

## 氯胺酮的镇痛作用及其对大鼠大脑皮层 NO/NOS 的影响\*

### The Analgesic Effect of Ketamine and its Effect on Nitric Oxide and Nitricoxide Synthase in Cerebral Cortex of Rat

温 燕,莫 宁

WEN Yan,MO Ning

(广西医科大学药理学教研室,广西南宁 530021)

(Department of Pharmacology,Guangxi Medical University,Nanning,Guangxi,530021,China)

**摘要:**为了观察大鼠切口疼痛模型中皮下注射氯胺酮对大鼠的镇痛作用,及其对大脑皮层一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS)的影响。采用体重(250±20)g 雄性SD大鼠80只,其中行为学评分分生理盐水组,氯胺酮组(5mg/kg组,10mg/kg组,20mg/kg组)和吗啡组共5组,每组8只;NO和NOS测定分正常对照组、生理盐水组、氯胺酮组(10mg/kg组,20mg/kg组)和吗啡组共5组,每组8只。按Brennan法制成切口疼痛模型,以累积疼痛评分和冷刺激评分确定疼痛行为。给药后30min取大脑皮层,测定NO含量、NOS(总NOS和iNOS)活性。结果表明,氯胺酮组(10mg/kg组,20mg/kg组)、吗啡组累积疼痛评分和冷刺激评分均低于生理盐水组( $P < 0.05$ );氯胺酮组(10mg/kg组,20mg/kg组)、吗啡组NO含量及NOS活性均低于生理盐水组( $P < 0.05$ )。说明在大鼠切口疼痛模型中,皮下注射不同剂量氯胺酮能产生镇痛作用,NO和NOS可能在氯胺酮的中枢神经系统的镇痛作用中发挥了重要作用。

**关键词:**氯胺酮 镇痛 大脑皮层 一氧化氮 一氧化氮合酶

**中图分类号:**R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2006)04-0330-04

**Abstract:**In order to observe the analgesic effect of hypodermic injection of Ketamine in a rat model of incisional pain and the effect on Nitric Oxide(NO) and Nitricoxide synthase(NOS) in the cerebral cortex, eighty male SD rats weighing of (250±20)g were used in our experiment. These animals were equally divided into 10 groups. Among them, 5 groups were used in ethology investigation of Saline, Ketamine(5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg), Morphia; another 5 groups were used in NO/NOS measurements of normal control, Saline, Ketamine(10mg/kg, 20mg/kg) and Morphia. According to the Brennan's method to build an incision pain model, cumulative pain score and cold stimulation score were utilized to assess pain behavior. The cerebral cortex was removed at 30min after administration to measure NO production and NOS(total NOS and iNOS) activity. Results indicated that the cumulative pain score and cold stimulation score were lower in Ketamine groups(10mg/kg group and 20mg/kg group)and Morphia group than Saline group( $P < 0.05$ ); and the NO production and the NOS activity in Ketamine groups(10mg/kg and 20mg/kg groups) and Morphia group were lower than Saline group( $P < 0.05$ ). It produces that the analgesic effect could be produced by hypodermic injection of different dosage Ketamine in a rat model of incisional pain. No and NOS may play an important role in the analgesic effect of the central nervous system.

**Key words:** Ketamine, analgesic, cerebral cortex, Nitric oxide, Nitric oxide synthase

收稿日期:2006-05-25

修回日期:2006-10-27

作者简介:温 燕(1979-),女,广西北流人,硕士研究生,主要从事药理学研究。

\* 广西自然科学基金项目(自 0447045)资助。

一氧化氮(NO)是一种由血管内皮细胞释放的内皮舒张因子(EDRF),也广泛产生于脑内<sup>[1]</sup>。近年发现,NO作为一种非经典的新型递质和信息传递分子,尤其是与其合成相关的一氧化氮合酶(NOS),在

痛觉调节中发挥了重要作用,引起了学者们的广泛关注<sup>[2,3]</sup>。而氯胺酮除了作为麻醉剂外,近年来也发现了它的其他用途,特别是作为镇痛剂在临床上开始使用<sup>[4~6]</sup>。但其镇痛作用机制尚未有确切统一的说法。本文的目的在于研究氯胺酮对大鼠大脑皮层 NO 生成量和 NOS 活性的影响,以探讨 NO、NOS 在氯胺酮镇痛作用的分子学机理中的可能相关作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品、试剂和仪器

盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司生产,批号:041107),盐酸吗啡注射液(沈阳第一制药厂生产,批号:050307),乙醚(广东光华化学厂生产),NO 试剂盒和 NOS 试剂盒(南京建成生物工程研究所生产),紫外/可见分光光度计(日本岛津 LN-1700),酶标仪(美国,型号 450)。

