

188-192

促皮质素对甲醛引起大鼠脊髓内生长抑素的影响

R977.11

武强, 李希成, 阮怀珍, 黎海蒂¹, 赵邦云 (第三军医大学 生理教研室, 重庆 400038, 中国)

Effect of corticotrophin on formaldehyde-induced somatostatin of spinal cord in rats

WU Qiang, LI Xi-Cheng, RUAN Huai-Zhen, LI Hai-Di¹, ZHAO Bang-Yun

(Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

KEY WORDS corticotropin; cyproheptadine; naloxone; phentolamine; analgesia; spinal cord; proto-oncogene proteins *c-fos*; somatostatin; immunohistochemistry; *in situ* hybridization

ABSTRACT

AIM: To study the effect of corticotrophin (Cor) on somatostatin (Som) and its synthesis in spinal dorsal horn induced by formaldehyde in rats.

METHODS: Using double immunohistochemical stainings, and *in situ* hybridization.

RESULTS: Two hours after sc formaldehyde (5%, 200 μL) in one hindpaw of rats, the neurons of *c-fos*-like immunoreactivity (FLI), somatostatin-like immunoreactivity (Som-LI), Som-LI/FLI, and perprosomatostatin mRNA (PPS-mRNA) in ipsilateral spinal dorsal horn were increased obviously, as compared with the control group. The FLI and Som-LI of spinal cord were not changed by ip Cor. Cor (25 or 12.5 U·kg⁻¹, ip) inhibited the formaldehyde-evoked FLI, Som-LI, Som-LI/FLI, and PPS-mRNA of spinal cord in a dose-dependent manner. The decrease of *c-fos* or Som level due to ip Cor in rats of chronic pain was prevented by raphe nuclei injected cyproheptadine, but not by

bicuculline, naloxone, or phentolamin injected to raphe nuclei. **CONCLUSION:** The formaldehyde-evoked *c-fos* expression, Som, and Som synthesis of spinal cord were suppressed by Cor through the serotonin receptor of raphe nuclei.

关键词 促皮质素; 赛庚啶; 纳洛酮; 酚妥拉明; 镇痛; 脊髓; 原癌基因蛋白 *c-fos*; 生长抑素; 免疫组织化学; 原位杂交

目的: 研究促皮质素(Cor)对甲醛引起大鼠脊髓内生长抑素及其合成的影响。 **方法:** 采用免疫组织化学、免疫组织化学双重染色法和原位杂交技术。 **结果:** 足底注射甲醛使大鼠脊髓背角内 FLI, Som-LI, Som-LI/FLI 和 PPS-mRNA 神经元数均较对照组显著增多。单独 ip Cor 对脊髓背角 FLI 和 Som-LI 无明显影响。但是, ip Cor 显著抑制甲醛引起的背角内 FLI, Som-LI, Som-LI/FLI 和 PPS-mRNA 神经元数的增多效应, 并有量效关系。中脑中缝核内预先注射赛庚啶阻断这一抑制效应, 而荷包牡丹碱、纳洛酮、酚妥拉明则无影响。 **结论:** ip Cor 通过 5-HT 受体抑制甲醛引起的大鼠脊髓背角内 *c-fos* 表达, Som 和 Som 合成而发挥镇痛作用。

INTRODUCTION

促皮质素(Cor)可通过脑内 5-HT 和 GABA 及其受体而产生镇痛作用^[1,2], 海马和中脑导水管周围灰质内注射 Cor 可抑制伤害性刺激甲醛诱发的脊髓背角 *c-fos* 表达^[3], 后一效应已被作为伤害性刺激反应的标志^[4,5]。生长抑素(somatostatin, Som)是第 1 级伤害性传入神经末梢释放的一种神经递质^[6], 伤害性热和化学刺激均可使脊髓背角 Som 释放增多^[7]。本文以甲醛诱发的脊髓背角 *c-fos* 表达为伤害性刺激反应的标志, 观察 ip Cor 对甲醛引起的背角内 Som 神经元, Som/*c-fos* 双染神经元及前生长抑素原(perprosomatostatin, PPS-mRNA)表达的影响, 并分析中缝核内相关受体在

