

坐骨神经切断大鼠脑脊液中 CCK-8 含量的动态变化及其与吗啡镇痛的关系 *

刘苏星^{1,2} 沈 上¹ 于英心¹ 韩济生¹ 罗 非¹

(¹ 北京大学神经科学研究所, 北京 100083; ² 包头医学院生理教研室)

摘要 目的:研究神经源性疼痛时吗啡镇痛效应的降低与中枢八肽胆囊收缩素(CCK-8)的释放量之间的关系。方法:以切断大鼠单侧坐骨神经作为引起神经痛的动物模型,用放射免疫分析法,观察术后第3,7,10和14天脑脊液中CCK-8-ir含量的变化,并在相应的时间点分别皮下注射吗啡(4mg/kg)和CCK_B受体拮抗剂L-365,260(0.5mg/kg),观察痛阈(辐射热甩尾潜伏期)的变化。结果:(1)大鼠单侧坐骨神经切断后一周,脑脊液中CCK-8样免疫活性物质(CCK-8-ir)的浓度(代表中枢CCK-8的释放量)增加了125%,此时吗啡的镇痛效果降低,而CCK拮抗剂使吗啡镇痛效果提高。(2)坐骨神经切断后1.5~2周,中枢CCK-8释放减少或保持正常水平,此时吗啡镇痛效果正常,CCK拮抗剂也不能使其效应进一步提高。(3)假手术组大鼠于第14天(第四次注射吗啡)时,吗啡作用减弱(发生耐受),此时CCK拮抗剂显示出对吗啡镇痛的加强作用。结论:单侧坐骨神经切断后一周吗啡镇痛效果减弱,可能与当时中枢CCK-8释放过多有关。切断坐骨神经后中枢释放CCK-8水平的变化,是影响阿片镇痛的重要因素。

关键词 坐骨神经切断;吗啡;八肽胆囊收缩素;L-365,260

RELATIONS BETWEEN THE EFFECT OF MORPHINE INDUCED ANALGESIA AND THE CONTENT OF CCK-8 IN CEREBRO-SPINAL FLUID AFTER SCIATIC NERVE TRANSECTION IN RATS

LIU Su-Xing^{1,2}, SHEN Shang¹, YU Ying-Xin¹, HAN Ji-Sheng¹, LUO Fei¹

(¹ Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing 100083; Department of Physiology, Baotou Medical College)

Abstract Objective: To investigate the relations between the release of cholecystokinin octapeptide (CCK-8) in spinal cord and the decrease of morphine-induced analgesia under neuropathic pain condition. Methods: Sciatic nerve transection in rats was used as an animal model of neuropathic pain. The contents of CCK-8 immunoreactivity (-ir) in cerebral spinal fluid (CSF) were determined 3, 7, 10, and 14 days after surgery. Pain thresholds (tail flick latency) were also monitored simultaneously after s.c. injection of morphine (4 mg/kg) and a CCK_B receptor antagonist, L-365,260 (0.5 mg/kg). Results: (1) One week after unilateral sciatic nerve transection, CSF concentration of CCK-8-ir showed a 125% increase. The effect of morphine-induced analgesia was significantly decreased, which could be reversed by CCK_B antagonist. (2) In 1.5~2 weeks after surgery, the level of spinal CCK-8 also either reduced or kept normal. No change to morphine analgesia could be observed, and CCK_B-antagonist had no further effect. (3) Rats with sham surgery showed decreased morphine analgesia (i.e., tolerance) on the 14th day after the 4th injection of morphine. The analgesic effect of morphine could be enhanced by CCK_B receptor blocker. Conclusion: The diminished analgesic effect of morphine maybe due to an over release of CCK-8. The level of centrally released CCK-8 may play an important role in the variation of opioid analgesia after sciatic nerve transection.

