

大鼠酒精依赖或戒断后对丙泊酚半数有效剂量的影响

张莉^{1*}, 谭华², 罗晨禹³, 刘英海³, 巩固³, 吴畏^{1,3#} (1.西南医科大学临床医学院, 四川泸州 646000; 2.成都市妇女儿童中心医院麻醉科, 成都 610000; 3.中国人民解放军成都总医院麻醉科, 成都 610083)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)09-1227-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.09.18

摘要 目的: 确定酒精依赖或戒断模型大鼠单次静脉注射丙泊酚的半数有效剂量(ED_{50}), 观察2倍 ED_{50} 丙泊酚对其的麻醉效果。方法: 取50只SD大鼠根据乙醇消耗量是否大于 $3.0\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 分为饮酒组($n=23$)和对照组($n=27$), 饮酒组大鼠持续自由间断饮用乙醇建立酒精依赖模型, 对照组大鼠只给予饮用水进行乙醇洗脱, 2组大鼠各随机选取16只采用序贯法确定单次静脉注射丙泊酚的 ED_{50} , 首剂量为 $6.02\text{ mg}/\text{kg}$; 洗脱1周后, 选取撤离乙醇24 h出现酒精戒断表现的饮酒组大鼠纳入酒精戒断模型, 同法确定酒精戒断组和对照组大鼠的丙泊酚 ED_{50} ; 洗脱1周后, 观察酒精依赖组、酒精戒断组和对照组大鼠单次静脉注射2倍 ED_{50} 剂量丙泊酚的麻醉效果[前爪翻正反射(FRR)消失时间、FRR复现时间和活动完全恢复时间]及其对应时间点和给药前的呼吸频率, 考察给药后48 h的肝功能指标(血清白蛋白、丙氨酸转氨酶、总胆红素、 γ 谷氨酰转氨酶)和肝组织形态学变化, 每组10只。结果: 酒精依赖模型大鼠丙泊酚的 ED_{50} 为 $9.563\text{ mg}/\text{kg}$, 大于对照组的 $5.623\text{ mg}/\text{kg}$; 酒精戒断模型大鼠丙泊酚的 ED_{50} 为 $4.086\text{ mg}/\text{kg}$, 小于对照组的 $5.297\text{ mg}/\text{kg}$; 与对照组比较, 酒精依赖组和酒精戒断组大鼠的FRR复现时间均明显延长($P<0.05$), FRR消失时间和活动完全恢复时间差异无统计学意义($P>0.05$), FRR消失时的呼吸频率均小于注射丙泊酚前、FRR复现时和活动完全恢复时($P<0.01$)。注射2倍 ED_{50} 剂量丙泊酚后, 酒精依赖组和酒精戒断组FRR复现时间均长于对照组($P<0.05$), 且酒精依赖组FRR复现时间长于酒精戒断组($P<0.05$); 酒精依赖组大鼠活动完全恢复时间长于对照组和酒精戒断组($P<0.05$); 3组大鼠FRR消失时的呼吸频率均小于注射丙泊酚前、FRR复现时和活动完全恢复时($P<0.01$), 3组大鼠肝功能指标和肝组织形态学变化无明显差异。结论: 大鼠酒精依赖后丙泊酚 ED_{50} 增加, 酒精戒断后 ED_{50} 减小, 2倍 ED_{50} 剂量丙泊酚对其肝功能无明显毒性。

关键词 序贯法; 丙泊酚; 酒精依赖; 酒精戒断; 半数有效剂量; 大鼠

Effects of Alcohol Dependence or Withdrawal on Median Effective Dose of Propofol in Rats

ZHANG Li¹, TAN Hua², LUO Chenyu³, LIU Yinghai³, GONG Gu³, WU Wei^{1,3} (1.College of Clinical Medicine, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2.Dept. of Anesthesiology, Chengdu Women & Children's Central Hospital, Chengdu 610000, China; 3.Dept. of Anesthesiology, Chengdu General Hospital of PLA, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To determine the median effective dose (ED_{50}) of propofol with single intravenous injection in alcohol dependence or withdrawal model rats, and to observe the anaesthetic effect of 2-fold ED_{50} propofol. **METHODS:** Fifty SD rats were divided into drinking group ($n=23$) and control group ($n=27$) based on whether the consumption of alcohol was greater than $3.0\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$. Drinking group continued to drink freely and intermittently to establish alcohol dependence model. Control group was only given drinking water for ethanol elution. 16 rats were randomly selected from each group to determine ED_{50} of propofol with single intravenous injection by sequential method, and initial dose was $6.02\text{ mg}/\text{kg}$. After eluting for a week, alcohol dependence rats stopped drinking for 24 hours and had alcohol withdrawal symptoms to establish alcohol withdrawal model. ED_{50} of propofol in alcohol withdrawal group and control group were determined with same method. After eluting for a week, anaesthetic effect [disappearance time and reappearance time of forepaw righting reflex (FRR), time of activity complete recovery] of 2-fold ED_{50} propofol with single intravenous injection were observed in alcohol dependence group, alcohol withdrawal group and control group, and corresponding time point and the frequency of respiration before administration were also observed. Changes of liver function indexes (serum albumin, alanine transaminase, total bilirubin, γ glutamyl transaminopeptidase) and liver histomorphology were observed 48 h after medication, 10 in each group. **RESULTS:** ED_{50} of propofol in alcohol dependence model rats was $9.563\text{ mg}/\text{kg}$, which was higher than $5.623\text{ mg}/\text{kg}$ of control group. ED_{50} of propofol in alcohol withdrawal model rats was $4.086\text{ mg}/\text{kg}$, which was lower than $5.297\text{ mg}/\text{kg}$ of control group. Compared with control group, reappearance time of FRR was prolonged significantly in alcohol dependence group and alcohol withdrawal group ($P<0.05$). There was no statistical significance in

