

吗啡对急性佐剂诱发性关节炎大鼠边缘系统毒蕈碱样胆碱受体的影响¹马晓峰², 端木肇夏, 印其章 (苏州医学院神经生物学研究室, 苏州215007, 中国)Effects of morphine on muscarinic receptors in limbic system in acute adjuvant-induced arthritic rats¹MA Xiao-Feng², DUAN-MU Zhao-Xia, YIN Qi-Zhang (Laboratory of Neurobiology, Suzhou Medical College, Suzhou 215007, China)

ABSTRACT To induce arthritis, the adjuvant with heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* was injected into the ankle joint in rats. Local redness, swelling, hotness, pain, and motor dysfunction of the inflamed joint (as well as mental dullness) were observed 48 h after inoculation. At this time, the maximal binding capacity (B_{max}) of muscarinic receptors in limbic system was increased, while the dissociation constant (K_d) was unchanged. Injection of morphine ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 3 times within 48 h after the inoculation resulted in a decrease of B_{max} and an increase of K_d of M-receptors, together with diminution of pain and disappearance of dullness.

KEY WORDS adjuvant arthritis; muscarinic receptors; pain; morphine; limbic system

摘要 在大鼠右后肢踝关节内侧注射含有灭活结核杆菌的佐剂复制关节炎模型。注射后48 h出现局部红、肿、热、痛、运动障碍以及迟钝等, 这时大脑边缘系统M受体的 B_{max} 明显升高, 而 K_d 无明显改变。在注射佐剂后48 h内注射吗啡($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip)三次, 可使M受体的 B_{max} 下降, K_d 上升, 疼痛减轻, 迟钝消失。

关键词 佐剂诱发性关节炎; 毒蕈碱受体; 疼痛; 吗啡; 大脑边缘系统

佐剂诱发性关节炎的发展过程, 大致可以分为数天以内的早期急性阶段和长达3周左右

Received 1992-01-10

Accepted 1992-11-10

¹ Project supported by Jiangsu Bureau of Chinese Traditional Medicine, No (89)21.

² Now in Nanjing Neuropsychiatric Institute, Nanjing 210029, China.

的后期慢性阶段^[1]。绝大多数的实验研究都在其发展成多发性关节炎的慢性阶段进行, 对其急性阶段的研究, 最近才开始注意^[2,3]。考虑到病理性疼痛伴有明显的情绪改变^[4], 大脑边缘系统是调节情绪的主要部位, 脑内胆碱能系统与镇痛和精神状态密切相关^[5,6]。本实验在佐剂诱发性关节炎的急性阶段, 测定大脑边缘系统毒蕈碱样(M)受体, 并与实验性皮肤痛进行对比, 同时还观察吗啡和电针对M受体的影响。

MATERIALS AND METHODS

关节炎大鼠模型的建立 实验用体重 $226 \pm 18 \text{ g}$ ($n=60$)的成年♂Wistar大鼠, 将含有 $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 灭活结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的完全弗氏佐剂0.1 ml注射到右后肢踝关节内侧软组织内^[7]。预实验发现, 注射佐剂后14 h, 局部呈现炎症现象, 表现为红、肿、热、痛和运动障碍。局部炎症在注射后48 h达高峰, 维持3-4 d。所有实验数据均在注射佐剂后48 h采集。这时病理组织学检查发现, 局部关节周围、关节腔以及滑膜都有明显的炎症细胞浸润。为了进行比较, 还设立实验性皮肤痛组, 方法是将正常大鼠固定于特制的固定架上, 将一对电极插入踝关节周围, 用57-9型痛阈测量仪以阶梯渐升方波给予伤害性刺激, 以大鼠出现躁动和嘶叫为度(1 mA左右), 每次连续刺激5 min。每天上、下午各一次, 在48 h内共刺激5次。

吗啡的处理 在注射佐剂后24, 29和48 h分别给大鼠ip盐酸吗啡(青海制药厂) $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。部分大鼠在相同时间分别在注射侧外踝和跟腱连线的中点(相当于人体的“昆仑”穴), 用G6805型治疗仪(上海医疗器械厂)给予12.5 Hz和45 Hz相交替的4 mA刺激, 电针三次, 每次持续5 min。

