

针刺镇痛和吗啡镇痛过程中 脑内 ^3H -5-羟色胺释放的研究

易庆成 陆大贤* 吴时祥 邹 冈

(上海药物研究所神经药理组)

摘 要

鉴于脑内神经细胞间的信号传递是通过突触部位神经介质的释放而实现的,因此神经介质必然在针刺镇痛过程中起重要作用。本文将脑室灌流方法与同位素技术相结合,研究家兔在清醒状态下针刺时脑内 5-HT 释放和痛觉之间的动态关系。先后在 48 只家兔上观察了脑室注射 ^3H -5-HT 后,脑室灌流液中 5-HT 释放和痛阈变化,发现针刺组 18 只家兔中半数以上在针刺提高痛阈的同时 5-HT 释放增加,而对对照组、吗啡组及手握后肢均不增加 5-HT 释放。这一结果表明针刺时脑内 5-HT 能神经原被激活。

针刺麻醉是我国广大医务工作者在毛泽东思想指导下,从祖国医学所特有的针刺镇痛疗法基础上发展起来的一项新的麻醉技术。近年来我国科学工作者又对针刺镇痛原理进行了广泛的研究。例如在丘脑、脑干和脊髓各个水平都证明存在着针刺信号与痛觉信号的相互作用,而前者可以抑制后者^[1-4]。可是在针刺信号抑制痛觉信号的神经传导途径中,究竟哪些神经介质承担着突触传递的任务仍不清楚。但这却是阐明针刺镇痛原理的一个重要环节,它不仅可以帮助人们了解针刺镇痛的物质基础,也可为选择针麻临床辅助用药提供线索。关于介质在针刺镇痛过程中的作用已有一些报告^[5,6],但目前看法尚不一致。

测定介质释放是神经药理学用来了解有关神经原活动常用的方法,它可以反映神经活动的动态过程。因此在搞清哪些介质参与针刺镇痛过程方面,脑内介质释放的研究具有重要意义。现已证明大多数类型的神经末梢对其介质具有高度选择性的摄取机制,因此,可以让外源性同位素标记的介质,通过选择性摄取渗入到相应神经末梢的亚细胞结构中,利用高度灵敏的同位素测量技术,来研究包括释放在内的介质的一系列特性^[7,8]。这为研究神经介质在针刺镇痛过程中的作用提供一个有效的手段。现有许多资料提示脑内 5 羟色胺 (5-HT) 与痛觉及镇痛有关^[9,10]。我们利用脑内 5-HT 能神经末梢选择性摄取 5-HT 的原理^[11],将氚标记 5-HT (^3H -5-HT) 注射到脑室系统,结合脑室灌流技术,研究动物在针刺过程中脑内 5-HT 释放的动态过程与痛阈变化的关系。

为了和药物镇痛进行比较,我们还进行了吗啡镇痛过程中脑内 5-HT 释放的研究。

本文 1975 年 7 月 9 日收到。

* 江西中医学院药理教研组进修教师。

一、方 法

1. 痛阈测定

取体重 1.5—2.3 公斤的家兔,性别不限,以钾离子透入法测痛。测痛时,家兔用布兜悬吊,先剪去两侧耳尖的兔毛,然后将各由两片有机玻璃制成的正负电极板分别夹在两耳尖。正极小孔直径 1.5 毫米,负极 5 毫米,棉条由孔中穿过并稍露出,使紧贴于耳尖去毛处。正负极棉条分别以饱和氯化钾溶液和生理盐水保持湿润。两电极间串联一台附有电流毫安表的测痛仪。通电时正极的钾离子透入皮下致痛,以家兔后肢突然收缩作为痛反应指标,记录电流毫安数。每 10 分钟测一次。选基础痛阈小于 1.5 毫安者供埋植脑室套管用。本研究分为对照组、针刺组和吗啡组。在针刺组我们沿用传统的手法运针,因为根据本实验室在近百只家兔上得出的经验,手针的镇痛效果较电针明显。先以左手握住家兔两后肢踝关节部位,用右手针刺双侧“足三里”,交替捻转 20 分钟后起针,立即测痛。针刺期间不测,针刺后仍每隔 10 分钟测一次,直至痛阈基本恢复到针刺前水平。

