

# 河豚毒素对大鼠和小鼠纳洛酮催促吗啡戒断症状的影响

陈素青<sup>1,2\*</sup>, 任雷鸣<sup>1</sup>, 黄致强<sup>3</sup>

(1. 河北医科大学药学院药理学教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省医学科学院药物研究室, 河北 石家庄 050021; 3. 河北省水产研究所, 河北 秦皇岛 066002)

**摘要:** 通过建立吗啡(Mor)依赖大鼠及小鼠模型, 观察河豚毒素(TTX, 大鼠  $0.003 \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , im, 5 d; 小鼠  $0.02 \sim 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , ip, 2 d)对纳洛酮(Nal)催促戒断症状的预防及治疗作用. 结果表明 TTX 抑制戒断后大鼠体重丢失; 明显抑制 Mor 依赖小鼠 Nal 催促后的跳台反应, 并促进催促后小鼠体重的恢复. 证实 TTX 可显著抑制 Mor 依赖大鼠和小鼠 Nal 激发的戒断反应, 其效果与可乐定相近. 在防治戒断症状的有效剂量范围内, TTX 不影响麻醉大鼠的血压, 呼吸和心率, 也不影响尼古丁诱发的神经反射活动, 对痛觉反应和中枢神经系统无明显抑制作用.

**关键词:** 河豚毒素; 吗啡依赖; 戒断症状; 纳洛酮; 大鼠; 小鼠

中图分类号: R964

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2001)06-0434-07

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是从河豚的卵巢及肝脏中提取的一种毒性极强的非蛋白毒素<sup>[1]</sup>, 具有选择性阻断钠通道的作用, 多年来一直作为工具药而广泛地应用于生理学, 药理学研究中<sup>[2,3]</sup>. 曾有人报道<sup>[4]</sup>, TTX 具有镇痛作用, 增强局麻药, 抗心律失常药的作用<sup>[5]</sup>, 但因其毒性大, 可造成严重低血压反应和呼吸抑制, 而限制了它的临床应用<sup>[6]</sup>. 在离体实验中, TTX 具有对抗纳洛酮(naloxone, Nal)催促的作用<sup>[7]</sup>, 但是至今尚无 TTX 对整体动物戒断反

应的研究报道. 据此, 本文研究了: ① TTX 对吗啡(morphine, Mor)依赖大鼠戒断症状的治疗作用及 TTX 自身药物依赖性; ② TTX 对 Mor 依赖小鼠戒断症状的预防作用; ③ TTX 对麻醉大鼠呼吸, 血压, 心率及心电图的影响, ④ TTX 对小鼠的镇痛作用及对小鼠自发活动的影响.

## 1 材料和方法

### 1.1 药品, 仪器和动物

盐酸吗啡粉, 东北第六制药厂生产, 批号 59004; Nal 购于 Sigma 公司; TTX 由河北省水产研究所提供; 盐酸可乐定(clonidine, Clo), 纯度 99.6%, 河北医科大学药学院合成, 批号 940505; 以上所有药品与试剂均以生理盐水(NS)配制成母液存于冰箱, 实验前以 NS 稀释至所需浓度备用.

日本光电 RM-6200 型四导生理记录仪, XZC-4A 型小动物自主活动测定仪, 黑龙江省牡丹江市高新技术开发公司.

Sprague-Dawley(SD)大鼠及昆明种小鼠均由河北医科大学实验动物中心提供. 合格证号: 冀医动字 04035, 冀医动字 04036. 在实验室饲养 3 d 后用于实验. 饲料由河北医科大学实验动物中心提供. 实验室室温为  $25 \sim 27^\circ\text{C}$ .

### 1.2 河豚毒素对吗啡依赖大鼠戒断症状的治疗作用及河豚毒素药物依赖性实验

体重( $194 \pm 29$ )g( $\bar{x} \pm s$ )SD 大鼠 72 只, ♀ ♂ 各半, 随机分为 8 组: Mor 组, NS 组, 不同剂量的 TTX ( $0.1, 0.03, 0.01, 0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )治疗组, Clo( $0.2 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组及空白对照组. 除空白对照组外, 其余 7 组大鼠均按剂量递增法<sup>[8]</sup>sc Mor 4 d, 建立 Mor 依赖大鼠模型. Mor 给药剂量为 d 1  $30 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , d 2  $45 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , d 3  $60 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 每日分 3 次给药, 并观察记录各组大鼠自发活动, 睡眠, 对刺激的反应, 毛发等状况; 同时记录体重变化, 饮水量和进食量. 空

收稿日期: 2000-12-18 接受日期: 2001-09-17

基金项目: 河北省省长基金(96-Z-0514)

作者简介: 陈素青(1961-), 女, 河北省沧州市人, 医学硕士, 副研究员, 主要从事心血管药理研究; 任雷鸣(1956-), 男, 河北省张家口市人, 教授, 博士生导师, 主要从事神经药理及心血管药理研究.

