

gray lesions reduce morphine analgesia in the rat. *Neurosci Lett* 1977; 4: 99

15 Fields HL, Basbaum AI. Anatomy and physiology of a descending pain control system. In: Bonica JJ, Liebeskind JC, Albe-Fessard DG, eds. *Advances in pain research and therapy*; vol 3. NY: Raven, 1979: 427-40

水管周灰质和中缝大核在刺乌头碱、N-脱乙酰刺乌头碱和吗啡镇痛中的作用

郭新、唐希灿 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

摘要 大鼠光热甩尾法测痛表明, ip LA 6 mg/kg icv DLA 60 μg 和 icv 或 ith 吗啡 5 μg 有显著镇痛作用, ith LA 40 μg 或 DLA 60 μg 无作用。icv 纳洛酮 4 μg 拮抗吗啡但不改变 LA 和 DLA 的镇痛作用。水管周灰质或中缝大核注射 DLA 20 μg 或吗啡 5 μg 也表现显著镇痛作用。电解和卡因酸(0.8 μg)损毁水管周灰质或中缝大核均拮抗 LA、DLA 和吗啡的镇痛作用。结果提示脊髓上部位特别是水管周灰质和中缝大核参与了 LA、DLA 和吗啡的镇痛作用。

关键词 乌头碱; 刺乌头碱; N-脱乙酰刺乌头碱; 吗啡; 镇痛; 水管周灰质; 中缝核; 卡因酸; 纳洛酮; 脊髓

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Mar, 11 (2): 112-116

药物镇痛时不同脑区 ^{45}Ca 的摄取、线粒体蛋白质结合 Ca^{2+} 和亚微结构 Ca^{2+} 的分布¹

赵晓宁、张祖暄、施善苓、王新光、杨爱珍、王天伦、赵文凡、黄孟健²、陈荣三²
(南京大学生理教研室及²配位化学研究所, 南京 210008, 中国)

^{45}Ca -uptake, mitochondrial protein bound Ca^{2+} and ultrastructural distribution of Ca^{2+} in some brain regions of mice during drug-induced analgesia¹

ZHAO Xiao-Ning, ZHANG Zu-Xuan, SHI Shan-Ling, WANG Xin-Guang, YANG Ai-Zhen, WANG Tian-Lun, ZHAO Wen-Fan, HUANG Meng-Jian², CHEN Rong-San²

(Division of Physiology and ²Coordination Chemistry Research Institute, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

ABSTRACT After buprenorphine (Bup, 0.8 mg/kg ip) treatment ^{45}Ca -uptake (cpm/mg fresh brain) *in vivo* by brain slices decreased from 589 ± 12 and 486 ± 12 to 522 ± 14 and 408 ± 10 and mitochondrial protein bound Tb^{3+} (Tb^{3+} relative fluorescent intensity) reduced from 41 ± 5 and 32 ± 2 to 30 ± 3 and 22 ± 2 in periaqueductal grey and hypothalamus, respectively. A large amount dense precipitate occurred

in the myelin sheath and mitochondria in both regions. The ^{45}Ca -uptake evoked by buprenorphine at $16 \mu\text{g}/40 \mu\text{l}$ *in vitro* has the similar tendency with that *in vivo*. Treated by ruthenium red ($20 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ip or icv) before buprenorphine, the above-mentioned effects were all abolished. Similar results were obtained with morphine (Mor, 10 mg/kg ip) and verapamil (Ver, 8 μg/mouse icv) instead of buprenorphine and ruthenium red, respectively. These results suggest that Ca^{2+} transport across neuroplasmic membranes plays a mediator role in drug-induced analgesia.

KEY WORDS buprenorphine; morphine; calcium radioisotopes; mitochondria; ruthenium red; verapamil; neurochemistry; analgesia; calcium

摘要 丁丙诺啡(0.8 mg/kg ip)使小鼠水管周灰质和下丘脑组织薄片的 ^{45}Ca 摄取减低, 线粒体蛋白质结合 Ca^{2+} 增加, 髓鞘和线粒体出现大量 Ca^{2+} 沉淀颗粒。预注钐红($20 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ip 或 icv)则相反。用吗啡(10 mg/kg ip)和维拉帕米($8 \mu\text{g}/\text{mouse}$ icv)作同样处理亦获得类似的结果。提示, 神经细胞质膜内外 Ca^{2+} 的移动可能在药物镇痛中起某种调节作用。

