DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.008
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
1142 2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)12-1142-03

重楼皂甙对急性吗啡耐受大鼠痛反应及海马ACTH和β-EP含量的影响

王 建[1],黎海蒂[1],徐海伟[1],方勇飞[2],龚发云[1],李希成[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室;[2]附属西南医院中西医结合科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠急性吗啡镇痛耐受时,痛行为和海马ACTH和β-内啡肽(β-EP)含量变化及重楼皂甙对其影响。方法 本实验采用大鼠急性吗啡镇痛耐受模型,运用热测痛法观察重楼皂甙对其痛阈的作用,并用放射免疫法测定海马ACTH和β-EP含量变化。结果 在急性单次皮下注射盐酸吗啡(6 mg/kg)后,海马ACTH和β-EP含量升高,而当连续5次皮下注射盐酸吗啡(6 mg/kg,间隔2 h)后,海马ACTH和β-EP含量回降。重楼皂甙对这一回降过程有抑制作用,并增强吗啡对急性吗啡耐受大鼠痛阈的提高作用。结论 重楼皂甙在吗啡急性耐受形成后可能有增强吗啡镇痛的作用,并可能通过影响脑内ACTH和β-EP等因素影响耐受形成。

关键词:重楼皂甙;吗啡;急性耐受;海马;促肾上腺皮质激素;β-内啡肽
中图法分类号:R338;R971.2 文献标识码:A

Effects of Rhizoma Paridis saponins on the pain threshold and Ir-ACTH and Ir-β-EP contents in hippocampus of acute morphine tolerant rats

WANG Jian, LI Hai-di, XU Hai-wei, FANG Yong-fei, GONG Fa-yun, LI Xi-cheng (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the contents of immunoreactive-adrenocorticotropin hormone (Ir-ACTH) and immunoreactive-β-endorphine (Ir-β-EP) in the hippocampus and pain behavior of acute morphine tolerant rats and the effect of Rhizoma Paridis saponins (RPS) on the contents and the behavior. **Methods** Five consecutive subcutaneous injections of morphine hydrochloric acid (6 mg/kg) were given to Wistar rats at 2 h intervals to establish the acute morphine tolerance rat model. The contents of ACTH and β-EP were determined by radioimmunoassay. The pain threshold was determined with hot water induced tail flick test and radiant heat-induced paw lift test. **Results** The contents of ACTH and β-EP were increased in the rats with single dose of morphine but decreased in those with 5 consecutive injections. RPS was found to suppress this decrease and increase the antinociception effect of morphine in acute morphine tolerant rats. **Conclusion** RPS can enhance the efficiency of morphine after the acute morphine tolerance was established and affect this establishment by its actions on ATCH and β-EP in the hippocampus.

Key words: Rhizoma Paridis saponins; morphine; acute tolerance; hippocampus; adrenocorticotropin; β-endorphine

吗啡是临床常用麻醉性镇痛药,长期应用会产生耐受与依赖。吗啡耐受的产生机制,现基本认为是机体对吗啡类药物的一种适应性功能改变。大量研究证明内源性阿片肽系统参与吗啡耐受的形成,在耐受形成中有内阿片肽及受体的功能变化[1],但由于采用模型及检测方法的不同,内阿片肽含量的变化没有一致结论;促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotropin hormone, ACTH)因其与β-内啡肽(β-endorphin, β-EP)具有共同生物化学起源而在痛觉研究中受到关注,但在吗啡耐受中的作用则鲜见报道[2,3]。重楼皂甙(Rhizoma Paridis saponins, RPS)是从中药重楼中提取的皂甙混合物,具有镇静和镇痛的作用[4]。为进一步探讨吗啡耐受机制并寻找有效的抑制吗啡耐受的药物及途径,本实验对

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M094)
作者简介:王 建(1971-),男,陕西省旬阳县人,硕士,助教,主要从事阿片依赖和耐受方面的研究。电话:(023)68752254
收稿日期:2000-02-28;修回日期:2000-09-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

