

脑室注射生长抑素对大鼠痛阈和脑内单胺类、黄嘌呤、次黄嘌呤含量的影响

李希成、黎海蒂、赵邦云、阮怀珍 (第三军医大学生理教研室, 重庆 630038, 中国)

Effect of intraventricular injection of somatostatin on pain threshold, and contents of the monoamines, xanthine, hypoxanthine in rats brain

LI Xi-Cheng, LI Hai-Di, ZHAO Bang-Yun,
HUAN Huai-Zheng

(Department of Physiology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT Using HPLC with electrochemical detection, we found that icv somatostatin (Som) 5 or 10 μg increased rat's pain threshold and contents of 5-HT and 5-HIAA in hippocampus, hypothalamus and brainstem, except the 5-HIAA content of brainstem in Som 5 μg group. However, the changes of NE among above three areas of brain were different, the NE contents of hypothalamus and brainstem significantly increased while that of hippocampus markedly decreased. After icv Som 20 μg , hypoxanthine and xanthine in hippocampus and hypothalamus decreased significantly, but edema occurred. Som 40 μg icv caused necrotic changes of neurons in brain.

KEY WORDS somatostatin; intraventricular injections; pain measurement; biogenic amines; hypoxanthines; hippocampus; hypothalamus

摘要 Som 5 或 10 μg icv 使大鼠痛阈升高, 高压液相色谱-电化学检测显示海马、下丘脑和脑干内 5-HT 和 5-HIAA (5 μg 组脑干的除外) 含量显著增多, 但三脑区内 NE 含量的变化却一致, 下丘脑和脑干的升高, 而海马的则下降。Som 20 μg icv 时, 海马和下丘脑的次黄嘌呤和黄嘌呤含量明显下降, 脑组织出现水肿。Som 40 μg icv 使脑神经细胞坏死。

关键词 促生长激素释放抑制激素; 脑室内注射; 痛阈测定; 生物胺; 次黄嘌呤类; 海马; 下丘脑

人体 iv 生长抑素(Som)可减轻头痛^[1], 硬

Received 1990 Sep 7

Accepted 1991 Jun 27

膜外注射 Som 能缓解患者的癌痛和术后疼痛^[2,3]。大鼠 icv 或鞘内注射 Som 具有镇痛效应, 但鞘内应用剂量过大时却可导致脊髓神经元变性和坏死^[4,6]。然而, icv Som 的镇痛机制以及毒性作用, 未见报道, 为此, 本文进行了观察。

MATERIALS AND METHODS

Som 为 Sigma 产品。

痛阈的测定 Wistar 大鼠 59 只, 男♂兼用, 体重 212 ± 5 g, 以敝式装置^[7]固定清醒大鼠, 用辐射热甩尾法测定痛阈, 以引起甩尾的潜伏期为痛阈的指标, 每隔 5 min 测定痛阈 1 次, 基础痛阈控制在 4~5 s 范围, 室温为 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

单胺类递质及其代谢产物的测定 采用 HPLC-电化学检测法^[8], 所用 HPLC 仪为 Gilson HPLC 系列, 以 Apple II 微机控制, 电化学检测器为 Gilson M141 型, 检测灵敏度为 20 A/V , 色谱柱为 Zorbaxods C₁₈ 不锈钢柱, 粒径 5 μm , 250 mm × 4.6 mm (内径), 所用试剂为去甲肾上腺素(norepinephrine, NE), 5-羟吲哚乙酸(5-hydroxyindole-3-acetic acid, 5-HIAA)和 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)均为 Sigma 产品, 皆以高氯酸(0.1 mol · L⁻¹), 内含 0.1% 半胱氨酸配成 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ 的储存液, 分析时用洗脱液稀释至 1 ng · μl^{-1} , 洗脱液系 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸缓冲液, 内含 0.044% Na₂EDTA, 0.02% 辛磺酸钠, 4% 乙腈和 6% 甲醇, pH 3.2; 经 0.22 μm 孔径的微孔滤膜过滤后, 减压脱气, 流量为 1.0 ml · min⁻¹。