\*联系作者. Tel: (0311)5813575-80057

白对照组 sc 等体积 NS. d 4 在 sc  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Mor 后 3~4 h, 给 Nal ( $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) 催促戒断反应, 每笼 1 只分别记录给 Nal 后 20 min 内大鼠戒断反应症状, 包括: 异常姿势, 高度激惹 (触碰激惹或靠近激惹), 咬牙 (间断性或连续性), 腹泻 (软便或不成形便), 流涎 (轻度或明显), 跳跃, 呼吸急促等. 参照文献评分标准<sup>[9,10]</sup>记录, 评分, 以此评价戒断症状的程度. 此外, 分别记录 Nal 催促前及催促后 1, 3, 5, 10, 24, 48, 72, 96, 120 h 时的体重变化. 对已形成 Mor 依赖的 7 组大鼠, Nal ip 后 30 min 合笼饲养并分别给予如下处理: Mor ( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , sc) 组, 每日分 3 次给药, 同时 im NS  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; NS 组分别 sc, im 等容积 NS, 令其自然戒断; 不同剂量 TTX ( $0.1, 0.03, 0.01, 0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , im) 组, 每日分 3 次给药, 观察其对戒断症状的治疗作用, 同时 sc 等容积 NS; Clo ( $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) 组, 每日 1 次, 同时 im, sc NS. 各组连续给药 5 d. 每天记录大鼠体重, 饮水量, 进食量; 观察活动情况, 睡眠, 对刺激的反应等. 治疗 d 5, 最后一次给药后 3 h, 各组大鼠再 ip Nal  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 进行第二次催促, 记录 20 min 内大鼠的戒断症状并评分. 由此观察 TTX 自身的依赖性. 空白对照组 sc, im 等体积 NS, 观察指标同其他各组, 但不再进行第二次 Nal 催促.

### 1.3 河豚毒素对吗啡依赖小鼠戒断症状的预防作用

体重 ( $22.6 \pm 1.9$ ) g ( $\bar{x} \pm s$ ) 小鼠 60 只, ♀♂ 各半, 随机分为 6 组: NS 对照组, Mor 对照组, 不同剂量 TTX ( $0.02, 0.06, 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组和 Clo ( $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组. 参考文献<sup>[11]</sup>方法, 采用 2 d 递增法 ip Mor 并加以改进, 建立 Mor 依赖小鼠模型. 除 NS 对照组外, 各组小鼠 2 d 共接受 7 次 ip 不同剂量的 Mor. d 1 注射 5 次 (9:00 am, 10:00 am, 11:00 am, 1:00 pm, 3:00 pm), 给药剂量分别为 8, 16, 25, 50, 50  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 给药容积  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重. d 2 注射 2 次 (8:00 am, 10:00 am), 每次  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 7 次累积剂量为  $249 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重. 小鼠自由饮水, 进食, 每日称体重. TTX 预防组小鼠在接受 Mor 注射的前一天和当天 ip 不同剂量的 TTX, 每日分 3 次注射, Nal 催促前 30 min 再 ip TTX 1 次. Clo 组小鼠以等容积 NS 代替 TTX, 但是在 Nal 催促前 30 min ip Clo  $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . NS 对照组小鼠以等容积 NS 代替 Mor 和 TTX. 各组小鼠于末次给予 Mor 后 2 h, 分别 ip Nal  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  催促戒断反应. 注射 Nal 后, 立即放入直径为

16 cm, 高为 35 cm 的容器内, 观察记录 20 min 内小鼠跳跃次数 (以四爪离地为 1 次), 并观察小鼠活动状况 (如呼吸急促, 洗脸, 腹泻, 颤抖等), 记录催促后 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 及 24 h 时的体重变化.

### 1.4 河豚毒素对麻醉大鼠血压, 呼吸, 心率及心电图的影响

体重 ( $269 \pm 22$ ) g ( $\bar{x} \pm s$ ) SD 大鼠 32 只, ♀♂ 兼用, 随机分为 4 组. 乌拉坦  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉, 做颈动脉插管和气管插管, 于四导生理记录仪记录大鼠血压, 呼吸频率, 心率, 记录标准 II 导联心电图. 股静脉插管给药, 分别记录给药前, 给 TTX ( $0.1, 0.03, 0.01, 0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 后即刻, 2, 5, 10 及 15 min 时大鼠血压, 呼吸频率, 心率和心电图的变化. 另取 SD 大鼠 16 只, 分为 TTX 组和 NS 对照组. 手术方法及观察指标同前. 两组大鼠 iv 尼古丁 (nicotine)  $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 记录给尼古丁后的血压, 呼吸频率, 心率和心电图; 1 h 后再次 iv 相同剂量尼古丁, 第二次 iv 尼古丁前 10 min, 两组大鼠分别 iv TTX ( $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 和等容积 NS. 观察 TTX 对血压, 呼吸频率, 心率和心电图的影响.

