

青风藤及青藤碱对吗啡依赖小鼠位置偏爱效应及 cAMP 水平的影响

莫志贤¹, 梁荣能², 王彩云¹ (1. 第一军医大学中医系, 广东 广州 510515; 2. 香港浸会大学中医药学院, 香港九龙塘)

摘要:目的 观察中药青风藤及其有效成分青藤碱对吗啡诱导的小鼠位置偏爱效应的影响及其与中枢 cAMP 水平的关系。方法 连续给予吗啡 (9 mg/kg, 1 次/d, sc) 5 d, 引起小鼠产生显著的条件性位置偏爱效应。用两种方式给予青风藤醇提液 (5, 10 g/kg, ig) 和青藤碱 (60 mg/kg, ig), 即在训练阶段每天 sc 吗啡前 45 min 给予和在 d 6 测定位置偏爱前 45 min 仅给药一次。大脑皮层 cAMP 含量采用放射免疫法测定。结果 吗啡对照组小鼠在伴药箱中停留的时间明显延长, 小鼠脑组织的 cAMP 水平亦显著升高。青风藤或青藤碱连续用药可显著抑制吗啡引起的小鼠位置偏爱的形成, 对小鼠已形成的条件性位置偏爱效应也具有一定的抑制作用。并能降低脑内 cAMP 含量。结论 青风藤及青藤碱能消除吗啡产生的条件性位置偏爱, 其作用机制与降低中枢 cAMP 水平有关。

关键词: 青风藤; 青藤碱; 吗啡; 条件性位置偏爱; cAMP; 精神依赖

中图分类号: R285.5; R749.611 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2004)02-0087-04

Effects of Caulis Sinomenii and sinomenine on morphine-induced place preference and cyclic AMP level in mice

MO Zhi-xian¹, LIANG Rong-neng², WANG Cai-yun¹ (1. Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. School of Chinese Medicine, Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of Caulis Sinomenii and sinomenine on the conditioned place preference induced by morphine in mice and its relation to cAMP level of the brain. **METHOD** Morphine was injected (9 mg/kg, one time/day, sc) to mice for 5 days. The strong place preference was observed in mice. Mice were pretreated 45 min before each injection of morphine during 5 d training phase and treated only once 45 min before the testing phase at d 6 with Caulis Sinomenii (5, 10 g/kg, ig) and sinomenine (60 mg/kg, ig), respectively. Cyclic AMP content in the brain cortex of mice was measured by RIA. **RESULTS** The time of staying in morphine-paired compartment and the cAMP level in brain of mice in morphine group were significantly increased. After treatment with Caulis Sinomenii and sinomenine, the time of staying in morphine-paired compartment and the cAMP level in mice were significantly reduced. **CONCLUSION** Caulis Sinomenii and sinomenine could suppress the acquisition and expression of place preference induced by morphine. Their mechanism may be related to decrease of cAMP level in the brain.

KEY WORDS: Caulis Sinomenii; sinomenine; morphine; conditioned place preference; cyclic AMP; psychic dependence

药物依赖包括生理性依赖和精神性依赖两个方面, 后者是导致复吸的主要因素。目前临床使用的戒毒药物, 主要针

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271610)

作者简介: 莫志贤 (1958-), 女 (汉族), 广西平南县人, 博士, 副教授, 硕士生导师。E-mail: cherrymo@fimmu.edu.cn

对性治疗生理性依赖,帮助成瘾者解除急性戒断症状。而用于治疗精神依赖的药物甚少,且疗效不佳。从中药中寻找防治毒品精神依赖的有效方剂或有效成分,是当前中药戒毒领域的迫切任务。我们在多年中药戒毒的临床和实验研究中发现,中药青风藤及其生物碱类活性成分对阿片类依赖的戒断症状及焦虑状态具有较好的疗效^[1,2]。本实验通过小鼠条件性位置偏爱试验,观察青风藤及青藤碱(sinomenine)对吗啡精神依赖的影响,并通过脑内cAMP水平检测,探讨药物的作用机制。为药物治疗毒品的精神依赖提供药理学依据,并为新型抗复吸中药的筛选和戒毒机制的探讨提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:昆明种小鼠,♂,体重(20.6±3.5)g,由第一军医大学实验动物中心提供,合格证号:粤检证字第2001A058号。

