DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.04.014

电针抑制 P物质引起的痛反应和脊髓 c-fos表达

阮怀珍* 李希成 黎海蒂 赵邦云 (第三军医大学基础医学部生理学教研室) 重庆, 630038
郝 勇 俞 琼 (第三军医大学 91.1队学员) 重庆, 630038

提 要 目的: 观察电针"夹脊"穴对大鼠鞘内注射 P物质 (SP, 10μg)引起的痛反应和脊髓 c-fos原癌基因蛋白表达的影响。方法: 采用免疫组织化学法和痛阈测定法。结果: 大鼠鞘内注射 SP可引起痛反应,并诱发脊髓 c-fos样免疫反应 (FLI)减少,此效应可部分被纳洛酮 (Nx)翻转。结论: 电针可能是通过内源性阿片肽抑制 SP而产生镇痛作用。

关键词 P物质;电针;原癌基因蛋白 c-fos;脊髓
中图法分类号 R971.9; Q514.3

近年的研究表明,原癌基因在中枢神经系统内的表达与痛觉调制有关,外周伤害性刺激可使脊髓背角 c-fos蛋白增加,并可被吗啡抑制[1,2]。P物质 (Substance P, SP)是伤害性初级传入末梢释放的一种兴奋性递质,在痛觉调制过程中,脊髓内 SP主要起着传递痛觉信息的作用[3~5],据报道内源性阿片肽在中枢神经系统的分布与 SP颇为一致,而电针 (Electroacupuncture, EA)可通过释放内源性阿片肽和 5羟色胺发挥镇痛作用[6,7]。但是电针对 SP引起的痛反应及其诱发的 c-fos有无影响未见报道。本研究采用测痛及对神经元功能活动进行细胞定位的 c-fos技术[2],研究 SP与电针的关系,进一步了解 SP在脊髓痛觉调制中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

实验用 Wistar大鼠 36只,体重 200~220 g,雌雄不拘。随机分成 (1)正常对照组,鞘内注射 (IT)人工脑脊液 15μl(ACSF, pH5.5,配 SP和纳洛酮所用溶液); (2) IT SP组, 10μg/10μl; (3) IT SP+高频电针组; (4) IT SP+低频电针组; (5) IT SP+IT纳洛酮 (5μg/10μl)+高频电针组; (6) IT SP+IT纳洛酮 95μg/10μl)+低频电针组,每组各 6只动物。

1.2 脊髓蛛网膜下腔插管

大鼠麻醉后,按文献 [3]方法,将外径 0.6 mm的 PE10塑料导管 (全长 10 cm)由枕骨大孔插入脊髓蛛网膜下腔 6 cm,约达脊髓腰 l节段。待动物清醒后观察确无肢体功能损害后继续饲养, 5~7 d后,在蛛网膜下腔注射药物,药物容量 10μl,并用 5μl生理盐水冲洗管道,总容量 15μl, 5 min注射完毕。

1.3 测痛和电针

采用电刺激鼠尾测痛法[8]。电针时由双侧"夹脊"穴 (腰 2~3)处进针,用 57-6D型电针仪给予刺激,时间 40 min,其频率为 100 Hz(高频)、3 Hz(低频),电压为 3 V。

1.4 免疫组化法

实验毕,按常规进行大鼠组织灌流,固定,切片 (40μm),然后进行 ABC免疫组化染色: 切片在 1∶2000的 c-fos抗血清 (Cambridge Research Biochemicals)中孵育 48 h(4℃),再依次进入生物素结合兔抗羊血清 (1∶200, Vector)及 ABC(1∶100, Vector),于室温下各孵育 3 h,继之用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺 (GOD-DAB-Ni)呈色液显色。非特异性对照和阴性对照分别采用正常兔血清和 PBS(0.01 mol/L)代替一抗,随后的步骤完全相同,结果表明对照切片上见不到免疫反应阳性细胞。

