

氯胺酮对大鼠吗啡戒断症状的影响及其作用机理

盛国庆¹, 张晋蓉², 邢淑华², 蒲小平¹, 李长龄¹, 戴体俊^{2*}

(1. 北京大学药学院分子与细胞药理学系, 北京 100083; 2. 徐州医学院麻醉学系, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究氯胺酮对大鼠吗啡戒断症状的影响及其可能的机理。方法 建立大鼠吗啡依赖模型, 在用纳洛酮催瘾前 2 min 给予不同剂量的氯胺酮, 观察其戒断症状的改变; 用分光光度法测定戒断时大鼠一氧化氮(NO)含量、一氧化氮合酶(NOS)活性, 用放射免疫法测定环鸟苷酸(cGMP)含量。结果 3个剂量的氯胺酮(5、10和20 mg·kg⁻¹)均可缓解吗啡戒断时探究、扭体、湿狗样抖动、跳跃等运动反应, 减少活动次数, 抑制植物神经系统症状。10、20 mg·kg⁻¹氯胺酮可显著减轻吗啡戒断所致的体重下降, 小剂量氯胺酮(5 mg·kg⁻¹)可抑制吗啡依赖大鼠前额叶皮质、小脑的 NOS 活性和 NO、cGMP 含量的增高。结论 氯胺酮可缓解大鼠吗啡戒断症状, 其作用机理可能与减弱大鼠吗啡戒断时 NMDA-NO-cGMP 通路效应有关。

关键词:吗啡; 氯胺酮; 戒断症状; *N*-甲基-*D*-天冬氨酸; 一氧化氮; 环鸟苷酸

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2002)02-0088-05

对于阿片类药物依赖性机理的研究, 经典的理论认为^[1], 长期给予阿片类物质后骤然撤药时, G 蛋白-cAMP 系统稳态失衡, G 蛋白-cAMP 系统发生急剧增高, 引发环腺苷酸依赖的蛋白激酶的活性升高, 改变了一些底物蛋白的合成和代谢, 从而出

现一系列的戒断症状。然而, 新近的研究表明, 谷氨酸能神经递质系统也参与了吗啡(morphine)依赖和戒断的形成过程^[2-6]。*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA)受体的非竞争性拮抗剂 MK-801 可以减轻大鼠的戒断症状; 正在进行临床戒毒实验的一些一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂和 NOS 的反义寡核苷酸均通过减少一氧化氮(nitric oxide, NO)的生成间接抑制 NMDA 受体^[7]。有实验也证明, 大鼠吗啡戒断时脊髓和脑干部位 NOS 的免疫活性显著增强。因此, 最近的研究认为, 以谷氨酸为启动物质的 NMDA-NO-cGMP 信号转导通路参与了吗啡戒断症状的发生^[8]。氯胺酮(ketamine)是 NMDA 受体的非竞争性拮抗剂, 也是临床常用的静脉麻醉药。有资料表明, 氯胺酮可以延缓吗啡镇痛耐受的产生^[9,10], 其作用机理很有可能是通过 NMDA 受体途径。临床上已试用氯胺酮戒毒并获得较好的疗效, 但缺乏动物实验依据, 作用机理亦不清楚。因此, 作者首先建立大鼠的吗啡依赖模型, 用阿片受体的特异性拮抗剂纳洛酮(naloxone)做催瘾剂, 观察了氯胺酮对大鼠吗啡戒断症状的影响, 并测定大鼠吗啡戒断时小脑和前额叶皮质 NO、NOS 和环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的变化以及氯胺酮对这些变化的影响, 来探索其缓解吗啡戒断症状的机理。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂和仪器

氯胺酮为江苏恒瑞医药股份有限公司产品(批号 001110), 盐酸吗啡注射液为沈阳第一制药厂生产(批号 980404), 纳洛酮为北京四环制药厂产品(批号 9811260)。NO、NOS 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, cGMP 试剂盒购自北京原子能研究院同位素研究所。752-G 紫外分光光度计(上海分析仪器厂), FJ-2107P 型液体闪烁计数器(国营二六二厂)。

收稿日期: 2001-10-15 接受日期: 2001-12-20

基金项目: 江苏省教委自然科学基金资助项目(94113)