次黄嘌呤和黄嘌呤的测定 采用 HPLC-uv

检测法，以 Gilson 62I 型数据处理仪处理数据⁽⁹⁾。

脑组织样品的提取 Som 5 和 10 μg 组的大鼠，于 icv 后 20 min 时测痛，测痛毕立即断头，在冰台上分离出海马、下丘脑和脑干。Som 20 μg 组的大鼠，在 icv 后 4 d，取脑分离出海马和下丘脑，将样品分别于高氯酸液 0.1 mol·L⁻¹ (10 μl/mg 组织) 中匀浆，经离心 (28 850×g, 4°C 40 min) 后，取上清液作色谱分析。

脑组织病理学检查 光镜检查是将脑固定于 10% 中性甲醛液中，按常规石蜡包埋，切片后作 HE 染色。电镜检查是将脑组织置 2.5% 戊二醛磷酸缓冲液中预固定后，转入 1% 铁酸液固定，丙酮逐级脱水，环氧树脂 618 包埋，超薄切片，日立 H-300 型电镜观察并照相。

脑室埋管和微量注射方法与以往报道⁽⁷⁾相同，实验数据用方差分析和 t test 检验处理。

RESULTS

Som 对痛阈和不同脑区单胺类递质及其代谢产物含量的影响 Som (0.5 和 1 μg·μl⁻¹) icv 10 μl 后 20 min，痛阈显著提高，与 icv 人工脑脊液(ACSF)的对照组比较，分别提高了 65% ($P < 0.05$) 和 91% ($P < 0.01$) (Tab 1)。与此同时，脑内 5-HIAA 和 5-HT 含量也明显增多，但是脑内 NE 含量的变化与痛阈的变化则不相一致。下丘脑和脑干的 NE 含量显著升高 ($P < 0.01$)，而海马的却显著下降 ($P < 0.01$) (Tab 2)。

NE Som icv 5 和 10 μg 组的海马内 NE 含量皆显著降低，而下丘脑的 NE 明显升高。Som 5 μg 对脑干内 NE 含量无明显影响 ($P > 0.05$)，但是 Som 10 μg 则可使其含量增加 2.3 倍。

5-HT 和 5-HIAA Som icv 5 和 10 μg 组中，海马、下丘脑和脑干内的 5-HT 含量

Tab 1. Pain threshold in radiant heat test after icv somatostatin (Som). $n = 7-8$, $\bar{x} \pm s$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs artificial cerebrospinal fluid (ACSF).

	ACSF	Tail-flick latency / s Som 5 μg	Tail-flick latency / s Som 10 μg
Basal	4.1 ± 0.5	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.6
5 min	4.4 ± 0.5*	5.7 ± 1.1*	5.6 ± 1.9*
10 min	4.2 ± 0.4*	5.5 ± 1.2*	5.7 ± 1.7*
15 min	4.1 ± 0.4*	5.5 ± 1.0*	6.3 ± 1.9***
20 min	4.0 ± 0.4*	5.9 ± 1.0*	6.6 ± 1.6***

Tab 2. Contents of NE, 5-HIAA, and 5-HT in rat brain after icv Som. $n = 6-8$, $\bar{x} \pm s$ (ng/g wet tissue). * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs ACSF.

	NE	5-HIAA	5-HT
Hippocampus			
ACSF	556 ± 152	342 ± 42	468 ± 93
Som			
5 μg	148 ± 41**	541 ± 129**	661 ± 95**
10 μg	253 ± 34***	775 ± 42***	1 014 ± 92***
Hypothalamus			
ACSF	1 915 ± 155	426 ± 87	685 ± 102
Som			
5 μg	3 171 ± 522**	713 ± 246***	1 626 ± 672***
10 μg	3 930 ± 958***	1 217 ± 293***	2 603 ± 643***
Brainstem			
ACSF	767 ± 184	504 ± 62	723 ± 73
Som			
5 μg	664 ± 236*	735 ± 246*	1 464 ± 249**
10 μg	2 556 ± 314***	2 833 ± 375***	3 501 ± 203***

均显著升高，海马内分别增高 41% 和 117%，下丘脑内分别增加 138% 和 280%，脑干内分别增加 102% 和 384%。在 Som 5 和 10 μg 组中，海马、下丘脑的 5-HIAA 含量也都显著升高。

Som 对海马和下丘脑内次黄嘌呤和黄嘌呤含量的影响和脑组织的病理变化 在 d 1 上午和 d 2 下午分别 icv Som 10 μg·10 μl⁻¹ 后，d 4 测得海马和下丘脑内次黄嘌呤和黄嘌

吟含量均显著降低, 与 icv ACSF 组比较, 海马内分别下降 79% 和 46%, 下丘脑内下降分别为 62% 和 32% ($P < 0.01$) (Tab 3).

