SA 组)6 只。

1.2 仪器与试剂 光辐射热测痛仪(LE 7106 Light Beam Analgesy-Meter, Panlab, USA)。无水乙醇(分析纯,天津福晨化学试剂厂)、生理盐水(扬州中宝制药有限公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 亚急性酒精中毒模型的建立 参考文献报道方法<sup>[11-12]</sup>,适应性喂养 1 周后,给予 SA 组大鼠 56%乙醇灌胃 10 d,剂量为 15 mL/kg(qd),NS 组大鼠给予等容量的生理盐水。

1.3.2 亚急性酒精中毒模型戒断的鉴定 每天观察和记录大鼠饮食、饮水、体质量、睡眠和活动等。停止灌胃酒精后,观察到大鼠出现打喷嚏、理毛增加、极易激怒、尾僵直、异常姿势等戒断症状,表明造模和戒断成功。

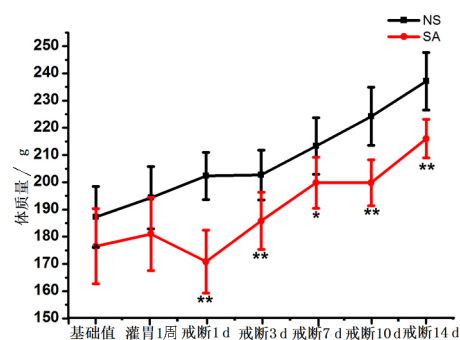
1.3.3 光辐射热甩尾反射检测 将大鼠固定,其尾部暴露并自然下垂,待动物安静 20 min 后,使用光辐射热测痛仪检测。照射相当于尾部中、后三分之一交界处的皮肤,照射启动时开始计时,当动物尾部出现明显逃避时所测得的时间间隔即为甩尾反射潜伏期(tail-flick latency, TFL)。除在造模前、造模 1 周检测 Focus = 23 的 TFL 外,还在酒精戒断 1 d、3 d、7 d、10 d、14 d 进行 TFL 的 TDRR 检测(Focus = 10、15、23、34、51、76)。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组比较时采用独立样本 *t*

检验,组内前后差异比较用配对 *t* 检验;光辐射热 TFL 的 TDRR 用重复测量双因素方差分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

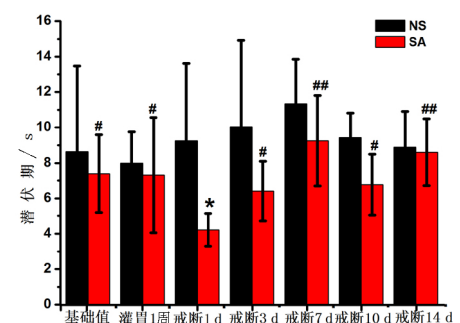
2.1 亚急性酒精中毒戒断对体质量的影响 基础值和灌胃 1 周的 NS 组大鼠与 SA 组大鼠的体质量相似(基础值: *t* = 1.584,灌胃 1 周: *t* = 1.992; *P* 均 > 0.05),而亚急性酒精中毒戒断期间,SA 组大鼠的体质量低于 NS 组大鼠(戒断 1 d: *t* = 6.045, *P* < 0.01;戒断 3 d: *t* = 3.282, *P* < 0.01;戒断 7 d: *t* = 2.616, *P* < 0.05;戒断 10 d: *t* = 4.696, *P* < 0.01;戒断 14 d: *t* = 4.261, *P* < 0.01),见图 1。



$\bar{x} \pm s$ , NS 组: *n* = 9, SA 组: *n* = 6。两组 *t* 检验: 与 NS 组相比, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01。