* 硕士研究生。研究方向: 临床麻醉学。电话: 028-86590360。
E-mail: 53099744@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 临床麻醉学。电话: 028-86570423。E-mail: wuweijz@163.com

disappearance time of FRR or activity complete recovery time ($P>0.05$). The frequency of respiration during FRR disappearance was lower than before propofol injection, FRR reappearance and activity complete recovery ($P<0.01$). After

intravenous injection of 2-fold ED_{50} propofol, reappearance time of FRR in alcohol dependence group and alcohol withdrawal group were longer than control group ($P<0.05$); the alcohol dependence group was longer than the alcohol withdrawal group ($P<0.05$). The time of activity complete recovery in alcohol dependence group was longer than control group and alcohol withdrawal group ($P<0.05$). The frequency of respiration in 3 groups during FRR disappearance were all lower than before propofol injection, FRR reappearance and activity complete recovery ($P<0.01$). There was no significant difference in the change of liver function indexes or liver histomorphology. CONCLUSIONS: ED_{50} of propofol is increased in alcohol dependence rats, while ED_{50} of propofol is decreased in alcohol withdrawal rats. 2-fold ED_{50} of propofol has no significant toxicity to liver function.

KEYWORDS Sequential method; Propofol; Alcohol dependence; Alcohol withdrawal; Median effective dose; Rat

近年来,酒精滥用及其危害日益严重。世界卫生组织发表的《2014年酒精与健康全球状况报告》显示,2012年全世界有害使用酒精导致的死亡人数超过330万,可能导致200多种疾病的发生和酒精依赖^[1]。长期饮酒会改变中枢神经系统正常功能,最终产生对酒精的依赖。酒精依赖者若中断酒精的补给,可能诱发严重的酒精戒断综合症(Alcohol withdrawal syndrome, AWS)。长期饮酒者会对巴比妥产生交叉耐受^[2],急性酒精摄入影响苯二氮草类药物代谢^[3],而酒精对其他麻醉药物的影响以及酒精戒断者对静脉全身麻醉药物的反应,目前缺乏系统的研究,导致这类患者需要使用麻醉药物时,临床医师无法准确判断药物的剂量,而使麻醉风险大幅度增加。

丙泊酚是临床上现作用于中枢神经系统最短效的静脉麻醉药物,其起效迅速、作用时间短、持续输注无蓄积,停药后苏醒快、无精神症状,故被广泛用于麻醉诱导和维持术后镇静及门诊短小手术麻醉,小儿乃至老年患者都适用^[4]。但丙泊酚对酒精依赖及酒精戒断患者进行麻醉是否安全,缺乏详细的数据资料。故本研究通过复制酒精依赖和酒精戒断大鼠模型,测定模型大鼠静脉注射丙泊酚的半数有效剂量(ED_{50}),用以评估临床上对酒精依赖和酒精戒断手术患者实施麻醉时丙泊酚的用药剂量,为临床麻醉工作提供参考依据,提高麻醉的安全性。

1 材料

1.1 仪器

AU2700全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司);CX21生物显微镜(日本Olympus公司);Epoch酶学检测仪(美国BioTek公司);DY89-11电动玻璃匀浆器(宁波新芝生物科技股份有限公司);Neofuge 15R台式高速冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司)。

1.2 药品与试剂

丙泊酚注射液(江苏恩华药业股份有限公司,批号:G0280,规格:200 mg:20 mL);乙醇(东莞市乔科化学有限公司,批号:20161002,纯度:95%);G1120 HE染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 动物

50只6周龄健康SD封闭群大鼠,♂,体质量160~200 g,购于成都达硕实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(川)2012-0001。