Tab 3. Hypoxanthine and xanthine contents of hippocampus and hypothalamus in rats after icv Som.
 $n=6-8$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.05$, $^{***}P < 0.01$ vs ACSF.

	Hypoxanthine, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	Xanthine, $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$
Hippocampus		
control	91.7 \pm 14.0	49.1 \pm 5.8
Som 20 μg	19.6 \pm 5.5 ^{**}	26.2 \pm 6.3 ^{**}
Hypothalamus		
control	128.1 \pm 19.4	38.9 \pm 4.2
Som 20 μg	48.8 \pm 18.0 ^{**}	26.6 \pm 7.0 [*]

Som 20 μg 分两次 icv 后, 大鼠的活动和饮食无异常表现, 于 d 4 取脑组织($n=4$)作光镜检查, 海马结构和间脑神经细胞的核结构和突起与正常的比较差异不大, 但是, 神经细胞周围间隙略见增宽, 白质轻度疏松, 脑组织($n=3$)的电镜检查显示胶质细胞突起肿胀, 胞浆内出现局部区域电子透明度增加, 提示有水肿现象(Fig 1, 2, Plate 1).

Som 40 μg 分两次 icv ($n=6$)后, 大鼠的饮食和活动明显减少, 于 3 d 死亡两只(原因不明), 其余大鼠于 d 4 取脑作光镜检查, 脑神经细胞核固缩深染, 周围间隙明显增宽, 突起显著变短, 白质疏松(Fig 1, Plate 1).

DISCUSSION

本实验结果表明 icv Som 的镇痛效应部分通过增强海马、下丘脑和脑干内 5-HT 系统的作用而实现, 这与 ACTH 和降钙素等脑肽的镇痛作用与 5-HT 有关的文献结果^[7,10]相符。至于 icv Som 时, 三脑区内 NE 含量不同形式的变化是否与 Som 镇痛效应有关, 有待探讨。

已知自由基与细胞和亚细胞结构的损害有关^[11], 但是我们在 icv Som 20 μg 后, 见到海

马等脑组织出现水肿等病理变化, 可能与超氧自由基 $[\text{O}_2^-]$ 的关系不大, 因为其底物次黄嘌呤, 黄嘌呤的含量不但未升高, 相反还降低, 这可能是由于 Som 抑制了 ATP 分解的缘故, 后者可能与 Som 抑制 TSH 释放^[12], 从而导致能量代谢降低有关。

本文在 icv Som 40 μg 后, 见到大鼠的海马和间脑的神经细胞出现坏死性病理变化。据报道猫^[13]和大鼠^[5]鞘内分别注射 Som 2 mg 和 30 μg 后, 脊髓均可发生广泛的神经元坏死。关于 Som 导致脊髓损伤的原因, 可能与 Som 引起脊髓缺血性损伤有关^[6]。但是在小鼠鞘内注射较大剂量的 Som 后却无毒性反应^[5], 人体 iv 或硬膜外注射 Som 后所产生的副作用均较小^[2,3], 于是有人认为 Som 的毒性作用有种族差异^[5], 还认为在大鼠产生毒性和镇痛作用的 Som 剂量, 以公斤体重计算远大于人体的用量, 即人体硬膜外注射 Som 产生镇痛的单次用量为 250 μg , 仅相当于大鼠的 1.5 μg ^[3,5]。由此提示: 应在不同种属的动物中, 对 Som 的镇痛机理和毒性作用进行深入的研究, 同时在临幊上采用 Som 治疗某些疾病时应持谨慎态度, 尤其是 Som 的用量不宜过大。

