

# 极小剂量纳洛酮增强电针的镇痛作用 但不影响电针对吗啡戒断症状的抑制作用<sup>\*</sup>

崔彩莲 龚 栋 彭文萍<sup>1</sup> 常 玥<sup>1</sup> 韩济生

(北京大学神经科学研究所,北京 100083)

**摘要** 目的:纳洛酮(naloxone, NX)是一种阿片受体拮抗剂,应用于大鼠,在1~10 mg/kg范围内能对抗吗啡镇痛和电针(electroacupuncture, EA)镇痛。但有人报道,极小剂量NX可加强吗啡镇痛。本工作观察极小剂量NX是否能加强大鼠电针镇痛,及电针对大鼠吗啡戒断的抑制作用。方法:选用成年雄性SD大鼠,分两批进行实验。第一批以辐射热甩尾阈(TFL)作为大鼠痛阈指标,检测腹腔注射(i. p.)NX 10 ng/kg对2Hz EA和100Hz EA镇痛效应的影响。第二批在慢性吗啡依赖大鼠模型上,以体重丢失作为吗啡戒断反应指标,观察i. p. NX 10 ng/kg对2Hz EA和100Hz EA抑制NX(1mg/kg, i. p.)诱发的体重丢失的影响。结果:(1)EA之前10分钟i. p. NX 10 ng/kg,不仅能显著增强2Hz EA的镇痛作用( $P < 0.05$ ),而且可使其镇痛效应延长至120分钟;同样剂量NX对100 Hz EA的镇痛效应无明显影响( $P > 0.05$ )。(2)EA之前10分钟i. p. NX 10 ng/kg,对两种频率EA抑制吗啡戒断大鼠体重丢失的效应均无显著影响。结论:极小剂量的NX能增强和延长2Hz EA的镇痛作用,该发现可能具有临床应用意义。极小剂量的NX未能影响EA抑制吗啡戒断大鼠体重丢失的作用,这可能与吗啡戒断状态下阿片受体的功能改变有关。

**关键词** 极小剂量纳洛酮;电针;吗啡戒断;体重丢失

## ULTRA-LOW DOSE OF NALOXONE POTENTIATES ANALGESIC EFFECT INDUCED BY ELECTROACUPUNCTURE, BUT DOES NOT AFFECT ITS SUPPRESSIVE EFFECT ON MORPHINE WITHDRAWAL IN RATS

CUI Cai-Lian, JI Dong, PENG Wen-Ping<sup>1</sup>, CHANG Yue<sup>1</sup>, HAN Ji-Sheng

(Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing 100083)

**Abstract** Aim: Naloxone (NX) is a well-known opioid receptor antagonist that blocks opioid analgesia. However there was an unexpected and paradoxical observation that administration of extremely low doses of NX enhanced, rather than attenuated, the analgesic effects produced by small doses of morphine or other opioid agonists. The aim of this study was to determine whether ultra-low dose of NX could increase the efficacy of EA-induced analgesia and the suppression of morphine withdrawal in rats. Methods: (1) adult male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into seven groups of 8~10 each, receiving normal saline (NS), NX 10 ng/kg, 2 Hz EA, 100 Hz EA, 2 Hz or 100 Hz EA plus NX 10 ng/kg, or no treatment as blank control. Nociceptive threshold was measured by radiant heat-induced tail flick latency (TFL). (2) Adult male SD rats were made dependent on morphine by multiple injections of increasing doses of morphine for 5 days. The rats were randomly divided into six groups of 8~10 each, receiving NS, NX 10 ng/kg, 2 Hz EA, 100 Hz EA, and 2 Hz or 100 Hz EA plus NX 10 ng/kg, respectively. They were given EA for 30 min 6 h after the last injection of morphine, followed by intraperitoneal (i. p.) administration of naloxone (1 mg/kg). Body weight loss (g) was measured before and 60 min after

\* 北京大学985项目基金(基础医学院创新型医学人才培养工程)资助课题

<sup>1</sup> 临床医学2000级本科生

the NX injection. Results: (1) NX 10 ng/kg did not significantly influence the basal level of TFL, but significantly potentiate the analgesic effect induced by 2 Hz EA, with the effect lasting as long as 120 min. The analgesic effect produced by 100 Hz EA was not affected. (2) NX 10 ng/kg did not significantly influence NX-induced body weight loss in morphine-dependent rat. 2 Hz or 100 Hz EA for 30 min significantly reduced the body weight loss ( $P < 0.01$ ). The efficacy of EA was not affected by NX 10 ng/kg. Conclusion: (1) Ultra-low dose of NX selectively increases the analgesic effect induced by 2 Hz EA in the rat, which may have potential clinical impact. (2) It did not affect the efficacy of EA in suppressing body weight loss in morphine withdrawal rats.

