

微电泳导入5-羟色胺对中缝大核缝-脊神经元活动的影响

朱丽霞、黎春元、史清瑶、吉长福 (中医研究院针灸研究所生理一室, 北京 100700)

提要 在大鼠中缝大核胞外记录逆向动作电位, 按潜伏期恒定、能跟随高频刺激及被自发放电碰撞三项标准鉴定了44个缝-脊神经元。在其中16个微电泳导入5-HT均产生抑制效应, 在另9个观察到小剂量LSD对自发放电或诱发反应的抑制效应, 说明这些都是5-HT神经元。电针双侧足三里激活其中19个, 这可能在针刺镇痛中起重要作用。

关键词 5-羟色胺; 麦角酸二乙胺; 中缝核; 逆向动作电位; 离子透入法; 脊髓; 针术

中缝大核(NRM)是5-羟色胺(5-HT)胞体密集分布的主要核团之一⁽¹⁾, 又是脊髓背外侧索的主要发源地⁽²⁾, 在脊髓痛觉传递的下行性调制中起重要作用⁽³⁾。

关于NRM在针刺镇痛中的作用已有不少报道⁽⁴⁾。我们在观察到电针穴位可激活多数NRM神经元的基础上, 又观察到微电泳导入5-HT可抑制多数NRM神经元^(5,6)。本文拟对NRM的缝-脊神经元(R-S神经元)进一步观察导入5-HT的效应及iv小剂量麦角二乙胺(LSD)的效应, 以分析电针激活的神经元的递质属性及其在针刺镇痛中的作用。

材料和方法

大鼠, 体重 $265 \pm SD 38$ g, ♀♂不拘。乌拉坦1g/kg ip麻醉, 气管插管, 暴露胸髓及颅骨钻孔, 固定在定位仪上, 调节头骨前屈度, 使前后囟平, 于后囟后3.7-3.8 mm处破脑膜, 借操纵器将七管微电极下插到小脑表面下7500-9300 μ m范围内记录NRM神经元的活动。固定脊椎骨, 剪去硬脊膜, 将一对银球电极(极间1-1.5 mm)接触胸髓(T₅₋₆或T₁₀₋₁₁)背外侧表面, 备逆向刺激用。

以七管微电极中心管(NaCl 4 mol/L)记录细胞活动, 引出信号经放大后输到窗口鉴别器, 择其进入窗口的信号, 输到数据处理装置, 或记忆储存其逆向动作电位或对其自发放电作脉冲计数直方图, 均用X-Y记录仪描记。

电针选用双侧足三里穴, 通以频率为50Hz, 强度为20V的双相脉冲波, 持续1 min。

微电极侧管分别灌以5-HT 16 mmol/L 硫酸肌酐(pH 4.5), 单钠谷氨酸盐0.5 mol/L (Glut pH 8.5), 二甲麦角新碱0.05 mol/L (MSG), 供导入药物用; NaCl 2 mol/L作平衡对照用; 2%滂胺天蓝醋酸钠溶液(0.5 mol/L), 供标定电极尖端位置用。

部分大鼠作尾静脉插管, 备iv LSD用。

整个记录过程是在用三碘季胺酚麻痹情况下进行。体温维持在37-38.5℃。实验毕, 在滂胺天蓝管通以直流电10 μ A 10 min, 以标定所记细胞的深度。测量逆向刺激电极与NRM记录电极间的距离后, 取出脑, 以福尔马林固定, 作冰冻切片, 焦油紫染色。

结 果

中缝大核缝-脊神经元的鉴定 通过银球电极以波宽0.07-0.1ms方波刺激胸髓背外侧部, 在NRM寻找可被逆向刺激激活的神经元, 共记录65个, 其中44个被鉴定为R-S神经元。其特征是:

1. 具有恒定的潜伏期 当刺激强度达到阈强度时, 可见潜伏期恒定的逆向动作电位, 加强刺激强度到2-3倍阈强度时, 潜伏期仅缩短0.1ms。根据传导距离与潜伏期计算其传导速度。在32个神经元中, 传导速小于5 m/s的仅1例, 5-30 m/s的23例, 31-50 m/s的