作者简介: 盛国庆(1974-), 男, 江苏省徐州市人, 博士研究生, 主要从事神经药理学研究; 戴体俊(1944-), 男, 江苏省徐州市人, 教授, 硕士生导师, 主要从事麻醉药理学研究; 李长龄(1946-), 男, 北京市人, 教授, 博士生导师, 主要从事心血管药理学研究。

* 联系作者 Tel: (0516)5838849, Fax: (0516)5748429, E-mail: sgq421@263.net

1.2 大鼠依赖模型的建立

实验动物选用 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(徐州医学院实验动物中心提供) 40 只, ♂, 体重(205 ± 26)g ($\bar{x} \pm s$), 随机分为 5 组, 每组 8 只, 即吗啡组, 生理盐水组和氯胺酮 3 个剂量组。参照文献[11], 采用皮下剂量递增法给药建立大鼠吗啡依赖模型。sc 盐酸吗啡, 对照组给予等容积的生理盐水。首次给予 10 mg·kg⁻¹, 每日 2 次(8:00, 17:00), 剂量递增法给药, 连续给药 5 d。剂量分别为 10、20、30、40 及 50 mg·kg⁻¹。d 6 8:00 给予吗啡 50 mg·kg⁻¹, 4 h 后给予纳洛酮(4 mg·kg⁻¹, ip) 催瘾, 氯胺酮组催瘾前 2 min 分别 ip 氯胺酮 5、10、20 mg·kg⁻¹, 其余各组给予等体积的生理盐水。

1.3 戒断症状观察

纳洛酮催瘾后立即将大鼠放于一特殊圆柱型装置中(直径 30 cm、高 35 cm), 记录 30 min 内戒断症状, 观察指标参照 Koob 等^[12]方法并略加改进。观察内容主要包括运动行为学表现(探究、扭体、跳跃及湿狗样抖动等, 直接记录 30 min 内发生的总次数)、植物神经系统症状(流涎、流泪和腹泻等, 按轻重不同等级打分, 无症状为 0 分, 轻度为 2 分, 重度为 4 分, 计算总分值)及催瘾前后 1 h 大鼠体重下降的百分率。

1.4 一氧化氮含量及一氧化氮合酶活性测定

纳洛酮催瘾 10 min 后断头, 低温迅速取出小脑和双侧大脑前额叶皮质, 称重置入预冷的匀浆介质中(pH 7.5, 0.025 mol·L⁻¹ EDTA)(1/10, W/V), 在 0~4℃冰水浴中用超声波粉碎机匀浆, 离心(4℃, 4000 × g, 10 min), 取上清液按文献[13, 14]方法测定 NOS 活性和 NO 含量, 蛋白测定采用 Lowery 等法, 以牛血清蛋白为标准^[15]。

1.5 环鸟苷酸含量测定^[16]

称取冷冻脑组织 70~100 mg, 置入 0.6 mL 预冷的 10% 三氯醋酸中匀浆, 并以此液调节匀浆浓度为每毫升含湿组织 50 mg, 离心(4℃, 2000 × g, 10 min), 取上清液, 用 4 倍量的水饱和乙醚提取 4 次, 以除去过量的三氯醋酸, 最后 1 次洗涤吸去乙醚, 置 60℃ 水浴上吹干, 吹干的样品保存于冰箱中(0~4℃), 在测定 cGMP 含量时将蒸干的样品溶于醋酸钠缓冲液(50 mmol·L⁻¹, pH 6.2) 200 μL, 以放射免疫法测定小脑和前额叶皮质的 cGMP 含量。

1.6 统计学处理

全部数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用完

全随机设计方差分析(ANOVA), 两组间比较采用两组 *t* 值法, 统计学处理应用 SAS 软件。

2 结果

2.1 氯胺酮缓解大鼠吗啡的戒断症状

表 1 结果表明, 与生理盐水对照组比较, 吗啡组大鼠运动活性次数增高 20 多倍, 植物神经系统症状评分增加 70 多倍, 体重显著下降。与吗啡组相比, 氯胺酮 3 个剂量组对大鼠吗啡戒断症状均有明显的抑制作用: ① 减轻探究、扭体、湿狗样抖动和跳跃等运动反应, 使活动次数减少, 氯胺酮各剂量组之间无显著差异, 但都高于生理盐水对照组及吗啡组; ② 氯胺酮可明显减轻腹泻、流涎和流泪等植物神经系统症状, 并随着剂量的增加其抑制效果逐渐增强; ③ 10、20 mg·kg⁻¹ 氯胺酮可显著减轻吗啡戒断所致的体重下降。

