

# Analgesic Efficacy and Mechanism of Acupoint Injection of Neostigmine in a Rat Model of Joint Pain

Miao Zhang\*, Xuran Zhang

No. 3 Surgical Ward, Department of Orthopaedics, Fuxin Central Hospital, Fuxin Liaoning  
Email: zhangmiao197702@163.com

Received: Jan. 27<sup>th</sup>, 2016; accepted: Feb. 16<sup>th</sup>, 2016; published: Feb. 19<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

---

## Abstract

**Objective:** Neostigmine could provide peripheral analgesic effects via intra-articular injection, but with obvious technical difficulty and potential complications. The purpose of this study is to investigate the analgesic effect and mechanism of acupoint injection of neostigmine in a rat model of joint pain. **Methods:** Animal models of ankle joint pain were prepared via intra-articular injection of monosodium iodoacetate in male Wistar rats. The experimental group received acupoint injection of neostigmine while the control group received acupoint injection of normal saline. The numbers of hind paw licking and radiation pain threshold were recorded, and serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured using ELISA. **Results:** Compared with the control group, the animals in the experimental group presented less hind paw licking, higher radiation threshold and lower levels of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ). **Conclusion:** Acupoint injection of neostigmine elevated the radiation pain threshold and lowered the level of proinflammatory pain mediators, providing effective analgesia in the rat model of joint pain.

## Keywords

Neostigmine, Acupoint Injection, Joint Pain, Analgesia

---

# 新斯的明经穴位注射对大鼠关节疼痛的镇痛作用及机制研究

张 淼\*, 张旭然

\*通讯作者。

阜新市中心医院骨三科, 辽宁 阜新  
Email: zhangmiao197702@163.com

收稿日期: 2016年1月27日; 录用日期: 2016年2月16日; 发布日期: 2016年2月19日

## 摘要

**目的:** 新斯的明可经关节腔注射发挥外周镇痛作用, 但关节注射存在技术难度和并发症风险。本研究目的为制备大鼠关节疼痛动物模型, 经穴位注射新斯的明, 分析镇痛效果及作用机制, 为新斯的明外周注射治疗关节疼痛的临床应用提供临床前研究依据。**方法:** 采用雄性Wistar大鼠经踝关节注射单碘醋酸钠生理盐水溶液制备关节疼痛模型, 经行为学观察及痛阈测量确认模型制备成功。实验组经后三里穴位注射新斯的明, 对照组注射等体积生理盐水。注射后测量两组实验动物舔足次数和热辐射痛阈, 取血清样本测量前炎症因子白介素1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )水平。**结果:** 与对照组相比, 实验组动物经穴位新斯的明注射后的舔足次数减少, 热辐射痛阈提高, 血清IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平降低, 两组间上述指标结果差异具有统计学意义( $p < 0.01$ )。**结论:** 研究表明经穴位于关节周围注射新斯的明, 可提高关节疼痛实验动物热辐射痛阈, 降低体内前炎症因子表达水平, 产生镇痛作用。

## 关键词

新斯的明, 穴位注射, 关节疼痛, 镇痛

## 1. 引言

四肢关节疼痛是骨外科临床常见症状, 在退变性骨关节疾病高发的中老年患者群体中发病率高, 可导致严重运动功能障碍, 是导致老年致残、失去自主生活能力的重要原因。对疼痛严重的关节病变终末期患者一般需行人工关节置换手术治疗, 费用高且损伤大, 术中术后危及生命的并发症多[1]。但是, 患者如疼痛控制良好, 则可能避免接受手术治疗。

当前临床主要应用的镇痛方式为口服非甾体类抗炎药或阿片类药物, 非甾体类抗炎药长期应用后患者不良反应发生率高, 包括危及生命的并发症如严重胃肠道溃疡、心血管疾病、凝血功能障碍等, 阿片类药物虽然相对安全, 但患者严重恶心、呕吐及便秘发生率高, 一般无法耐受[2] [3]。