一般状态的观察 在注射佐剂后48 h, 在踝关节取一固定点, 用外卡尺测量踝关节的前后径(mm), 用半导体点温计(上海医用仪器厂)测踝关节皮肤温度

(°C)。以引起大鼠嘶叫的电流强度(mA)作为痛阈,连测3次取 \bar{x} 。同时还观察大鼠的行为改变。

全部测量结束后,处死大鼠,取脑边缘系统测M受体。

脑边缘系统 根据 Paxinos 和 Watson 的大鼠脑图谱,取前脑包括梨状皮层、眶回、胼胝体下回、海马回、视前区、下丘脑和海马在内的边缘系统结构,置于预冷的 Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹(pH 7.2)缓冲液中悬浮,匀浆45-60 s。取匀浆液在4°C下32 000×g离心20 min,弃上清液,再加入缓冲液,以同样的条件匀浆离心。最后沉淀物用预冷的 Tris-HCl 50 mmol·L⁻¹缓冲液悬浮,置-30°C备用。膜制备中蛋白含量用双缩脲法测定。

测定 M 受体 放射配体是 [³H]二苯羟乙酸奎宁酯(quinuclidinyl benzilate, QNB),放射性活度1535.5 TBq·mol⁻¹(英国 Amersham International plc)。非标记配体用 Chlorimipramine (瑞士 Ciba 公司) 12.5 μmol·L⁻¹、 [³H]QNB 0.11, 0.22, 0.45, 0.90, 1.80, 3.60 nmol·L⁻¹ 分别和1 mg 上述制备的膜蛋白混合,并加入缓冲液或 Chlorimipramine 溶液,双复平行管。37°C水浴30 min后,置冰水中5 min,迅速通过69-II型纤维滤膜(上海虹光造纸厂)进行负压抽滤。滤膜经90°C, 30 min烘干后置于闪烁液中平衡2 h,经 FFJ-21010型双道液体闪烁计数器国营二六二厂)记录。实测值通过 Scatchard plot, 得出 [³H]QNB 对 M 受体特异性结合的最大结合数(B_{max})及其平衡解离常数(K_d)值。

RESULTS

关节炎大鼠的一般状态 大鼠在注射佐剂后48 h,右后踝关节出现典型的免疫反应性炎症,表现为红、肿、热、痛和机能障碍。炎症

关节粗大,皮肤温度升高和痛阈下降,与正常对照组相比都有显著差异,但尾部痛阈无明显改变(Tab 1)。大鼠安静时少动,迟钝和理毛次数减少,当刺激时出现易激惹的情绪表现和炎症肢体的运动障碍。

大鼠边缘系统的 M 受体 注射佐剂后48 h 边缘系统 M 受体的 B_{max}明显高于正常对照组和皮肤痛组。但 K_d与正常对照组和皮肤痛组没有显著差异(Tab 2)。

Tab 2. Muscarinic receptors in limbic system of rats. $\bar{x} \pm s$. *P>0.05, †P<0.01 vs control and cutaneous pain. †P>0.05, ††P<0.05, †††P<0.01 vs arthritis.

	n	B _{max} /fmol·mg ⁻¹	K _d /nmol·L ⁻¹
Control	10	12.20±0.43	1.93±0.11
Cutaneous pain	10	13.40±0.90	1.91±0.15
Arthritis	20	20.60±1.80†	1.90±0.13†
Arthritis + morphine	8	17.30±0.80†	2.72±0.53†
Arthritis + acupuncture	8	18.70±1.60†	2.01±0.10†

吗啡对关节炎大鼠的影响 在注射佐剂后的48 h内,先后注射吗啡3次,可明显提高炎症关节局部和尾部的痛阈,但对炎症关节的直径和皮肤温度无明显影响(Tab 1)。这时边缘系统 M 受体的 B_{max}比关节炎组明显降低,但仍高于正常对照组。K_d则明显高于关节炎组,也

Tab 1. Rat ankle 48 h after adjuvant injection. $\bar{x} \pm s$. *P>0.05, †P<0.01 vs control. †P>0.05, ††P<0.01 vs arthritis.

