

· 基础研究 ·

电针不同穴位对大鼠分娩镇痛效应及其神经递质作用的影响

沈岩金 蒋秋燕 莫海霞 李 丽 王梦莹

摘要 目的 探讨电针不同穴位对大鼠分娩镇痛效应及其神经递质的作用机制。**方法** 120 例模型孕鼠随机分为空白组(A 组),电针三阴交穴组(B 组),电针合谷穴组(C 组),电针合谷加三阴交组(D 组),电针血海穴组(E 组),药物组(F 组),每组 20 只。采用热水甩尾测痛法观察大鼠痛阈值;Real-time PCR 及 Western blot 检测大鼠中枢神经递质 5 羟色胺(5-HT)及 5 羟色胺 2A 受体(5-HT_{2A})、去甲肾上腺素转运蛋白(NET)及去甲肾上腺素 α 2-A 受体(α 2-AR)、多巴胺(DA)及多巴胺 D2 受体(Drd2)、前强啡肽原(Pdyn)及阿片受体(Oprk1)的 mRNA 与蛋白表达。**结果** (1)大鼠痛阈值比较,干预前各组间差异无统计学意义($P > 0.05$);干预后,与 A 组比较,B、C、D、E、F 组痛阈明显升高($P < 0.01$)。(2)与 A 组比较,B、C、D、E、F 组中枢神经中大脑灰质 5-HT、5-HT_{2A} 及 NET、 α 2-AR mRNA 及蛋白表达均明显升高($P < 0.01$); DA、Drd2 均明显降低($P < 0.01$);Pdyn、Oprk1 差异无统计学意义($P > 0.05$)。而脊髓中 5-HT、5-HT_{2A} 及 Pdyn、Oprk1 明显升高($P < 0.01$); NET、 α 2-AR 明显降低($P < 0.01$); DA、Drd2 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 不同穴位产生不同针效作用,以 B 组较好,E 组相对较差。穴位间出现的这种差异,可能与穴位所在的经络腧穴功效及其所处的神经解剖学位置有关。

关键词 电针穴位;分娩镇痛;神经递质及其受体

Effect of Electroacupuncture at Different Acupoints on Delivery Analgesic Effect and Neurotransmitters in Rats SHEN Yan-jin, JIANG Qiu-yan, MO Hai-xia, LI Li, and WANG Meng-ying Department of Obstetrics, First Affiliated Hospital, Guangxi University of TCM, Nanning (530023)

ABSTRACT Objective To observe delivery analgesic effect of electroacupuncture (EA) at different acupoints and the mechanism of neurotransmitters in rats. **Methods** Totally 120 pregnant model rats were randomly divided into a blank control group (A), EA at Sanyinjiao (SP6) group (B), EA at Hegu (LI4) group (C), EA at Hegu (LI4) and Sanyinjiao (SP6) group (D), EA at Xuehai (SP10) group (E), and drug group (F) 20 in each group. The pain threshold of rats were observed using hot water tail flick test. Real-time PCR and Western blot were used to detect mRNA and protein expressions of rat central neurotransmitters and their receptors (5-HT and 5-HT_{2A}, NET and α 2-AR, DA and Drd2, Pdyn and Oprk1). **Results** (1) There was no significant difference in pain threshold among all the groups before intervention ($P > 0.05$). Compared with group A, the pain threshold significantly increased in group B, C, D, E, and F ($P < 0.01$). (2) 5-HT, 5-HT_{2A}, NET, α 2-AR of gray matter in the central nervous system significantly increased ($P < 0.01$); DA and Drd2 significantly decreased ($P < 0.01$) in group B, C, D, E, and F, as compared with group A. But there was no statistical difference in Pdyn and Oprk1 between group A and the rest groups ($P > 0.05$). Compared with group A, 5-HT and 5-HT_{2A}, Pdyn, and Oprk1 in the spinal cord increased significantly ($P < 0.01$); NET and α 2-AR significantly decreased ($P < 0.01$) in the rest groups. There was no statistical difference in DA and Drd2 between group A and the rest groups

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81260547; No. 81373685)

作者单位:广西中医药大学第一附属医院产科(南宁 530023)

通讯作者:蒋秋燕, Tel: 0771-5848759, E-mail: 693307169@qq.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20170426. 110

($P > 0.05$). **Conclusions** Different acupuncture points had different acupuncture effects. Better results were obtained in group B, while poorer results were obtained in group E. This difference between the acupoints might be related to the actions of meridian acupoints and the neuroanatomical sites.