2. 脑室灌流

动物用戊巴比妥钠(30 毫克/公斤)静脉麻醉。固定头部于定向仪上,将聚乙烯塑料管制成的脑室套管理植于左侧脑室和大脑导水管(图 1)。坐标分别为 $AP\ 0, L\ 4, H\ 5$ 和 $P\ 12.5, LR\ 0, H\ -0.5^{[12]}$ 。用恒速注射器以每 10 分钟 0.72 毫升的速度将人工脑脊液^[13],从侧脑室套管灌入,由大脑导水管流出。凡进出量基本相等(表示畅通),且灌流液清晰无出血现象者,即用自凝牙托粉将套管固定在家兔颅骨上,同时封闭两套管上口。动物饲养一周后挑选健康者进行试验。

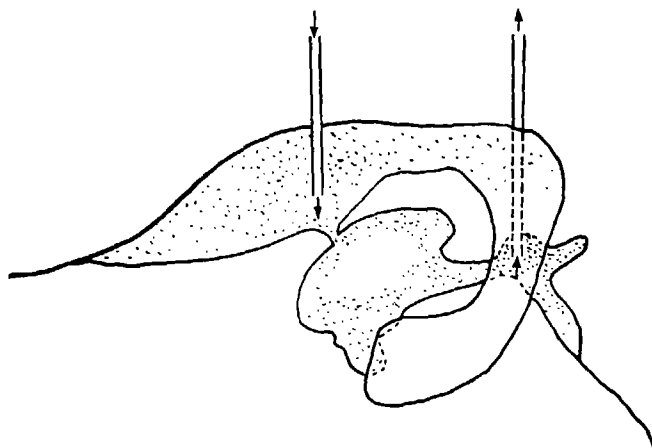


图 1 家兔脑室灌流示意图
(由左侧脑室前端灌入,大脑导水管流出,黑点表示灌流范围)

为了了解灌流范围,我们先后在 11 只埋植套管的家用含 1% 溴酚蓝的人工脑脊液灌流,历时 0.5—4 小时不等。灌流结束后,家兔以戊巴比妥钠麻醉,结扎一侧颈动脉,由远心端推注 10% 甲醛溶液直至颈静脉流出液基本无血,以达到在位固定脑组织的目的。然后解剖兔脑,观察染料分布。灌流时间虽不相同,但结果基本一致。以左侧脑室首端,第三脑室和大脑导水管颜色最深;同侧脑室的下角、第四脑室前部以及对侧脑室亦有蓝色分布,可见灌流范围

颇广。

本研究所用的 ^3H -5-HT 系肌酐硫酸盐, 比放射活性 10.7 居里/毫克分子。实验时用微量注射器将 ^3H -5-HT 5 微居里/5 微升从侧脑室套管注入脑室系统, 内含 ^3H -5-HT 的绝对剂量为 0.2 微克。随即又注射 30 微升人工脑脊液以避免 ^3H -5-HT 在套管内滞留。待 ^3H -5-HT 被脑室周围结构中的 5-HT 能神经末梢摄取 40 分钟后, 开始灌流。前 30 分钟为冲洗灌流, 主要系将套管内及脑室腔内残存的 ^3H -5-HT 冲洗出来。然后用含有 1% 乙二胺四乙酸钠(EDTA) 溶液 0.1 毫升的刻度离心管收集灌流液, 每 10 分钟一管。在收集灌流液的同时测痛。由于 5-HT 失活的主要方式是通过 5-HT 能神经末梢高效的重摄取, 因此从第 4 管起改用盐酸丙咪嗪 (5×10^{-3} 克/毫升) 的人工脑脊液灌流, 以防止释放出来的 5-HT 被神经末梢回收^[14]。针刺组在用丙咪嗪人工脑脊液灌流 50—60 分钟后, 开始针刺双侧“足三里” 20 分钟; 吗啡组在换用丙咪嗪人工脑脊液后 30—50 分钟, 由耳静脉注射盐酸吗啡溶液。一般共收集灌流液 10 管。

3. 灌流液放射强度的测量

每 10 分钟收集一次的灌流液体积约为 0.60—0.75 毫升。每管均以人工脑脊液加至 0.8 毫升。分别取 0.2 毫升加入含有 10 毫升闪烁液的计数杯中, 摇后即成均相, 虽经放置亦不分层。闪烁液的组成为 2, 5-二苯噻唑(PPO) 4 克, 1, 4-[2'-(5'-苯基噻唑)]-苯(POPOP) 0.6 克, 萘 75 克, 乙二醇乙醚 300 毫升, 二甲苯加至 1,000 毫升。用双管符合型液体闪烁计数仪测量, 不低于 30 倍本底的脉冲数所需的时间, 或测量一定时间以达到不低于 30 倍本底的脉冲数, 最后均换算成每分钟脉冲数(CPM)。此值乘 4 即为各管灌流液的总放射强度。

