

URWell 对吗啡依赖小鼠戒断反应 和 NO/NOS 系统的影响

陈春霞¹, 霍国伟², 杨尔滨², 黄建春¹, 林兴¹, 黄仁彬^{1*}

(1. 广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021; 2. 新加坡前进医药戒毒中心, 新加坡)

[摘要] 目的: 研究中药 URWell 对吗啡依赖小鼠催促戒断症状及其一氧化氮(NO)/一氧化氮合酶(NOS)系统的影响, 初探其作用机制。方法: 取昆明种小鼠 60 只, 随机分为正常对照组, 模型组, 阳性对照组(可乐定, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig), URWell 组(以生药剂量分别为 $20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig)。除正常对照组外, 各组以剂量递增法连续皮下注射吗啡, 建立吗啡依赖模型, 于建模第 5 天开始各组分别给予相应的药物, 连续给药 6 d。各组于建模第 8 天, 予以纳络酮($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip)催促戒断, 观察小鼠 2 h 内的戒断症状和体重变化。用硝酸还原酶法测定各组小鼠大脑组织匀浆的 NO 含量与 NOS 活性。结果: 与模型组比较, URWell 组($20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)小鼠在第 8, 9 天跳跃反应明显降低($P < 0.05$), 可乐定组和 URWell 组($20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)小鼠戒断后体重降低明显减少($P < 0.05$), 可乐定组和 URWell 组($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)小鼠大脑 NO 含量及 NOS 活性下降($P < 0.05$)。结论: URWell 能抑制吗啡依赖小鼠催促戒断症状, 其作用机制可能与 URWell 影响大脑的 NO/NOS 系统有关。

[关键词] URWell; 吗啡依赖; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 戒断症状

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0290-04

Effects of URWell on Withdrawal Syndrome and NO/NOS System in Morphine-dependent Mice

CHEN Chun-xia¹, HUO Guo-wei², YANG Er-bin², HUANG Jian-chun¹, LIN Xin¹, HUANG Ren-bin^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. URWELL ONE-STOP Recovery Center, Singapore)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of URWell on withdrawal syndrome and nitric oxide (NO) /nitric oxide synthase (NOS) system in morphine-dependent mice and its action mechanisms. **Method:**

[收稿日期] 20120912(013)

[第一作者] 陈春霞, 硕士生, 从事生化药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: chunxia251401@126.com

[通讯作者] * 黄仁彬, 博士, 教授, 博士生导师, 从事生化药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@163.com

- [2] 关喆, 卫四来. 骨性关节炎病因探讨[J]. 吉林中医药, 2009, 29(3):198.
- [3] 师咏梅, 许放, 柳占彪. 痹祺胶囊对实验性骨关节炎大鼠 MMP-3 和 TIMP-1 的影响[J]. 天津中医药, 2011, 28(1):64.
- [4] 苏宁, 姚全胜. 新药毒理实验动物组织病理学图谱[M]. 南京: 东南大学出版社, 2005:127.
- [5] 付冬瑞. 膝关节滑膜炎中西医治疗近况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):209.
- [6] 杜以宽, 马民, 唐勇. 中医对骨性关节炎病因病机的认识[J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(2):155.
- [7] 孙丽红, 李超英. 虎骨及代用品研究进展[J]. 长春中医药大学学报, 2002, 18(4):59.
- [8] 邱洪斌, 王景涛, 徐辉, 等. 人工虎骨粉对家兔骨折愈合影响的实验研究[J]. 临床医药实践杂志, 2008, 1(24):953.
- [9] 张依山. 金天格胶囊对成骨细胞作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(2):321.
- [10] 张军, 吴林生, 孙树椿, 等. 金天格胶囊治疗原发性骨质疏松症 660 例临床疗效[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(4):490.

[责任编辑 何伟]

Sixty mice were divided into 6 groups randomly, namely the control group, model group, positive control group (clonidine, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig), URWell group ($20, 10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig). Except the control group, the morphine-dependent mice model of other groups was established by administration of gradually increasing doses of morphine. Oral URWell or saline (control, model) was administered from the 5th day to the 10th day. The acute withdrawal was induced by naloxone ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip) in the 8th day, then withdrawal syndrome and body weight loss were recorded. NO concentration and NOS activity in brain tissues were tested by nitrate reductase method. **Result:** Compared with the model group, URWell ($20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), respectively, significantly suppressed morphine withdrawal syndrome within the 8th day and 9th day ($P < 0.05$), clonidine and URWell ($20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) significantly reduced body weight loss in morphine-dependent mice following morphine withdrawal, as well as clonidine and URWell ($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) significantly inhibited levels of NO and NOS in brain tissues. **Conclusion:** URWell treatment attenuated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice, and the mechanism may be associated with inhibiting NO and NOS in the brain.

