DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.04.004

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

李希成 阮怀珍 赵邦云 袁 和 刘祚周（生理学教研室）

提 要 脑室内注射（icv）P物质（substance P，SP，1μg/10μl）可使痛阈明显升高，纹状体、下丘脑内甲啡肽样免疫活性物质（Ir-MEK）含量显著增多（$P<0.05\sim0.01$），而海马内Ir-MEK含量无明显变化；电解损毁中脑导水管中央灰质（PAG）后，SPicv升高痛阈和二脑区内Ir-MEK含量的作用显著降低（$P<0.05\sim0.01$）。

将SP注入PAG（0.4μg/4μl），电针“夹脊”穴（5Hz、3V）或腹腔注射吗啡（3mg/kg）均可使痛阈和纹状体、下丘脑内Ir-MEK含量显著升高。在SP注入PAG或腹腔注射吗啡时，海马内Ir-MEK含量也明显提高。将SP注入PAG加电针刺激增强上述效应的作用更为显著（$P<0.01$）。将SP注入PAG加腹腔注射吗啡增强上述效应的作用却未见进一步升高（$P>0.05$）。结果表明SP可能经PAG使脑内甲啡肽含量增加而发挥镇痛效应，SP注入PAG与电针具有协同作用。

关键词 镇痛；电针；甲脑啡肽；P物质；痛阈；脑区

据报道[1][2]，脑内和腹腔内注射SP均能引起镇痛。应用抗体微量注射法的实验表明SP引起的镇痛作用，可能与其促使脑啡肽释放有关[3][4]。本文将SP注入大鼠脑室和PAG，观察SP对痛阈和不同脑区Ir-MEK含量的影响；分析PAG在其中所起的作用；探讨SP注入PAG、电针和吗啡所引起的镇痛和不同脑区Ir-MEK含量变化之间的相互关系。

实 验 方 法

实验用Wistar大鼠98只，体重150～250g。

1．痛阈测定和电针方法

实验时采用敞式装置固定清醒大鼠，用单个方波脉冲刺激鼠尾，以出现嘶叫反应时的最小电压值为其相应的痛阈值[5]。每隔5mim测痛阈1次，待痛阈稳定后，将最后两次痛阈的均值作为基础痛阈值。于电针或给药后也每隔5mim测痛阈1次，共4次（历时20min），然后将电针后或给药后各次测得的痛阈值减去其基础痛阈值，所得之差为痛阈变化值，分别取4次痛阈变化值的均值作为电针或给药后痛阈变化的均值。

电针时，用电针仪通过不锈钢针灸针电刺激双侧相当于人体“夹脊”穴部位，其频率为5Hz，强度为3V，时间为20min。

2．不同脑区甲啡肽的测定

用放射免疫法测定不同脑区Ir-MEK的含量。在测痛完毕后，立即断头剥取大鼠全脑，放入沸生理盐水中煮5min，然后将脑取出置冰台上分离出纹状体、下丘脑和海马，称重后将它们分别放入醋酸液（02mcl，3ml）中匀浆，2～3h后再以NaOH（0.6mol，1ml）中和酸，经离心取上清液作放免测定[6]。

测定时在聚苯乙烯管中顺序加入上述上清液、甲啡肽抗血清（工作浓度为1:3000）各0.5ml，^{125}I标记甲啡肽（每分钟约含8000～10000脉冲数）0.05ml，摇匀后置4℃冰箱孵育24h，再加入10%SPA（冻干葡萄球菌A蛋白菌体试剂），离心后弃上清液，用γ-放免计数仪测定沉淀物的每分脉冲数，计算出各管的B/T百分数，根据同批实验所作标准曲线查出各样品Ir-MEK的含量，经换算为每mg湿重组织Ir-MEK含量的微微克（pg/mg），所有实验均作双复管。实验中所用^{125}I标记的甲啡肽系按氯胺T法[6]制备，甲啡肽为Sigma产品，甲啡肽抗血清为第二军医大学生理教研室所生产。