**Key words** Ultra-low dose of naloxone; Electroacupuncture; Morphine withdrawal; Body weight loss

目前,阿片类(如吗啡)制剂系统给药仍然是减轻癌症痛及其他许多严重疼痛的主要方法<sup>[1]</sup>。但是由于其严重的副作用(如呼吸抑制、耐受与依赖、及认知损害等),限制了它的临床应用<sup>[2]</sup>。因此,寻找一种既能解除疼痛又无明显副作用的制剂或方法已成为疼痛研究者的一大难题。纳洛酮(naloxone, NX)是一种阿片受体拮抗剂,在大鼠,1~10 mg/kg范围内能明确对抗吗啡镇痛和EA镇痛。但Crain和Shen等报道,极小剂量NX不仅不对抗,反而可加强吗啡镇痛,减轻吗啡耐受。大量实验均显示,极小剂量的NX或纳曲酮(NTX)可增强吗啡的镇痛作用,缓解吗啡的耐受和依赖<sup>[3~5]</sup>。临床观察也验证了极小剂量的NX与小剂量吗啡联合用药,在术后痛病人能显著增强和延长吗啡镇痛效应,并减轻吗啡的副作用<sup>[6,7]</sup>。

我们以往的工作证明,不同频率的EA促进中枢神经系统释放不同类型的内源性阿片肽<sup>[8,9]</sup>,作用于阿片受体来介导镇痛<sup>[10]</sup>、抑制吗啡戒断综合征<sup>[11]</sup>。这是EA镇痛和EA治疗药物成瘾的重要机制之一。本工作观察极小剂量NX是否能增强EA的镇痛作用,及其抑制吗啡戒断的效应,为临床提高EA疗效提供依据。

## 材料与方法

### 1. 动物及药品

雄性SD大鼠,体重220~250克。由北京实验动物中心提供。饲养环境:每笼4只,温度21±1℃,相对湿度50%,维持12h/12h黑/白照明周期。

盐酸吗啡(Morphine Hydrochloride)由青海制药厂生产;盐酸纳洛酮(Naloxone Hydrochloride)为Sigma公司产品。

### 2. EA刺激和痛阈测定<sup>[12]</sup>

EA方法:按本实验室常规操作。将大鼠固定在

塑料筒内,将两对不锈钢针灸针插人大鼠双侧“足三里”穴和“三阴交”穴。用韩氏仪给予2/100Hz电刺激,2 Hz时波宽为0.6ms,100Hz波宽0.2ms。电流强度按1mA,2mA,3mA递增,共刺激30min。

测痛方法:实验开始时,取三次测定的大鼠甩尾阈(Tail Flick Latency, TFL)平均值作为基础痛阈。给大鼠皮下注射生理盐水(NS)或NX后10min开始EA,EA开始后每10min暂停EA测痛一次,以三次所测数值分别与基础TFL比较,以其变化百分率之平均值作为镇痛效应的指标。EA结束后,仍每隔10min测痛一次,至120min。痛阈升高超过150%时即停止照射,并以此为最大镇痛效果。

### 3. 吗啡依赖大鼠模型制备

大鼠皮下注射吗啡5天,每天三次(8:00, 16:00, 24:00),剂量逐日递增,分别为5、10、20、40和50mg/kg。在第6天8:00接受最后一次50mg/kg吗啡注射后6h,进行EA刺激和NX催促戒断实验。电针刺激前10 min i. p. NX 10 ng/kg,或等量NS作为对照。

### 4. 数据处理和统计学检验

应用GraphPad软件公司的Prism 3.0实验统计学专业软件进行统计学处理和绘图。实验数据以均值±标准误(Mean ± S. E. M)表示,统计学处理采用ANOVA继以Newman-Keuls检验,以 $P < 0.05$ 作为判断显著性的标准。