KEYWORDS electroacupuncture; delivery analgesia; neurotransmitter and its receptor

分娩疼痛是世界上疼痛阈值最高的疼痛种类之一, 针灸镇痛具有历史悠久、效果明显、无创伤的镇痛优势, 成为现代研究的热点^[1]。有研究证实神经递质及其受体系统参与了针刺镇痛^[2], 而对不同穴位电针介导下, 神经递质镇痛机制的探讨是本课题研究的内容。

本实验通过对模型大鼠应用不同穴位电针, 观察各组大鼠痛阈, 采用 Real-time PCR、Western blot 检测大鼠中枢神经递质 5-羟色胺 (5-HT)、去甲肾上腺素 (NE)、多巴胺 (DA)、前强啡肽原 (Pdyn) 等受体 mRNA 及蛋白表达, 揭示不同穴位电针对分娩大鼠神经化学参与的镇痛机制, 现报道如下。

材料与方法

1 动物 3 月龄、健康 SD 大鼠 120 只, 体重 (300 ± 50) g, 性成熟未交配。由广西医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (桂) 2009-0002。动物模型通过广西中医药大学伦理委员会批准, 所有实验过程都是遵循国立健康研究院有关实验动物护理和使用指导原则。

2 药物 盐酸哌替啶注射液 1 mL/50 mg, 由青海制药有限公司生产, 批号: H63020022。

3 试剂及仪器 LightCyclerR480 DNA SYBR Green I Master 由生工生物工程上海 (股份) 有限公司提供。TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司, 定量 PCR 试剂: ABI SybrGreen PCR Master Mix (2X) 购于 ABI 公司 DNA Marker, 第一链 cDNA 合成试剂盒 (AMV First Strand cDNA Synthesis Kit), 氯仿, 异丙醇, 无水乙醇, DEPC H_2O , $6 \times$ DNA Loading Dye, $10 \times$ TAE (400 mmol/L Tris-acetate and 10 mmol/L EDTA, pH 8.0), 等其他试剂均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司。Pdyn、Oprk1、NET、 $\alpha 2$ -AR、5-HT、5-HT2A、DA、Drd2 蛋白表达: BCA 蛋白浓度测定试剂盒由 Biovision 公司提供, 抗 Pdyn 抗体、由 Novus 公司提供, 抗 Oprk1 抗体、抗 β -actin 抗体由 Abnova 公司提供, 二抗及化学发光试剂盒 Abbkine 公司提供; 抗 NET 抗体、抗 $\alpha 2$ -AR 抗体及抗 β -actin 抗体由 Santa Cruz 公司提供, 二抗及化学发光试剂盒由 Abbkine 公司提供; 抗 5-HT、5-HT2A 抗体由 Abcam 公司提供; 二抗及化学发光试剂盒由 Abbkine

公司提供; 抗 DA 抗体、抗 Drd2 抗体由 BLOSS 公司提供, 抗 β -actin 抗体由 Abnova 公司提供, 二抗及化学发光试剂盒由 Abbkine 公司提供。电针仪为北京华卫产业开发公司生产 LH202H 韩氏穴位神经刺激仪; 电针为天津杏林书院医疗器械有限公司生产的汉医牌 $0.17 \text{ mm} \times 7 \text{ mm}$ 。PCR 反应扩增仪 (美国 ABI 公司 Applied Biosystems 2720 Thermal cycler); YXJ-2 离心机 (湘仪离心机仪器有限公司); H6-1 微型电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂); 凝胶成像系统 (Gene Genius 公司); TU-1901 紫外分光光度计 (北京普析通用仪器有限公司); StepOne 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

4 方法

4.1 造模及分组 按雌、雄 1:1 比例合笼, 每日上午检查托盘, 发现阴栓, 取出编号, 并连续 2 日对大鼠进行阴道脱落细胞涂片检查发现卵圆体即确定妊娠^[3]。120 例造模成功的孕鼠按随机数字表法^[4]分为空白组 (A 组), 电针三阴交穴组 (B 组), 电针合谷穴组 (C 组), 电针合谷加三阴交组 (D 组), 电针血海穴组 (E 组), 药物组 (F 组), 每组 20 只。

4.2 干预方法 孕鼠在妊娠第 19 天开始灌服蓖麻引产诱发大鼠启动产程^[5]。当大鼠产程启动时, 取穴^[6]电针及应用药物镇痛。具体干预方法如下: A 组: 未行任何处理, 自然分娩; B 组: 在两后肢内踝尖直上 10 mm 处, 直刺 3 mm, 旁开 1 mm 同一穴再针入 1 针; C 组: 在两前肢第一、二掌骨之间取穴, 直刺 1 mm, 旁开 1 mm 同一穴再针入 1 针; D 组: 方法同 B、C 组; E 组: 在两后肢股内侧中间, 髌底内侧端至耻骨联合连线的下 1/9 处取穴, 直刺 5 mm, 旁开 1 mm 同一穴再针入 1 针。避免两针相触短路, 胶布固定后与电针仪连接, 同一对正、负极连接同一穴, 能引起大鼠肢体轻微抖动为针刺得气, 频率为 2 Hz 和 100 Hz 交替的疏密波, 电压 9 V, 强度 $0.1 \sim 0.3 \text{ mA}$, 波宽 $0.2 \sim 0.6 \text{ ms}$, 每次 20 min, 每隔 2 h 电针 1 次直至产下最后 1 个仔鼠止。F 组: 在孕鼠产程启动后, 用量按体表面积等效剂量换算比率计算^[7], 皮下注射盐酸哌替啶 1 次。