3．脑室内、PAG内埋管和微量注射、电解损毁及其鉴定法均与我们以往报道的相同[5][7]。

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

实 验 结 果

一、脑室和PAG内注射SP对痛阈和不同脑区Ir-MEK含量的影响

SP (1μg/10μl) icv后的20min内，大鼠痛阈和纹状体、下丘脑的Ir-MEK含量均明显升高，与人工脑脊液 (ACSF, 10μl) icv对照组的结果相比较，差异显著或非常显著($P<0.05\sim0.01$)，而海马内Ir-MEK的含量却未见明显变化($P>0.05$)。损毁PAG后，SPicv所引起的镇痛效应显著下降(痛阈降低了45.4%)，纹状体和下丘脑内Ir-MEK含量的升高效应也分别减少了26.8%和24.1% ($P<0.05\sim0.01$) (附表)。

附表 摧毁PAG对SPicv所引起痛阈和纹状体、下丘脑、海马内Ir-MEK含量的影响

分 组	Ir-MEK(pg/mg)			痛阈变化值
	纹状体	下丘脑	海马	(V)
ACSF icv (10)	391.0± 70.4	140.8±13.3	53.3± 6.1	0.84±0.21
SP icv (12)	598.9±120.3**	173.2± 8.2*	60.1±12.4	2.18±0.29**
损毁PAG后 SP icv(12)	438.1±103.5$^{\Delta\Delta}$	131.5±20.4$^{\Delta}$	55.4±7.1	1.19±0.49$^{\Delta\Delta}$

表中数字为均值±标准误。括号内数字为动物数。 SP icv组与ACSF icv组比较，*$P<0.05$；**$P<0.01$。 SPicv+损毁组与SP icvi组比较，$^{\Delta}P<0.05$；$^{\Delta\Delta}P<0.01$。

SP (0.4μg/4μl) 注入PAG也可使痛阈升高，三脑区内Ir-MEK含量均显著增多，与ACSF注入PAG组比较，痛阈升高了157.1%，纹状体、下丘脑和海马内Ir-MEK含量分别增加了72.1%、51.1%和40.3% ($P<0.01$) (图1、2)。

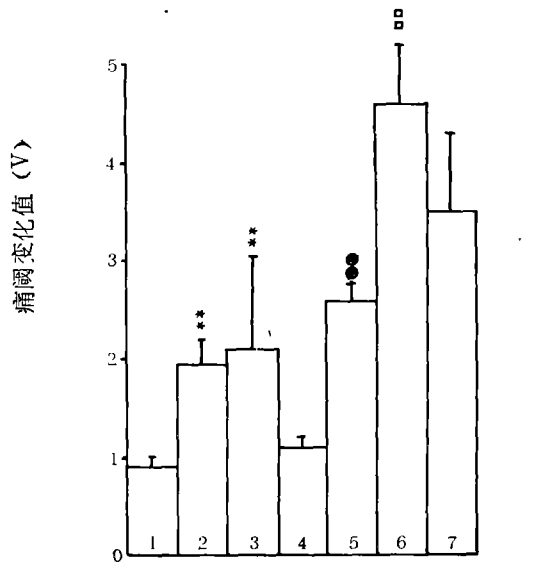


图1 SP注入PAG加电针对痛阈的影响

横座标：1.对照 (n=9)；2.电针 (n=8)；3.吗啡(n=8)；4.ACSF注入PAG(n=10)；5.SP注入PAG(n=12)；6.SP注入PAG+电针 (n=9)；7.SP注入PAG+吗啡 (n=8)

纵座标：平均值±标准误。电针、吗啡组与对照组比较，**<0.01；SPP注入PAG组与ACSF注入PAG组比较，⊛⊛$P<0.01$；SP注入PAG+电针组与SP注入PAG或电针组比较，$\square P<0.01$。

以上结果表明，将SP注入脑室或PAG内均可引起痛阈和三脑区Ir-MEK含量升高。SPicv升高痛阈和使纹状体、下丘脑内Ir-MEK含量增多的作用可能是通过PAG而实现的。

二、SP注入PAG对不同脑区Ir-MEK含量变化的影响及其与电针和吗啡镇痛的相互关系

1. 电针和吗啡的效应：将电针和吗啡组的结果与正常对照组的比较，电针20min内痛阈升高了138.5%，纹状体和下丘脑的Ir-MEK含量升高了30.3%和82.4% ($P<0.01$)，而海马内Ir-MEK含量无明显变化。腹腔内注射吗啡 (3mg/kg) 后20min，痛阈升高了157.8%，纹状体、下丘脑和海马内Ir-MEK含量分别升高了58.7%、64.8%和35.1% ($P<0.05\sim0.01$) (图1、2)。

