

的抗癌基因,其表达产物的增多即意味着癌细胞活性的丧失,此外,p53基因是一个与程序性细胞死亡有密切关系的基因^[11-13]。从我们的上述实验结果推测,p53基因可能抑制与Lewis肺癌细胞增殖相关的基因,激活与Lewis肺癌细胞分化和程序性细胞死亡相关的基因,最终使肿瘤的增殖停滞,或使肿瘤细胞向正常细胞分化,或诱发肿瘤细胞的程序性细胞死亡,从而产生抗肿瘤作用。总之,LRPS对抗癌基因p53表达的影响可能是其抗肿瘤作用的机制之一。

REFERENCES

- 1 Chen LZ, Feng XW, Zhou JH, Tang JF. Immuno-tumoricidal effect of *Rehmannia glutinosa* polysaccharide b and its mechanism. *Chin J Pharmacol Toxicol* 1993; 7: 153-6.
- 2 Liu FJ, Tang JF, Zhao XN, Ru XB, Feng XW, Gu GM. Effects of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides on the transplantation tumor in mice. *Chin Pharm J* 1995; 30 Suppl: 87-8.
- 3 Oren M. The p53 cellular tumour antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 1985; 823: 67-78.
- 4 Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
- 5 Tokunaga K, Taniguchi H, Yoda K, Shimizu M, Sakiyama S. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal β -actin mRNA. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 2829-33.
- 6 Arai N, Nomura D, Yokota K, Wolf D, Brill E, Shohat O, et al. Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 1986; 6: 3232-9.
- 7 Kevin PF. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Techniques* 1993; 9: 380-4.
- 8 Dukas K, Sarfati P, Vaysse N, Pradayrol L. Quantitation of changes in the expression of multiple genes by simultaneous polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1993; 215: 66-72.
- 9 Apostolakis MJ, Schuermann WHT, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1993; 213: 277-84.
- 10 Babu JS, Kanangat S, Rouse BT. Limitations and modifications of quantitative polymerase chain reaction. Application to measurement of multiple mRNAs present in small amounts of sample RNA. *J Immunol Methods* 1993; 165: 207-16.
- 11 Mercer WE. Cell cycle regulation and the p53 tumor suppressor protein. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1992; 2: 251-63.
- 12 Lee JM, Bernstein A. Apoptosis, cancer and the p53 tumour suppressor gene. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 149-61.
- 13 Kastan MB, Canman CE, Leonard CJ. p53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14: 3-15.

474-477

26

生长抑素和电针抑制关节炎大鼠脊髓 c-fos 的表达

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

R 274.943

R 684.305

Somatostatin and electroacupuncture inhibited c-fos expression in spinal cord of arthritic rats

RUAN Huai-Zhen, LI Xi-Cheng, LI Hai-Di, ZHAO Bang-Yun

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

KEY WORDS somatostatin; electroacupuncture; adjuvant arthritis; spinal cord; proto-oncogene proteins c-fos; immunohistochemistry

AIM: To observe the effect of intrathecal injection of

somatostatin (Som) associated with electroacupuncture (EA) at "Jiaji" points on c-fos protein expression of spinal cord in pain rats. **METHODS:** Rats with adjuvant arthritis were used as pain model and the c-fos-like immunoreactivity (FLI) was detected by immunohistochemistry. **RESULTS:** The c-fos protein expression induced by arthritis were found in all of the I - X laminae of the ipsilateral spinal cord of rats, and most of the labeled cells were located in the laminae I - II and V - VI. Som and EA suppressed the c-fos expression and the lessening of FLI cells in the spinal cord. **CONCLUSION:** Pathological pain following arthritis activated pain sensitive neurons (PSN) and evoked c-fos expression in spinal cord,

Som and EA suppressed activities of these PSN, producing the effect of analgesia.