4.3 大鼠痛阈测定 采用热水甩尾痛阈测定方法^[8], 各组大鼠在干预措施前、后分别以 (50 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$

表 1 Real-time PCR 引物序列

基因	正向引物序列	反向引物序列	引物长度 (bp)
β-actin	5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	5'-CGGACTCATCTGACTCCTGCT-3'	229
Pdyn	5'-TAAGTGGGACAACCAAGAAACG-3'	5'-AGGGGAAGTGTTATCCATCAAA-3	126
Opark1	5'-AGACCGCAACCAACATCTACA-3'	5'-GCACAGAACATCTCCAAAAGG -3'	122
NET	5' GAGCTTT GTTATTACTTCATGTCCC 3'	5'TGCCTTCTCAATGCTACCCA 3'	136
α2-AR	5'-ACACTCGAGGGATCCTGGCCT,CTCTCGGATC-3'	5'ACAA AGCTTGGGCGCAAAGCTGCCCTCGG-3'	217
DA	5'-CACCTTTGTTTTGACTGGCTACT-3'	5'-CCTGGCGAGCACAGTAATCA-3'	133
Drd2	5'-CAAGCATCCTGAACCTGTGTG-3'	5'-GGTCTGTATTGTTGAGTCCGAAG-3'	177
5-HT	5'-GTCACCTGCGACCTGTTTATC-3'	5'-GCGTCCTTTTGTTACATAGTCT-3'	130
5-HT2A	5'-TGCCACCAACTATTTCTGAT-3'	5'-AAGAGCACATCCAGGTAAATCC-3'	153

热水浸烫鼠尾 4 cm,记录入水至甩尾出水的间隔时间(测量 3 次,取其均数,时间按秒计算)。因大鼠针刺后最高痛阈值并不都在同一时段出现,针刺前、针刺后 10、20、30、60 min 共 5 个测量时段,而统计分析时,则不分时段选取最大痛阈值,观察大鼠鼠尾热水浸烫至甩尾出水的间隔时间。

4.4 标本采集 各组大鼠在接受以上干预措施产下最后 1 个鼠仔时,10%的水合氯醛,按 0.4 mL/100 g 腹腔注射麻醉下断头处死,迅速用生理盐水洗干净,选择大脑灰质及腰脊髓膨大段,标本保存在-80℃冰箱备 Real-time PCR 及 Western blot 检测。所有标本在 3 个月内完成检测。

4.5 观察指标及检测方法

4.5.1 神经递质 Pdyn、NET、DA、5-HT 及其受体 mRNA 表达 采用 Real-time PCR 检测分析。分别将大鼠脑灰质及脊髓腰膨大段提取总 RNA,将 RNA 逆转录为 cDNA,-20℃保存备用。ABI Step One 型荧光定量 PCR 仪系统检测相关基因表达量。引物(表 1)由上海生工生物有限公司设计与合成。扩增条件:95℃ 2 min,95℃ 10 s 变性,60℃ 40 s 退火,72℃ 延伸,40 个循环。TRIzol Reagent 由 invitrogen 提供。

4.5.2 神经递质 Pdyn、NET、DA、5-HT 及其受体蛋白表达 采用 Western blot 检测。分别将大鼠大脑灰质及腰脊髓膨大段提取总蛋白,蛋白定量。将蛋白上样,经 SDS-PAGE 电泳分离,至溴酚蓝刚跑出分离胶时停止电泳。然后转膜(250 mA,90 min),将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉进行封闭 1 h。分别将抗 Pdyn、NET、DA、5-HT 抗体及其受体抗体与 PVDF 膜杂交 2 h,然后 4℃过夜。将膜用 TBST 清洗 4 次,每次 5 min,再与二抗室温下孵育 1 h。TBST 清洗后将膜用化学发光法显影曝光,凝胶图像系统分析目标蛋白灰度值。按试剂盒说明书进行操作。