二、结 果

1. 对照组

本组实验主要观察在整个脑室灌流过程中动物的痛阈是否平稳; 灌流液中的放射强度以何种方式变化, 因为这是针刺实验前应该首先掌握的。9 只家兔在整个实验过程中痛阈平稳, 波动一般不超过 20%, 灌流液体积基本恒定。若以直方图表示, 各管放射强度随着灌流时间呈阶梯式下降, 最初降低的速度较快, 以后逐渐减慢, 与资料[15,16] 脑室注射同位素标记的 5-HT 及去甲肾上腺素(NA) 的灌流结果相符。82 号兔为其中一例(图 2)。该兔在实验期间除第 6 管稍多外, 灌流液体积基本保持恒定, 痛阈波动幅度很小。灌流液中放射强度除换用丙咪嗪人工脑脊液开始的两管脉冲数增加和维持恒定外, 随后均呈阶梯式下降趋势。

2. 针刺组

18 只家兔灌流液体积、针刺前的痛阈波动情况和灌流液放射强度的下降趋势, 均与对照组相同。针刺使其中 15 只的痛阈有不同程度的提高, 痛阈提高百分率超过 50% 以上者有 11 只。这 18 只家兔中有 13 只在针刺期间收集的灌流液中放射强度较针刺前也有不同程度的提高, 与对照组家兔灌流液中放射强度呈阶梯式逐管降低相反, 表明针刺期间 ^3H -5-HT 的释放增加。以实验过程中 ^3H -5-HT 释放增加与否作为质反应指标, 在针刺组和对照组间进行 χ^2 测验, $0.01 < P < 0.05$, 表明针刺过程中 ^3H -5-HT 的释放与对照组相比差异显著。而这 13 只 ^3H -5-HT 释放增加的家兔中, 11 只亦属上述痛阈提高者, 因此痛阈提高与 ^3H -5-HT 释放有一定的关系。由图 3 可见, 24 号兔经 20 分钟针刺后痛阈提高一倍以上, 与此同时灌流液中的放射强度也明显增加, 针刺的前 10 分钟脉冲增加了 2.5×10^3 CPM, 后 10 分钟增加 4.7×10^3

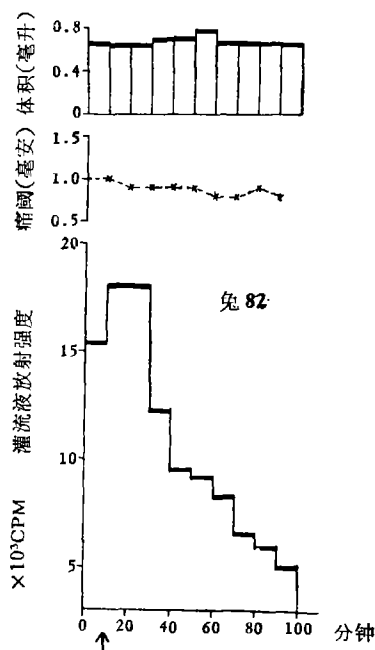


图2 对照组痛阈和灌流液中放射强度变化的关系

(箭头表示换用丙咪嗪人工脑脊液灌流)

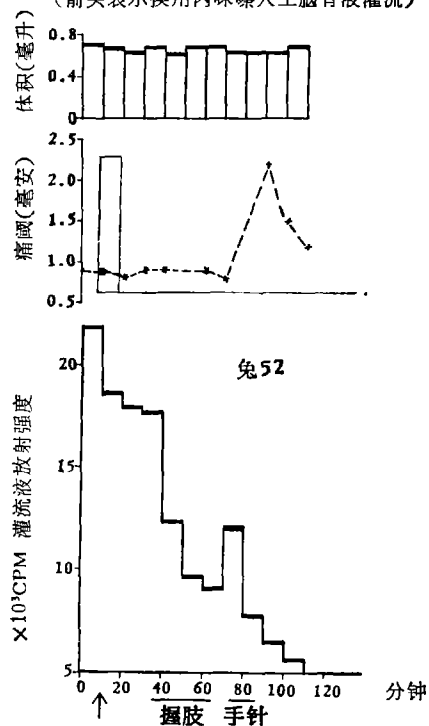


图4 单手握后肢对痛阈和灌流液中 ^3H -5-HT含量的影响

(注意单手握后肢和同时针刺之间的差别)