Key words Sciatic nerve transaction; Morphine; Cholecystokinin octapeptide; L-365,260

*本工作由国家自然科学基金(30170307, 30370461)、211工程二期项目及北京大学985青年启动项目资助
责任编辑

近年来的研究表明,在病理痛发展过程中,动物对外源性吗啡镇痛的相应性发生动态变化。例如,炎症痛状态下,吗啡的镇痛作用比正常动物高10倍^[1],而神经源性疼痛状态下,吗啡的镇痛效果较差^[2]。以往的研究表明,中枢八肽胆囊收缩素(CCK-8)具有对抗阿片镇痛的作用^[3,4]。那么,上述病理性痛状态下吗啡镇痛效应的改变是否与抗阿片肽CCK-8的功能状态发生变化有关呢?

形态学研究证据表明:外周神经损伤后,大鼠初级感觉神经元中CCK mRNA及CCK_B受体的mRNA均发生上调,而且二者的升高在时程上也是一致的^[5,6]。行为药理学实验也证明,吗啡对单侧坐骨神经切断所致的自残行为(反映神经痛的指标之一)的抑制作用差,但若与CCK_B受体拮抗剂联合应用,其抑制作用会显著提高^[2]。以上工作提示,在神经源性痛状态下,CCK的功能可能发生了上调,因而导致吗啡镇痛效果的降低。然而能够真正反映中枢神经系统中CCK-8功能状况的指标——中枢CCK-8的释放量,在神经源性疼痛过程中有何种动态变化?在此过程中吗啡的镇痛作用是否也有相应的动态变化,二者是否具有某种一致性?这些问题迄今未见报道。本文采用放射免疫分析方法,观察了坐骨神经切断的大鼠脑脊液中CCK-8含量的动态变化,并用行为药理学实验方法,研究了在此过程中CCK-8与吗啡镇痛作用两者的相互关系。

材料与方法

1. 测痛

成年雌性Wistar大鼠(体重200~300g)由北京大学医学部实验动物中心提供。所有测痛实验进行时,室温均保持在20±1℃。将大鼠装入特制的塑料圆筒型固定器内^[7],使其后肢及尾巴暴露在筒外,待大鼠安静30分钟,采用8.75毫米放映灯泡(电压为17V,可调),发射出的直径约5mm的光束,照射相当于尾部中、下三分之一交界处的皮肤。采用与光源并联的电子计时器同步记录照射持续时间,测定甩尾反应潜伏期(Tail-Flick Latency, TFL)作为痛阈。调节电压使TFL保持在4~6秒。每隔5分钟测TFL一次,共测三次,取三次的平均值作为基础痛阈。将给药后测得的TFL与基础痛阈比较,以其变化百分率代表药物的镇痛效应。痛阈增加超过150%时停止照射,以免灼伤皮肤,并以150%作为最大镇痛效果。

2. 坐骨神经切断术

大鼠在水合氯醛麻醉(350mg/kg,i.p.)下,接受单侧坐骨神经切断手术。在左大腿中部后外侧切开皮肤,钝性分离坐骨神经,于坐骨神经总干分叉前的近端,切去5mm长一段。然后顺序缝合肌肉和皮肤。假手术组只分离神经但不切断,其余操作同手术组。

3. 大鼠脑脊液的抽取

大鼠在水合氯醛麻醉下,迅速暴露枕骨下缘的环枕膜,将弯成30度角套有塑料管的针头,从枕骨与环枕膜连接处插入到小脑延髓池,使套在针头上的塑料管卡在环枕膜入口处。每只鼠抽取100ml脑脊液(CSF)。脑脊液取出后,在95℃水浴中加热10分钟,-20℃保存,等待做CCK-8放射免疫测定。

4. CCK-8的放射免疫测定

¹²⁵I-Bolton Hunter-CCK-8购自Amersham Inc(UK),其放射比度不少于2000ci/mmol;CCK-8标准品为Sigma公司产品;CCK-8抗血清为美国NIEH洪昭雄博士惠增,滴度为1:9000,与无硫CCK-8、CCK-4、胃泌素、甲硫脑啡肽的交叉反应均小于0.1%。用自动免疫计数器(Pharmacia-LKB1275型,对¹²⁵I的计数效率75%),测定沉淀部分的放射性,该机自动给出标准曲线并打印测定结果。每管最小可测浓度为0.4fmol/ml,批内误差为3.0%,批间误差为10.3%。