2 方法与结果

2.1 建模与分组

2.1.1 酒精依赖模型 参照研究^[5-6]报道的方法,取50只大鼠以6%乙醇(V/V,下同)水溶液作为唯一水源,24 h自由饮水进食,饲养8周。于第9周将大鼠单只独笼饲养,进行两瓶水[1瓶饮用水/1瓶20%乙醇混合溶液]自由间断饮用(星期一、三、五给予饮用水和20%乙醇水溶液,星期二、四、日只给予饮用水或20%乙醇混合溶液中的一种),记录每只大鼠每日乙醇消耗量,连续观察测试1周,以大鼠平均乙醇摄入量为3.0 g/(kg·d)为标准,乙醇摄入量大于3.0 g/kg(高水平乙醇消耗)的大鼠纳入饮酒组,继续单只单笼饲养,两瓶水自由间断饮用;其余大鼠纳入对照组,只给予饮用水,进行酒精洗脱。于第16周,观察饮酒组大鼠仍维持高水平乙醇消耗并将大鼠逐只放入规格为100 cm×50 cm×60 cm、底部描有等分8格底纹的敞口箱,记录5 min内大鼠爬过的格子数和站立次数。与对照组比较,饮酒组大鼠在饮酒(饮用20%乙醇混合溶液)期间和停止饮酒后2、24 h时的站立次数分别减少74.02%、72.95%、51.35%,5 min内爬过的格子数分别减少71.10%、65.15%、47.05%,两组比较差异具有统计学意义($P<0.05$),表明饮酒组大鼠出现饮酒后行为学改变,提示酒精依赖模型建立成功,纳入酒精依赖组。从酒精依赖组和对照组大鼠中随机各选取16只,确定其单次静脉注射丙泊酚的 ED_{50} ,实验后按饮酒组和对照组饮水方案进行药物洗脱1周。

2.1.2 酒精戒断模型 “2.1.1”项下药物洗脱后(即第17周),观察饮酒组大鼠撤除乙醇后0、2、24 h的行为体征,参照改良柳田知司评分表^[7]进行酒精戒断评分,结果显示,饮酒组大鼠3个时间点的酒精戒断评分分别为3.89、10.44、9.01,而对照组大鼠3个时间点的酒精戒断评分分别为3.48、3.61、3.43,可见饮酒组大鼠撤离乙醇后2、24 h的酒精戒断评分明显高于对照组($P<0.05$),提示饮酒组大鼠的酒精戒断模型建立成功,纳入酒精戒断组。从酒精戒断组和对照组大鼠中随机各选取16只,确定其单次静脉注射丙泊酚的 ED_{50} ,实验后按“2.1.1”项下方法进行药物洗脱1周。改良柳田知司评分见表1。

2.2 药物 ED_{50} 的确定

2.2.1 实验方法 大鼠单次尾静脉注射丙泊酚,以前爪翻正反射(Forepaw righting reflex, FRR)消失作为麻醉

表1 改良柳田知司评分表

Tab 1 Improved Liutianzhishi score table scale

体征	评分
刻板行为 ^a	1分:出现1种刻板行为 2分:出现2种刻板行为 3分:出现3种刻板行为 4分:出现4种刻板行为 5分:出现5种刻板行为
激惹性	1分:轻微或中等激惹 2分:极易激惹 3分:接触时叫或中等攻击性 4分:接触时叫或极具攻击性 5分:自发性叫或极具攻击性
尾巴强直	1分:轻度尾巴强直 2分:中度尾巴强直 3分:尾巴强直但行走时具有轻度弹性 4分:尾巴强直且行走时有弹性 5分:尾巴极度强直且行走时无弹性
异常姿势	1分:轻微低头拱背 2分:中度低头拱背 3分:显著低头拱背 4分:低头拱背加后肢分开 5分:低头拱背加前肢分开

注:“a”指刻板行为包括理毛、打喷嚏、摇头、叫、咀嚼5种

Note: “a” stereotyped behavior include grooming, sneezing, shaking head, shouting, chewing

有效(阳性)的标准,反之则认为麻醉无效(阴性)。依照改良序贯法^[8]:相邻组别剂量按等比数级设置,组间比例设为1.2:1,已有研究报道静脉麻醉时丙泊酚的ED₅₀为6.02 mg/kg^[9],本研究以此作为首剂量进行序贯,下一只大鼠实验所需剂量根据上一只大鼠的反应结果确定,若前一只大鼠反应表现为阴性则后一只大鼠采用相邻的高剂量,若反应表现为阳性则采用相邻的低剂量,重复该过程,直至出现6次阳性-阴性转折交叉点,终止序贯。实验纳入计算的动物数(n),从第1次出现阳性-阴性或阴性-阳性转折交叉点的第1只大鼠开始计算。

