

# 大鼠蛛网膜下腔联合注射 $\kappa$ 阿片受体激动剂和 NMDA 受体拮抗剂协同镇痛

李富春 孙秀君 胡文辉 任民峰

(中国医学科学院、中国协和医科大学基础医学研究所, 北京 100005)

**提要** 以大鼠热辐射甩尾潜伏期为测痛指标, 蛛网膜下腔(it)联合注射非镇痛剂量的  $\kappa$ 阿片受体激动剂强啡肽(dynorphin, Dyn) A-(1-13) 5 nmol 或 U50488H(trans-(±)-3, 4-dichloro-N-methyl-2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl]-benzeneacetamide) 100 nmol 和 N-methyl-D-aspartate(NMDA)受体拮抗剂 DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid(APV) 10 nmol 或 kynurenic acid(KYN) 50 nmol 有显著的协同镇痛效应, 其效应与 NMDA 受体拮抗剂呈一定量效关系。 $\kappa$ 阿片受体特异性拮抗剂 nor-binaltorphimine(nor-BNI) 15 nmol 可完全翻转 Dyn A-(1-13) 5 nmol 和 APV 10 nmol 及 U50488H 100 nmol 和 KYN 50 nmol 的协同镇痛。说明协同作用是通过  $\kappa$ 阿片受体和谷氨酸能神经元之间的相互作用实现的。

**关键词** NMDA 受体;  $\kappa$ 阿片配基; 协同镇痛

$\kappa$ 阿片受体及其内源性配基强啡肽(Dyn)广泛分布于中枢神经系统; 尤其在脊髓背角浅层<sup>(1~5)</sup>。脊髓蛛网膜下腔(it)注射 Dyn A 强烈抑制大鼠热辐射甩尾和电嘶叫反应<sup>(6~9)</sup>, 随剂量增加伴随一过性后肢运动障碍或永久性瘫痪, 致脊髓神经元大量死亡<sup>(10~12)</sup>。其毒性作用与 NMDA 受体过度激活有关<sup>(11,12)</sup>。鉴于 NMDA 受体拮抗剂有镇痛作用<sup>(13,14)</sup>, 本文观察了阈下镇痛剂量的 NMDA 受体拮抗剂与 Dyn A-(1-13)及非肽类  $\kappa$ 阿片受体激动剂和拮抗剂的联合镇痛, 以探讨 Dyn A 和  $\kappa$ 阿片受体在脊髓痛调制中的作用机制, 并分析 Dyn A 痛调制与神经毒性作用的不同特点。

## 材 料 和 方 法

**动物与药品** Wistar 大鼠, 体重 240~280 g, 由中国医学科学院动物繁育中心提供。Dyn A-(1-13)为 Peninsula (Belmont, CA, USA) 公司产品; kynurenic acid (KYN), DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) 为 Sigma 公司产品; U50488H 和 nor-binaltorphimine (nor-BNI) 由北京医科大学神经科学中心馈赠; 其余试剂, 分析纯, 为北京化工厂产品。各药品以一定浓度比例溶入生理盐水中, 分装并冻存于 -20℃ 冰箱, 实验前解冻, 混合液于实验前配制。对照组以生理盐水注射。

**插管与药物注射** 按 Yaksh 法行大鼠蛛网膜下腔插管。术前以戊巴比妥钠(35 mg · kg<sup>-1</sup>) 行 ip 麻醉, 枕骨下方消毒, 沿正中线切开皮肤, 逐层分离肌肉, 直至暴露枕骨下方的环枕后膜。钩破此膜, 有无色透明脑脊液随呼吸上下波动, 并有少许流出。取自制 PE 管, 缓缓插入脊髓蛛

网膜下腔,至 7.5 cm 处固定,外端留有 4.5 cm 管长,作缝合手术。动物手术后 24 h 检查,正常者作实验用。每只动物经插管以 50  $\mu$ l 微量注射器注入药物,药物容量以 10  $\mu$ l 为标准,两种溶液间以 1  $\mu$ l 气泡隔开。

**甩尾潜伏期(TFL)测定** 将术后正常大鼠装入自制特殊园筒,尾和后肢露于筒外,待动物安静 20~30 min 后,用电影放映灯泡(0~12 V 可调)经聚焦照射离尾尖相当尾长 1/3 处皮肤,以 TFL 反映痛阈。首先间隔 5 min 测 3 次,取平均值为基础痛阈,在 4~5 s 左右。给药后隔 10 min 测一次,与基础值比较求出增长百分数,反映镇痛作用。为避免灼伤尾部,以照射 14 s 为上限,超过基础值 150%者以 150%计算。给药后连续观测 60 min。

