

滇西罂拉碱甲的镇痛和身体依赖性研究

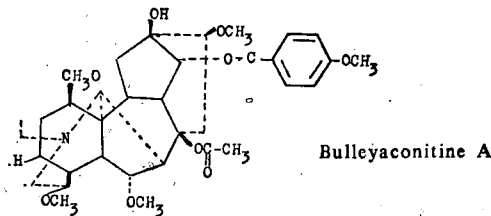
唐希灿 刘雪君* 陆维华 王懋德** 李爱玲***

(中国科学院上海药物研究所, 上海)

提要 用扭体法、热板法、光热-甩尾法和甲醛致痛法证实 Bul 有明显镇痛作用。连续给药 9 d, 镇痛作用无耐受现象。小鼠跳跃反应试验阴性; Bul 对吗啡依赖大鼠或猴的戒断症状, 均无替代作用。Bul 的镇痛作用不能被纳络酮翻转; 利血平可取消 Bul 的镇痛作用, 补充 5-HT 或 5-HTP 能翻转利血平取消 Bul 的镇痛作用。

关键词 滇西罂拉碱甲; 烯丙吗啡; 纳络酮; 利血平; 5-羟色胺; 止痛; 吗啡依赖

乌头在我国古代已供药用, 中医处方中乌头常用于治疗风湿及类风湿性关节炎、坐骨神经痛及胃、腹冷痛等疾患⁽¹⁾。一些乌头生物碱的镇痛作用已有报道^(2~5)。生长在滇西的乌头属植物滇西罂拉(*Aconitum bulleyanum* Diels), 当地民间用于止痛。化学分离得到 4 种生物碱⁽⁶⁾。本实验室药理筛选研究, 发现其中的滇西罂拉碱甲(bulley aconitine A, Bul)具有明显镇痛作用, 优于已报道的乌头生物碱, 故对 Bul 进行较深入研究。



材 料 与 方 法

实验动物为 18~22 g 小鼠及 120~200 g 大鼠, 雌雄兼用, 由中国科学院上海分院实验动物中心提供。雄恒河猴由第二军医大学基础部药理教研组提供。吗啡依赖大鼠每笼单个饲养, 每天 sc 吗啡 25 mg/kg, 上、下午各一次, 持续给药 4 个月后用于试验。

Bul 游离碱, 无色立方晶体, 熔点 166~8 °C, 由昆明植物研究所提供。3-乙酰乌头碱(3-acetylaconitine, AAc) 游离碱粉剂由本所植化室提供。用蒸馏水(加稀 HCl 助溶)分别配成 1 和 2 mg/ml 溶液, pH 2~3, 置冰箱内备用, 试验溶液均在当天稀释成所需浓度, pH 5。吗啡粉剂系青海制药厂产品, 阿司匹林粉剂为上海第六制药厂生产, 烯丙吗啡针剂(5 mg/ml) 是法国 Laboratoires Clin-Comar-Byla 产品; 纳络酮粉剂及利血平针剂系上海医科大学红旗制药厂生产, 5-HT 粉剂瑞士产品, 上海化学试剂采购供应站分装。

本文于 1986 年 3 月 26 日收到。

本文于 1985 年 11 月 29 日在全国第二届神经药理学学术会议(南宁)上宣读。

* 山东昌潍医学院药理教研组; ** 昆明医学院药理教研组; *** 上海医药工业研究院。

方法与结果

一. 镇痛作用

化学致痛法测试⁽⁴⁾ ♀小鼠每组 3 只, 经预试验后, 各药物分别采用 4~5 剂量组, 每剂量用 3 组小鼠。小鼠先 sc 或 ig 药物, 对照组 sc 生理盐水, 20 min 后 ip 0.7% 乙酸 10 ml/kg, 间隔 5 min 后记录每组小鼠 10 min 的扭体次数, 分别计算各给药组的扭体反应抑制率, 按机率单位法统计 (以下同) Bul 抑制扭体反应次数 50% 的有效剂量 (ED_{50})。结果见表 1, sc Bul 的相对镇痛作用为 AAc 的 3.25 倍, 但 ig 给药二者差异不大; Bul 的相对镇痛作用为吗啡的 15.3~16.7 倍; 阿司匹林的 1208~4062 倍。