5. 数据处理及统计学检验

实验数据均采用中文版电子表格软件Microsoft Excel进行初步的统计学检验。其结果以均值±标准误(Mean ± SE)表示。多组数据之间的比较采用方差分析(ANOVA),继以Newman-Keul's检验。以P<0.05作为差异存在统计学意义的标准。

结 果

1. 坐骨神经切断大鼠CSF中CCK-8-ir含量的动态变化

40只实验鼠随机均分为5组(n=8)。第一组不手术,直接抽取脑脊液,作CCK的放射免疫测定,作为正常大鼠CCK基础水平对照。其它4组均行坐骨神经切断术,术后分别在第3、7、10和14天抽取CSF,用放射免疫法测定CSF中CCK-8-ir的含量。结果见图1,图中两条虚线之间的部分表示正常大鼠CSF中CCK-8-ir含量的波动范围(6.25±

2.13 fmol/ml; 术后第3天,CCK-8-ir含量略有降低(4.35 ± 2.04 fmol/ml),但仍属正常波动范围;术后第7天,CCK-8-ir含量显著升高(14.21 ± 3.2 fmol/ml,较对照水平高125%, $P < 0.05$);而术后第10天,CCK-8-ir含量降至 0.4 ± 0 fmol/ml,仅为对照水平的6.4%($P < 0.01$),术后第14天又恢复至正常水平(7.03 ± 3.81 fmol/ml)。

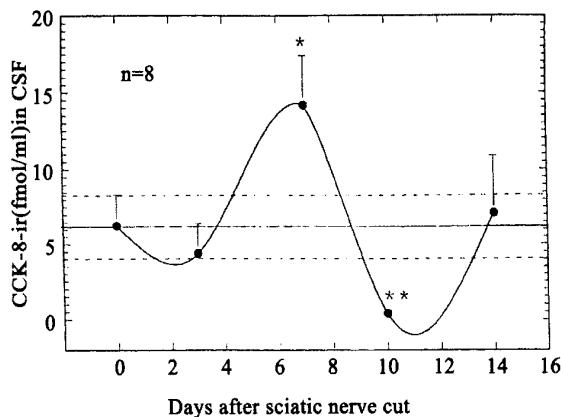


图1 左侧坐骨神经切断后脑脊液中CCK-8含量的变化规律。图中两虚线表示大鼠脑脊液中CCK-8正常值的波动范围。 $^{*} \cdot ^{**}$:与正常组(手术第0天)相比,分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$

Fig. 1 Changes of CCK-8-ir in CSF following left sciatic nerve transaction. The range between two dotted lines represents CCK-8-ir level in CSF of normal rats. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, compared with day 0 (normal rats)

2. CCK_B受体拮抗剂L-365,260对坐骨神经切断大鼠吗啡镇痛效果的影响

将44只雌性Wistar大鼠随机均分为4组(每组n=11),其中两组大鼠行左侧坐骨神经切断术(切断组),其余两组给予假手术(假手术组)。两切断组大鼠中,一组同时皮下注射吗啡(4mg/kg)及CCK_B受体拮抗剂L-365,260(0.5mg/kg),另一组则与吗啡同时注射配药液(0.5ml/kg),给药时间点仍然取术后第3、7、10、14天,各给药一次。每次给药前,先测基础痛阈,给药后10分钟再测甩尾变化百分率,每隔10分钟测一次,共测三次,取三次甩尾变化百分率的平均值,作为30分钟内的平均镇痛效果。两个假手术组的给药及测痛方式与切神经组相同。结果如图2所示。

坐骨神经切断术后第3天,切断组的吗啡镇痛(MA)效果在 $61.4 \pm 12.9\%$,与假手术组无显著差异,s.c.给予L-365,260后,吗啡镇痛效果略有增加,但未达到显著水平。术后第7天,切断组CCK-8-ir含量明显升高,此时吗啡镇痛效果降到 $26.2 \pm 7.72\%$,比切断组第3天和假手术组第7天的镇痛