## 结 果

### 1. i. p. NX 10 ng/kg 对 2Hz EA 和 100Hz EA 镇痛效应的影响(图1)

66只大鼠,随机分为7组:空白对照组( $n=8$ ),NS对照组( $n=8$ ),NX 10 ng/kg组( $n=10$ ),2 Hz EA+NS组( $n=10$ ),100 Hz EA+NS组( $n=10$ ),2 Hz EA+NX 10 ng/kg组( $n=10$ ),100 Hz EA+NX

10 ng/kg 组( $n=10$ )。检测各组大鼠 TFL 的改变。

i. p. NX 10 ng/kg 对 2Hz EA 和 100Hz EA 镇痛效应的影响, 如图 1A、B 所示。

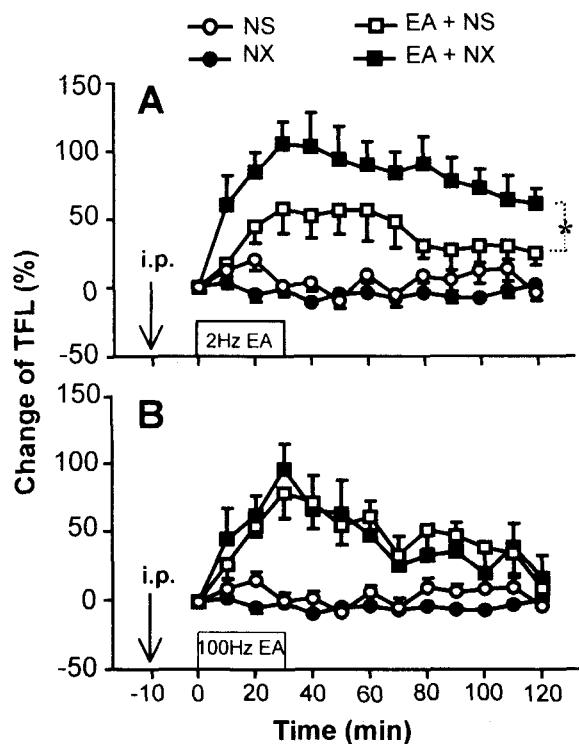


图 1 i. p. NX 10 ng/kg 对 2Hz EA 和 100Hz EA 镇痛效应的影响。纵坐标: 尾尾阈值变化百分数。 $* P < 0.05$  (ANOVA), 与 2Hz EA 组比较

**Fig. 1** Effect of i. p. NX 10 ng/kg on 2 Hz- and 100 Hz-EA analgesia in normal rats.  $* P < 0.05$  (ANOVA), compared with 2Hz EA group.

(1) 与空白对照组相比, i. p. NS 或 10 ng/kg NX, 对大鼠的基础痛阈(TFL)均无明显影响( $P > 0.05$ )。(2) 2 Hz EA 或 100 Hz EA 组, 在 EA 刺激 30 分钟期间及 EA 结束后的 30 分钟内均可显著升高大鼠的 TFL( $P < 0.05$ )。(3) EA 开始前 10 分钟给予 i. p. NX 10 ng/kg, 不仅能显著增强 2Hz EA 的镇痛作用, 而且可使其镇痛效应延长至 120 分钟(ANOVA,  $P < 0.05$ )。(4) NX 10 ng/kg 对 100 Hz EA 的镇痛效应无明显影响( $P > 0.05$ )。

2. i. p. NX 10 ng/kg 对 2Hz EA 和 100Hz EA 抑制吗啡戒断大鼠体重丢失的影响(图 2)

54 只吗啡依赖模型大鼠, 随机分为 6 组: NS 组( $n=8$ ), NX 10 ng/kg 组( $n=8$ ), 2 Hz EA + NS 组( $n=9$ ), 100 Hz EA + NS 组( $n=9$ ), 2 Hz EA + NX 10 ng/kg 和 100 Hz EA + NX 10 ng/kg 组( $n=10$ )。于 EA 刺激结束后, 立即给各组大鼠 i. p. NX 1 mg/kg 催促吗啡戒断症状, 并测定 NX 注射前和注射后

