

大鼠中脑导水管周围灰质内注入氯化钙对吗啡抑制丘脑束旁核痛诱发放电的拮抗

陈肇熙、黄彰海 (第一军医大学生理教研室, 广州 510515)

提要 吗啡 3 mg/kg, ip 或在中脑导水管周围灰质(PAG)内注入生理盐水 0.5 μ l + ip 吗啡后, 均可明显抑制由电刺激腓神经所引起的丘脑束旁核(Pf)内痛兴奋神经元单位放电的痛诱发放电(PEvD)。注射CaCl₂ 15 nmol/L 0.5 μ l 于PAG内, 5 min后ip吗啡则上述对PEvD的抑制作用被明显减弱或消除。若将同量CaCl₂注入PAG的外侧则无拮抗作用。

关键词 水管周灰质; 丘脑; 痛; 诱发电位; 吗啡; 氯化钙; EGTA; 维拉帕米

钙与吗啡镇痛有关⁽¹⁾。中枢Ca²⁺能对抗吗啡的镇痛, 而吗啡的镇痛作用可能就在于它降低了中枢某些部位钙的功能而实现⁽²⁻⁴⁾。但以上报道均以甩头、甩尾(兔、大鼠或小鼠)为指标, 本文以电刺激大鼠腓神经所引起的丘脑束旁核(parafascicular nu of thalamus, Pf)中痛-兴奋神经元的痛诱发放电(pain evoked discharge, PEvD)为指标, 观察中脑导水管周围灰质(periaqueductal gray, PAG)内注入CaCl₂, EGTA或维拉帕米对ip吗啡抑制Pf的PEvD作用是否有影响, 探讨吗啡对此二核团的作用以及两核团间的联系。

材料和方 法

盐酸吗啡(3526工厂, 南方医院药局惠赠), EGTA(Sigma公司), 维拉帕米(verapamil, Isoptin, Knoll AG Chemical Works)。

Sprague-Dawley大鼠♂, 体重277 \pm SD 11 g。10%水合氯醛4 ml/kg ip短时麻醉, 气管插管、分离左侧腓神经、将头固定于SN-I-M脑立体定位仪上、暴露颅骨并依脑立体定位图

谱⁽⁵⁾钻孔以备插入微电极和注射针头。大鼠清醒后在箭毒制动和人工呼吸下进行实验。Pf坐标选用右侧前后-2.2至-2.4、左右1.0至1.4、脑表面下4.9至6.3。用充灌2%滂胶天蓝的NaAc溶液(0.5 mol/L)的玻璃微电极(ϕ 1-3 μ m, 10-30 M Ω , 借Narschige微电极推进器插入Pf, 鉴定并记录Pf中痛-兴奋神经元的细胞外单位放电。放电信号经WF-I微电极放大器、FZG-IA直流前置放大器输入SBR-I双线示波器监视和供磁带录音, 同时将示波器放大后的信号输入兼有削波整形功能的频率监听器⁽⁶⁾进行监听。削波后的信号用ATAD-861生理数据处理机⁽⁷⁾进行放电脉冲的序列密度联机处理, 即时打印出直方图和每一地址(address)的放电数据(选用64个地址, 每一地址200 ms)。电刺激腓神经是用JSD-731 C刺激器, 波宽0.5 ms、频率100 Hz、串长30 ms、电压20-30 V经Pt电极施予。

在脑立体定位仪的另一电极架上固定一支1 μ l微量注射器作为PAG内注射之用。PAG坐标为左侧前后-6.2至-6.4、左右0.4至0.8、脑表面下5.5至5.6。每次注射量均为0.5 μ l, 在2 min内注完。

结果的计算, 以注射前Pf的痛诱发放电数作为100%, 计算注射后5, 10, 20, 30, 40 min放电增减的%, 进行t测验, 与盐水对照组做组间对比。

实验过程中监测大鼠心电和肛温。实验后用电泳法将玻璃微电极内的滂胶天蓝泳入记录部位, 并经微量注射器向原注入部位注入此染料, 切片检查电极尖端和注射针尖的位置。

结 果

ip 吗啡的作用 单独 ip 吗啡(3 mg/kg, n=10)后的 5-40 min 内 Pf 的痛诱发放电受到明显抑制, 在 10-40 min 期间, 分别比 ip 盐

水降低 40 ± 56 , 60 ± 47 , 80 ± 32 , 80 ± 31 .