## 结 果

### 阈下剂量 $\kappa$ 阿片受体激动剂与 NMDA 受体拮抗剂联合注射的镇痛作用

实验分成 9 组,分别 it 生理盐水, Dyn A-(1-13) 5 nmol, U50488 100 nmol, APV 10 nmol, KYN 50 nmol 以及联合注射相同剂量 Dyn A-(1-13)和 APV 或 KYN, U50488 和 APV 或 KYN 之混合液。

图 1A, 1B 显示了联合 it Dyn A-(1-13)和 APV 或 KYN 的协同镇痛效应。Dyn A-(1-13) 5 nmol 和 APV 10 nmol 在联合给药 30 min 内, Dyn A-(1-13) 5 nmol 和 KYN 50 nmol 在联合给药 20 min 内均有极显著甩尾抑制效应( $P < 0.001$ )。前者在 40 min 和 50 min 时仍有抑制效应。单一给药均不影响甩尾反应。

图 1C, 1D 显示联合 it U50488H 100 nmol 和 APV 10 nmol 或 KYN 50 nmol 时的协同作用。在 40 min 内均有显著或极显著的甩尾抑制效应,而后的作用较前者更强。

结果表明  $\kappa$ 阿片受体激动剂和 NMDA 受体拮抗剂能协同诱导镇痛效应。

### $\kappa$ 阿片受体特异性拮抗剂 nor-BNI 对上述相互作用的影响

在联合 it Dyn A-(1-13) 5 nmol 和 APV 10 nmol 或者 U50488H 100 nmol 和 KYN 50 nmol 后 10 min, it nor-BNI 15 nmol 可完全翻转 Dyn A-(1-13)和 APV, U50488 和 KYN 的甩尾抑制效应(图 2),提示  $\kappa$ 阿片受体参与了上述的协同镇痛。

### 相互作用的剂量依赖性及强啡肽 $\kappa$ 活性的必要性

改变 APV 或 KYN 的剂量可分别影响与之配合的  $\kappa$ 配基 Dyn A-(1-13)或 U50488H 的协同镇痛效应,并呈现一定的量效关系(APV: 2.5, 5, 10 nmol; KYN: 25, 50 nmol); 而 Dyn A-(1-13)从 5 nmol 减至 2.5 nmol 则未能显出与 APV 的协同镇痛效应(图 3)

无  $\kappa$ 活性的 Dyn A-(2-17) 5 nmol 以及与 APV 10 nmol 联合注射不影响大鼠热辐射甩尾(图 4)。

### APV 对抗强啡肽 A 的致瘫作用与甩尾抑制的分离

预注射(it) APV 10 nmol, 10 min 后,再 it 损伤剂量的 Dyn A-(1-17) 20 nmol,在不同时间点显著改善了大鼠后肢功能,与此同时测得 TEL 仍处于抑制状态,延续至少 12 h,此时后肢功能恢复。以上说明 APV 能对抗强啡肽致瘫作用的同时,强啡肽的甩尾抑制作用仍得以显示(图 5)。

