

研究论文

2 Hz 和 100 Hz 电针加速 脑内三种阿片肽基因表达

郭惠夫 王晓民 田今华 侯跃平 韩济生

(北京医科大学神经科学研究中心, 北京 100083)

摘 要

我室以往的工作证明 2 Hz 和 100 Hz 电针可引起中枢释放不同种类的阿片肽, 本工作试图阐明不同频率的电针是否影响三种阿片肽的基因转录。用地高辛标记的反义 cRNA 探针进行原位杂交, 显示大鼠脑内前脑啡肽原 (preproenkephalin, PPE), 前强啡肽原 (preprodynorphin, PPD) 和前阿黑皮素原 (proopiomelanocortin, POMC) mRNA。结果: (1) 低、高频电针均不影响 POMC mRNA 的水平。(2) 对 PPE 的影响, 两种频率电针诱导脑干网状结构头端腹内侧区 PPE mRNA 升高的幅度相似, 2 Hz 电针诱导视上核、视交叉上核、下丘脑室旁核、弓状核、腹内侧核及外侧丘系核的 PPE mRNA 表达比 100 Hz 电针高得多。(3) 对 PPD 的表达, 2 Hz 电针不改变脑内 PPD mRNA 的水平, 100 Hz 电针可使视上核、下丘脑室旁核、腹内侧核及脑干臂旁核的 PPD mRNA 明显升高。鉴于肽类的加速释放必然引起合成的增加, 上述结果为不同频率电针加速不同内源性阿片肽的释放和合成, 从而发挥镇痛作用, 提供了有力的佐证。

关键词: 电针刺激; 刺激频率; 前脑啡肽原; 前强啡肽原; 前阿黑皮素原; 基因表达

本室对针刺镇痛原理的研究中, 有一个至为重要的发现, 即不同频率电针镇痛具有不同的中枢机理。这一发现主要包括两个内容: (1) 低频和高频电针镇痛由不同的中枢部位介导, 即下丘脑弓状核是介导低频电针镇痛的重要部位, 而脑桥的臂旁核则是介导高频电针镇痛的关键部位^[1~3]; (2) 不同频率电针释放不同的内源性阿片肽, 作用于不同的阿片受体而发挥镇痛作用, 即低频电针释放脑啡肽和内啡肽, 作用于 μ 和 δ 受体, 高频电针则释放强啡肽, 作用于 κ 受体而发挥镇痛作用^[1, 4~6]。我们曾用 c-Fos 免疫组化法检测不同频率电针激活的中枢部位^[7], 发现低频和高频电针引起脑内不同部位的 Fos 表达, 其中低频 (2 Hz) 电针激活弓状核, 高频 (100 Hz) 电针激活臂旁核 Fos 表达的结果, 与以上发现的第一个内容相吻合。本研究采用原位杂交法, 在转录水平检测 2 Hz 和 100 Hz 电针对脑内三种内源性阿片肽基因, 即前脑啡肽原 (preproenkephalin, PPE), 前强啡肽原 (preprodynorphin, PPD) 和前阿黑皮素原 (proopiomelanocortin, POMC) 基因表达的影响, 对不同频率电针镇痛的原理进行深入研究。