效果明显降低($P < 0.05$),经s.c.L-365,260预处理后,吗啡的镇痛效果明显加强(升至 $103 \pm 14.3\%$, $P < 0.01$)。而假手术组无论是单给吗啡,还是加注L-365,260,吗啡镇痛效果与术后第3天相比都无明显变化。

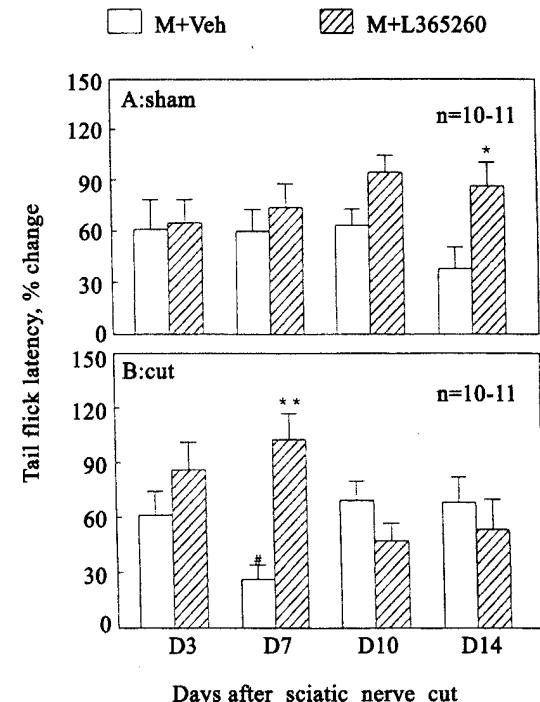


图2 L-365,260对坐骨神经切断大鼠吗啡镇痛效应的影响。 $^{*} \cdot ^{**}$:与吗啡加配药液组相比, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$;# :与第三天组相比, $P < 0.05$

Fig. 2 The influence of L-365,260 on morphine analgesic effect in sciatic nerve axotomy rats. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, compared with morphine and vehicle group. # $P < 0.01$, compared with the third day after sciatic nerve cut

术后第10天,CCK-8-ir含量最低,但吗啡镇痛效果与假手术组或术后第3天相比并无明显差异,将L-365,260与吗啡同时注射时,假手术组的镇痛效果显著高于切断组($P < 0.05$ 图中未标出)。术后第14天,CSF中CCK-8-ir含量恢复正常水平,吗啡的镇痛也恢复正常($73.5 \pm 13.7\%$),此时L-365,260不能加强MA,与术后第3天相比无显著性差别。而假手术组在术后14天,即第4次s.c.注射吗啡后,其镇痛效果有下降趋势($38.1 \pm 12.5\%$, $P < 0.05$),可能产生了耐受现象。加注L-365,260可使吗啡镇痛恢复到正常水平。

讨 论

在神经源性疼痛状态下,人与动物对外源性吗

啡的敏感性均降低,这一事实已有很多报道^[2,8,9],其机制的探讨集中在中枢及外周的内源性阿片肽与抗阿片肽两方面。有报道表明,坐骨神经切断大鼠初级感觉神经元中 CCK mRNA 水平升高,且其时程变化与 CCKB 受体的 mRNA 升高的时程相一致^[5,6]。但 CCK-8 释放量是否有相应的变化,尚未见报道。我们在一侧坐骨神经切断造成的神经源性疼痛模型上,用放射免疫分析结合行为药理学实验方法,发现坐骨神经切断后,CSF 中 CCK-8-ir 的含量发生了双相变化:术后第 7 天升至最高,第 10 天降至最低,而第 3、第 14 天与正常水平相近。这是首次在神经递质释放水平上给出的神经源性痛大鼠脊髓 CCK 功能存在可塑性改变的证据。