PAG 内注入 CaCl_2 对痛诱发放电的影响

单独注入 $0.5 \mu\text{l}$ CaCl_2 15 nmol/L (n=6), 与注入生理盐水 $0.5 \mu\text{l}$ (n=7) 相比, 在 40 min 观察期内痛诱发放电无明显差异(图1-A₁).

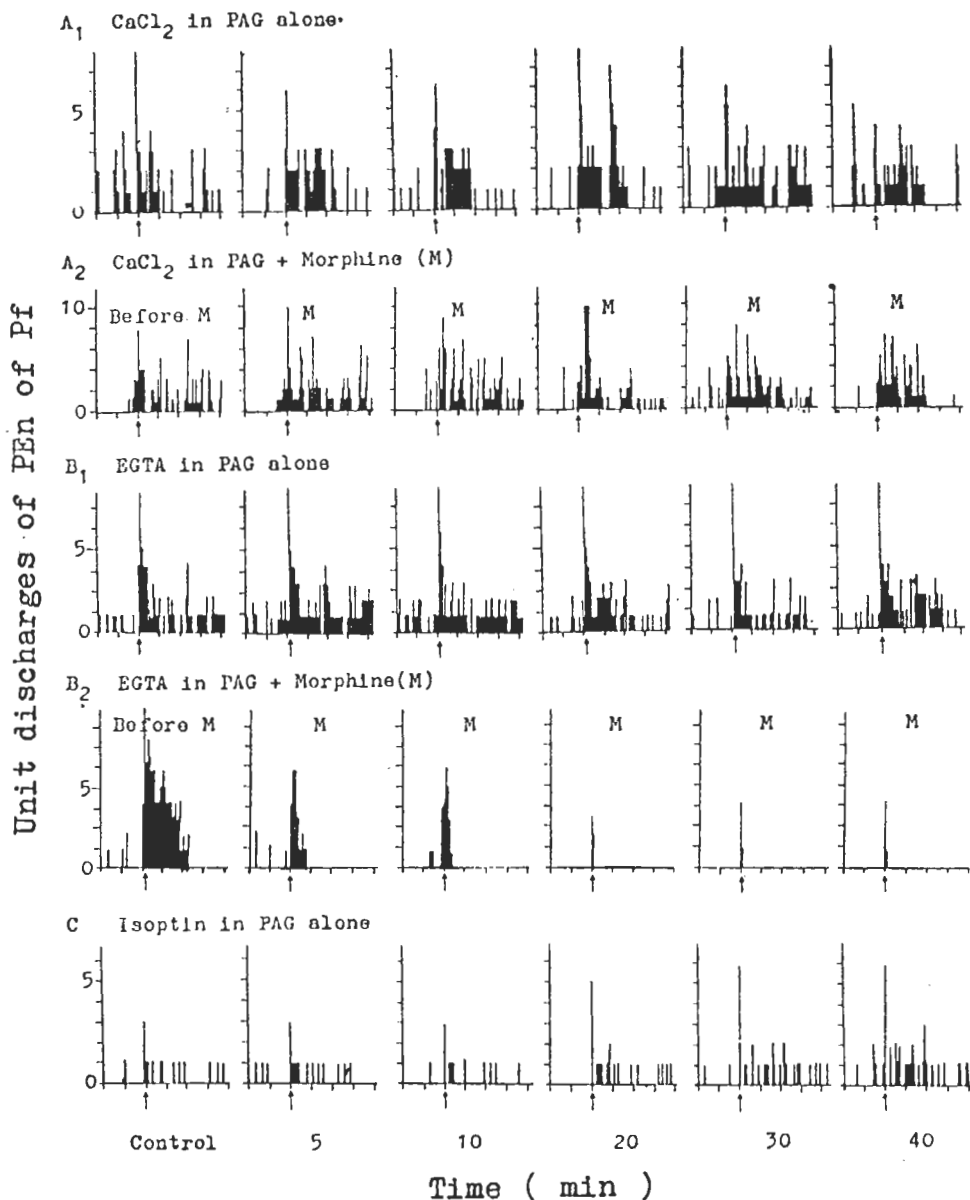


Fig 1. Unit discharges of pain-excitatory neuron (PEN) in parafascicular nu(Pf) of thalamus. Ordinate: Spikes/200 ms. Abscissa: 2 s/scale (10 addresses). \uparrow Electrical stimulation of peroneal nerve. Spontaneous discharges (before \uparrow) and pain-evoked discharges (after \uparrow). A₁) After injection of CaCl_2 (15 nmol/L, $0.5 \mu\text{l}$) into periaqueductal grey(PAG) without ip morphine; A₂) Showing the inhibitory effect of morphine no longer appeared after CaCl_2 injection into PAG; B₁) No effect after injection of EGTA (25 nmol/L, $0.5 \mu\text{l}$) into PAG alone; B₂) Showing the marked inhibitory effect of ip