关键词 丁丙诺啡; 吗啡; 钙放射性同位素; 线粒体; 钐红; 维拉帕米; 神经化学; 镇痛; 钙

Received 1989 Apr 13 Accepted 1989 Sep 2

¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 252

Ca^{2+} 在神经递质释放和痛调节中起重要作用^(1,2)。 Tb^{3+} 是一种检测生物膜上 Ca^{2+} 结合部位的专一性 Ca^{2+} 探针^(3,4)。我们用 Tb^{3+} 探针检测,发现在电针镇痛时某些脑区的线粒体膜结合 Ca^{2+} 及其亚细胞分布发生明显改变^(5,6)。本文试图用不同镇痛剂进一步了解电针镇痛与药物镇痛之间是否存在统一的作用部位和机理。

MATERIALS AND METHODS

痛阈测定 昆明系小鼠 98 只, 体重 $25 \pm \text{SD} 1 \text{ g}$, ♀♂不拘, 随机分组, 用辐射热尾尾法测痛。丁丙诺啡(buprenorphine, Bup, 0.8 mg/kg)或吗啡(morphine, Mor, 10 mg/kg)ip, 钌红(ruthenium red, $20 \mu\text{g}/\text{mouse}$)和维拉帕米(verapamil, Ver, $8 \mu\text{g}/\text{mouse}$) ip 或 icv。镇痛指数(AI) = $100(\text{TL}-\text{BL})/(\text{10}-\text{BL})$ 。TL 为处理后潜伏期, BL 为处理前潜伏期。

脑薄片制备和 ^{45}Ca 测定 按小鼠前脑图谱⁽⁷⁾, 在冰浴条件下分离出水管周灰质(periaqueductal grey, PAG)、下丘脑(hypothalamus, Hypo)和海马(hippocampus, Hip), 置 4°C 保存。使用 McILwain 脑切片机切成 0.2 mm 薄片⁽⁸⁾。称重后, 分别暂存于含 2 ml 冰冷人工脑脊液的培育管中, 然后置 $95\% \text{O}_2 + 5\% \text{CO}_2$ 中 36°C 温育 15 min , 每管加入 $^{45}\text{CaCl}_2$ ($9.25 \times 10^5 \text{ Bq}/100 \mu\text{l}$) 继续温育 20 min , 吸出培育液, 并用冰冷重蒸水漂洗 2 次, 每次 15 min 。加入 0.4 ml $30\% \text{H}_2\text{O}_2$ 和 0.2 ml 甲酸, 80°C 消化 1 h 。冷却后再加入 4 ml 乙二醇醚和 5 ml 闪烁液(PPO + POPOP)。在 FJ-2105 型双道液闪仪中测定放射性强度。

脑线粒体制备和线粒体- Tb^{3+} 荧光测定 小鼠于最后 1 次测痛后处死。分离出不同脑区。每份脑组织置 Teflon 棒玻璃匀浆器中用蔗糖 0.32 mol/L 制成匀浆, 再按差速离心法⁽⁹⁾ 提取脑粗制线粒体并测定线粒体蛋白浓度⁽¹⁰⁾。每管取线粒体蛋白 $40 \mu\text{g}$, 加 0.2 ml Tb^{3+} (TbCl_3 , 0.2 mol/L), 六次甲基四胺缓冲

液 0.4 ml (0.5 mol/L), $\text{pH} 6.2$, 最后加重蒸水至终容量 2 ml 。 36°C 平衡 1 h , 用 Hitachi Rf-540 型荧光分光光度仪测定 Tb^{3+} 荧光强度。 $\lambda_{\text{em}} = 545 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ 。

电镜样本制备 药物处理后 30 min 拉断小鼠颈椎, 用含草酸钾 90 mmol 的生理盐水进行心脏灌流。至流出液澄清后, 用含草酸钾 90 mmol 的 3% 戊二醛溶液($\text{pH} 7.4$)继续灌流 20 min 。按文献⁽⁸⁾ 分离出不同脑区, 切成 1 mm^3 小块, 浸入同样的戊二醛固定液中 2 h 。用含草酸钾 90 mmol 的 7.5% 蔗糖溶液($\text{pH} 7.4$)漂洗 1 h 。然后在 1% 锇酸、 2% 焦锑酸钾溶液中后固定, 重蒸水($\text{pH} 10$)漂洗 15 min , 脱水, Epon-12 包埋, 60°C 聚合 48 h 。LKB-V 型超薄切片机切片, 片厚 50 nm 。乙酸铀和柠檬酸铅双重染色, 在 EM-100 S 和 JEM-200 CX 电镜下观察。