1.5 数据处理

在每一动物腰 3~4节段随机抽样四片,作阳性细胞计数,取均数作为该动物的 c-fos样免疫反应 (c-fso-likeimmunoreactivity, FLI)数。实验数据皆用电子计算机经双样本 t检验程序 (PDA-2)进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$表示。

2 结果

2.1 鞘内注射 (IT) SP对大鼠痛阈及脊髓 c-fos的影响

大鼠 IT SP(1μg/10μl)后痛阈明显下降, 10~20 min最低, 30 min后开始逐渐恢复,与 ACSF组比较 $P<0.01$,见表 1。

* 阮怀珍 女, 36岁,副教授,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　鞘内注射 SP和电针对大鼠痛阈的影响(%)

Tab 1　Effects of intrathecal injection of SP and EA on pain threshold of rats(%)

Groups	Time after stimulation (min)					
	10	20	30	40	50	60
ACSF	95.4± 4.0	102.8± 2.4	105.7± 2.9	98.2± 5.3	100.6± 4.0	102.9± 3.1
SP	35.8± 5.6**	44.5± 3.5**	54.8± 0.6**	74.2± 2.1**	82.3± 4.0*	88.6± 6.1
SP+ EA (3Hz)	74.4± 4.6++	73.3± 5.2++	78.7± 3.5++	75.6± 4.7	84.7± 4.4	83.1± 4.9
SP+ EA(100Hz)	76.5± 5.1++	75.0± 5.5++	77.5± 5.9	75.3± 4.8	82.5± 5.3	84.1± 4.4
SP+ N_X+ EA (3Hz)	49.6± 6.4▲	45.8± 5.8▲	53.2± 3.9▲	55.7± 4.8▲	61.8± 6.4▲	79.9± 7.2
SP+ N_X+ EA (100Hz)	47.5± 5.4▲	44.8± 5.6▲	56.2± 4.9▲	54.8± 4.5▲	63.8± 5.8▲	80.9± 8.2

*: $P < 0.05$;**: $P < 001$ *vs* ACSF;++: $P < 0.01$, *vs* SP;▲: $P < 0.05$, *vs* SP+ EA

为了观察引起伤害性反应的 SP是否能激活脊髓背角感觉神经元,我们进行了 c-fos免疫组化染色。SP及 ACSF组动物测痛后(注射药物 1 h)立即麻醉灌注进行 c-fos免疫组化染色。c-fos样蛋白呈黑色颗粒,位于细胞核内,细胞质不显色。故 FLI细胞是细胞核深染而胞质不着色的神经元,此类细胞呈圆形或椭圆形。大鼠脊髓分层采用 Molander的图谱[9]。为了叙述方便,将Ⅰ、Ⅱ层合为浅表层(superficial),Ⅲ、Ⅳ层为固有核(nucleus proprius),Ⅴ、Ⅵ层为背角颈部(neck),其余是腹侧部(ventral),包括Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ层及中央管区 Ⅹ层。

结果显示,ACSF组脊髓 c-fos表达很低。而大鼠 IT SP, 1 h后,双侧脊髓背角出现大量 FLI细胞,主要分布在Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅵ层,其它区较少,表 2;图 1~ 2

表 2　鞘内注射 SP和电针对大鼠脊髓 c-fos表达的影响

Tab 2　Effect of intrathecal injection of SP and EA on FLI into the spinal cord of rats

Groups	FLI
ACSF	4.9± 0.9
SP	86.8± 10.9**
SP+ EA(3Hz)	39.4± 9.6++
SP+ EA(100Hz)	42.3± 8.9++
SP+ N_X+ EA(3Hz)	69.1± 10.5▲▲
SP+ N_X+ EA(100Hz)	66.5± 11.3▲▲