4.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计分析

软件进行数据处理和分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,干预治疗前后的比较采用配对 t 检验;3 组及以上组间差异比较采用单因素方差分析,组间均数的两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 6 组大鼠干预前后痛阈值比较(表 2) 干预前,各组痛阈值差异无统计学意义($F = 0.736, P = 0.598 > 0.05$);干预后,各组痛阈值差异有统计学意义($F = 216.361, P < 0.01$)。除 A 组($t = 1.017, P = 0.316$)外,与干预前比较,干预后 B、C、D、E、F 组痛阈值均显著升高($t_B = 31.359, t_C = 22.367, t_D = 24.541, t_E = 14.425, t_F = 26.806, P < 0.01$)。与 A 组干预后比较,B、C、D、E、F 组痛阈明显升高($P < 0.01$)。痛阈值由低至高依次为 A 组 < E 组 < D 组 < C 组 < B 组 < F 组。

表 2 6 组大鼠干预前后痛阈值比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	痛阈值 (VAS 评分)	
		干预前	干预后
A	20	6.94 ± 0.89	7.26 ± 1.09
B	20	6.98 ± 1.06	18.26 ± 1.21 *△
C	20	6.86 ± 1.00	15.96 ± 1.52 *△▲▲
D	20	7.31 ± 0.82	14.28 ± 0.97 *△▲▲○
E	20	6.77 ± 1.04	12.14 ± 1.30 *△▲▲○●
F	20	7.01 ± 0.96	19.45 ± 1.84 *△▲○●#

注:与本组干预前比较,* $P < 0.01$;与 A 组干预后比较,△ $P < 0.01$;与 B 组干预后比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与 C 组干预后比较,○ $P < 0.01$;与 D 组干预后比较,● $P < 0.01$;与 E 组干预后比较,# $P < 0.01$

2 6 组大鼠中枢神经递质及其受体 mRNA 表达水平比较

2.1 6 组大鼠大脑灰质神经递质及其受体 mRNA 表达比较(表 3) 与 A 组比较,B、C、D、E、F 组 5-HT、5-HT2A、NET、α2-AR mRNA 表达水平均明显升高,DA、Drd2 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。与 B 组比较,C、D、E 组的 5-HT、5-HT2A mRNA 表

达水平下降, DA、Drd2 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$); F 组 NET、 $\alpha 2$ -AR、5-HT、5-HT2A 表达水平升高, DA、Drd2 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 C 组比较, D、E 组 5-HT、5-HT2A、NET、 $\alpha 2$ -AR mRNA 表达水平下降, DA、Drd2 mRNA 表达水平升高 ($P > 0.05$); F 组 5-HT、5-HT2A、NET、 $\alpha 2$ -AR mRNA 表达水平升高, DA、Drd2 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 D 组比较, E 组 5-HT、5-HT2A、NET、 $\alpha 2$ -AR mRNA 表达水平下降, DA、Drd2 mRNA 表达水平升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); F 组 5-HT、5-HT2A、NET、 $\alpha 2$ -AR mRNA 表达水平升高, DA、Drd2 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 E 组比较, F 组 5-HT、5-HT2A、NET、 $\alpha 2$ -AR mRNA 表达水平升高, DA、Drd2 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 6组大鼠脊髓神经递质及其受体 mRNA 表达比较(表4) 与 A 组比较,B、C、D、E、F 组 Pdyn、

Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平均明显升高; NET、 α 2-AR mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。与 B 组比较,C、D、E 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平下降,NET、 α 2-AR mRNA 表达水平升高;F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平升高,NET、 α 2-AR mRNA 表达水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 C 组比较,D、E 组 Pdyn、Oprk1 mRNA 表达水平下降,NET、 α 2-AR mRNA 表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平升高,NET、 α 2-AR mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。与 D 组比较,E 组 Pdyn、Oprk1 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$);F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平升高,NET、 α 2-AR mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。与 E 组比较,F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平明显升高,NET、 α 2-AR mRNA 表达水平下降($P < 0.01$)。

表3 6组大鼠大脑灰质神经递质及其受体 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Pdyn	Oprk1	NET	α2-AR
A	20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
B	20	1.0138 ± 0.0429	1.0106 ± 0.0094	1.3535 ± 0.3008 *	1.3465 ± 0.3124 *
C	20	1.0112 ± 0.0597	1.0102 ± 0.0098	1.3961 ± 0.2977 *	1.3068 ± 0.3293 *
D	20	1.0107 ± 0.0413	1.0088 ± 0.0063	1.3823 ± 0.3527 *	1.3381 ± 0.3963 *
E	20	1.0077 ± 0.0413	0.9577 ± 0.2017	1.3883 ± 0.3400 *	1.3063 ± 0.2767 *
F	20	1.0162 ± 0.0516	1.0112 ± 0.0093	1.6084 ± 0.4064 *△▲●	1.5475 ± 0.3585 *△▲●