2.2.2 计算方法 采用Dixon-Mood法^[8]计算各组大鼠单次尾静脉注射丙泊酚后FRR消失即麻醉有效时的ED₅₀及ED₅₀的95%置信区间(CI)。计算公式如下:

$$ED_{50} \text{的对数值: } \lg ED_{50} = \sum_{i=1}^n ix / \sum_{i=1}^n i \dots\dots\dots (1)$$

$$ED_{50} \text{对数值的标准误: } SE_{\lg ED_{50}} = d \sqrt{\sum_{i=2}^n \frac{p(1-p)}{i-1}} \dots (2)$$

$$ED_{50} \text{的95\% CI对数值: } (\lg ED_{50} - 1.96 \times SE_{\lg ED_{50}}, \lg ED_{50} + 1.96 \times SE_{\lg ED_{50}}) \dots\dots\dots (3)$$

式中,x为给药剂量,n为纳入动物数,p为阳性率,d为两相邻剂量对数的差值。最后取反对数即求得ED₅₀以及ED₅₀的95%CI。

2.3 观察指标

2.3.1 一般情况 实验全程记录大鼠一般情况,每日乙醇消耗量,每周固定时间对大鼠称体质量。

2.3.2 安全性指标 记录各组大鼠注射ED₅₀剂量和2倍

ED₅₀剂量丙泊酚的不良反应,记录注射丙泊酚前(T₁)、FRR消失时(T₂)、FRR复现时(T₃)、活动完全恢复时(T₄)4个时间点的呼吸频率。

2.3.3 麻醉效果指标 记录各组大鼠FRR消失时间即麻醉起效时间,为药物注射完毕至FRR消失的时间;FRR复现时间即麻醉苏醒时间,为FRR消失至FRR再度出现的时间;活动完全恢复时间即麻醉完全恢复时间,为FRR消失至活动恢复正常的时间。

2.4 2倍ED₅₀剂量丙泊酚的大鼠实验

取“2.1”项下酒精依赖组、酒精戒断组、对照组大鼠,各10只,根据上述结果,以各组大鼠丙泊酚ED₅₀的2倍为给药剂量,单次静脉注射丙泊酚,给药48h后尾静脉取血,腹腔注射0.4%水合氯醛,处死,分离肝组织。观察3组大鼠给药前和给药后48h的平均进食量和体质量变化;采用全自动生化分析仪检测给药后48h血清白蛋白(ALB)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(T-BIL)、γ-谷氨酰转氨酶(γ-GT)水平;使用生物显微镜观察给药后48h肝组织的病理学变化。

2.5 统计学方法

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两个样本均数比较采用独立样本t检验,多个样本均数比较采用单因素方差分析,重复测量资料采用重复测量方差分析,两两比较使用LSD检验。当P<0.05时表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 体质量和乙醇消耗量

实验过程中,大鼠体质量整体平稳增长。饮酒组大鼠共23只,对照组大鼠27只,两组大鼠实验第16、17、18周时的平均体质量比较差异均无统计学意义(P>0.05)。强制饮酒期间(前8周),大鼠平均每日消耗6%乙醇水溶液113.34 mL/kg,换算为乙醇消耗量为6.01 g/(kg·d)。分组后第1周(实验第9周),饮酒组大鼠乙醇消耗量维持在3.05 g/(kg·d)左右,4周(实验第13周)后乙醇消耗量逐渐上升且维持在4.00 g/(kg·d)以上。实验第16、17、18周时大鼠平均乙醇消耗量为4.15、4.23、4.17 g/(kg·d),这3周的大鼠乙醇消耗量比较差异无统计学意义(P>0.05)。两组大鼠第16、17、18周的体质量结果见表2。

表2 饮酒组与对照组大鼠第16、17、18周的体质量结果($\bar{x} \pm s, g$)

Tab 2 Results of body weight of rats in drinking group and control group at 16th, 17th, 18th week($\bar{x} \pm s, s$)

组别	n	16周	17周	18周
饮酒组	23	504.22 ± 65.96	521.09 ± 57.24	538.42 ± 72.13
对照组	27	483.13 ± 83.42	502.08 ± 69.77	518.42 ± 74.09
t		0.472	0.344	0.249
P		0.654	0.743	0.812

3.2 酒精依赖模型大鼠 ED₅₀

结果显示,酒精依赖组大鼠丙泊酚的 ED₅₀ 为 9.563 mg/kg (95% CI: 8.945~10.242 mg/kg), 明显高于对照组大鼠丙泊酚的 ED₅₀ 5.623 mg/kg (95% CI: 5.023~6.295 mg/kg)。其中,酒精依赖组中有 7 只大鼠麻醉有效,对照组中有 8 只大鼠麻醉有效,两组麻醉有效大鼠进行比较,依赖组 FRR 复现时间比对照组显著延长 ($P < 0.01$), FRR 消失时间和活动完全恢复时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 3。

表 3 酒精依赖组与对照组大鼠的麻醉效果比较 ($\bar{x} \pm s, s$)