新斯的明作为经典的人工合成胆碱酯酶抑制剂, 既往主要用于治疗重症肌无力及麻醉术后拮抗非去极化肌松药物, 但已有研究指出新斯的明分别可在中枢神经系统及外周组织内发挥镇痛作用, 给药方式包括经硬膜外隙和经关节腔注射, 但是两种给药方式临床应用均存在一定技术难度和并发症风险[4]-[7]。此外, 外周注射药物的作用机制不同于中枢神经系统内给药的作用方式, 目前对新斯的明不同给药方式的镇痛机制仍有待在今后研究中进一步阐明。本研究目的为制备大鼠关节疼痛动物模型, 经穴位注射新斯的明, 分析经穴位注射的镇痛效果及作用机制, 为新斯的明外周注射治疗关节疼痛的临床应用提供临床前基础研究依据。

## 2. 资料与方法

### 2.1. 动物和试剂

实验动物为雄性 Wistar 大鼠 20 只, 体重(200  $\pm$  20)克, 随机分为实验组(10 只)和对照组(10 只), 由中国医科大学实验动物中心提供, 动物实验前全部实验方案均经所在单位科研主管部门伦理委员会审批

通过。实验试剂包括：单碘醋酸钠(Sigma, USA)，甲硫酸新斯的明注射液(润弘制药，河南)，血清白介素1-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )ELISA 检测试剂盒(R&D, USA)。

## 2.2. 关节疼痛动物模型的制备

正式实验开始第1天时，两组实验动物均采用10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射进行麻醉。麻醉成功后，取左侧卧位，70%酒精将右侧足底及外踝区域消毒。采用单碘醋酸钠生理盐水溶液(60 mg/mL)在实验组和对照组大鼠后足垫部位进针穿刺、向踝关节方向注射，剂量60  $\mu$ L/只。实验后24小时，观察动物出现活动减少、三足跛行，右踝关节红肿，提示关节疼痛模型制备成功，可进一步行痛阈测量、药物注射及血清学检测(实验流程见图1)。

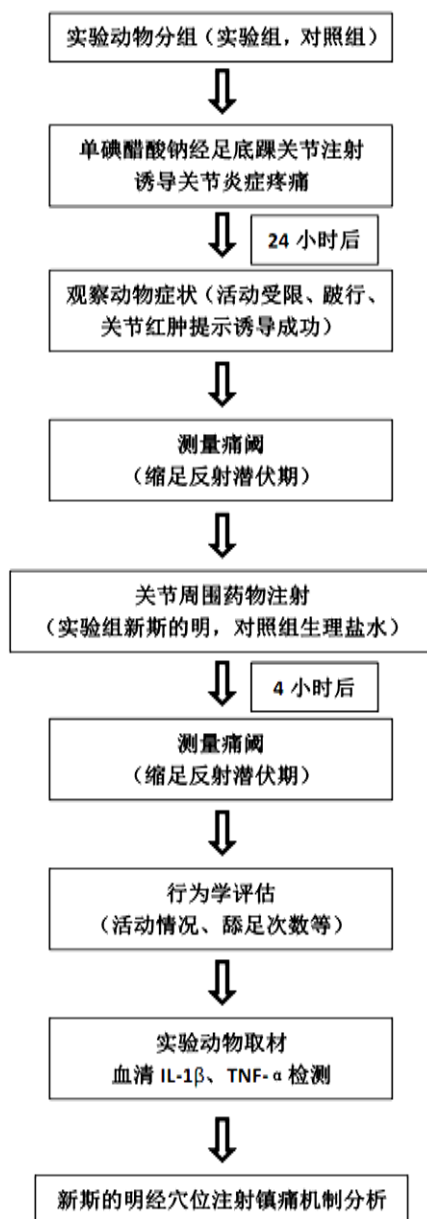


Figure 1. Flow chart of experimental process  
图 1. 实验流程图

### 2.3. 经穴位给药前痛阈测量

采用辐射热测痛仪(IITC INC., Life Science Instrument, USA)测量大鼠注射侧肢体痛阈, 测试中于室温下将大鼠置于热辐射仪专用容器内, 静置 15 分钟后, 以强光照射踝关节模拟热损伤, 以大鼠的缩爪反射潜伏期为观察指标, 以左右两侧踝关节的潜伏期差值为痛敏分数, 辐射热温度设置为 42℃, 加热上限 20 秒以避免热损伤。测试部位为右后肢足垫中央皮肤, 测试指标为辐射热照射开始至大鼠出现缩腿反应的潜伏期并记录, 共测 3 次, 每次间隔 5 min, 取 3 次测定平均值作为测定结果, 评估实验组和对照组动物测量结果是否存在统计学差异。