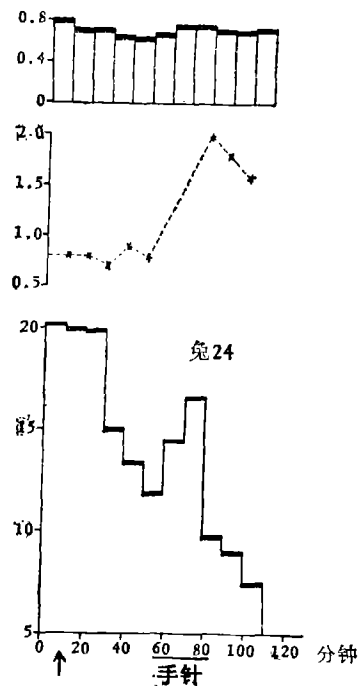


图3 针刺组痛阈和灌流液中放射强度变化的关系

(注意 ^3H -5-HT释放的同时痛阈明显提高)

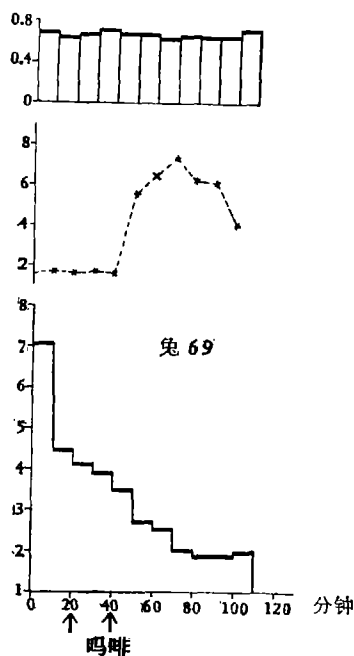


图5 吗啡静脉注射对痛阈和灌流液中放射强度变化的影响

(静脉注射后痛阈明显提高而无 ^3H -5-HT释放现象)

CPM, 总共增加了 7.2×10^3 CPM. 按计数效率为 14% 校正, 应为 5.14×10^4 DPM, 相当于 5-HT 绝对量 0.89 毫微克. 同一只家兔间隔一周后重复试验, 仍可见上述痛阈提高和 5-HT 释放的增加现象.

本组针刺是握住家兔两侧后肢情况下进行的, 因此有必要了解握腿这样一种刺激是否会导致脑内 5-HT 释放? 我们又在另外 15 只动物上观察了先手握后肢 20 分钟, 间隔 10 分钟, 然后再握腿针刺时脑内 5-HT 释放的变化. 结果证明单握后肢并不能引起 5-HT 释放的增加, 但其中部分动物再针刺时却能见到 5-HT 释放的增加现象. 图 4, 52 号兔情况是一个例子.

3. 吗啡组

6 只家兔中 3 只的吗啡剂量为 10 毫克/公斤, 另 3 只为 15 毫克/公斤. 静脉注射后痛阈均迅速而明显提高, 吗啡的其他中枢作用如呼吸抑制、瞳孔缩小等都非常明显, 但均未见 3H -5-HT 释放的增加现象, 灌流液中放射强度的变化型式与对照组相同. 由于吗啡作用很持久, 连续观察 1 小时以上才看到痛阈开始回降. 为了使实验时程与对照组一致, 并未延长灌流时间到痛阈降至给药前水平. 图 5, 69 号兔情况为其中一例.