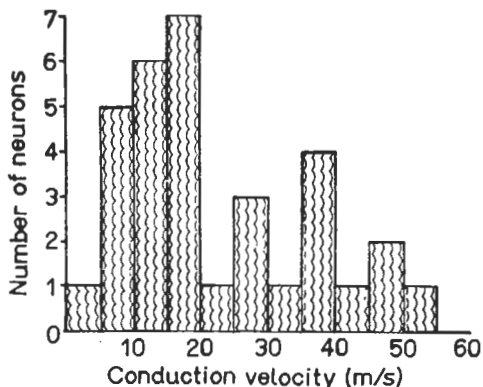


Fig 1. Distribution of conduction velocity of 32 raphe-spinal neurons.

8例,多数相当于A δ 纤维的传导速度,其分布如图1。

2. 能跟随高频刺激 以间隔为3ms的双脉冲或三个脉冲刺激脊髓,能跟随而产生2或3个逆向动作电位,部分神经元还可跟随500Hz的刺激,只是第三个逆向动作电位的潜伏期有时可延长0.1-0.2ms。

在39个神经元还用双脉冲刺激检查了不应期,除3个外,不应期均短于2ms,平均为 $1.40 \pm SD 0.56$ ms。

3. 可与自发放电碰撞 在符合上述两点的65个神经元中,有48个神经元有自发放电,进行了碰撞实验。以自发放电触发刺激器,以刺激器的延迟来调节自发放电与刺激间的间隔,当此间隔小于临界延迟(critical delay),因发生碰撞而不能记到逆向动作电位。此延迟也就是产生碰撞的最大间隔,即碰撞间隔(collision time)。实际测得的碰撞间隔(C)往往较其计算值(潜伏期加不应期)为小,但很接近。图2为一例R-S神经元,潜伏期(L)与不应期(R)分别为1.4ms和1.7ms,碰撞间隔为3.0ms,较其计算值3.1ms略小。图3碰撞间隔与其计算值的相关曲线,相关系数为0.9786, $C = 0.91(L + R) - 0.33$ 。

有4个神经元,没有发生碰撞,仔细审查自发放电与逆向动作电位的波幅与波形,发现两者并非同一神经元,故不能碰撞,

符合上述三个特征的44个神经元,均被鉴定为缝-脊神经元。

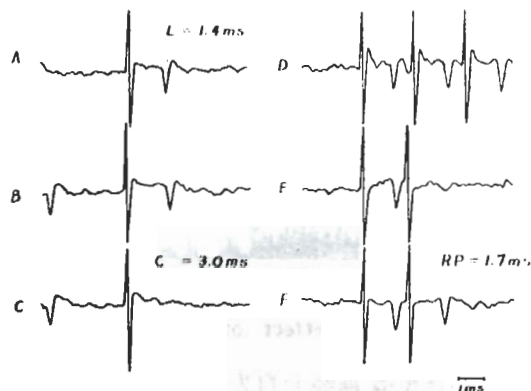


Fig 2. Antidromic action potential of a raphe-spinal neuron in nucleus raphe magnus. Constant latency (L) 1.4 ms in A; collision time (C) 3.0 ms in B and C; following frequency 500 Hz in D; refractory period (RP) 1.7 ms in E and F.

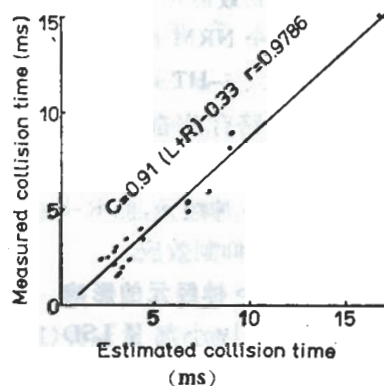


Fig 3. Correlation of the measured collision time and the estimated value.