### 1.2 动物和分组

#### 1.2.1 行为学评分分组

成年雄性 SD 大鼠(250±20)g 40 只(广西医科大学实验动物中心提供)。生理盐水组,氯胺酮组,吗啡组(10mg/kg),其中氯胺酮组又分为 5mg/kg 组,10mg/kg 组,20mg/kg 组。每组 8 只。

#### 1.2.2 NO 和 NOS 试剂盒测定分组

成年雄性 SD 大鼠(250±20)g 40 只。正常对照组,生理盐水组,氯胺酮组,吗啡组(10mg/kg),其中氯胺酮组又分为 10mg/kg 组,20mg/kg 组。每组 8 只。

### 1.3 切口疼痛模型

根据 Brennan 等<sup>[7]</sup>所用方法在大鼠足趾部制作切口疼痛模型。将大鼠吸入乙醚麻醉,右后肢消毒,从足跟近端 0.5cm 处向趾部作一长约 1cm 的纵形切口,依次切开皮肤和筋膜,用小弯镊挑起足底肌肉并纵向切割,但保持肌肉起止和附着的完整性,按压止血后缝合皮肤,并切口消毒。整个手术 5min 内完成。

### 1.4 行为学观察

待大鼠苏醒直至翻正反射消失,采用累积疼痛评分法和冷刺激评分法观察大鼠的疼痛行为学变化。

#### 1.4.1 累积疼痛评分法<sup>[7]</sup>

观察给药前、后 1h 内的疼痛行为学变化。评分标准:后爪翘起不着地,有舔足,记为 2 分;后爪着地但不持重,记为 1 分;后爪着地且持重,记为 0 分。每 5min 观察一次,共 12 次,以 5min 内常出现的行为记分,总分 24 分。

#### 1.4.2 冷刺激评分法<sup>[8]</sup>

观察给药后 5min 内疼痛行为学变化。在一透明

可见的容器内盛 5~7cm 厚的颗粒碎冰块(温度 0~4℃),将大鼠置于冰上,观察其 5min 内手术侧抬足的次数。

### 1.5 取材和样本制备

术后 12h 选取累积疼痛评分 14~16 分、冷刺激 >26 次的大鼠分组并给药。给药后 30min 将动物迅速脱臼处死,在冰盒上快速取大鼠的大脑皮层,迅速转移至-80℃低温冰箱。大脑皮层称重并置于生理盐水中,匀浆管置于冰盒中匀浆,2500 转/min 离心 10min 制备成 10%的组织匀浆液。

### 1.6 NO 和 NOS 的测定

酶标法<sup>[9]</sup>测定 NO 的含量,分光光度计法<sup>[9]</sup>测定 NOS 活性,考马斯亮兰法<sup>[9]</sup>测定组织蛋白质浓度。

### 1.7 统计学处理

所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计学处理采用 SPSS13.0 统计分析软件,各组组间差异采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),继以 LSD 和 Games-Howell 检验,进行数据处理,以  $P < 0.05$ ,作为显著性差异的标准。

## 2 结果与分析

### 2.1 行为学变化

如表 1 所示,累积疼痛评分:与生理盐水组比较,氯胺酮各组 and 吗啡组评分均明显降低。冷刺激评分:与生理盐水组比较,氯胺酮 10mg/kg 组,20mg/kg 组和吗啡组评分均明显降低。(见表 1)

表 1 疼痛大鼠的行为学评分( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 1 Action score of painful rat( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别 Group	累积疼痛评分 Cumulative pain score (差值 equation)	冷刺激评分 Cold stimulation score
生理盐水组 Saline group	1.3 ± 0.7	24.7 ± 4.7
氯胺酮 5mg/kg 组 Ketamine 5mg/kg group	4.0 ± 1.3*	21.5 ± 2.8
氯胺酮 10mg/kg 组 Ketamine 10mg/kg group	9.5 ± 0.9* <sup>Δ</sup>	15.2 ± 3.5* <sup>Δ</sup>
氯胺酮 20mg/kg 组 Ketamine 20mg/kg group	9.1 ± 0.8* <sup>Δ</sup>	13.1 ± 3.2* <sup>Δ</sup>
吗啡组 Morphia group	8.5 ± 0.9* <sup>Δ</sup>	13.0 ± 2.5* <sup>Δ</sup>

与生理盐水组比较, \* :  $P < 0.05$ ; 与氯胺酮 5 mg/kg 组比较,  $\Delta$ :  $P < 0.05$ 。

Compare with the Saline group, \* :  $P < 0.05$ ; Compare with Ketamine 5 mg/kg group,  $\Delta$ :  $P < 0.05$ .