2. SP注入PAG对电针和吗啡效应的影响：SP注入PAG加电针刺激，可使痛阈和纹状体、下丘脑、海马内Ir-MEK含量均大幅度提高，分别将其中两组的痛阈变化值和三脑区Ir-MEK含量的变化

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

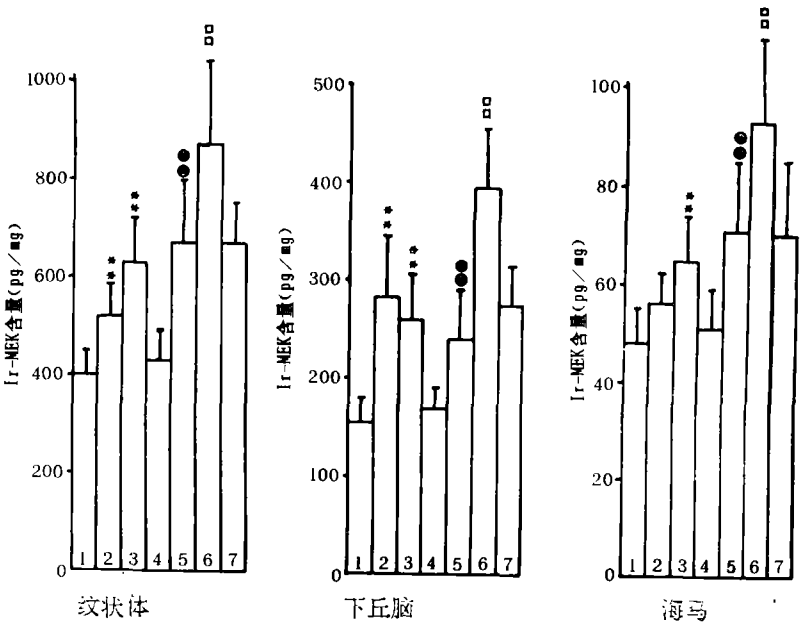


图2 SP注入PAG加电针对纹状体、下丘脑和海马内Ir-MEK含量的影响
(图注同图1)

值作t检验，结果表明，SP注入PAG加电针组与单一的SP注入PAG组或电针组的差异都非常显著($P<0.01$)。但是，SP注入PAG加吗啡组，其痛阈和三脑区Ir-MEK含量与单一的SP注入PAG或吗啡组的结果相比较均无显著差异($P>0.05$)(图1、2)。

根据组织切片检查结果表明，损毁部位在PAG尾端的外侧或腹外侧部。

以上结果表明，将SP注入PAG同时电针"夹脊"穴具有明显的协同作用，能进一步增强电针镇痛和升高脑内Ir-MEK含量，将SP注入PAG同时腹腔注射吗啡则无类似现象。

讨 论

1. SP升高痛阈和脑内Ir-MEK含量与PAG的关系

我们在实验中观察到，将SP注入大鼠脑室可使痛阈明显升高，纹状体和下丘脑Ir-MEK的含量显著增多。据报道[4]，由此而引起的镇痛作用为脑室注入脑啡肽抗血清所取消。看来，脑室注入SP所引起的镇痛作用可能与它促使纹状体和下丘脑等脑区释放甲啡肽有关。

已知，脑肽在中枢神经系统中产生镇痛作用的有效部位是中脑和脊髓，其中许多脑肽如SP、ACTH、胆囊收缩素等的镇痛作用都是通过PAG而实现的[3][8][9]。由此可见脑室注射SP可能是由于激活了PAG促使有关脑区释放甲啡肽而引起镇痛效应的。为了证实这一设想，我们将SP直接注入PAG内，观察到纹状体、下丘脑和海马内Ir-MEK含量均显著增多、痛阈明显升高；在损毁PAG后将SP注入脑室，见到升高纹状体和下丘脑Ir-MEK含量和升高痛阈的作用均显著降低。这一实验结果提示，PAG在SP提高脑内甲啡肽含量和提高痛阈中具有重要作用。