1.1.2 药物:青风藤,广东省药材公司提供,经本校中药鉴定室鉴定为防己科植物青藤[*Sinomenium acutum* (Thunb) Rehder et Wils]的干燥藤茎。青风藤醇提液的制备方法是:取500g青风藤用80%乙醇回流提取2h,共提取2次。合并两次药液。回收乙醇后过滤,浓缩至1g(生药)/mL,置4℃冰箱备用。使用时用蒸馏水配成所需浓度。盐酸青藤碱,广州白云山制药总厂提供,批号:000822,用蒸馏水溶解后配制成所需浓度。盐酸吗啡(粉剂),解放军总后勤部药品供应站提供,用蒸馏水配制成所需浓度。³HcAMP放射免疫测定试剂盒,北京中国原子能科学研究院提供。

1.1.3 器材:条件性位置偏爱箱仿文献制作^[3],箱体由黑白两个的正方体(15cm×15cm×15cm)组成,中间有一可活动的隔板,将隔板抽起后,小鼠可在两个箱体之间自由活动。LS6500闪烁计数仪,美国Beckman公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物预处理:将位置偏爱箱箱体的隔板抽出,把小鼠逐只放入箱体中间,观察15min,以小鼠的头部为准记录小鼠在各箱体停留时间。观察过程在隔音条件下进行。剔除对箱体某一侧有显著偏爱的小鼠,以排除非条件性位置偏爱对实验结果的影响。结果显示,几乎所有小鼠偏爱黑箱。由此,将白箱作为非偏爱侧。

1.2.2 吗啡诱导的位置偏爱效应的训练及测定:将达到实验条件的小鼠随机分为正常对照组、吗啡对照组(9mg/kg)、青风藤醇提液5g(生药)/kg加吗啡(9mg/kg)组、青风藤醇提

液10g(生药)/kg加吗啡(9mg/kg)组和盐酸青藤碱60mg/kg加吗啡(9mg/kg)组,每组10只动物。除盐水对照组两次均sc生理盐水外,其余各组小鼠每天分别sc盐酸吗啡和生理盐水各一次,两次给药间隔8h(8:00,16:00)。小鼠注射盐酸吗啡后置于非偏爱侧白色箱体,注射生理盐水后置于偏爱侧黑色箱体。小鼠在箱内逗留时间为40min。共训练5d,小鼠即形成条件性位置偏爱。在最后一次注射吗啡24h后进行位置偏爱检测。将偏爱箱隔板抽出,把小鼠逐只放入箱体中间,观察15min,以小鼠的头部为准记录小鼠在各箱体的停留时间。

1.2.3 受试药物的给予:分如下两种方法给药:(A)为观察药物对吗啡引起的位置偏爱效应形成的影响,给药组小鼠在每次注射吗啡前45min分别ig青风藤醇提液和盐酸青藤碱,正常对照组及吗啡对照组ig相同容积的生理盐水。连续给药5d。(B)为观察药物对已形成的小鼠位置偏爱的影响,在吗啡诱导位置偏爱的5d内均不给药,仅在d6测试前45min给药一次(ig)。

1.2.4 小鼠大脑皮层cAMP的提取及含量测定:在进行位置偏爱时间测定完成后,将小鼠断头处死,迅速取出脑组织,称取同一部位大脑皮层,加入预冷的6%三氯醋酸,冰浴中匀浆,于4℃3000r/min离心15min。上清用5倍体积的水饱和和乙醚洗提4次,水相在70~75℃水浴上蒸干后放入冰箱备用。采用竞争性蛋白结合分析法测定脑组织样本中的cAMP含量。实验方法按试剂盒说明书方法进行。

1.2.5 统计学处理:实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,应用SPSS 10.0统计软件进行单因素设计的方差分析。

2 结果

2.1 青风藤及青藤碱对吗啡引起的位置偏爱形成及大脑cAMP水平的影响

吗啡对照组与盐水对照组比较,小鼠在白色箱体中停留时间显著延长($P < 0.01$),显示小鼠产生了明显的位置偏爱。同时,小鼠大脑皮层cAMP水平也较盐水对照组明显升高。青风藤醇提液5,10g/kg+吗啡的两个剂量组小鼠在伴药箱中滞留时间与给药前相比,无显著性差异($P > 0.05$);与吗啡对照组比较,则明显缩短($P < 0.01$)。青藤碱60mg/kg+吗啡组与吗啡对照组相比,差异非常显著($P < 0.01$)。青风藤醇提液10g/kg+吗啡组和青藤碱60mg/kg+吗啡组小鼠大脑皮层cAMP含量明显下降,与吗啡对照组比有明显差异,见表1。