2.2 氯胺酮对大鼠吗啡戒断时小脑、前额叶皮质的一氧化氮含量及一氧化氮合酶活性的影响

表 2 结果表明, 与生理盐水对照组比较, 吗啡组戒断时小脑、前额叶皮质的 NO 含量分别增加了 37% 和 40%, NOS 的酶活性分别增加 80% 和 75%, 氯胺酮组小脑、前额叶皮质 NO 含量分别比吗啡组降低了 44% 和 32%, NOS 活性分别比吗啡组降低了

Tab 1. Effects of ketamine (Ket) on morphine (Mor) withdrawal symptoms in rats

Group	Movement frequency	Autonomic syndrome score	Weight loss /%
NS	5.9 ± 1.7	0 ± 0	1 ± 1
Mor	120 ± 44**	24 ± 6**	4 ± 2**
NS + Ket 5	65 ± 31###	17 ± 6###	4 ± 1**
10	60 ± 14###	9 ± 4###	2 ± 1###
20	51 ± 25###	6 ± 2###	1 ± 1##

Mor was administered sc twice daily in a volume of 0.1 mL·kg⁻¹ body weight to rats. The dose of Mor was increased progressively from 10 to 50 mg·kg⁻¹ for 5 d. Withdrawal signs were precipitated by administration of naloxone(4 mg·kg⁻¹, ip) after the final administration of Mor(50 mg·kg⁻¹, sc), the animals were placed in an observable cylinder(30 cm in diameter and 35 cm in height). Normal saline(NS) or different doses of Ket(5, 10, 20 mg·kg⁻¹) were administered ip in a volume of 0.1 mL·kg⁻¹ body weight to rats 2 min before the test. The behavioral syndrome, autonomic syndrome and percentage of weight loss were measured. $\bar{x} \pm s$, *n* = 8. ** *P* < 0.01, compared with NS group; # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01, compared with Mor group.

Tab 2. Effects of ketamine on nitric oxide(NO) concentration and nitric oxide synthase(NOS) activity in brain tissues of morphine withdrawal rats

Group	NO concentration/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ protein		NOS activity/ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ protein	
	Cerebellum	Prefrontal cortex	Cerebellum	Prefrontal cortex
NS	0.57 ± 0.13	0.42 ± 0.09	0.24 ± 0.07	0.12 ± 0.04
Mor	0.78 ± 0.18*	0.59 ± 0.15*	0.43 ± 0.14**	0.21 ± 0.06**
Mor + Ket 5	0.44 ± 0.12##	0.40 ± 0.13#	0.18 ± 0.06##	0.12 ± 0.03##

Drug treatments were the same as described in Tab 1. All rats were sacrificed 10 min after the administration of naloxone for measuring NO concentration and NOS activity in brain tissues. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with NS group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with Mor group.

58%和43%，而与生理盐水对照组无显著差异。表明氯胺酮可以显著降低大鼠吗啡戒断时小脑、前额叶皮质的NO含量及NOS活性。

2.3 氯胺酮对吗啡依赖大鼠戒断时小脑、前额叶皮质的环鸟苷酸含量的影响

表3结果表明,与生理盐水对照组比较,吗啡组戒断时小脑、前额叶皮质cGMP含量分别增加75%和85%;氯胺酮组小脑、前额叶皮质的cGMP含量分别比吗啡组降低46%和50%,与吗啡组有显著性差异,而与生理盐水对照组无显著差异。因此,氯胺酮可以显著降低大鼠戒断时小脑、前额叶皮质的cGMP含量。

Tab 3. Effect of ketamine on cyclic guanosine monophosphate(cGMP) concentration in brain tissues of morphine withdrawal rats

Group	cGMP concentration/ $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ protein	
	Cerebellum	Prefrontal cortex
NS	0.20 ± 0.08	0.13 ± 0.07
Mor	0.35 ± 0.14*	0.24 ± 0.12*
Mor + Ket 5	0.19 ± 0.10#	0.12 ± 0.06#

Drug treatments were the same as described in Tab 1. All rats were sacrificed 10 min after the administration of naloxone for measuring cGMP concentration in brain tissues. $\bar{x} \pm s$, $n = 8$. * $P < 0.05$, compared with NS group; # $P < 0.05$, compared with Mor group.

