

## 海马内 $\delta$ 受体在电针抑制电惊厥中的作用<sup>1</sup>

何晓平、曹小定 (上海医科大学基础部神经生物学教研室, 上海 200032, 中国)

### Effects of intrahippocampal $\delta$ -receptors on inhibition of electroconvulsive shock by electro-acupuncture<sup>1</sup>

HE Xiao-Ping, CAO Xiao-Ding (Department of Neurobiology, Faculty of Basic Medical Sciences, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**Abstract** The relationship between the  $\delta$ -receptors of the hippocampus and electroacupuncture (EA) anticonvulsions was analyzed by radioimmunoassay and microinjection. The content of leu-enkephalin-like immunoreactive substance (LEK-LIS) in perfusate from the hippocampus increased after repeated electroconvulsive shock (ECS), while the content of LEK-LIS was not changed after single ECS. EA inhibited epileptiform spikes induced by ECS, and the content of LEK-LIS decreased markedly after EA ( $30 \pm 9$  pg/0.1 ml lower than that before EA). Leu-enkephalin (LEK), an agonist of the  $\delta$ -receptors, 10  $\mu$ g injected into the hippocampus produced epileptiform spikes. However, ICI 174 864 (4  $\mu$ g),

a specific antagonist of the  $\delta$ -receptors, suppressed convulsions significantly. The results suggest that the  $\delta$ -receptors of the hippocampus participate in EA anticonvulsions.

**Key words** epilepsy; convulsions; acupuncture; hippocampus; endorphin receptors; leucine enkephalin; perfusion; radioimmunoassay; ICI 174 864

**提要** 反复电惊厥使海马推挽灌注液中亮啡肽样免疫活性物质(LEK-LIS)的含量增加, 经电针处理后再给予电惊厥, 则含量明显下降。海马内微量注入 $\delta$ 受体的激动剂LEK引致皮层的痫样放电, 而注入该受体的拮抗剂ICI 174 864却明显抑制了电惊厥。结果提示海马内的 $\delta$ 受体是与惊厥发作及电针抑制惊厥发作有关的。

**关键词** 癫痫; 惊厥; 针刺; 海马; 内啡肽受体; 亮氨酸脑啡肽; 灌注法; 放射免疫测定; ICI 174 864

1988年4月16日收稿 1988年10月26日接受

<sup>1</sup> 本工作受到霍英东教育基金会资助。

电针对青霉素诱发的皮层痫样放电和电惊厥均具有抑制作用,且涉及内阿片肽系统<sup>(1-3)</sup>。海马与惊厥发作有密切关系<sup>(4)</sup>。用放射自显影法观察到电针抑制电惊厥时海马内的阿片受体结合部位可发生变化(待发表资料)。不同亚型的阿片受体在惊厥发作中的作用是不同的<sup>(5,6)</sup>。针刺抑制惊厥发作究竟影响了何种亚型的阿片受体?迄今未见文献报道。故本实验用放射免疫法测定海马推挽灌注液中亮啡肽样免疫活性物质(Leu-enkephalin-like immunoreactive substance, LEK-LIS)的含量,并在海马内微量注射 $\delta$ 受体激动剂和拮抗剂,旨在观察和分析海马内 $\delta$ 受体在电针抑制惊厥发作中的作用。

## Materials and methods

大鼠 45 只,体重  $234 \pm SD 21$  g,  $\text{♀} \text{♂}$  不拘。用乙醚麻醉后,将头部固定于立体定向仪上。经双耳电极给予电惊厥刺激,30 min 刺激一次,方法详见前文<sup>(2)</sup>。以电极引导皮层及海马电活动,经去伪迹后描记在 SJ-42 型多道生理记录仪上,同时用磁带数据记录仪录取脑电信号,遂输入 Apple II 微机分析处理。以一次电惊厥发作为一个样本进行分析,其分析结果为一次发作中痫样放电的频率和振幅的面积以及放电持续时间,并用成对或成组的非参数统计法进行统计学处理。