Tab 3 Comparison of anaesthetic effect between rats in alcohol dependence group and control group ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	<i>n</i>	FRR 消失时间	FRR 复现时间	活动完全恢复时间
酒精依赖组	7	9.3±0.87	513.9±15.48	966.4±72.13
对照组	8	8.9±1.25	462.6±26.95	864.5±108.43
<i>t</i>		0.695	6.215	1.872
<i>P</i>		0.498	0.001	0.082

两组麻醉有效大鼠 T_1 、 T_3 、 T_4 的呼吸频率明显大于 T_2 ($P < 0.01$), 但两组组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 4。

表 4 酒精依赖组与对照组大鼠不同时间点的呼吸频率比较 ($\bar{x} \pm s, \text{次/min}$)

Tab 4 Comparison of respiratory rate between rats in alcohol dependence group and control group at different time points ($\bar{x} \pm s, \text{times/min}$)

组别	<i>n</i>	T_1	T_2	T_3	T_4	<i>F</i>	<i>P</i>
酒精依赖组	7	108.1±4.98*	92.3±3.27	104.6±3.42*	105.3±3.94*	31.433	<0.000
对照组	8	106.7±3.37*	91.6±2.72	104.3±4.82*	107.4±3.58*	23.686	<0.000
<i>t</i>		0.875	0.338	0.142	0.742		
<i>P</i>		0.396	0.741	0.889	0.470		

注:与 T_2 比较, * $P < 0.05$

Note: vs. T_2 , * $P < 0.05$

3.3 酒精戒断组大鼠 ED₅₀

结果显示,戒断组大鼠丙泊酚的 ED₅₀ 为 4.086 mg/kg (95% CI: 3.566~4.675 mg/kg) 低于对照组大鼠丙泊酚的 ED₅₀ 5.297 mg/kg (95% CI: 4.919~5.945 mg/kg)。酒精戒断组和对照组各有 8 只大鼠麻醉有效,两组麻醉有效大鼠进行比较,酒精戒断大鼠 FRR 复现时间比对照组延长 ($P < 0.05$), FRR 消失时间和活动完全恢复时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 5。

两组麻醉有效大鼠 T_1 、 T_3 、 T_4 的呼吸频率明显大于 T_2 ($P < 0.01$), 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 6。

3.4 大鼠 2 倍 ED₅₀ 实验

取酒精依赖组、酒精戒断组、对照组各 10 只,以各组大鼠 2 倍 ED₅₀ 剂量进行单次静脉注射丙泊酚,即对照组 11.24 mg/kg、酒精依赖组 19.12 mg/kg、酒精戒断组 8.18 mg/kg。3 组大鼠在注射丙泊酚前、后 48 h 平均饮水量、

表 5 酒精戒断组与对照组大鼠的麻醉效果比较 ($\bar{x} \pm s, s$)

Tab 5 Comparison of anaesthetic effect between rats in alcohol withdrawal group and control groups ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	<i>n</i>	FRR 消失时间	FRR 复现时间	活动完全恢复时间
酒精戒断组	8	9.8±1.64	571.2±42.23	904.7±34.49
对照组	8	9.9±1.27	497.6±88.97	876.2±34.49
<i>t</i>		0.099	2.189	0.707
<i>P</i>		0.922	0.046	0.491

表 6 酒精戒断组与对照组大鼠不同时间点的呼吸频率比较 ($\bar{x} \pm s, \text{次/min}$)

Tab 6 Comparison of respiratory rate between anesthesia effective rats in 2 groups at different time points ($\bar{x} \pm s, \text{times/min}$)

组别	<i>n</i>	T_1	T_2	T_3	T_4	<i>F</i>	<i>P</i>
酒精戒断组	8	107.2±4.98*	95.0±3.91	102.3±3.21*	106.9±4.23*	33.434	<0.000
对照组	8	109.1±2.37*	92.8±1.94	104.2±3.31*	110.1±3.52*	25.890	<0.000
<i>t</i>		1.208	1.436	1.306	1.702		
<i>P</i>		0.247	0.173	0.213	0.111		

注:与 T_2 比较, * $P < 0.05$

Note: vs. T_2 , * $P < 0.05$

体质量无明显变化。注射丙泊酚后,3 组大鼠均出现明确、可逆的麻醉效果,无明显不良反应,无大鼠呼吸暂停或死亡。3 组大鼠 FRR 消失时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);酒精依赖组大鼠 FRR 复现时间长于酒精戒断组 ($P < 0.05$),酒精戒断组大鼠 FRR 复现时间长于对照组 ($P < 0.05$);酒精依赖组大鼠活动完全恢复时间长于对照组和酒精戒断组 ($P < 0.05$), 结果见表 7。

表 7 3 组大鼠的麻醉效果比较 ($\bar{x} \pm s, s$)

