

电针对海洛因成瘾大鼠戒断后焦虑情绪及中央灰质 β -内啡肽表达的影响

王桂华 潘贵书 张新勇

【摘要】 目的 观察电针对海洛因成瘾戒断大鼠情绪及中央灰质(periaqueductal grey, PAG) β -内啡肽(β -endorphine, β -EP)表达的影响。**方法** 通过剂量递增方法,建立海洛因依赖模型。简单随机抽样将大鼠分为对照组、成瘾组、戒断组、针刺组。高架十字迷宫实验判断大鼠的情绪状态;免疫组化的方法检测 PAG β -EP 的表达;观察戒断后,针刺足三里和三阴交穴对戒断大鼠情绪和 PAG β -EP 表达影响。**结果** 海洛因成瘾戒断后大鼠各项焦虑指标:开臂停留时间占 totalTime 百分比(OT%)、开臂进入次数占进臂总次数百分比(OE%)、探头次数[分别为(12.5 ± 4.3)%, (17.1 ± 6.7)%, (5.7 ± 2.0)次]低于对照组[分别为(26.8 ± 8.7)%, (32.4 ± 6.0)%, (12.2 ± 4.0)次],差异具有显著性(P 值分别为 0.003, 0.018, 0.003), β -EP 表达产物的平均光密度值(206.1 ± 23.1)高于对照组(186.2 ± 15.3),差异具有显著性($P=0.041$);戒断组大鼠给予针刺后 OT%、OE%、探头次数各项焦虑指标值[分别为(26.5 ± 8.7)%, (31.8 ± 7.7)%, (9.9 ± 3.1)次]增高与对照组比较差异无显著性(P 值分别为 0.920, 0.816, 0.122), β -EP 表达产物的平均光密度值(185.3 ± 11.4)与对照组(186.2 ± 15.3)比较亦差异无显著性($P=0.891$)。**结论** 针刺能减轻戒断大鼠的焦虑情绪且具有促进 PAG 内源性 β -EP 表达的作用,这可能是针刺改善戒断大鼠的焦虑情绪的一个重要机制之一。

【关键词】 电针; 海洛因; 成瘾; 焦虑; 中脑导水管周围灰质; β -内啡肽

Effect of acupuncture on anxiety mood and the expression of β -EP in periaqueductal grey of heroin withdrawal rats WANG Gui-hua, PAN Gui-shu, ZHANG Xin-yong. Department of Physiology, Binzhou Medical College, Yantai 264003, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of Electroacupuncture on anxiety mood and periaqueductal grey (PAG) β -endorphine expression in rats with morphine abstinence syndrome. **Methods** The model of heroin-addicted rat was firmly established by the subcutaneous injection of gradually-increased dosages of heroin. Rats were randomly divided into control group, heroin-addict group, withdrawal group, electroacupuncture group. Anxiety mood of experimental rats were assessed by Elevated Plus Maze test. Expression of β -EP in PAG was detected by immunohistochemistry. The effect of electroacupuncture at bilateral zusanli and sanyinjiao on anxiety mood and expression of β -EP in PAG was observed in rats with heroin abstinence symptom. **Results** The anxiety index in rats with heroin abstinence symptom; the value of OT%, OE% and head-dips times was (12.5 ± 4.3)%, (17.1 ± 6.7)% and (5.7 ± 2.0) times respectively, lower than that in control group [(26.8 ± 8.7)%, (32.4 ± 6.0)% and (12.2 ± 4.0) times respectively], there existed significant difference (The value of P was 0.003, 0.018 and 0.003 respectively). Meanwhile, The expression of β -EP-positive neurons (206.1 ± 23.1) was significantly higher than the control (186.2 ± 15.3). There existed significant difference ($P=0.041$). Electroacupuncture could increase OT%, OE%, head-dips times [(26.5 ± 8.7)%, (31.8 ± 7.7)% and (9.9 ± 3.1) times respectively] in rats with heroin abstinence symptom, which compared with control group were not statistically distinctive (The value of P was 0.920, 0.816 and 0.122 respectively). The expression of β -EP (185.3 ± 11.4) in PAG increased, which compared with control group (186.2 ± 15.3) were not statistically distinctive ($P=0.891$). **Conclusion** Electroacupuncture could inhibit the abstinence syndrome effectively. And there is obvious promotion of β -EP expression in PAG. This is probably one of underlying mechanisms for electroacupuncture improving withdrawal symptoms.