在海马内埋置推挽套管( $P_2$ ,  $RL_2$ ,  $H_3$ )。套管由不锈钢同心管组成,外管直径为 0.9 mm,内管直径为 0.4 mm,内管下端伸出外管 0.5 mm。灌注液为恒温的人工脑脊液(其配方为  $\text{NaCl}$  130.11,  $\text{KCl}$  2.99,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.52,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  0.04,  $\text{NaHCO}_3$  24.97,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0.80,  $\text{CaCl}_2$  1.30 mmol/L,  $38^\circ\text{C}$ )。由恒速灌注器以  $75 \mu\text{l}/\text{min}$  的速度进行灌注。灌注于术后 3-4 h 开始,待平衡 30 min 后正式收集样品。每 30 min 收集 1 管,每管收集 20 min,约 1.5 ml。收集 1 管,即在沸水浴中煮 7 min,然后储存于  $-20^\circ\text{C}$  待测。

亮啡肽(Leu-enkephalin, LEK)放免药箱购自上海第二医科大学高血压研究所,按脑啡肽的放射免疫法<sup>(7)</sup>进行测定。处理前后 LEK-LIS 含量的变化采用  $t$  检验。

海马内微量注射采用双层不锈钢套管,外管直径 0.75 mm,内管直径 0.40 mm,内管较外管长 0.50 mm。待电惊厥引致的发作稳定后,于下一次电惊厥前 5 min 从预先埋置的套管内向一侧海马注入  $\delta$  受体的激动剂 LEK  $10 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$  或拮抗剂 ICI 174 864  $4 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ,以等量生理盐水为对照。注射均在 2 min 内完成。LEK 购自中科院上海生化研究所;ICI 174 864 由英国 ICI Pharmaceutical Division 赠送。

实验结束后,作形态学检查,以鉴定套管部位,凡定位不准者弃去不用。

## Results

### 海马推挽灌注液中 LEK-LIS 的含量测定

大鼠 25 只,分为 3 组。对照组不给予任何处理,每间隔 30 min 收集灌注液 1 管,共收 5 管。电惊厥组在收集 1 管作为对照后,分别给予电惊厥 4 次,于刺激即刻开始收集灌注液。而电针加电惊厥组则在给予第 4 次电惊厥前施用电针刺激,电针刺激方法同前文<sup>(2)</sup>。

1 电惊厥 放射免疫的测定结果表明,在 2.5 h 内,LEK-LIS 的含量基本是稳定的。给予惊厥刺激后,大鼠惊厥发作。同时,4 次电惊厥都使海马灌注液中 LEK-LIS 的含量增加,其中第 3 和第 4 次电惊厥所引起的 LEK-LIS 含量升高,与惊厥前相比,有显著性差异( $P < 0.05$ ) (Fig 1)。结果表明,反复电惊厥可使海马内 LEK-LIS 的释放增加。

2 电针加电惊厥 电惊厥引起皮层的高幅痫波发放。电针刺激后再给予电惊厥,所产生的痫波发放明显减少。将痫波的频率面积,振幅面积及放电持续时间 3 项指标经微机统计学处理, $P$  值分别小于 0.05, 0.01 和 0.01, (Fig 2)。结果表明在收集海马灌注液的第 3 组大鼠,电针对电惊厥发作具有抑制作用,放