热板致痛法测试⁽⁴⁾ ♀小鼠逐个放于在 56 °C 水浴恒温的紫铜圆筒内, 先预测 2~3 次, 选择痛反应 (舐后足) 在 18 s 内的小鼠用于药物试验, 每组 10 只, 每个药物测试 3~5 个剂量组, 小鼠痛反应时间比用药前提高 1 倍以上为有镇痛作用, 测定每剂量组的镇痛%。比较结果表明, Bul 的相对镇痛强度分别为 AAc, 吗啡和阿司匹林的 1.8, 65.5 和 7195 倍 (表 1)。

甲醛致痛法测试 给小鼠一侧前足趾背部 sc 2.5% 甲醛 0.03 ml⁽⁷⁾ 或大鼠 sc 5% 甲醛 0.05 ml⁽⁸⁾ 致痛, 按 4 级记分⁽⁸⁾ 定量表示痛反应。经预试验后, 各试验药采用 3~5 个剂量, 小鼠每组 10 只, 大鼠每组 6 只, 记录在各药物作用高峰时、各剂量组出现 0 或 1 分 (注射甲醛侧脚趾正常或接近正常接触桌面) 鼠数。小鼠试验结果表明, Bul 的相对镇痛作用强度分别为 AAc, 吗啡和阿司匹林的 2.5, 35.2 和 5187 倍。Bul 对大鼠的相对镇痛作用稍弱于 AAc, 但各为吗啡和阿司匹林的 18 和 3043 倍 (表 1)。

小鼠每组 6 只, 各 sc Bul 或吗啡 ED_{95} 剂量后, 立即从一侧前足趾 sc 2.5% 甲醛, 每间隔 3 min 记录各鼠的痛反应最高分数。Bul 于 sc 后 36 min 出现镇痛作用, 51 min 作用达高峰, 141 min 后镇痛作用消失。吗啡于给药后 6 min 出现镇痛作用, 21 min 作用达高峰, 51 min 后镇痛作用消失。Bul 起效时间比吗啡慢, 但作用持续时间明显长于吗啡。

光热致痛法测试⁽⁴⁾ 用 8.75 mm 放映灯泡 (12 V, 50 W) 发出光热, 照射于大鼠尾的近尾端 3 cm 处; 通过调压变压器调节痛反应 (甩尾离开光源) 时间在 3~5 s。大鼠先预测 2~3 次, 痛反应时间较稳定者用于试验, 每组 6 只, 测定药物作用高峰时, 大鼠痛反应时

Tab 1. Comparison of analgesic effects of bulleyaconitine A (Bul) with 3-acetylaconitine (AAc), aspirin and morphine

Pain stimulus	Animal	Route	Analgesic dose (ED_{50} , $p=0.95$ fiducial limits, mg/kg)			
			Bul	AAc	Aspirin	Morphine
Writhing (ip 0.7% acetic acid 10 ml/kg)	Mice	sc	0.048 (0.039~0.058)	0.156 (0.142~0.171)	195 (172~220)	0.80 (0.73~0.89)
		ig	0.288 (0.254~0.327)	0.267 (0.222~0.321)	348 (288~420)	4.4 (3.8~5.0)
Hot plate (56°C)	Mice	sc	0.087 (0.086~0.089)	0.16 (0.146~0.176)	626 (594~660)	5.7 (5.6~5.9)
2.5% Formaldehyde (sc 0.03 ml in front paw)	Mice	sc	0.091 (0.081~0.102)	0.23 (0.21~0.25)	472 (436~510)	3.2 (3.0~3.6)
5% Formaldehyde (sc 0.05 ml in front paw)	Rats	sc	0.137 (0.129~0.145)	0.1 (0.063~0.159)	417 (255~682)	2.5 (2.2~2.9)
Tail-flick (Light irradiation)	Rats	sc	0.104 (0.092~0.117)	>0.3		3.6 (3.4~3.8)