morphine after EGTA injected into PAG; C) No effect after injection of isoptin (2.5 mg/ml, $0.5 \mu\text{l}$) into PAG alone.

PAG 内 CaCl_2 + ip 吗啡 PAG 内注入 CaCl_2 (15 nmol/L, 0.5 μl), 5 min 后 ip 吗啡, 在吗啡后 40 min 内痛诱发放电不再受到吗啡的抑制 ($n=7$) (图 1-A₂ 和图 2), 与 PAG 内注入生理盐水 + ip 吗啡组 ($n=9$) 相比在吗啡后 10-40 min 内, 差异均非常显著 (图 2)。

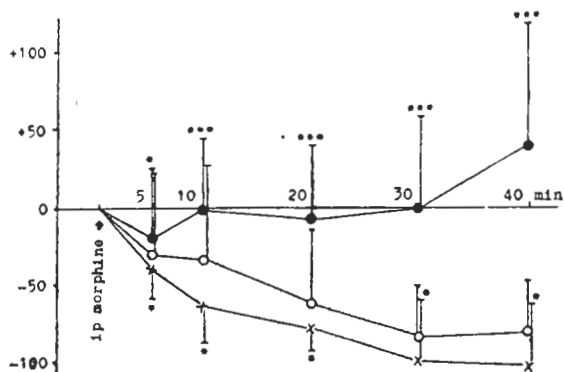


Fig 2. Changes of pain-evoked discharges after ip morphine 3 mg/kg ($\bar{x} \pm \text{SD}$). (○) Saline (0.5 μl) into PAG + ip morphine. (●) CaCl_2 (15 nmol/L, 0.5 μl) into PAG + morphine. (×) CaCl_2 (15 nmol/L, 0.5 μl) injected into the site lateral to PAG + ip morphine. * $p > 0.05$, *** $p < 0.01$

PAG 外侧注入 CaCl_2 + ip 吗啡 将 15 nmol/L 的 CaCl_2 0.5 μl 注于 PAG 的外侧 (旁开 2.0, 前后和深度坐标同 PAG), 不能对抗 ip 吗啡对 Pf 的痛诱发放电的抑制作用 ($n=7$) (图 2)。与 PAG 内注入 CaCl_2 组相比, 差异非常显著。

