

电针对海洛因依赖大鼠戒断症状及相关脑区一氧化氮合酶表达的影响

刘宜军 刘惠芬 王育红 甄利波 赖苗军 朱华强 陈为升 杨国栋 周文华

【摘要】 目的 观察电针对海洛因依赖大鼠戒断症状及中央灰质背侧部(CGd)、被盖背外侧核(ldt)和蓝斑(LC)等脑区一氧化氮合酶(Nitricoxide synthase, NOS)阳性神经元表达的影响。方法 SD大鼠随机分为空白对照组、戒断组、捆绑组和电针组。大鼠逐日递增皮下注射海洛因9d建立海洛因依赖模型,同时每天进行电针干预。纳洛酮激发戒断症状、评分。还原型辅酶II黄递酶组织化学法染色,测定相关脑区NOS阳性神经元表达。结果 空白对照组纳洛酮激发戒断症状总评分为(5.4±1.3)分,戒断组为(18.7±3.9)分,2组间差异有显著性($P<0.05$),电针组为(10.7±3.6)分,和戒断组相比差异有显著性($P<0.05$),捆绑组为(14.3±4.8)分,与戒断组比较差异无显著性($P>0.05$),表明电针可以有效减轻海洛因依赖大鼠纳洛酮激发戒断症状;空白对照组CGd、ldt和LC等脑区NOS阳性神经元表达水平均较低,戒断组上述部位NOS阳性神经元表达较空白对照组均显著增多($P<0.05$),而电针处理明显减少戒断大鼠这些部位NOS阳性神经元的表达($P<0.05$)。结论 电针能有效控制海洛因依赖大鼠戒断症状,其作用机制可能与其调节相关脑区NOS阳性神经元表达有关。

【关键词】 电针; 海洛因依赖; 戒断症状; 一氧化氮合酶

Effects of electroacupuncture on withdrawal symptoms and expression of NOS in related encephalic regions in heroin dependent rats LIU Yi-jun, LIU Hui-fen, WANG Yu-hong, et al. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of electroacupuncture(EA) on the withdrawal symptoms of heroin dependent rats and the nitricoxide synthase(NOS) expression in encephalic regions including central gray dorsal part(CGd), laterodorsal tegmental nucleus(ldt) and locus ceruleus(LC). **Methods** SD rats were randomly divided into normal control, withdrawal, restrained and EA group. Rats were injected subcutaneously with heroin according a gradually increasing dose scheme for 9 days to establish model of heroin dependence; rats were treated with EA during the heroin treatment. Naloxone(4 mg/kg) was injected intraperitoneally four hours after the last heroin injection. Total withdrawal symptoms scores were assessed within half an hour just after naloxone injection. Nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) staining was used to determine the expression of positive neurons of nitric oxide synthase(NOS) in the related encephalic regions. **Results** The total scores of withdrawal symptoms precipitated by naloxone in normal control group was (5.4±1.3)points and that of withdrawal group was (18.7±3.9)points. There was significant difference between the two groups($P<0.05$). The EA group's was (10.7±3.6) points. There was significant difference between the EA and withdrawal group($P<0.05$). The expression of Nitricoxide synthase positive neuron in CGd,ldt and LC in normal control group was rather low, but that of withdrawal group was significant increased($P<0.05$). There was dramatical decrease in EA group contrast to the withdrawal group($P<0.05$). There was no difference between the restrained group and the withdrawal group($P>0.05$). **Conclusion** EA could inhibit the withdrawal symptoms of heroin dependence rats, whose mechanism might be involved in the alteration of expression of NOS positive neuron in related encephalic regions.

【Key words】 Electroacupuncture; Heroin dependence; Withdrawal symptoms; NOS

一氧化氮合酶(Nitricoxide synthase, NOS)是一氧化氮(Nitricoxide, NO)的限速酶^[1],在NO的产生过程中起重要作用。机体内存在3种类型NOS:内皮型、神

经元型(nNOS)和诱导型,其中nNOS在慢性海洛因依赖和戒断中起重要作用。研究发现吗啡依赖和戒断动物脑和脊髓nNOS的合成及mRNA水平明显增加^[2,3],慢性吗啡处理诱导中央灰质背侧区(central gray, dorsal part, CGd)及伏隔核(neucleus accumbens, NAc)区NOS阳性细胞表达增多,腹腔或脑室给予NOS抑制剂能够显著减轻吗啡依赖大鼠纳洛酮激发的戒断症状^[4],上述研究表明NOS参与了吗啡依赖和戒断过程。韩济生等^[5-8]系列研究发现2/100 Hz电针(EA)或经皮电刺激(TENS)可抑制大鼠和人吗啡戒断

基金项目:国家自然科学基金项目(30670675);宁波市科技计划项目(2002C10030)