3 讨论

本实验显示,与吗啡组比较,氯胺酮3个剂量组的运动活性次数分别减少46%、50%、57%,表明氯胺酮可有效地抑制吗啡戒断时运动活性,而且戒断大鼠的运动活性越强,氯胺酮的抑制效果越明显,体现了NMDA受体非竞争性拮抗剂的应用依赖

性(use-dependence)特点^[17]。氯胺酮可有力地抑制植物神经系统反应及体重下降的趋势。研究中发现,吗啡依赖大鼠戒断时前额叶皮质、小脑的NO含量、NOS活性显著增高,同时,各脑区cGMP的含量变化与NO、NOS的变化呈平行关系,表明了NO和cGMP之间的内在联系,并且提示NO-cGMP的偶联机理参与了吗啡的戒断症状。预先给予小剂量氯胺酮($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)可显著抑制戒断所致的NOS活性增强和NO、cGMP含量的增高。一些NOS抑制剂(L-NNA、L-NMMA、7-NI等)可有效地抑制吗啡的戒断症状,并在进行临床试验^[18]。用反义寡核苷酸介导的NOS的活性减弱也产生相似的作用。因此,作为NMDA受体的非竞争性拮抗剂,氯胺酮缓解大鼠吗啡戒断症状的可能机理是:吗啡戒断时,大量释放的谷氨酸作用于NMDA受体引起 Ca^{2+} 内流增加,激活NOS,产生NO,NO作为鸟苷酸环化酶的内源性活化因子,促进cGMP合成。cGMP是一种重要的细胞信使,引起细胞功能的一系列变化,导致戒断症状的发生。氯胺酮与NMDA受体的苯环哌啶位点非竞争性结合,减弱了NMDA受体的药理学活性,抑制了NMDA受体兴奋,从而抑制了NMDA-NO-cGMP信号通路,起到缓解大鼠吗啡戒断症状的作用。在本实验开始之前,作者进行了预实验,直接给予大鼠不同剂量(包括0.1、1、5、10、20、30、50、100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)的氯胺酮,发现低于30 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量时,大鼠运动自如,反正反射存在,自主活动正常,没有流泪、流涎、腹泻症状。但超过50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以后,大鼠运动失调、步履蹒跚、反应迟钝,运动次数明显减少,开始出现麻醉镇静作用。因此本实验氯胺酮剂量为5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,远低于大鼠麻醉剂量(100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)^[19],不产生镇静作用。并且1次给药,起效快,迅速抑制行为和植物神经系统变化,减轻了

催瘾前后的体重下降,作用持续时间短,几乎与吗啡戒断症状发作维持时间相一致而无迁延作用、不产生运动失调等不良反应。因此,采用小剂量给药,把握治疗剂量和疗程可以减轻其导致运动失调的副作用,这为临床应用提供了动物实验依据。

消除身体依赖性,缓解戒断症状只是综合治疗的首步措施,最终的治疗目的在于消除精神依赖性、防止复吸,并最终回归社会。氯胺酮是否可以有效抑制阿片类药物依赖的奖赏作用,消除依赖者的精神依赖性,还有待进一步研究。在本实验条件下,氯胺酮虽可缓解吗啡依赖大鼠的戒断症状,但尚不能完全消除之,提示 NMDA-NO-cGMP 通路只是吗啡戒断症状发生的机理之一。

4 参考文献:

- [1] Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction[J]. *J Neurosci*, 1992, **12**(7):2439 - 2450.
- [2] Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction[J]. *Science*, 1997, **278**(5335):58 - 63.
- [3] Koob GF, Nestler EJ. The neurobiology of drug addiction[J]. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1997, **9**(3):482 - 497.
- [4] Nestler EJ, Berhow MT, Brodtkin ES. Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways[J]. *Mol Psychiatry*, 1996, **1**(3):190 - 199.
- [5] Fundytus ME, Ritchie J, Coderre TJ. Attenuation of morphine withdrawal symptoms by subtype-selective metabotropic glutamate receptor antagonists[J]. *Br J Pharmacol*, 1997, **120**(6):1015 - 1020.
- [6] Anon. Research news: teaching the brain to take drugs[J]. *Science*, 1997, **280**:2045 - 2047.
- [7] London ED, Kimes AS, Vaupel DB. Inhibitors of nitric oxide synthase and the opioid withdrawal syndrome [J]. *NIDA Res Monogr*, 1995, **147**:170 - 181.
- [8] Buccafusco JJ, Terry AV Jr, Shuster L. Spinal NMDA receptor - nitric oxide mediation of the expression of morphine withdrawal symptoms in the rat[J]. *Brain Res*, 1995, **679**(2):189 - 199.
- [9] Trujillo KA, Akil H. Inhibition of opiate tolerance by non-competitive *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonists[J]. *Brain Res*, 1994, **633**(1 - 2):178 - 188.
- [10] Dai TJ, Ye M, Fu Y, Shi Y, Guo ZM. Effects of ketamine on morphine induced analgesia and tolerance in mice[J]. *Chin J Pain Med*(中国疼痛医学杂志), 1998, **4**(4):217 - 221.
- [11] Yang GD, Zhou WH, Zhang FQ, Zhang YH, Liu HF. Experimental study of selective muscarinic receptor antagonists on attenuation of morphine tolerance and dependence in rat [J]. *Natl Med J China*(中华医学杂志), 1997, **77**(2):130 - 133.
- [12] Koob GF, Maldonado R, Stinus L. Neural substrates of opiate withdrawal[J]. *Trends Neurosci*, 1992, **15**(5):186 - 191.
- [13] Zhong CS, Sun AY. *Biomedicine of Nitric Oxide*[M](一氧化氮的生物医学). Shanghai: Shanghai Medical University Publishing House, 1997. 361 - 365.
- [14] Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models [J]. *FASEB J*, 1993, **7**(2):349 - 360.
- [15] Sharma RK, Wang JH. Preparation and assay of the Ca^{2+} - dependent modulator protein[J]. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1979, **10**:187 - 198.
- [16] Cailla HL, Vannier CJ, Delaage MA. Guanosine 3',5'-cyclicmonophosphate assay at 10(-15) mole level [J]. *Anal Biochem*, 1976, **70**(1):195 - 202.
- [17] Zou G. *Basic Neuropharmacology*[M](基础神经药理学). 2nd ed. Beijing: Science Press, 1999. 128 - 130.
- [18] Capasso A, Sorrentino L, Pinto A. The role of nitric oxide in the development of opioid withdrawal induced by naloxone after acute treatment with mu- and kappa-opioid receptor agonists[J]. *Eur J Pharmacol*, 1998, **359**(2 - 3):127 - 131.
- [19] Xu PC, Hu XG, Wang J, Duan SM. Effects of propofol and ketamine on cyclic guanosine 3',5'-monophosphate(cGMP) content in the rat brain *in vivo*[J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 1999, **15**(1):87 - 88.

Effects of ketamine on precipitated morphine withdrawal symptoms in rats and its possible mechanism

SHENG Guo-Qing¹, ZHANG Jin-Rong², XING Shu-Hua², PU Xiao-Ping¹, LI Chang-Ling¹, DAI Ti-Jun²

(1. Department of Molecular and Cellular Pharmacology, College of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Department of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

Abstract: **AIM** To elucidate the effects of ketamine on naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms in rats and its possible mechanism. **METHODS** Naloxone-precipitated morphine withdrawal symptoms were observed in morphine-dependent rats. Various doses of ketamine or normal saline were administrated ip to rats 2 min before the test. Nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) output were assessed with spectrophotometric analysis, concentration of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) was measured with radioimmunoassay. **RESULTS** Ketamine (5, 10, 20 mg·kg⁻¹, ip) can significantly attenuate the counted withdrawal behaviors (numbers of jumps, wet dog shakes, rearing as well as writhing movements); various doses of ketamine effectively inhibited autonomic hyperactivity such as salivation, tearing, diarrhea ($P < 0.05$); weight loss across the abstinence session was attenuated by ketamine at the

doses of 10, 20 mg·kg⁻¹ ($P < 0.05$). Levels of NOS activity, NO output as well as cGMP content in cerebellum, prefrontal cortex during the period of morphine withdrawal were increased significantly compared with saline group ($P < 0.05$), while pretreatment of ketamine could inhibit the enhanced NOS activity, NO output as well as concentration of cGMP in morphine abstinence session ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Withdrawal symptoms in morphine dependent rats can be attenuated by pretreatment of ketamine, the mechanism may be related to the suppression of up-regulation of NMDA-NO-cGMP signaling pathway.

Key words: morphine; ketamine; withdrawal symptoms; *N*-methyl-*D*-aspartate; nitric oxide; cyclic guanosine monophosphate

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Educational Committee of Jiangsu Province (94113)

(本文编辑 周宇红)