关键词 生长抑素; 电针; 佐剂诱发性关节炎; 脊髓; 原癌基因蛋白 *c-fos*; 免疫组织化学

目的: 观察鞘内注射生长抑素及电针“夹脊”穴对病理性疼痛情况下大鼠脊髓 *c-fos* 原癌基因蛋白表达的影响。 **方法:** 用急性佐剂性关节炎大鼠作为病理性疼痛的实验模型, 免疫组织化学法检测 *c-fos* 样免疫反应细胞。 **结果:** 佐剂性关节炎可诱发大鼠脊髓内多层神经元 *c-fos* 蛋白表达, 接种后 24 h, 以背角 I - II, V - VI 层内最多, 而生长抑素和电针均可抑制其表达, 表现为 *c-fos* 蛋白形成减少。 **结论:** 生长抑素和电针缓解病理性疼痛的作用与抑制伤害性痛反应诱发的脊髓 *c-fos* 表达有关。

c-fos 是一种存在于正常神经元胞核内的原癌基因, 伤害性传入信息抵达中枢神经系统内, 在相应的感受区激活原癌基因 *c-fos*, 虽然其表达受多种因素的影响; 缺乏特异性, 但非伤害性刺激时, *c-fos* 表达很低, 因此被当作神经元活动的一个标志物^[1,2]。佐剂诱发的关节炎作为一种病理性疼痛的实验模型, 已用于痛觉调制研究。鞘内注射 (intrathecal injection, ith) 生长抑素 (somatostatin, Som) 及电针 (electroacupuncture, EA) 都具有明显的镇痛效应^[3-5]。但是 Som 及电针能否抑制关节炎大鼠诱发的脊髓 *c-fos* 表达未见报道。本研究 Som 及电针在镇痛中的作用。

MATERIALS AND METHODS

大鼠 Wistar 大鼠 (本校动物所提供, 1 级, 证书号: 24301050) 36 只, 体重 200 - 220 g, 雌雄不拘。随机分成 (1) 正常对照组、鞘内注射 (ith) 人工脑脊液 15 μ L (ACSF, pH 5.5, 配 Som 所用溶液) 及右侧后肢踝关节内侧软组织内注射 0.1 mL 生理盐水; (2) 关节炎组, 接种后 24 h; (3) 关节炎 + ith Som (Sigma 公司); (4) 关节炎 + 高频电针组; (5) 关节炎 + 低频电针组; (6) 关节炎 + 非穴位处电针 (高频), 每组各 6 只大鼠。

模型制备 在大鼠右后踝关节内侧软组织内注射 0.1 mL 含有灭活结核杆菌 ($10^6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的完全弗氏佐剂^[6]。接种后 14 - 16 h, 大鼠踝关节局部出现红、肿, 并伴有活动

减少、侧卧、行走时明显跛行, 脚掌不敢着地, 有时舔舐肿胀部位, 而且痛阈降低, 形成具有典型红肿热痛和痛觉过敏的急性关节炎模型。免疫组化法实验在接种后 24 h 进行。

脊髓蛛网膜下腔插管 大鼠麻醉后, 按文献^[7]方法, 将外径 0.6 mm 的 PE10 塑料导管 (全长 10 cm) 由枕骨大孔插入脊髓蛛网膜下腔 6 cm, 约达脊髓腰 1 节段。待动物清醒观察确无肢体功能损害后再继续饲养 5 - 7 d。在蛛网膜下腔注射药物, 药物容量 10 μ L, 并用 5 μ L 生理盐水冲洗管道, 总容量 15 μ L, 5 min 注射完毕。

电针 电针时由双侧“夹脊”穴 (脊椎两侧, 腰 2 - 3) 处进针, 用 57-6D 型电针仪 (北京航空学院五七工厂生产) 给予刺激, 在 2 min 内把电压和频率逐渐升高至预定值 (电压为 3 V, 高频 100 Hz, 低频 3 Hz)。电流刺激波形均为连续波, 电针时间 40 min。非穴位处电针选腰部肌肉。

免疫组化法 实验毕, 按常规进行大鼠组织灌流, 固定, 切片 (40 μ m), 进行 ABC 免疫组化染色: 切片在 1:2000 的 *c-fos* 抗血清 (Cambridge Research Biochemicals) 4 $^{\circ}\text{C}$ 中放 48 h, 再依次进入生物素结合兔抗羊血清 (1:200, Vector) 及 ABC (1:100, Vector), 于室温下各放 3 h, 继之用葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺 (GOD-DAB-Ni) 呈色液显色。非特异性对照和阴性对照分别采用正常兔血清和 PBS ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 代替 *c-fos* 抗血清, 随后的步骤完全相同。结果: 对照切片上见不到免疫反应阳性细胞。

