

丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性形成的影响及其机制

丘宏强¹, 陈崇宏^{2*}

1. 福建医科大学附属协和医院 药学部, 福建 福州 350001

2. 福建医科大学药学院, 福建 福州 350004

摘要: **目的** 观察丹参提取物(含隐丹参酮 85.11%)对小鼠吗啡身体依赖性形成及其对脑内环磷酸腺苷(cAMP)和一氧化氮(NO)生成的影响。**方法** 剂量递增 sc 吗啡建立小鼠吗啡依赖模型, 观察丹参提取物对盐酸纳洛酮催促吗啡依赖小鼠戒断症状的影响, 并分别用放射免疫分析法、硝酸还原酶法测定小鼠脑内 cAMP 和 NO 水平。**结果** 丹参提取物(80 mg/kg)可显著降低吗啡依赖小鼠催促戒断症状; 对吗啡依赖小鼠脑内 cAMP 无明显影响, 但可显著降低吗啡依赖小鼠脑内 NO 水平。**结论** 丹参提取物能缓解吗啡依赖小鼠的戒断症状, 其机制可能与下调脑内 NO 水平有关。

关键词: 丹参; 吗啡依赖小鼠; 戒断症状; 环磷酸腺苷(cAMP); 一氧化氮(NO)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)03-0535-03

Effect of *Salvia miltiorrhiza* extracts on formation of morphine physical dependence in mice and its possible mechanism

QIU Hong-qiang¹, CHEN Chong-hong²

1. Department of Pharmacy, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

2. College of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

Abstract: **Objective** To observe the action of *Salvia miltiorrhiza* extracts (SmE2, liposoluble constituents) on the formation of physical dependence induced by morphine in mice and the effects of SmE2 on the production of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and nitric oxide (NO) in brain of morphine-dependent mice. **Methods** Morphine-dependent mice model was established by sc injection of morphine at a gradual increasing dosage. The effect of SmE2 on the withdrawal symptoms induced by Naloxone in morphine-dependent mice was observed. cAMP and NO content in brain were determined through radioimmunoassay and nitrate reductase, respectively. **Results** SmE2 (80 mg/kg) could remarkably reduce the withdrawal symptoms in morphine-dependent mice. The cAMP concentration in brain showed no obvious change in morphine-dependent mice treated with SmE2, but NO content in brain could significantly be reduced. **Conclusion** SmE2 has effect on relieving the withdrawal symptoms in morphine-dependent mice with down-regulation of NO content in brain as possible mechanism.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; morphine-dependent mice; withdrawal symptoms; cyclic adenosine monophosphate (cAMP); nitric oxide (NO)

前期研究表明丹参粗提物能在体缓解吗啡引起的小鼠身体依赖性^[1], 在离体豚鼠回肠吗啡依赖模型上丹参提取物也显示出很好的抗戒断作用, 并初步鉴定其中的主要成分是隐丹参酮^[2]。有实验证明, 丹参具有抑制腺苷酸环化酶(AC)活性的作用^[3], 也有研究表明丹参能够影响脑内 NO 水平^[4]。本实验在体研究丹参提取物(含隐丹参酮 85.11%)对小鼠吗啡身体依赖性形成的影响, 观察丹参提取物对

吗啡戒断小鼠脑内环磷酸腺苷(cAMP)和 NO 水平的影响, 以初步探讨丹参提取物抗吗啡戒断症状的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性昆明种小鼠, 体质量 18~23 g, 购于福建医科大学实验动物中心; 动物房(20±3)℃饲养 1 d 后进行实验, 实验期间自由饮食饮水。

收稿日期: 2010-05-27

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C0410026)

作者简介: 丘宏强(1978—), 男, 福建长汀人, 主管药师、硕士, 在读博士, 从事神经药理研究。Tel: (0591)83357896-8226 E-mail: honjohn@126.com

*通讯作者 陈崇宏 Tel: (0591)83569301 Fax: (0591)83574658 E-mail: cch@mail.fjmu.edu.cn

1.2 试剂

盐酸吗啡注射液, 沈阳第一制药厂生产, 批号 000612; 盐酸纳洛酮粉针剂, Sigma 公司; 均用生理盐水(NS)配制。丹参提取物, 本实验室提取(含隐丹参酮 85.11%), 用前以含 2%聚山梨酯-80 的生理盐水溶解。NO 测试盒, 南京建成生物工程公司产品; cAMP 放射免疫测定药盒, 上海中医药大学同位素产品; 其余化学试剂均为 AR 级。

1.3 仪器与设备

BP310S 型电子天平, 德国产品; 751G 分光光度计, 上海分析仪器厂生产; LGR16—W 低温冷冻离心机, 北京医用离心机厂生产; JY92—II 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝科器研究所生产; SN—695B 型智能放免 γ 测量仪, 上海原子核研究所日环光点仪器有限公司产品; 35 cm×30 cm 玻璃缸。