CCK-8 作为重要的内源性抗阿片物质,在神经痛大鼠 CSF 中有如此大的变化,很可能会影响吗啡的镇痛效果。我们的实验结果表明,在神经切断术后第 3、7、10、14 的四个时间点上分别 s.c. 注射 4mg/kg 的吗啡,其镇痛效果与 CSF 中 CCK-8-ir 含量的变化基本相符:在术后第 3 和第 14 天两个时间点上,CCK-8-ir 的释放量接近正常,吗啡的镇痛效果也正常;在术后第 7 天,CCK-8-ir 释放量最高,此时吗啡镇痛效果也明显下降,提示脊髓 CCK 抗吗啡的作用加强;当给予 CCK_B 受体拮抗剂 L-365,260 阻断 CCK-8/CCKB 受体途径的作用后,吗啡的作用又回复至正常水平,但假手术组动物却没有相应的加强吗啡镇痛效应的现象。这些结果表明,上述吗啡镇痛效应的下降确实是 CCK-8-ir 释放增加的结果。

术后第 10 天,CCK-8-ir 的含量明显降低,即使应用 L-365,260 也不能再加强其镇痛作用,是我们所预期的结果。然而为什么中枢 CCK-8 释放很低,而吗啡的镇痛作用未见增强呢?可能的原因如下:(1) 内阿片系统自身功能的降低:有形态学证据表明,周围神经损伤(包括外周神经横切、外周神经松结扎、脊神经切断等)后,脊髓背角及背根神经节都会发生可塑性变化,在神经损伤的近端有髓及无髓神经纤维均有不同程度的变性^[10,11],背角初级传入神经元的突触联系减少^[12],而此处正是阿片受体富集的区域;Besse 等^[13]还发现背根神经切除的大鼠,背角受体丧失 70%,m 受体丧失 60%;Stevens 等^[14]进一步做了阿片受体结合实验的时程分析,他们在大鼠单侧坐骨神经松扎(CCI)术后第 2、5、10 天,检测脊髓背角 FII 层、V 层及 X 层三个区域的阿片受体数目,发现 CCI 术后第 10 天,双侧脊髓背

角的 FII 层、V 层及 X 层 受体数目明显减少,这可能是坐骨神经切断术后第 10 天,吗啡镇痛效果不好的一个重要原因。(2) 其它神经肽的作用:Bennett 等^[15]用与上述实验相同的方法,证明了 CCI 术后初期,坐骨神经初级传入末梢内 P 物质(SP)及降钙素基因相关肽(CGRP)降低,而手术后第 10 天,SP 及 CGRP 再复出现。SP 被认为是感觉神经初级传入纤维中传递痛觉的一种神经递质,与其共存的 CGRP 则通过抑制 SP 的降解来加强 SP 的功能^[16]。CCI 术后第 10 天 SP/CGRP 的出现与 受体数目减少,在疼痛调制功能上都是一致的,均起到使吗啡镇痛作用降低的作用。这一点恰巧与我们的大鼠坐骨神经切断后第 10 天,吗啡的镇痛作用不佳的实验结果相吻合。(3) 不能排除此时有其它抗阿片物质(如血管紧张素 II, ACTH 等)功能活动增强的可能性。

假手术组在第 4 次(第 14 天)s.c. 注射吗啡时,镇痛效果降低,可能是对吗啡镇痛效果产生了耐受。而将吗啡与 L-365,260 联合应用时,镇痛效果明显提高,说明多次 s.c. 注射吗啡,体内抗阿片物质 CCK-8 的功能活动增强了,通过 CCK_B 受体对抗吗啡镇痛。而在坐骨神经切断的大鼠,第 4 次 s.c. 注射同等剂量的吗啡却没有出现耐受现象。Wiesenfeld-Hallin 曾报道:坐骨神经完整的大鼠持续脊髓灌注吗啡(240mg/day)3~4 天后发生吗啡耐受,而对坐骨神经切断大鼠经受同样的处理并没有出现吗啡耐受现象^[17]。这一报道与我们的实验结果是一致的。神经损伤后吗啡镇痛不易出现耐受现象,为临幊上持续使用阿片类药物治疗慢性神经源性痛提供了一个依据。

总之,我们的结果表明,单侧坐骨神经切断后一周吗啡镇痛效果减弱,可能与当时中枢 CCK-8 释放过多有关;切断坐骨神经后中枢 CCK-8 释放水平的变化,是影响阿片镇痛的重要因素。