吗啡急性耐受形成中海马 ACTH 和β-EP 的变化以及重楼皂甙的作用进行了初步观察。

1　材料与方法

1.1　实验动物与分组

Wistar 大鼠 64 只, 体重(180±30)g, 雌雄不拘。随机分为 8 组, 每组 8 只: ①正常对照组: 皮下注射生理盐水 0.5 ml/kg; ②单次吗啡组: 盐酸吗啡 6 mg/kg 皮下注射; ③急性吗啡耐受组(AMT): 盐酸吗啡 6 mg/kg 皮下注射, 每 2 h 1 次, 共注射 5 次; ④急性吗啡耐受+灌服重楼皂甙组: 在第 5 轮注射吗啡之前灌服重楼皂甙溶液 300 mg/kg, 约 2.5 ml; ⑤急性吗啡耐受+灌服溶剂组: 在第 5 轮注射吗啡之前灌服溶剂 2.5 ml(仅不含重楼皂甙); ⑥灌服生理盐水组(NS): 灌服生理盐水 10 ml/kg; ⑦灌服重楼皂甙组(RPS): 灌服重楼皂甙 300 mg/kg; ⑧灌服溶剂组(Solvent): 灌服重楼皂甙溶液所用的溶剂 10 ml/kg。

1.2　试剂和药品

盐酸吗啡(沈阳第一制药厂), ACTH 放射免疫试剂盒(天津德普生物和医学技术有限公司), β-EP 放射免疫试剂盒(上海第二军医大学神经生物教研室), 重楼皂甙(重庆中药研究所)。

1.3　急性耐受模型的制备和痛阈测定方法

以盐酸吗啡 6 mg/kg 对大鼠进行皮下注射, 连续 5 轮, 每轮间隔 2 h 即制得急性耐受模型[5]。痛阈测定方法: ①热甩尾法: 将大鼠置于特制固定器内 30 min, 安静后将鼠尾从尖端起约 5 cm 长浸入水浴中(50±1)°C, 记数从尾巴浸入起到完全离开水面的时间, 作为基础痛阈, 在最后一轮给药后 1 h 再行同样测量记为反应痛阈, 以 15 s 作为中止时间以防止组织损伤。镇痛效应以痛阈变化百分比表示: (反应痛阈−基础痛阈)/基础痛阈×100%, 超过 200%按 200%计[5]。②辐射热抬足法: 将大鼠置于一玻璃容器内 30 min, 安静后用 RTY-1 型热痛测试仪将光束聚焦于大鼠右后爪掌心, 调节强度至抬足反应在 3~4 s 左右。分别测量基础痛阈和反应痛阈, 方法与表示方法均同甩尾法[6]。

1.4　取材及 Ir-ACTH 及 Ir-β-EP 含量测定

在各组测完反应痛阈后即断头活杀, 取出海马。按照药盒说明书进行放免测定, 并用福林-酚法作蛋白定量检测。放免测定, 标准品的重复率和回收率均符合质控要求。

1.5　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用电子计算机经双样本 t 检验程序(PDA-2)进行统计学处理。

2　结果

2.1　重楼皂甙对正常大鼠痛阈的影响

分别以热甩尾法和辐射热抬足法测定痛阈变化, 观察时间点分别为给药后 0.5、1 和 1.5 h, 灌服生理盐水组、灌服溶剂对照组和灌服重楼皂甙组 3 组间痛阈升高率比较差异均不显著, 见表 1。