### 2.2 皮下注射氯胺酮和吗啡对 NO 含量和 NOS 活性的影响

如表 2 所示,生理盐水组的 NO 含量,总 NOS 及 iNOS (诱生 NOS) 活性均高于正常组,而氯胺酮 10mg/kg, 20mg/kg 和吗啡组均低于正常组,说明氯

氯胺酮和吗啡能降低大脑皮层 NO 的含量和 NOS 的活性。

表 2 氯胺酮对大鼠大脑皮层 NO 含量和 NOS 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 The effect of ketamine on the NO production and the NOS activity in the cerebral cortex of Rat ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别 Group n = 8	NO 含量 No production ( $\mu\text{mol/gprot}$ )	总 NOS 活性 Total NOS activity (U/mgprot)	iNOS 活性 iNOS activity (U/mgprot)
正常对照组 Normal control group	5.1 $\pm$ 3.8*	7.5 $\pm$ 4.4*	—
生理盐水组 Saline group	16.5 $\pm$ 6.5 $\Delta$	17.0 $\pm$ 7.8 $\Delta$	5.8 $\pm$ 4.5
氯胺酮 10mg/kg 组 Ketamine 10mg/kg group	4.9 $\pm$ 3.5*	7.0 $\pm$ 2.5*	1.4 $\pm$ 1.9*
氯胺酮 20mg/kg 组 Ketamine 20mg/kg group	7.0 $\pm$ 5.9*	7.9 $\pm$ 3.7*	1.4 $\pm$ 2.0*
吗啡组 Morphia group	9.5 $\pm$ 4.1*	7.5 $\pm$ 2.9*	1.3 $\pm$ 2.1*

与生理盐水组比较, \* :  $P < 0.05$ ; 与正常对照组比较,  $\Delta$ :  $P < 0.05$ 。

Compare with the Saline group, \* :  $P < 0.05$ ; Compare with the normal control group,  $\Delta$ :  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

本次实验结果表明,皮下注射不同剂量的氯胺酮可以降低大鼠大脑皮层的 NO 生成量,抑制 NOS 的活性,并产生了镇痛作用。提示大脑皮层的 NO 和 NOS 可能参与了氯胺酮的中枢神经系统的镇痛作用,三者之间可能存在着一定的联系。

NO 作为一种信使物质,在中枢伤害性感受的传递<sup>[10]</sup>和维持清醒状态<sup>[11]</sup>中起着重要作用。在 NOS 的催化下,精氨酸(L-arg)与还原型辅酶 II (NADPH)、O<sub>2</sub> 生成 NO 和 NADP+ NADPH。生成的 NO 通过细胞膜,并与可溶性的鸟苷酸环化酶(GCS)结合,使之激活,致使细胞内 cGMP(环鸟苷酸)浓度升高,从而激活蛋白激酶,导致痛觉过敏。NOS 广泛分布于中枢神经系统,其中以大脑皮层、梨状区和斜角带、尾壳核等部位最为丰富<sup>[12]</sup>,与 N-甲基-D-门冬氨酸(N-methyl-D-aspara, NMDA)受体相伴行,提示这两者的功能可能存在密切联系。有研究也表明,兴奋 NMDA 受体可使细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加,从而激活 NOS,增加了 NO 的释放<sup>[13]</sup>。根据 Luo D 等<sup>[14]</sup>在鼠的研究中也发现,给予 NMDA 后,能导致 NO 的释放。

伤害性刺激(如本实验中的切口疼痛)可引起脑内 Glu(谷氨酸)释放,激活 NMDA 受体,引起大量 Ca<sup>2+</sup> 内流入神经元。致使细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度升高,从而激活 NOS,导致 NO 生成增多<sup>[13]</sup>。本实验采用大鼠后趾部切口疼痛模型,使实验大鼠所表现的自发性疼痛行为形成伤害性刺激,导致大脑皮层 NO 生成增多。