### 1.5 河豚毒素的镇痛作用

取体重 ( $22.6 \pm 1.7$ ) g ( $\bar{x} \pm s$ ) 小鼠 50 只, ♀♂ 各半, 随机分为 5 组: NS 对照组, 哌替啶 (pethidine,  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) 组, TTX  $0.02, 0.06$  和  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量组. TTX 每日分 3 次 ip, 连续 3 d. NS 组 ip 等容积 NS 代替 TTX. 哌替啶组于测定前 30 min ip 度冷丁, 其余时间点 ip 等容积 NS. 各组小鼠于末次给药后 30 min, 分别 ip 0.6% 的醋酸, 每只 0.2 mL, 观察 20 min 内小鼠扭体次数<sup>[12]</sup>.

### 1.6 河豚毒素对小鼠自主活动的影响

取体重 ( $22.0 \pm 1.6$ ) g ( $\bar{x} \pm s$ ) 小鼠 50 只, ♀♂ 各半, 随机分为 5 组: NS 对照组, 戊巴比妥钠 ( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) 组, TTX  $0.02, 0.06$  和  $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量组. TTX 每日分 3 次 ip, 连续 3 d. NS 组 ip 等容积 NS 代替 TTX. 戊巴比妥钠组于测定前 30 min ip 戊巴比妥钠, 其余时间点 ip 等容积 NS. 各组小鼠于末次给药后 30 min 测定自发活动次数. 测定前, 将小鼠分别放入小动物自主活动测定仪的盒内 (共 4 个测定盒) 熟悉 10 min, 测定 5 min 内每只小鼠的活动次数, 然后按顺序交换位置, 再测 5 min, 共测 4 次, 取平均值.

### 1.7 统计学处理

实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 差异显著性应用  $F$

检验和 Dunnett *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 河豚毒素对吗啡依赖大鼠戒断症状的治疗作用及河豚毒素药物依赖性实验

表 1 结果表明,采用剂量递增法 sc Mor(累积剂量  $155 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )建立 Mor 依赖大鼠模型,用 Nal 催促后戒断症状评分明显高于空白对照组。除空白对照组外,上述各组大鼠在催促后 d 6 进行第二次催促,Nal 第二次催促后,Mor 组戒断症状评分明显高于其他组,且与第一次催促戒断症状评分相同。NS 对照组,各 TTX 治疗组及 Clo 组的第二次戒断症状评分均小于第一次( $P < 0.01$ ),且与 NS 对照组的戒断反应程度无差别( $P > 0.05$ ),说明连续用药 5 d, TTX 自身无躯体依赖性。

表 2 结果表明, Mor 依赖大鼠用 Nal 催促后体重下降。Nal 催促后继续应用 Mor 组大鼠体重恢复

最快,催促后 10 h 体重已恢复至催促前水平,随后逐渐增加,但 120 h 后体重增长百分率明显低于其他各组。NS 对照组大鼠体重下降最明显,恢复时间也晚于 TTX 治疗组。用 TTX 治疗的 4 组大鼠体重下降百分率均小于 NS 对照组,在催促后 10 ~ 96 h 效果明显。TTX 的治疗效果与剂量相关,剂量越小,抑制戒断后体重丢失的作用越明显。0.1 及  $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组大鼠体重下降分 2 个时项,Nal 催促后 5 h 体重改变出现一个下降峰,10 h 时体重略有上升,到 24 h 时又出现另一个下降峰,随后又逐渐回升。而 0.01 及  $0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组体重恢复明显并且恢复的时间也早,而且第二个体重下降峰消失,到 96 h 时体重增加程度大于自然戒断的 NS 对照组( $P < 0.05$ ),说明 0.01 和  $0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的 TTX 具有促进大鼠体重增加的作用。Clo 组体重改变趋势同 TTX  $0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组,但不如 TTX 治疗作用明显,且给药后副作用明显,动物表现毛稀,竖立,行动迟缓等反应。