**: $P < 0.01$, *vs* ACSF;++: $P < 0.01$, *vs* SP;▲▲: $P < 0.01$, *vs* SP+ EA

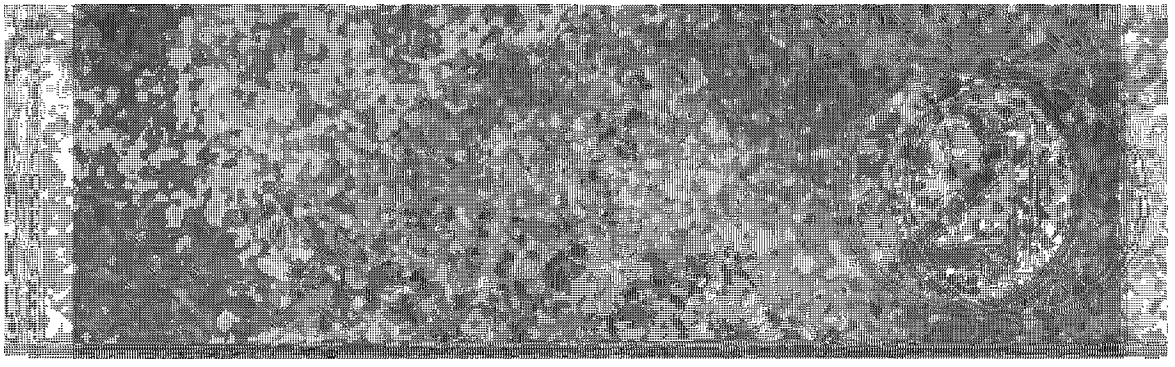


图 1　鞘内注射 ACSF后, FLI神经元在脊髓的分布极少　(× 120)

Fig 1　Very sparse FLI neurons in the rat spinal cord after IT ACSF　(× 120)

图 2　鞘内注射 SP后,脊髓Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅵ层 FLI神经元标记致密　(× 120)

Fig 2　Densely labeled FLI neurons of laminae Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅵ in the rat spinal cord after IT SP　(× 120)

2.2　电针"夹脊"穴对 SP引起伤害性反应的影响

大鼠鞘内注射 SP立即电针 40 min,高频、低频电针均可使痛阈提高, 1 h后进行免疫组化染色,可见 SP诱发的脊髓 c-fos表达明显减少,与单纯 IT SP组比较,相差显著, $P < 0.01$ 若电针前鞘内注射纳洛酮,则可部分翻转电针的抗伤害性作用,使痛阈降低,脊髓 c-fos增多(表 1~ 2;图 3~ 4)。由此说明电针可抑制 IT SP所引起的痛反应和脊髓背角 c-fos表达,此种效应可部分被纳洛酮所阻断。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

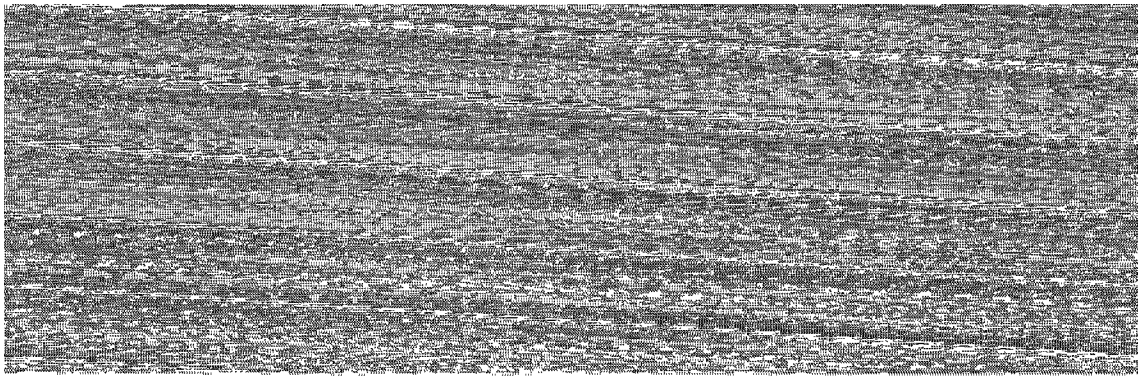


图 3 鞘内注射 SP后,再电针(100Hz),脊髓 FLI神经元减少 (× 120)

Fig 3 FLI neurons decreased in the rat spinal cord after IT SP, EA on the "Jiaji point" (× 120)