60 min 大鼠的体重(g)变化。从图 2 可见,(1) 2 Hz EA 和 100 Hz EA 刺激, 均可显著减少 NX 诱发的吗啡戒断大鼠的体重丢失( $P < 0.01$ )。(2) EA 前 10 分钟 i. p. NX 10 ng/kg, 对两种频率 EA 抑制吗啡戒断大鼠体重丢失的效应均无显著影响, 至少未能进一步增强 EA 的作用。

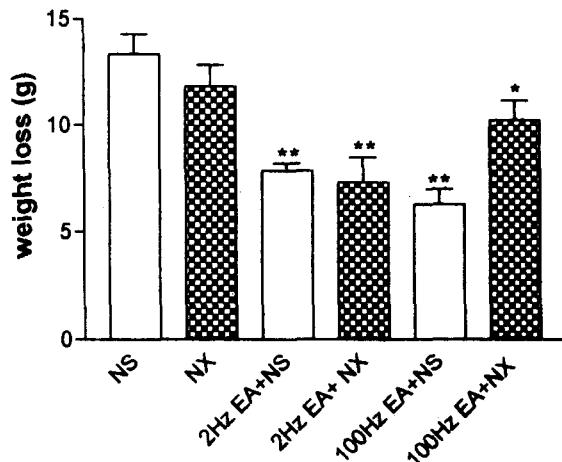


图 2 2Hz EA 和 100Hz EA 抑制吗啡戒断大鼠体重丢失的效应未受到 i. p. NX 10 ng/kg 的显著影响。纵坐标: 体重丢失(克)。 $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ; 与 NS 对照组比较。

**Fig. 2** Naloxone-induced body weight loss in morphine withdrawal rats was not significantly affected by NX 10 ng/kg i. p.  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ , compared with NS control group.

## 讨 论

1. i. p. NX 10 ng/kg 能够加强和延长 2Hz EA 镇痛效应

Crain 等在体实验中观察到极小剂量 NX 能加强外源性给予吗啡产生的镇痛作用。本工作证实: 极小剂量 NX 也能加强 2Hz 电针引起的镇痛作用, 可能是由于它加强了 2Hz 电针所释放的内源性阿片肽的镇痛作用所致。

关于这种增强作用的机制, Crain 等在离体培养的小鼠脊髓背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)痛感应神经元上进行了较深入的研究。结果提示, 存在于痛感应神经元上的阿片受体( $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ )具有两种类型: 一类是对阿片激动剂具有极高亲合力的兴奋性阿片受体, 通过与 Gs 蛋白偶联, 使 AC/CAMP  $\uparrow \rightarrow$  PKA  $\uparrow$ , 从而使细胞膜的钾离子通透性下降( $C_K \downarrow$ ), 钠离子通透性增高( $C_{Na} \uparrow$ ), 使动作电位持续时间(APD)延长, 加速痛信息传递(表现为痛敏); 一类是与 Gi/Go 偶联的性抑制性阿片受体, 与阿片激动剂的亲合力属于一般, 即较低水平, 能使

$C_K \uparrow, C_{Na} \downarrow$ , 从而使痛感觉神经元的 APD 缩短, 延滞了痛信息的传递(表现为镇痛)。极小剂量(pM 水平) NX 可选择性的阻断兴奋性阿片受体, 而不影响抑制性阿片受体<sup>[3,4]</sup>。表现为在体实验中极小剂量的 NX 或 NTX 可增强吗啡的镇痛、缓解吗啡的耐受和依赖<sup>[5]</sup>。本实验结果显示: 单纯的 10 ng/kg NX i. p. 不影响大鼠的 TFL。说明在生理状态下, NX 10 ng/kg 对调制痛与镇痛的两类(兴奋性与抑制性)阿片受体<sup>[3]</sup>均无明显阻断作用。

2Hz EA 和 100 Hz EA 组, 在 EA 刺激 30 分钟期间及 EA 结束后的 30 分钟内均可显著升高大鼠的 TFL。其原理是 EA 刺激促使大鼠中枢释放内源性阿片肽, 其镇痛作用相当于小剂量的吗啡(3~4mg/kg)<sup>[13]</sup>, 通过阿片受体来介导镇痛<sup>[10]</sup>。从图 1A 可以看出, 于 EA 开始前 10 分钟给以 i. p. NX 10 ng/kg, 不仅能显著增强 2Hz EA 的镇痛, 而且使镇痛时间延长了至少 60 分钟。