微电泳导入5-HT对R-S神经元的效应

在16个神经元观察了导入5-HT的效应。导入电流多为60nA,个别为120nA,导入全过程给以极性相反、大小相同的平衡电流,两次导入间歇均给以滞留电流,约6-12nA。导入时间为25s,导入5-HT过程中,自发放电减少,一般需10-15s才减到最少,停止导药后渐渐恢复,停导后2min时,基本恢复,尚不能恢复到对照水平。图4示其中两个神经元,一个电针穴位能激活,另一个电针没影响,但导入5-HT均产生抑制效应。

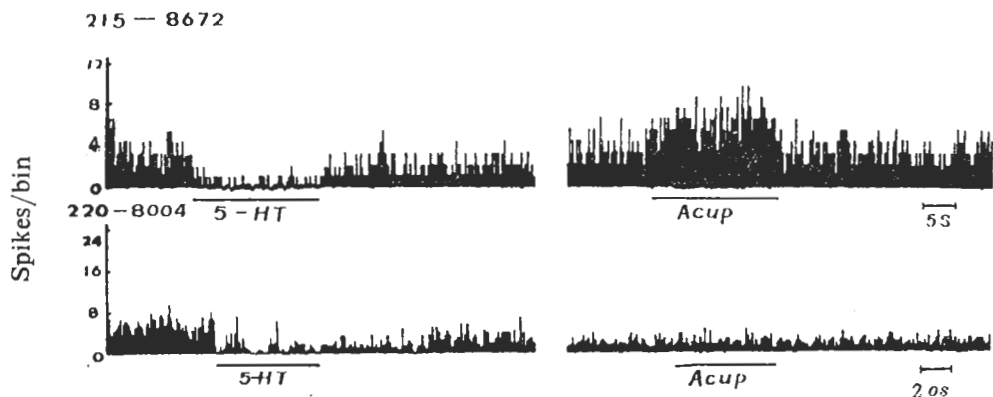


Fig 4. Inhibitory effect of iontophoretic 5-HT on 2 raphe-spinal neurons (215-8672 and 220-8004).

3个R-S神经元自发放电很少,在微电泳导入谷氨酸引起放电增加的背景下,导入5-HT仍能产生抑制效应。但事先导入5-HT受体阻断剂——二甲麦角新碱 methysergide(MSG),和以往工作结果一样,再次导入5-HT则不再抑制了,即此抑制效应可被MSG阻断。

另外,有5个NRM神经元,未能被逆向刺激所激活,导入5-HT可抑制3个神经元的自发放电,1个略有兴奋,另1个则没有影响。由此说明,导入5-HT产生抑制效应的神经元并非都是R-S神经元,而R-S神经元对导入5-HT则多产生抑制效应。

iv LSD对R-S神经元的影响 在9个R-S神经元观察了尾iv小剂量LSD(10μg/kg)的

效应,在iv LSD后,不论自发放电(4个)还是电针穴位的诱发反应(5个)均受到明显的抑制。3例在iv LSD后5min内产生抑制效应,25-40min恢复;6例在iv后10-15min才明显抑制,可持续到45-90min才恢复,个别神经元则到iv后110min才恢复。2例iv生理盐水,1hr内未见明显变化。从图5可见iv LSD分别抑制一神经元(H8750)的自发放电及另一神经元(H8538)的诱发反应,而iv生理盐水则无抑制效应。

我们曾在尾iv LSD产生抑制效应时,改变电极深度,发现位于该神经元的深和/或浅处有自发放电的神经元,但逆向刺激不能激活,回到原处,经过一段时间后,该神经元才渐渐