为了鉴定沉淀颗粒的化学成份, 将未染色的超薄切片置于敷有 Formvar 膜的铜网上, 用 Link-860 X-射线能谱仪进行元素分析。加速电压 120 kV , 计数 200 s 。

药品 钌红(Sigma); 焦锑酸钾(E Merck); Tb_2O_3 (GR, Johnson Mattkey); 盐酸吗啡制剂(沈阳第一制药厂); $^{45}\text{CaCl}_2$, 比放射性 18.5 MBq/ml (中国科学院原子能科学研究所, 同位素研究室); 维拉帕米(Knoll); 丁丙诺啡(天津医药工业研究所合成)。

RESULTS

钌红对 Bup 镇痛和脑片 ^{45}Ca 摄取的影响

1 体内试验 先测痛 3 次, 取 \bar{x} 作为正常痛阈。然后 ip Bup 0.8 mg/kg , 30 min 后再测痛 3 次, 计算 AI(%)。在给 Bup 前 15 min 先 icv 钌红 $20 \mu\text{g}/\text{mouse}$, 于最后一次测痛后处死小鼠, 测定 ^{45}Ca 放射性强度。结果见 Tab 1。

从 Tab-1 可见, Bup 有较强的镇痛效应。与此同时, PAG 和 Hypo 两个脑区的 ^{45}Ca 摄取明显减低。预先 icv 钌红后, 两个脑区的

Tab 1. Effects of ruthenium red (RR, 20 $\mu\text{g}/\text{mouse icv}$) on buprenorphine (Bup, 0.8 mg/kg ip) induced ^{45}Ca -uptake in brain slices. $n=8-10$ brain slices, $\bar{x} \pm \text{SD}$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs Bup group, and between the groups of Hip, $P > 0.05$. Hip = hippocampus, PAG = periaqueductal grey, Hypo = hypothalamus AI = analgesic index.

Group	AI (%)	^{45}Ca (cpm/mg fresh brain)		
		Hip	PAG	Hypo
<i>In vivo</i>				
Control	6 \pm 15	544 \pm 14	589 \pm 12	486 \pm 12
Bup	51 \pm 13***	534 \pm 11	522 \pm 14**	408 \pm 10***
RR + Bup	14 \pm 17†	540 \pm 14	624 \pm 14††	503 \pm 8††
<i>In vitro</i>				
Control		645 \pm 21	721 \pm 20	824 \pm 15
Bup		658 \pm 12	628 \pm 12***	781 \pm 10**
RR + Bup		638 \pm 17	756 \pm 21†	849 \pm 15†

In vitro, Bup 16 $\mu\text{g}/40 \mu\text{l}$ was added together with $^{45}\text{CaCl}_2$ (9.25 kBq/100 μl) into incubation medium with slices. RR 0.4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ was added 15 min before Bup. After incubation, the radioactivity was determined by a FJ-2001 double channel liquid scintillation spectrometer.

^{45}Ca 摄取明显增加。单独 Bup 或钉红 + Bup 处理对 Hip 的 ^{45}Ca 摄取均无明显影响。

2 体外试验 如下分组: (1) 对照组每管加入 $^{45}\text{CaCl}_2$ 9.25 kBq/100 μl ; (2) Bup 组每管加入 Bup 16 $\mu\text{g}/40 \mu\text{l}$ 和同样剂量 $^{45}\text{CaCl}_2$; (3) 钉红 + Bup 组每管先加入钉红 0.4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$, 15 min 后再加 Bup 和 $^{45}\text{CaCl}_2$, 剂量同相应组, 然后测定 ^{45}Ca 的放射性强度。

与体内试验一样, Bup 也使 PAG 和 Hypo 的 ^{45}Ca 摄取显著降低; 预加入钉红后出现相反的结果。Bup 或钉红 + Bup 处理对 Hip 的 ^{45}Ca 摄取亦无明显影响。