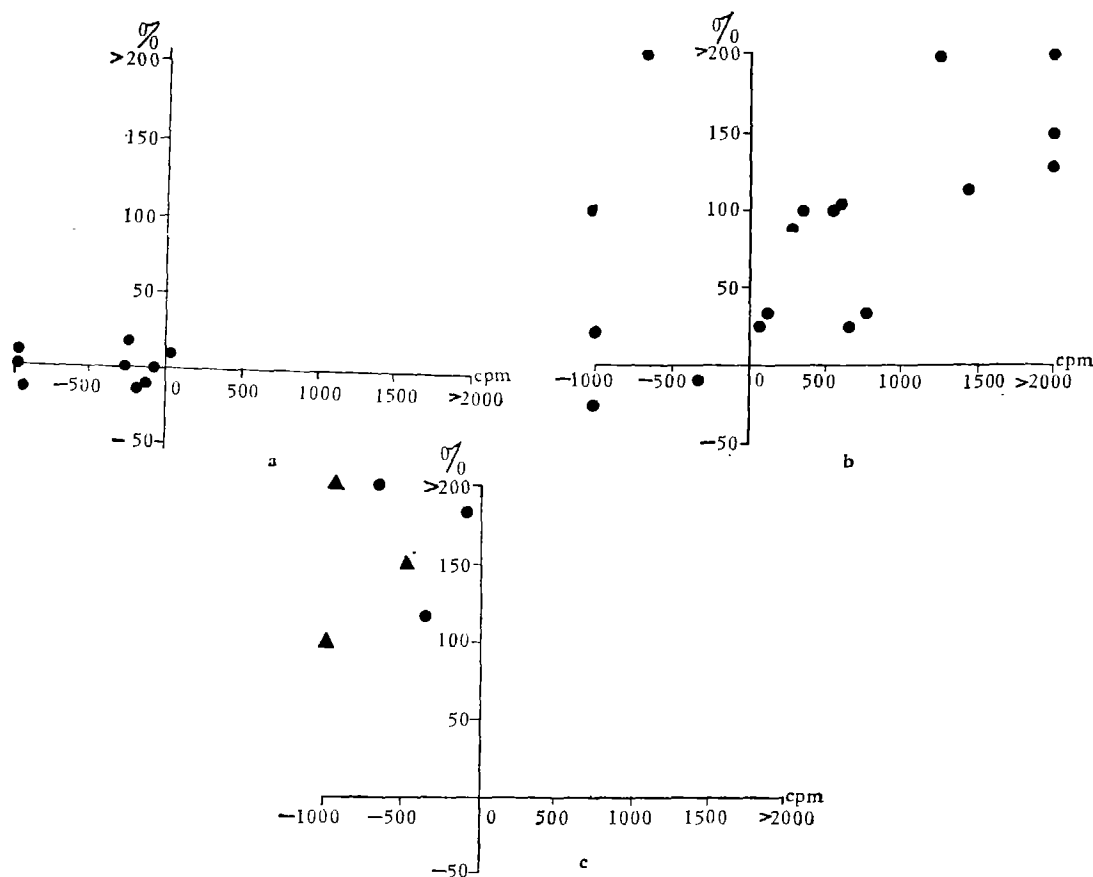


图 6 三组实验结果的图解

(纵坐标表示痛阈变化百分率之差, 横坐标表示纵坐标上同一时刻的 CPM 之差 a. 对照组: 每一点表示一次实验结果; b. 针刺组; c. 吗啡组: 圆圈为 10 毫克/公斤, 三角为 15 毫克/公斤)

倘若作图,以纵坐标表示针刺或吗啡注射前后痛阈变化的百分率之差,以针刺或吗啡注射前作为 100%;横坐标代表与纵坐标同一时刻的 CPM 之差,对照组则以相当于此时此刻前后两管计算,正值代表 5-HT 释放增加,负值表示灌流液中放射强度降低;可将上述三组结果用图 6 表示。图 6a 为对照组,9 只家兔中有 8 只的结果都分布在横坐标 0 点以左,纵坐标 0 点上下 20% 左右。这说明 5-HT 释放既未增加,痛阈也未提高。而针刺组(图 6b)绝大多数实验结果分布在第一象限,说明在痛阈提高的同时 5-HT 释放也增加。18 只动物中有 2 只实验结果,坐落于第三象限,这表示痛阈未提高,5-HT 释放也不增加。可见针刺提高痛阈和 5-HT 释放增加是有一定关系的。其余 3 只动物的实验结果出现于第二象限,其中 2 只针刺后痛阈明显提高,却未见 5-HT 释放增加,但这在 18 只动物中是少数。吗啡组(图 6c)6 只动物的结果都集中分布在第二象限横坐标以上较高部位,说明吗啡使痛阈显著提高,然而并不增加 5-HT 的释放。