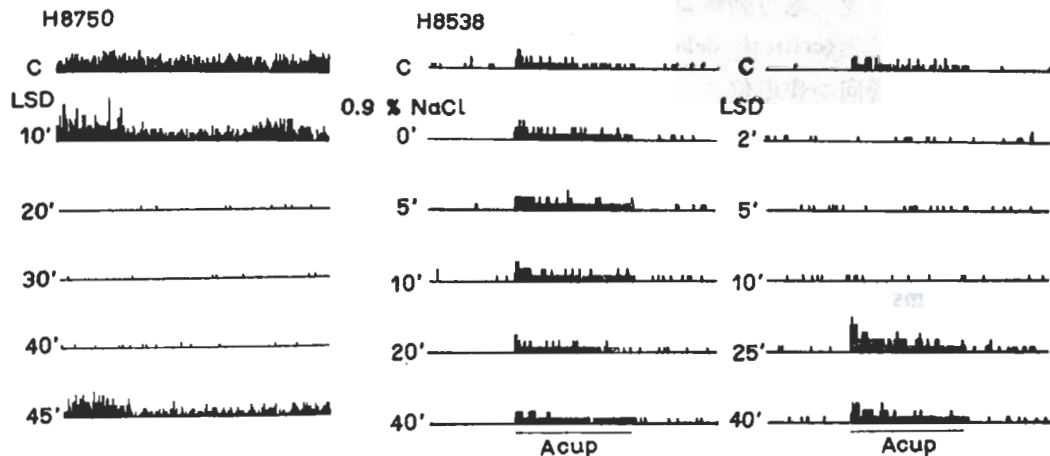


Fig 5. Inhibitory effect of systemic LSD on spontaneous discharges of a raphe-spinal neuron (H8750) and acupuncture activated effect of another raphe-spinal neuron(H8538) in 45 min. C = control before LSD or saline injection,

恢复。说明小剂量 LSD 对 R-S 神经元有相对特异的抑制效应。

电针双侧足三里穴的效应 以往的工作中已观察到电针双侧足三里穴可激活 NRM 多数神经元, 本实验又对上述 25 个 R-S 神经元观察了电针效应, 19 个明显激活, 4 个无变化, 2 个则略有抑制, 说明电针穴位能激活多数导入 5-HT 及 iv LSD 产生抑制效应的 R-S 神经元。

讨 论

本实验用多管微电极在 NRM 记录到的 R-S 神经元的传导速多数(97%)在 5-50 m/s 范围内, 与文献报道的 10.5-55 m/s⁽⁷⁾与 6.8-60 m/s⁽⁸⁾相似。但是不能排除因用多管微电极记录(电极尖端较粗)而遗漏部分峰-峰值较小的慢传导的 R-S 神经元的可能。

最近 Wessendorf 等人⁽⁹⁾报道, NRM 内慢传导(传导速在 0.7-1.0 m/s)的 R-S 神经元是 5-HT 能的。那些传导速在 18.1-21 m/s 的神经元, 在注射神经毒 5,7-双羟色胺后也明显减少, 但他根据脊髓背角浅层较少见到直径 > 3 μm 的 5-HT 终末而认为这些不是 5-HT 能神经元。但从本实验结果看, 传导速在 5-30 m/s 的 R-S 神经元未必不是 5-HT 能的。

在离体实验中已证明胞外 5-HT 可抑制 5-HT 神经元合成 5-HT 及释放 5-HT; 而在脑内微电泳导入 5-HT⁽¹⁰⁾、或因给予 5-HT 前体⁽¹¹⁾或重摄取抑制剂⁽¹²⁾提高脑内 5-HT 水平时均可抑制中缝背核 5-HT 神经元的放电; 进而又证明在中缝核胞体及树突上存有 5-HT 的自家受体⁽¹³⁾, 这些都说明 5-HT 神经元存有负反馈的调节, 导入 5-HT 可抑制 5-HT 能神经元的放电, 就是负反馈调节的结果。同理, 我们试图在 NRM 观察微电泳导入 5-HT 的效应来协助鉴别神经元的递质属性。以往的实验⁽⁹⁾表明导入 5-HT 可抑制多数 NRM 的神经元(17/27)此效应可被 5-HT 受体阻断剂阻断, 说明 NRM 有相当多的 5-HT 能神经元。本实验在 16 个

R-S 神经元导入 5-HT, 则全部产生程度不同的抑制效应, 说明在 NRM 的 R-S 神经元中 5-HT 神经元的比例较高, 和 Bowker 等人⁽¹⁴⁾报道的绝大部分(88.6%)的 R-S 神经元是 5-HT 能神经元的结果相似。

据报道⁽¹⁵⁾iv 小剂量 LSD 可选择性地抑制中缝核神经元放电, 微电泳导入小剂量 LSD 也可产生抑制效应, 它是不依赖突触后神经元参与的突触前的直接效应。LSD 对 5-HT 能神经元的抑制效应的特异性较导入 5-HT 更强。本实验在 9 个 R-S 神经元观察了 iv 小剂量 LSD 的效应, 不论自发放电还是诱发反应都被抑制, 进一步说明大多数 R-S 神经元是 5-HT 能的。

