

野罂粟总生物碱镇痛作用部位的研究

杨宇杰¹, 王春民^{2*}, 袁亚非¹, 刘豫安¹, 佟继铭¹

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000)

摘要:目的 研究野罂粟总生物碱(TAPN)的镇痛作用部位。方法 采用小鼠福尔马林试验, ip 和 iv 两种给药途径对醋酸所致小鼠扭体反应所得 ED₅₀ 进行比较, 小鼠和大鼠侧脑室给药法(icv)、脊髓蛛网膜下腔给药法(ith)确定 TAPN 的镇痛作用部位。结果 TAPN ip 给药对福尔马林致痛的早、晚两相疼痛反应均有抑制作用, 对晚期相更为敏感。ip 或 iv 等剂量的 TAPN, 对小鼠扭体反应的抑制程度多以 ip 为强, 且测得 TAPN 给药后各个时间段的 ED_{50(ip)} 均小于 ED_{50(iv)}。TAPN 微量 icv 给药具有明显的镇痛作用, 而微量 ith 给药无明显的镇痛作用。结论 TAPN 的镇痛作用部位主要在外周, 同时也具有中枢镇静作用, 且在脊髓以上水平。

关键词:野罂粟总生物碱; 镇痛作用; 脊髓; 中枢作用

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2005)04-0554-04

Analgesic sites of total alkaloids in *Papaver nudicaule*

YANG Yu-jie¹, WANG Chun-min², YUAN Ya-fei¹, LIU Yu-an¹, TONG Ji-ming¹

(1. Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Chengde JFK Pharmaceutic Group Co., Ltd, Chengde 067000, China)

Abstract: Objective To study the analgesic sites and mechanism of total alkaloids in *Papaver nudicaule* (TAPN). **Methods** The sites of analgesic action of TAPN were observed by adopting Formalin test and two different routes of intracerebroventricular (icv), intrathecal (ith) in mice and rats and comparing ED₅₀ of TAPN in writhing reaction in mice induced by acetic acid by ip and iv administration. **Results** TAPN significantly lowered pain score of the early and late phase of Formalin response and was more sensitive in the late phase. Inhibition of TAPN at the same dose by ip administration in writhing reaction in mice induced by acetic acid was stronger than that by iv. The ED₅₀ value of TAPN at any time by ip administration was lower than that by iv administration. By means of central microinjection, TAPN by icv administration induced remarkable analgesic effect in mice, but TAPN by ith administration had no significant analgesic effect. **Conclusion** The sites of analgesic action of TAPN are mainly at periphery. TAPN has also central analgesic effect, and the site may be at the level above the spinal cord.

Key words: total alkaloids in *Papaver nudicaule* (TAPN); analgesic effect; spinal cord; central effect

野罂粟总生物碱(total alkaloids in *Papaver nudicaule*, TAPN)是从罂粟科植物野罂粟 *Papaver nudicaule* L. 中提取出来的总生物碱, 药理学研究表明其具有较强的镇痛作用, 且维持时间较长, 毒性较低, 长期应用未出现致身体依赖性^[1,2]。本实验初步分析确定 TAPN 的镇痛作用部位, 为进一步研究开发 TAPN 奠定实验基础。

1 材料

1.1 动物: 昆明种小鼠, 18~22 g, 河北省实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 04056 号。Wistar 大鼠, 180~220 g, 中国医学科学院实验动物中心提供, 合格证号: 医动字 2002-048 号。

1.2 药品与试剂: TAPN (质量分数为 59.3%), 承德医学院中药研究所提供; 吗啡, 东北第六制药厂生产, 批号 001009; 吗啡, 上海第一制药厂生产, 批号 990212; 醋酸, 化学纯, 上海化学试剂厂出品, 批号 980425; 甲醛, 化学纯, 上海泗联化工厂出品, 批号 990402。

1.3 仪器: DT-100A 分析天平, 北京光学仪器厂; 江湾 II 型立体定位仪, 贝克曼公司; 冰冻切片机, 上海新华元件厂; WQ-9E 痛阈测定仪, 北京海淀电子医疗器械厂。

