

中枢 Ca^{2+} 对刺乌头碱镇痛作用的影响¹

郭·新、唐希灿 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031, 中国)

Effects of central Ca^{2+} on analgesic action of lappaconitine

GUO Xin, TANG Xi-Can

(Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT Lappaconitine (LA), isolated from *Aconitum sinomontanum* Nakai, was characterized as analgesic principle by our laboratory. The analgesic effect of ip LA 6 mg/kg as measured in the rat tail-flick test was reduced by icv CaCl_2 or MgCl_2 0.1 or 1 $\mu\text{mol}/\text{rat}$. BaCl_2 was inactive. The analgesic action induced by LA was potentiated by ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA, 0.2 $\mu\text{mol}/\text{rat}$ icv) but not by ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, 0.2 or 0.4 $\mu\text{mol}/\text{rat}$ icv). The calcium antagonists nifedipine (5 mg/kg ip) and verapamil (1 $\mu\text{mol}/\text{rat}$ icv) partially reversed the Ca^{2+} antagonistic effect on LA analgesia, although nifedipine did not enhance LA analgesic action and only at 15 min after medication did verapamil exhibit enhancement of LA analgesia. The analgesic activity of LA was reduced and augmented by microinjection of CaCl_2 0.5 μmol and EGTA 50 nmol to periaqueductal gray (PAG) area, respectively. These results suggest that LA can produce analgesia, possibly through a decrease in cellular calcium availability and PAG may be involved in the Ca^{2+} antagonistic effect on LA analgesia.

KEY WORDS calcium; lappaconitine; analgesia; periaqueductal gray; calcium channel blockers; EGTA

摘要 大鼠光辐射热-甩尾法测痛表明, icv CaCl_2 或 MgCl_2 0.1, 1 μmol 显著拮抗 ip 刺乌头碱 (LA) 6 mg/kg 的镇痛作用, icv EGTA 0.2 μmol 显著增强 LA 的镇痛作用, ip 硝苯啶 5 mg/kg 或 icv 维拉帕米 1 μmol 可部分翻转 Ca^{2+} 对 LA 镇痛的拮抗作用。PAG 注射 CaCl_2 0.5 μmol 和 EGTA 50 nmol 分别拮抗和增强 LA 的镇痛作用。

关键词 钙; 刺乌头碱; 镇痛; 水管周灰质; 钙通道阻滞剂; EGTA

从高乌头 (*Aconitum sinomontanum* Nakai) 中分离得到的刺乌头碱 (lappaconitine, LA)⁽¹⁾ 用多种致痛方法测试均有显著提高痛阈作用, 是一种非成瘾性镇痛剂^(2,3)。 Ca^{2+} 在中枢神经系统表现出多种功能, 其中 Ca^{2+} 对许多中枢镇痛剂如吗啡、乙酰胆碱和可乐定等镇痛的拮抗作用已被广泛报道⁽⁴⁻⁶⁾。本文着重研究中枢 Ca^{2+} 与 LA 镇痛作用的相互关系。

MATERIALS AND METHODS

氢溴酸刺乌头碱 (沈阳第四制药厂) 和硝苯啶 (nifedipine 上海天平制药厂) 均以 1% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 配成混悬液。维拉帕米 (verapamil 上海第十制药厂)。乙二醇双 (α -氨基乙基) 醚四乙酸 (EGTA, AR, 湖州生物化学厂)。

Received 1988 Dec 23 Accepted 1989 May 18

¹ Part of this paper was presented at the 5th Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists, 1988 Jul 6, Beijing

乙二胺四乙酸 (EDTA, AR, 锡县东风化工厂)。EGTA 和 EDTA 配制时均加入少量稀 NaOH 溶解, 再调至 pH 7。

♀大鼠, 体重 $211 \pm SD$ 25 g, 由中国科学院上海分院动物饲养中心供应。随机分组, 每组 5 只。药物 icv, 10 μ l/只。

大鼠光热-甩尾法测痛⁽²⁾ 大鼠全身用方布包裹, 鼠尾露于布外。待大鼠适应 10 min 后, 用 8.75 mm 放映灯泡 (12 V, 75 W) 光辐射热照射鼠尾近尾端 1/3 处。记录从照射至鼠尾甩离光源的时间 (甩尾潜伏期)。调节电压使甩尾潜伏期在 3.0 s 左右, 然后控制电压于同一水平, 测试 3-5 次, 选取甩尾反应稳定的大鼠用于实验, 以末 3 次测得的反应时间的平均值为基础甩尾潜伏期。为防止大鼠尾部灼伤, 每次照射不超过 8 s。实验时室温 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