2.2　重楼皂甙对吗啡镇痛急性耐受大鼠痛阈、海马 ACTH 及β-EF 含量的影响见表 2

表 1　重楼皂甙对正常大鼠痛阈提高率的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of Rhizoma Paridis saponins on the pain threshold of rats(%, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Hot water-induced tail flick test			Radiant heat-induced paw lift test		
		0.5 h	1 h	1.5 h	0.5 h	1 h	1.5 h
NS	8	6.4±1.7	6.1±1.5	3.2±0.7	3.8±1.1	4.3±1.3	2.8±1.0
Solvent	8	7.1±2.1	6.7±2.2	4.4±1.2	3.1±0.9	3.7±1.1	2.9±0.7
RPS	8	8.3±2.5	7.1±2.9	5.0±1.4	4.8±1.4	5.1±1.5	4.7±1.2

NS: Normal saline; RPS: Rhizome Paridis saponins

表 2　重楼皂甙对痛阈升高率、海马 ACTH 和β-EP 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of Rhizoma Paridis saponins on the pain threshold elevation rate and the Ir-ACTH and Ir-β-EP content in hippocampus of acute morphine tolerant rats($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Pain threshold elevation rate(%)	Hippocampal ACTH (ω_B/pg·mg^{-1})	Hippocampal β-EP (ω_B/pg·mg^{-1})
Control	8	1.11±0.34	<1	3.17±0.89
Single morphine	8	193.8±11.88*	211.88±69.60*	7.25±1.33*
AMT	8	80.00±21.78*▼	45.21±13.78*▼	4.36±1.29▼
AMT+solvent	8	89.25±19.31☆	50.33±13.12☆	6.69±1.45☆
AMT+RPS	8	140.25±34.95■	125.88±36.31■	74.84±21.70■

AMT: Acute morphine tolerant; *: $P<0.01$ *vs* control; ▼: $P<0.01$ *vs* single morphine; ☆: $P<0.05$ *vs* AMT+RPS; ■: $P<0.01$ *vs* AMT

3　讨论

大量研究证实, 一次大剂量注射或重复的常规镇痛剂量吗啡注射可在 24 h 内形成急性吗啡耐受。本实验采用北京医科大学韩济生等人建立的模型, 在第 5 轮盐酸吗啡注射后痛阈升高由第 1 轮注射后的 193.8%±11.88%降至80.00%±21.78%, 与文献报道相符[5], 证明所用模型确切。吗啡耐受产生机制尚不完全清楚, 但内源性阿片肽系统的参与已获证明。β-内啡肽是体内 3 大内源性阿片肽之一, 主要作用于 μ-受体发挥镇痛作用。一般认为, 在大量或慢性多次给予外源性阿片物质后, 可反馈性的引起内源性阿片

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

肽功能下调，并可能伴有内源性阿片肽数量的下降。Fang 等[7]报道对雌性豚鼠慢性给予吗啡可引起下丘脑β-内啡肽系统功能的全面下调。但也有不一样的观点，Rattan 等[8]认为慢性吗啡可激活雄性 Sprague-Dawley 大鼠脑内β-内啡肽系统，这种影响包含在耐受和依赖机制中。这两者结果间的矛盾可能与给药方式和研究脑区的不同相关。由于中枢神经系统结构和功能的复杂性，对β-内啡肽在耐受中的地位尚无法定论。本实验观察到给予单次吗啡可提高海马β-内啡肽含量，而给予多次吗啡(形成急性耐受)此作用消失。由于在耐受形成过程中有内源性β-内啡肽含量的变化，推断内源性β-内啡肽可能参与急性吗啡耐受形成机制。

作为一类黑皮素相关肽，ACTH 通过作用于脑内黑皮素受体亚型，MC3R，MC4R 产生生物效应。ACTH 在中枢具有对抗阿片镇痛的作用，这种抗阿片作用可能通过受体后第二信使水平的相互作用而产生，如钙、cAMP 水平上的相互拮抗等[9]。ACTH 可能作为一种阿片调节肽在阿片镇痛和耐受中起调节作用[10]。Alvaro 等[11]报道：外源性阿片物质的持续给予，导致大鼠在纹状体、PAG 和伏核出现时间依赖性的 MC4R mRNA 表达下降，并伴随 MC4R 蛋白受体的下降，而另一些脑区如额叶皮质、橄榄核、下丘脑及黑质无此变化。推论黑皮素可拮抗阿片镇痛耐受和生理依赖。本实验见在吗啡耐受形成中，ACTH 有先升高后下降的变化，推测 ACTH 参与急性吗啡耐受形成，并可能具有与黑皮素相似的作用，是另一种阿片调节肽。