Tab 7 Comparison of anaesthetic effects among 3 groups ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	<i>n</i>	FRR 消失时间	FRR 复现时间	活动完全恢复时间
酒精依赖组	10	8.6±1.14	656.6±76.59**	1260.0±114.27**
酒精戒断组	10	9.6±1.82	528.2±42.14*	1131.8±103.05
对照组	10	9.6±3.05	500.4±39.40	1070.8±117.58
<i>F</i>		0.604	15.546	5.719
<i>P</i>		0.556	<0.000	0.010

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与酒精戒断组比较, ** $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. alcohol withdrawal group, ** $P < 0.05$

3 组大鼠 T_1 、 T_3 、 T_4 的呼吸频率明显大于 T_2 ($P < 0.01$), 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 8。

3 组大鼠肝功能指标 ALB、ALT、T-BIL、 γ -GT 4 项指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 结果见表 9。

3 组大鼠肝组织 40 倍光镜下显示,对照组与酒精依赖组大鼠肝细胞与肝血窦以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞结构完好,细胞核大而圆,组织结构正常,形态清晰,未见明显病理变化;酒精戒断组大鼠偶见蛋白管型,部分血管腔内有粉红色蛋白液渗出,少量肝细

胞浆疏松、透明,呈气球样变,未见明显肝坏死以及假小叶形成。3组大鼠肝组织形态学变化见图1。

表8 3组大鼠不同时间点的呼吸频率比较($\bar{x} \pm s$, 次/min)

Tab 8 Comparison of respiratory rate among 3 groups at different time points($\bar{x} \pm s$, times/min)

组别	n	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	F	P
酒精依赖组	10	113.4±6.39*	96.5±7.09	106.0±7.21*	112.8±4.32*	21.740	<0.000
酒精戒断组	10	111.1±4.59*	95.6±5.63	110.2±5.97*	111.2±4.20*	15.874	<0.000
对照组	10	113.0±4.37*	97.6±5.40	109.2±6.14*	113.2±5.63*	14.548	<0.000
F		0.672	0.238	0.887	0.434		
P		0.522	0.790	0.427	0.654		

注:与T₂比较,*P<0.05

Note: vs. T₂, *P<0.05

表9 3组大鼠肝功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 9 Comparison of liver function indexes among 3 groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALB, g/L	ALT, U/L	T-BIL, μ mol/L	γ -GT, U/L
酒精依赖组	10	27.98±1.65	52.00±5.34	9.63±1.96	2.51±0.62
酒精戒断组	10	28.25±1.91	46.39±8.35	11.08±1.56	2.14±0.62
对照组	10	29.27±2.25	48.40±7.87	11.74±2.36	1.82±0.80
F		1.279	1.521	2.778	1.997
P		0.299	0.242	0.085	0.161

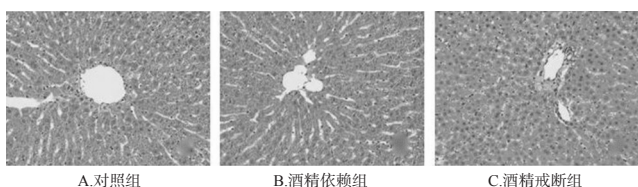


图1 3组大鼠肝组织形态学变化(x40)

Fig 1 Comparison of liver histomorphology among 3 groups(x40)

4 讨论

随着酒文化在世界各国的盛行,饮用酒精制品带来的嗜酒、醉酒等不良事件不断发生,成为危及社会发展和公共卫生安全的社会隐患。酒精依赖以及酒精戒断带来的医疗问题受到越来越多医务人员的高度重视,酒精依赖-戒断动物模型的成功建立将是研究酒精依赖、酒精戒断以及伴发病理学改变成因和机制的起始步骤。长期大量饮酒不仅造成个体精神障碍,还引起躯体包括神经、心血管、消化、内分泌和代谢多个系统的损害,慢性酒精暴露导致的酒精性肝病、转氨酶升高、营养不良、维生素B缺乏、电解质紊乱等都可能影响药物的正常代谢和功效。

在本次实验初期,将6%乙醇水溶液作为唯一饮水源强制喂养8周,保障了大鼠有足量的乙醇消耗;后期进行嗜酒与非嗜酒的筛选,促进嗜酒大鼠进一步消耗乙醇,确保酒精依赖的形成。经过评估,共有23只大鼠进入饮酒组,成功率46.00%;4周后,饮酒组大鼠乙醇消耗量从3.05 g/(kg·d)上升并维持在4.00 g/(kg·d)以上,逐渐形成酒精依赖,与Carnicella S等^[6]报道的该模型成功