### 2.2 河豚毒素对吗啡依赖小鼠戒断症状的预防作用

表 3 结果表明,吗啡剂量递增法给药 2 日,在短时间内即可造成小鼠对 Mor 的依赖性,Nal 催促后小鼠平均跳跃次数与 NS 对照组相比有明显增加。预先给予不同剂量的 TTX,均能减少小鼠跳跃次数,尤其是在 11 ~ 20 min 之间抑制作用明显。与 TTX 对 Mor 依赖大鼠戒断症状的治疗作用结果相同,TTX  $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量的抑制作用最强。Clo 治疗组小鼠跳跃反应明显减少,11 ~ 20 min 时的抑制跳跃反应的作用强度与 TTX 组相同,但仍可见类似于大鼠的副作用。

表 4 结果表明,Nal 催促后,各组小鼠体重均有下降,其中 Mor 组催促后 6 h 体重下降最明显,TTX 预防组体重下降与对照组基本一致( $P > 0.05$ ),且下降程度显著低于 Mor 组。

### 2.3 河豚毒素对麻醉大鼠血压,呼吸,心率及心电图的影响

乌拉坦麻醉大鼠 iv 4 个不同剂量 TTX ( $0.1, 0.03, 0.01, 0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 后 5 ~ 10 min, 血压,呼吸及心率与给药前相比无显著差异( $n = 8, P > 0.05$ ),心电图亦无异常改变。尼古丁( $0.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) iv 使麻醉大鼠血压先降后升,2 min 后开始恢复,5 ~ 10 min 恢复至给药前水平,并可使大鼠呼吸频率和心率减慢。TTX 使尼古丁引起的大鼠的升压作用有

**Tab 1. Effects of tetrodotoxin (TTX) on the scores of withdrawal syndrome after naloxone (Nal) precipitation in morphine (Mor)-dependent rats**

Group	Score of withdrawal syndrome	
	First time	Second time
Control	$2.0 \pm 1.8$	-
NS	$16.1 \pm 6.0^{**}$	$2.0 \pm 3.0$
Mor	$16.9 \pm 2.8^{**}$	$16.4 \pm 4.4^{##}$
TTX 0.1	$13.2 \pm 3.1^{**}$	$4.9 \pm 3.6$
0.03	$16.6 \pm 2.4^{**}$	$4.6 \pm 2.6$
0.01	$17.0 \pm 3.2^{**}$	$3.5 \pm 2.6$
0.003	$17.1 \pm 3.1^{**}$	$3.5 \pm 2.6$
Clo 0.2	$14.8 \pm 2.3^{**}$	$1.3 \pm 1.9$

Mor  $155 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (total) was given sc in 4 d (d 1  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , d 2  $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , d 3  $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , d 4  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Three to four hours after the last administration of Mor, Nal ( $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) was given to precipitate withdrawal responses (first time). Thirty minutes after Nal ip, Mor ( $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , sc), normal saline (NS,  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  sc) or TTX ( $0.1, 0.03, 0.01, 0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , im) was given for 5 d, each dose was divided into three equal sub-doses. Clonidine (Clo,  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) was given ip once daily for 5 d. Three hours after the last administration, withdrawal responses were induced secondly by Nal ( $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , ip) on d 8.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 9$ .  $** P < 0.01$ , compared with control group;  $## P < 0.01$ , compared with NS group by ANOVA and Dunnett's *t* tests.

**Tab 2. Effects of tetrodotoxin on the body weight after naloxone precipitation in morphine-dependent rats**

Group	Body weight change/%								
	1	3	5	10	24	48	72	96	120(h)
Control	-5.2±1.7	-5.7±1.5	-6.6±1.5	-1.6±1.7	-0.6±1.9	2.7±1.8	6.8±1.9	9.2±1.8	11.2±3.0
NS	-6.4±1.4	-7.4±0.9	-8.6±1.0	-5.8±2.9**	-6.2±2.8**	-2.0±2.3**	1.8±1.9**	5.0±2.8	10.3±2.7
Mor	-5.7±1.2	-6.7±1.2	-7.3±1.6	0.2±2.3##	1.1±1.7##	3.2±1.9##	2.0±1.7**	2.2±2.4**	2.8±3.4**#
TTX 0.003	-8.4±1.1	-7.4±1.4	-9.0±1.3*	-2.3±2.2##	-0.6±1.4##	3.1±2.4##	6.7±3.3##	9.4±4.8	12.1±6.5
0.01	-4.1±2.2	-5.4±2.6#	-6.8±2.3	-4.8±2.6*	-4.0±1.7#	1.9±3.2#	7.5±3.5##	12.1±3.8#	14.8±4.6
0.03	-5.3±1.5	-6.1±1.7	-7.7±1.9	-2.6±2.2#	-3.0±2.5**	1.4±3.1	4.8±3.3	7.6±4.5	10.9±6.6
0.1	-6.1±1.1	-6.7±1.3	-7.7±1.2	-2.4±2.3#	-6.0±1.7**	-2.5±2.5*	2.3±2.5*	4.9±2.6	8.5±4.5
Clo 0.2	-6.1±1.1	-8.9±0.8**	-9.7±1.9**	-3.8±1.8	-0.3±1.9##	1.3±4.2	4.0±5.0	6.0±5.7	7.7±5.9

The treatments were the same as described in Tab 1.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with NS group by ANOVA and Dunnett's  $t$  test.