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

2. SP升高痛阈和脑内Ir-MEK含量与电针镇痛的关系

我们电针“夹脊”穴或将吗啡注入腹腔后，观察到它们能显著地升高痛阈和纹状体、下丘脑、海马Ir-MEK的含量。由此表明电针和吗啡镇痛至少部分也是促使一些脑区释放脑啡肽的缘故。此外，我们还见到SP注入PAG加电针“夹脊”穴能大幅度提高痛阈和上述三脑区Ir-MEK的含量，比单一SP注入PAG或电针“夹脊”穴的作用要强得多。然而SP注入PAG加腹腔注射吗啡却无类似现象。这一结果表明，在升高痛阈和脑内Ir-MEK的含量上，SP和电针有协同作用，因为二者都能激活PAG，电针能激活PAG早已有证明[10]。

据报道[11]，将SP抗血清注入家兔PAG后能使电针镇痛效应显著降低。由此看来，电针有可能激活PAG使之释放SP，SP反过来也可激活PAG，它们转而都可使脑内甲啡肽含量进一步增加，这或许就是SP注入PAG加电针“夹脊”穴能显著提高痛阈的原因。循此路径深入探索可望大幅度提高针刺镇痛的效应。

参考文献

1. Malick JB, et al. Anlgesic activity of substance P following intracerebral administration in rat. Life Sci 1978;23:835
2. Mohrland JS, et al. Substance P-induced analgesia in the rat. Brain Res 1979; 171:556
3. Naranjo JR, et al. Analgesic activity of substance P in rats: apparant mediation by met-enkephalin release. Life Sci 1982;30:441
4. Naranjo JR, et al. Blockade by met-enkephalin antiserum of analgesia induced by substance P in mice. Neuropharmacology 1982;21:1295
5. 李希成，等。损毁大白鼠中脑中央灰质对针刺镇痛效应的影响。中华医学杂志 1980；60：612
6. 谢翠微，等。甲硫脑啡肽和亮脑啡肽放射免疫测定。北京医学院学报1984；16：141
7. 张长城，等。中脑导水管周围灰质在侧脑室注入微量吗啡或纳洛酮所引起的镇痛或拮抗镇痛中的作用。生理学报1983；35：301
8. Walker JM, et al. Induction of analgesia by central administration of ORG-2766, an analog of ACTH4-9. Europ J Pharmacol 1981; 69: 71
9. Jurna I, et al. Antinociceptive effect of central administered caerulein and cholecystokinin octapeptide (CCK-8). Europ J Pharmacol 1981;7:323
10. 张长城，等。电针穴位对中脑导水管周围灰质伤害性反应的影响。针刺研究1981；6：52
11. Han JS, et al. Acupuncture mechanisms in rabbits studied with microinjection of antibodies aganist- endorphin, enkephalin and substance P. Neuropharmacology 1984;23:1

（收稿：1988.9.26；修回：1989.4.4）

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

Effect of Intracerebral Injection of Substance P on Pain Threshold, Electroacupuncture Analgesia and Met-enkephalin Contents of Several Brain Areas in Rats

Li Xicheng, et al (Department of Physiology, Third Military Medical College)

Radioimmunoassay was used to determine the immunoreactive met-enkephalin (ir-MEK) contents of several brain areas. The pain threshold (PT) and the ir-MEK contents of striatum and hypothalamus increased markedly by intracerebroventricular (icv) injection of substance P (SP, 1μg/10μl), no significant change of ir-MEK in hippocampus, and the increased ir-MEK contents and pain threshold were obviously deminished ($P<0.05\sim0.01$) by electrolytic lesion of the periaqueductal gray (PAG). The PT and ir-MEK contents of hypothalamus and striatum were increased by intra- PAG injection of SP (0.4μg/4μl), electroacupuncture (EA)or intraperitoneal (ip) injection of morphine. The ir-MEK content of hippocampus was also increased following intra-PAG injection of SP or ip injction of morphine. The combinative use of intra-PAG injection of SP and EA in the 3 areas elevated the PT and ir-MEK content more markedly than the single intra-PAG injection of SP ($P<0.01$). The effects of the combinative use of intra-PAG of SP and ip injection of morphine were almost identical with any one of the two singly. The present work indicates that the analgesic effect of SP activated by PAG is mediated by the increase in cerebral met-enkephalin contents. There is a combinative effect produced by intra-PAG injection of SP and EA.

Key words, analgesia; electro acupuncture; Met-enkephalin; substance P; pain threshold; areas in brain

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