脑室内预注钉红后不同脑区线粒体膜结合 Ca^{2+} 的改变 于给 Bup 前 15 min icv 钉红 20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 。从 Tab 2 可见, Bup 镇痛时, PAG 和 Hypo 的线粒体膜结合 Ca^{2+} 显著增加,

亦即 Tb^{3+} 荧光强度降低。预注钉红后, 这两个脑区的线粒体膜结合 Ca^{2+} 和痛阈均明显降低。单独 Bup 或钉红 + Bup 处理对 Hip 的线粒体膜结合 Ca^{2+} 均无明显影响。

Tab 2. Effects of RR 20 $\mu\text{g}/\text{mouse icv}$ or verapamil (Ver, 8 $\mu\text{g}/\text{mouse icv}$) on Bup 0.8 mg/kg or morphine (Mor, 10 mg/kg) ip induced analgesia and mitochondrial protein bound Tb^{3+} (TbCl_3) fluorescent intensity. $n=9-10$ mice, $\bar{x} \pm \text{SD}$, * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control, † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$ vs Mor or Bup group, and between the groups of Hip, $P > 0.05$. Other notes are the same as in Tab 1.

Group	AI (%)	Tb^{3+} relative fluorescent intensity		
		Hip	PAG	Hypo
Control	5 \pm 6	38 \pm 3	41 \pm 5	32 \pm 2
Bup	49 \pm 11***	37 \pm 1	30 \pm 3**	22 \pm 2**
RR + Bup	14 \pm 18††	41 \pm 4	51 \pm 5***††	38 \pm 3††
Control	4 \pm 3	37 \pm 2	42 \pm 5	37 \pm 3
Mor	75 \pm 22***	39 \pm 6	31 \pm 1***	26 \pm 4***
Ver + Mor	10 \pm 10†††	38 \pm 3	40 \pm 6††	36 \pm 2††

用 Ver 8 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 和 Mor 10 mg/kg 作同样处理亦获得了类似的实验结果 (Tab 2)。

Bup 对不同脑区亚微结构 Ca^{2+} 分布的影响 实验分成 3 组, 钉红 20 $\mu\text{g}/\text{mouse ip}$ 15 min 后 ip Bup 0.8 mg/kg。预实验发现麻醉剂戊巴比妥钠本身对细胞内 Ca^{2+} 分布有明显影响。本实验各组均在给药后 30 min 直接拉断颈椎处死小鼠, 然后制备电镜样本。

Fig 1 是 ip 生理盐水后 Hypo (A) 和 PAG (B) 两个结构 Ca^{2+} 分布的电镜照片。由 Fig 1 A 和 B 可见, 这两个脑区的髓鞘和线粒体没有或只有少量沉淀颗粒。

注射 Bup 后, Hypo (Fig 1, C) 和 PAG (Fig 1, D) 的髓鞘和线粒体都出现大量电子致密颗粒。预注钉红使 Hypo (Fig 1, E) 和 PAG (Fig 1, F) 的髓鞘和线粒体的电子致密颗粒明显减少。

为了证明沉淀颗粒的化学成份, 采用电子探针 X-射线微区分析对上述处理引起的沉淀颗粒进行了元素分析。对 Fig 1 G, A 点作 X-

射线微区分析,表明在 3620 eV 处(Fig 2, A)有一峰,此峰是 3600 eV 的 Sb-L 峰和 3690 eV 的 Ca-K_α 发射峰叠加,而 Fig 1, G 的对照点 B 则无峰(Fig 2, B),说明沉淀颗粒中含有锑和钙,锑是外源性焦锑酸钾带入的,因此,沉淀颗粒的主要元素是钙。

