

1,6-二(4-苯乙基-1-甲基-1-哌嗪基)己烷二溴化物镇痛作用及机制探讨

张红梅¹, 李长龄^{1*}, 李润涛² (1. 北京大学药学院分子与细胞药理学系, 北京 100083; 2. 北京大学药学院化学生物学系, 北京 100083; * 联系人)

摘要:目的 研究哌嗪类新化合物 1,6-二(4-苯乙基-1-甲基-1-哌嗪基)己烷二溴化物(97-9-G4)的镇痛作用及机制。方法 扭体法、热板法研究镇痛活性;联合给药观察纳洛酮、利血平、阿托品、CaCl₂ 和 EDTA 等对 97-9-G4 镇痛作用的影响;并测定 97-9-G4 对小鼠体内 PGE₂ 的影响。结果 sc 97-9-G4 5 mg/kg 即可有效抑制小鼠扭体反应($P < 0.05$);sc 40 mg/kg 和 icv 2.5 μg/kg 均可明显延长热板实验的舔足阈($P < 0.05$);纳洛酮、CaCl₂ 和 EDTA 均可拮抗、减弱或加强其镇痛作用;利血平、阿托品对 97-9-G4 的镇痛作用影响不明显。结论 97-9-G4 具有明显的镇痛活性,其镇痛作用与阿片受体及体内 Ca²⁺ 等因素有一定关系。

关键词:哌嗪类;1,6-二(4-苯乙基-1-甲基-1-哌嗪基)己烷二溴化物;镇痛;纳洛酮

中图分类号:R964;R971.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)06-0439-03

Analgesic effects and mechanisms of 1,6-Di-(4-phenethyl-1-methyl-1-piperazinyl) hexane dibromide

ZHANG Hong-mei¹, LI Chang-ling^{1*}, LI Run-tao² (Dept. of Molecular & Cellular Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate the analgesic effects and mechanisms of 1,6-Di-(4-phenethyl-1-methyl-1-piperazinyl) hexane dibromide (97-9-G4). **METHOD** The writhing model of mice induced by acetic acid and hot-plate test (sc, icv) were used to study the analgesic effects of 97-9-G4; The influences of naloxone, reserpine, atropine, CaCl₂ and EDTA on the analgesic effects of 97-9-G4 were observed; The influence of 97-9-G4 on the content of PGE₂ was determined. **RESULTS** The inhibition of writhing reaction induced by acetic acid and the rising of pain threshold in mice by hot-plate were found. And analgesic effect of 97-9-G4 could be antagonized by naloxone; CaCl₂ reduces while EDTA enhances the analgesic effects; Reserpine and atropine have no obvious influence on it. **CONCLUSION** The analgesic effect of 97-9-G4 was significant, it can be antagonized by naloxone. And Ca²⁺ may be one of the factors of 97-9-G4's analgesic mechanisms.

KEY WORDS: piperazines; 1,6-Di-(4-phenethyl-1-methyl-1-piperazinyl) hexane dibromide; analgesia; naloxone

近年来哌嗪类衍生物镇痛活性的研究时有报道^[1],我校化学生物学系也正在致力于这类药物的设计与合成^[2]。在已得到的一系列新化合物中,我们发现 1,6-二(4-苯乙基-1-甲基-1-哌嗪基)己烷二溴化物[1,6-Di-(4-phenethyl-1-methyl-1-piperazinyl) hexane dibromide](97-9-G4)具有良好的镇痛作用,本实验就其镇痛活性以及可能的机制做了一些实验研究和探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物及试剂 1,6-二(4-苯乙基-1-甲基-1-哌嗪基)己烷二溴化物(97-9-G4):白色粉末,溶于水,北京大学药学院化学生物学系合成提供;盐酸吗啡注射液(Mor):沈阳第一制药厂产品,批号 900805;纳洛酮注射液(Nal):北京四环制药厂产品,批号 000621;利血平(Res):上海医科大学红旗制药厂,批号为 901208;阿托品(At):南京第三制药厂,批号为