间提高 1 倍以上的鼠数，计算其镇痛%。Bul 的相对镇痛作用强度为吗啡的 34.6 倍。

二. 成瘾性试验

镇痛作用耐受性测定 ♀小鼠 12 只，均分为 2 组，各 sc 吗啡 20 mg/kg 和 Bul 0.15 mg/kg，每天 1 次，每次试验前及给药后 15 min，用热板法测痛，连续 9 天。Bul 组小鼠在给药试验期间的镇痛作用呈现波动，但未见明显降低。吗啡组小鼠的镇痛作用则随给药次数的递增而逐渐减弱（图 1）。

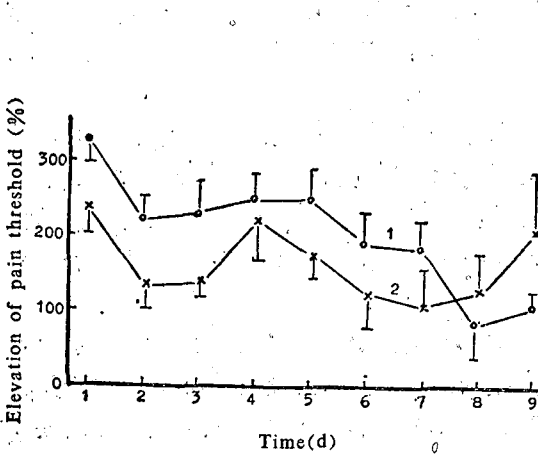


Fig 1. Tolerance of the analgesic action after daily sc bulleyaconitine A (Bul) or morphine in mice (hot plate method). 1: morphine 20 mg/kg 2: Bul 0.15 mg/kg, $\bar{X} \pm SE$

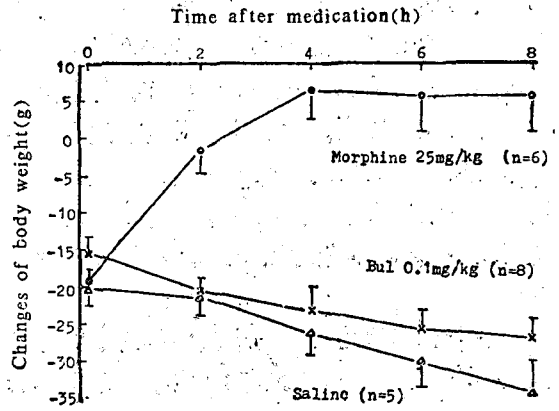


Fig 2. Effect of sc bulleyaconitine A (Bul) on body weight loss induced by withdrawal in morphine addicted (25 mg/kg, sc) rats

小鼠跳跃反应试验⁽⁹⁾ ♂小鼠 40 只，均分 8 组。各鼠于 2 日内给药 7 次⁽⁸⁾，每次给药剂量递增，于末次给药后 3 h，ip 烯丙吗啡催瘾，立即记录各组 10 min 内出现跳跃反应的鼠数和次数。吗啡组剂量依次为 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 和 160 mg/kg。Bul 二个剂量组：一组为 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12, 0.14 和 0.16 mg/kg；另一组为 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2, 0.24 和 0.28 mg/kg。累积总剂量各为 317.5, 0.7 和 1.2 mg/kg。对照组 sc 生理盐水。吗啡组 8 只小鼠出现跳跃反应，平均每鼠跳跃 13.1 次，Bul 组小鼠未出现跳跃反应。

吗啡成瘾大鼠的停药戒断替代试验⁽¹⁰⁾ 吗啡依赖大鼠在停止 sc 吗啡 24 h 后出现明显抑制：外观安静少动、匍伏笼内、不食不饮和体重明显下降。选取体重下降 15 g 以上大鼠用于替代试验。sc 吗啡 25 mg/kg 后（6 只），很快出现活动增多，频繁地吃食与饮水，体重很快回升到停吗啡前水平。sc Bul 0.1 mg/kg（8 只）后，大鼠外观仍处于安静少动的抑制状态；体重继续下跌，无替代吗啡的作用（图 2）。