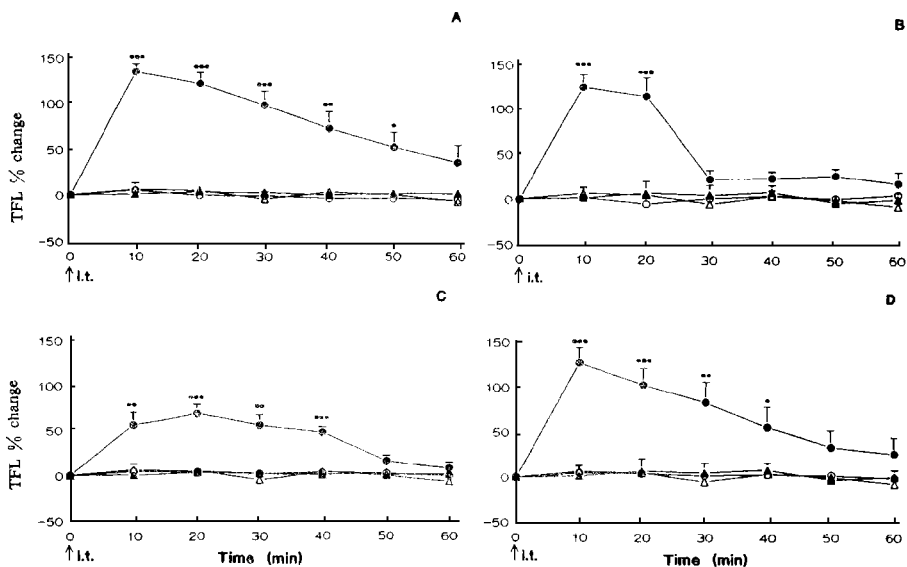


Fig 1 Effect of intrathecal co-administration of  $\kappa$ opioid receptor agonists and NMDA receptor antagonists on tail flick response to radiant thermal stimuli \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  as compared with the control group. A; Dyn A-(1-13) 5 nmol( $\circ$ ), APV 10 nmol( $\blacktriangle$ ), or combination of the two( $\bullet$ ), and saline as control( $\triangle$ ). B; Dyn A-(1-13) 5 nmol( $\circ$ ), KYN 50 nmol( $\blacktriangle$ ), or combination of the two( $\bullet$ ), and saline( $\triangle$ ). C; U50488H 100 nmol( $\circ$ ), APV 10 nmol( $\blacktriangle$ ), or combination of the two( $\bullet$ ), and saline( $\triangle$ ). D; U50488H 100 nmol( $\circ$ ), KYN 50 nmol( $\blacktriangle$ ), or combination of the two( $\bullet$ ), and saline( $\triangle$ ).

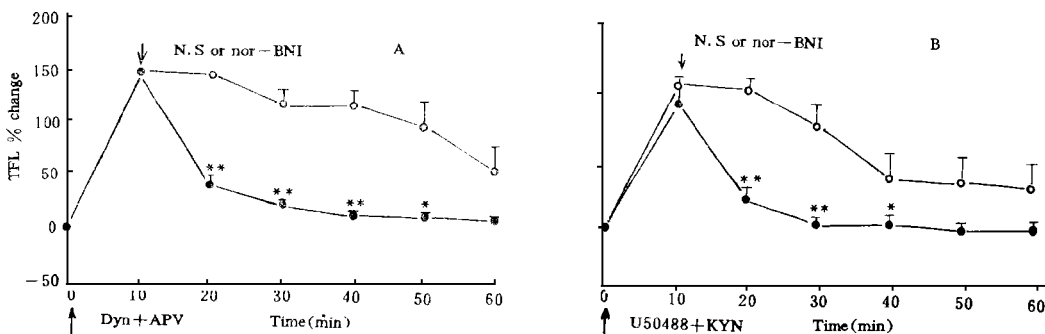


Fig 2 Antagonistic effect of intrathecal administration of nor-BNI on the interaction of  $\kappa$ opioid receptor agonists and NMDA receptor antagonists. A; Antagonism of nor-BNI 15 nmol ( $\bullet$ ) on the joint effect of Dyn A-(1-13) 5 nmol and APV 10 nmol and saline as control ( $\circ$ ); B; Antagonism of nor-BNI 15 nmol ( $\bullet$ ) on the joint effect of U50488H 100 nmol and KYN 50 nmol and saline as control ( $\circ$ ).

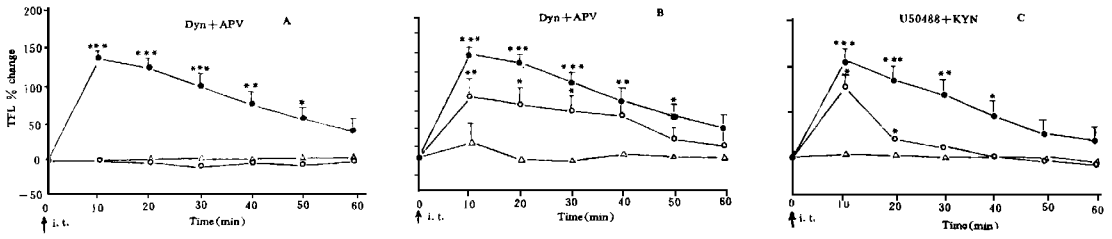


Fig 3 Dose-dependent effect of co-administration of  $\kappa$  opioid receptor agonists and NMDA receptor antagonists. A; The effect of Dyn A-(1-13) 2.5 nmol( $\circ$ ), 5 nmol( $\bullet$ ) and APV 10 nmol ( $\Delta$ ); B; The effect of Dyn A-(1-13) 5 nmol and APV 2.5 ( $\Delta$ ), 5 ( $\circ$ ), 10 nmol( $\bullet$ ); C; The effect of U50488H 100 nmol( $\Delta$ ) and KYN 25( $\circ$ ), 50 nmol( $\bullet$ ).