表1 青风藤及青藤碱对小鼠位置偏爱形成和大脑皮层cAMP含量的影响($n=10$)

组别	小鼠在伴药箱(白箱)侧的逗留时间/s		cAMP含量 (pmol/g脑组织)
	给药前	给药后	
盐水对照组	303.5±83.2	308.8±89.9	0.736±0.195
吗啡对照组	312.4±83.3	460.3±35.3 ²⁾	1.572±0.441 ²⁾
青风藤5g/kg+吗啡	316.9±100.7	359.7±72.9 ⁴⁾	1.236±0.388 ²⁾
青风藤10g/kg+吗啡	305.6±80.1	323.6±139.7 ⁴⁾	1.046±0.317 ^{1,4)}
青藤碱60mg/kg+吗啡	294.5±77.4	344.0±94.9 ⁴⁾	1.119±0.363 ^{2,3)}

注:与盐水对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$,与吗啡对照组比较:³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs saline control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, vs morphine control group

2.2 青风藤及青藤碱对吗啡引起的位置偏爱效应表达的影响

在吗啡诱导小鼠位置偏爱形成后用药的结果表明,青风藤醇提液 10g/kg 组小鼠在伴药箱中滞留时间与吗啡对照组比较,明显缩短($P < 0.01$)。青风藤醇提液 5mg/kg 组及青藤碱 60mg/kg 组与吗啡对照组相比,无显著差别($P > 0.05$)。

表 2 青风藤及青藤碱对小鼠位置偏爱效应表达和大脑皮层 cAMP 含量的的影响($n = 10$)

组 别	小鼠在伴药箱(白箱) 侧的逗留时间/ s		cAMP 含量 (pmol / g 脑组织)
	给药前	给药后	
盐水对照组	303 .5 ± 83 .2	308 .8 ± 89 .9	0 .736 ± 0 .195
吗啡对照组	312 .4 ± 83 .3	460 .3 ± 35 .3 ²⁾	1 .572 ± 0 .441 ²⁾
青风藤 5g/kg + 吗啡	324 .5 ± 93 .4	385 .3 ± 97 .9	1 .395 ± 0 .347 ²⁾
青风藤 10g/kg + 吗啡	319 .6 ± 101 .0	343 .4 ± 86 .2 ⁴⁾	1 .161 ± 0 .404 ^{2,3)}
青藤碱 60mg/kg + 吗啡	330 .1 ± 86 .2	391 .5 ± 90 .3	1 .425 ± 0 .376 ²⁾

注:与盐水对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$,与吗啡对照组比较:³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs saline control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, vs morphine control group

3 讨论

条件性位置偏爱试验是 20 世纪 80 年代发展起来的一项检测药物奖赏特性的行为药理学方法,作为评价药物精神依赖性潜力的简单有效方法而被广泛采用^[4]。本实验记录吗啡诱导的位置偏爱小鼠在伴药箱的停留时间可较好地反应小鼠的精神依赖情况。结果表明,青风藤及其有效成分青藤碱均能明显抑制吗啡诱导的条件性位置偏爱的形成,对已形成的位置偏爱在高剂量时亦有一定程度的拮抗作用。

中药青风藤的主要成分是青藤碱。我们的结果表明,青藤碱对小鼠条件性位置偏爱的影响与青风藤相似,均表现明显的抑制吗啡诱导位置偏爱效应的作用。青藤碱可能是青风藤防治阿片类依赖的天然有效成分。青藤碱的化学名为 7,8- didehydro- 4- hydroxy- 3, 7- dimethoxy- 1-7- methyl- (9a, 13a, 14a) - morphinan- 6- one。从化学结构上看,青藤碱由氢菲核和乙胺桥组成,母核为吗啡烷,结构类似吗啡,但本身并无成瘾性^[5]。我们以前的研究已发现,青风藤及青藤碱能够抑制豚鼠回肠的戒断性收缩,并对吗啡依赖大、小鼠的戒断症状有抑制作用^[2,6,7]。从本实验结果看,青风藤醇提取液的作用较青藤碱明显,表明青风藤中可能还有其它成分在起作用或协同作用,但青风藤中其它有效成分的作用尚有待进一步分析。

cAMP 作为细胞第二信号的信使在阿片类依赖的形成和维持中起着重要作用^[5]。腺苷酸环化酶(AC) 和 cAMP 途径的异常增强与阿片类戒断反应和精神依赖的维持有着密切的联系^[6]。阿片类药物依赖的形成过程伴随有细胞内 AC- cAMP 信号转导过程的变化,吗啡长时间作用可使其脑内 cAMP 水平含量明显升高^[7]。因此认为 AC- cAMP 的改变可能是产生吗啡依赖的生化基础之一。本研究发现,连续给予吗啡 5d,小鼠在产生条件性位置偏爱的同时,大脑皮层的 cAMP 含量也明显升高。青风藤提取液及青藤碱连续应用或单次