[**Key words**] URWell; morphine-dependent; NO; NOS; withdrawal syndrome

URWell是由远志、菟丝子、百合、延胡索、锁阳等多味中草药组成的复方制剂,在新加坡的临床观察表明其有较好的戒毒和抗复吸疗效。本研究通过建立小鼠吗啡依赖动物模型,观察URWell对其戒断症状、体重变化及一氧化氮(NO)/一氧化氮合酶(NOS)系统的影响,以进一步证实其疗效,探讨戒断机制,为开发URWell用于中药戒毒提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 URWell(广西医科大学药理教研室自行制备,批号120218):干燥生药粉碎后加10倍蒸馏水(去离子水),先泡2h,煮2h,过滤;药渣再加8倍蒸馏水,煮2h;合并2次滤液,浓缩至500mL,加3倍95%乙醇沉淀24h,取上清回收乙醇,浓缩至250mL(每1mL含2g生药材)。盐酸吗啡(Mor)注射液(沈阳第一制药厂,批号100310-2);盐酸纳洛酮(Nal)注射液(北京四环制药有限公司,批号20110103);盐酸可乐定片(陕西西岳制药有限公司,批号1103601)。

1.2 动物 昆明种小鼠,SPF级,雌雄各半,体重18~22g,由广西医科大学实验动物中心提供。试验动物使用许可证号SCXK(桂)2009-0002。

1.3 试剂与仪器 NO, NOS测试盒(批号20120210),考马斯亮蓝(批号20120317),均由南京建成生物工程研究所提供。722SP型可见分光光度计(上海棱光技术有限公司生产)。

2 方法

2.1 动物分组和吗啡依赖小鼠模型的建立^[1-2] 小鼠60只随机分为6组,即正常对照组,模型组,阳性对照组(可乐定, $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig),URWell组(以生药计剂量分别为20,10,5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig),每

组10只。除正常对照组外,其他各组均采用皮下注射(sc)剂量递增法建立吗啡依赖小鼠模型,每日sc给吗啡剂量分别为20,40,60,80,100,100,100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,每天2次(9:30,17:30各1次),连续给药7d。第8天于9:30一次注射吗啡100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 动物给药 从造模第5天起,阳性对照组和URWell组分别在给吗啡前30min ig给予相应剂量的药物,吗啡依赖模型组和正常对照组 ig 同体积的生理盐水,每天2次,连续给药6d。

2.3 观察指标

2.3.1 观察小鼠催促戒断跳跃反应和体重变化 末次给予吗啡后90min,ip纳洛酮(Nal)4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 催促。立即把小鼠放入一个高35cm,直径30cm的玻璃圆桶内观察2h内跳跃动物例数(n)和动物的跳跃次数(f)。连续观察小鼠停用吗啡后3d的催促戒断症状(从第8天至第10天)。观察结束称体重,与基础体重(第7天下午17:00给药前称得的体重)相比计算小鼠的体重变化率。

2.3.2 脑组织中NO及NO合酶的测定 实验结束后,冰盘上取小鼠大脑,称重,制备10%的脑匀浆液(用无菌生理盐水制备),静置10min,离心并取上清。严格按照试剂盒的方法测定NO含量与NOS活性。

2.4 数据处理 除各组小鼠跳跃例数的比较采用 χ^2 检验外,其余计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验分析,均采用SPSS 13.0统计软件进行处理。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对吗啡依赖小鼠催促戒断跳跃反应的影响 小鼠剂量递增连续给予Mor后,Nal催瘾表现为躁

动不安、活动增多,并出现跳跃反应。与正常对照组比较,模型组小鼠跳跃的例数及跳次数明显增高;与模型组比较,URWell 组(20, 10 g·kg⁻¹·d⁻¹)小鼠在第 8, 9 天(即催促戒断后第 1, 2 天)跳跃反应明显降低($P < 0.05$)。URWell 组(20 g·kg⁻¹·d⁻¹)在第 8 天和第 9 天抑制跳跃反应效果甚至优于可乐定组。见表 1。