1.4 丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性形成的影响

依据文献方法建立吗啡依赖模型^[1]。昆明种小鼠 sc 吗啡形成小鼠吗啡依赖模型。吗啡首日剂量为 10 mg/kg, 逐日递增 10 mg/kg, 直到第 8 天为 80 mg/kg, 每日给药 2 次, 时间为 9:00 am 和 19:00 pm。

小鼠随机分成对照组, 吗啡组, 丹参提取物高、中、低剂量组, 吗啡组和丹参提取物组建立吗啡依赖模型, 对照组则用 NS 代替吗啡, 给药方案相同。丹参提取物组在每天 sc 吗啡同时 ip 丹参提取物, 剂量分别为 80、60、40 mg/kg。吗啡组和对照组则给予 NS。于末次给药后 1.5 h 对照组、吗啡组 ip 含 2%聚山梨酯-80 的 NS, 丹参提取物组 ip 不同剂量的丹参提取物。0.5 h 后各组再 ip 盐酸纳洛酮(6 mg/kg)催促戒断, 观察注射纳洛酮后 30 min 内小鼠的跳跃次数和 1 h 后体质量的减少量。

1.5 丹参提取物对吗啡戒断小鼠脑内 cAMP 和 NO 水平的影响

小鼠随机分成 3 组: 对照组(sc NS, 末次 sc NS 2 h 后, ip 6 mg/kg 纳洛酮催促)、吗啡戒断组(sc 吗啡, 首日剂量为 10 mg/kg, 逐日递增 10 mg/kg 直到第 8 天 80 mg/kg, 末次 sc 吗啡 2 h 后, ip 6 mg/kg 纳洛酮催促)、丹参提取物+吗啡戒断组(造模同吗啡戒断组, 在 sc 吗啡同时 ip 丹参提取物 80 mg/kg)。给药体积为 10 mL/kg, 每天给药 2 次; 各组小鼠在末次 sc 吗啡或 NS 3 h 后, 取脑。测定全脑 cAMP 和 NO 水平。

1.5.1 cAMP 水平的测定 根据试剂盒说明书采用放射免疫法测定脑组织中 cAMP 水平。

1.5.2 脑匀浆中 NO 水平的测定 NO 水平测定采用硝酸还原酶法, 根据试剂盒说明测定脑组织 NO 水平。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性形成的影响

结果见表 1。吗啡组小鼠跳跃反应次数和体质量减少量与对照组比较有极显著差异($P < 0.001$), 提示小鼠吗啡依赖模型成功。在跳跃反应方面, 与吗啡组相比, 丹参提取物各剂量组均可一定程度抑制小鼠吗啡身体依赖的形成, 但无剂量依赖关系, 其中高、中剂量组具有统计学差异($P < 0.05$); 在小鼠体质量下降方面, 丹参提取物各剂量组体质量下降比吗啡组轻, 但只有高剂量组差异显著($P < 0.05$)。提示, 丹参提取物长期给药能够一定程度上抑制小鼠吗啡身体依赖性的形成。

表 1 丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性形成的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of SmE2 on formation of morphine physical dependent mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	跳跃次数	体质量减少/g
对照	—	0.5 ± 0.85	0.60 ± 0.19
吗啡	—	37.0 ± 23.54***	0.84 ± 0.16**
丹参提取物	40	22.0 ± 13.79	0.74 ± 0.20
	60	14.4 ± 11.97 [#]	0.73 ± 0.16
	80	17.9 ± 10.00 [#]	0.59 ± 0.21 [#]

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与吗啡组比较: [#] $P < 0.05$

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group [#] $P < 0.05$ vs morphine group

2.2 丹参提取物对吗啡戒断小鼠脑组织 cAMP 和 NO 水平的影响

结果见表 2。与对照组比较, 吗啡戒断组小鼠脑内 cAMP 水平升高了 53.3% ($P < 0.01$); 而与吗啡戒断组比较, 丹参提取物组小鼠脑内 cAMP 水平虽然降低了 16.6%, 但无统计学差异($P > 0.05$)。

吗啡戒断组小鼠全脑 NO 水平比对照组增加 70.9% ($P < 0.01$), 丹参提取物组小鼠全脑 NO 水平比吗啡戒断组下降了 27.3% ($P < 0.05$), 表明丹参提取物可显著抑制吗啡戒断小鼠脑内 NO 水平的升高。

3 讨论

小鼠造吗啡依赖模型同时给予不同剂量的丹参提取物, 观察长期给药对小鼠吗啡依赖形成的影响。

表 2 丹参提取物对吗啡戒断小鼠脑内 cAMP 和 NO 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effect of SmE2 on contents of cAMP and NO in brain of morphine physical withdrawal mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	cAMP/ (pmol·g ⁻¹)	NO/ (μmol·g ⁻¹)
对照	—	60.35 ± 8.68	1.08 ± 0.34
吗啡	—	85.05 ± 15.3*	1.84 ± 0.62*
丹参提取物	80	67.71 ± 13.16	1.34 ± 0.43 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与吗啡组比较: [#] $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs morphine group