作者单位:201203 上海,上海中医药大学(刘宜军、甄利波);宁波微循环与莨菪类药物研究所(刘惠芬、赖苗军、朱华强、陈为升、杨国栋、周文华);中南大学湘雅二院精神卫生研究所(王育红)

通讯作者:周文华, Email:whzhou@vip.163.com

综合征,其作用机制可能是 EA 或经皮电刺激促使中枢神经系统释放内源性阿片肽,进而抑制其戒断症状。至于 EA 治疗吗啡依赖的具体的神经分子学机制很复杂,至今仍不甚清楚。本研究利用 NADPH-d 组织化学方法观察电针“三阴交”对海洛因依赖大鼠相关脑区 NOS 表达的影响,从分子生物学方面探讨电针对戒断症状影响的机制。

材料与方法

一、材料

1. 实验动物: 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只,由浙江省实验动物中心提供,体质量(250 ± 20)g。

2. 主要试剂与仪器: 海洛因(公安部物证鉴定中心提供),β-NADPH(Sigma 公司),氯化硝基四氮唑蓝(Fluka 公司);LEICACM1850 型冰冻切片(德国 Leica 公司),Olympus BX 51 显微镜(日本 Olympus 公司),G6805-DEA 治疗仪(汕头医用设备有限公司)。

二、方法

1. 分组与处理方法: SD 大鼠随机分为 4 组(n = 6): 空白对照组、海洛因戒断组、捆绑组和电针组。海洛因依赖模型参照文献^[9]: 海洛因首日剂量 7.5 mg/kg,分 3 次皮下注射,并按 7.5 mg/kg 逐日递增的方法连续 9 d 建立大鼠海洛因躯体依赖模型,末次注射海洛因 4 h 后腹腔注射纳洛酮 4 mg/kg,随即观察大鼠 30 min 内戒断症状(包括异常姿势、湿狗样摇动、激惹、咬牙、流泪、腹泻和流涎等),按柳田知司评分法^[10]进行总评分,此组为戒断组;电针组在戒断组的基础上于每天首次海洛因给药后,将大鼠捆绑固定,选双侧“三阴交”(SP6)^[11]电针干预,进针深度 5 mm,频率 50 Hz,电流强度以其后肢轻微抖动为度,时间 30 min,每天 1 次,连续 9 d;捆绑组除与电针组相比每天首次注射海洛因后只捆绑 30 min。空白对照组以等容积生理盐水代替海洛因按上述方法注射 9 d。

2. 组织取材与 NADPH-d 染色: 3% 戊巴比妥钠腹腔麻醉(60 mg/kg),200 ml 生理盐水快速灌流,4% 多聚甲醛 200 ml 心脏灌注 1 h,取全脑,置入 4% 多聚甲醛溶液中 4℃ 固定,24 h 后以 30% SPB 4℃ 置换固定液至其沉底。根据大鼠脑立体定位图谱^[12]确定核团位置,以冰冻切片机在大脑 CGd(按前囟位向尾侧 6.6 ~ 6.8 mm)、ldt(按前囟位向尾侧 9.0 ~ 9.2 mm)和 LC(按前囟位向尾侧 9.2 ~ 9.4 mm)部位冠状切取 30 μm 脑片各 5 张。将切片收集于 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)中漂洗 10 min,重复 2 次,加入含 0.3% Triton X-100、0.6 mg · ml⁻¹ β-NADPH 和 0.5 mg · ml⁻¹ 氯化硝基四氮唑蓝(NBT)的 PB 液(pH 8.0)中,37℃ 孵育 40 min, PBS 终止反应。

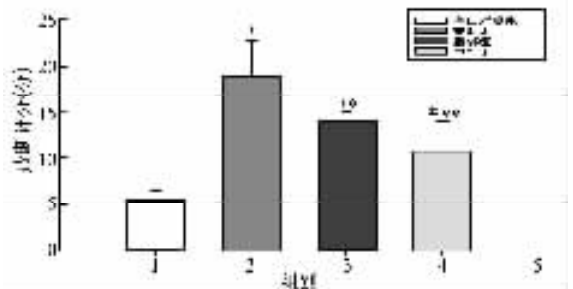
3. 图像处理与统计分析: 每组选取对应冠状面脑片 5 张,显微镜下对 NOS 阳性细胞进行计数并测量其积分光密度。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS

11.5 统计软件进行统计学处理,多组间比较,用 ANOVA 单因素方差分析。

结果

一、电针对海洛因依赖大鼠戒断症状的影响

海洛因依赖大鼠纳洛酮激发戒断症状总评分为(18.7 ± 3.9)分,与空白对照组[(5.4 ± 1.3)分]相比差异明显(P < 0.05, n = 6);表明海洛因依赖大鼠戒断模型成功建立。电针处理戒断总评分为(10.7 ± 3.6)分,与戒断组间差异有显著性(P < 0.05);而捆绑组戒断总评分为(14.3 ± 4.8)分,与海洛因戒断组比较差异无显著性(P > 0.05),表明电针可以明显减轻海洛因依赖大鼠的戒断症状。见图 1。