3.2 对吗啡依赖小鼠体重变化率的影响 正常对照组小鼠的体重随时间逐渐增加,表现正常。与正常对照组比较,模型组小鼠体重明显降低($P <$

0.01),在 20 h(即催促戒断 2 h)后表现最明显,以后逐渐回升,到 74 h 体重由负增长转为正增长。与模型组比较,可乐定组和 URWell 组(20, 10 g·kg⁻¹·d⁻¹)小鼠体重降低明显减少($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 对吗啡依赖性小鼠大脑的 NO 及 NOS 的影响 与正常对照组比较,模型组小鼠大脑 NO 含量及 NOS 活性升高($P < 0.01$);与模型组相比,可乐定组和 URWell 组(20 g·kg⁻¹·d⁻¹)NO 含量及 NOS 活性下降($P < 0.01$)。URWell 组(10 g·kg⁻¹·d⁻¹)NOS 活性下降($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 URWell 对吗啡依赖小鼠催促戒断时跳跃反应情况($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	D8		D9		D10	
		2 h 跳跃 动物/只	2 h 跳跃数 /次	2 h 跳跃 动物/只	2 h 跳跃数 /次	2 h 跳跃 动物/只	2 h 跳跃数 /次
正常对照	-	1	1.0 ± 0.0	1	1.0 ± 0.0	0	0.0 ± 0.0
模型	-	9 ²⁾	30.4 ± 20.6 ²⁾	6 ¹⁾	21.2 ± 18.1 ²⁾	4 ¹⁾	7.0 ± 5.0
可乐定	0.000 4	5	6.2 ± 9.5 ⁴⁾	2	8.5 ± 3.5	0 ³⁾	0.0 ± 0.0
URWell	20	2 ⁴⁾	6.0 ± 5.7 ⁴⁾	0 ⁴⁾	0.0 ± 0.0 ³⁾	1	1.0 ± 0.0
	10	3 ⁴⁾	23.7 ± 15.6 ³⁾	2	2.5 ± 2.1 ³⁾	1	4.0 ± 0.0
	5	6	26.8 ± 19.7	2	11.5 ± 10.6	2	5.0 ± 1.4

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 URWell 对吗啡依赖小鼠催促戒断体重变化率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	体重变化率/%				
		18 h	20 h	26 h	50 h	74 h
正常对照	-	2.82 ± 2.00	2.84 ± 0.92	3.37 ± 2.53	5.87 ± 3.47	6.86 ± 4.66
模型	-	-2.39 ± 2.09 ²⁾	-6.20 ± 2.48 ²⁾	-2.29 ± 1.77 ²⁾	-1.60 ± 1.03 ²⁾	1.36 ± 1.27 ²⁾
可乐定	0.0004	-1.38 ± 1.12	-1.85 ± 1.77 ⁴⁾	1.48 ± 1.32 ⁴⁾	3.68 ± 3.13 ⁴⁾	6.12 ± 4.72 ⁴⁾
URWell	20	-0.87 ± 0.60 ³⁾	-1.04 ± 0.82 ⁴⁾	1.17 ± 1.00 ⁴⁾	2.32 ± 1.28 ⁴⁾	4.52 ± 1.90 ⁴⁾
	10	-1.45 ± 0.60	-1.98 ± 1.16 ⁴⁾	0.65 ± 0.48 ⁴⁾	1.15 ± 0.45 ⁴⁾	3.01 ± 1.53 ³⁾
	5	-2.57 ± 2.09	-3.41 ± 1.84 ³⁾	-2.22 ± 1.79	0.30 ± 0.27 ⁴⁾	1.85 ± 0.68

表 3 URWell 对吗啡依赖小鼠大脑 NO 含量及 NOS 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	NO/μmol·g ⁻¹	总 NOS/U·mg ⁻¹	诱导型 NOS/U·mg ⁻¹
正常对照	-	0.66 ± 0.45	1.23 ± 0.37	0.44 ± 0.14
模型	-	1.22 ± 0.14 ²⁾	2.31 ± 0.77 ²⁾	1.27 ± 0.78 ²⁾
可乐定	0.0004	0.66 ± 0.53 ³⁾	1.19 ± 0.28 ⁴⁾	0.57 ± 0.21 ³⁾
URWell	20	0.59 ± 0.52 ⁴⁾	1.23 ± 0.38 ⁴⁾	0.40 ± 0.15 ⁴⁾
	10	0.85 ± 0.69	1.38 ± 0.38 ⁴⁾	0.46 ± 0.34 ³⁾
	5	1.12 ± 0.89	1.80 ± 0.20	0.51 ± 0.21 ³⁾

