

· 实验研究 ·

褪黑素合用电针时大鼠脑内
 β -内啡肽的变化*

周敏明 俞昌喜 王妙珍 曹小定 吴根诚

内容提要 目的 观察褪黑素合用电针对大鼠下丘脑弓状核中 β -内啡肽样免疫阳性反应强度及其前体——前阿黑皮原(POMC)mRNA 表达的影响,以探讨褪黑素加强电针镇痛的机理。方法 采用 ABC 免疫组织化学和原位杂交组织化学技术,结合计算机图像处理,测定其积分光密度(IOD)值。结果 腹腔注射褪黑素 60mg/kg, 30min 时合用电针 30min 后,脑内 β -内啡肽样免疫阳性物质积分 IOD 值明显降低;10h 后脑内 POMC mRNA 阳性物质积分 IOD 值明显增高。结论 褪黑素加强电针镇痛效应的机制可能与促进脑内 β -内啡肽的释放和合成有关。

关键词 褪黑素 电针镇痛 前阿黑皮原 β -内啡肽 免疫组织化学 原位杂交

Changes of Cerebral β -Endorphin in Rats Treated with Combination Therapy of Melatonin and Electroacupuncture ZHOU Min-ming, YU Chang-xi, WANG Miao-zhen, et al *Department of Neurobiology, Institute of Acupuncture Research, State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Medical Center of Fudan University, Shanghai (200032)*

Objective : To explore the strengthening of acupuncture analgesic mechanism on the level of β -endorphin and proopimelanocortin mRNA expression in the arcuate nucleus of hypothalamus in rats following electroacupuncture (EA) combined with melatonin (MEL). **Methods** : Integrated optical density (IOD) was measured by ABC immuno-histochemical and in situ hybridization technique with computerized image processing. The rat's brain was coronally sectioned after combination of EA and MEL. **Results** : IOD of β -endorphin-like immunopositive substance in rat's brain was lowered significantly, which was measured after MEL (60 mg/kg) was injected intraperitoneally and followed by EA 30min later for 30min, and the IOD of cerebral POMC mRNA positive substance increased significantly 10 hrs later. **Conclusion** : The mechanism of MEL in enhancing EA analgesic effect might be related with the release and synthesis of β -endorphin.

Key words melatonin, electroacupuncture analgesia, proopimelanocortin, β -endorphin, immuno-histochemistry, in situ hybridization

褪黑素(melatonin, MEL)是体内重要的神经内分泌物质,主要由松果体合成分泌。MEL 除参与体内昼夜节律、生长发育、免疫调节等许多重要的生理或病理过程调节之外,还具有重要的镇痛作用⁽¹⁾,而且毒副作用很小。针刺具有镇痛效应,但存在镇痛不全的缺憾。我们近期研究表明,MEL 能加强电针(electroacupuncture, EA)镇痛⁽²⁾,但其作用机制尚不清楚。

脑内 β -内啡肽在痛觉调制和镇痛中具有重要的作用。我们以往研究工作表明,针刺和 MEL 均能促

进 β -内啡肽的释放与合成^(3~5)。为了进一步了解 MEL 合用电针后对 β -内啡肽的影响,故本实验应用免疫组织化学和原位杂交技术,对脑内 β -内啡肽样免疫阳性反应强度及其前体——前阿黑皮原(POMC)mRNA 表达进行观察,试图探讨 MEL 对针刺镇痛效应影响的中枢机制。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠,体重 180~200g,购自上海医科大学实验动物中心,在光暗周期 12:12h 的实验室中饲养,自由饮食、饮水。

2 药品与试剂 MEL,购自 Sigma 公司,临用前以无水乙醇溶解,再加生理盐水配置(乙醇浓度为 5%,V/V) β -内啡肽抗体为 Phoenix Pharmaceuticals 产

*“九五”国家科技攻关资助课题(No. 96-906-11-01)

复旦大学医学院神经生物学教研室,针刺原理研究所,医学神经生物学国家重点实验室(上海 200032)

