

## 曲马多对大鼠的镇痛作用

K M DHASMANA, A K BANERJEE<sup>1</sup>, W RATING, W ERDMANN (Department of Anaesthesiology, <sup>1</sup>Laboratory Animal Centre, Faculty of Medicine, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands)

**摘要** 用甩尾法和热板法研究了鞘内和皮下注射曲马多(tramadol)对大鼠的镇痛作用。可能由于曲马多快速从蜘蛛膜下腔消除,故鞘内注射仅有短暂(20 min)的镇痛作用。虽然去甲肾上腺素能系统、色胺系统和胆碱能系统可能在曲马多的镇痛作用中起调节作用,

但预先用纳洛酮(2 mg/kg, sc)处理大鼠,可拮抗此镇痛作用,似乎表明阿片系统也参与曲马多的镇痛作用。

**关键词** 曲马多;阿片;皮下注射;脊髓注射;镇痛;痛

\* \* \* \* \*

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Jul, 10 (4): 294-297

## 血管紧张素 II 在兔脑导水管周围灰质对抗吗啡镇痛并参与吗啡耐受的形成

王晓民<sup>1</sup> 韩济生 (北京医科大学生理教研室, 北京 100083, 中国)

### Antagonism to morphine analgesia and involvement in morphine tolerance of angiotensin II in periaqueductal gray of the rabbits

WANG Xiao-Min<sup>1</sup>, HAN Ji-Sheng

(Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

**ABSTRACT** The stainless steel cannulas were implanted to ♂ rabbits of 2.0-2.6 kg, under Na-pentobarbital anaesthesia with the aid of a stereotaxic instrument. Co-ordinates of the locations of the implantations were P 9.5, LR 1.0, H 10.0 mm (under outer surface of the skull) on both sides of periaqueductal gray (PAG). After 1 wk, nociception was assessed by measuring the latency of the escape response (ERL) elicited by strong radiant heat focused on the nose of rabbits. The analgesic effect of

morphine (4 mg/kg, iv) was blocked by injecting angiotensin II (AII, 0.1 µg) into PAG ( $P < 0.01$ , ANOVA), but not by injecting the same dose of AII into the vicinity of PAG ( $P > 0.05$ , ANOVA). Morphine tolerance was induced by iv infusion of morphine for 2 d, the dose being 50 mg/(kg·8 h) on d 1 and 75 mg/(kg·8 h) on d 2. On d 3, the degree of tolerance was checked by the analgesia induced by iv morphine 4 mg/kg. Tolerance was partly reversed by injecting AII anti-serum 2 µl into PAG ( $P < 0.01$ , ANOVA). The results suggest that AII in PAG is antagonistic to morphine analgesia and is involved in

Received 1988 Apr 19 Accepted 1989 Feb 21  
<sup>1</sup>Now in: Department of Pathophysiology, Dalian Medical College, Dalian 116023, China.

the development of morphine tolerance.

**KEY WORDS** periaqueductal gray; angiotensin II; morphine; analgesia; drug tolerance

**摘要** 以辐射热甩头法测定免痛阈,在中脑导水管周围灰质(PAG)注射血管紧张素II(AII)0.1 $\mu$ g使iv吗啡4 mg/kg的镇痛作用显著减弱,注入PAG附近脑区则无效。连续2d静脉滴注吗啡50-75 mg/(kg·8h)导致吗啡耐受后,PAG注射AII抗血清2 $\mu$ l可使吗啡镇痛作用重新出现。说明PAG内的AII参与吗啡耐受的形成。

**关键词** 水管周灰质; 血管紧张素II; 吗啡; 镇痛; 药物耐受性

Kaneko等首次从牛脑中分离纯化出一种具有抗阿片作用的活性物质,并定名为血管紧张素II(angiotensin II, AII)<sup>(1)</sup>。给小鼠<sup>(2)</sup>或大鼠<sup>(3)</sup>侧脑室注射AII对吗啡镇痛有明显的对抗作用,但脑内的具体作用部位不明。中脑导水管周围灰质(periaqueductal grey, PAG)是吗啡产生镇痛作用的重要部位<sup>(4,5)</sup>。本工作将微量的AII注入免PAG,观察是否能对抗吗啡镇痛;并将AII抗血清注入PAG,观察是否能对抗吗啡耐受。

## MATERIALS AND METHODS

♂兔,体重2.3 $\pm$ SD 0.3 kg,在20 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C进行实验。