**Tab 3. Effects of tetrodotoxin on jumping responses of mice precipitated by naloxone**

Group	Jumping times/min <sup>-1</sup>		
	0-10 min	11-20 min	Total
NS	0	0	0
Mor	38±23**	15±18**	52±41**
TTX 0.02	10±8##	2±4#	12±11##
0.06	14±16##	4±8	18±24#
0.2	18±18**#	5±6	23±24#
Clo 0.4	6±8##	4±5	10±12##

Mor 249 mg·kg<sup>-1</sup> (total, sc), NS or TTX was given ip for 2 d. First day, Mor (8, 16, 25, 50, 50 mg·kg<sup>-1</sup>, sc) was given five times, each dose of TTX(0.02, 0.06, 0.2 μg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, ip) was divided into three equal sub-doses. Second day, Mor(50 mg·kg<sup>-1</sup>, sc) was given two times, 3 sub-doses of TTX(ip) were given as those on the 1st day and additional dose of TTX was given once again before Nal(6 mg·kg<sup>-1</sup>, ip) precipitation. Clo(0.4 mg·kg<sup>-1</sup>) was given ip only once before Nal precipitation.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with NS group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with Mor group by ANOVA and Dunnett's  $t$  tests.

增加趋势, 降压作用有减小趋势. 但无显著性差别 ( $n=8$ ,  $P > 0.05$ ). TTX 不影响尼古丁的呼吸抑制及心率减慢的作用 ( $P > 0.05$ ).

**2.4 河豚毒素的镇痛作用**

哌替啶 20 mg·kg<sup>-1</sup> 完全抑制小鼠扭体反应, 而 3 个 TTX(0.02, 0.06, 0.2 μg·kg<sup>-1</sup>) 组小鼠 20 min 内的扭体次数分别为 18±14, 21±8 和 16±10, 与 NS 对照组扭体次数 (20±13) 比无显著性差异 ( $n=8$ ,  $P > 0.05$ ). 说明此剂量范围的 TTX 无镇痛作用.

**2.5 河豚毒素对小鼠自发活动的影响**

戊巴比妥钠 15 mg·kg<sup>-1</sup> ip 后 30 min 产生镇静作用, 自主活动明显减少 ( $n=10$ ,  $P < 0.01$ ), 而 3 个 TTX(0.02, 0.06, 0.2 μg·kg<sup>-1</sup>) 组小鼠 5 min 内的自主活动次数分别为 227±43, 203±42, 149±47, 与 NS 组小鼠 5 min 内的自主活动次数 (219±32) 比无明显差别 ( $P > 0.05$ ), 说明此剂量范围的 TTX 对小鼠中枢神经系统或骨骼肌无抑制作用.

**Tab 4. Effects of tetrodotoxin on the body weight after naloxone precipitation in morphine-dependent mice**

Group	Body weight change/%							
	1	2	4	6	8	10	12	24(h)
NS	-0.8±1.8	-4.0±2.0	-7.2±3.6	-4.4±2.5	-7.2±3.0	-8.0±3.1	-8.2±4.2	-3.0±3.5
Mor	-6.8±5.1**	-7.8±5.6	-8.3±6.2	-11.4±4.9**	-5.6±5.6	-4.2±4.3	-3.5±4.2	0.6±7.1
TTX 0.02	-2.0±2.5##	-2.4±2.5##	-4.3±1.4	-5.6±3.2##	-6.5±5.1	0.2±3.2**	2.4±3.9###	4.3±5.6
0.06	-2.8±2.5#	-3.4±2.3#	-4.5±2.9	-5.7±3.0##	-5.8±3.6	-0.9±4.5**	-1.3±3.9**	2.7±4.4
0.2	-4.3±1.5	-6.2±2.2	-7.4±1.3	-8.1±2.5	-4.6±3.1	-0.4±2.8**	0.6±3.8**	-0.7±3.9*
Clo 0.4	-4.0±2.4	-5.8±3.5	-9.0±2.9	-8.9±3.1*	-3.1±4.4	2.8±5.1###	1.2±4.3###	4.6±1.4

The treatments were the same as described in Tab 3. The loss of body weight Nal-induced in mice was represented by percentage change.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=9$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with NS group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with Mor group by ANOVA and Dunnett's  $t$  test.