【Key words】 Electroacupuncture; Herion; Addiction-withdrawal; Anxiety; Periaqueductal grey; β -endorphine

海洛因为吗啡衍生物二乙酰吗啡,海洛因成瘾者

有明显的焦虑、抑郁症状,而其中枢机制则是解决临床预防和治疗的关键,但至今仍不清楚^[1-3]。随着神经生理研究的进展,发现蓝斑核(locus ceruleus, LC)和 PAG 与阿片依赖有密切关系^[4]。近年来有关电针刺激的临床研究较多,已经证明,电针刺刺激有较好的脱毒治疗效果^[5]。PAG 作为内源性阿片物质较集中的

DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-6554.2009.06.019

基金项目:贵州省委组织部人才基金项目([黔人领函2007]09号)

作者单位:264003 烟台 滨州医学院生理教研室(王桂华);遵义医学院生理教研室(潘贵书);淮安市第二人民医院神经内科(张新勇)

通信作者:潘贵书, Email: pgs@zmc.edu.cn

脑区,是否与成瘾戒断后的焦虑情绪及成瘾依赖有关,研究报告甚少。本实验通过建立海洛因的成瘾戒断模型并对其进行电针刺激的戒断治疗,从行为学及分子学方面研究电针刺激能否缓解或解除海洛因成瘾大鼠戒断后焦虑情绪,初步探讨其作用机制。

材料与方法

一、材料

健康 SD 大鼠(重庆第三军医大学动物实验中心) 28 只,雌雄不拘,体质量(200 ± 20)g。海洛因:贵州省公安厅提供。高架十字迷宫:四川成都泰盟科技有限公司。LH-402 型韩氏穴位神经刺激仪:北京力普康医药科技发展有限公司。 β -EP 免疫组织化学试剂盒:Booster 公司提供。

二、方法

1. 动物分组:将大鼠随机分成实验组(21 只)和对照组(7 只)。实验组海洛因成瘾后分为实验 1 组(成瘾组)7 只和实验 2 组(戒断组)14 只,其中 7 只给予针刺为针刺组。按文献^[6]复制动物模型。针刺组大鼠于停药后每天行针刺(部位:足三里、三阴交,频率 2/100HZ,电流 1-2-3 mA,共 30 min,1 次/d,连续 5 d^[7]);4 组大鼠各自自行行为学测试(2 次/d,连续 5 d),计算 OT%、OE% 及探头次数^[8],各指标取均值比较。

2. β -EP 检测:行为学实验后将各组大鼠麻醉,取 PAG 脑区,石蜡包埋后,行冠状切片。 β -EP 免疫组织化学方法按试剂盒要求进行,中性树胶封片,光镜观察,以正常羊血清代替 β -EP 一抗孵育为阴性对照,结果采用 B12000 图像处理系统计算 β -EP 免疫反应物质平均光密度。

3. 数据统计:实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件单因素方差分析进行检验;组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

结 果

一、海洛因成瘾大鼠模型建立

在模型建立过程中实验组大鼠随海洛因剂量加大出现明显症状,给药后约 2 min 左右,行动开始缓慢,5 min 后动物出现明显神情呆滞嗜睡,出现怪异动作,动作蹒跚、摇摇晃晃,、咀嚼、咬牙、啃咬物体、直立两眼明显凸出、发亮、尾僵直、尾尖上翘或将头部嵌入垫料中昏睡、易受金属撞击声惊醒、呼吸道功能受限,时间持续约 30 min。用纳洛酮催促戒断后,几乎所有成瘾组大鼠出现明显的戒断症状,主要表现:异常姿势、高度激惹、咬牙、烦躁不安、扭体、湿狗样动作、直立、毛蓬松、洗脸、上睑下垂,有些大鼠还出现舔阴、意向性震颤、流涎。

成瘾大鼠戒断症状及其评分符合海洛因依赖模型的评分标准,并且成瘾大鼠催促戒断评分和对照组大

鼠的戒断症状评分差异有显著性($t = 15.65, P < 0.01$)以及体质量的变化差异有显著性($t = 4.34, P < 0.01$)。见表 1、表 2。

表 1 海洛因成瘾大鼠纳洛酮催促戒断症状 (次数/30min, $\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	湿狗样抖	扭体	清理	直立
对照组	0.45 ± 1.04	0.18 ± 0.60	2.64 ± 2.29	12.91 ± 4.42
成瘾组	11.25 ± 6.04	14.38 ± 7.60	7.38 ± 3.85	18.50 ± 5.18
t 值	5.87	6.24	3.37	7.08
P 值	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01