**埋植套管** 用戊巴比妥钠30 mg/kg iv麻醉后,将兔头固定于立体定位仪(日本Narishige)上<sup>(6)</sup>,双侧PAG埋植0.8 mm不锈钢套管。定位坐标为P 9.5, LR 1.0, H(自颅骨面向下)10.0 mm,套管全长14.5 mm,用牙科聚丙烯树脂将套管固定,插入管芯封闭。术后1 wk开始实验,全部实验在5 wk内完成。

**测痛** 以辐射热甩头法测定兔鼻唇部皮肤的痛阈。取辐射热照射开始至兔甩头的时间(escape response latency, ERL, s)作为伤害性刺激反应阈,即痛阈,每隔5 min测痛一次,

连续测3次,取平均值作为基础痛阈,一般在4-6 s范围。注射药物后每隔10 min测一次,所测得值与基础痛阈相比,以变化%表示,若痛阈升高超过200%时则停止照射以免灼伤皮肤,以200%作为痛阈增加的最高值。

盐酸吗啡(青海制药厂出品)4 mg/kg经耳缘静脉iv,注射量为1 ml。脑内注射时,将注射管(外径0.35 mm)自埋植套管插入脑内,伸出套管下端2.0 mm。用恒速微量器向脑内注入NS或药液1 $\mu$ l, AII抗血清或正常兔血清2 $\mu$ l,均在8 min内注射完毕。

AII抗血清由本实验室免疫兔获得。放射免疫测定的滴度为1:22 000(50%结合率),亲和常数 $K_d$ 为2.627 $\times$ 10<sup>6</sup> GL/mol与强啡肽1-13、甲硫脑啡肽、 $\beta$ -内啡肽和血管紧张素I的交叉反应均小于0.1%。

**吗啡耐受的形** 测定免基础痛阈后,经耳缘静脉点滴吗啡的5%葡萄糖盐水120 ml约8 h滴完,连续点滴2 d, d1吗啡量50 mg/kg, d2为75 mg/kg。d2点滴结束后14至15 h将吗啡耐受兔随机分为两组进行测痛实验。

**注射部位鉴定** 最后一次实验结束后,iv KCl将兔处死,按原注射管长度自套管插入0.3 mm的不锈钢丝,用10%福尔马林将脑固定,2 wk后取脑作0.5 mm连续冰冻切片,确定注射部位。凡注射管端不在PAG内者其资料另成为一组(注射部位对照组)。用方差分析(ANOVA)进行显著性检验。

## RESULTS

**单侧PAG注射AII对免痛阈的影响** 10只兔随机均分为两组,均iv NS 1 ml/kg,10 min后,单侧PAG注射AII 0.1 $\mu$ g或NS 1 $\mu$ l。每10 min测痛一次共60 min。在此期间NS组的痛阈最大变动值在-2 $\pm$ 14~+27 $\pm$ 26%之间, AII组在-2 $\pm$ 6~+10 $\pm$ 14%之间,经方差分析统计两组之间 $P>0.05$ 。

**单侧PAG注射AII对抗iv吗啡4 mg/kg的镇痛作用** 24只兔,随机均分为2组,均iv

吗啡 4 mg/kg, 10 min 后痛阈分别为  $187 \pm 8$  与  $170 \pm 48\%$ 。此时向单侧 PAG 注射 AII  $0.1 \mu\text{g}$ 。对照组注 NS  $1 \mu\text{l}$ 。从 Fig 1 A 可见, AII 组在注药 20 min 后痛阈开始迅速下降, 至 1 h 末为  $38 \pm 44\%$ ; NS 组在 20 min 时痛阈达峰值为  $197 \pm 8\%$ , 尔后缓缓降低, 1 h 末为  $110 \pm 71\%$ 。两组差异非常显著, 说明单侧 PAG 注射 AII 可翻转吗啡的镇痛作用 ( $P < 0.01$ )。从 Fig 1 B 可见, 注射管端未命中(在 PAG 邻近部位)的兔, 注射 AII  $0.1 \mu\text{g}$  对吗啡镇痛并无明显对抗作用。

**单侧 PAG 注射 AII 抗血清 加速吗啡耐受的恢复** 17 只兔, 连续 2 d 静滴吗啡, d1 为  $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot 8 \text{ h})$ , 痛阈上升的最高值为  $152 \pm 55\%$ , 8 h 末痛阈升高  $107 \pm 76\%$ ; d2 吗啡剂量增加到  $75 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot 8 \text{ h})$ , 但痛阈最高只上升  $128 \pm 81\%$ , 8 h 末痛阈为  $64 \pm 75\%$ , 均低于 d1 的相应值, 表明产生了吗啡耐受 (Tab 1)。