1995-12-11 收稿 1996-04-08 修回

1 材料和方 法

实验在 12 只体重为 180~250 g 的雌性 Wistar 大鼠上进行。均分为 4 组: 2 Hz 电针组; 100 Hz 电针组; 插针不通电组(简称插针组)和正常组。2 Hz 和 100 Hz 电针刺激采用本室以往惯用的模型, 在两后肢相当于足三里和三阴交的位置各插入一对不锈钢针灸针。通电刺激 30 min, 电流每 10 min 按 1-2-3 mA 递增。插针组与电针组同样插针, 但不予通电。正常组动物未经过任何处理。本实验所用的三种探针(德国 Munich 大学 V. Holtt 教授惠赠)均为 cRNA 探针, 其中 PPE 为克隆的大鼠 cDNA 片段, 转录产物长约 600 个核苷酸, 而 PPD 和 POMC 为大鼠 cDNA 的反义寡核苷酸探针, 转录产物分别为 74 和 150 个核苷酸。电针后 24 h, 所有动物在水合氯醛(0.3 g/kg, i. p.) 麻醉下经主动脉灌注固定。取脑组织入 4% 多聚甲醛后固定, 蔗糖置换, 恒冷箱切片。切片后入相应固定液(用灭菌缓冲液配制)中固定 3~5 h。切片处理如下: (1) 飘浮切片于 0.1 mol/L PBS (pH 7.2), 5 min×3 (3 次); (2) 0.1 mol/L 甘氨酸/(0.01 mol·L⁻¹ PBS) (pH 7.2, 下同); (3) 0.4% Triton X-100/PBS, 15 min; (4) 1 μg/ml 蛋白酶 37 C, 30 min; (5) 4% 多聚甲醛/PBS, 5 min; (6) PBS 3 min×2; (7) 0.25% 乙酸酐/(0.1 mol·L⁻¹ 三乙醇胺), 10 min; (8) 2 XSSC, 10 min。将切片用灭菌滤纸吸干, 并将其放入杂交液, 分别用地高辛标记的 PPE, PPD 和 POMC 反义 cRNA 探针(1 μg/ml) 行原位杂交, 43 C 保温 12~16 h。杂交完毕, 按以下程序漂洗: 4 XSSC, 37 C, 15 min; 2 XSSC (含 RNase A, 20 μg/ml), 37 C, 30 min; 1 XSSC, 37 C, 15 min; 0.5 XSSC, 37 C, 15 min; 0.05 mol/L PBS (pH 7.2), 5 min×3。然后将切片挑入碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 Fab 片段, 1:1 000 (稀释液: 1% BSA, 0.4% TritonX-100, 0.05 mol/L PBS), 室温 4 h。切片入 0.05 mol/L PBS 漂洗 5 min×4; TSM1, 5 min×2; TSM2, 5 min×2。切片入 NBT 和 BCIP 显色液中, 室温下避光显色 3 h。0.05 mol/L PBS 冲洗 5 min×2 以终止显色反应, PBS 中贴片, 晾干, 100% 乙醇脱水 15 min×2, 二甲苯透明, 中性树胶封片。部分切片用焦油紫轻度复染。

原位杂交的对照实验为: (1) 预先用 RNase 处理切片; (2) 用过量的未标记 cRNA 探针预处理切片; (3) 用标记的正义 RNA 或标记无关 RNA 探针代替标记的 cRNA 探针进行杂交; (4) 用正常羊血清代替地高辛抗体。原位杂交结果均在光学显微镜下进行观察并照相。

数据资料的采集在 IBAS2000 图像分析仪(OPTON)上进行光密度扫描, 测定积分光密度值。所有结果均用均数±标准误表示。两两比较采用 Student's *t* 检验, 组间比较采用方差分析(ANOVA)及进一步的 Student-Newman-Keul's 检验。结果如下。

在对照实验中, 预先用 RNase 处理的切片没有任何杂交信号出现, 提示阳性信号的出现依赖于 RNA 的存在; 过量的未标记的 cRNA 探针大大降低了原位杂交的阳性信号, 表明标记 cRNA 探针的有限结合; 用标记的正义 RNA 或无关 RNA 探针进行杂交, 以及用正常羊血清代替地高辛抗体进行孵育, 也不能显示杂交信号, 说明本实验结果是特异的。

在正常动物脑内, 三种阿片肽前体的 mRNA 均有较高的基础表达。以 PPE 表达范围最广, PPD 次之。POMC mRNA 的分布最为局限, 但 POMC mRNA 在弓状核局部的基础表达水平极高。在插针不通电的动物, 其脑内各部位三种阿片肽 mRNA 的水平无明显改变。