2 方法与结果

2.1 福尔马林试验: 取小鼠 40 只, 随机分为 4 组,

收稿日期: 2004-06-16

作者简介: 杨宇杰(1969—), 女, 医学硕士, 副教授, 研究方向为中药新药开发与研究。

* 通讯作者

即生理盐水 (NS) 组、吡哌美辛 (20 mg/kg) 组、TAPN 两个剂量 (74, 37 mg/kg) 组。各组小鼠 ip 给予相应药物后 30 min, 于小鼠右后足掌 sc 1% 福尔马林 10 μL, 分别观察记录注射后 0~5 min (早期相) 及 20~30 min (晚期相) 的疼痛症状并评分。0 分: 行走自如; 1 分: 跛行, 不动时撑地; 2 分: 抬足; 3 分: 抖足或舔足。各组总评分按下列公式计算。结果见表 1 (数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间进行 *t* 检验)。

$$\text{评分} = (0t_1 + 1t_2 + 2t_3 + 3t_4) / (t_1 + t_2 + t_3 + t_4)$$

t_1, t_2, t_3, t_4 分别为 0、1、2、3 min 的各自持续时间

表 1 TAPN 对福尔马林致小鼠疼痛反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effect of TAPN on pain reaction in mice induced by Formalin ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg · kg ⁻¹)	评分	
		0~5 min	20~30 min
NS	—	1.96 ± 0.13	1.68 ± 0.07
吡哌美辛	20	1.86 ± 0.11	1.04 ± 0.12**
TAPN	74	1.63 ± 0.08*	1.13 ± 0.11**
	37	1.82 ± 0.14	1.34 ± 0.08*

与 NS 组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01

P* < 0.05 *P* < 0.01 vs NS group

2.2 TAPN ip 或 iv 给药对小鼠醋酸扭体法的镇痛作用: 取小鼠 90 只, 随机分为 9 组, 每组 10 只, 分别为 NS 组、ip 和 iv TAPN 50、25、12.5、6.25 mg/kg 剂量组 (0.2 mL/10 g), 给药后 5 min 各组小鼠 ip 0.7% 醋酸 0.1 mL/10 g, 观察小鼠扭体反

应: 腹部内凹, 躯干与后腿伸直, 臀部高起, 连续记录每 10 min 内的扭体数, 计算药物对扭体反应的抑制率, 以给药后扭体次数减少 50% 以上为有效镇痛作用指标。结果见表 2。根据表 2 结果, 采用简化机率单位法求出药物镇痛的 ED₅₀ 及 95% 可信限, 结果见表 3。

抑制率 = (NS 组平均扭体数 - 给药组平均扭体数) / NS 组平均扭体数 × 100%

2.3 TAPN 经脊髓蛛网膜下腔给药 (intrathecal injection, ith) 的镇痛作用

2.3.1 TAPN ith 给药对小鼠的镇痛作用: 小鼠 ith 给药法: 实验时固定小鼠腰骶两侧, 用 4 号针头连微量注射器, 自 L₅~L₆ 间隙进针, 以鼠尾突然侧向摆动为注射成功标志, 约 1 min 内缓慢注射完, 一次注射量为 10 μL。取小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 即 NS 组、吗啡 (0.05 mg/kg) 组和 TAPN (0.4、0.2 mg/kg) 组, 分别 ith 给药 10 μL, ip 0.7% 醋酸 0.1 mL/10 g 后, 连续记录每 10 min 内的扭体数, 计算药物对扭体反应的抑制率, 结果见表 4。

2.3.2 TAPN ith 给药对大鼠的镇痛作用: 大鼠 ith 给药法: ip 戊巴比妥钠 35 mg/kg 麻醉大鼠, 暴露并刺破 L₃~L₄ 间隙的韧带, 置入聚乙烯 PE-10 导管 (内径 0.28 mm, 外径 0.61 mm), 见导管外口有脑脊液缓慢滴出, 表示导管已插入蛛网膜下腔, 封口。外露部分固定于肌肉和皮肤, 并缝合。手术后第