Tab 1. Effect on pain threshold after iv infusion of morphine in rabbits.  $n = 17, \bar{x} \pm \text{SD}$ .

h	Change of pain threshold (%)	
	d 1 morphine 50 mg/(kg·8 h)	d 2 morphine 75 mg/(kg·8 h)
1	$31 \pm 62$	$45 \pm 61$
2	$120 \pm 76$	$78 \pm 80$
3	$136 \pm 67$	$112 \pm 77$
4	$152 \pm 55$	$121 \pm 75$
5	$124 \pm 59$	$128 \pm 81$
6	$144 \pm 73$	$119 \pm 82$
7	$116 \pm 80$	$94 \pm 74$
8	$107 \pm 76$	$64 \pm 75$

将对吗啡耐受的兔随机分为 A, B 两组, 在 d3 分别 iv 吗啡  $4 \text{ mg}/\text{kg}$ , 10 min 时痛阈平均升高  $52 \pm 43$  和  $62 \pm 27\%$ 。此时 A 组 ( $n = 9$ ) 单侧 PAG 注入 AII 抗血清, B 组 ( $n = 8$ ) 注正常兔血清各  $2 \mu\text{l}$ 。从 Fig 2 可见, PAG 注射正常兔血清的兔痛阈逐渐下降, 而注射 AII 抗血清的兔痛阈上升至  $116 \pm 65\%$ , 在注射后 1 h 内均高于对照组, 两组差异非常显著 ( $P < 0.01$ )。



Fig 1. Effects of unilateral injection of angiotensin II (AII  $0.1 \mu\text{g}$ , ●) or normal saline (NS  $1 \mu\text{l}$ , ○) into periaqueductal gray (PAG) (A,  $n = 9$ ,  $***P < 0.01$ ) or the vicinity of PAG (B,  $n = 7-8$ ,  $*P > 0.05$ ) on morphine anaesthesia. ↓ (0 min) iv morphine  $4 \text{ mg}/\text{kg}$ ; AII injection, ERL = escape response latency,  $***P < 0.01$  or  $*P > 0.05$  vs NS  $P$  values were calculated according to analysis of variance (ANOVA).

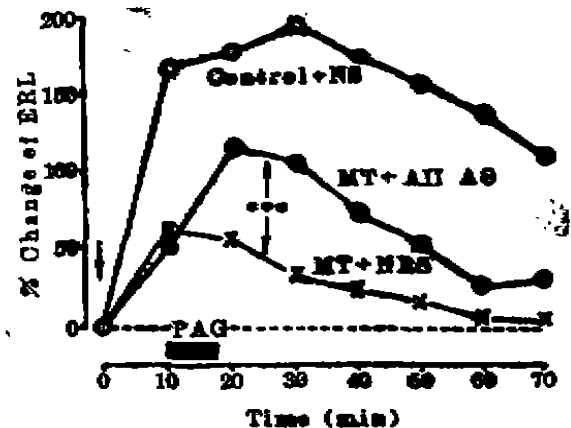


Fig 2. Partial reversal of morphine tolerance (MT) by unilateral injection of AII antiserum (AII AS,  $2 \mu\text{l}$ ) or normal rabbit serum (NRS,  $2 \mu\text{l}$ ) to PAG.  $n = 7-9$ ; ↓ (0 min) iv morphine  $4 \text{ mg}/\text{kg}$ ;  $***P < 0.01$  vs MT + NRS group.  $P$  values were calculated according to analysis of variance (ANOVA).

说明 AII 抗血清翻转了吗啡耐受。但这种翻转只是部分的, 因为正常兔在 iv 吗啡 10 min 后痛阈升高  $170 \pm 58\%$ , 在 PAG 注 NS  $2 \mu\text{l}$  后 30 min 痛阈上升的最高值达  $197 \pm 8\%$ 。上述结果表明中枢 AII 参与吗啡耐受的形成。