2 结 果

2.1 不同频率电针对 PPE mRNA 表达的影响

2 Hz 电针刺激可以引起脑内许多部位的 PPE mRNA 表达加速, 这些部位包括视交叉上核、视上核, 下丘脑室旁核、弓状核、腹内侧核、外侧丘系腹侧核、中缝大核、巨细胞网状核和旁巨细胞网状核等, 其中以下丘脑室旁核的增加幅度最为明显, 接近 600%, 外侧丘系腹侧核的增加幅度也很大, 达 400%, 其它部位也有不同程度的升高。100 Hz 电针也能引起以上各部位的 PPE mRNA 表达密度升高, 与对照组相比具有显著性差异, 在脑干网状结构腹内侧区的诸核 (即中缝大核、巨细胞网状核和旁巨细胞网状核等) 的表达升高的幅度与 2 Hz 电针相似, 但在视交叉上核、视上核、弓状核、室旁核、腹内侧核、外侧丘系腹侧核等部位, 其升高的幅度远不及 2 Hz 电针组 (表 1)。

表 1 2 Hz 和 100 Hz 电针对大鼠脑内前脑啡肽原 mRNA 表达的影响

Table 1 Effect of 2 Hz and 100 Hz electroacupuncture on the expression of pre-proenkephalin mRNA in rat brain(I. O. D.)

Structure	Naive	Needle	2 Hz	100 Hz
Suprachiasmatic n. (SCN)	29.1±4.5	30.2±5.1	81.1±9.7 ⁺⁺	41.5±3.5 [*]
Supraoptic n. (SON)	18.4±5.4	20.8±5.6	64.4±5.7 ⁺⁺	37.5±4.2 [*]
Paraventricular(H) n. (PAH)	32.7±2.2	33.8±2.7	221.1±7.5 ⁺⁺	49.4±4.1 [*]
Arcuate n. (Arc)	19.7±1.9	18.1±2.0	87.1±3.5 ⁺⁺	49.6±4.6 [*]
Ventromedial n. (VMH)	28.9±3.6	30.2±2.4	76.5±5.4 ⁺⁺	45.6±3.7 [*]
Ventral lateral lemniscus (VLL)	20.7±8.6	23.2±4.3	101.0±8.1 ⁺⁺	46.9±4.7 [*]
Raphe magnus (RM)	40.2±6.9	41.1±5.8	85.1±7.1 [*]	82.7±7.4 [*]
Gigantocellular (Gi)	47.9±6.8	48.5±7.6	83.7±6.0 [*]	77.1±5.9 [*]
Paragigantocellular (PGi)	29.0±4.0	32.1±5.0	69.3±4.7 [*]	78.7±8.5 [*]

Shown are values of integral optic density in $\bar{x} \pm s_x$ ($n=3$, in each area of each rat 3 slices were scanned and then averaged). Unilateral scan was made except for the midline nuclei (SCN, RM). ^{*} $P<0.01$ compared with naive and needle group (insertion of needles without electrical stimulation). ⁺ $P<0.01$ compared with 100 Hz EA group.

电针引起的 PPE mRNA 表达升高不仅表现在细胞平均密度的增加, 还表现在标记细胞数目的增加, 但在不同的部位增加的因素 (细胞数或平均细胞密度) 有所不同, 如在弓状核, 100 Hz 电针引起的 PPE mRNA 表达主要表现在细胞数目的增加, 而 2 Hz 电针引起的表达则两因素兼而有之。在弓状核的中部, 2 Hz 电针诱导一些大细胞的 PPE mRNA 表达, 其细胞直径可达 25 μm , 而 100 Hz 电针引起的 PPE mRNA 表达只出现于直径较小的细胞 (多在 15 μm 以内)。在室旁核, 电针引起的 PPE mRNA 表达加速主要表现在平均细胞密度的增加, 以大细胞部的增加最为明显, 其细胞的直径可达 30 μm , 细胞的形态多为圆形或卵圆形, 如图 1 所示 (见图版 1)。