表 2 TAPN ip 和 iv 给药对醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of TAPN by ip and iv administration on writhing reaction in mice induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (mg · kg ⁻¹)	给药途径	给药后扭体次数/(次 · 10 min ⁻¹)				抑制率/%			
			11~20 min	21~30 min	31~40 min	41~50 min	11~20 min	21~30 min	31~40 min	41~50 min
NS+NS	—	ip+iv	22.7 ± 3.7	31.3 ± 4.2	30.2 ± 5.1	19.4 ± 3.8	—	—	—	—
TAPN+NS	50	ip+iv	5.7 ± 2.9***	8.9 ± 3.8***	8.3 ± 4.2***	6.8 ± 3.5***	74.9	71.6	72.5	65.0
	25	ip+iv	10.4 ± 5.6**	15.0 ± 3.5**	15.6 ± 3.9**	10.0 ± 2.8**	54.2	52.1	48.3	48.5
	12.5	ip+iv	14.6 ± 3.3**	20.6 ± 5.3*	17.9 ± 4.1**	12.6 ± 3.4*	35.7	34.2	40.7	35.1
	6.25	ip+iv	18.8 ± 3.9	22.7 ± 5.6*	21.5 ± 5.1*	15.3 ± 3.6*	17.2	27.5	28.8	21.1
TAPN+NS	50	iv+ip	6.7 ± 3.2***	10.9 ± 4.3***	8.1 ± 3.7***	6.9 ± 2.9***	70.5	65.2	73.2	64.4
	25	iv+ip	11.1 ± 4.6**	16.3 ± 5.7**	15.6 ± 4.2**	11.2 ± 4.8**	51.1	47.9	48.3	42.2
	12.5	iv+ip	15.3 ± 3.1*	21.5 ± 4.6*	19.0 ± 3.9**	12.7 ± 4.7*	32.6	31.3	37.1	34.5
	6.25	iv+ip	18.5 ± 3.4	23.0 ± 4.9*	22.2 ± 5.6*	15.9 ± 4.3	18.5	26.5	26.5	18.0

与 NS 组比较: **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001

P* < 0.05 *P* < 0.01 ****P* < 0.001 vs NS group

表 3 TAPN ip 和 iv 给药对醋酸致小鼠扭体反应的镇痛 ED₅₀ 及 95% 可信限

Table 3 Analgesic ED₅₀ and 95% confidence limits of TAPN by ip and iv administration writhing reaction in mice induced by acetic acid

给药途径	ED ₅₀ (95% 可信限)/(mg · kg ⁻¹)			
	11~20 min	21~30 min	31~40 min	41~50 min
ip TAPN	23.36 (16.06~33.98)	25.87 (19.12~35.00)	24.96 (18.28~34.08)	26.37 (19.31~36.00)
iv TAPN	28.21 (20.48~38.87)	26.58 (18.44~38.31)	26.32 (18.59~37.26)	27.04 (20.17~36.26)

表 4 TAPN ith 给药对醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effects of TAPN by ith administration on writhing reaction in mice induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药后扭体次数/(次·10 min ⁻¹)				抑制率/%			
		6~15 min	16~25 min	26~35 min	36~45 min	6~15 min	16~25 min	26~35 min	36~45 min
NS	—	24.6	31.9	28.8	21.5	—	—	—	—
吗啡	0.05	8.2±0.6**	11.9±0.9**	10.4±1.1**	8.4±0.7**	67	63	64	61
TAPN	0.4	20.4±2.4	28.7±3.2	27.3±1.8	18.7±2.1	17	10	5	13
	0.2	21.2±2.6	29.6±2.3	26.5±2.4	20.6±2.8	14	7	8	4

与 NS 组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs NS group

6 天开始实验。取预先脊髓蛛网膜下腔埋管的大鼠 24 只, 体重 180~220 g, 随机分为 3 组, 即 NS 组、吗啡 (0.5 mg/kg) 组和 TAPN (1 mg/kg) 组, 分别 ith 给药 10 μL , 即将 10 μL 药液在套管外端, 用注射器在 1 min 内缓慢注入蛛网膜下腔, 注药后用 5 μL 人工脑脊液冲洗导管。给药后用电刺激甩尾法测痛。

大鼠电刺激致痛法: 采用 WQ-9E 痛阈测定仪输出方波阶梯电流 (波宽 0.1 ms, 频率 5 kHz, 阶梯高度 0.02 mA, 阶梯宽度 1 s), 刺激鼠尾近尖端 1/3 处, 以引起动物甩尾的电流强度 (mA) 作为痛阈, 选取基础痛阈在 0.3 mA 以下的大鼠进行实验, 给药前测痛两次, 间隔 20 min, 取其平均值作为基础痛阈。如给药后测痛电流高达 1 mA 而动物仍不甩尾时, 终止刺激, 以 1 mA 作为其痛阈。以给药后痛阈提高 1 倍以上者, 作为有效镇痛作用。