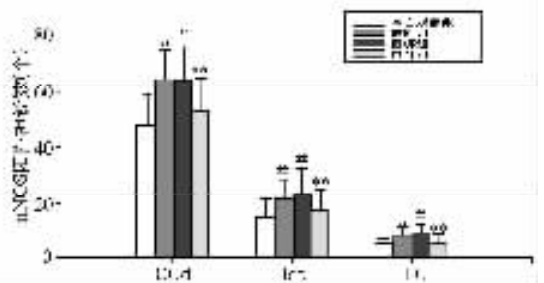
与空白对照组相比#P < 0.05;
与戒断组相比*P > 0.05;
与戒断组相比**P < 0.05

图 1 海洛因依赖大鼠戒断症状总评分比较

二、电针对大鼠相关脑区 nNOS 阳性神经元表达的影响

nNOS 免疫反应阳性物质主要位于神经元胞体和突起的胞浆内,呈深棕色,背底呈淡黄或不着色。

1. 大鼠脑内 NOS 阳性神经元数量的变化: 海洛因戒断组和捆绑组大鼠 CGd、ldt 及 LC 脑区内 NOS 神经元数与空白对照组相比均显著增多(P < 0.05);电针处理后能明显减少海洛因戒断大鼠上述脑区内 NOS 阳性神经元数(P < 0.05)。见图 2。

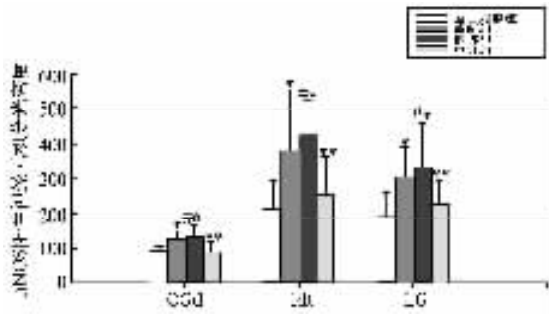


与空白对照组相比#P < 0.05;
与戒断组相比*P > 0.05, **P < 0.05

图 2 电针对大鼠相关脑区 nNOS 阳性神经元表达数的影响

2. 大鼠脑内 NOS 阳性神经积分光密度的变化: 海洛因戒断组与捆绑组大鼠 CGd、ldt、LC 脑区内 NOS 神经积分光密度分别和空白对照组相比均显著升

高, 差异有显著性($P < 0.05$); 而电针处理后能明显降低海洛因戒断大鼠 CGd、ldt、LC 内 NOS 阳性神经元积分光密度($P < 0.05$)。见图 3。



与空白对照组相比# $P < 0.05$;
与戒断组相比* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$

图 3 电针对大鼠相关脑区 nNOS 阳性神经元积分光密度的影响

讨 论

中医学认为戒断症状的主要病机为余毒未清, 正气已虚, 治则为清热解毒, 扶助正气, 调畅气血。三阴交为足三阴经交会穴, 能调节脾肝肾, 促使气血精恢复正常, 正气充足, 则抗邪外出, 此为选穴依据。

研究表明电针可以有效控制阿片类药物戒断症状。温屯清等^[13]针刺合谷、内关、外关及足三里治疗海洛因戒断综合征和口服盐酸洛非西定片对照组相比起效快, 临床疗效满意; 刘胜等^[14]发现电针“肾俞”穴能明显抑制大鼠戒断症状, 并阐明了电针对阿片类药物依赖作用涉及多个中枢核团, 包括中脑导水管周围灰质区及下丘脑。本实验发现电针“三阴交”可以有效减轻海洛因依赖大鼠戒断症状, 与上述研究结果相一致。

有研究表明, NO 在阿片类药物的成瘾过程中起中间信使的作用^[15,16]。NOS 是 NO 合成的关键因素, 脑组织中主要分布是 nNOS, 它的化学结构和化学特性与 NADPH-d 有共同之处。因为 NO 很不稳定, 合成后很快被氧化, 以亚硝酸根和硝酸根的形式存在于体内, 所以常用简便的组织化学染色方法显示 NADPH-d, 对 NOS 进行定位。神经元型 NOS(nNOS)在慢性海洛因依赖和戒断中起重要作用。nNOS 是一种依赖钙离子/钙调蛋白(Ca^{2+}/CaM)的酶, 主要存在于神经元内, 其生物合成量与胞内 Ca^{2+} 浓度密切相关。胞内 Ca^{2+} 的来源有两个, 即胞外 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 的释放。近来的研究表明, 在慢性吗啡刺激引起的神经可塑性变化中, N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体敏感性增加, 引起胞外 Ca^{2+} 内流是其主要表现之一^[17,18], 而吗啡耐受和依赖时胞内储存 Ca^{2+} 释放又明显增加^[19], 结果均导致 nNOS 的生成增加。