ACKNOWLEDGMENTS 病理解剖教研室梁晓利讲师、左声鹤副教授审阅病理切片, 王风君同志参加部分实验工作。

REFERENCES

- 1 Sicuteli F, Geppetti P, Marabini S, Lembeck F. Pain relief by somatostatin in attacks of cluster headache. *Pain* 1984; 18 : 359
- 2 Chrusbasik J, Meynadier J, Blond S, et al. Somatostatin, a potent analgesic. *Lancet* 1984; 2 : 1208
- 3 Chrusbasik J, Meynadier J, Scherpereel P, Wünsch E. The effect of epidural somatostatin on postoperative pain. *Anesth Analg* 1985; 64 : 1085
- 4 Rezek M, Havlicek V, Leybin L, Labella FS, Friesen H. Opiate-like naloxone-reversible actions of somatostatin given intracerebrally. *Can J*

- Physiol Pharmacol 1978; **56**: 227
- 5 Mollenholt P, Post C, Rawal N, Freedman J, Hokfelt T, Paulsson I. Antinociceptive and 'neurotoxic' actions of somatostatin in rat spinal cord after intrathecal administration. *Pain* 1988; **32**: 95
- 6 Long JB. Spinal subarachnoid injection of somatostatin causes neurological deficits and neuronal injury in rats. *Eur J Pharmacol* 1988; **149**: 287
- 7 Li XC, Li HD, Zhao BY. Serotonin of hippocampus and hypothalamus taking part in the analgesic effect of adrenocorticotrophic hormone in rats. *Acta Pharmacol Sin* 1990; **11**: 89
- 8 Ye WL. Rapid and sensitive assay of monoamine transmitters and their metabolites in biological samples using high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Acta Physiol Sin* 1987; **39**: 412
- 9 You ZY, Wang FJ. The determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid by high performance liquid chromatography. *Chin J Chromatogr* 1989; **7**: 95
- 10 Bourgoin S, Pohl M, Hirsch M, Mauborgne A, Cesselin F, Hamon M. Direct stimulatory effect of calcitonin on [³H] 5-hydroxytryptamine release from the rat spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1988; **156**: 13
- 11 Del Maestro RF, Thaw HH, Bjork J, Planker M, Arfors K-E. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand* 1980; (Suppl 492): 43
- 12 Arimura A, Schally AV. Increase in basal and thyrotropin-releasing hormone (TRH)-stimulated secretion of thyrotropin (TSH) by passive immunization with antiserum to somatostatin in rats. *Endocrinology* 1976; **98**: 1069
- 13 Gaumann DM, Yaksh TL, Post C, Wilcox GL, Rodriguez M. Intrathecal somatostatin in cat and mouse studies on pain, motor behavior, and histopathology. *Anesth Analg* 1989; **68**: 623

BIBLID: ISSN 0253-9756 中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Nov; **12**(6): 510-513

胆碱能激动剂和阻断剂对大鼠背侧海马 CA1 区单位放电的影响

张云凤、张长城 (第三军医大学生理教研室、重庆 630038, 中国)

Effects of cholinergic agonists and antagonists on unit discharge of dorsal hippocampal CA1 area in rat

ZHANG Yun-Feng, ZHANG Chang-Cheng
(Department of Physiology, Third Military Medical College, Chongqing 630038, China)

ABSTRACT The effects of icv cholinergic agonists (acetylcholine 6 µg, physostigmine 10 µg, and nicotine 20 µg) and cholinergic antagonists (scopolamine 40 µg and hexamethonium 250 µg) on 174 cells unit discharges of the dorsal hippocampal CA1 area in 42 rats were studied. The frequencies of the unit discharges were increased in 41 cells over 84 cells by icv M or N receptor cholinergic agonists, but reduced

in 22 cells over 42 by M or N receptor cholinergic antagonists. After the electrolytic lesion of the septal region, the effects of acetylcholine and nicotine on unit discharges disappeared. The results indicated that the cholinergic agents changed the electric activity of cholinergic sensitive neurons via the septum-hippocampal cholinergic pathway.

KEY WORDS parasympatholytics; parasympathomimetics; hippocampus; septal nuclei; electrophysiology

提要 icv 胆碱能 M 或 N 型受体激动剂 acetylcholine, physostigmine 或 nicotine 后, 大鼠背侧海马 CA1 区单位放电以增频反应为主, 而 M 或 N 型受体阻断剂 scopolamine 或 hexamethonium, 却以减频反应为主; 损毁隔区后, icv acetylcholine 或

Received 1990 Jun 25

Accepted 1991 Jun 13