970102;氯化钙(CaCl₂):中国医药公司北京采购供应站经销,批号为 900731;乙二胺四乙酸(EDTA):Sigma 公司产品;阿司匹林(ASP):原料药,纯度 99%,山东新华制药厂生产,批号为 005564;冰醋酸:中国人民解放军第九零六六工厂产品,批号 940527。

1.1.2 动物 昆明小鼠,♀,体重(22±2)g(北京大学医学部实验动物部提供,一级,动物合格证号:01-3049)。

1.2 方法

1.2.1 扭体法^[3] 70 只小鼠随机分为 7 组:生理盐水(NS);吗啡(Mor)2 mg/kg;97-9-G4 40,20,10,5,2.5 mg/kg 组。皮下注射(sc),30 min 后,腹腔注射(ip)0.7%醋酸 0.2 mL/只,记录注射醋酸后 15 min 内小鼠的扭体次数。

1.2.2 热板法^[4] 90 只小鼠随机分为 9 组:采用皮下注射(sc)和侧脑室注射(icv)两种给药途径,设 NS 及 Mor 2 mg/kg(sc)和 1 μg/kg(icv)对照;97-9-G4(sc) 40,20,10 mg/kg 以

基金项目:国家自然科学基金项目(29972005)

及 97-9- G4(icv) 5,2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(icv 方法:在小鼠头部两耳连线与矢状缝交点左右前外各 2 mm 处进针,注射容量为 10 μL ,进针深度为 2 mm)。调节热板仪温度在 55 $^{\circ}\text{C}$,于给药前测各组小鼠的基础舔足阈(三次),给药 30 min 后,测药后添足阈。

1.2.3 Nal, Res, Atr 等对 97-9- G4 镇痛作用的影响^[5]:120 只小鼠随机分为 12 组: NS, 97-9- G4, Nal, Res, Atr, CaCl_2 , EDTA 组以及以上各药物联合 97-9- G4 给药组,剂量 途径和时间见表 3,给药后一定时间 ip 0.7%醋酸 0.2 mL/只,记录注射醋酸后 15 min 内小鼠的扭体次数。

1.2.4 对小鼠腹腔液 PGE_2 含量的影响:60 只小鼠随机分为 4 组: NS 对照组,醋酸模型组, ASP 组(100 mg/kg), 97-9- G4(20 mg/kg) 组,给药 30 min 后,ip 0.7%的冰醋酸 0.1 mL/10 g,5 min 后立即向每只小鼠腹腔精确注射生理盐水 2 mL,轻揉使之混匀。4 min 后,断头处死电干血,收集腹腔液约 2 mL,按照文献方法^[6]测定 PGE_2 含量。

1.2.5 数据处理 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用样本均数 t 检验比较两组差异的显著性。

2 结果

2.1 97-9- G4 对小鼠扭体试验的影响

97-9- G4 5 mg/kg sc 给药时,可有效地抑制醋酸所致的小鼠扭体反应,抑制率呈剂量依赖性增加。其中抑制 % = (生理盐水组扭体数-给药组扭体数)/生理盐水组扭体数 $\times$ 100%。见表 1。

表 1 sc 97-9- G4 对小鼠扭体试验的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 1 Analgesic effects of 97-9- G4 (sc) on mice in the writhing test($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose (mg/kg)	Writhing numbers (within 15 min)	Inhibitory rate (%)	ID ₅₀ & ID ₉₅ % Confidence Limit (mg/kg)
NS	-	33.8 $\pm$ 6.0		
Mor	2	3.1 $\pm$ 2.5 ³⁾	90.8	
97-9- G4	40	0.0 $\pm$ 0.0 ³⁾	100.0	
97-9- G4	20	4.2 $\pm$ 5.0 ³⁾	87.6	8.8
97-9- G4	10	17.1 $\pm$ 12.4 ²⁾	49.4	(7.4-10.5)
97-9- G4	5	25.7 $\pm$ 10.3 ¹⁾	24.0	
97-9- G4	2.5	31.3 $\pm$ 9.2	7.4	