水管周灰质埋植套管和微量注射 大鼠在 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉下, 固定于立体定位仪。以 H_2O_2 溶液腐蚀皮下组织, 暴露颅骨。为避免损伤中央突, 水管周灰质 (periaqueductal gray, PAG) 单侧 (AP-6.5, L 0.8, H 6.0 mm)⁽⁷⁾ 埋植不锈钢套管 (长 11 mm, 外径 0.6 mm)。套管与矢状面成 10° 角, 尖端高于注射部位 3.0 mm, 用牙托粉固定于颅骨。套管内插入等长钢丝, 以保证套管通畅。手术后 7 d 用于实验。

大鼠在乙醚麻醉下用 1 μ l 微量注射器 PAG 注射药物。每次注射容量均 0.5 μ l, 1 min 内匀速注完, 留针 1 min, 以免药液外渗。实验完毕后, 同法 PAG 注射蓝墨水。处死大鼠, 取脑用 10% 福尔马林固定, 切片。选取注射部位正确的大鼠用于结果统计。

RESULTS

二价阳离子对 LA 镇痛作用的影响 大鼠 6 组, 分别 icv 生理盐水 (NS)、 BaCl_2 或不同剂量 CaCl_2 、 MgCl_2 同时 ip LA 6 mg/kg, 分别于给药前及后 30 min 时测痛。 BaCl_2 0.02 μ mol

不影响 LA 的镇痛作用。 CaCl_2 或 MgCl_2 0.1 μ mol 部分拮抗 LA 的镇痛作用, CaCl_2 或 MgCl_2 1 μ mol 则完全拮抗之 (Tab 1)。可见, Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对 LA 镇痛作用的拮抗表现出剂量依赖关系。

大鼠 icv CaCl_2 后, 安静、少动。未观察到文献⁽⁸⁾报道的木僵、共济失调等行为反应。

Tab 1. Effects of icv divalent cations on analgesia produced by lappaconitine (LA) in the rat tail-flick test. Divalent cations and LA were administered simultaneously. $n=5$, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs 0 min, † $P > 0.05$, †† $P < 0.01$ vs LA + NS.

Drug	Dose (μ mol)	Tail-flick latency (s)	
		LA (6 mg/kg ip) 0 min	30 min
NS	—	3.1 ± 0.1	$4.3 \pm 0.2^{***}$
CaCl_2	0.1	$3.1 \pm 0.1^\dagger$	$3.3 \pm 0.1^{***\dagger\dagger}$
	1	$3.0 \pm 0.1^\dagger$	$3.0 \pm 0.2^{*\dagger\dagger}$
MgCl_2	0.1	$3.1 \pm 0.1^\dagger$	$3.4 \pm 0.1^{***\dagger\dagger}$
	1	$3.1 \pm 0.0^\dagger$	$3.1 \pm 0.2^{*\dagger\dagger}$
BaCl_2	0.02	$2.9 \pm 0.1^\dagger$	$4.0 \pm 0.3^{***\dagger\dagger}$

二价阳离子络合剂对 LA 镇痛作用的影响 大鼠分别 icv 不同剂量二价阳离子络合剂 EGTA 和 EDTA, 其本身均不影响痛阈。icv EGTA 0.2 μ mol 同时 ip LA 6 mg/kg, 可显著加强 LA 的镇痛作用。而 icv EGTA 0.1

Tab 2. Effects of icv EGTA and EDTA on analgesia induced by lappaconitine (LA, 6 mg/kg ip) in the rat tail-flick test. Rats were tested for changes in tail-flick latency 30 min after simultaneous administration of EGTA or EDTA and LA or NS (2 ml/kg ip). $n=5$, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control.

Drug	Dose (μ mol)	Tail-flick latency (s)	
		NS	LA
Control	—	3.0 ± 0.2	4.4 ± 0.3
EGTA	0.1	$3.0 \pm 0.1^*$	$4.2 \pm 0.1^*$
	0.2	$3.1 \pm 0.3^*$	$5.1 \pm 0.3^{***}$
EDTA	0.2	$3.1 \pm 0.1^*$	$4.4 \pm 0.4^*$
	0.4	$3.0 \pm 0.2^*$	$4.3 \pm 0.4^*$

μmol, EDTA 0.2, 0.4 μmol 对 LA 的镇痛作用均无明显影响(Tab 2)。

icv EGTA 和 EDTA 后, 大鼠立刻产生兴奋、不协调运动等表现, 10 min 后完全消失, 不影响测痛。这种行为反应与文献(8)报道相符。

两种钙拮抗剂对 LA 镇痛作用的影响 ip LA 6 mg/kg 有显著提高痛阈作用, 30 min 时作用最强, 持续 60-90 min. icv CaCl₂ 1 μmol 后, LA 提高痛阈作用消失, 若同时 ip 硝苯啶 5 mg/kg, 则 LA 镇痛作用部分恢复, 而硝苯啶本身不影响 LA 的镇痛作用(Fig 1 A)。icv 维拉帕米 1 μmol 与硝苯啶相似, 即部分翻转 Ca²⁺ 对 LA 镇痛的拮抗作用, 但维拉帕米与 LA 合用 15 min 时有加强 LA 镇痛的作用(Fig 1 B)。