## DISCUSSION

Kaneko 等在提取脑内抗阿片物质时是用离体豚鼠回肠纵行肌收缩作为检测指标, 吗啡抑制收缩, 而 AII 对抗吗啡的作用<sup>(1)</sup>。在整体实验中, icv AII 能对抗吗啡的镇痛<sup>(2,3)</sup>。PAG 是脑内与镇痛有关的重要神经结构之一<sup>(7,8)</sup>。本工作证明在 PAG 内微量注射 AII 可明显对抗吗啡镇痛, 注射管端偏斜到 PAG 外的则无效。说明 AII 的抗吗啡镇痛作用有高度的部位特异性。PAG 内既有阿片受体<sup>(9)</sup>, 也有 AII 受体<sup>(9,10)</sup>。但有实验证实 AII 与阿片受体并不发生特异性结合<sup>(1)</sup>。因此 AII 的抗吗啡镇痛作用不是在阿片受体上发生竞争性拮抗, 而很可能是通过 AII 受体介导的一种生理性拮抗。离体实验证明, 吗啡可抑制大鼠脑突触小体对  $Ca^{2+}$  的摄取, 其作用可被阿片受体阻断剂纳洛酮所阻断<sup>(11)</sup>; AII 可促进突触小体对  $Ca^{2+}$  的摄取, 其作用可被 AII 受体的阻断剂 saralasin 所阻断。将 AII 与吗啡合并应用时, AII 能完全翻转吗啡对突触小体  $Ca^{2+}$  摄取的抑制作用(待发表资料)。此外, 吗啡可明显降低脑内 cAMP 含量, 而 AII 可明显升高脑内 (PAG) cAMP 的含量, 这可能是 AII 抗吗啡镇痛作用的部分机理。

反复注射吗啡可引起动物或人体对吗啡镇痛发生耐受。为探讨具有抗吗啡镇痛作用的 AII 是否参与吗啡耐受的形成, 本工作运用微量注射 AII 抗血清以选择性取消 AII 生理功能的方法, 发现 PAG 注射 AII 抗血清可以部分翻转吗啡耐受, 促进吗啡镇痛作用的恢复, 说明 PAG 内 AII 的抗吗啡功能加强, 是产生吗啡耐受的重要原因。有资料表明, 当长期应用吗啡导致耐受时, 吗啡对鼠脑突触小体  $Ca^{2+}$  摄取的抑制作用减弱, 甚至可增加  $Ca^{2+}$  摄取<sup>(12)</sup>。本实验室最近的工作表明, 大鼠吗啡耐受时, 脑脊液中 AII 样免疫活性物质成倍增加, 脑内 AII-mRNA 含量明显升高(待发表资料)。可以设想, 当连续给予吗啡作用时, 中枢 AII 的

合成和释放大幅度增加, 促进了突触小体的  $Ca^{2+}$  摄取和 cAMP 生成, 与吗啡抑制  $Ca^{2+}$  摄取和减少 cAMP 生成的突触后效应恰呈相反的变化, 这可能是导致出现吗啡耐受的机理之一。

致谢 赵淳同志参加技术工作。

## REFERENCES

- 1 Kaneko S, Tamura S, Takagi H. Purification and identification of endogenous anti-opioid substances from bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126 : 587
- 2 Kaneko S, Mōri A, Tamura S, Satoh M, Takagi H. Intracerebroventricular administration of angiotensin II attenuates morphine-induced analgesia in mice. *Neuropharmacology* 1985; 24 : 1131
- 3 Wang KW, Xie GX, Han JS. Angiotensin II antagonizes morphine analgesia in the brain but not in the spinal cord. *Kexue Tongbao* 1987; 32 : 383
- 4 Tsou K, Jang CS. Analgesic effect of intraventricular or intracerebral micro-injection of morphine. *Acta Physiol Sin* 1962; 25 : 119
- 5 Bennett GJ, Mayer DJ. Inhibition of spinal cord interneurons by narcotic microinjection and focal electrical stimulation in the periaqueductal central grey matter. *Brain Res* 1979; 172 : 243
- 6 Sawyer CH, Everett JW, Green JD. The rabbit diencephalon in stereotaxic coordinates. *J Comp Neurol* 1954; 101 : 801
- 7 Han JS. Acupuncture analgesia: its neuronal pathways and the relevant neurotransmitters. *Prog Physiol Sci* 1984; 15 : 294
- 8 Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; 179 : 1011
- 9 Lind RW, Swanson LW, Ganten D. Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. *Neuroendocrinology* 1985; 40 : 2
- 10 Sirett NE, Hubbard JI, Bray JJ. Brain angiotensin II receptors. *Exp Brain Res* 1985; 4 (Suppl) : 233
- 11 Guerrero-Munoz F, Cerreta KV, Guerrero ML, Way EL. Effect of morphine on synaptosomal  $Ca^{2+}$  uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 209 : 132