参 考 文 献

- Stanfa LC, Dickenson AH. Cholecystokinin as a factor in the enhanced potency of spinal morphine following carrageenin inflammation. Br J Pharmacol, 1993, 108: 967~973.
- Xu XJ, Puke MJC, Verge VMK, Wiesenfeld-Hallin Z, Hughes J, Hokfelt T. Up-regulation of cholecystokinin in primary sensory neurons is associated with morphine insensitivity in experi-

- mental neuropathic pain in the rat *Neurosci Lett*, 1993, 152:129~132.
- 3 Han JS. CCK-8: a negative feedback control mechanism for opioid analgesia. *Progress Bain Res*, 1995, 105:263~271.
 - 4 Veraksits A, Runkorg K, Kurrikoff K, Raud S, Abramov U, Matsui T, Bourin M, Koks S, Vasar E. Altered pain sensitivity and morphine-induced anti-nociception in mice lacking CCK2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003, 166:168~175.
 - 5 Verge VMK, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T. Cholecystokinin in mammalian primary sensory neurons and spinal cord: in situ hybridization studies on rat and monkey spinal ganglia. *Eur J Neurosci*, 1992, 5:240~250.
 - 6 Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hokfelt T. The role of spinal cholecystokinin in chronic pain states. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 91:398~403.
 - 7 Ren MF, Han JS. Ret rail flick acupuncture analgesia model. *Chinese Med J*, 1979, 92:857~592.
 - 8 Portenoy RK, Foley KM, and Inturrisi CE. The nature of opioid responsiveness and its implications for neuropathic pain: new hypotheses derived from studies of opioid infusions. *Pain*, 1990, 43:273~286.
 - 9 Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Cholecystokinin and morphine analgesia: variations on a theme. *TiPS*, 1994, 15:65~66.
 - 10 Basbaum AL, Gautron M, Jazat F, Maze M, Guilbaud G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain*, 1991, 47:359~367.
 - 11 Bennett GI, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, 33:87~107.
 - 12 Castro-Lopez JM, Coimbra A, Grant G, Arvidsson J. Ultrastructural changes of the central scalloped (C1) primary afferent endings of synaptic glomeruli in the substantia gelatinosa Rolandi of the rat after peripheral neurootomy. *J Neurocytol*, 1990, 19:329~337.
 - 13 Besse D, Lombard MC, Zajac JM, Roques BP, Besson JM. Pre and postsynaptic distribution of m, d and k opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*, 1990, 521:15~22.
 - 14 Stevens CW, Kajander KC, Bennett GI, Seybold VS. Bilateral and differential changes in spinal mu, delta and kappa opioid binding in rats with a painful, unilateral neuropathy. *Pain*, 1991, 46:315~326.
 - 15 Bennett GI, Kajander KC, Sahara Y, Iadarola MJ, Suginoto T. Neurochemical and anatomical changes in the dorsal horn of rats with an experimental painful peripheral neuropathy. In: F Cervero, GI Bennett and PM Headley (eds). *Processing of sensory information in the superficial dorsal horn of the spinal cord*, Plenum Press, New York, 1989, pp463~471.
 - 16 Le GP, Hyberg F, Terenius K, Hokfelt T. Calcitonin gene-related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. *Eur J Pharmacol*, 1985, 115:309~311.
 - 17 Wiesenfeld-Hallion Z. The effects of intrathecal morphine and naltrexone on autotomy in sciatic nerve sectioned rats. *Pain*, 1984, 18:267~278.

(上接 367 页)

参 考 文 献

- 1 许楚芸,魏丽玲,何文贞.益母草注射液治疗月经期偏头痛.中国疼痛医学杂志,2002,2:77~79.
- 2 王毓敏,谢广茹,乔卉等.曲马多缓释片对中度癌痛的镇痛效果 40 例临床观察.中国疼痛医学杂志,2001,2:123.
- 3 匡培根.偏头痛.中国疼痛医学杂志,2002,2:111~115.
- 4 Harati Y, Gooch C, Swenson M, et al.曲马多治疗糖尿病性神经性疼痛的双盲随机试验.中国疼痛医学杂志,2001,1:58~63.