数据处理 在每只大鼠腰 3 - 4 节段随机抽样四片, 作阳性细胞计数, 取均值作为该大鼠的 *c-fos* 样免疫反应 (*c-fos-like immunoreactivity*, FLI) 数。实验数据皆用电子计算机双样本 *t* 检验程序 (PDA-2) 进行统计学处理。

RESULTS

佐剂性关节炎对大鼠脊髓 *c-fos* 的影响 *c-fos* 样蛋白呈黑色颗粒, 位于细胞核内, 细胞质不显色, 此类细胞呈圆形或椭圆形。对照组脊髓 *c-fos* 表达很低。而佐剂性关节炎大鼠接种后 24 h, 同侧脊髓出现大量 FLI 细胞, 主要分布在 I - II 及 V - VI 层, 其它区较少 (Tab 1, Fig 1A, 1B)。对侧脊髓也出现少量 FLI 细胞。

鞘内注射 Som 对关节炎大鼠诱发的脊髓 *c-fos* 的影响 接种弗氏佐剂后立即 ith Som, 24 h 后进行免疫组化染色, 可见脊髓背角 I - II、V - VI 层 FLI 表达减少, 与单纯关节炎组比较差异显著 ($P < 0.01$, Tab 1; Fig 1C)。由此说明, Som 能阻断伤害性传入冲动诱发的脊髓神经元 *c-fos* 的表达。

Tab 1. Effect of somatostatin (Som) and electroacupuncture on FLI in the spinal cord of arthritic rats. $n=6$, $\bar{x} \pm s$. $^c P < 0.01$ vs control; $^d P > 0.05$, $^e P < 0.05$, $^f P < 0.01$ vs arthritic.

	Number of <i>c-fos</i> -like immunoreactivity neurons			
	I - II	III - IV	V - VI	VII - X
Control	3.4 ± 1.2	0.5 ± 0.6	0.1 ± 0.4	0.1 ± 0.4
Arthritic	58 ± 10 ^c	14 ± 4 ^c	46 ± 10 ^c	20 ± 7 ^c
Arthritic + Som	23 ± 6 ^f	14 ± 4 ^d	20 ± 6 ^f	19 ± 4 ^d
Arthritic + EA (100 Hz)	26 ± 8 ^f	8.3 ± 2.5 ^e	21 ± 6 ^f	13 ± 4 ^e
Arthritic + EA (3 Hz)	27 ± 9 ^f	13 ± 5 ^d	20 ± 7 ^f	12 ± 4 ^e
Arthritic + EA (no Jiaji)	51 ± 10 ^d	12 ± 3 ^d	44 ± 9 ^d	21 ± 8 ^d

电针“夹脊”穴对关节炎大鼠诱发的脊髓 *c-fos* 的影响 接种弗氏佐剂后立即电针 40 min, 24 h 后进行免疫组化染色, 可见高频电针组大鼠脊髓各层内, 关节炎所诱发的 *c-fos* 表达明显减少, 与单纯关节炎组比较, 相差显著 ($P < 0.01$, Tab 1, Fig 1D). 低频电针组的 I - II, V - VI 及 VII - X 层内呈现同样改变, 但 III - IV 层变化不明显 (Tab 1, Fig 1E). 而非穴位处电针, 对关节炎所诱发的 *c-fos* 表达无明显影响, 这一结果显示, 电针“夹脊”穴也能阻断伤害性传入冲动诱发的脊髓相应神经元 *c-fos* 的表达。

DISCUSSION

本文用急性佐剂性关节炎大鼠作为病理性疼痛的实验模型, 可诱发脊髓 *c-fos* 表达, 将关节炎引起的 FLI 与伤害性刺激(福尔马林)引起的 FLI 进行对比, 发现与福尔马林一样^[1,7], 关节炎诱发的 FLI 分布于脊髓各层. 电生理学方法及免疫组化等实验均有证明, 脊髓的 I - II 及 V - VI 层神经元与伤害性信息的传递有关^[8], 因此关节炎诱发的 FLI 主要集中于 I - II 及 V - VI 层. 本实验结果提示, 关节炎引起的伤害性信息持续作用于脊髓相应的感受部位, 激活其中的痛感受神经元, 表现为大量 *c-fos* 蛋白生成。