品 免疫组化 ABC 试剂盒购自 Vector 公司,前阿黑皮原 (prepro-opiomelanocortin, POMC) cRNA 探针 (462bases) 由上海第二军医大学神经生物教研室提供,蛋白酶 K 和 RNA 酶为华美生物工程公司产品。

3 主要仪器 G6805-2 型多功能电针治疗仪,上海医用电子仪器厂;Reichert-Jung 恒冷切片机,德国;J2-HS 低温高速离心机,美国 Beckman 公司;Leica Q500IW 计算机图像处理系统,德国。

4 实验方法

4.1 动物及组织准备 大鼠随机分成 4 组:(1)对照组 采用 5% 乙醇生理盐水腹腔注射(ip);(2)给药组 MEL 60mg/kg, ip;(3)电针组 5% 乙醇生理盐水 ip, 30min 后在大鼠右后肢的足三里 (St36) 和昆仑 (UB60) 两穴上插入电针,以 G6805-2 型多功能电针治疗仪给予疏密波 (疏波约 2Hz, 密波约 60Hz), 强度以引起大鼠右后肢轻度抖动为宜 ($< 1\text{mA}$), 持续 30min;(4)针药结合组, MEL 60mg/kg, ip, 30min 后合用电针刺激 30min。

将大鼠分成两批,每批动物 ($n = 5$) 分组如上。两批动物分别在给予 MEL 或电针 1h 及 10h 后,在戊巴比妥钠麻醉下,经左心室插管灌入生理盐水 200ml,继以 4% 多聚甲醛 400ml 灌注固定。取出脑组织,选取下丘脑部位,经 20% ~ 30% 的蔗糖梯度下沉,冰冻冠状切片,片厚 $30\mu\text{m}$ 。放入含 30% 蔗糖、30% 乙二醇的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液中保存备用。

4.2 免疫组织化学 采用 ABC 法⁽⁶⁾。切片经 0.01mol/L PBS 冲洗后,入 10% 羊血清孵育液 30min (37°C),加兔抗 β -内啡肽抗体 (1:5000, Phoenix Inc, 37°C) 在湿盒中孵育,4h 后移至 4°C 再孵育 48 ~ 72h。0.01mol/L PBS 漂洗后入生物素标记的羊抗兔 IgG (1:200, Vector, 37°C) 1h, 0.01mol/L PBS 漂洗干净后入 AB 液 (1:200, Vector, 37°C), 1h 后进行 0.05% DAB 显色。以不加兔抗 β -内啡肽抗体的组织切片作对照实验,未见阳性反应。

4.3 原位杂交反应 (ISHH) 采用漂浮法⁽⁷⁾。切片经 0.1mol/L PBS 洗涤后,用 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白酶 K 37°C 消化 30min, 0.1mol/L PBS 洗涤, 0.25% 乙酸酐、0.1mol/L 三乙醇胺处理 10min, $4 \times \text{SSC}$ 、50% 甲酰胺平衡 20min 后,切片放入含 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ POMC cRNA 探针的杂交液 (50% 甲酰胺, $5 \times \text{SSC}$, 2% Blocking Reagent, 0.02% SDS), 42°C 反应 20h 后,充分洗涤 ($2 \times \text{SSC}$ 15min 2 次, $2 \times \text{SSC}$ 37°C 30min, $0.1 \times \text{SSC}$ 42°C 15min 2 次),加抗地高辛抗体 (1:5000),孵育 2h, NBT/BCIP

显色。选用部分脑片作如下处理以鉴别杂交信号的特异性:(1)杂交前以 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA 酶消化脑片中的 RNA,再将脑片置于含探针的杂交液中孵育;(2)将脑片置于不含探针的杂交液中孵育,其余步骤均与 ISHH 完全相同。结果两种处理后的脑片均无任何信号显示。