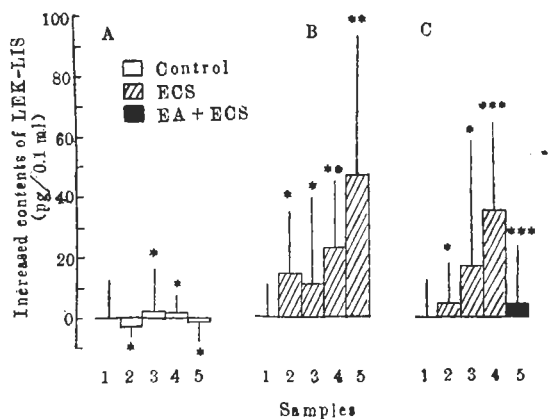


Fig 1. Contents of Leu-enkephalin-like immunoreactive substance (LEK-LIS) in perfusate of the hippocampus after electroconvulsive shock (ECS) or electro-acupuncture (EA). (A) Control,  $n=7$ , 5 samples were collected without any pretreatment. (B) ECS,  $n=7$ . The 1st sample, control, the other samples with 1st, 2nd, 3rd and 4th ECS. (C) EA + ECS,  $n=11$ . The 1st sample, control. The 2nd - 4th samples with ECS. The 5th sample with ECS and EA.  $\bar{x} \pm SD$ . In (A) and (B), the 2nd, 3rd, 4th, 5th samples vs the 1st sample; in (C), 5th sample vs 4th sample. \* $P > 0.05$ ; \*\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.01$ .

射免疫测定结果表明, 电针刺激后再给予电惊厥, LEK-LIS 的含量显著下降, 比电针前降低  $30 \pm 9 \text{ pg}/100 \mu\text{l}$ ,  $P < 0.01$  (Fig 1), 表明电针可使电惊厥时海马内 LEK-LIS 的释放量减少。

**海马内微量注射 LEK 对皮层电图的影响** 在 6 只大鼠一侧海马内微量注入  $\delta$  受体的激动剂 LEK  $10 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ , 1-5 min 内均在皮层电图上记录到高幅的痫波发放 (Fig 3)。而注入生理盐水, 则对皮层电图无明显影响。

**海马内微量注射 ICI 174 864 对电惊厥作的影响** 大鼠 16 只, 进行了 21 次实验。从感觉运动皮层和双侧海马引导脑电活动。经微机分析所得的结果为痫样放电的频率面积, 振幅面积以及放电的持续时间。

**1 注射液侧海马** 从多道生理记录仪的记录中可见, 海马内注入 ICI 174 864, 可使电惊厥发作减轻 (Fig 4)。微机的分析资料表明, 在预先用 ICI 174 864 处理的大鼠中, 电惊厥

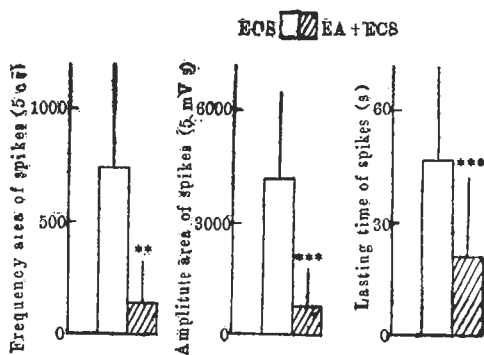


Fig 2. Effect of EA on ECS, an analysis of spikes with Apple II.  $n=11$ ,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.01$  vs ECS. c: number of spikes.

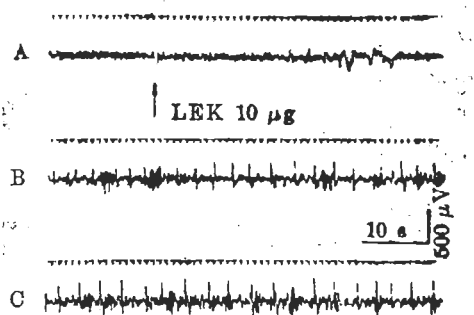


Fig 3. Effect of Leu-enkephalin (LEK,  $10 \mu\text{g}$ ) injected into the hippocampus on electroencephalogram (EEG). A B C: Continuous recording.