中枢给药部位的鉴定: 大鼠 ith 给药测痛实验结束后, 经注射管注入氨黑 10B 20 μL , 10 min 后处死大鼠, 解剖脊柱, 观察埋置导管的位置及给药部位。结果见图 1。

2.4 TAPN 经侧脑室给药 (intracerebroventricular injection, icv) 的镇痛作用

2.4.1 TAPN icv 给药对小鼠的镇痛作用: 小鼠 icv 给药法: 实验时固定小鼠头部, 用 4 号针头连微

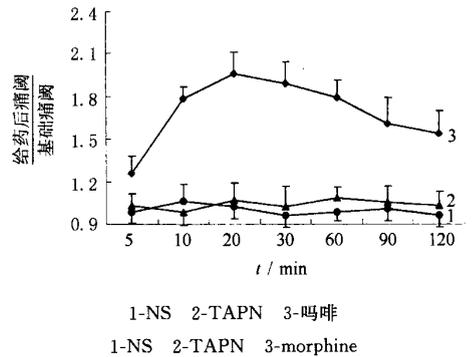


图 1 TAPN ith 给药对电刺激所致大鼠甩尾反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of TAPN by ith administration on tail flick reaction in rats induced by electric stimulation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

量注射器, 在小鼠两耳连线与两眼连线之间, 稍偏高中线的头盖骨部位上, 将注射器垂直刺入约 2 mm (预先用外套管固定针尖尖端距离), 约 1 min 内缓慢注射完, 一次注射量为 10 μL 。取小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 即 NS 组、吗啡 (0.05 mg/kg) 组和 TAPN (0.4, 0.2 mg/kg) 组, 分别 icv 给药, 5 min 后 ip 0.7% 醋酸 0.1 mL/10 g, 由 ip 醋酸后的第 6 分钟开始连续记录每 10 min 内的扭体数, 计算药物对扭体反应的抑制率, 结果见表 5。

表 5 TAPN icv 给药对醋酸致小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 5 Effects of TAPN by icv administration on writhing reaction in mice induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药后扭体次数/(次·10 min ⁻¹)				抑制率/%			
		6~15 min	16~25 min	26~35 min	36~45 min	6~15 min	16~25 min	26~35 min	36~45 min
NS	—	23.7±2.8	32.4±2.5	26.8±1.9	20.6±2.1	—	—	—	—
吗啡	0.05	7.9±0.6**	15.1±0.4**	14.0±0.8**	9.9±0.7**	67	53	48	52
TAPN	0.4	8.4±2.1*	15.9±1.3**	13.8±1.9**	10.1±1.7**	65	51	49	51
	0.2	15.4±2.2*	21.3±3.1*	19.9±2.4*	15.7±1.6*	35	34	26	24

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

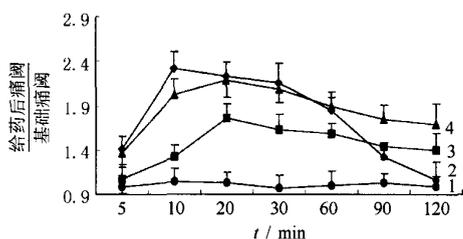
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group

2.4.2 TAPN icv 给药对大鼠的镇痛作用: 大鼠 icv 给药法: ip 戊巴比妥钠 35 mg/kg 麻醉后, 将大鼠固定在立体定位仪上, 参考 Kong and Klippel 大

鼠脑图谱将外径为 0.7 mm、内置直径为 0.4 mm 内芯的不锈钢注射套管插入侧脑室内。取出内芯, 见有脑脊液流出或波动时即将外套管固定于清洁干燥

的颅骨上,手术后第 6 天开始实验。选取预先侧脑室埋管的大鼠 32 只,雌雄兼用,体重 180~220 g,随机分为 4 组,每组 8 只,即 NS 组、吗啡 (0.5 mg/kg) 组和 TAPN (1, 0.5 mg/kg) 组,分别 icv 给药。注射给药时,拔出内芯,插入外径与内芯一致,长度比外套管长约 0.5 mm 的注射管,将 10 μ L 药液缓慢均匀地注入侧脑室,时间约为 1 min。注射完毕后,将注射套管保留 20 min,以防药液溢出。给药后不同时间用电刺激甩尾法测痛阈。