图 4 鞘内注射纳洛酮可部分翻转电针的作用 (× 120)

Fig 4 Effects of EA were reversed by naloxone (× 120)

3 讨论

近年的研究表明,伤害性传入信息抵达中枢神经系统内,在相应的感受区激活 c-fos原癌基因的表达,生成 c-fos蛋白,从而后者被作为伤害性感受神经元被激活的标志物[2]。我们的工作首次报道了 SP可增强伤害性刺激(福尔马林)诱发的脊髓 c-fos表达[3]。本实验观察到大鼠鞘内注射 SP使痛阈明显降低,同时也可引起 c-fos表达。将 SP引起的 FLI与伤害性刺激(福尔马林)引起的 FLI进行对比,发现 SP与福尔马林一样,诱发的 FLI分布于脊髓各层,但主要集中于含伤害性细胞的Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅵ层[1,3]。一些作者[10]曾在猫的脊髓背角观察到微电泳导入 SP可兴奋多数背角的伤害性感受神经元,引起缓慢、持续较久的兴奋效应。因此本文将 SP注入鞘内,可能是由于兴奋了脊髓背角伤害性感受神经元,从而诱发 c-fos表达。

电针的不同参数,可引起中枢递质量的不同改变,本文观察到,鞘内注射 SP后立即电针"夹脊"穴,无论高频还是低频,均使痛阈增高,脊髓内 FLI明显少于单纯 SP组。电针"夹脊"穴可产生镇痛作用早已有报道,主要是通过释放内源性阿片肽和 5羟色胺[6,7]。内源性阿片肽与 SP关系密切,它们的分布颇为一致,免疫组化研究证明,脊髓和三叉神经脊束核胶质区有密集的阿片肽中间神经元,它与感觉传入神经末梢形成突触联系。我们以往的实验观察到鞘内注射吗啡和 5-羟色胺均可抑制 SP引起的痛反应及 c-fos表达[11,12],因此,电针"夹脊"穴可能是通过释放内源性阿片肽和 5羟色胺而产生镇痛作用,抑制鞘内注射 SP引起的痛反应,阻断 SP诱发的脊髓 FLI增多效应。纳洛酮为阿片受体阻断剂,故可部分翻转电针的作用。

参考文献

1 Presley R W, Menetrey D, Levin J D *et al*. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. J Neurosci, 1990, 10(1): 323

2 Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. J Comp Neruol, 1990, 296(4): 517

3 Ruan H Z, Li X C, Cai W Q. Participation of substance P in noxious stimulus-evoked c-fos expression in spinal cord. Chin Sci Bull, 1994, 39(20): 1725

4 Ruan H Z, Li X C. Effect of morphine and monoamine neurotransmitters on pain modulation of substance P in the spinal cord. Chin Sci Bull, 1991, 36(8): 683

5 Matsumura H, Sakurada T, Hara A *et al*. Characterization of the hyperalgesic effect induced by intrathecal injection of substance P. Neruopharmacol, 1985, 24(5): 421

6 李希成,阮怀珍,赵邦云等.脑内注射 P物质对大鼠痛阈、电针镇痛和不同脑区甲啡肽含量的影响.第三军医大学学报,1989, 11(4): 257

7 李希成,赵邦云,阮怀珍等.脑内 P物质对大鼠不同脑区5羟色胺含量的影响及其与痛阈、电针镇痛的关系.针刺研究 1991, 16(2): 125

8 Ruan H Z, Li X C, Li H D. Effects of morphine and electroacupuncture on substance P level in spinal cord and their relation to pain threshold in rats. J Med Coll PLA, 1993, 8(1): 79

9 Molander C, Xu Q, Grant G. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. J Comp Neurol, 1984, 230(1): 133

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10 Randic M, Miletic V. Effect of substance P in cat dorsal horn neurones activated by noxious stimuli. Brain Res. 1977, 128(1): 164
11 阮怀珍,李希成,黎海蒂.吗啡对鞘内注射 P物质引起的痛阈和 c-fos表达的影响.针刺研究, 1996, 21(1): 65
12 Ruan H Z, Li X C, Cai W Q. Effect of 5-HT on pain modulation of substance P in spinal cord of rats. Acta Pharmacologica Sinica, 1995, 16(6): 512