PAG 内注入 EGTA 的作用 单独把 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA (25 nmol/L, 0.5 μl) 同法注入 PAG, 在 40 min 内未见 Pf 的痛诱发放电有明显变化 ($n=7$, 图 1-B₁), 与盐水对照组相差并不显著。同量的 EGTA 注入 PAG, 5 min 后再 ip 吗啡, 从吗啡后 5 min Pf 的痛诱发放电即开始受到非常明显的抑制 ($n=7$, 图 1-B₂)。

PAG 内注入维拉帕米的作用 单独将 Ca^{2+} 通道阻断剂维拉帕米 (2.5 mg/ml, 0.5 μl) 注入 PAG, 40 min 内未观察到对 Pf 的痛诱发放电有何明显影响 ($n=15$), 与单独向 PAG 内注入生理盐水组 ($n=7$) 相比无明显差异 (图 1-C)。

讨 论

本实验见到单独 ip 吗啡或事先向 PAG 内注入生理盐水再 ip 吗啡, Pf 的痛诱发放电均受到显著抑制。若 PAG 内注入极微量 CaCl_2 再 ip 吗啡, 吗啡的抑制作用就受到显著对抗。这与用兔热辐射甩头法所得结果⁽⁴⁾相符, 也与用小鼠热辐射甩尾法的结果^(8,9)相符。只是他们所用 CaCl_2 的剂量 (15-20 nmol) 远比本文中的为大。本实验中曾将 CaCl_2 注入 PAG 外侧, 就不能对抗 ip 吗啡的抑制作用, 说明 CaC 作用部位的专一性。以上用 Pf 痛兴奋神经元单位放电为指标的结果, 也支持人工注射 CaCl_2 可以翻转吗啡与受体结合后所引起的 Ca^{2+} 耗竭效应的设想⁽¹⁰⁾。

本实验中还见到单独向 PAG 内注入 CaCl_2 、阳离子螯合剂 EGTA 或 Ca^{2+} 通道阻断剂维拉帕米以改变 PAG 内 Ca^{2+} 的含量而不 ip 吗啡, 在 40 min 观察期内, 与生理盐水组对比, 均未见到其对 Pf 痛诱发放电有明显影响, 而当 EGTA + ip 吗啡, 就显著抑制痛诱发放电。这与 Chapman 和 Way⁽²⁾的结果不同, 他们报告 EDTA, EGTA 和 La^{3+} 本身即可镇痛, 而 icv Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} 可致痛觉过敏。这一差异可能主要在于试剂的用量不同、动物种类以及给药途径等不同所致。本文结果与金文泉等向家兔膈区注入 CDTA 不能改变其热辐射甩头痛阈⁽¹⁰⁾相符。

从本文结果看, 吗啡抑制 Pf 痛诱发放电, 不是直接作用于 Pf 而是通过 PAG 起作用的。但似乎又不能单纯归之于吗啡使 PAG 内 Ca^{2+} 耗竭, 因为单纯人为地造成 PAG 内 Ca^{2+} 减少并不能抑制 Pf 痛诱发放电。因此, 有理由设想吗啡激活了 PAG 内某种结构进而抑制 Pf 的痛反应, 在此过程中包含着 Ca^{2+} 的环节。谢贻芳等⁽¹¹⁾用弱电刺激 PAG 与 ip 吗啡相似, 均可抑制 Pf 内痛敏神经元的放电反应, 切断 T₁₂-L₁ 背侧 1/2 后上述效应仍存在。这一结果间接支持我们的上述设想。虽然已知 PAG 有

纤维发出至 Pf^(12,13)但此二核团间的机能联系尚未明了。耿皖平等⁽¹⁴⁾用大鼠甩尾法见到 icv CaCl₂ 可拮抗 sc 可乐定的镇痛作用, 而 EGTA 可增强之。本实验条件下 ip 吗啡对 Pf 放电的抑制作用是否也通过 α_2 受体环节, 尚待探讨。