文献资料显示 LC^[20] 和 CGd^[21] 的 NMDA 受体激活及 NOS 合成增加与吗啡依赖的形成和戒断密切相关, ldt 处 NOS 表达较多, 因此, 本实验选择了 CGd、ldt 以及 LC 等部位进行观察。本实验结果也显示慢性海洛因依赖大鼠戒断时 CGd、LC、ldt 等处 nNOS 阳性神

经元数量显著增多, 积分光密度明显增强, 电针治疗后 nNOS 阳性神经元显著减少, 积分光密度减弱, 表明电针对海洛因依赖大鼠戒断症状具有控制作用, 其机制可能与其调节大脑相应脑区的 NOS 表达有关, 但具体机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992, 8:113-116.
- Macheska H, Ziolkowska B, Mika J, et al. Chronic morphine increases biosynthesis of nitric oxide synthase in the rat spinal cord. *Neuro Report*, 1997, 8:2743-2747.
- Cuellar B, Fernandez AP, Lizasoain I, et al. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000, 148:66-73.
- Medvedev IO, Dravolina OA, Bespalov AY. Differential effects of nitric oxide synthase inhibitor, 7-nitroindazole, on discriminative stimulus and somatic effects of naloxone in morphine dependent rats. *Eur J Pharmacol*, 1999, 377:183-186.
- Han JS, Zhang RL. Suppression of morphine abstinence syndrome by body electroacupuncture of different frequencies in rats. *Drug Alcohol Dependence*, 1993, 31:169-175.
- Han JS, Chen XH, Sun SL, et al. Effect of low and high frequency TENS on met-enkephalin-Arg-Phe and dynorphin A immunoreactivity in human lumbar CSF. *Pain*, 1991, 47:291-298.
- Fei H, Xie GX, Han JS. Low and high frequency electroacupuncture stimulations release (Met) enkephalin and dynorphin A in rat spinal cord. *Chin Sci Bull*, 1987, 32:1496-1509.
- Wu LZ, Cui CL, Tian JB, et al. Suppression of morphine withdrawal by electroacupuncture in rats: dynorphin and κ -opioid receptor implicated. *Brain Res*, 1999, 851:290-296.
- 叶晓明, 王新华, 由振东. 海洛因依赖大鼠模型的建立. *第二军医大学学报*, 2000, 21:95.
- 柳田知司. うシトへ镇痛药短效頻回注入はだる身体依存つ形成. 实中验前临床研究报, 1997, 47:5139-5143.
- 华兴邦, 李群蓉, 周浩良, 等. 大鼠穴位图谱的研制. *实验动物与动物实验*, 1991, 1:3.
- 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱. 北京: 人民卫生出版社, 1991:3-137.
- 温屯清, 阳召军, 雷希龄, 等. 针刺治疗海洛因戒断综合征的临床应用. *中国针灸*, 2005, 25:449-453.
- 刘胜, 周文华, 刘惠芬, 等. 针灸“肾俞”穴对吗啡依赖大鼠戒断反应和成瘾脑区神经元活动的影响. *中国针灸*, 2004, 24:805-808.
- 王仁刚, 朱兴族. 一氧化氮在神经系统中的作用. *生理科学进展*, 1994, 25:73.
- 潘际刚, 潘贵书, 徐国强, 等. 海洛因依赖大鼠 4 个脑区亮氨酸脑啡肽含量的变化. *中国行为医学科学*, 2005, 14:319.
- Zhu H, Barr GA. Opiate withdrawal during development: are NMDA receptors indispensable? *Trends Pharmacol Sci*, 2001, 22:404-408.
- Bespalov AY, Zvartau EE, Beardsley PM. Opioid-NMDA receptor interactions may clarify conditioned (associative) components of opioid analgesic tolerance. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25:343-353.
- Spencer RJ, Jin W, Thayer SA, et al. Mobilization of Ca^{2+} from intracellular stores in transfected neuron cells by activation of multiple opioid receptor subtypes. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54:809-818.
- Tokuyama S, Zhu H, Oh S, et al. Further evidence for a role of NMDA receptors in the locus coeruleus in the expression of withdrawal syndrome from opioids. *Neurochem Int*, 2001, 39:103-109.
- 赖苗军, 刘惠芬, 宋琦琳, 等. 海洛因慢性处理对大鼠脑内一氧化氮合酶阳性神经元数量和形态的影响. *中国行为医学科学*, 2006, 15:964-966.

(收稿日期:2007-09-16)

(本文编辑:冯学泉)