注:与 NS 组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ compared with NS group

2.2 97-9- G4 对小鼠热板试验的影响

97-9- G4 40 mg/kg(sc)和 2.5 mg/kg (icv) 给药后小鼠舔足阈与给药前进行比较,均有显著性差异,中枢微量给药即可产生明显的镇痛作用,见表 2。

2.3 各种药物对 97-9- G4 镇痛作用的影响

Res + 97-9- G4 和 Atr + 97-9- G4 组与单独给 97-9- G4 组扭体数相当,经 t 检验没有显著性差异,说明 97-9- G4 的镇痛作用与体内单胺类递质和 M 胆碱受体关系不明显;而 Nal + 97-9- G4 组、 CaCl_2 + 97-9- G4 组和 EDTA + 97-9- G4 组与

单独给 97-9- G4 组相比较有显著性差异,结果见表 3。

表 2 97-9- G4 对小鼠热板试验的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Analgesic effects of 97-9- G4 on mice in hot-plate test($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Injection route	Dose (mg/kg)	Pain thresholds before injection (s)	Pain thresholds after injection (s)
NS	sc	-	15.9 $\pm$ 2.9	16.8 $\pm$ 6.6
NS	icv	-	12.7 $\pm$ 3.3	16.3 $\pm$ 5.9
Mor	sc	2	17.6 $\pm$ 5.5	32.1 $\pm$ 9.4 ¹⁾
Mor	icv	0.001	13.6 $\pm$ 3.6	56.4 $\pm$ 9.8 ³⁾
97-9- G4	sc	40	13.7 $\pm$ 6.0	25.8 $\pm$ 11.1 ¹⁾
97-9- G4	sc	20	19.1 $\pm$ 6.4	26.3 $\pm$ 16.2
97-9- G4	sc	10	14.5 $\pm$ 5.3	17.4 $\pm$ 8.7
97-9- G4	icv	0.005	14.0 $\pm$ 1.9	54.6 $\pm$ 10.6 ³⁾
97-9- G4	icv	0.0025	14.9 $\pm$ 5.6	32.8 $\pm$ 17.2 ¹⁾

注:与给药前比较¹⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.001$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.001$ compared with before injection

表 3 不同药物对 97-9- G4 镇痛作用的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Influence of compounds on the analgesic effect of 97-9- G4($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Dose (mg/kg)	Injection route	Compounds action duration (h)	Writhing number (within 15 min)
NS	-	sc	0.5	32.6 $\pm$ 6.0
97-9- G4	10	sc	0.5	15.6 $\pm$ 8.1 ²⁾
Nal	1.6	sc	0.6	32.1 $\pm$ 5.6
Res	1	ip	24	30.6 $\pm$ 5.6
Atr	5	sc	1	27.3 $\pm$ 5.1
CaCl_2	222	sc	1	32.2 $\pm$ 4.9
EDTA	223	sc	1	30.0 $\pm$ 6.8
Nal + 97-9- G4	1.6 + 10	sc + sc	0.6 + 0.5	33.8 $\pm$ 6.6 ⁴⁾
Res + 97-9- G4	1 + 10	ip + sc	24 + 0.5	14.3 $\pm$ 10.2 ²⁾
Atr + 97-9- G4	5 + 10	sc + sc	1 + 0.5	13.3 $\pm$ 8.8 ²⁾
CaCl_2 + 97-9- G4	222 + 10	sc + sc	1 + 0.5	19.0 $\pm$ 8.3 ^{1,3)}
EDTA + 97-9- G4	223 + 10	sc + sc	1 + 0.5	11.3 $\pm$ 7.8 ^{2,3)}

注:与生理盐水对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与单独给 97-9- G4 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ compared with NS group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ compared with 97-9- G4 group