而氯胺酮作为一种非竞争性 NMDA 受体拮抗剂,可以通过阻断 NMDA 受体而发挥作用。咸云淑等<sup>[15]</sup>在大鼠硬膜外用氯胺酮对辣椒素致敏大鼠疼痛的超前镇痛作用研究中证实,氯胺酮通过与开放的 NMDA 受体复合物通道结合后而降低通道的平均开放时间和通过变构效应减少通道开放的频率两方面机制阻断 NMDA 受体通道,阻止 Ca<sup>2+</sup> 内流,降低 NOS 活性从而阻止 NO 的生成,消除中枢敏化而发挥镇痛作用。另外,文献<sup>[16]</sup>在对大鼠交感神经节的研究中也发现,氯胺酮能降低交感神经节中 NO 的含量以及 NOS 的活性。也有离体研究认为氯胺酮可以抑制大鼠脑组织 NOS 的活性<sup>[17]</sup>,减少脑组织 NO 的生成。本实验发现,10mg/kg 以上剂量的氯胺酮具有明显稳定的镇痛作用,并降低 NO 含量和 NOS 活性,这提示了氯胺酮在中枢神经系统的镇痛作用中可能是通过 NO 和 NOS 发挥作用的。然而,氯胺酮究竟是通过阻断大脑皮层的 NMDA 受体而抑制 NOS 活性,还是直接抑制其 NOS 活性来发挥镇痛作用,仍有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] 姚泰,乔健天,樊小力,等. 生理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:315.
- [2] HALEY JE. Gases as neurotransmitters[J]. Essays Biochem, 1998, 33: 79-91.
- [3] 金志刚,么冬爱,袁华. 一氧化氮与疼痛研究新进展[J]. 现代康复, 2001, 5(9): 89.
- [4] 张宗旺,朱桂枝,张励才,等. 氯胺酮镇痛机制的研究进展[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 2000, 21(3): 135-137.
- [5] 扈家强,王大柱. 氯胺酮的超前镇痛作用[J]. 天津医药, 2004, 32(12): 782-784.
- [6] 刘国凯,黄宇光,罗爱伦. 小剂量氯胺酮用于术后镇痛的研究及其临床价值[J]. 中华麻醉学杂志, 2003, 23(3): 238-240.
- [7] BRENNAN T J, VANDERMEULEN E P, GEBHART G F. Characterization of a rat model of incisional pain [J]. Pain, 1996, 64(3): 493-501.
- [8] 袁维秀,张宏,徐娟,等. 鞘内注射氯胺酮对慢性神经痛大鼠脊髓背角一氧化氮合酶的影响[J]. 中国麻醉学杂志, 2004, 24(5): 377-379.
- [9] 张志龙,李彦东,张来柱,等. 氯胺酮对大鼠丘脑一氧化氮合酶活性和一氧化氮含量的影响[J]. 济宁医学院学报, 2002, 25(4): 13-14.
- [10] MELLER S T, LEWIS S J, BATES J N, et al. Is there a role for an endothelium-derived relaxing factor in nociception[J]. Brain Res, 1990, 531(1-2): 342-345.

- [11] DZOLJIC M R, DE VRIES R. Oxide synthase inhibition reduces wakerulness [J]. *Neuropharmacology*, 1994, 33 (11):1505-1509.
- [12] OKERE CO, KABA H. Increased expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the accessory olfactory bulb during the formation of olfactory recognition memory in mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12 (12): 4552-4556.
- [13] GARTHWAITE J, CHARLES S L, CHESEWILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests roles as intercellular messenger in the brain [J]. *Nature*, 1988, 336(6197):385-388.
- [14] LUO D, KANEZEVICH S, VINCENT S R. N-methyl-D-aspartate induced nitric oxide release: an invivo microdialysis study [J]. *Neuroscience*, 1993, 57(4):897-900.
- [15] 咸云淑, 徐纳新, 赵恒兰, 等. 氯胺酮对辣椒素致敏大鼠的超前镇痛作用 [J]. *吉林医学*, 2004, 25(2):29-30.
- [16] 于洪波, 莫宁, 戴体俊. 氯胺酮对大鼠交感神经节 NO 与 NOS 的抑制作用 [J]. *国际医药卫生导报*, 2006, 12 (4):4-6.
- [17] GELLEY H T, WEBSTER N R. Brain nitric oxide synthase activity is decreased by intravenous anesthetics [J]. *Anesth Analg*, 1996, 83(3):591-594.

(责任编辑: 韦廷宗)

(上接第 329 页 Continue from page 329)

- [10] RALPH A D. WILLIAMS, KELVIN E SMITH. DNA relatedness of thermus strains, description of thermus brockianus sp nov, and proposal to reestablish thermus thermophilus (Oshima and Imahori) [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45 (3): 495-499.
- [11] RALPH A D. WILLIAMS, KELVIN E SMITH. Thermus oshimai sp nov, isolated from hot springs in Portugal, Iceland, and the Azores, and comment on the concept of a limited geographical distribution of thermus species [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(2):403-408.
- [12] ANA PAULA CHUNG, FRED A RAINEY. Thermus igniterrae sp nov and Thermus antranikianii sp nov, two new species from Iceland [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 209-217.
- [13] OLAFUR FRIDJONSSON, HILDEGARD WATZLAWICK. Cloning of the gene encoding a novel thermostable  $\alpha$ -Galactosidase from thermus brockianus ITI360 [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9):3955-3963.
- [14] 吴军森, 林炜铁, 杨继国. 嗜高温酶的研究及应用 [J]. *广州食品工业科技*, 2002, 19(1):60-62.

(责任编辑: 韦廷宗 邓大玉)