三、讨 论

在动物清醒状态下采用脑室灌流,能够同时观察痛阈变化和介质释放之间相关性的整个动态过程。每一次实验又是同一只动物针刺前后或注射吗啡前后的自身对照,分成三组后又可进行组间比较。5-HT 能神经末梢对 5-HT 所具有的高度选择性摄取机制已为许多实验所证明。例如荧光组织化学和电镜放射自显影都证实大鼠侧脑室注射 5-HT 或 ^3H -5-HT 可被脑室周围 5-HT 能神经末梢所摄取^[17-19]。但是这种选择性也不是绝对的,试管内实验当浓度超过 $8\text{ }\mu\text{M}$ 时,也可能为其他单胺类神经末梢所摄取^[9]。因此要用高比放射活性的 ^3H -5-HT。我们所用的 ^3H -5-HT 的比放射活性较上述资料所用的高一倍以上,注射的 5-HT 绝对量(0.2 微克)又低于上述资料报道,家兔脑室内脑脊液量又显然比大鼠为多。因此在我们的实验条件下, ^3H -5-HT 为其他神经末梢所摄取的可能性较小。我们认为所观察到的针刺时灌流液中放射强度(^3H -5-HT 及其代谢产物)的增加乃代表 5-HT 神经原被激活。

根据资料报道^[20,21],用人工脑脊液灌流猫脑室时,灌流液中 5-HT 含量极少。用大剂量单胺氧化酶抑制剂预先处理,每 25 分钟的灌流液中 5-HT 含量亦不超过 1—6 毫微克。灌流液中 5-HT 量虽少但较稳定,说明静息时 5-HT 能神经原存在着自发活动。电生理研究^[22]证明,大鼠中脑中缝核单个神经原的自发放电频率为 0.2—2.5 次/秒,而且非常规则,也反映了这一点。有意义的是:只有直接刺激中缝核本身才能使灌流液中 5-HT 量增加^[21]。频率以低为最适^[20]。这与脑室灌流液中乙酰胆碱的变化成了鲜明的对照。乙酰胆碱很容易为各种刺激所释放,而且在一定范围内刺激频率越高释放量也越多。此外,当动物在清醒状态下只有环境温度的急骤改变,才能影响脑室灌流液中 5-HT 的含量^[23]。在我们的实验过程中,针刺前后环境温度骤变的情况是不存在的。手握后肢并不增加 5-HT 的释放;实验过程中钾离子透入引起痛反应时也不伴随 5-HT 释放的增加。这些都说明针刺过程中 5-HT 释放的增加可能有一定的特异性。临床实践证明,要使针麻成功,除穴位选择外,电针的参数和针刺的手法都很重要,也许这都是构成激活脑内 5-HT 能神经原的条件。

现有一些资料说明直接电刺激动物脑干的中缝核及其邻近区域,可以产生镇痛效应^[24-26]。注射阻断 5-HT 生物合成的对氯苯丙氨酸,则镇痛效应减弱^[27]。这些结果表明 5-HT 能神经原激活可以产生或加强镇痛效应。

十余年前,我们观察到家兔脑室内注射 5-HT, 剂量要高达 100 微克才有 1 小时左右的镇痛效应^[28]。因此从针刺时脑室灌流液中 5-HT 释放量极少来看,很难设想是通过释放 5-HT 到脑室,然后作用于脑室壁结构而发挥镇痛效应的。很可能针刺时脑室灌流液中 5-HT 释放量的增加,仅仅反映了 5-HT 能神经原被激活,而真正的作用部位还在离脑室壁更远的地方。荧光组织化学的资料^[29]证明,中枢内所有 5-HT 能神经纤维均起源于脑中缝核,但各核团的纤维走向不同,它们的功能也可能不一样。针刺镇痛究竟和哪一部分关系最密切还有待解决。至于其他神经介质在针刺镇痛中的作用如何、与 5-HT 释放之间有何联系等等,都是需要进一步研究的问题。

吗啡镇痛与脑内神经介质关系的资料极多,几乎所有拟议中的介质都被认为有关,目前还难于下结论^[30]。认为和 5-HT 有关的也大不乏人。我们的结果说明吗啡发挥镇痛作用时并无 5-HT 释放到脑室,但并不排除与 5-HT 有关的其他可能性。我们要强调的只是:脑室灌流条件下,吗啡和针刺对 5-HT 释放的影响是不同的。因此它们的作用原理也可能不一样。由于吗啡镇痛原理的研究比较深入,我们认为继续比较针刺镇痛与吗啡镇痛的异同,有助于阐明针刺镇痛的原理。