PAG 微量注射 CaCl₂ 和 EGTA 对 LA 镇

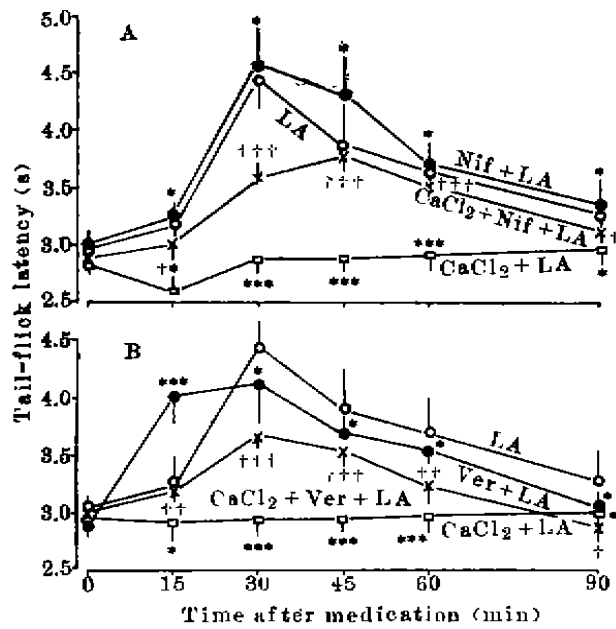


Fig 1. Effects of (A) nifedipine (Nif, 5 mg/kg ip) and (B) verapamil (Ver, 1 μmol/rat icv) alone or in combination with CaCl₂ (1 μmol/rat icv) on the analgesic response to lappaconitine (LA, 6 mg/kg ip) in the rat tail-flick test. n = 5. $\bar{x} \pm SD$. Nif, Ver or CaCl₂ were injected simultaneously with LA. *P > 0.05, *P < 0.01 vs LA; †P > 0.05, ††P < 0.05, †††P < 0.01 vs CaCl₂ + LA.**

痛作用的影响 取 7 d 前 PAG 埋管的大鼠, 均分 5 组, 每组给药情况见 Fig 2。为了排除乙醚麻醉的影响, 在大鼠给药后 30 min 开始测痛。实验完毕后检查 PAG 注射部位, 选取定位正确的大鼠用于结果分析。可见, CaCl₂ 0.5 μmol 和 EGTA 50 nmol 本身不明显改变痛阈, 而它们能分别拮抗和增强 ip LA 6 mg/kg 的镇痛作用。

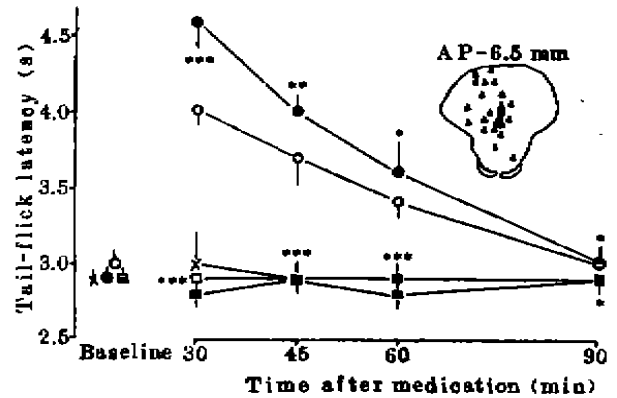


Fig 2. Effects of microinjection of CaCl₂ 0.5 μmol and EGTA 50 nmol to periaqueductal gray (PAG) area on lappaconitine (LA, 6 mg/kg ip) induced analgesia. CaCl₂ or EGTA and LA were administered simultaneously. n = 5. $\bar{x} \pm SD$. (○) NS + LA, (●) EGTA + LA, (□) CaCl₂ + LA, (×) EGTA + NS, (■) CaCl₂ + NS. *P > 0.05, **P < 0.05, *P < 0.01 vs NS + LA. The inset showed the injection sites in PAG.**

DISCUSSION

icv CaCl₂ 和 EGTA 以提高和降低中枢 Ca²⁺ 水平分别拮抗和增强 LA 的镇痛作用, 表明 LA 镇痛作用的产生与中枢 Ca²⁺ 水平变化密切相关。icv BaCl₂ 0.02 μmol 不影响 LA 的镇痛作用, 实验中发现更高剂量的 BaCl₂ 使大鼠产生抽搐死亡。由于 EGTA 对 Ca²⁺ 的络合作用较对 Mg²⁺ 更为专一⁽⁶⁾。且 EGTA 增强 LA 的镇痛作用, 而广谱的二价阳离子络合剂 EDTA 不影响 LA 的镇痛作用, 表明 Ca²⁺ 与 LA 镇痛作用的关系较 Mg²⁺ 更密切。生理条件下细胞内外 Ca²⁺ 浓度相对恒定。icv CaCl₂ 或 EGTA 引起胞外 Ca²⁺ 浓度的变化, 从而使得