组别	伸展	齿颤	上睑下垂
对照组	0.18 ± 0.60	0 ± 0	0.27 ± 0.65
成瘾组	9.50 ± 6.80	4.13 ± 4.19	4.75 ± 3.58
t 值	4.57	3.30	4.11
P 值	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 海洛因成瘾大鼠戒断症状评分和体质量变化($\bar{x} \pm s, n = 7$)

分组	戒断评分(分)	体质量减少(g)
对照组	2.64 ± 1.69	3.09 ± 2.77
成瘾组	16.75 ± 2.25	10.63 ± 4.78
t 值	15.65	4.34
P 值	<0.01	<0.01

二、海洛因成瘾及成瘾戒断后大鼠情绪的变化

结果显示:成瘾组大鼠在闭臂停留时间相对对照组增加,自由活动范围减小,进臂次数减少,探头次数减少,OT% 和 OE% 值降低,与对照组比较差异无显著性(t 值分别为 2.28, 1.99, 均 $P > 0.05$),而探头次数明显低于对照组($P < 0.05$);戒断组大鼠在开臂停留时间及进臂次数明显减少,自由活动范围明显减小,探头次数减少,在闭臂有僵住不动,排便等行为出现,尤以戒断的前 2 天最明显,与对照组、成瘾组、针刺组比较,差异具有显著性(均 $P < 0.01$),于戒断的后 3 d 大鼠的活动范围、进臂次数、探头次数有所增加但仍低于对照组,差异有显著性(均 $P < 0.05$);戒断大鼠于针刺后,在两臂自由活动增多,进臂次数及探头次数增多,活动范围增大,活动路程增多,其 OT% 和 OE% 值、探头次数与对照组比较,差异无显著性(t 值分别为 0.10, 0.24, 1.63, 均 $P > 0.05$),见表 3。

表 3 针刺对戒断大鼠焦虑情绪影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

分组	OT(%)	OE(%)	探究行为(次)
对照组	26.8 ± 8.7	32.4 ± 6.0	12.2 ± 4.0 ^d
成瘾组	19.8 ± 6.1	27.8 ± 5.0	6.8 ± 3.8 ^{bc}
针刺组	26.5 ± 8.7	31.8 ± 7.7 ^c	9.9 ± 3.1 ^c
戒断组	12.5 ± 4.3 ^{bf}	17.1 ± 6.7 ^{bdf}	5.7 ± 2.0 ^{bf}

注:与对照组比较 ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$;与成瘾组比较 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$;与针刺组比较 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$

三、中脑导水管周围灰质 β -EP 的表达

β -EP 免疫反应物质呈棕黄色或棕褐色弥漫分布于胞浆,少量分布于细胞核。以 PAG 的腹外侧和背外

侧亚核部位表达最为密集,染色深。成瘾及戒断组大鼠在 β -EP PAG 神经元胞浆染色较浅,呈淡黄色。 β -EP 表达明显低于对照组大鼠。戒断大鼠给予针刺后 PAG β -EP 表达明显增加。胞浆深染,呈棕黄色或棕褐色。

结果显示:成瘾组与戒断组大鼠 PAG β -EP 免疫反应物质平均光密度值(分别为 $228.6 \pm 19.0, 206.1 \pm 23.1$)均显著低于对照组(186.2 ± 15.3),差异有显著性(t 值分别为 $4.58, 2.73, P < 0.01, P < 0.05$);而针刺组(185.3 ± 11.4)大鼠与对照组比较,差异无显著性($t = 0.140, P > 0.05$)。

讨 论

海洛因成瘾性强,有明显的镇静、缓解疼痛作用,并对情绪产生一定影响。阿片依赖者在撤除药物时,焦虑、抑郁和失眠是主要特征,尤其在戒断后期,焦虑、抑郁等精神情绪逐渐占主导地位^[9-10]。关于阿片类药物成瘾及戒断的机制已进行了长期而广泛的研究,目前对于躯体依赖机制的探索已积累了不少知识,而长期吸食阿片类药物患者突然停药会出现一系列的戒断症状及情绪反应也得到实验证实^[11]。本研究中亦发现停药后行为学实验中反映焦虑情绪的各项指标都明显降低,戒断大鼠出现明显焦虑反应如自由活动减少,僵住不动,排便、烦躁易激惹等,实验中还显示停药后可导致大鼠 PAG β -EP 表达下降,推测停药后焦虑状态可能是由于突然停药导致外源性阿片样物质供应中断而内源性阿片能系统由于长期外源性阿片样物质的使用而被抑制,使内源性阿片样物质合成分泌不足导致一系列焦虑情绪的表现。