吗啡成瘾猴戒断症状替代试验 ♂猴 1 只，体重 5.5 kg，每天上、下午各 sc 吗啡一次，起始剂量 2.5 mg/kg，3 d 后递增为 5 mg/kg，以后每隔 3~4 天递增 5 mg/kg，21 天后剂量递增为 25 mg/kg，此后按此剂量每天上、下午各 sc 一次，4 个月后用于药物替代试验。猴子停给吗啡 18 h 后 sc 烯丙吗啡 0.5 mg/kg，5 min 后猴外观出现烦躁、唾液分泌增多、阵发躁动、咬链条、噁心和震颤等戒断症候群。sc Bul 30 μg/kg 后观察 30 min，猴的戒断症状未见减弱。随即 sc 吗啡 25 mg/kg，3 min 后戒断症状减弱并逐渐趋于消失。

三. 纳络酮对 Bul 镇痛作用的影响

将经挑选的痛阈较稳定小鼠20只均分为4组,2组各sc吗啡10mg/kg及Bul 0.1 mg/kg,另2组则于sc吗啡及Bul后15 min,各ip纳络酮2 mg/kg。纳络酮能取消吗啡的镇痛作用,但不影响Bul的镇痛作用(图3)。

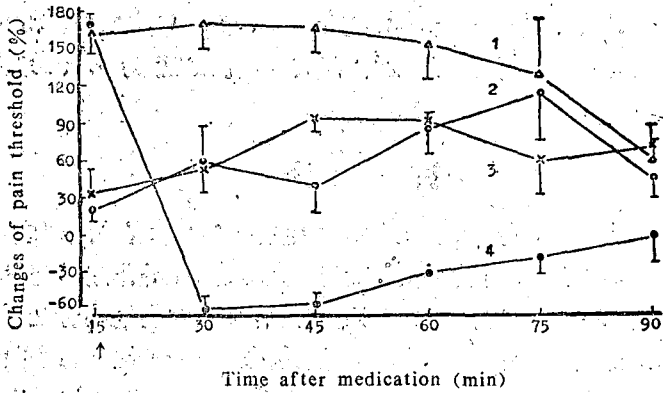


Fig 3. Antagonistic effect of naloxone on analgesic action of sc bulleyaconitine A (Bul) or morphine in mice (hot plate method). 1: morphine 10 mg/kg; 2: Bul 0.1 mg/kgsc; 3: naloxoneip + Bul; 4: naloxone + morphine. ↑ naloxone 2 mg/kg ip

四. 脑内阿片受体结合试验

方法参照文献(11)。用阿片受体的广谱配基 ^3H etorphine 1.84 nM与Bul及AAc进行竞争结合试验,Bul在 $10\ \mu\text{M}$,AAc在 $0.728\ \text{mM}$ 浓度时,均不能抑制放射配基与阿片受体相结合。

五. 利血平对Bul镇痛作用的影响

♂大鼠12只,均分为2组,用光热甩尾法测痛反应。一组sc Bul 0.1 mg/kg,15 min后痛反应时间明显延长;另一组大鼠先ip利血平3 mg/kg,3 h后再sc Bul 0.1 mg/kg,则镇痛作用消失。另取大鼠20只,均分为4组:(1)组icv Bul $1\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$,痛阈明显提高,(2)组先ip利血平3 mg/kg,3 h后再icv Bul $1\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$,则Bul的镇痛作用不再出

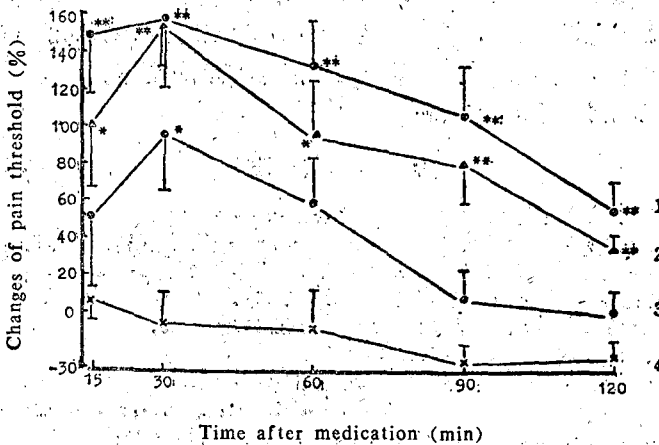


Fig 4. Influence of reserpine, 5-HT and 5-HTP on the analgesic action induced by bulleyaconitine A (Bul) in rats (tail-flick method). 1: reserpine 3 mg/kg ip + 5-HTP 75 mg/kg ip + Bul $1\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ icv; 2: reserpine + 5-HT $10\ \mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$ icv + Bul; 3: Bul; 4: reserpine + Bul. reserpine pretreatment 3 h before Bul, 5-HT, or 5-HTP. Bul was given 30 min after 5-HT or 5-HTP