细胞对胞外 Ca^{2+} 的获得性大小发生变化。由于实验未测细胞内外 Ca^{2+} 浓度及 Ca^{2+} 流的变化大小, 因此我们仅能推断细胞对 Ca^{2+} 获得性的增加和减少分别拮抗和增强 LA 的镇痛作用。

Ca^{2+} 内流可通过多种途径, 硝苯啶和维拉帕米仅通过作用于电压敏感性钙通道的不同位点影响 Ca^{2+} 内流⁽⁹⁾。由于硝苯啶很容易通过血脑屏障⁽¹⁰⁾, 而神经细胞在非除极化状态, 钙拮抗剂对电压敏感性钙通道无明显作用⁽¹¹⁾, 因此 ip 硝苯啶或 icv 维拉帕米不显著改变 LA 的镇痛作用。当 icv CaCl_2 引起胞外 Ca^{2+} 浓度增加时, 它们仅通过作用于电压敏感性钙通道而部分对抗细胞对 Ca^{2+} 的获得性, 因而部分翻转 Ca^{2+} 对 LA 镇痛的拮抗作用。迄今关于钙拮抗剂自身镇痛作用的报道因所用动物和测痛方法不同而结果不一⁽¹²⁻¹⁴⁾。我们实验中 icv 维拉帕米 15 min 时有加强 LA 镇痛的作用, 可能是维拉帕米自身短暂镇痛作用的表现。

损毁大鼠 PAG 能取消 LA 的镇痛作用(待发表资料), 大鼠 PAG 微量注射 CaCl_2 和 EGTA 分别对抗和增强 LA 外周给药的镇痛作用, 提示 PAG 与 LA 镇痛作用发挥有关, 也参与 Ca^{2+} 对 LA 镇痛作用的拮抗。

REFERENCES

- 1 Wei BY, Kong XC, Zhao ZY, Wang HC, Zhu ZH. Studies of Chinese Aconitum spp. XVIII—alkaloids from *Aconitum sinomontanum* (I). *Bull Chin Mater Med* 1981; 6(2):26
- 2 Tang XC, Zhu MY, Feng J, Wang YE. Studies on pharmacologic actions of lappaconitine hydrobromide. *Acta Pharm Sin* 1983; 18: 579
- 3 Liu JH, Zhu YX, Tang XC. Anti-inflamma-

- tory and analgesic activities of N-deacetyl-lappaconitine and lappaconitine. *Acta Pharmacol Sin* 1987; 8: 301
- 4 Harris RA, Loh HH, Way EL. Effects of divalent cations, cation chelators, and an ionophore on morphine analgesia and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 1975; 195: 488
- 5 Widman M, Rosin D, Dewey WL. Effects of divalent cations, lanthanum, cation chelators and an ionophore on acetylcholine antinociception. *Ibid* 1978; 205: 311
- 6 Geng WP, Xu SY. Relationship between clonidine analgesia and calcium cation. *Acta Pharm Sin* 1987; 22: 170
- 7 Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New South Wales: Academic Press Australia, 1982: Figure 25-30
- 8 Ben-Sreti MM, Gonzalez JP, Sewell RDE. Effects of elevated calcium and calcium antagonists on 6, 7-benzomorphan-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 1983; 90: 385
- 9 Schramm M, Towart R. Modulation of calcium channel function by drugs. *Life Sci* 1985; 37: 1843
- 10 Janicki PK, Siembab D, Paulo EA, Krzascik P. Single-dose kinetics of nifedipine in rat plasma and brain. *Pharmacology* 1988; 36: 183
- 11 Spedding M, Middlemiss DM. Central effects of Ca^{2+} antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1985; 6: 309
- 12 Del Pozo E, Caro G, Baeyens JM. Analgesic effects of several calcium channel blockers in mice. *Eur J Pharmacol* 1987; 137: 155
- 13 Contreras E, Tamayo L, Amigo M. Calcium channel antagonists increase morphine-induced analgesia and antagonize morphine tolerance. *Ibid* 1988; 148: 463
- 14 Hoffmeister F, Tettenborn D. Calcium agonists and antagonists of the dihydropyridine type: Antinociceptive effects, interference with opiate- μ -receptor agonists and neuropharmacological actions in rodents. *Psychopharmacology* 1986; 90: 299