许多研究表明大鼠脑室, 鞘内注射 Som 有明显的镇痛效应^[3,9,10], 硬膜外注射 Som 可缓解患者

癌痛和术后疼痛^[11,12]. 电生理实验结果也表明 Som 可能参与痛觉调制过程. Randic^[13]等观察到微电泳 Som 可使猫脊髓背角神经元放电频率减少, 无论是自发的还是伤害性刺激诱发的, 其放电频率均被抑制. 因此 Som 可能是抑制了关节炎大鼠痛感受神经元的激活, 使 *c-fos* 表达减少。

电针“夹脊”穴可产生镇痛作用早已有报道, 主要是通过释放内源性阿片肽和 5-羟色胺^[4,5]. 本文观察到, 接种弗氏佐剂后立即电针“夹脊”穴, 则其脊髓内 FLI 明显少于单纯关节炎组, 而非穴位处电针, 对关节炎所诱发的 *c-fos* 表达无明显影响. 本实验结果提示: 电针“夹脊”穴的传入冲动抵达脊髓, 以某种方式压抑了该区痛感受神经元的兴奋性功能活动. 在此背景上, 关节炎引起的持续性伤害性传入信息抵达同节段脊髓内, 对痛感受神经元的激活作用减弱, 使 *c-fos* 表达减少。

ACKNOWLEDGMENT 第三军医大学 93.I 队七年制学员参加部分工作。

REFERENCES

- Presley RW, Menétrey D, Levin JD, Basbaum AI. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990; 10: 323-35.
- Bullitt E. Expression of *c-fos*-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 296: 517-30.
- Mollenholt P, Post C, Rawal N, Freedman J, Höökfelt T, Paulsson I. Antinociceptive and 'neurotoxic' actions of somatostatin in rat spinal cord after intrathecal administration. *Pain* 1988; 32: 95-105.
- Li XC, Ruan H, Zhao BY, Yuan H, Liu ZZ. Effect of intracerebral injection of substance P on pain threshold, electroacupuncture analgesia and met-enkephalin level in rat brain. *J Med Coll PLA* 1990; 5: 227-31.
- Li XC, Zhao BY, Ruan H, Li HT, Liu ZZ. Effect of intracerebral injection of substance P on serotonin contents of several brain regions and its relation with pain threshold, electroacupuncture analgesia in rats. *Acupunct Res* 1991; 16: 125-8.
- Zhu LX, Li CY, Ji CF, Li WM. The effect of laser irradiation on arthritis in rats. *Acupunct Res* 1990; 15: 71-6.
- Ruan H, Li XC, Cai WQ. Participation of substance P in noxious stimulus-evoked *c-fos* expression in spinal cord. *Chin Sci Bull* 1994; 39: 1725-9.
- Swett JE, Woolf CJ. The Somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol* 1985; 231: 66-77.
- Li XC, Li HD, Zhao BY, Ruan H. Effect of intraventricular