图 1 亚急性酒精中毒戒断对体质量的影响

2.2 亚急性酒精中毒戒断对 TFL 的影响 在进行亚急性酒精中毒和戒断过程中,检测光照强度 Focus 值为 23 时的 TFL 见图 2。结果显示,SA 组在戒断 1 天时 TFL 不仅较 NS 组缩短(*t* = 2.748, *P* < 0.05),且比造模前、造模 1 周亦缩短(基础值: *t* = 3.481, *P* < 0.05;灌胃 1 周: *t* = 2.648, *P* < 0.05),提示戒断时痛觉阈值下降,有痛觉敏化。但在戒断 3~14 d 逐渐恢复(戒断 3 d: *t* = 2.823, *P* < 0.05;戒断 7 d: *t* = 4.956, *P* < 0.01;戒断 10 d: *t* = 2.903, *P* < 0.05;戒断 14 d: *t* = 6.554, *P* < 0.01)。

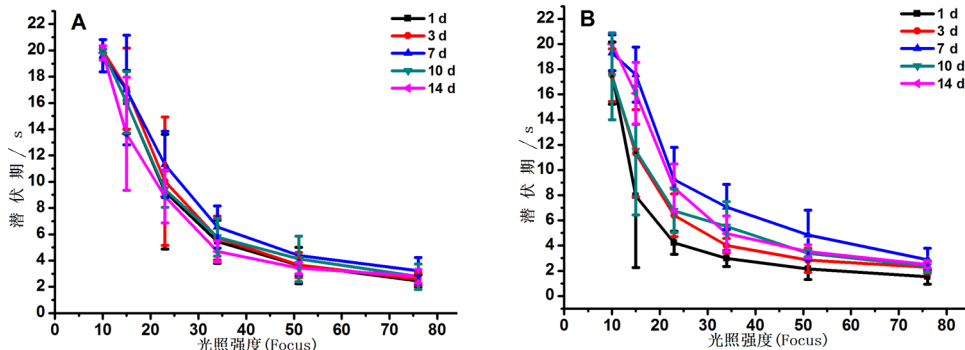


$\bar{x} \pm s$ , NS 组: *n* = 9, SA 组: *n* = 6; 两组 *t* 检验: 与 NS 组相比, \* *P* < 0.05; 配对 *t* 检验: 与戒断 1 d 相比, # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01。

图 2 光照强度 Focus 值为 23 时的甩尾反射潜伏期比较

2.3 亚急性酒精中毒戒断对痛觉 TDRR 的影响  
 在戒断期间 NS 组大鼠的 TFL 没有明显改变,但 SA 组大鼠的 TFL 在戒断第 1 天缩短,提示大鼠痛觉敏化,后大鼠 TFL 逐渐恢复(图 3)。经重复测量的双因素方差分析,光照强度因素( $F = 22.090$ )、组间因素( $F = 11.602$ )以及光照强度因素和组间因素的交互作用( $F = 8.628$ )均有统计学意义( $P < 0.01$ )。光

照强度间差异提示 TFL 与光照强度间存在 TDRR,而组间差异及其与光照强度因素的交互作用则显示了 SA 组与 NS 组的 TDRR 不同(图 3)特别是戒断 1 d 时 SA 组的 TDRR 曲线较 NS 组左移,提示了痛觉的敏化,而戒断 14 d 时两组 TDRR 曲线的几乎重合,提示了痛觉敏感性的恢复(图 4)。



$\bar{x} \pm s$ , NS 组:  $n = 9$ , SA 组:  $n = 6$  (重复测量的双因素方差分析:光照强度因素、组间因素以及光照强度因素与组间因素的交互作用均有统计学意义) ( $P < 0.01$ )。

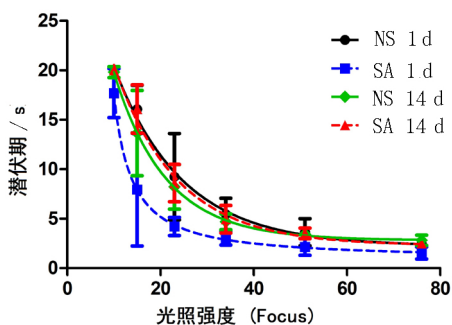
图 3 戒断期间 NS 组 (A) 和 SA 组 (B) 大鼠光辐射热尾反射潜伏期的 TDRR 比较