2.2 不同频率电针对 PPD mRNA 表达的影响

插针不通电以及 2 Hz 电针的动物,其 PPD mRNA 表达均不增加。而 100 Hz 电针可以引起脑内一些部位的 PPD mRNA 表达明显加速,这些部位是视上核、下丘脑腹内侧核、室旁核以及脑干的臂旁核。以视上核的表达升高最为明显,尤其是视上核的视交叉后部的细胞染色极深。100 Hz 电针引起的 PPD mRNA 表达加速主要表现为细胞平均密度的增加,但有的部位也有标记细胞数目的增多,如下丘脑腹内侧核、脑干臂旁核等。结果见表 2。

表 2 2 Hz 和 100 Hz 电针对前强啡肽原 mRNA 表达的影响

Table 2 Influence of 2 Hz and 100 Hz electroacupuncture on the expression of prepro-dynorphin mRNA in rat brain

Structure	Naive	Needle	2 Hz	100 Hz
Supraoptic n.	17.8 ± 2.6	18.3 ± 4.1	19.0 ± 6.3	53.7 ± 3.0*
Paraventricular (H) n.	7.9 ± 5.4	8.8 ± 3.7	8.9 ± 1.3	25.5 ± 2.9*
Ventromedial (H) n.	5.2 ± 0.8	7.4 ± 3.0	6.3 ± 2.1	27.2 ± 3.6*
Parabrachial n.	19.0 ± 7.2	17.2 ± 3.0	16.8 ± 2.0	58.6 ± 3.5*

Shown are values of integral optic density in $\bar{x} \pm s_x$ ($n=3$, in each area of each rat 3 slices were scanned and then averaged). * $P < 0.01$ compared with naive, needle group and 2 Hz EA group.

2.3 电针刺激对 POMC mRNA 表达的影响

POMC mRNA 在脑内有基础表达的部位较为局限,其阳性神经元胞体主要位于下丘脑弓状核,此外在大脑皮质的某些区域和杏仁核有少量的标记神经元。无论是插针不通电还是给予 2 Hz 或 100 Hz 电针,对脑内 POMC mRNA 的表达都没有影响(表 3)。

表 3 2 Hz 和 100 Hz 电针对前阿黑皮素 mRNA 表达的影响

Table 3 Effects of 2 Hz and 100 Hz electroacupuncture on proopiomelanocortin (POMC) mRNA of the rat brain

	Naive	Needle	2 Hz	100 Hz
Arcuate nucleus	46.7 ± 5.0	48.0 ± 5.3	47.0 ± 6.6	47.9 ± 5.3

Shown are values of integral optic density in $\bar{x} \pm s_x$ ($n=3$, in each area of each rat 3 slices were scanned and then averaged). There is no significant difference between the groups.

3 讨 论

崔霞等^[8]用 Northern 杂交检测了电针(2/15 Hz)刺激后脑内 PPE mRNA 表达的时程变化,发现电针后 4 h PPE mRNA 开始合成增加,24 h 达到较高水平,48 h 达最高峰,72 h 回落。纪如荣等^[9]用原位杂交的方法检测到,100 Hz 电针后 24 h 可以引起大鼠脊髓和延髓腹内侧网状结构的 PPE mRNA 合成加速。基于以上工作,本研究也选择电针后 24 h 观察阿片肽 mRNA 的表达情况。发现电针可使延髓腹内侧网状结构(巨细胞网状核、旁巨细胞网状核、中缝大核)的 PPE mRNA 表达明显加速,在这些区域低频与高频电针刺激具有同等的效应,

这一结果与纪如荣等^[9]的报道是一致的。但本研究的观察更为系统,并着重比较了低频(2 Hz)和低频(100 Hz)电针作用的异同,发现电针还能引起脑内其它部位的 PPE mRNA 表达增加,这些部位是视上核、视交叉上核、下丘脑腹内侧核、弓状核和室旁核以及中脑的外侧丘系腹侧核,在这些部位 2 Hz 电针的作用比 100 Hz 电针强得多。