### 3 讨论

本实验采用逐步增量法,建立大鼠和小鼠 Mor 依赖模型,观察了 TTX 对 Nal 催促戒断反应的预防和治疗作用. 在国内外首次证明,TTX 对动物实验性 Mor 戒断反应具有明显的抑制作用,其效果与 Clo 相似. 另一方面,在本实验所用剂量范围内,TTX 对小鼠自发活动,醋酸致痛反应无显著影响;对麻醉大鼠的血压,心率和呼吸功能亦无影响. TTX 用药前后,尼古丁所致的心血管效应和呼吸反应均无明显变化.

阿片类毒品的滥用是国内外注目的严重社会问题之一. 临床戒毒治疗包括早期脱毒和后期康复两个过程. 早期脱毒治疗是针对戒断综合征进行的积极治疗,以减轻患者的身心痛苦,为康复打下基础. 药物脱毒是目前常用的方法,主要包括阿片类药物和非阿片类两大类<sup>[13]</sup>. 阿片类药物虽然疗效确实,但是药物本身也具有成瘾性,推广使用有一定困难和风险<sup>[14]</sup>. 大量实验研究表明, Mor 依赖戒断不仅与阿片受体有关,也涉及到中枢胆碱能神经<sup>[15]</sup>, 中枢肾上腺素神经<sup>[16]</sup>, 中枢多巴胺受体和 5-羟色胺受体<sup>[17]</sup>等. 最近发现,中枢神经系统和外周 NO 合酶受抑制时,显著减轻 Mor 戒断症状<sup>[18]</sup>. 这些开拓性研究,为开发有效的非阿片类脱毒药,奠定了理论和实验基础.

TTX 对外周自主神经钠通道具有高度选择性,在不影响神经末梢突触后效应器的浓度范围,即可阻断神经递质释放<sup>[2,19]</sup>. Valeri 等<sup>[7]</sup>利用家兔离体空肠建立 Mor 依赖模型, Nal 可诱发戒断性收缩; TTX ( $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 完全阻断了 Nal 的催促作用. 在非学术刊物的报道中,有人试用 TTX 作为脱毒药用于临床<sup>[20]</sup>. 但是,至今尚未发现有关 TTX 对整体动物 Mor 戒断反应的研究报道. 为了探索 TTX 作为脱毒药的可能性,本实验利用常用的大鼠和小鼠 Mor 依赖模型<sup>[8,11]</sup>, 观察 TTX 治疗和预防 Mor 戒断反应的效应. 实验结果表明, Mor 依赖大鼠给予 Nal 可催促戒断反应发生,此时  $\text{im } 0.003 \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量的 TTX, 均可显著抑制戒断大鼠的体重下降. 与 Clo 组大鼠不同, TTX 治疗组大鼠的体重呈双峰下降, TTX 各剂量组对第一个下降峰的抑制作用与 Clo 组相同,但是 TTX  $0.1$  和  $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  两剂量对大鼠第二个下降峰的抑制作用较差,提示戒断大鼠体重下降可能是一个复杂的病理过程,有多

种因素参与. TTX  $0.01$  和  $0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  剂量的治疗效果最佳, TTX  $0.003 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  对第二个下降峰的抑制作用与 Clo 组相同,特别是在催促后 72 h, 两组大鼠体重增长程度优于自然戒断组和 Clo 组. 在本实验条件下,连续应用 TTX 5 d 后,进行第二次 Nal 催促, TTX 组未出现 Mor 样戒断反应,戒断症状的评分与自然戒断的 NS 组相似;体重增长也近似于未致 Mor 成瘾的空白对照组. 关于 TTX 是否存在自身依赖性潜力的问题,尚需做其他实验证实.

Mor 成瘾小鼠用 Nal 后催促产生跳台反应,在此模型上观察了 TTX  $0.02, 0.06, 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  3 个剂量的预防作用. 预先应用 TTX 处理小鼠 2 d, Nal 给药后 20 min 内,小鼠跳跃次数显著低于 Mor 对照组小鼠. 其剂量与效应的关系与大鼠模型相同,  $0.02 > 0.06 > 0.2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Nal 催促后第 11 ~ 20 min 内, TTX 抑制戒断反应的作用最强,且与 Clo 相同(表 3). 众所周知, Clo 作为脱毒药,有明显的副作用. 本实验亦观察到 Clo 给药后,小鼠活动减少,毛色光泽减退及出现竖毛现象. 与 Clo 不同, TTX 连续用药 2 d, 各剂量组小鼠自发活动与 NS 组相比无显著性差别,亦未观察到 TTX 具有镇痛作用. 这些资料说明, TTX 防治 Mor 戒断反应的作用不涉及中枢镇静,镇痛作用和骨骼肌张力变化,且无 Clo 样副作用发生.