2.4 对小鼠腹腔渗出液 PGE_2 含量的影响

ip 0.7%冰醋酸可使小鼠腹腔液中的 PGE_2 含量显著升高,与 NS 对照组相比较有显著性差异($P < 0.01$);sc 20 mg/kg 的 97-9- G4,对冰醋酸引起的 PGE_2 含量的升高虽有抑制趋势,但与模型组相比较没有显著性差异,因此该剂量的 97-9- G4 主要不是通过抑制体内 PGE_2 的合成来发挥镇痛作用。

表 4 97-9- G4 对小鼠腹腔渗出液 PGE₂ 含量的影响作用($\bar{x} \pm s$)

Tab 4 Effect of 97-9- G4 on abdominal cavity exudates PGE₂ value in mice($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Dose (mg/ kg)	A
Control (NS)	15	-	0.12 ± 0.03
Moldel (Ac)	15	-	0.35 ± 0.05 ¹⁾
ASP	12	100	0.29 ± 0.05 ²⁾
97-9- G4	13	20	0.32 ± 0.07 ¹⁾

注:与生理盐水对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与醋酸模型组比较²⁾ $P < 0.01$
Note: ¹⁾ $P < 0.01$ compared with NS group; ²⁾ $P < 0.01$ compared with Moldel (Ac) group

3 讨论

由实验结果可知,97-9- G4 具有很好的镇痛活性,且呈良好的剂量依赖性。通过小鼠侧脑室给药证明,当脑室给药剂量仅为皮下给药剂量的 1/4000 时,就有明显的镇痛活性,说明该药的作用部位很有可能是在中枢;阿片受体拮抗剂纳洛酮可以拮抗其镇痛活性,推断该药最终主要是通过阿片受体结合产生镇痛作用的。

此外,作为痛觉感受器的感觉神经末梢存在着多种痛介质的受体或作用位点,而这些受体或作用位点偶联着 Ca²⁺ 通道,当痛介质兴奋其相应受体或位点时,Ca²⁺ 通道开放,Ca²⁺ 流入细胞内,当细胞内 Ca²⁺ 浓度增高时,兴奋了痛感受器,产生痛感受器电位,形成痛冲动传入中枢产生痛觉^[7]。在以上实验中注射 97-9- G4 前 30 min 分别 cs CaCl₂或 EDTA,可减弱或加强 97-9- G4 的镇痛作用,说明 97-9- G4 的镇痛作

用与 Ca²⁺ 有一定关系,推测 97-9- G4 能抑制 Ca²⁺ 内流,减少细胞内 Ca²⁺ 浓度的升高,使痛感受器不易兴奋从而产生镇痛作用,这可能也是 97-9- G4 的镇痛机制之一。

97-9- G4 具有良好的镇痛活性,我们希望通过对其镇痛机制的探讨以及下一步成瘾性方面的试验,进一步评估该类化合物在临床上用于镇痛的可能性,开发该类化合物的应用价值。

参考文献

[1] Cignarella Via. V. 3,8- Diazabicyclo[3,2,1] octan derivatives having analgesic activity. WO 95/ 23152 CA 1996, 124:55984h.
[2] 李润涛,崔家玲,程铁明,等.二酰基双哌嗪双季铵盐类衍生物的合成及镇痛活性[J].药学学报,1999,34(9) :666 .
[3] Gyires K, Torma Z. The use of the writhing test on mice for screening different types of analgesics[J]. Arch Int Pharmacodyn, 1984, 267(1) : 131 .
[4] 陈志武,马传庚,宋必卫. 维生素 E 镇痛作用及机制的研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(5) :285 .
[5] 陈志武,戴俐明,马传庚,等.钙离子对颅通定镇痛作用的影响[J].中国药理学通报,1994,10(2) :147 .
[6] 王瑜,赵维中,陈志武,等.酮洛芬镇痛作用与前列腺素、一氧化氮、氧自由基的关系[J].安徽医科大学学报,1998,33(4) :257 .
[7] Delpoz E, Caro G, Baeyens J W. Analgesic effects of several calcium channel blockers in mice[J]. Eur J Pharmacol,1987,137: 155 .