4.4 光密度测定 采用 Leica Q500IW 计算机图像处理系统,测定上述免疫组化或原位杂交染色脑片下丘脑弓状核积分光密度 (IOD) 值,以相对定量比较各实验组与对照组大鼠脑内 β -内啡肽免疫阳性反应强度或 POMC mRNA 表达的变化。参照大鼠脑立体定位图谱,选取冠状面位于 bregma 后 2.6 ~ 3.0mm 的染色脑片。每只动物选用 2 张脑片,各 IOD 值按文献⁽⁸⁾方法施以本底修正后的均值即为每只动物的 IOD 值。对于不同组别同一脑区测定条件不变,以便相对定量比较。

4.5 统计学分析 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并运用 Jandel Scientific: Sigma Stat 2.0 统计软件进行方差分析和 q 检验。

结 果

1 各组脑内 β -内啡肽免疫阳性物质变化 见图 1 ~ 4, 表 1。 β -内啡肽样免疫阳性物质分布比较局限,主要见于下丘脑弓状核及其周围区域,结果显示:对照组下丘脑弓状核内 β -内啡肽样免疫阳性反应神经细胞特异性染色显著,免疫阳性反应物分布于细胞质及部分大的突起内,而给药组和电针组弓状核内 β -内啡肽样免疫阳性反应强度明显弱于对照组,表现为阳性细胞积分 IOD 值降低 ($P < 0.01$)。针药结合组的 β -内啡肽样免疫阳性反应强度则弱于给药组和电针组,积分 IOD 值的降低更为显著 ($P < 0.01$)。

表 1 各组脑内 β -内啡肽样免疫阳性物质反应强度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IOD 值
对 照	5	770.92 ± 23.22
给 药	5	$419.44 \pm 18.72^*$
电 针	5	$478.18 \pm 36.47^*$
针药结合	5	$254.27 \pm 23.22^{* \Delta \blacktriangle}$

注 与对照组比较, $^* P < 0.01$; 与给药组比较, $^\Delta P < 0.01$; 与电针组比较, $^\blacktriangle P < 0.01$

2 脑内 POMC mRNA 表达的变化 见表 2 (图略)。结果显示 给药组和电针组大鼠下丘脑弓状核内神经细胞的 POMC mRNA 表达明显强于对照组,阳性细胞积分 IOD 值显著升高 ($P < 0.01$)。针药结合组 POMC mRNA 表达则明显强于单纯给药组和单纯电