我们以往的研究结果证实, TTX 在对犬和兔离体血管无直接松弛作用的浓度,可完全阻断支配血管的交感神经反应<sup>[2,19,21]</sup>. 另一方面, TTX 在犬离体心脏表现出明显的负性肌力作用<sup>[3]</sup>. Bower 等<sup>[1]</sup>也观察到 TTX 具有降低血压的作用. 血压下降也会影响动物的一般状态和对药物反应的能力,为了排除 TTX 对心血管系统和呼吸系统的影响,本实验用麻醉大鼠观察了 TTX  $0.003 \sim 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  对大鼠心率,血压和呼吸频率的作用. 实验结果表明,预防和治疗实验中所用 TTX 的剂量范围均不改变麻醉大鼠的心率,血压和呼吸. 虽然 TTX 对外周自主神经系统具有选择性阻断作用,但是本实验并未观察到 TTX 对尼古丁诱发心血管及呼吸反应的抑制作用,这可能与所用剂量有关. TTX 防治 Mor 依赖动物戒断反应的机理尚不清楚,可能与成瘾大鼠和小鼠的病理生理状态与非成瘾动物的生理状态不同有关. 在正常大鼠和小鼠所观察到的药物作用效果可能难以代表模型动物的药物作用机理,有必要进一步观察 TTX 对模型动物心血管活动和神经反射的影响.

## 4 参考文献:

- [1] Bower DJ, Hart RJ, Matthews PA, Howden ME. Nonprotein neurotoxins[J]. *Clin Toxicol*, 1981, **18**(7):813 - 863.
- [2] Ren LM, Nakane T, Chiba S. Differential effects of  $\omega$ -conotoxin GVIA and tetrodotoxin on vasoconstrictions evoked by electrical stimulation and nicotinic receptor stimulation in canine isolated, perfused splenic arteries[J]. *Br J Pharmacol*, 1994, **111**(4):1321 - 1327.
- [3] Ren LM, Furukawa Y, Karasawa Y, Murakami M, Takei M, Narita M, *et al.* Effects of tetrodotoxin and imipramine on the cardiac responses to nicotine in isolated, blood-perfused canine heart preparations[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, **18**(1):77 - 84.
- [4] 陈冀胜, 潘心富. 河豚毒素(TTX)临床应用简介[J]. 海洋药物杂志, 1986, **5**(2):31 - 34.
- [5] 朱成华, 王桂兰, 李蕴山, 傅绍萱, 黄致强, 潘心富. 河豚毒素(TTX)对抗心律失常药疗效和毒性的影响[J]. 海洋药物杂志, 1984, **3**(1):7 - 9.
- [6] 张永贵, 刘树威, 张宇辉. 河豚毒素(TTX)解毒药的研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 1996, **4**(2):105 - 106.
- [7] Valeri P, Morrone LA, Romanelli L. Manifestations of acute opiate withdrawal contracture in rabbit jejunum after  $\mu$ -,  $\kappa$ - and  $\delta$ -receptor agonist exposure[J]. *Br J Pharmacol*, 1992, **106**(1):39 - 44.
- [8] Miao H, Qin BY. Influences of locus coeruleus lesions and reserpine treatment on opioid physical dependence in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 1995, **16**(2):137 - 140.
- [9] Ling GS, Tappe NS, Inturrisi CE. Methadone induced physical dependence in the rat[J]. *Life Sci*, 1984, **34**(7):683 - 690.
- [10] 吴锦, 刘玉琦, 陈可冀. 复方冬元膏戒毒效应的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, **15**(9):541 - 543.
- [11] Saelens JK, Granat FR, Sawyer WK. The mouse jumping test — a simple screening method to estimate the physical dependence capacity of analgesics[J]. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1971, **190**(2):213 - 218.
- [12] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992. 700.
- [13] 秦伯益. 近年来我国阿片类戒毒药物的研究进展[J]. 中国药物滥用防治杂志, 1996, **6**(3):2 - 5.
- [14] 郑继旺, 张天镐. 盐酸二氢埃托啡的精神依赖性潜力[J]. 中国药物依赖性通报, 1995, **4**(2):65 - 69.
- [15] Buccafusco JJ. Inhibition of the morphine withdrawal syndrome by a novel muscarinic antagonist(4-DAMP)[J]. *Life Sci*, 1991, **48**(8):749 - 756.
- [16] Fernandez-Lopez A, Soria C, Revilla V, Gomez T, Calvo P. Effect of morphine and abstinence syndrome on [ $^3$ H] bromoxidine binding to  $\alpha_2$ -adrenoceptors in rat brain[J]. *Neurochem Res*, 1994, **19**(4):445 - 449.
- [17] 何鸣, 杨德森, 程介士. 丁丙诺啡及其加纳洛酮对吗啡依赖大鼠的行为和中枢阿片肽, 单胺系统的影响[J]. 中国临床心理学杂志, 1995, **3**(2):68 - 74.
- [18] Vaupel DB, Kimes AS, London ED. Nitric oxide synthase inhibitors. Preclinical studies of potential use for treatment of opioid withdrawal[J]. *Neuropsychopharmacology*, 1995, **13**(4):315 - 322.
- [19] Ren LM, Nakane T, Chiba S. Characteristics of the response of isolated and perfused canine splenic arteries to vasoactive substance and to periarterially electrical stimulation[J]. *Jpn J Pharmacol*, 1994, **64**(1):19 - 25.
- [20] 徐铮奎. 河豚鱼毒素戒毒疗效显著[N]. 科技文摘报, 1997-08-12(1).
- [21] Ren LM, Burnstock G. Prominent sympathetic purinergic vasoconstriction in the rabbit splenic artery: potentiation by 2,2'-pyridylisatogen tosylate[J]. *Br J Pharmacol*, 1997, **120**(3):530 - 536.