参 考 文 献

- 1 Hano K, Kaneto H, Kakunaga T. Significance of calcium ion in the morphine analgesia. *Jpn J Pharmacol* 1964; 14 : 227
- 2 Chapman DB, Way EL. Metal ion interactions with opiates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1980; 20 : 553
- 3 张祖暄、胡卫东、陈荣三。钙离子在电针镇痛中的作用。科学通报 1977; 22 : 454
- 4 周仲福、康保娥、谢国玺、韩济生。家兔缰核和导水管周围灰质内微量注射氯化钙拮抗电针和吗啡的镇痛作用。生理学报 1985; 37 : 463
- 5 Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. *A stereotaxic atlas of the rat brain*. 2nd ed. NY: Plenum Press, 1979: -2.2, -2.3, -2.4, -6.2, -6.3, -6.4
- 6 梁联中。设有频率指示的电生理监听器。第一军医大学学报 1986; 6 : 82
- 7 陈肇熙、张岷、孙闻颖、李伟鹏、张枫桐、梁联中。单板计算机在电生理教学实验中的应用。广东生理学通报 1986; 3 : 111
- 8 张祖暄、童静波、葛鸣、陈荣三。钙离子对小鼠电针镇痛和吗啡镇痛影响的相似性。生理学报 1983; 35 : 172
- 9 张祖暄、张媛贞、余启祥、李春宝、陈荣三。吗啡镇痛和电针镇痛的共同离子基础。科学通报 1980; 25 : 375
- 10 金文泉、周仲福、韩济生。家兔膈区和伏核内钙、镁离子对抗电针镇痛与吗啡镇痛。药理学报 1985; 20 : 726
- 11 谢贻芳、乔健天。刺激兔中脑导水管周围灰质对束旁核单位放电的影响。生理学报 1981; 33 : 170
- 12 Ruda MA. An autoradiographic study of the efferent connection of the midbrain central gray in the cat. *Anat Rec* 1975; 181 : 468
- 13 汤凤彩、王云祥、蔡德亨。大白鼠丘脑束旁核的传入纤维联系——HRP 法研究。解剖学报 1983; 14 : 404
- 14 耿皖平、徐叔云。可乐定镇痛与中枢 Ca²⁺ 的关系。药理学报 1987; 22 : 170

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Nov, 9 (6) : 504-507

Antagonism of CaCl₂ injected into periaqueductal gray on the inhibitory action of morphine on pain-evoked discharges of parafascicular nucleus in rats

CHEN Zhao-Xi, HUANG Zhang-Hai

(Department of Physiology, The First Medical College of PLA, Guangzhou 510515)

ABSTRACT Electrical stimulation of the peroneal nerve in Sprague-Dawley rats induced pain-evoked discharge (PEvD) of the parafascicular nucleus (Pf). Morphine (3 mg/kg, ip) alone or plus saline 0.5 μ l into the periaqueductal gray area (PAG) markedly inhibited the PEvD of unit discharges of pain-excitatory neurons in Pf. Injection of CaCl₂ (15 nmol/L, 0.5 μ l) into PAG 5 min before ip morphine attenuated or abolished the inhibitory action of morphine on PEvD. The fact that no antagonistic effect of CaCl₂ injected into the site lateral to PAG was seen suggests the specificity of the site of action. CaCl₂, EGTA or verapamil

injected into PAG without ip morphine did not influence the PEvD. Injection of Ca²⁺ into PAG antagonized the inhibitory action of morphine on the PEvD, suggests that the action of morphine takes place via PAG instead of directly in the Pf and can not be attributed entirely to the lack of Ca²⁺ in the PAG. It is concluded that morphine may activate certain structures in the PAG first and then inhibit PEvD of Pf and that Ca²⁺ is involved in this process.

KEY WORDS periaqueductal gray; thalamus; pain; evoked potentials; morphine; calcium chloride; EGTA; verapamil