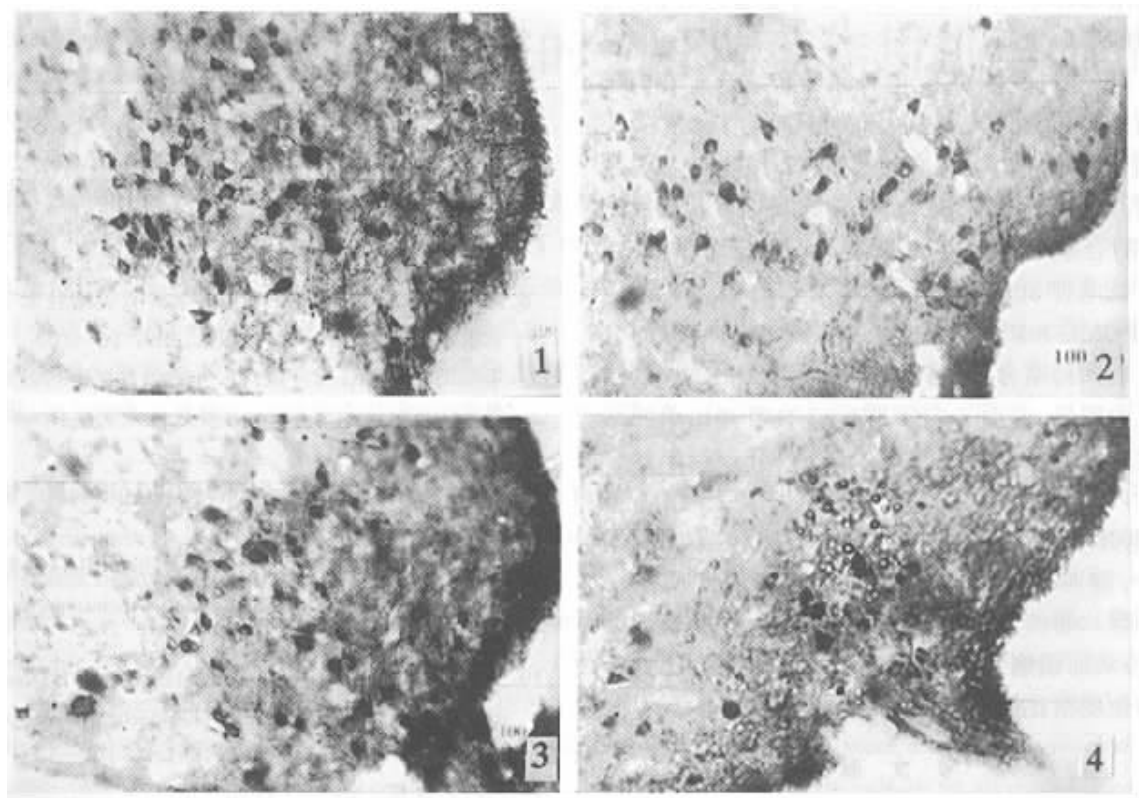


图 1 对照组:下丘脑弓状核内 β -内啡肽样免疫阳性反应神经细胞染色显著; $\times 100$ 图 2 给药组下丘脑弓状核内 β -内啡肽样免疫反应强度弱于对照组; $\times 100$ 图 3 电针组 β -内啡肽免疫反应强度亦弱于对照组; $\times 100$ 图 4 针药结合组 β -内啡肽免疫阳性反应强度则弱于给药组及电针组; $\times 100$

针组,IOD 值的升高更为明显($P < 0.01$)。

表 2 各组脑内 POMC mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	POMC mRNA(IOD 值)
对 照	5	313.88 $\pm$ 8.20
给 药	5	492.20 $\pm$ 37.25 * $\blacktriangle$
电 针	5	635.39 $\pm$ 42.22 * $\triangle$
针药结合	5	996.02 $\pm$ 30.86 * $\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle$

注:与对照组比较,* $P < 0.01$ 与给药组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ 与电针组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

讨 论

以往研究表明⁽¹⁾,外源性给予 MEL 可显著提高动物痛阈,并存在剂量依赖关系,提示 MEL 具有镇痛作用。我所研究报道⁽⁹⁾,侧脑室注射 MEL 而引起大鼠痛阈提高 50% 的剂量约为腹腔注射的 1/100,而侧脑室注射纳洛酮可拮抗腹腔注射 MEL 提高大鼠痛阈的效应,提示中枢神经系统可能是 MEL 发挥镇痛效应的重要部位,其作用机制涉及脑内阿片肽系统。

中枢阿片肽系统在痛觉调制中具有重要的作用。其中, β -内啡肽主要分布在下丘脑弓状核及其周围脑区,而下丘脑也是 MEL 受体和内源性 MEL 在脑内分布水平最高的区域⁽¹⁰⁾。有文献报道⁽¹¹⁾,腹腔注射

MEL 30min 后取脑测定,发现下丘脑组织 β -内啡肽含量显著下降,这可能是由于 MEL 促进 β -内啡肽释放之故而引起了组织内含量的下降。此外,我们以往研究表明,针药结合能够进一步促进 β -内啡肽的释放与合成^(4,5)。因此,有关 MEL 及 MEL 与电针结合对 β -内啡肽释放和合成影响的研究,必将有助于深入探讨 MEL 镇痛及针药结合镇痛的机理。