## Effects of tetrodotoxin on naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent rats and mice

CHEN Su-Qing<sup>1,2</sup>, REN Lei-Ming<sup>1</sup>, HUANG Zhi-Qiang<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. Department of Pharmacology, Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang 050021, China;

3. Hebei Institute of Fisheries, Qinhuangdao 066002, China)

**Abstract:** The protective and therapeutic effects of tetrodotoxin (TTX, rats, 0.003 – 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , im, for 5 d; mice, 0.02 – 0.2  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ , ip, for 2 d) on withdrawal syndrome induced by naloxone (Nal) were investigated in morphine-dependent rats and mice. The results showed that the loss of body weight of rats was significantly inhibited ( $P < 0.01$ ) by TTX. The jumping responses precipitated by Nal in mice were inhibited significantly by TTX administered 2 d before the challenge with Nal. TTX significantly inhibited the withdrawal syndrome evoked by Nal in morphine-dependent rats and mice, and its

effects were similar to that of clonidine. In the range of dose used in this study, TTX did not affect the blood pressure, respiration and heart rate, and did not affect the nicotine-induced neural reflex responses in anesthetized rats. TTX had no effects on ethanoic acid-writhing response and spontaneous movements of the mice.

**Key words:** tetrodotoxin; morphine dependence; withdrawal syndromes; naloxone; rats; mice

**Foundation item:** The project supported by Governor Foundation of Hebei Province(96-Z-0514)

(本文编辑 周宇红)

### 欢迎订阅《中国药学文摘》

《中国药学文摘》包括刊物(ISSN1003-3521/CN11-2529/R),数据库网络版(可通过中国医药信息网 www.cpi.ac.cn 检索),光盘或软盘三种出版形式,是国家科技部重点扶植,国家药品监督管理局主管的我国药学文献大型检索和查询系统.该系统于1981年创建,主要刊载国内外公开发行的700余种药理学及相关学科期刊中的药学文献,以文摘,题录等形式进行报道.(若需查原文可与本中心图书资料室联系,电话:68313344 转 3811)

该刊(库)内容涵盖药学各个领域,共设十二个栏目:药理学理论与发展动态,生药学和中药材,药物化学,药物生产技术,药剂学和制剂技术,药理学和毒理学,生物药剂学,药物分析,临床应用与药物评价,药品管理,制药设备和工厂设计及包装,新药介绍等.

《文摘》库拥有近28万多条数据,并以每年2万4千多条数据递增,内容丰富,查询方便,可为医药生产,科研,教学,流通,医院药房,药店,药检,情报和管理机构服务.

《中国药学文摘》刊物为月刊(另加年度索引一本),大16开本,约230页.本部自办发行,若需订阅书本刊物,网络版或光盘请向本编辑部索要订单.通讯地址如下:

单位名称:国家药品监督管理局信息中心《中国药学文摘》编辑部

通讯地址:北京市西城区北礼士路甲38号

邮政编码:100810 联系人:戴秀茹 王素然

开户银行:建设银行北京展览路分理处 帐号:2610002517

电话:(010)68313344-3803 或 0442,0421 传真:(010)68311978