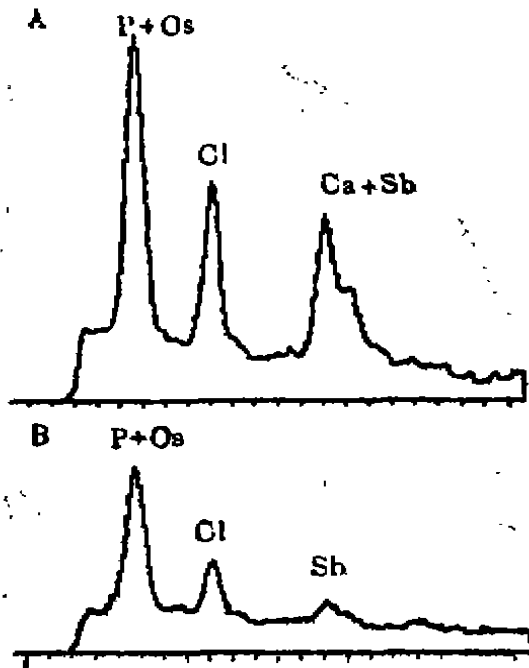


Fig 2. X-ray spectrum of precipitates spot (A) and control spot (B) of Fig 1 G, respectively. The main element of the precipitates was Ca²⁺.

DISCUSSION

关于 Ca²⁺ 在麻醉性镇痛剂镇痛中的作用机理,至今仍未完全清楚。有人认为 Ca²⁺ 是痛感受所必需的因子,吗啡镇痛是由于阻止 Ca²⁺ 与生物膜结合和向细胞内转运⁽¹⁾。从本文结果看,无论麻醉性镇痛剂、非麻醉性镇痛剂或电针^(6,6)引起的镇痛很可能都与细胞膜或胞器膜内外 Ca²⁺ 的转运相关,而且 Hypo 和 PAG 区的 Ca²⁺ 对药物镇痛似有相对专一性。

电镜观察表明,在 Bup 处理后, Hypo 和 PAG 区的髓鞘和线粒体聚集了大量 Ca²⁺, 通常认为,有髓鞘神经纤维由于髓鞘的绝缘作用,离子通过轴突膜产生的动作电位仅限于郎

氏结。因此,动作电位呈跳跃式传播。髓鞘上无离子通道,那么在髓鞘上为什么会出现大量 Ca²⁺ 沉淀颗粒? 众所周知,中枢神经系统的髓鞘是由少突胶质细胞的突起形成的,髓鞘螺旋形的板层结构在靠近郎氏结时,形成一系列舌状胞质囊,其中含有微管和细胞器。这些舌状胞质囊集中形成有髓鞘纤维的结旁区,髓鞘的最内板层与轴膜之间有一宽约 12 nm 的轴周间隙。为了实现神经冲动的跳跃传导,髓鞘必须有效地封闭轴周间隙,使之不与细胞外隙相连,至少不让离子通过,而细胞外隙与轴周间隙之间存在通道。因此,目前认为髓鞘似乎是一个多少有点漏电的电容器;而且,郎氏结的完整性有赖于 Ca²⁺ 的存在。从电镜下观察到的髓鞘 Ca²⁺ 沉淀颗粒分布看,细胞外 Ca²⁺ 很可能通过髓鞘转运进入细胞内,值得研究。

致谢 梅学仁同志提供丁丙诺啡

REFERENCES

- 1 张祖暄,李春宝. 钙离子与神经递质. 自然杂志 1980; 3 : 430
- 2 Way EL. Review and overview of four decades of opiate research. In: Loh HH, Ross DH, eds. *Neurochemical mechanisms of opiates and endorphins*. 1st ed. NY: Raven Press, 1979; 1-27
- 3 Epstein M, Reuben J, Levitzki A. Calcium binding site of trypsin as probed by lanthanides. *Biochemistry* 1977; 16 : 2449
- 4 Loscalzo J, Rabkin D. The interaction of Tb³⁺ with the human platelet surface. *Arch Biochem Biophys* 1986; 249 : 237
- 5 Xie XY, Li XX, Zhang ZX, Huang MJ, Chen RS. The change of mitochondrial protein bound Ca²⁺ in some brain regions under the conditions of electroacupuncture or morphine analgesia and analgesic tolerance. *Acta Physiol Sin* 1988; 40 : 553
- 6 Shi SL, Zhang WN, Zhao CQ, Zhang ZX. The effects of electroacupuncture, morphine and Tb³⁺ on the ultrastructural distribution of calcium ions in the discrete brain regions of mice. *J Nanjing Univ* 1988; 24 : 495
- 7 Slotnick BM, Leonard CM. *A stereotaxic atlas of the albino mouse forebrain*. 1st ed. Maryland: Rockville Press, 1975 : 54-146
- 8 Xu XG, Zhu JQ, Wang XG, Wang FP. Ef-

fects of penicillin and phenobarbital on the ^3H -GABA accumulation in slices of mice brain. *Acta Physiol Sin* 1987; 39 : 516