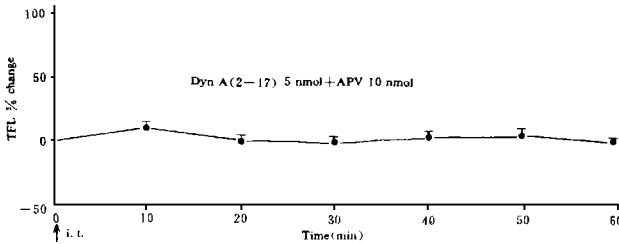


Fig 4 Effect of intrathecal co-administration of Dyn A-(2-17) 5 nmol (without  $\kappa$  activity) and APV 10 nmol on tail flick response.

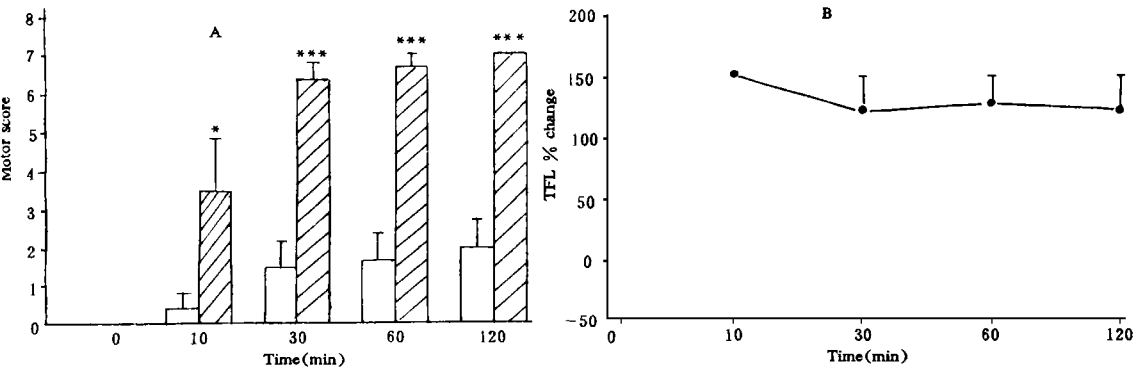


Fig 5 Differentiation of pain modulation and neurotoxic effect of dynorphin. A; Pretreatment with APV 10 nmol antagonized hindlimb paralysis induced by succeeding it Dyn A-(1-17) 20 nmol. Motor scores 0~7 are corresponding to normal motor function and motor dysfunction to different extents, according to Faden<sup>(10)</sup>. B; Inhibition of tail flick response remained.  $\square$  : Dyn neurotoxicity;  $\text{▨}$  and  $\bullet$ — $\bullet$ : Pretreatment with APV.

## 讨 论

本实验所用 Dyn A-(1-13) 5 nmol 不抑制甩尾反射,也不致大鼠运动障碍,但与 APV 10 nmol 或 KYN 50 nmol 联合应用时有协同镇痛。联合应用时产生强而持久的,渐变的协同镇痛效应;并与所用 APV 呈现一定的量效关系。此时后肢功能正常、尾部有一定的张力,反射正常,不表现任何毒性作用。合成的  $\kappa$  配基 U50488H 100 nmol 也有类似作用。Dyn A-(1-13) 5 nmol 和 U50488H 100 nmol 分别与 APV 10 nmol 和 KYN 50 nmol 两两联合应用所引起的协同镇痛均为  $\kappa$  受体特异性拮抗剂 nor-BNI 15 nmol 几乎完全翻转。提示有  $\kappa$  阿片受体参与介导这种协同作用。

我们的实验还发现,无  $\kappa$  活性<sup>(15)</sup>的 Dyn A-(2-17) 5 nmol 不影响甩尾及后肢功能,与 APV 10 nmol 联合应用不引起甩尾抑制。文献报道,APV 抑制大鼠甩尾的最小剂量为 60 nmol<sup>(13)</sup>。我们 40 nmol APV 不表现镇痛。这些资料均说明在脊髓水平存在  $\kappa$  阿片受体与谷氨酸能神经元之间的功能联系,推测可能是通过脊髓传入神经元突触前膜  $\kappa$  受体的激活,  $Ca^{2+}$  内流受抑而使末梢谷氨酸释放减少这样一些机制,而加强 NMDA 受体拮抗剂在热辐射甩尾测痛中的镇痛效应。我们在脊髓片谷氨酸释放实验中发现,高钾去极化钙离子依赖的标记谷氨酸释放受低浓度强啡肽 A 抑制(待发表资料)。