本实验观察到,无论是腹腔注射 MEL 60mg/kg 或电针 30min,处理 1h 后弓状核内 β -内啡肽样免疫阳性物质积分 IOD 值降低。鉴于 β -内啡肽的合成需要有一段时间,而本实验在腹腔注射 MEL 或电针 1h 时灌注取脑,故此时脑内 β -内啡肽样免疫阳性反应的变化,可间接反映脑内 β -内啡肽的释放。而免疫反应阳性物质(以 IOD 值表示)增高,则提示突触前的储存增多,释放减少;反之,积分 IOD 值降低,则提示 β -内啡肽的释放增加。本实验结果提示,MEL 及电针均能促进 β -内啡肽的释放。这与有关 MEL 在提高动物痛阈同时促进 PAG 内 β -内啡肽释放的研究结果⁽³⁾,以及朱崇斌等⁽⁴⁾报道电针促进 β -内啡肽释放的结论是相吻合的。当 MEL 与电针合用后,弓状核内 β -内啡肽样免疫阳性物质积分 IOD 值的降低更加明显,提示 β -

内啡肽释放的增加比单纯给药或电针更为显著,从而也表现出更强的镇痛效应。

为了进一步探讨 MEL、电针和针药结合对 β -内啡肽合成的影响,我们又观察了 β -内啡肽前体 POMC mRNA 表达的变化。大鼠在给予 MEL 或电针 10h 后灌注取脑,此时脑内 POMC mRNA 的表达可间接反映 β -内啡肽的合成情况⁽¹²⁾。结果显示,腹腔注射 MEL 60mg/kg 或电针 30min 后,弓状核内阳性物质 IOD 值增高,即 POMC mRNA 表达增强,提示 β -内啡肽的合成增加。当针药结合后,弓状核内 POMC mRNA 表达的增强更为明显,表明 β -内啡肽合成的增加比单纯给药或电针更为显著。本实验结果提示 MEL 与电针合用可使 β -内啡肽的合成进一步增加。综上所述,由于 MEL 和电针均可引起 β -内啡肽释放增加,导致突触前储存减少,继而促使其前体合成加速,POMC mRNA 则表达增强。而针药结合则进一步促使 β -内啡肽的释放与合成,从而镇痛效应明显增强。由此可见,上述原位杂交与免疫组化的两组实验结果是相吻合的。

参 考 文 献

1. Golombek DA, Escobar E, Burin LJ, et al. Time-dependent melatonin analgesia in mice: inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur J Pharmacol* 1991;194:25—30.
2. 周敏明,俞昌喜,曹小定,等.褪黑素对大鼠电针镇痛效应的影响. *针刺研究* 2000;25(2):93—95.
3. 俞昌喜,吴根诚,许绍芬,等.褪黑素对大鼠中脑导水管周围灰质内阿片肽释放的影响. *生理学报* 2000;52(3):207—

210.

4. Zhu CB, Jin L, Xu SF. Release of enkephalin and beta-endorphin in rat brain accelerated by combination of droperidol with electroacupuncture. *Chinese J Physiol Sci* 1995;11(2):123—128.
5. 朱崇斌,李晓艳,朱燕华,等.氟哌啶与电针合用增强大鼠脑内前脑啡肽原 mRNA 和前阿黑皮原 mRNA 表达:原位杂交组织化学研究. *针刺研究* 1994;19(3—4):95.
6. 远山正弥(饶志仁译). *神经科学研究尖端技术手册——分子组织化学*. 北京:科学出版社,1997:92—102.
7. 李晓艳,朱崇斌,殷霞,等.一种漂浮法进行的地高辛标记组织化学原位杂交技术. *上海医科大学学报* 1995;22(1):75—78.
8. 汤耀法.光密度的由来及其物理意义. *中国医学物理学杂志* 1997;14:179—181.
9. Yu CX, Zhu CB, Xu SF, et al. The analgesic effects of peripheral and central administration of melatonin in rats. *Eur J Pharmacol* 2000;403:49—53.
10. Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, et al. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994;24:101—146.
11. Xu F, Li JC, Ma KC, et al. Effects of melatonin on hypothalamic gamma aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, beta-endorphin and serotonin levels in male mice. *Biol Signals* 1995;4:225—231.
12. 俞逸红,高明,何莲芳.针刺后大鼠下丘脑弓状核前阿黑皮素 mRNA 水平变化的时程. *上海医科大学学报* 1994;21(增刊):59—61.

(收稿 2000-08-09 修回 2000-11-05)