组别	<i>n</i>	5-HT	5-HT 2A	DA	Drd2
A	20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
B	20	2.0278 ± 0.4904 *	1.7573 ± 0.2166 *	0.5536 ± 0.2802 *	0.5152 ± 0.2736 *
C	20	1.6500 ± 0.4331 *△△	1.3939 ± 0.1318 *△△	0.7150 ± 0.2203 *△△	0.7337 ± 0.3382 *△△
D	20	1.6651 ± 0.4185 *△△	1.5129 ± 0.1477 *△△	0.7096 ± 0.2384 *△△	0.7331 ± 0.2536 *△△
E	20	1.4127 ± 0.4304 *△△	1.2401 ± 0.1224 *△△	0.7118 ± 0.2213 *△△	0.7005 ± 0.2356 *△△
F	20	2.1782 ± 0.3540 *△△▲▲○○●●	2.0939 ± 0.3158 *△△▲▲○○●●	0.5314 ± 0.1835 *△△▲▲○○●●	0.4994 ± 0.2330 *△△▲▲○○●●

注:与 A 组比较,* $P<0.01$;与 B 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与 C 组比较, $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$;与 D 组比较, $\circ P<0.05$, $\circ\circ P<0.01$;与 E 组比较, $\bullet P<0.05$, $\bullet\bullet P<0.01$

表4 6组大鼠脊髓神经递质及其受体 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Pdyn	Oprk1	NET	α2-AR
A	20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
B	20	1.8014 ± 0.2425 *	1.8835 ± 0.2358 *	0.3931 ± 0.1721 *	0.3689 ± 0.1891 *
C	20	1.6177 ± 0.1242 *△	1.7386 ± 0.1236 *△	0.5793 ± 0.3482 *△△	0.5862 ± 0.3410 *△△
D	20	1.4684 ± 0.2804 *△△▲	1.4152 ± 0.2898 *△△▲	0.7393 ± 0.3158 *△△▲	0.8124 ± 0.3414 *△△▲
E	20	1.3240 ± 0.2815 *△△▲○	1.1689 ± 0.2468 *△△▲○	0.7358 ± 0.2178 *△△▲	0.7460 ± 0.2394 *△△▲
F	20	1.9774 ± 0.2457 *△▲○●	2.2170 ± 0.2496 *△▲○●	0.3446 ± 0.1606 *△▲○●	0.3515 ± 0.2030 *△▲○●

组别	<i>n</i>	5-HT	5-HT2A	DA	Drd2
A	20	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
B	20	1.5954 ± 0.1407 *	1.4050 ± 0.3472 *	0.8931 ± 0.1745	0.8798 ± 0.1995
C	20	1.3916 ± 0.0225 *△△	1.1186 ± 0.3336 *△△	0.8860 ± 0.1895	0.8536 ± 0.5097
D	20	1.4905 ± 0.1369 *△△	1.2136 ± 0.3715 *△△	0.8921 ± 0.1517	0.8233 ± 0.2460
E	20	1.2907 ± 0.1618 *△△	1.0645 ± 0.5737 *△△	0.8841 ± 0.1751	0.8828 ± 0.2879
F	20	1.7024 ± 0.0983 *△△▲○●	1.3106 ± 0.3031 *△△▲○●	0.9911 ± 0.2987	0.8733 ± 0.3220

注:与 A 组比较,* $P<0.01$;与 B 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与 C 组比较, $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$;与 D 组比较, $\circ P<0.01$;与 E 组比较, $\bullet P<0.01$

组比较,D、E 组 5-HT、5-HT2A、NET、 α 2-AR 蛋白表达水平下降,DA、Drd2 蛋白表达水平升高($P > 0.05$);F 组 5-HT、5-HT2A、NET、 α 2-AR 蛋白表达水平升高,DA、Drd2 蛋白表达水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 D 组比较,E 组 5-HT、5-HT2A、NET、 α 2-AR 蛋白表达水平下降,DA、Drd2 蛋白表达水平升高,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);F 组 5-HT、5-HT2A、NET、 α 2-AR 蛋白表达水平升高,DA、Drd2 蛋白表达水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 E 组比较,F 组 5-HT、5-HT2A、NET、 α 2-AR 蛋白表达水平升高,DA、Drd2 蛋白表达水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