时痫样放电的频率面积和振幅面积减少, 持续时间缩短。而对照组 3 项指标均无明显变化。P 值分别小于 0.05, 0.01 和 0.01, (Fig 5)。

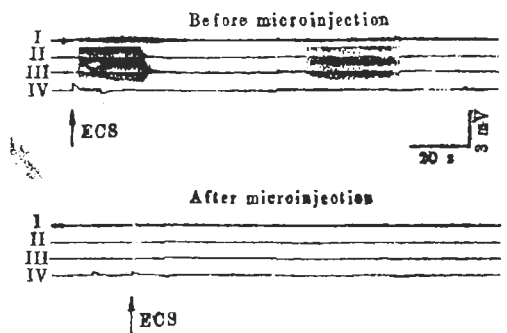


Fig 4. Effect of ICI 174 864 microinjected into the hippocampus on ECS. I: ECoG; II: EEG of the left hippocampus; III: EEG of the right hippocampus; IV: Forelimb movement.

结果表明海马内注入 ICI 174 864 可以抑制注液侧海马的痫样放电。

2 对侧海马 一侧海马内微量注射 ICI 174 864 有时也可使对侧海马的痫样放电受到抑制,但统计结果表明,对侧海马痫样放电的各项指标在注药后没有显著改变。

3 大脑皮层 在皮层亦见类似对侧海马的情况。除痫样放电的持续时间比对照组明显缩短外,对其余两项指标无显著作用。

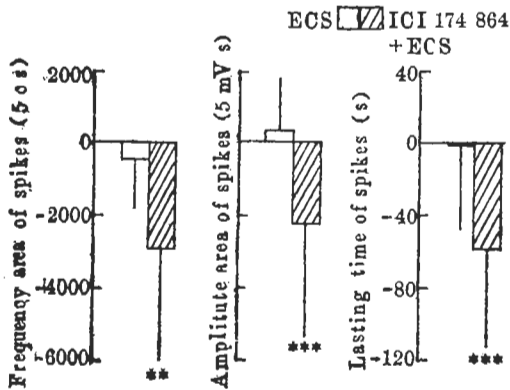


Fig 5. Effect of ICI 174 864 (4  $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ ) injected into the hippocampus on ECS.  $n = 11$ ,  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*\* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.01$  vs ECS.

## Discussion

既往的工作表明,电针抑制电惊厥的作用可被纳洛酮翻转,提示电针可能促进了某种抗癫痫的内阿片肽的释放<sup>(2)</sup>。由于纳洛酮对各亚型阿片受体的特异性不高,故据此并不能推测所涉及的受体亚型。内阿片肽对惊厥发作具有双重调节作用,各亚型的阿片受体作用并不相同,甚至完全相反<sup>(8,9)</sup>。大量工作集中在 $\delta$ 和 $\kappa$ 受体上。有人认为前者是致痫的,而后者是抗痫的<sup>(10)</sup>。McGinty JF 报道刺激杏仁核引起的点燃发作引致海马内脑啡肽含量升高,而强啡肽含量下降,提示海马内的这两种肽可能对惊厥起着不同的调节作用<sup>(11)</sup>。那么,电针对惊厥的作用是否由于抑制了 $\delta$ 受体或增强了 $\kappa$ 受体的作用所致呢?本文仅就海马内的 $\delta$ 受体在针刺抑制惊厥发作过程中的作用进行了观察

分析。

外源性给予阿片肽时,可引起海马神经元的兴奋性反应,如 LEK 在不同核团注射的电泳结果表明,它唯在海马引起了 100% 神经元的兴奋性反应<sup>(12)</sup>。既然海马内 LEK 含量增多使神经元兴奋性升高,那么当动物处于神经组织异常兴奋的惊厥发作状态时,海马内的 LEK 神经末梢是否会释放出更多的 LEK 呢?本结果证实反复电惊厥使海马推挽灌注液中的 LEK-LIS 含量明显升高,而给予单个电惊厥时,发作较弱,其 LEK-LIS 含量虽有所增高,但不如反复电惊厥增高得那样明显。如预先经电针处理,电惊厥时海马灌注液中的 LEK-LIS 含量则显著减少,提示电针对惊厥发作的抑制作用可能部分是通过减少 LEK 的释放而发挥作用的。