2.4 痛觉 TDRR 的曲线拟合分析 进一步对戒断 1 d 和 14 d 的 NS 组和 SA 组大鼠 TFL 的 TDRR 数据应用双曲线型四参数模型  $Y = c^{s+1} / (x-a)^s + b^{[9]}$  进行非线性拟合分析(图 4),拟合结果分别为,SA 组戒断 1 d:  $c = 8.156$ ,  $s = 1.147$ ,  $a = 5.649$ ,  $b = 0.9264$ ,  $R^2 = 0.8461$ ;相应的 NS 组:  $c = 1352$ ,  $s = 96.98$ ,  $a = -1403$ ,  $b = 2.217$ ,  $R^2 = 0.9011$ 。SA 组戒断 14 d:  $c = 1260$ ,  $s = 98.15$ ,  $a = -1306$ ,  $b = 2.289$ ,  $R^2 = 0.9541$ ;相应的 NS 组:  $c = 462.8$ ,  $s = 45.02$ ,  $a = 488.0$ ,  $b = 2.809$ ,  $R^2 = 0.9104$ 。提示其属于双曲线型的 TDRR,与 NS 组相比,亚急性酒精中毒戒断 1 d 时 SA 组 TDRR 曲线的曲度参数  $c$  减小而曲线左移,呈现痛觉阈值降低而敏化,戒断 14 d 时已恢复。

### 3 讨论

本研究采用 56% 酒精灌胃 10 d 的方法建立亚急性酒精中毒模型。停止酒精灌胃后(戒断),观察大鼠出现打喷嚏、理毛增加、极易激怒、尾僵直、异常姿势等戒断症状,显示造模成功。

在灌胃期间,SA 组与 NS 组大鼠体质量差异无统计学意义,表明 56% 酒精灌胃没有明显影响大鼠体质量增长;而停止酒精灌胃后,SA 组与 NS 组大鼠体质量有明显差异,表明酒精戒断对大鼠体质量增长有一定的抑制作用。本实验还观察到,亚急性酒精中毒大鼠戒断后出现烦躁不安等戒断症状,这与相关报道<sup>[13-14]</sup>的结果相一致。本研究表明,亚急性酒精中毒大鼠在戒断 1 d 时不仅单一光照强度 Focus 值为 23 时的 TFL 出现缩短,而且 TDRR 曲线也出现左移,提示痛觉敏化;而戒断 3~14 d 均逐渐恢复。谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)是脑内主要的兴奋性氨基酸,其参与突触兴奋传递、学习记忆形成,与多种神经变性疾病有关<sup>[15]</sup>。兴奋性氨基酸储存于突触前末梢内,以  $Ca^{2+}$  依赖方式释放作用于突触后膜兴奋性氨基酸受体而发挥其作用<sup>[16]</sup>。有研究表明,长期饮酒使兴奋性氨基酸受体(主要是 NMDA 受体)敏感性及其数目增加<sup>[17-18]</sup>。NMDA 受体被激活后,其通道开放,并通过一氧化氮合酶(NOS)促进大量 NO 产生,NO 又促进 NMDA 的活性,形成



$\bar{x} \pm s$ , NS 组:  $n = 9$ , SA 组:  $n = 6$ ; 图中实线和虚线分别为 NS 组和 SA 组数据的双曲线型四参数模型  $Y = c^{s+1} / (x-a)^s + b$  非线性拟合线。

图 4 戒断 1 d 和 14 d 两组大鼠光辐射热尾反射潜伏期的 TDRR 分析

正反馈,从而提高神经元的兴奋性,使疼痛中枢敏感化,伤害性刺激信号传入增强,导致痛觉过敏<sup>[19]</sup>。由此可见,酒精作用本身可抑制谷氨酸释放和受体功能,进而导致受体代偿性上调,一旦突然戒断酒精,酒精的抑制作用减弱而谷氨酸释放和受体敏感性升高,进而导致痛觉过敏。至于痛觉 TDRR 分析,表明了亚急性酒精中毒戒断 1 d 时 SA 组痛觉敏化的特性,即敏化不是 TDRR 曲线的平移,而是其曲度参数  $c^{[9]}$  减小而呈现曲线左移;同时还提示,这种敏化与光照强度有关,即伤害性刺激过弱或过强均不呈现敏化,可能提示了受体激活的阈刺激或饱和刺激特性,但其具体机制仍需进一步的研究。

**【参考文献】**

[1] 林兵,于永超,陈禹,等. 胶原多肽对亚急性酒精中毒大鼠的保护作用研究[J]. 中国食物与营养, 2015, 21( 2) : 69-72.