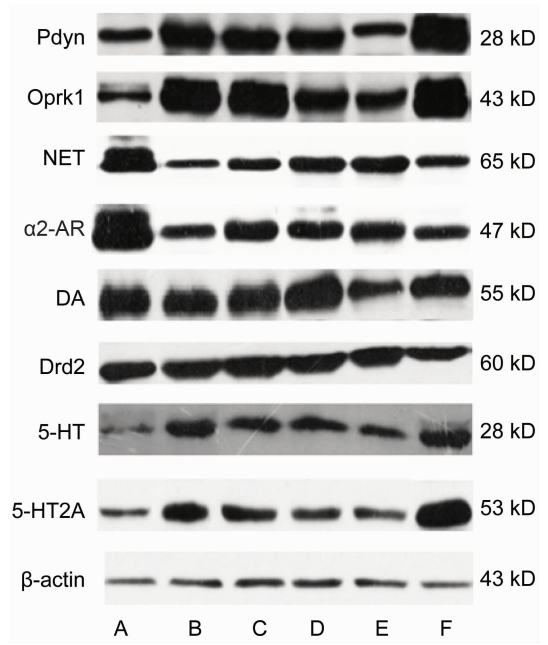


图2 6组大鼠脊髓膨大段神经递质蛋白电泳图

表5 6组大鼠大脑灰质神经递质及其受体蛋白灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

注:与 A 组比较,* $P<0.01$;与 B 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与 C 组比较, $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$;与 D 组比较, $\circ P<0.05$, $\circ\circ P<0.01$;与 E 组比较, $\bullet P<0.05$, $\bullet\bullet P<0.01$

3.2 6 组大鼠脊髓神经递质及其受体蛋白表达水平比较(表 6) 与 A 组比较,B、C、D、E、F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A 蛋白表达水平均明显升高,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平下降($P < 0.01$);与 B 组比较,C、D、E 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A 蛋白表达水平下降,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平升高;F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A 蛋白表达水平升高,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 C 组比较,D、E 组 Pdyn、Oprk1 蛋白表达水平下降,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A mRNA 表达水平升高,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平下降($P < 0.01$)。与 D 组比较,E 组 Pdyn、Oprk1 蛋白表达水平下降($P < 0.01$),5-HT、5-HT2A、NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$);F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A 蛋白表达水平升高,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平下降($P < 0.01$)。与 E 组比较,F 组 Pdyn、Oprk1、5-HT、5-HT2A 蛋白表达水平明显升高,NET、 $\alpha 2$ -AR 蛋白表达水平下降($P < 0.01$)。

讨 论

分娩时,由于子宫收缩、子宫壁血管暂时闭塞缺血、损伤使细胞破裂,释放致痛物质刺激传递伤害信息的神经纤维末梢,激发传入冲动,引起剧烈疼痛。现代医学认为痛觉和痛反应的产生与神经和神经递质及其受体相互交织作用密切相关。针刺具有镇痛作用,为国、内外医学界所公认。针刺穴位信号被感觉神经及感受器感应后,通过外周神经纤维传递到脊髓及大脑相关部位的中枢神经细胞分泌神经递质,又通过激活细胞受体发挥镇痛作用^[1]。而针刺不同穴位之间,神经递质镇痛机制,一直是人们最为关注的问题。

张吉等^[9]认为:针刺镇痛是涉及整个神经系统,既涉及中枢神经系统及其核团,又涉及周围神经及其传导体系。继后,韩济生教授发现针刺可引起内源性阿片肽等中枢性神经递质的释放,发挥镇痛效应^[10],其诸多研究成果表明,针刺镇痛有着不容置疑的神经化学基础^[11]。大量电生理研究结果已证明,针刺信号被感觉神经及感受器感应后,经过脊髓后角(初级传入中枢)和丘脑(高级传入中枢)使中枢神经细胞分泌神经递质 5-HT、NE、DA 及内啡肽等物质,这些物质又通过与靶细胞膜受体结合,相互作用后激活胞内信息传导途径,产生一系列的生物效应^[12]。随着针刺作用机制研究的不断深入,发现在脑中缝核群有丰富的 5-HT 能神经元,针刺时,脑内 5-HT 的合成、释放增加而参与针刺镇痛^[13]。有实验证实,针刺治疗大鼠疼痛模型可使大鼠脑干及大脑皮层的 5-HT 含量提高,并持续 30 min 以上^[14],说明针刺镇痛效应与脑内 5-HT 含量变化有密切关系。NE 能神经纤维在中枢的分布也非常广泛,以中脑网状结构、脑桥的蓝斑以及延髓网状结构的腹外侧部分居多,被交感神经节后纤维作为神经递质释放以发挥作用。研究表明抑制 NET 对单胺重吸收抑制剂与阿片类药物导的镇痛作用的协同作用是必须的^[15]。 $\alpha 2$ -AR 能将细胞外的刺激信息通过放大转导的作用,传输到细胞内,而引发胞内一系列生物学反应。它有反馈抑制 NE 分泌的作用。NET 能将神经元释放的 NE 再摄取回突触前膜内,调控突触间隙中的 NE 浓度,终止神经冲动信号、维持受体对神经递质的敏感性^[16]; $\alpha 2$ -AR 可通过反馈抑制 NE 分泌的作用,提示 NE 是通过 NET、 $\alpha 2$ -AR 的作用,调控疼痛的发生发展的作用机制^[17];而位于中枢的 DA 及受体系统,是一类经典的神经递质,在黑质和纹状体部分是痛觉调制区,参与伤害性信息传递及介导痛觉调制,