在吗啡耐受和依赖防治中，中药受到愈来愈多的重视，因为它具有成分多样，多靶点作用及毒副作用小等优势。中药重楼，又名七叶一枝花、蚤休，百合科重楼属，根茎入药。现代药理研究发现，其提取物或有效成分具有抗肿瘤、消炎、抑菌、镇静、镇痛、止血等作用[12]。本实验首次提出重楼皂甙在吗啡耐受中的应用，观察到重楼皂甙对正常大鼠痛阈影响虽不明显(与王强等[4]报道结果有所不同，可能是因为采用动物类型不同及使用药物在制得工艺和剂量上的差异所致，痛行为测定方法的缺乏特异性也是重要原因)，但可增强吗啡对已形成耐受大鼠的作用，提示它可与吗啡协同产生镇痛作用。重楼皂甙并可升高急性吗啡耐受大鼠海马β-EP 和 ACTH 的含量，提示它可能通过β-EP 和 ACTH 间接地影响吗啡急性耐受的形成。关于重楼皂甙对吗啡耐受的作用及机制尚待进一步研究。本实验显示出重楼皂甙可能成为又一类治疗吗啡成瘾的有效中药。

参考文献：

[1] Zhang G, Lagrenge A H, Ronnekleiv O K. Tolerance of hypothalamic beta-endorphine neurons to mu-opioid receptor activation after chronic morphine[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 277(1): 551－558.

[2] 方 圆. 促肾上腺皮质激素的中枢抗阿片镇痛效应及其作用机制分析[J]. 生理科学进展, 1995, 26(2): 137－140.

[3] el-Daly E S. Influence of acute and chronic morphine of stadol on the secretion of adrenocorticotrophin and its hypothalamic releasing hormone in the rat[J]. Life Sci, 1996, 59(22): 1 881－1 890.

[4] 王 强, 徐国钧, 蒋 莹. 重楼类中药镇痛和镇静作用的研究[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(2): 45－47.

[5] 汤 健, 梁熙南, 张万琴, 等. 大鼠针刺耐受与吗啡耐受[J]. 北京医学, 1979, 1(1): 34－37.

[6] Wu X, Li H D. Effects of intra-hippocampal injection of interleukin-2 on pain threshold and formaldehyde-induced substance P-like immunoreactivity in periaqueductal gray and spinal cord[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1999, 20(9): 839－843.

[7] Fang Y, Kelly M J, Ronnekleiv O K. Proopiomelanocortin mRNA expression: distribution and region-specific down-regulation by chronic morphine in female guinea pig hypothalamus[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 30, 55(1): 1－8.

[8] Rattan A K, Teiwani G A. Effect of chronic tretment with morphine, midazolam, and both together on beta-endorphin levels in the rat[J]. Brain Res Bull, 1996, 41(6): 335－341.

[9] 方 圆, 韩济生. 中枢 ACTH 受体研究进展[J]. 生理科学进展, 1995, 26(3): 199－203.

[10] 黎海蒂. 促肾上腺皮质激素的痛调制作用研究[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册, 1994, 14(3): 154－156.

[11] Alvaro J D, Tatro J B, Quillan J M, *et al*. Morphine down－regulates melanocortin-4 receptor expression in brain regions that mediate opiate addiction[J]. Mol Pharmacol, 1996, 50(3): 583－591.

[12] 石小枫, 杜德极. 重楼的药理研究及应用概况[J]. 中医药学报, 1991, (4): 42－44.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net