中枢给药部位的鉴定:大鼠 icv 给药测痛实验后,经注射套管注入生物活性染料氨黑 10 B 10 μ L, 10 min 后处死大鼠,取脑作冰冻切片,参照图谱确定注射部位。结果见图 2。



1-NS 2-吗啡 3-TAPN 0.5 mg/kg 4-TAPN 1 mg/kg
1-NS 2-morphine 3-TAPN 0.5 mg/kg 4-TAPN 1 mg/kg

图 2 TAPN icv 给药对电刺激所致大鼠甩尾反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 2 Effect of TAPN by icv administration on tail flick reaction in rats induced by electric stimulation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3 讨论

在小鼠后足掌注射 1% 福尔马林可产生持续时间较长的紧张性疼痛,并表现为两个时相^[3], Dubuisson 等^[4]认为两相中致痛作用的机制是不同的,早期相 (0~5 min) 是由于注射福尔马林后直接刺激外周神经末梢引起的疼痛反应;晚期相 (20~30 min) 可能是由于福尔马林注射后继发的炎症反应所致。本实验研究结果发现 TAPN 对小鼠福尔马林致痛的早、晚两相均有抑制作用,而对晚期相更为敏感,说明 TAPN 既能抑制因炎症介质引起的痛觉过敏,又能抑制因直接刺激伤害性感受器引起的疼痛反应。

Nakamura^[5]曾用大鼠醋酸扭体法分别测定 Tolmetin 钠 ip 和 iv 后的镇痛 ED₅₀及血浆和腹腔渗出液中药物的浓度以鉴别其镇痛作用部位是在中枢或在外周,认为如果镇痛药的作用部位在外周,则 ip 给药后,在用药局部即可显现镇痛作用,而 iv 给药则需待一部分药物分布到腹腔后才出现镇痛作用,故 ED_{50 (ip)} 小于 ED_{50 (iv)};反之,如镇痛作用部位在中枢,ip 给药时,药物需首先吸收入血,然后进入中枢才会出现镇痛作用,故 ED_{50 (ip)} 远远大于 ED_{50 (iv)}。本实验参照有关文献的报道^[6],用小鼠醋酸扭体法测得 TAPN 给药后各个时间段的 ED_{50 (ip)} 均小于 ED_{50 (iv)},而且 ip 或 iv 等剂量的 TAPN,对小鼠扭体反应的抑制程度多以 ip 给药为强,结合 TAPN 在福尔马林实验中对晚期相疼痛反应更为敏感的特点,推断 TAPN 的镇痛作用部位主要在外周。

本实验同时研究了 TAPN icv 及 ith 两种给药途径对小鼠醋酸扭体法和大鼠甩尾法的镇痛作用,结果发现与全身给药剂量 (小鼠 ip 给药的 ED₅₀为 25.14 mg/kg,大鼠 ip 给药的 ED₅₀为 62.35 mg/kg) 相比,icv 极微量 (小鼠 0.4 mg/kg,大鼠 1 mg/kg) TAPN 具有明显的镇痛作用,而 ith 同样微量 TAPN 无明显镇痛作用,提示 TAPN 在中枢也具有镇痛作用,而且其镇痛作用部位可能在脊髓以上的神经结构。

References:

- [1] Li J, Zhang H J, Yang H S, et al. Analgesic effect of 91-04 and its other inhibitory effects on the central nervous system [J]. *Bull New Drug Res Found* (新药研究基金会报), 1992, 2: 115-118.
- [2] Hao X J, Jin H W, Li J, et al. Studies on APN¹ analgesic and body-dependent effects [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 1997, 12 (Suppl): 10.
- [3] Hunskaar S, Fasmer O B, Hole K. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics [J]. *J Neurosci Method*, 1985, 14: 69-76.
- [4] Dubuisson D, Dennis S G. The Formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats [J]. *Pain*, 1977, 2: 167-174.
- [5] Nakamura H, Shimizu M. Site of analgesic action of a non-steroidal, anti-inflammatory drug, tolmetin sodium in rats [J]. *Br J Pharm*, 1981, 73: 779-785.
- [6] Luo X Y, Zhang X M, Gao W, et al. Studies on site of analgesic action of matrine and its mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 41-43.

《中草药》杂志被确认为允许刊载处方药广告的第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知,《中草药》杂志作为第一批医药专业媒体,允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话:(022)27474913 23006821

传真:23006821

联系人:陈常青