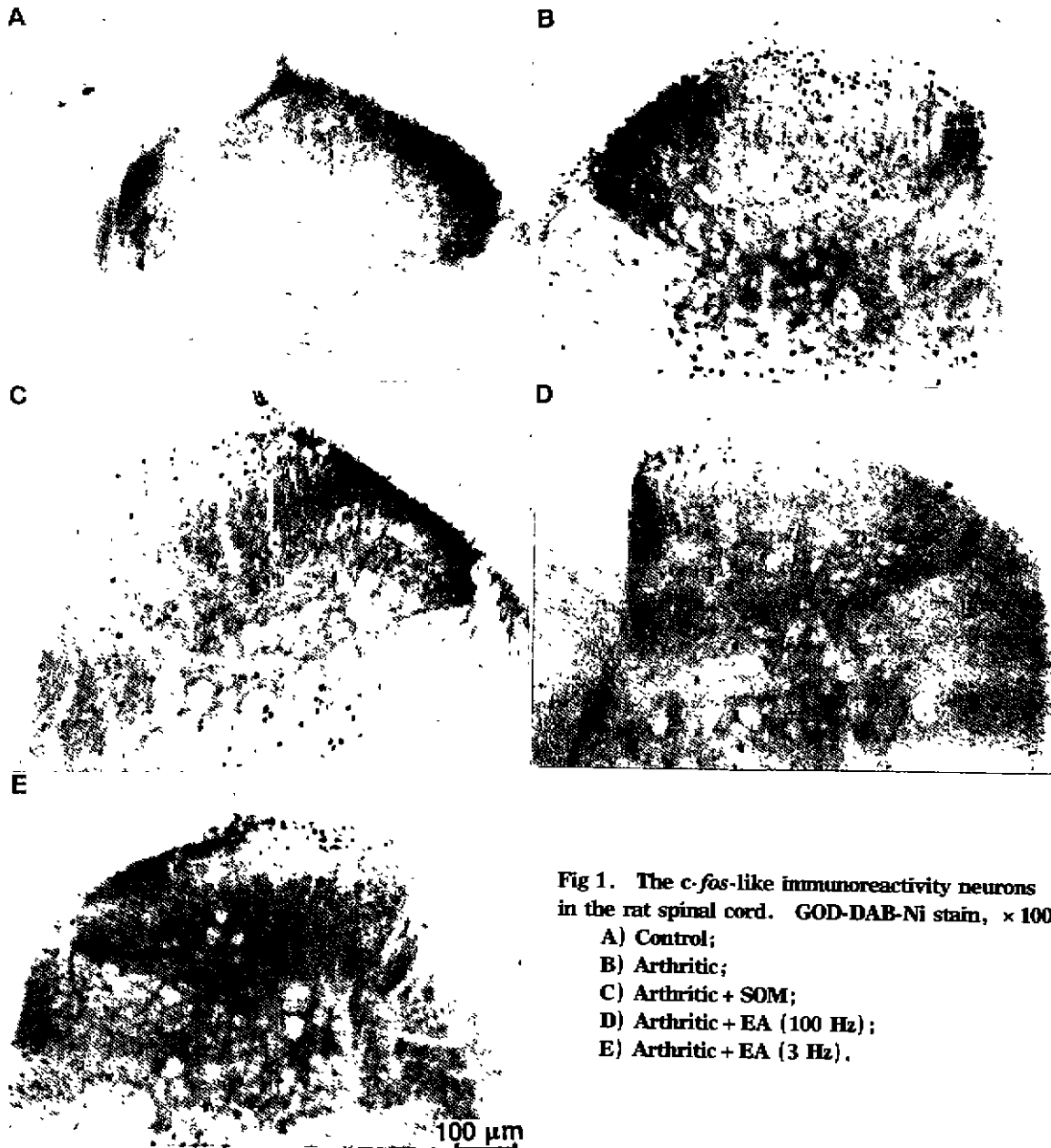


Fig 1. The *c-fos*-like immunoreactivity neurons in the rat spinal cord. GOD-DAB-Ni stain, $\times 100$.

- A) Control;
- B) Arthritic;
- C) Arthritic + SOM;
- D) Arthritic + EA (100 Hz);
- E) Arthritic + EA (3 Hz).

injection of somatostatin on pain threshold, and contents of monoamines, xanthine, hypoxanthine in rats brain.

Acta Pharmacol Sin 1991; 12: 507-10.

10 Chapman V, Dickenson AH.

The effects of somatostatin and somatostatin on nociceptive transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord.

Neuropeptides 1992; 23: 147-52.

11 Chrubasik J, Meynadier J, Scherpereel P, Wunsch E

The effect of epidural somatostatin on postoperative pain.

Anesth Analg 1985; 64: 1085-8.

12 Meynadier J, Chrubasik J, Dubar M, Wunsch E. Intrathecal

somatostatin in terminally ill patients. A report of two cases

Pain 1985; 23: 9-12.

13 Randic M, Miletic V. Depressant actions of methionine-enkephalin

and somatostatin in cat dorsal horn neurones activated by noxious

stimuli Brain Res 1978; 152: 196-202.