综上所述, 本实验观察到 NRM 中传导速在 5-30 m/s 的 R-S 神经元中, 可被导入 5-HT 或 iv LSD 所抑制的神经元, 可能也包括在 NRM 向脊髓投射的 5-HT 能神经元中。电针穴位可激活多数这类神经元, 通过对脊髓痛觉传递进行下行抑制而产生镇痛效应。

参 考 文 献

- 1 Dahlstrom A, Fuxe K, Evidence for the existence of monoaminocytaining neurons in the central nervous system, *Acta Physiol Scand* 1964; 62 (suppl 232) : 1
- 2 Basbaum AI, Fields HL, The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat. Further studies on the anatomy of pain modulation. *J Comp Neurol* 1979; 187 : 513
- 3 邹 冈, 易庆成. 内源性吗啡样多肽和镇痛. *生理科学进展* 1978; 9 : 2
- 4 江振裕, 杜焕基, 赵燕芳, 等. 损毁大白鼠脑中缝核群对针刺镇痛效应的影响. *中华医学杂志* 1977; 57 : 611
- 5 史清瑶, 朱丽霞. 中缝大核微电泳导入纳洛酮对电针效应的影响. *针刺研究* 1983; 8 : 89
- 6 史清瑶, 朱丽霞. 中缝大核微电泳导入 5-HT 的作用与电针效应的关系. 同上 1984; 9 : 59
- 7 Lovick TA, West DC, Walstencroft JH. Responses of raphe-spinal and other bulbar raphe neurons to stimulation of the periaqueductal gray in the cat. *Neurosci Lett* 1978; 8 : 45

- 8 Pomeroy ST, Behbehani MM. Response of nucleus raphe magnus neurons to iontophoretically applied substance P in rats. *Brain Res* 1980; 202 : 464
- 9 Wessendorf MW, Proudfit HK, Anderson EG. The identification of serotonergic neurons in the nucleus raphe magnus by conduction velocity. *Ibid* 1981; 214 : 168
- 10 Bramwell GJ, Gönye T. Responses of midbrain neurons to iontophoretically applied 5-HT. *Br J Pharmacol* 1973; 48 : 357
- 11 Aghanjanian GK. Influence of drugs on the firing of serotonin-containing neuron in brain. *Fed Proc* 1972; 31 : 91
- 12 Bramwell GJ. Effect of imipramine on unit activity in the midbrain raphe of rats. *Br J Pharmacol* 1972; 44 : 345
- 13 Ennis C, Cox B. Pharmacological evidence for the existence of two distinct serotonin receptors in rat brain. *Neuropharmacology* 1982; 21 : 41
- 14 Bowker RM, Westlund KN, Coulter JD. Origins of serotonergic neurpsns in the spinal cord in rat : An immunocytochemical-retrograde transport study. *Brain Res* 1981; 226 : 187
- 15 Bramwell GJ, Gönye T. Responses of mid-brain neurons to micro-iontophoretically applied 5-hydroxytryptamine : Comparison with the response to intravenously administered lysergic acid diethylamide. *Neuropharmacology* 1976; 15 : 437

Acta Pharmacologica Sinica 1986 Sep; 7 (5) : 394-398

Effect of iontophoretic 5-HT on raphe-spinal neurons

ZHU Li-xia, LI Chun-yuan, SHI Qing-yao, JI Chang-fu

(Dept Physiology I, Inst Acupuncture and Moxibustion, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700)

ABSTRACT Forty-four raphe-spinal neurons in the nucleus raphe magnus (NRM) of immobilized rats were identified by antidromic action potentials with constant latency, ability of following high frequency stimulation (333 Hz) and collision by orthodromic action potentials or spontaneous spikes.

The spontaneous discharges were reduced by iontophoretic 5-HT in all 16 raphe-spinal neurons tested and both spontaneous discharges and excitatory effect of acupuncture were inhibited by lysergic acid diethylamide (LSD) 10 µg/kg in all 9

neurons. These inhibitory effect may be mediated by presynaptic negative feedback regulation. Therefore, it is considered that these neurons may be serotonergic.

Most serotonergic raphe-spinal neurons may be activated by acupuncture, which may play an important role in acupuncture analgesia.

KEY WORDS serotonin; lysergic acid diethylamide; raphe nuclei; antidromic action potentials; iontophoresis; spinal cord; acupuncture