表 6 6 组大鼠脊髓神经递质及其受体蛋白灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Pdyn	Oprk1	NET	$\alpha 2$ -AR
A	20	0.4120 $\pm$ 0.0103	0.5025 $\pm$ 0.0271	0.76 $\pm$ 0.30	0.49 $\pm$ 0.12
B	20	1.7600 $\pm$ 0.0301 *	1.6510 $\pm$ 0.0428 *	0.29 $\pm$ 0.18 *	0.13 $\pm$ 0.06 *
C	20	1.2785 $\pm$ 0.0146 * Δ	1.1520 $\pm$ 0.0276 * Δ	0.45 $\pm$ 0.17 * $\Delta\Delta$	0.35 $\pm$ 0.14 * $\Delta\Delta$
D	20	0.9045 $\pm$ 0.0074 * $\Delta\Delta\Delta$	0.9775 $\pm$ 0.0092 * $\Delta\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.26 * $\Delta\Delta\Delta$	0.32 $\pm$ 0.14 * $\Delta\Delta\Delta$
E	20	0.6870 $\pm$ 0.0111 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.7380 $\pm$ 0.0477 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.57 $\pm$ 0.21 * $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.37 $\pm$ 0.10 * $\Delta\Delta\Delta\Delta$
F	20	1.8335 $\pm$ 0.0174 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.7550 $\pm$ 0.0040 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.20 $\pm$ 0.11 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.11 $\pm$ 0.05 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$
组别	n	5-HT	5-HT2A	DA	Drd2
A	20	0.2070 $\pm$ 0.0035	0.0918 $\pm$ 0.0305	0.50 $\pm$ 0.16	0.70 $\pm$ 0.14
B	20	0.2930 $\pm$ 0.0005 *	1.7513 $\pm$ 0.0141 *	0.41 $\pm$ 0.23	0.74 $\pm$ 0.30
C	20	0.1755 $\pm$ 0.0012 * $\Delta\Delta$	1.1510 $\pm$ 0.0033 * $\Delta\Delta$	0.40 $\pm$ 0.15	0.68 $\pm$ 0.25
D	20	0.1780 $\pm$ 0.0004 * $\Delta\Delta$	1.4900 $\pm$ 0.0093 * $\Delta\Delta$	0.39 $\pm$ 0.19	0.63 $\pm$ 0.21
E	20	0.1740 $\pm$ 0.0004 * $\Delta\Delta$	0.8000 $\pm$ 0.0370 * $\Delta\Delta$	0.42 $\pm$ 0.23	0.68 $\pm$ 0.18
F	20	0.3023 $\pm$ 0.0035 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	1.7800 $\pm$ 0.0140 * $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.42 $\pm$ 0.18	0.67 $\pm$ 0.21

注:与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与 C 组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与 D 组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$;与 E 组比较, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 。

研究证实,激活 Drd2 受体,使 DA 产生镇痛作用^[18]; Dyn 是一内源性多肽,由 Pdyn 所产生,能够通过 K-阿片肽受体起镇痛作用,在脊髓背角的 K-阿片受体被内源性阿片肽激活后,可以改变痛觉传入纤维对疼痛刺激信号的反应性,通过促使内源性 Dyn 的释放,激活内源性的 Dyn/K 受体镇痛系统,实现中枢镇痛效应^[19]。而 Dyn 在大脑无明显镇痛作用^[20],100 Hz 电针可使大鼠脊髓节段产生大量的强啡肽,产生镇痛作用^[21]。神经递质及其受体间存在相互交织作用,内阿片肽释放可通过抑制 NE 能神经元的活动而实现其镇痛效应,而 DA 系统对内阿片肽系统的释放又有一定的抑制性作用,NE 受体激动时可使 NE 释放减少,对其产生负反馈调节、协同阿片类药物提高痛阈值的作用;DA 镇痛是由于 Drd2 受体介导激活中枢阿片肽系统产生镇痛效果等,说明神经递质参与针刺镇痛,是通过促进脑内吗啡样物质释放,作用于阿片受体而产生镇痛作用。