PAG 是海洛因作用的最重要中枢部位之一。在吗啡依赖大鼠注射纳洛酮可诱发戒断症状,出现戒断反应时,PAG 的自发放电增加,提示 PAG 可能参与了吗啡依赖和戒断反应^[12]。有研究证明,针刺可明显抑制阿片戒断综合症如烦躁失眠等,使其通过穴位促使中枢内源性阿片肽释放,起到治疗效果^[13]。利用这一原理对海洛因成瘾戒断大鼠行电针刺激,发现戒断大鼠给予电针刺激后焦虑情绪有了明显改善;另外戒断

大鼠在闭臂表现木僵行为,在给与针刺后消失,PAG β -EP 表达增加。这提示针刺可以减轻戒断大鼠焦虑情绪,同时增加 PAG β -EP 表达,进一步说明 PAG 可能是介导戒断反应和焦虑情绪反应的重要核团之一。因此在临床工作中可以考虑电针减轻成瘾患者的戒断焦虑状态。由于电针治疗抑制海洛因戒断症状及情绪反应涉及多部位和多种神经递质,甚至是同一脑区不同亚区,因此作用机制值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Schroeder J, Epstein DH, Umbricht A, et al. Changes in HIV risk behaviors among patients receiving combined pharmacological and interventions for heroin and cocaine dependence. *Addict Behav*, 2005, 8: 8-12.
- [2] 李刚,贾福军,许明智,等. 海洛因依赖者稽延性戒断症状及相关因素. *中国行为医学科学*, 2005, 14: 408-409.
- [3] 刘建波,地力夏提·亚合甫,李凡,等. 海洛因成瘾者焦虑、抑郁情绪与艾滋病高危行为的关系. *中国行为医学科学*, 2006, 15: 1001-1002.
- [4] Koob GF, Maldonado R, Stinus L, et al. Neural substrates of opiate withdrawal. *TINS*, 2002, 15: 186-191.
- [5] Song XG. Observation on improving effect of treatment 50 case of heroin abstinence syndrome with methadone combined with needling. *World J Acup-Max*, 2001, 11: 57-58.
- [6] 纪家涛,王新华,由振东,等. 吗啡依赖大鼠模型的建立. *第二军医大学学报*, 2001, 18: 81-82.
- [7] 韩济生. 针刺镇痛频率特异性的进一步证明. *针刺研究*, 2001, 26: 224-227.
- [8] 王欣,谢鸣. 酸枣仁汤对高架十字迷宫大鼠行为学影响的量效关系评价. *中国实验方剂学杂志*, 2004, 10: 35-37.
- [9] 曾燕,梁勋厂,李熯,等. 电针对吗啡戒断大鼠学习记忆及海马 CA3 区长时程增强损害的恢复作用. *针刺研究*, 2004, 29: 245-251.
- [10] 姜美俊,刘学兵,苏中华,等. 一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 对吗啡依赖小鼠位置偏爱及戒断症状的影响. *中国行为医学科学*, 2006, 15: 99-101.
- [11] Sala M, Braide D, Leone MP, et al. Chronic morphine affects abstinence symptoms and emotional changes during treatment and withdrawal in rats; Possible residual long-term impairment. *Behav Pharmacol*, 2005, 5: 570-576.
- [12] Bozarth MA. Physical dependence produced by central morphine infusion: an anatomical mapping study. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000, 18: 373-383.
- [13] 吴鉴楨,崔彩莲,韩济生. 韩氏穴位神经刺激仪治疗阿片戒断综合症的临床研究. *中国疼痛医学杂志*, 2005, 1: 30-38.

(收稿日期:2008-12-18)

(本文编辑:冯学泉)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

远程投稿、查稿、审稿、编辑系统启事

本刊采用远程稿件采编系统进行投稿、查稿等,现就有关问题说明如下。

1. 作者投稿:登录本刊网站下载模版,使用模版编辑稿件,登陆在线投稿系统,按操作提示投稿。原则上不再受理邮寄稿件和 Email 稿件。

2. 稿件查询:使用作者注册用户名和密码,登陆在线查稿系统,可查询作者稿件审理进程和费用信息等。

3. 远程审稿:审稿人使用用户名、密码登陆在线审稿系统,按操作提示审稿。

4. 远程编辑:编辑使用用户名、密码登陆在线编辑系统,按操作提示进行稿件编辑处理。

有关投稿、稿件查询,远程审稿,远程编辑的详细要求,请登陆本刊网站首页浏览。

网站登录: <http://www.xwxy.cn> IP 地址: <http://202.102.187.230>

(本刊编辑部)