LEK 主要作用于 $\delta$ 受体<sup>(13)</sup>,为 $\delta$ 受体激动剂;而 ICI 174 864 是具有较高选择性的 $\delta$ 受体拮抗剂,它对 $\delta$ 受体的亲和力与纳洛酮相似,但与之不同的是对 $\mu$ 和 $\kappa$ 受体的作用甚小<sup>(14)</sup>。在海马内微量注射 LEK 10  $\mu\text{g}$ ,引致皮层的癫痫样放电;而注入 ICI 174 864 则显著地减弱电惊厥发作。此结果提示惊厥发作时释放的 LEK 与 $\delta$ 受体结合后产生的效应是兴奋性的,一旦 $\delta$ 受体被阻遏,惊厥发作就明显减弱。电针可能是通过减少海马内的 LEK 释放,阻断 $\delta$ 受体的突触效应,从而抑制惊厥发作的。

致谢 本室汤耀发副主任技师为数据的分析处理编制了程序;美国纽约大学陶玫琳女士参加部分实验。

## References

- 何晓平、吴根诚、曹小定. 电针对青霉素引起的家兔大脑皮层痫样放电的影响. 上海针灸杂志 1985; 2: 18
- He XP, Cao XD. Effects of etorphine and electro-acupuncture on electroconvulsive shock in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1986; 7: 106
- He XP, Cao XD, Jiang YM, Shen LL. Effect of electro-acupuncture on electroconvulsive shock in rat: physiological observation

- and spectral analysis of EEG. *J Trad Chin Med* 1986; 6 : 283
- 4 Evans MC, Meldrum B. Regional brain glucose metabolism in chemically-induced seizures in the rat. *Brain Res* 1984; 297 : 235
  - 5 Snead OC III, Bearden LJ. The epileptogenic spectrum of opiate agonists. *Neuropharmacology* 1982; 21 : 1137
  - 6 Kanamatsu T, McGinty JF, Mitchell CL, Hong JS. Dynorphin- and enkephalin-like immunoreactivity is altered in limbic- basal ganglia regions of rat brain alter repeated electroconvulsive shock. *J Neurosci* 1986; 6 : 644
  - 7 Lo ES, Wu JB, Yi CC, Wan FS, Tsou K. Radioimmunoassay for enkephalins. *Acta Biochem Biophys Sin* 1980; 12 : 115
  - 8 何晓平、曹小定。内阿片肽在调节惊厥发作中的作用。生理科学进展 1988; 19 : 146
  - 9 Frenk H. Pro- and anticonvulsant actions of morphine and the endogenous opioids: involvement and interactions of multiple opiate and non-opiate systems. *Brain Res Rev* 1983; 6 : 197
  - 10 Przewłocka B, Stala L, Lasoń W, Przewłocki R. The effect of various opiate receptor agonists on the seizure threshold in the rat. Is dynorphin an endogenous anticonvulsant? *Life Sci* 1983; 33 (Suppl 1) : 595
  - 11 McGinty JF, Kanamatsu T, Obie J, Dyer RS, Mitchell CL, Hong JS. Amygdaloid kindling increases enkephalin-like immunoreactivity but decreases dynorphin-A-like immunoreactivity in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1986; 71 : 31
  - 12 Elazar Z, Motles E, Ely Y, Simantov R. Acute tolerance to the excitatory effect of enkephalin microinjection into hippocampus. *Life Sci* 1979; 24 : 541
  - 13 Paterson SJ, Robson LE, Kosterlitz HW. Classification of opioid receptors. *Br Med Bull* 1983; 39 : 31
  - 14 Cotton R, Giles MG, Miller L, Shaw JS, Timms D. ICI 174 864 : a highly selective antagonist for the opioid  $\delta$ -receptor. *Eur J Pharmacol* 1984; 97 : 331