### 2.4. 经穴位药物注射

再次以前述方法麻醉动物, 并以 70%酒精消毒将膝关节以下区域消毒, 进行关节周围药物注射。注射部位选取大鼠后三里穴(对应人体足三里穴), 位于膝关节后外侧, 腓骨小头下方约 5 mm 处, 局部解剖位置在胫、腓骨间隙中, 深度应达肌筋膜层(图 2)。实验组关节周围注射的药物为新斯的明注射液(50 μg/kg); 对照组关节周围注射安慰剂为与实验组等体积生理盐水。

### 2.5. 经穴位给药后的动物疼痛行为学和痛阈测量

药物注射后 4 小时, 记录 30 分钟内实验组和对照组大鼠舔咬右后肢次数, 记录后, 再次采用辐射热测痛仪测量大鼠注射侧肢体痛阈, 方法同前述。

### 2.6. 血清炎症因子检测

痛阈测量结束后, 断头处死大鼠, 5 mL 离心管收集全血, 3000 转 4 度离心 10 分钟后, 取上清后分别置于 1.5 mL 容积 EP 管中, 置于冰上保存, 采用 ELISA 法进行检测血清白介素 1-1β (IL-1β)和肿瘤坏死因子-α (TNF-α)水平。

### 2.7. 统计分析

所有数据以均数 ± 标准差( $X \pm s$ )表示, SPSS13.0 软件进行统计分析, 采用 t 检验比较实验组与对照组舔足次数、痛阈测量值及血清炎症因子水平,  $p < 0.05$  认为结果差异有统计学意义。

## 3. 结果

### 3.1. 模型制备和行为学观察

实验组和对照组动物在踝关节内单碘醋酸钠生理盐水溶液注射后, 均出现明确活动减少、三足跛行及右踝关节红肿症状, 提示关节疼痛模型制备成功。药物注射后 4 小时两组动物比较, 实验组舔足次数为  $12.0 \pm 2.54$ , 对照组为  $34.5 \pm 4.11$ , 实验组动物疼痛相关舔足次数低于对照组( $P < 0.01$ ) (表 1)。

### 3.2. 痛阈测量

经穴位给药前, 两组大鼠痛阈测量结果为实验组  $9.63 \pm 0.76$  s, 对照组  $9.51 \pm 0.73$  s, 经穴位给药后第二次测量中, 实验组大鼠痛阈测量结果为  $6.71 \pm 0.29$  s, 对照组结果为  $4.37 \pm 0.45$  s (表 2), 结果提示新斯的明注射后提高了实验组大鼠的热辐射痛阈( $P < 0.01$ )。

### 3.3. 血清炎症因子水平

在血清炎症因子检测结果中(表 3), 对照组大鼠相比, 实验组接受阿片类药物局部注射的大鼠血清白介素 1-1 (IL-1β)和肿瘤坏死因子-α (TNF-α)水平为: IL-1β 含量实验组  $109.623 \pm 7.327$  pg/ml, 对照组



**Figure 2.** Illustration of acupoint injection in the mouse hindlimb  
**图 2.** 穴位注射示意图

**Table 1.** Paw-licking behaviors in the experimental and control group  
**表 1.** 实验组和对照组大鼠舔足次数 ( $\bar{X} \pm s$ , 次/30min)

分组	每组样本量	0~30 min 舔足次数
实验组(新斯的明注射)	n = 10	12.0 ± 2.54
对照组(生理盐水注射)	n = 10	34.5 ± 4.11*

注: \*与实验组比较,  $P < 0.01$ 。

**Table 2.** Pain radiation threshold in the experimental and control group  
**表 2.** 实验组和对照组大鼠不同时间痛阈变化比较 ( $\bar{X} \pm s$ , s)