[2] 李兴伟,吴鉴明. 亚急性酒精中毒大鼠的学习记忆与海马 p-CREB 表达的相关性研究[J]. 皖南医学院学报, 2011, 30( 3) : 180-184.

[3] WILLIAM A, CARLEZON JR, DUMAN RS *et al.* The many faces of CREB[J]. Trends Neurosci, 2005, 28( 8) : 436-445.

[4] 王岚,王学义. 慢性酒精中毒导致学习记忆损害的机制[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2009, 35( 5) : 316-318.

[5] EDWARDS S, VENDRUSCOLO LF, SCHLOSBERG JE *et al.* Development of mechanical hypersensitivity in rats during heroin and ethanol dependence: alleviation by CRF( 1) receptor antagonism[J]. Neuropharmacology, 2012, 62( 2) : 1142-1151.

[6] SHURMAN J, KOOB GF, GUTSTEIN HB. Opioids, pain, the brain, and hyperkatifeia: a framework for the rational use of opioids for pain[J]. Pain Med, 2010, 11( 7) : 1092-1098.

[7] EGLI M, KOOB GF, EDWARDS S. Alcohol dependence as a chronic pain disorder[J]. Neurosci & Biobehav Rev, 2012, 36( 10) : 2179-2192.

[8] WANG MY, SUN RY. Review on timed dose-response relationship[J]. Chin Pharmacol Bull, 1987, 3( 2) : 111-114.

[9] WANG MY, SUN RY. Mathematical models for hyperbolic type of timed dose-response relationship of drugs[J]. Acta Pharmacol Sin, 1987, 8( 6) : 481-486.

[10] 余雪霏,张铭勋,方博文,等. 大鼠光辐射热尾试验的时反应量-效关系[J]. 皖南医学院学报, 2014, 33( 2) : 176-180.

[11] 杨丽丽,邓志钦,郑显著,等. 灵芝孢子粉对抗亚急性酒精性肝损伤的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24( 3) : 513-514.

[12] 阎月,葛蒙梁,王清娟,等. 自由基在亚急性酒精中毒中的损伤作用实验研究[J]. 营养学报, 1994, 16( 2) : 204-207.

[13] XIA JX, LI J, ZHOU R *et al.* Alterations of rat corticostriatal synaptic plasticity after chronic ethanol exposure and withdrawal[J]. Alcohol Clin & Exp Res, 2006, 30( 5) : 819-824.

[14] ERDEN BF, OZDEMIRCI S, YILDIRAN G *et al.* Dextromethorphan attenuates ethanol withdrawal syndrome in rats[J]. Pharmacol Biochem & Behav, 1999, 62( 3) : 537.

[15] 刘凤莲. 谷氨酸能神经递质传递系统研究进展[J]. 长春师范学院学报( 自然科学版), 2005, 24( 3) : 93-96.

[16] 杨庆华,崔松彪,姜海英,等. 酒精戒断对清醒大鼠海马 DG 区部分兴奋性氨基酸的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2006, 23( 4) : 459-461.

[17] KALLURI HS, MCTHTA AK, TICKU MK. UP-regulation of NMDA receptor subunit in rat brain following chronic ethanol treatment[J]. Mol Brain Res, 1998, 58( 1-2) : 221-224.

[18] 于海芙,吴光,崔松彪. 慢性酒精中毒及戒断对大鼠海马 NMDA 受体亚基 NR2B 表达的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2007, 33( 6) : 365-367.

[19] 蔡清香. NMDA 受体在瑞芬太尼急性耐受及痛觉过敏中的作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2010.