率在50.00%左右以及酒精消耗最终可维持在(4.8±0.4) g/(kg·d)的结果一致。

本研究的每项步骤由专人操作,所用设备、药物均已固定,流程采用统一标准,只单一接受丙泊酚麻醉,保证了麻醉效应的均一性,实验程序可靠。饮酒组大鼠在接受6%、20%乙醇饲养后与正常对照组大鼠体重相比,未见明显差异,排除其他非处理因素后,可认为3组大鼠间测得的丙泊酚的ED₅₀不同,是由乙醇作用引起。本次实验采用序贯法而未用传统的Bliss法测定丙泊酚的ED₅₀,是因为序贯法适用于反应快速的药物并可节约大量实验动物^[10],其测定结果与传统方法测算值并无明显差异。结果显示,两次测定对照组丙泊酚的ED₅₀分别为5.623 mg/kg和5.297 mg/kg,与Chen X等^[11]测定的ED₅₀数值6.02 mg/kg相比偏小,可能原因是:本次实验饲养周期长,大鼠鼠龄较大,对丙泊酚麻醉作用较为敏感。测得酒精组、酒精戒断组大鼠丙泊酚的ED₅₀分别为9.563、4.086 mg/kg,分别比对照组大鼠剂量增加70.11%和减少22.83%,提示丙泊酚对酒精依赖大鼠的麻醉作用降低,而对酒精戒断组大鼠的麻醉作用增强。

孙林浩等^[12]发现,50%乙醇灌胃后小鼠再以丙泊酚腹腔注射,麻醉持续时间延长,表明酒精与丙泊酚产生协同作用,加强中枢抑制,与本实验酒精依赖大鼠丙泊酚ED₅₀增加即麻醉作用降低,出现相反的结果。其原因可能是:乙醇作为大脑皮层活动的抑制物具有两面性,食用少量乙醇将导致脑组织皮层下中枢脱抑制性兴奋,出现控制力降低、情绪高涨、精神亢奋等欣快表现,但食用大量乙醇会影响大脑供血^[13],引起中枢神经的抑制作用。以50%乙醇灌胃的小鼠已呈中枢神经抑制状态,再注射丙泊酚作用时间必然延长。而本实验酒精依赖大鼠自由饮用乙醇水溶液,只是满足精神和躯体上的渴求,当食用乙醇到达欣快状态时不再进一步饮用,大鼠此时处于兴奋状态,需要加大丙泊酚剂量才能起到麻醉效果。另外,正常情况进入体内的丙泊酚约有20%经由肝脏微粒体乙酸化系统(MEOS)路径代谢,长期乙醇作用而未发生乙醇性肝损害时,MEOS路径活性异常增强,会对通过该路径的丙泊酚消除具有明显促进作用^[14]。本次实验发现对照组、酒精依赖组和酒精戒断组大鼠肝功能以及肝组织病理学形态未见明显差异,表明大鼠给予乙醇后尚未对肝造成损害,而激活的MEOS路径加快了丙泊酚的代谢,使丙泊酚ED₅₀增加。除此以外,乙醇可以改变中枢神经多种神经递质5-羟色胺、谷氨酸、多巴胺、去甲肾上腺素传递功能^[15]; γ -氨基丁酸是中枢神经系统主要的抑制性递质, γ -氨基丁酸受体又是乙醇作用的主要靶点之一,乙醇可使 γ -氨基丁酸受体表达下调^[16],这些机制也在某些方面影响了丙泊酚的麻醉作用,造成丙泊酚ED₅₀发生改变。

酒精戒断后易诱发AWS,一般出现在末次饮酒后

1~3 d^[17],其主要表现是自主神经活性增强,意识和动作和神经系统的症状^[18],此次测定酒精戒断24 h丙泊酚的ED₅₀明显低于酒精依赖组与正常对照组,可能也是躯体已发生变化的一个佐证。长期大量饮酒者颅脑磁共振成像显示出现脑萎缩、脑白质脱髓鞘病变、脑梗死等改变^[19],表明酒精对大脑产生不可逆的神经细胞毒性作用。大鼠停止饮用乙醇后,初期适量的乙醇浓度使大鼠处于兴奋状态,弥补了缺失神经元的部分功能,维持躯体正常或高于正常的兴奋性,随着时间延长乙醇浓度降低,使得原兴奋稳态不能得以保持,出现兴奋性-抑制性的“反跳”,这也解释了酒精戒断后AWS迅速出现并在24 h左右缓慢恢复的现象。此时,大鼠主要表现为中枢抑制作用,少量丙泊酚即可发挥明显抑制效能,麻醉作用在酒精戒断期增强。

3组大鼠分别接受自身2倍ED₅₀剂量的丙泊酚后,全部呈现麻醉状态,说明测定的ED₅₀数值有效、可靠。3组丙泊酚起效时间无明显差异,而酒精戒断组和酒精依赖组麻醉作用时间延长。酒精依赖组麻醉作用与活动完全恢复时间均较对照组和酒精戒断组延长,可能与该组注射剂量较大有关。酒精戒断组虽注射剂量较对照组少,但麻醉作用时间延长,可能与该组乙醇神经细胞毒性持续存在、中枢兴奋性受抑制有关。在20 min左右,3组大鼠自主活动均完全恢复,未对远期造成不良影响,即丙泊酚对3组大鼠均产生了有效的、可逆的麻醉作用。在注射2倍ED₅₀剂量的丙泊酚前、后,大鼠呼吸频率均在正常范围之内,各组FRR消失时呼吸频率均较其他时间点减低,证实丙泊酚对呼吸有一定程度的抑制作用,但持续时间较短,未引发呼吸暂停等严重不良反应。大鼠饮食量、体质量在注射自身2倍ED₅₀剂量丙泊酚前和注射后48 h未出现明显变化,也说明单次使用丙泊酚对大鼠生理行为未造成不良影响。