我们推测, 单纯 2Hz EA 镇痛时, 由 2Hz EA 刺激释放的内源性脑啡肽、内啡肽及内吗啡肽<sup>[9,14]</sup>不仅作用于与 Gs 蛋白偶联的兴奋性阿片受体, 同时也作用于与 Gi/Go 偶联的抑制性阿片受体。由于存在着兴奋性阿片受体介导的抗镇痛效应, 使得 2Hz EA 的镇痛效应未能充分显现。当 i. p. NX 10 ng/kg 时, 这种极小剂量 NX 选择性的阻断了兴奋性阿片受体(而不影响抑制性阿片受体)<sup>[3]</sup>, 从而增强和延长了 2Hz EA 的镇痛作用。至于 10 ng/kg NX 何以对 100 Hz EA 的镇痛效应无明显影响, 可能由于 100 Hz EA 刺激释放的强啡肽<sup>[8~10]</sup>对兴奋性阿片受体的亲合力与脑啡肽、内啡肽及内吗啡肽不尽相同。这一推测还需要更多的实验来验证。

2. i. p. NX 10 ng/kg 对 2Hz EA 和 100Hz EA 抑制吗啡戒断大鼠体重丢失无显著影响

NX(1 mg/kg, i. p.)可催促吗啡依赖大鼠表达戒断症状, 其中体重丢失一项被大多数学者作为吗啡戒断的计量性指标。本实验结果显示, 单纯的 i. p. NX 10 ng/kg 不影响吗啡戒断引起的大鼠体重丢失。提示在较大剂量(1 mg/kg = 1 000 000 ng/kg) NX 诱发的吗啡戒断状态下, 极小剂量(10 ng/kg) NX 对兴奋性阿片受体的敏感性并未产生明显影响。

2Hz EA 或 100Hz EA 均可抑制吗啡戒断大鼠的体重丢失, 这与我们前期的实验结果一致<sup>[15]</sup>。i. p. NX 10 ng/kg 对 2Hz EA 或 100Hz EA 抑制吗啡戒断大鼠体重丢失的效应, 并不产生显著性影响。这可

能由于吗啡戒断时, 阿片受体的敏感性和功能发生了极大的改变<sup>[16,17]</sup>, 远远超出了正常范围。此外, 有许多非阿片系统(如谷氨酸受体系统<sup>[18]</sup>、单胺类受体系统<sup>[19,20]</sup>等)也在吗啡依赖和戒断的调节过程中发挥重要作用, 而这是极小剂量 NX 无法影响的。

总之, 本工作首次发现极小剂量的 NX 能增强和延长 2Hz EA 的镇痛作用, 这对于临床提高 EA 镇痛效应可能具有实用意义。

## 参 考 文 献

- Yaksh TL. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1997, 41 : 94~111.
- Portenoy PK, Payne R. Acute and chronic pain. In: Lowinson JH, Ruiz P, Millman RB, Langrod JG, eds. *Substance Abuse: A Comprehensive Textbook*, 3rd. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1997. pp. 563~589.
- Crain SM, Shen KF. Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance / dependence during chronic cotreatment, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 : 10540 ~ 10544.
- Shen KF, Crain SM. Cholera toxin-B subunit blocks excitatory opioid receptor-mediated hyperalgesic effects in mice, thereby unmasking potent opioid analgesia and attenuating opioid tolerance / dependence. *Brain Res*, 2001, 919 : 20~30.
- Shen KF, Crain SM. Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance/dependence in mice, *Brain Res*, 1997, 757 : 176~190.
- Gan TJ, Ginsberg B, Glass PSA, et al. Opioid-sparing effects of a low-dose infusion of naloxone in patient-administered morphine sulfate. *Anesthesiology*, 1997, 87 : 1075~1081.
- Johnson A, Bengtsson M, Lofstrom JB, et al. Influence of postoperative naloxone infusion on respiration and pain relief after intrathecal morphine. *Reg Anesth*, 1988, 13 : 146~151.
- Han JS, Chen XH, Sun SL, et al. Effect of low