强啡肽的神经毒性作用与 NMDA 受体过度激活有关<sup>(11,12)</sup>。实验表明,预注 APV 10 nmol 后, Dyn A-(1-17) 20 nmol 的致瘫作用大大减弱,运动功能在 30 min 后几乎完全恢复;而此时大鼠热辐射甩尾仍处于抑制状态, Dyn A-(1-13)和-(1-17)具有相同的  $\kappa$  活性<sup>(3,4)</sup>,并同样有致神经毒性作用<sup>(10,11)</sup>,都为 APV 对抗<sup>(11,12)</sup>。APV 对抗强啡肽致损伤,但能加强它的痛调制作用;从另一方面说明强啡肽痛调制和致瘫是两类不同的机制。

## 参 考 文 献

- 1 Goldstein A, et al. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979;76: 6666.
- 2 Chavkin C, et al. Specific receptor for the opioid peptide dynorphin, structure- activity relationships. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78: 6543.
- 3 Chavkin C, et al. Dynorphin is a specific endogenous ligand of the  $\kappa$  opioid receptor. *Science* 1982;215: 413.
- 4 Huidobro-Toro, et al. Dynorphin interaction at the  $\kappa$ -opiate site. *Eur J Pharmacol* 1981;72: 265.
- 5 Mansour A, et al. Anatomy of CNS opioid receptor. *Trends Neurosci* 1988;11: 308.
- 6 Han JS, et al. Dynorphin; potent analgesic effect in spinal cord of the rat. *Life Sci* 1982;31: 1781.
- 7 Przewlocki R, et al. Mixed opioid/non-opioid effect of dynorphin and dynorphin related peptides after their intrathecal injection in rats. *Neuropeptides* 1983a;3: 233.
- 8 Przewlocki R, et al. Analgesic effect of  $\mu$ -,  $\delta$ -and  $\kappa$ -opiate agonists and, in particular, dynorphin at the spinal level. *Life Sci* 1983b;33 suppl 1,649.
- 9 Spaminato S, et al. Characterization of dynorphin A-induced antinociception at the spinal level.

- Eur J Pharmacol* 1985;110 : 21.
- 10 Faden AI, et al. Opioid and non-opioid mechanism may contribute to dynorphin's pathophysiological actions in spinal cord injury. *Ann Neurol* 1990;27 : 67.
- 11 Caudle RM, et al. A novel interaction between dynorphin (1-13) and an *N*-methyl-*D*-aspartate site. *Brain Res* 1988;443 : 329.
- 12 Tian XF and Jen MF. The study on the mechanism underlying dynorphin spinal neurotoxicity. *Chin J Physiol Sci* 1994 in press.
- 13 Cahusac PMB, et al. The behavioral effects of an *N*-methyl-*D*-aspartate receptor antagonist following application to the lumbar spinal cord of conscious rats. *Neuropharmacology* 1984;23 : 719.
- 14 Nasstrom, et al. Antinociceptive actions of different classes of EAA receptor antagonist in mice. *Eur J Pharmacol* 1992;212 : 21.
- 15 Walker, et al. Non-opiate effects of dynorphin and des-Tyr-dynorphin. *Science* 1982;218 : 1136.

## INTRATHECAL CO-ADMINISTRATION OF KAPPA OPIOID RECEPTOR AGONISTS AND NMDA RECEPTOR ANTAGONISTS INDUCES SYNERGISTIC ANALGESIA IN RATS

FC Li, XJ Sun, WH Hu and MF Jen

(Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005)

**ABSTRACT** It is reported that intrathecal (it) injection of low dose of dynorphin (Dyn) induces no analgesia while high dose of Dyn induces analgesia and might lead to hindlimb paralysis and loss of reflex *via* NMDA receptor. We hypothesized that NMDA receptor antagonists may reveal *kappa* analgesic-potential of subliminal dose of Dyn. Twenty-four hours after intrathecal cannulation, tail flick latency was measured before and after it of drugs. Combination of Dyn A-(1-13) 5 nmol or U50488H 100 nmol, a *kappa* receptor agonist with either *DL*-2-amino-5-phosphonovaleric acid (5 and 10 nmol) or kynurenic acid (25 and 50 nmol) it induced synergistic analgesia, which was reversed by nor-binaltorphimine 15 nmol, a *kappa* receptor antagonist. It is concluded that *kappa* opioid receptor agonists and NMDA receptor antagonists synergistically induce analgesia *via* interaction with their receptors.

**Key words** NMDA receptor; *Kappa* opioid ligand; Synergistic analgesia