分组	每组样本量	第一次测量	第二次测量
实验组	n = 10	9.63 ± 0.76	6.71 ± 0.29
对照组	n = 10	9.51 ± 0.73	4.37 ± 0.45*

注: \*与实验组比较,  $P < 0.01$ 。

**Table 3.** The level of serum IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the experimental and control group  
**表 3.** 实验组和对照组大鼠血清白介素 1 $\beta$  和肿瘤坏死因子- $\alpha$  比较 ( $\bar{X} \pm s$ )

分组	IL-1 $\beta$ (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (ng/ml)
实验组	109.623 ± 7.327	0.811 ± 0.062
对照组	138.413 ± 9.545*	1.419 ± 0.067*

注: \*与实验组比较,  $P < 0.01$ 。

138.413 ± 9.545 pg/ml, 实验组较对照组含量显著降低( $P < 0.01$ ); TNF- $\alpha$  含量实验组 0.811 ± 0.062 ng/ml, 对照组为 1.419 ± 0.067ng/ml, 实验组较对照组含量显著降低( $P < 0.01$ )。

#### 4. 讨论

临床上关节疼痛的镇痛治疗以药物口服为主, 但近年来已有越来越多临床研究开始重视利用外周局部药物注射途径给药进行四肢关节镇痛, 常用注射药物一般为局部麻醉药物和激素类药物配伍阿片类药物及非甾体类抗炎药, 常用给药途径为关节腔内配合关节周围注射[2]。外周注射一方面可反复长期应用, 另一方面有助于减少全身用药不良反应, 避免口服或注射非甾体类药物可能导致的消化系统和心血管系

统并发症。但是亦有研究指出, 局部麻醉药物或激素类药物可导致软骨细胞毒性及肌肉骨骼干细胞毒性问题, 因此并不适合经关节腔或关节周围给药[8] [9], 仍需进一步寻找适合的药物用于外周注射关节镇痛。

针刺作为中医传统治疗手段, 在临床上对四肢关节疼痛治疗有长时间应用, 目前研究认为针刺具有镇痛、抗炎及免疫调节作用, 在动物实验研究中认为大鼠后三里穴位对应人体足三里穴位, 局部刺激穴位可降低关节液中前炎症因子表达水平并抑制软骨细胞凋亡[10]-[12]。穴位注射是针刺与药物结合的治疗方式, 是临床上治疗关节炎症疼痛的常用方法。与关节腔内注射相比, 穴位注射技术难度低, 重复性好, 无半月板和关节软骨穿刺损伤及关节感染风险。

既往研究曾指出新斯的明具有良好的中枢和外周镇痛作用, 与局部麻醉药及阿片类药物等联合应用时可发挥协同镇痛效应[13]。新斯的明中枢镇痛时以硬膜外给药为主, 不适合作为关节疼痛的治疗手段, 外周给药时新斯的明可产生抗伤害性作用, 临床研究中以关节腔内给药为主。既往研究指出关节腔内新斯的明注射对关节镜下半月板切除患者术后疼痛有效[6] [7]。目前认为其作用机制为与外周乙酰胆碱酯酶结合, 增加内源性乙酰胆碱水平, 降低细胞内 cAMP 水平, 进而发挥镇痛作用[13]。

单碘醋酸钠生理盐水注射液可用于建立大鼠等膝关节骨性关节炎动物模型[14], 但在造模过程中因实验动物小, 膝关节给药困难, 本研究选择踝关节注射, 使注射操作简便易行, 同时保证在动物模型中良好复制临床关节炎症的疼痛症状, 尚未有相关报道。此外, 研究中选择大鼠足三里穴位作为注射部位, 给药方便, 重复性良好, 尚无报道上述实验技术在新斯的明外周镇痛作用机制研究中的应用。