2 Hz 电针不影响 PPD mRNA 的表达,而 100 Hz 电针能明显增加视上核、下丘脑腹内侧核、室旁核以及脑干臂旁核的 PPD mRNA 合成。

两种频率电针均不影响 POMC mRNA 的水平,其可能原因是弓状核的 POMC 基础表达很高,足以应付电针所引起的 β -内啡肽的释放。但对此最近有不同的报道。俞逸红等^[10]采用点杂交发现 3 Hz 电针 60 min 引起弓状核的 POMC mRNA 表达增高,这一作用在电针后 8 h 开始,72 h 达到高峰。造成以上区别的原因可能是电针持续的时间不同,以及从电针结束到处死动物的时间点不同所致。

低频电针引起脑内 PPE mRNA 表达增加,而高频电针引起脑内 PPD mRNA 的表达增加,这一结果支持本室以往的发现,即低频电针释放脑啡肽,高频电针释放强啡肽而发挥镇痛作用(Fei et al, 1987; Han and Wang, 1992)。但值得一提的是,本工作发现高频电针能加速脑内 PPE 和 PPD mRNA 的表达。而事实上脑内的脑啡肽在高频电针镇痛中的作用还没有得到详细研究;其次,强啡肽在脑内不镇痛或对抗镇痛的观点是基于辐射热甩尾测痛的模型得出的结果^[11~16]。最近有人在用冷水刺激尾部引起甩尾测痛的模型上发现,脑内注射强啡肽或 κ 受体激动剂是有镇痛作用的^[17],很有可能,脑啡肽和强啡肽两者在脑内都参与高频电针镇痛,这一课题有待进一步研究。

利用原位杂交方法得出的结果能从核团以至细胞水平上提供电针在中枢促进阿片肽 mRNA 表达的精确部位,是本工作的特色。电针引起脑内阿片肽 mRNA 表达加速的意义可能是对电针所释放的阿片肽进行补充。由于其表达持续时间长,因此还可能是临床针刺治疗具有累加效应的机制之一。

研究电针镇痛作用中一个经常的议题是:电针刺激是否等同于应激刺激?众所周知,应激刺激都是比较强的刺激。从刺激强度的角度来分析,在电脉冲的波宽(0.3 ms)和电流强度(3 mA)都固定的情况下,100 Hz 电针的应激作用应该强于 2 Hz 电针的作用。但从我们的实验结果可以看出,在许多脑区,2 Hz 加速 c-fos 表达的作用大于 100 Hz 电针^[7];对 PPE 表达的影响也是 2 Hz 超过 100 Hz 电针(表 1)。因此,在我们所用的电针强度下,所涉及的并不是非特异的超强应激刺激,而是机体可分辨的相对特异的一种刺激。