不同穴位产生不同针效作用,以三阴交穴较好,血海穴相对较差。对于穴位间出现的这种差异性,推测可能与穴位所在的经络腧穴功效及其所处的神经解剖学位置有关。三阴交穴属于足太阴脾经、足厥阴肝经、足少阴肾经的交会穴,针刺其穴可以同时激发肝、脾、肾、任脉等多条经脉的经气,从而“气至病所”,起到缓解分娩疼痛的作用。而支配大鼠子宫的神经纤维来自 T10 - S2。峰值在 T13 - L2 和 L6 - S10,大鼠三阴交神经纤维来自 L3 - L6^[22]。由此证实,经络腧穴间存在不同针效作用是与神经化学、神经解剖学基础有关。

由于,目前临床常用的分娩镇痛药物如,杜冷丁注射,镇痛效果明显,但其有可能通过胎盘进入胎儿体内对新生儿产生一过性的不良影响。因此,本研究成果可为分娩镇痛提供一种有效、操作简单、对母婴安全、无损伤的治疗方法;为电针分娩镇痛的进一步研究提供科学依据和理论基础。

参 考 文 献

- [1] 任秋生,王艳芳,王均炉,等. 电针合谷三阴交对布比卡因分娩镇痛最低有效浓度的影响[J]. 浙江中医杂志, 2015, 50(2): 132 - 133.
- [2] 李甲文. 针刺镇痛的中枢神经递质基础[J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(1): 160 - 161.
- [3] 赵春梅,郑文兰. 阴道脱落细胞检查对确定大鼠妊娠价值的探讨[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(2): 31 - 32.
- [4] 孙振球,徐勇主编. 医学统计学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 723 - 724.
- [5] 高杰,孙念怙,王凤云. 蓖麻油引产对妊娠大鼠分娩的影响[J]. 中国医学科学院学报, 1998, 20(5):

367 - 370.

- [6] 余曙光,郭义主编. 实验针灸学[M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2014: 152 - 152.
- [7] 魏伟,吴希美,李元健主编. 药理实验方法学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69 - 73.
- [8] Wegert S, Ossipov MH, Nichols ML, et al. Different activities of intrathecal Mk-801 or morphine to alter responses to thermal and mechanical stimuli in normal or nerve-injured rats[J]. Pain, 1997, 97(1): 57 - 64.
- [9] 张吉,张宁. 针刺镇痛机制的探讨[J]. 中国针灸, 2007, 27(1): 72 - 75.
- [10] 杨光华,饶淑华,鲍蔚敏. 韩济生与针刺镇痛原理的发现[J]. 中医研究, 1997, 46(6): 46.
- [11] 韩济生. 针刺镇痛频率特异性的进一步证明[J]. 针刺研究, 2001, 26(3): 224 - 227.
- [12] 韩济生. 针麻镇痛研究[J]. 针刺研究, 2016, 41(5): 377 - 387.
- [13] 韩济生,周保和,卢振初,等. 中枢 5 - 羟色胺在针刺镇痛中的作用[J]. 中国科学: 数学, 1978, (5): 105 - 114.
- [14] 梁繁荣,刘雨星,陈瑾,等. 电针镇痛后效应与脑干 5-HT 下丘脑 B-EP 含量的关系[J]. 上海针灸杂志, 2001, 20(3): 37 - 39.
- [15] Shen F, Tsuruda PR, Smith JA, et al. Relative contributions of norepinephrine and serotonin transporters to antinociceptive synergy between monoamine reuptake inhibitors and morphine in the rat formalin model[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74891.
- [16] Schroeder C, Jordan J. Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 303(11): H1273 - 1282.
- [17] Chabot-Doré AJ, Millecamps M, Naso L, et al. Dual allosteric modulation of opioid antinociceptive potency by $\alpha 2A$ -adrenoceptors[J]. Neuroparmacology, 2015, 12: 285 - 300.
- [18] Ansah OB, Leite-Almeida H, Wei H, et al. Striatal dopamine D2 receptors attenuate neuropathic hypersensitivity in the rat[J]. Exp Neurol, 2007, 205(2): 536 - 546.
- [19] Rivera-Arconada I, Benedet T, Roza C, et al. DREAM regulates BDNF-dependent spinal sensitization[J]. Mol Pain, 2010, 6: 95.
- [20] 何承敏,韩济生. 大鼠中脑导水管周围灰质内微量注射强啡肽抗体对不同频率电针镇痛的影响[J]. 针刺研究, 1990, 15(2): 97 - 102.
- [21] 崔彩莲,吴臻楨,田津斌,等. 100 Hz 电针促进吗啡依赖和戒断大鼠脊髓强啡肽的释放[J]. 中国疼痛医学杂志, 1998, 4(2): 88 - 93.
- [22] 杨安峰,杨平主编. 大鼠的解剖和组织[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 176 - 179.

(收稿:2016-05-16 修回:2017-04-06)

责任编辑:段碧芳

英文责编:张晶晶