本研究提示经穴位于关节周围注射新斯的明, 可对实验大鼠关节疼痛产生良好的镇痛作用, 减少大鼠单位时间内舔足次数, 提高痛阈水平。血清学研究结果指出, 外周注射新斯的明可减少血清中白介素 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, 即通过调节疼痛相关炎症因子水平发挥镇痛作用。由于两种前炎症因子在体内作用具有多层次多靶点的复杂特点, 可进一步利用本动物模型对其明确作用机制进行深入研究, 为临床开发适合长期应用且无严重不良反应的关节镇痛治疗方法提供理论和实验基础。

## 参考文献 (References)

- [1] Maheshwari, A.V., Blum, Y.C., Shekhar, L., *et al.* (2009) Multimodal Pain Management after Total Hip and Knee Arthroplasty at the Ranawat Orthopaedic Center. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **467**, 1418-1423. <http://dx.doi.org/10.1007/s11999-009-0728-7>
- [2] Zhang, M., Zhang, X.R. and Sun, Y. (2015) Articular Injection of Opioids for Postoperative Pain Management of Knee Arthroplasty: Current Status and Progress. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, **19**, 6037-6041.
- [3] Richmond, C.E., Bromley, L.M. and Woolf, C.J. (1993) Preoperative Morphine Pre-Empts Postoperative Pain. *Lancet*, **342**, 73-75. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)91284-S](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)91284-S)
- [4] Naguib, M. and Yaksh, T.L. (1997) Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes That Mediate Antinociception in the Rat Spinal Cord. *Anesthesia and Analgesia*, **85**, 847-853.
- [5] Lauretti, G.R., Reis, M.P., Prado, W.A. and Klamt, J.G. (1996) Dose-Response Study of Intrathecal Morphine versus Intrathecal Neostigmine, Their Combination, or Placebo for Postoperative Analgesia in Patients Undergoing Anterior and Posterior Vaginoplasty. *Anesthesia and Analgesia*, **82**, 1182-1187.
- [6] Yang, L.C., Chen, L.M., Wang, C.J. and Buerkle, H. (1998) Postoperative Analgesia by Intra-Articular Neostigmine in Patients Undergoing Knee Arthroscopy. *Anesthesiology*, **88**, 334-339. <http://dx.doi.org/10.1097/00000542-199802000-00010>
- [7] 张立贤, 樊碧发, 张亚军. 关节镜术后关节腔和硬膜外隙注射新斯的明镇痛的临床研究[J]. 中国疼痛医学杂志, 2004, 10(2): 123-124.
- [8] Lo, I.K., Sciore, P., Chung, M., *et al.* (2009) Local Anesthetics Induce Chondrocyte Death in Bovine Articular Cartilage Disks in A Dose- and Duration-Dependent Manner. *Arthroscopy*, **25**, 707-715. <http://dx.doi.org/10.1097/00000542-199802000-00010>
- [9] Gungor, I., Yilmaz, A., Ozturk, A.M., *et al.* (2014) Bupivacaine and Levobupivacaine Induce Apoptosis in Rat Chondrocyte Cell Cultures at Ultra-Low Doses. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, **24**, 291-295. <http://dx.doi.org/10.1007/s00590-013-1202-5>

- [10] 李辉, 李晓泓, 张露芬. 电针“大椎”“命门”对佐剂性关节炎大鼠抗炎及免疫调节反应的影响[J]. 针刺研究, 2009, 34(4): 225-229.
- [11] 黄猛, 谢英元, 丁光宏. 穴位注射组胺在急性佐剂性关节炎大鼠上引起的镇痛效应[J]. 针刺研究, 2010(35): 99-103.
- [12] 包飞, 孙华, 吴志宏, 等. 针刺对膝骨关节炎大鼠软骨基质金属蛋白酶及其抑制剂表达的影响[J]. 中国针灸, 2011, 31(3): 241-246.
- [13] 侯景栋, 张宝娟, 段世明. 新斯的明用于术后镇痛[J]. 国外医学(麻醉学与复苏分册), 2001, 22(2): 119-122.
- [14] Kim, J.K., Kim, T.H., Park, S.W., *et al.* (2010) Protective Effects of Human Placenta Extract on Cartilage Degradation in Experimental Osteoarthritis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **33**, 1004-1010.  
<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.33.1004>