现, (3)(4) 组大鼠在 ip 利血平 3 mg/kg 3 h 后, 分别 icv 5-HT 10 μ g 或 ip 5-HTP 75 mg/kg, 30 min 后再各 icv Bul 1 μ g/10 μ l, 均有翻转利血平的作用, Bul 的镇痛作用重又出现(图 4)。

六、局部麻醉作用⁽¹²⁾

小鼠每组 10 只, Bul 各剂量的容量为 0.03 ml, Bul 0.002, 0.003 和 0.004% 分别使 20, 50 和 80% 小鼠出现传导阻滞症候群⁽¹²⁾, 其 ED₅₀ 浓度为 0.0029%, 稍弱于 AAC (0.0024%)。

讨 论

本文用多种疼痛模型测试表明, Bul 均具有明显镇痛作用, 它的作用远比已报道的几种乌头生物碱^(2~5)为强。Bul 还具有明显抗炎、解热⁽¹³⁾和局部麻醉作用。与 AAC⁽¹⁴⁾和刺乌头碱⁽⁴⁾的药理作用相类似。从化学结构上看, 三者均具有乌头碱型结构骨架⁽¹⁵⁾, 表明上述药理活性与此基本骨架密切相关。Bul 与 AAC 的结构仅在 3 与 14 位上的基团存在差异, Bul 为氢及对甲氧基苯甲酸, AAC 为乙酰基与苯甲酸, 结果是 Bul 的镇痛作用增强, 毒性比 AAC 弱(本实验室未发表资料), 提示对乌头碱型骨架上一些侧链基团的更换, 很有可能获得具有更大治疗指数的化合物, 值得继续研究。

Bul 连续用药不产生镇痛作用耐受, Bul 在几种成瘾性模型上测试均为阴性结果, 阿片受体结合试验也为阴性, 这些结果一致证明, Bul 是一种不同于吗啡类的非成瘾性镇痛剂, 由于 Bul 的镇痛作用持续时间长, 因此它更适于各种慢性疼痛疾患的治疗, 临床长期用药⁽¹³⁾也已证实动物试验结果。

icv Bul 同样有明显镇痛作用, 表明 Bul 发挥其镇痛作用有中枢参与。Bul 的镇痛可为预先注射利血平取消, 脑内或外周补充 5-HT 或其前体 5-HTP, 均能拮抗利血平的取消 Bul 镇痛作用, 表明 Bul 发挥其镇痛作用与脑内 5-HT 水平有密切关联。但从已有的药理结果分析, Bul 的镇痛作用可能还有其它环节参与; Bul 明显抑制炎症渗出液内 PGE 含量⁽¹³⁾; 电生理试验观察到 AAC 象其它局部麻醉剂一样最先作用于传导慢较细的纤维及神经末梢, 使动作电位的上升相变慢, 表明钠通道的活化过程异常(本实验室待发表资料), 由于 Bul 的化学结构与 AAC 很近似, 且二者的许多药理作用也很相似, 故推测 Bul 对离子通道以及 PG 合成的抑制和/或释放的影响, 均可能参与其镇痛作用的发挥。