从小鼠纳洛酮催促后的跳跃反应和体质量下降综合考虑, 80 mg/kg 丹参提取物长期给药可以显著抑制小鼠吗啡依赖的形成。丹参提取物各剂量疗效并未呈现明显的量效关系, 这可能由于行为学实验动物之间个体差异较大造成, 其次可能和剂量之间差距不够大有关, 但不影响对丹参提取物抗小鼠吗啡依赖形成疗效的判断。

阿片类物质依赖的生化机制仍不十分清楚。过去 20 年研究多集中在阿片受体上, 但是尚无一种受体理论能有效地解释阿片类药物依赖机制, 近年来阿片作用的受体后机制受到重视。研究发现, 细胞内信号转导系统如 AC、cAMP 等参与了吗啡依赖的形成^[5]。本实验结果吗啡戒断组脑内 cAMP 水平和对照组相比显著升高, 丹参提取物 80 mg/kg 给药后可以降低脑内 cAMP 水平, 降幅达 16.6%, 但是和吗啡戒断组相比无明显差异 ($P > 0.05$), 这有可能与检测的是全脑 cAMP 水平有关, 如从不同功能区研究 cAMP 水平或许会有新的发现, 这有待进一步展开实验研究。

NO 作为信使物质在中枢神经系统中起到的细胞间信号传递作用越来越受到人们重视。研究认为, NO 在介导阿片依赖和戒断方面是一种重要的神经介质, NO 参与阿片类药物身体依赖已被实验所证实^[6]。吗啡戒断时, 突触内 Ca^{2+} 升高, 中枢神经系统内广泛脑区 (如海马、蓝斑核等) cNOS 活性明显升高, 而 NOS 活性升高以及表达量的增加都会导致细胞内 NO 的大量生成^[7]。本实验吗啡戒断组小鼠脑内 NO 水平显著升高, 长期给予丹参提取物 80 mg/kg 可以显著缓解小鼠的吗啡戒断症状 (跳跃反应和体质量的下降), 与吗啡戒断组相比, 小鼠脑内 NO 水平显著降低, 降幅 27.3%。有报道指出丹

参对病理性引起的 NO 水平异常升高有明显的抑制作用, 能减轻 NO 的毒性作用^[8]。这些提示丹参提取物很可能是通过减少脑内 NO 的生成来缓解小鼠吗啡戒断症状。此外, 丹参提取物主要成分隐丹参酮还具有 Ca^{2+} 通道阻断作用^[9]。笔者推测丹参提取物可能通过减少 Ca^{2+} 内流来降低 Ca^{2+} 依赖的 cNOS 活性, 从而减少脑内和血浆 NO 水平。丹参提取物还可能阻断去 NE 能神经元突触前膜 Ca^{2+} 通道的开放, 使钙离子向突触前膜内流减少, 导致 NE 能神经元与戒断相关的递质释放减少。

综上所述, 丹参提取物是一个潜在抗依赖药物, 其减轻吗啡戒断症状的作用机制可能是抑制脑内 NO 水平病理性的升高。至于其精细调控机制, 特别是研究丹参提取物对神经细胞内 Ca^{2+} 量影响将是本课题组今后的研究重点。

参考文献

- [1] 丘宏强, 陈崇宏, 余 涓. 丹参提取物对小鼠吗啡身体依赖性的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(5): 720-723.
- [2] 丘宏强, 何 方, 陈崇宏. 丹参提取物对豚鼠回肠体外吗啡依赖性的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(1): 1-3.
- [3] Kohda T, Tanaka S, Seiji Y, *et al.* Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from danshen, the root of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37: 1287-1290.
- [4] 李振洲, 匡培根, 吴卫平. 脑缺血后脑组织一氧化氮合成酶基因表达及丹参影响的初步研究 [J]. 卒中与神经疾病, 1997, 4(1): 1-2.
- [5] Bilecki W, Holh V, Przewlocki R. Acute delta-opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 390(1-2): 1-6.
- [6] Bull P M, Ludwig M, Blackburn-Munro G J, *et al.* The role of nitric oxide in morphine dependence and withdrawal excitation of rat oxytocin neurons [J]. *Eur J Neurosci*, 2003, 18(9): 2545-2551.
- [7] Cuellar B, Fernández A P, Lizasoain I, *et al.* Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal [J]. *Psychopharmacology*, 2000, 148: 66-73.
- [8] 张 莹, 石承先, 李玉祥, 等. 丹参对重症急性胰腺炎大鼠诱导型一氧化氮合成酶 mRNA 的表达与器官损伤的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(11): 1012-1015.
- [9] Lam F F, Yeung J H, Chan K M, *et al.* Mechanisms of the dilator action of cryptotanshinone on rat coronary artery [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578(2-3): 523-560.