综上所述,大鼠酒精依赖期间单次静脉注射丙泊酚,丙泊酚的ED₅₀增加。大鼠酒精戒断期间单次静脉注射丙泊酚,丙泊酚的ED₅₀减少。对酒精依赖、酒精戒断的大鼠,根据病情调整丙泊酚的用量,也是比较安全的。但本研究仅对高饮酒水平雄性大鼠进行实验,以后可在雌性、中-低饮酒水平大鼠方面做进一步研究。

参考文献

[1] 中国新闻网.世界卫生组织发布酒精与健康全球状况报告[EB/OL].(2014-05-14)[2017-10-22].<http://www.chinanews.com/wine/2014/05-14/6167445.shtml>.

[2] KHANNA JM, KALANT H, SHAH G, et al. Tolerance to ethanol and cross-tolerance to pentobarbital and barbital in four rat strains[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991, 39(3): 705-709.

[3] SELLERS EM, BUSTO U. Benzodiazepines and ethanol: assessment of the effects and consequences of psychotropic drug interactions[J]. *J Clin Psychopharmacol*, 1982, 2

(4): 249-262.

[4] 中华医学会麻醉学分会老年人麻醉学组.中国老年患者围术期麻醉管理指导意见[J].*国际麻醉学与复苏杂志*, 2014, 35(10): 870-881, 901.

[5] LUCCHI L, MORESCO RM, GOVONI S, et al. Effect of chronic ethanol treatment on dopamine receptor subtypes in rat striatum[J]. *Brain Res*, 1988, 449(1/2): 347-351.

[6] CARNICELLA S, RON D, BARAK S. Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse[J]. *Alcohol*, 2014, 48(3): 243-252.

[7] 王慎军.慢性饮酒及戒断致大鼠背侧纹状体突触可塑性变化的研究[D].南京:南京医科大学, 2009.

[8] JUNG H, CHOI SC. Sequential method of estimating the LD₅₀ using a modified up-and-down rule[J]. *J Biopharm Stat*, 1994, 4(1): 19-30.

[9] 周毅,杨俊,康仪,等.异丙酚前药HX0891和HX0892在大鼠体内的初步药理学评价[J].*华西药理学杂志*, 2012, 27(1): 45-47.

[10] 王海燕,杨俊,殷望,等.丙泊酚前药HX0969w及磷丙泊酚钠与丙泊酚剂剂灌胃对大鼠的镇静催眠效应及其安全性比较[J].*四川大学学报(医学版)*, 2015, 46(2): 214-217.

[11] CHEN X, YAN R, BAI Z, et al. Enhanced sedative efficacy and delayed recovery in propofol anesthesia in a rat model of hepatic cirrhosis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5723-5730.

[12] 孙林浩,袁玲,张露露,等.乙醇对丙泊酚催眠效应的影响[J].*徐州医学院学报*, 2015, 35(8): 497-499.

[13] 高俊.酒精中毒致精神障碍患者脑内神经递质功能研究[J].*国际神经病学神经外科学杂志*, 2015, 42(5): 439-442.

[14] CICHOSZ-LACH H, PARTYCKA J, NESINA I, et al. Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase 3 in digestive tract alcohol damage[J]. *Hepatogastroenterology*, 2007, 54(76): 1222-1227.

[15] ANDERSON PD, BOKOR G. Forensic aspects of drug-induced violence[J]. *J Pharm Pract*, 2012, 25(1): 41-49.

[16] HEMBY SE, O'CONNOR JA, ACOSTA G, et al. Ethanol-induced regulation of GABA-A subunit mRNAs in prefrontal fields of cynomolgus monkeys[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, 30(12): 1978-1985.

[17] PERRY EC. Inpatient management of acute alcohol withdrawal syndrome[J]. *CNS Drugs*, 2014, 28(5): 401-410.

[18] JESSE S, BRATHEN G, FERRARA M, et al. Alcohol withdrawal syndrome: mechanisms, manifestations, and management[J]. *Acta Neurol Scand*, 2017, 135(1): 4-16.

[19] 崔益明,吴德军.盐酸纳美芬治疗急性酒精中毒昏迷患者的临床观察[J].*中国药房*, 2014, 25(12): 1103-1105.

(收稿日期:2017-10-30 修回日期:2018-02-07)

(编辑:邹丽娟)