致谢 陈洁同志协助阿片受体结合试验。

参 考 文 献

1. 邓士贤、王懋德. 关于乌头的药理与应用问题. 云南医学杂志 1963; (2):40.
2. 张覃沐等. 乌头碱和闹羊花毒素的镇痛作用以及并用东莨菪碱和阿托品后的增强现象. 生理学报 1958; 22:98.
3. 唐希灿等. 雪上一枝蒿甲碱、紫草乌碱和异乌头碱的镇痛作用. 药学学报 1966; 13:227.
4. 唐希灿等. 刺乌头碱氢溴酸盐的药理作用研究. 同上 1983; 18:579.
5. 唐希灿等. 3-乙酰乌头碱的镇痛作用和无成瘾性. 中国药理学报 1986; 7:413.
6. 罗士德等. 滇西喇叭碱甲的结构. 化学学报 1986. 待发表.
7. 刘雪君等. 一种简便筛选镇痛药方法——甲醛试验. 药学通报 1985; 20:716.
8. Dubnisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4:161.
9. Saelens JK et al. The mouse jumping test—A simple screening method to estimate the physical dependence capacity of analgesics. *Arch Int Pharmacodyn* 1971; 90:213.
10. Nurimoto S. A simple method for evaluating physical dependence liability in rats. *Jap J Pharmacol* 1973; 23:401.
11. 徐珩等. 羟甲芬太尼: 一个新的 μ 阿片受体激动剂. 中国科学 1984; (8):733.

12. 唐希灿等. 氯丙嗪类似物的神经药理作用. 药理学报 1963; 10:30.
13. 唐希灿. 抗炎镇痛新药溴西啉拉碱甲. 新药与临床 1986; 5:120.
14. 唐希灿等. 3-乙酰乌头碱的抗炎作用. 中国药理学报 1984; 5:85.
15. 王锋鹏. 乌头属和翠雀属植物中生物碱化学研究概况. 药理学报 1981; 16:943.

STUDIES ON THE ANALGESIC ACTION AND PHYSICAL DEPENDENCE OF BULLEYACONITINE A

TANG Xi-Can, LIU Xue-Jun, LU Wei-Hua, WANG Mao-De and LI Ai-Ling

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai)

ABSTRACT *Aconitum bulleyanum* Diel is an herb which has been used as an anodyne in Yunnan province for a long time. Bulleyaconitine A (Bul), an active principle, was extracted from this herb. The analgesic action of Bul has been shown in this paper by using the following methods: mice writhing evoked by ip 0.7% acetic acid 10 ml/kg; mice hot plate (56°C); continuous pain stimuli elicited by sc formaldehyde in front paw⁽⁸⁾ and rat tail-flick response to light irradiation. The relative analgesic effect of Bul was found to be 1.8~3.25, 15.3~65.5 and 1208~7195 times as potent as 3-acetylaconitine, morphine and aspirin, respectively. The duration of analgesic effect of Bul assayed with pain stimuli of formaldehyde in mice was longer than that of morphine. No tolerance of analgesic effect was found after daily sc of Bul 0.15 mg/kg for 9 d in mice assayed with hot plate method. In nalorphine-challenge test, no jumping response was observed in mice treated with Bul 1.2 mg/kg, the maximal tolerance dose. Rats were given sc morphine 25 mg/kg bid for 120 d, withdrawal of morphine was followed by a decrease in body weight, which was used as a parameter of abstinence syndrome, Bul sc 0.1 mg/kg did not alter the weight loss of morphine-treated rats. One male monkey developed physical dependence after sc morphine of which the daily dose was increased progressively from 2.5 to 25 mg/kg in 21 d and then maintained for 120 d. Bul 30 µg/kg sc did not suppress the withdrawal signs evoked by ip nalorphine 0.5 mg/kg. The results indicate that Bul induced no morphine-like tolerance nor physical dependence.

The analgesic action of Bul was not antagonized by naloxone, but was eliminated by intraperitoneal injection of reserpine 3 mg/kg 3 h prior to Bul. The antagonistic action of reserpine to Bul could be reversed by icv 5-HT or ip 5-HTP given 3 h after reserpine. So, the analgesic effect of Bul may be related to the 5-HT level in brain.

It was found that Bul exhibit strong local anesthetic activity when injected around the sciatic nerve in mice, the ED₅₀ concentration of Bul (50% mice with signs of sciatic nerve block) was 0.0029%.

Key words Bulleyaconitine A; Nalorphine; Naloxone; Reserpine; 5-HT; Analgesia; Morphine dependence