- and high frequency TENS on met-enkephlin-Arg-Phe and dynorphin A immunoreactivity in human lumbar CSF. *Pain*, 1991, 47 : 291 ~ 298.
- 9 Han JS. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. *Trends Neurosci*, 2003, 26 : 17 ~ 22.
- 10 Chen XH, Han JS. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors: another cross-tolerance study. *Behav Brain Res*, 1992, 47 : 143 ~ 149.
- 11 Wu LZ, Cui CL, Tian JB, et al. Suppression of morphine withdrawal by electroacupuncture in rats: dynorphin and k-opioid receptor implicated. *Brain Research*, 1999, 851 : 290 ~ 296.
- 12 Ren MF, Han JS. Rat tail flick acupuncture analgesia model. *Chinese Med J*, 1979, 92 : 576 ~ 582.
- 13 Han JS, Zhou ZF, Xuan YT. Acupuncture has analgesic effect in rabbits. *Pain*, 1983, 15 : 83 ~ 91.
- 14 Huang C, Wang Y, Chang JK, et al. Endomorphin and mu-opioid receptors in mouse brain mediate the analgesic effect induced by 2 Hz but not 100 Hz electroacupuncture stimulation. *Neurosci Lett*, 2000, 294 : 159 ~ 162.
- 15 Han JS, Zhang RL. Suppression of morphine abstinence syndrome by body electroacupuncture of different frequencies in rats. *Drug Alcoh Depend*, 1993, 31 : 169 ~ 175.
- 16 Laura M, Kastin HJ, James E, et al. Opiate Tolerance and Dependence: Receptors, G-proteins, and Antagonists. *Peptides*, 1998, 19 : 1603 ~ 1630.
- 17 Minoru N, Masahiko F, Tsutomu S. Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Therap*, 2001, 89 : 1 ~ 15.
- 18 Koyuncuoglu H, Nurten A, Yamanturk P, et al. The importance of the number of NMDA receptor in the development of supersensitivity or tolerance to and dependence on morphine. *Pharmacol Res*, 1999, 39 : 311 ~ 319.
- 19 El-Kadi AOS, Sharif SI. The role of dopamine in the expression of morphine withdrawal. *Gen Pharmacol*, 1998, 30 : 499 ~ 505.
- 20 Grant KA. The role of 5-HT<sub>3</sub> receptors in drug dependence. *Drug Alcoh Depend*, 1995, 38 : 155 ~ 171.

## 弥散性伤害抑制控制缩短正常男性慢痛的时间

弥散性伤害抑制控制(DNIC)是中枢性疼痛调节系统的一部分,它依赖于脊髓和脊髓上机制。以前研究表明,纤维肌痛患者试验性疼痛时与正常对照组相比缺乏 DNIC 效应。DNIC 对慢痛(second pain)较快痛有更大的作用。因此假设强的条件刺激可缩短慢痛的时间。

此试验旨在分别评估慢痛抑制的相关机制的作用,以这种方式引导受试者对实验或条件刺激的注意力。研究对象包括:11位正常对照男性,22位正常对照女性,11位纤维肌痛女性。实验比较了3组研究对象疼痛结束的 DNIC 效应。右手鱼际表面反复热刺激用于产生慢痛的实验性刺激。左手浸入热水浴做为条件刺激。以前的试验表明 DNIC 缓解疼痛需要一个强条件刺激,这可能至少部分依赖于分散效应。与两组正常组相比,纤维肌痛患者有更大的热痛时间总和,DNIC 明显抑制正常男性对照组热刺激产生的慢痛。而在正常女性组和纤维肌痛组中无此效应,但 DNIC 加分散注意力并不增加抑制的程度。相对的,DNIC 或 DNIC 加分散注意力均不能减轻女性正常对照者热刺激产生的慢痛。DNIC 加分散注意力可以明显抑制女性纤维肌痛患者的热刺激产生的慢痛,但 DNIC 单独无此效应。本研究结果表明 DNIC 对实验性慢痛的调节有性别特异性,女性缺乏此疼痛抑制机制。

(Staud R, Robinson ME, Vierck JCJ, et al. *Pain* 2003; 101: 167 ~ 174. 郭俊唐 译, 于生元 审校)