从针刺镇痛可能通过激活 5-HT 能神经原发挥作用这一设想出发,联系到临床实践,我们想采用促进 5-HT 能突触传递的药物可能会加强针麻效果。如上所述,5-HT 释放出来后主要通过重摄取而失活,丙咪嗪和氯丙咪嗪等药物能选择性地阻断这一过程,从而加强 5-HT 能突触传递^[31]。此外,单胺氧化酶抑制剂和 5 羟色氨酸均能增加脑内 5-HT 含量。因此,将这些药物适当地与针麻结合起来是值得考虑的。

参 考 资 料

- [1] 张香桐, 中国科学, 1973, 1, 28—55.
- [2] 上海中医学院、上海师范大学、上海中医学院附属曙光医院, 中华医学杂志, 53 (1973), 136—138.
- [3] 吴建屏、赵志奇、魏仁榆, 中国科学, (1974), 5, 526—533.
- [4] 沈铿、蔡体导、蓝青, 中华医学杂志, 54 (1974), 628—633.
- [5] 北京医学院基础部针麻原理研究组生理组, 中国科学, 1974, 1, 98—108.
- [6] 湖南医学院针麻原理研究组, 中华医学杂志, 53 (1973), 478—486.
- [7] Snyder, S. H., Kuhar, M. J., Green, A. I., Coyle, J. T., & Shashan, E. G., *Int. Rev. Neurobiol.*, 13 (1970), 127—158.
- [8] Iversen, L. L., *Biochem. Pharmacol.*, 23 (1974), 1927—1936.
- [9] Harvey, J. A. & Lints, C. E., *J. comp. Physiol. Psychol.*, 74 (1971), 28—36.
- [10] Vogt, M., *Lecture delivered in Shanghai*, November, 1973.
- [11] Kuhar, M. J. & Aghajanian, G. K.: *Nature New Biol.*, 241 (1973), 187—189.
- [12] Sawyer, C. H., Everett, J. W. & Green, J. D., *J. comp. Neurol.*, 101 (1954), 801—824.
- [13] Pappenheimer, J. R., Heisey, S. R., Jordan, E. F. & Downer, J., *Am. J. Physiol.*, 203 (1962), 763—774.
- [14] Lidbrink, P., Jonsson, G. & Fuxe, K., *Neuropharmacology*, 10 (1971), 521—536.
- [15] Tilson, H. A. & Sparber, S. B., *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 181 (1972), 387—398.
- [16] Sparber, S. B. & Tilson, H. A., *Neuropharmacology*, 11 (1972), 453—464.
- [17] Fuxe, K. & Ungerstedt, U., *J. Pharm. Pharmacol.*, 19 (1967), 335—337.
- [18] Aghajanian, G. K. & Bloom, F. E., *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 156 (1967), 23—30.
- [19] Fuxe, K., Hökfelt, T., Ritzén, M. & Ungerstedt, U., *Histochemie*, 16 (1968), 186—194.
- [20] Holman, R. B. & Vogt, M., *J. Physiol.*, 223 (1972), 243—254.
- [21] Ashkenazi, R., Holman, R. B. & Vogt, M., *ibid.*, 233 (1973), 195—209.
- [22] Aghajanian, G. K., Foote, W. E. & Sheard, M. H., *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 171 (1970), 178—187.
- [23] Myers, R. D. & Beleslin, D. B., *Am. J. Physiol.*, 220 (1971), 1746—1754.

- [24] Mayer, D. J., Wolfe, T. L., Akil, H., Cardner, B. & Liebeskind, J. C., *Science*, **174** (1971), 1351—1354.
- [25] Reynolds, D. V., *ibid.*, **164** (1969), 444—445.
- [26] Samain, R. & Valzelli, L., *Eur. J. Pharmacol.*, **16** (1971), 298—302.
- [27] Akil, H. & Mayer, D. J., *Brain Res.*, **43** (1972), 692—697.
- [28] 邹冈, 张昌绍: 吗啡镇痛作用部位的脑内微量注射研究, *Scientia Sinica*, **13** (1964), 1099—1109.
- [29] Hökfelt, T. & Ljundahl, A. S., in *Neurotransmitters* (ed. Kopin, I. J.), Williams & Wilkins, Baltimore, 1972, 1—24.
- [30] Vogt, M., in *Agonist and antagonist Actions of Narcotic Drugs* (ed. Kosterlitz, H. W. et al.), MacMillan, London, 1972, 139—141.
- [31] Meek, J., Fuxe, K. & Anden, N. E., *Eur. J. Pharmacol.* **9** (1970), 325—332.