三个给药组给药前后对比,亦无显著性差异($P > 0.05$)。青风藤醇提液 10g/kg + 吗啡组小鼠大脑皮层 cAMP 含量明显下降,与吗啡对照组比有明显差异。其它两个给药组脑组织中 cAMP 含量有所降低,但与吗啡对照组比,差异不显著($P > 0.05$),见表 2。

Table 2 Effect of Caulis Sinomenii and sinomenine on expression of place preference and cAMP lever of the brain in mice($n = 10$)

组 别	小鼠在伴药箱(白箱) 侧的逗留时间/ s		cAMP 含量 (pmol / g 脑组织)
	给药前	给药后	
盐水对照组	303 .5 ± 83 .2	308 .8 ± 89 .9	0 .736 ± 0 .195
吗啡对照组	312 .4 ± 83 .3	460 .3 ± 35 .3 ²⁾	1 .572 ± 0 .441 ²⁾
青风藤 5g/kg + 吗啡	324 .5 ± 93 .4	385 .3 ± 97 .9	1 .395 ± 0 .347 ²⁾
青风藤 10g/kg + 吗啡	319 .6 ± 101 .0	343 .4 ± 86 .2 ⁴⁾	1 .161 ± 0 .404 ^{2,3)}
青藤碱 60mg/kg + 吗啡	330 .1 ± 86 .2	391 .5 ± 90 .3	1 .425 ± 0 .376 ²⁾

注:与盐水对照组比较:¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$,与吗啡对照组比较:³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, vs saline control group; ³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, vs morphine control group

用药均可使小鼠脑内 cAMP 含量明显下降。青风藤及青藤碱抑制小鼠对吗啡诱导的条件性位置偏爱的行为与皮层组织 cAMP 水平变化基本一致,提示对脑内 cAMP 的抑制可能是青风藤及青藤碱消除吗啡的条件性位置偏爱的机制之一。

本次实验结果表明青风藤及其有效成分对吗啡所致的精神依赖具有拮抗作用,为青风藤及青藤碱用于干预阿片类药物依赖的觅药行为提供了研究线索,也为该药的临床应用提供理论依据。但药物的作用机制仍有待深入研究。

参考文献

[1] 莫志贤, 张国梅, 王彩云, 等. 复方青风藤治疗海洛因依赖的临床疗效观察[J]. 华南药讯, 2002, 32(1) : 46 .
[2] 莫志贤, 张国梅, 王彩云. 青风藤及有效成分防治吗啡戒断反应的实验研究[J]. 华南药讯, 2002, 32(1) : 20 .
[3] Carr GD, Fibiger HC, Phillips AG. Conditioned place preference as a measure of drug reward[M]. In : Lieberman JM, Cooper SJ. The neuropharmacological basis of reward. New York : Oxford University Press, 1989 : 264-319 .
[4] 陶青, 郑继旺. 条件性位置偏爱实验[J]. 中国药物依赖性通报, 1996, 5(2) : 68 .
[5] 傅绍喧, 张士善. 青藤碱的药理作用[J]. 药学通报, 1979, 14(15) : 199 .
[6] 王彩云, 莫志贤, 朱秋双, 等. 青藤碱对吗啡依赖大鼠吗啡戒断症状及单胺类神经递质的影响[J]. 中药材, 2002, 25(5) : 337 .
[7] 王彩云, 莫志贤, 梁荣能. 青藤碱对吗啡依赖小鼠催促戒断症状的影响[J]. 解放军药学报, 2002, 18(3) : 13 .
[8] Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity[J]. Neuron, 1993, 11(6) : 995 .
[9] Widnell KL, Self DW, Lane SB, et al. Regulation of CREB expression: In vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1996, 276(1) : 306 .
[10] 方芳, 汪青, 曹清, 等. 吗啡依赖小鼠脑组织 cAMP 系统的变化

及腺苷酸环化酶磷酸化调节[J]. 中国医学科学院学报, 2000,
22(1):14.

收稿日期:2003-04-25