(收稿: 1996-08-11;修回: 1997-02-16)
(编辑 刘 鹏)

Inhibitive effects of electroacupuncture on pain response and c-fos expression in spinal cord induced by substance P in rats

Ruan Huaizhen, Li Xicheng, Li Haidi, Zhao Bangyun, Hao Yong, Yu Qiong (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To observe the effects of electroacupuncture at the "Jiaji" point on pain response and c-fos expression in spinal cord induced by intrathecal injection of substance P (SP, 10μg) in rats. Methods: Immunohistochemistry and measurement of pain were used. Results: The intrathecal injection of SP produced pain response and evoked c-fos expression in spinal cord. 1h after the injection of SP, the FLI neurons were localized in laminae I, II, V and VI of both sides of the spinal cord. Electroacupuncture at the "Jiaji" point could inhibit pain response and c-fos expression, which could be partially reversed by naloxone. Conclusion: Electroacupuncture might exert its analgesic effects through stimulating the internal opiate peptide to inhibit SP.

Key Words substance P; electroacupuncture; c-fos; spinal cord; rat

大鼠生后脑发育和缺血再灌流过程中编程性细胞死亡及其可能机理的研究

A study of programmed cell death and its possible mechanism during postnatal brain development and ischemia-reperfusion in rats

赵士福* 蔡文琴 (第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室)重庆, 630038

编程性细胞死亡(Programmed cell death, PCD)是脑发育及损伤中神经细胞死亡的重要形式。已知的 PCD调节基因中, bcl-2家族及白介素-β转化酶(Interleukin-1β converting enzyme, ICE)基因在 PCD的调节中起重要作用。体外研究提示, bcl-2和 bcl-xl基因表达可阻止神经细胞 PCD,而 Bax及 ICE则促进 PCD。这些基因在脑发育及缺血再灌流中的表达及与 PCD的关系报道资料较少。本实验应用 DNA片段原位末端标记(TUNEL)、核酸原位杂交(ISH)、免疫组化(ICC)、流式细胞仪(FCM)以及电镜(EM)等方法,研究大鼠生后脑发育及缺血再灌流过程中 PCD的发生、以及 bcl-2 bcl-xL Bax和 ICE基因的表达,旨在了解生后脑发育变化以及在调节 PCD中的规律; bcl-2 bcl-xL Bax和 ICE基因表达变化以及在调节 PCD发生中的作用。主要结果如下:① 应用 TUNEL FCM 电镜,结合图像分析对大鼠生后脑发育过程中 PCD的观察发现: 在 TUNEL染色上 PCD细胞表现为染色质凝聚成块、移向核边缘、有时形成环半月状,偶尔可见见凋亡小体等。TUNEL法与电镜结合显示,只有 TUNEL深染细胞核有凋亡细胞特征,而核淡染细胞不具有凋亡细胞表现: 本实验首次将 TUNEL与 FCM结合研究神经细胞 PCD发生规律; P1-P7d PCD细胞呈上升趋势, P7d达到高峰,之后 PCD细胞减少, P14d后急剧下降, P28 d以后 PCD细胞基本消失。大脑皮层、海马、皮层下白质和基底节区均存在 PCD细胞,提示生后脑内 PCD发生在四周之内, PCD是生后脑发育中神经细胞死亡的主要方式。② 应用核酸原位杂交和免疫组化等技术,对生后脑发育中 ICE bcl-2 bcl-xL和 Bax基因表达进行观察。结果显示, ICE在生后一周内表达较强, P7-P28 d呈减弱趋势; Bax蛋白在生后一周上升, P7 d后表达减弱, P14 d后降至较低水平, ICE和 Bax具促进 PCD发生作用。bcl-2在胚胎期有明显表达而生后未见明

(下转 34页)

* 赵士福,男, 31岁,博士研究生

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net