9 Moldave K. Preparation of RNA from mammalian ribosomes. In: Grossman L, Moldave K, eds. *Methods in Enzymology*, vol 12. Nucleic Acids, Part A. NY: Academic Press,

1967; 607-8

10 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265

11 Chapman DB, Way EL. Metal ion interactions with opiates. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1980; 20 : 553

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1990 Mar, 11 (2) : 113-119

左旋四氢巴马汀及其同类药加强兔电针镇痛

吴 钢、姜建伟、吴根诚、曹小定 (上海医科大学神经生物学教研室, 上海 200032, 中国)

Potentialiation of electroacupuncture analgesia by *l*-tetrahydropalmatine and its analogues in rabbits

WU Gang, JIANG Jian-Wei, WU Gen-Cheng, CAO Xiao-Ding

(Department of Neurobiology, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT *l*-Tetrahydropalmatine (*l*-THP), tetrahydroberberine (THB) and *l*-stepholidine (*l*-SPD) are the homologues of tetrahydroprotoberberines and have a common antagonistic effect to central dopamine receptors. In the present experiment, the potassium iontophoretic dolorimetry was used to determine the pain threshold of rabbits. Unilateral "Hegu" point (the dorsum of the front paw, between 1st and 2nd metacarpals) and "Waiguan" point (the dorsum of the foreleg, between radius and ulna, 2 cm above the wrist joint) of each rabbit were electrically needled. The effects of iv *l*-THP 8 mg/kg, THB 16 mg/kg or *l*-SPD 4 mg/kg on electroacupuncture analgesia were investigated. The experimental results indicated that these 3 agents enhanced the potency of electroacupuncture analgesia and prolonged the duration as well. This investigation gives the evidence that the drug possessing antagonistic effect to central dopamine receptors could be used as a synergist of acupuncture analgesia.

KEY WORDS *l*-tetrahydropalmatine; tetrahydroberberine; *l*-stepholidine; acupuncture; analgesia; berberines

Received 1989 Mar 10 Accepted 1989 Sep 18

摘要 在兔 K^+ 透入测痛模型上, iv *l*-THP 8 mg/kg 及其同类药 THB 16 mg/kg 和 *l*-SPD 4 mg/kg 加大电针单侧“合谷”和“外关”穴引起的痛阈升高幅度, 并延长痛阈升高的持续时间, 表明 *l*-THP、THB 和 *l*-SPD 具有加强电针镇痛强度和延长电针镇痛后效应的作

关键词 *l*-四氢巴马汀; 四氢小檗碱; *l*-千金藤定; 针刺; 镇痛; 小檗因类

左旋四氢巴马汀 (*l*-tetrahydropalmatine, *l*-THP) 具有镇痛、镇静、肌松和抗心律失常等多种药理功能, 副作用小, 呼吸抑制轻微, 为临床广泛应用的一种非麻醉性镇痛药⁽¹⁻⁴⁾。四氢小檗碱 (tetrahydroberberine, THB)^(2,5) 和左旋千金藤定 (*l*-stepholidine, *l*-SPD)⁽⁶⁾ 具有与 *l*-THP 相似的化学结构和药理功能, 为已在临床应用的两个 *l*-THP 同类药。现已证实 *l*-THP, THB 和 *l*-SPD 可阻断中枢多巴胺受体, 是脑内新类型多巴胺受体阻滞剂⁽⁷⁻⁹⁾。一些中枢多巴胺受体阻滞剂具有加强针刺镇痛的作用⁽¹⁰⁻¹²⁾。为进一步了解中枢多巴胺系统与针刺镇痛的关系, 并寻找合理的针刺镇痛的增效剂以提高针刺麻醉的疗效, 本文采用兔实验, 试将 *l*-THP 与电针联合应用, 观察 *l*-THP 对电针镇痛的影响, 比较其同类药 THB 和 *l*-SPD 对电针镇痛的作用。

MATERIALS AND METHODS

l-THP 注射液 (广东湛江制药厂)。THB 和 *l*-SPD 由中国科学院上海药物研究所提供。