参 考 文 献

- [1] Han JS, Wang Q. Mobilization of specific neuropeptides by peripheral stimulation of identified frequencies. *News in Physiol Sci*, 1992, 7: 176~180
- [2] Wang Q, Mao LM, Han JS. The arcuate nucleus of hypothalamus mediates low but not high frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Brain Res*, 1990, 513: 60~65
- [3] Wang Q, Mao LM, Han JS. The role of parabrachial nucleus in high frequency electroacupuncture analgesia in rats. *Chin J Physiol Sci*, 1991, 7: 363~371
- [4] Fei H, Xie GX, Han JS. Low and high frequency electroacupuncture stimulations release (met5) enkephalin and dynorphin A in rat spinal cord. *Kexue Tongbao*, 1987, 32: 1496~1501
- [5] Fei H, Sun SL, Han JS. New evidence supporting differential release of enkephalin and dynorphin by low and high frequency electroacupuncture stimulation. *Kexue Tongbao*, 1988, 33: 703~705
- [6] Chen XH, Han JS. Analgesia induced by electroacupuncture of different frequencies is mediated by different types of opioid receptors; another cross-tolerance study. *Behavioral Brain Res*, 1992, 47: 143~149
- [7] Guo HF, Fang Y, Wang XM, et al. Electroacupuncture of different frequencies accelerated the Fos protein expression in different areas of the CNS. *Acupunct Res*, 1994, 19: 52~54
- [8] Cui X, Xu W, Zhang ZW, et al. Temporal analysis of the abundance of mRNA encoding c-fos and preproenkephalin in rat brain following electroacupuncture stimulation. *The Second Stanford Intern Neurosci Symposium: Gene Expression in the Central Nervous System*. Beijing, China, 1993, p90
- [9] 纪如荣, 张 勤, 韩济生. 电针可促进前脑啡肽原 mRNA在大鼠脊髓和延髓的表达:原位杂交研究. *生理学报*, 1993, 45: 395~399
- [10] 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
- [11] Walker JM, Katz RJ, Akil H. Behavioral effect of dynorphin[1-13] in the mouse and rat; initial observations. *Peptides*, 1980, 1: 341~345
- [12] Friedman HJ, Jen MF, Chang JK, et al. Dynorphin: a possible modulatory peptide on morphine or beta-endorphin analgesia in mouse. *Eur J Pharmacol*, 1981, 69: 357~360
- [13] Herman BH, Leslie F, Goldstein A. Behavioral effects and *in vivo* degradation of intraventricularly administered dynorphin-(1-13) and D-Ala-dynorphin-(1-11) in rats. *Life Sci*, 1980, 27: 883~892
- [14] Wuster M, Schulz R, Herz A. Opiate activity and receptor selectivity of dynorphin (1-13) in the mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol*, 1980, 62: 235~236
- [15] Ren MF, Lu CH, Han JS. Dynorphin-A-(1-13) antagonizes morphine analgesia in the brain and potentiates morphine analgesia in the spinal cord. *Peptides*, 1985, 6: 1015~1020
- [16] Walker JM, Moises HC, Coy DH, et al. Dynorphin(1-17): lack of analgesia but evidence for non-opiate electrophysiological and motor effects. *Life Sci*, 1982, 31: 1821~1824
- [17] Adams JU, Chen XH, Kim Deriel J, et al. Intracerebraventricular treatment with an antisense oligonucleotide to kappa-opioid receptors inhibited kappa agonist induced analgesia in rats. *Brain Res*, 1994, 667: 129~132

2 HZ AND 100 HZ ELECTROACUPUNCTURE ACCELERATE THE EXPRESSION OF GENES ENCODING THREE OPIOID PEPTIDES IN THE RAT BRAIN

GUO HUI-FU, WANG XIAO-MIN, TIAN JIN-HUA,
HUO YUE-PING, HAN JI-SHENG

(Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083)

ABSTRACT

Previous findings from this laboratory have shown that low (2 Hz) and high (100 Hz) - frequency electroacupuncture (EA) accelerated the release of different kinds of opioid peptides in the CNS. In the present study, we tried to elucidate whether EA of different frequencies would affect the transcription of genes encoding different opioid peptides. Digoxin-labeled antisense cRNA probes were used for *in situ* hybridization to detect the mRNA encoding preproenkephalin (PPE), preprodynorphin (PPD) and proopiomelanocortin (POMC) in the rat brain. The results showed that: (1) Neither 2 Hz nor 100 Hz EA altered the POMC mRNA level in the rat brain. (2) EA of the two frequencies induced a similar degree of increase of PPE mRNA in rostromedial reticular formation (gigantocellular, paragigantocellular and lateral reticular nucleus); whereas in supraoptic nucleus, suprachiasmatic nucleus, arcuate nucleus, paraventricular hypothalamic nucleus, ventromedial nucleus and the nucleus of lateral lemniscus, 2 Hz EA induced a higher PPE mRNA expression than 100 Hz EA. (3) 100 Hz EA markedly increased the PPD mRNA levels in supraoptic nucleus, paraventricular hypothalamic nucleus, ventromedial nucleus and parabrachial nucleus, while 2 Hz was without effect. Since *de novo* peptide synthesis is regarded as a natural outcome following accelerated peptide release, the present results substantiate our previous observation that EA of different frequencies exert different acceleratory effects on the release and synthesis of different opioid peptides in the central nervous system.

Key words: electroacupuncture stimulation; stimulation frequency; preproenkephalin; preprodynorphin; proopiomelanocortin; gene expression