4 讨论

阿片类毒品的滥用在国内已成为日益严重的社会—医学问题,吸毒已成为世界性人类公害之一。

其成瘾机制目前尚未完全明确。西药阿片类药物虽然疗效确切,但药物本身也具有成瘾性,推广使用有一定困难和风险^[3]。我国应用中医药戒毒源远流

长,具有安全、简便、无成瘾等优点,在目前医药戒毒治疗成为当前的研究热点之一,各国致力于研发低毒无瘾的戒毒中药^[4-7]。在新加坡的临床用药中观察到由多味中草药组成的复方制剂 URWell 有较好的戒毒效果,但对其脱瘾机制缺乏系统研究。

吗啡依赖小鼠在给予足够剂量的阿片受体拮抗剂纳洛酮后,在短期出现的跳跃行为和体重减轻是小鼠代表性的阿片戒断反应^[8]。可乐定是经典的 α_2 肾上腺素受体激动剂,可以有效地降低小鼠的跳跃次数和体重减轻值^[9]。我们的实验中很好地重复了可乐定对戒断症状的治疗作用。本研究采用皮下注射剂量递增法建立吗啡依赖小鼠模型,对比观察 URWell 及可乐定对戒断症状及 NO/NOS 系统的影响,探讨 URWell 的戒毒机制。

目前大量的研究表明^[10-13],依赖戒断不仅与阿片受体有关,也涉及到中枢胆碱能神经,中枢肾上腺素神经,中枢多巴胺受体、5-羟色胺受体、NO 合酶等。本研究对临床初试有较好疗效的中药 URWell 观察了其对小鼠吗啡依赖催促戒断症状的控制作用。结果显示中药 URWell($20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)对纳洛酮催促出现的小鼠吗啡戒断症状跳跃反应有明显的抑制作用,URWell($20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)在催促戒断后第 1 天和第 2 天抑制跳跃反应效果甚至优于可乐定组。在控制吗啡依赖小鼠戒断体重减轻的观察中发现,URWell 组($20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)在催促戒断 2 h 体重的减轻与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),说明其在一定程度上能对抗药物依赖戒断时体重的丢失。同时,研究发现,URWell 还可以抑制吗啡依赖引起的 NO/NOS 系统的异常上调,表明其可能通过抑制中枢神经系统和外周 NO/NOS 减轻戒断症状。

综上所述,URWell 具有良好的戒毒作用,其机制可能与抑制 NO/NOS 系统有关,本结果为深入研究中药 URWell 在基础与临床戒毒治疗中的作用与机理及新药的开发提供了依据,但 URWell 广泛的临床应用仍有待进一步的研究工作。

[参考文献]

- [1] 顾珊智,李生斌.各种实验因素对建立大鼠吗啡依赖模型的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2004,25(5):446.
- [2] 谢海源,赖术,黄建春,等.Cedemex对吗啡依赖大鼠戒断症状的干预及治疗作用[J].广西医科大学学报,2007,24(2):231.
- [3] 郑继旺,张开镐.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.
- [4] 王煜,王景霞,欧丽娜,等.钩藤对吗啡诱导的大鼠条件性位置偏爱效应的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):218.
- [5] 杨铮,蒋伟哲,黄建春,等.思的明对吗啡依赖猴戒断症状的治疗作用[J].中国新药杂志,2008,17(15):1315.
- [6] 焦莹,李峰,刘洋.中医药戒毒的理论与临床研究进展[J].中国药物依赖性杂志,2008,17(3):165.
- [7] 苏军凯,郑有顺,莫志贤,等.参附汤加味对吗啡依赖大鼠戒断症状及位置偏爱效应的影响[J].中国实验方剂学杂志,2000,6(2):26.
- [8] 张开镐.药物依赖性的动物实验方法(一)[J].中国药物依赖性杂志,1999,8(1)23.
- [9] 张磊,刘鸿宇,陈磊,等.可乐定对吗啡依赖小鼠催促戒断后行为的影响[J].中国药物依赖性杂志,2010,19(4):253.
- [10] Benyamin R, Trescot A M, Datta S, et al. Opioid complications and side effects [J]. Pain Physician, 2008,11(2 Suppl):S105.
- [11] Ballantyne J C, Shin N S. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence [J]. Clin J Pain, 2008, 24(6):469.
- [12] 何鸣,杨德森,程介士,等.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、单胺释放的影响[J].中国临床心理学杂志,1995,3(2):68.
- [13] 刘忠华,张开镐.阿片类药物依赖的分子机制[J].中国药物依赖性杂志,1999,8(2):86.

[责任编辑 聂淑琴]