	n	Ankle diameter/mm	Skin temperature/°C	Pain threshold/mA	
				Ankle	Tail
Control	10	6.0±0.9	28.0±1.9	0.24±0.02	0.31±0.04
Arthritis	20	9.8±1.8*	30.0±0.9†	0.19±0.01†	0.28±0.02†
Arthritis + morphine	10	10.1±1.1†	29.9±0.9†	0.36±0.01†	0.33±0.03†
Arthritis + acupuncture	10	10.5±0.8†	30.1±1.2†	0.30±0.03†	0.29±0.04†

高于正常对照组 (Tab 2)。这时大鼠的活动增多, 迟钝消失。

在注射佐剂后的 48 h 内, 不给吗啡而先后电针 3 次, 只明显提高炎症关节的局部痛阈, 而对关节直径、局部皮肤温度、尾部痛阈、情绪状态以及 M 受体的 B_{max} 和 K_d 均无明显影响 (Tab 1, 2)。

DISCUSSION

急性佐剂诱发性关节炎, 与其慢性的多发性关节炎比较起来, 其主要优点是复制时间短, 能较快取得实验结果; 炎症病变只局限于注射部位, 比较单纯, 便于进行分析研究; 也较少地给动物造成病痛, 比较符合实验动物使用的伦理规范⁽²⁾。本实验结果和其他实验室^(2,7)都表明, 用此模型研究痛觉调制, 更符合病理情况下疼痛和镇痛过程。

本实验结果表明, 在注射佐剂后 48 h, 当大鼠出现明显的炎症时, 大脑边缘系统 M 受体的 B_{max} 明显增高, 这时动物还表现出少动和迟钝等改变。而在实验性皮肤痛组, 既无受体的改变, 动物也活动如常。提示来自炎症局部的持续的伤害性传入, 能激活脑内胆碱能系统, 引起边缘系统 M 受体上调, 导致情绪状态的改变。吗啡对关节炎大鼠不仅有镇痛作用, 而且可使上调的 M 受体下调, 少动和迟钝状态也相应得到改善。这一实验结果和吗啡主要减弱疼痛的情绪反应的临床观察⁽⁸⁾相一致。至于吗啡使关节炎大鼠脑内 M 受体 K_d 上升, 也和正常大鼠上见到的结果⁽⁹⁾一致。

在本实验条件下, 电针只对炎症局部有镇痛作用, 而对脑内 M 受体和情绪状态无明显

作用。除了针刺对关节炎疼痛的作用不同于吗啡以外, 还可能与电针的次数较少和每次电针的持续时间较短有关。

ACKNOWLEDGMENT 苏州市广济医院精神药理研究室郭泉涌主任在 M 受体测定方面给予指导并提供实验条件。

REFERENCES

- 1 Newbould BB. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *Brit J Pharmacol Chemother* 1963; 21: 127-36.
- 2 Millan MJ, Czlonkowski A, Morris B, Stein C, Arendt R, Huber A, et al. Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain; influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain* 1988; 35: 299-312.
- 3 Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation; stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. *Pain* 1988; 35: 313-26.
- 4 Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms; a new theory. *Science* 1965; 150: 971-9.
- 5 Green PG, Kitchen J. Antinociception opioids and the cholinergic system. *Prog Neurobiol* 1986; 26: 119-46.
- 6 Davis KL, Berger PA, Hollister LE, Barchas JD. Cholinergic involvement in mental disorders. *Life Sci* 1978; 22: 1865-72.
- 7 Zhao FY, Jiang F, Zhu LX. Effect of electroacupuncture on pain threshold of rats with acute experimental arthritis. *Acupuncture Res* 1988; Suppl 3: 154-7.
- 8 Jaffe JH, Martin WR. Opioid analgesics and antagonists. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P, editors. *Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, 8th ed. New York; Pergamon Press, 1990: 485-521.
- 9 Lu L, Tang J, Han JS. Effects of morphine and its analogues on M-cholinoceptor binding affinity in rat brain. *Acta Pharmacol Sin* 1983; 4: 149-52.