¹ Correspondence to Prof LI Hai-Di. Phn 86-23-6875-2269. Fax 86-23-6531-6682. E-mail g.j.s.@tmmu.edu.cn
Received 1997-09-15 Accepted 1998-09-17

其中所起的作用, 试图进一步了解 Cor 抑制慢性痛的机制。

MATERIALS AND METHODS

材料 Cor (天津生物化学制药厂); Som 抗血清 (Sigma, USA); *c-fos* 抗血清 (Cambridge Research Biochemicals); PPS-mRNA 原位杂交试剂盒由第三军医大学组胚教研室提供; ABC 试剂盒 (Vector Laboratory), 赛庚啶 (Cyp, 5-HT 受体拮抗剂), 荷包牡丹碱 (Bic, GABA 受体拮抗剂), 纳洛酮 (Nal, 阿片受体拮抗剂), 酚妥拉明 (Phe, α -肾上腺受体拮抗剂) 均为美国 Sigma 产品。

实验用 Wistar 大鼠 41 只, 雌雄不拘, 体重 $255 \text{ g} \pm 22 \text{ g}$, 8-12 wk, 由本校实验动物研究中心提供, 证书号, 医动字 24301056。

免疫组织化学法 (1) Som, *c-fos* 免疫组织化学法, 实验毕, 按常规进行大鼠组织灌注, 固定, 切片 ($40 \mu\text{m}$), ABC 免疫组化染色。对照实验以 PBS 温育缓冲液和正常羊血清代替一抗, 结果均未见到免疫反应阳性细胞^[5]。(2) Som/*c-fos* 免疫双重染色法, 将 *c-fos* 抗血清染色后的切片再置入兔抗 Som 血清温育 48 h (4°C), 随后依次进入生物素结合羊抗兔血清和 ABC 液中各温育 2-4 h, 最后用 DAB-H₂O₂ 液呈色, Som 免疫阳性产物为棕色。

前生长抑素原 mRNA 原位杂交法^[8] 以地高辛标记的反意 cRNA 探针, 按常规步骤进行原位杂交前, 杂交和杂交后处理, 抗地高辛抗体工作浓度为 1:1000, 以 NBT/BCIP ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}/200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 反应液显色, 对照实验包括用 $3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ RNA 酶 A 预处理切片 30 min 和不含探针杂交缓冲液杂交, 结果均检测不到明显的杂交信号。

中缝核埋管, 注药及鉴定法^[9] 为了进一步了解 ip Cor 是否作用于中缝核内的某种受体而抑制甲醛引起脊髓内 *c-fos* 和 Som 的增多效应, 在大鼠中缝核内预先分别注射赛庚啶、荷包牡丹碱、纳洛酮、酚妥拉明后再 ip Cor ($25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$), 同时注射甲醛。

数据处理 从每鼠脊髓腰段 3, 4 节段, 随机选出 4 片, 经图像分析仪 (CMIA5007, 北京产), 作阳性细胞计数, 取均数作为该鼠的 *c-fos* 样免疫反

应 (*c-fos*-like immunoreactivity, FLI) 数, Som 样免疫反应 (Som-like immunoreactivity, Som-LI) 数, 以及 PPS-mRNA 数。实验数据均用电子计算机经双样本 *t* 检验程序 (PDA-2) 进行统计学处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

RESULTS

甲醛对脊髓内 FLI, Som-LI, Som-LI/FLI 和 PPS-mRNA 的影响 于大鼠一侧足底皮下注射甲醛 (5%, $200 \mu\text{L}$) 后 2 h, 可见腰段脊髓背角 FLI 神经元在 I, II, V, VI 层增多, 以 I, II 层分布最为密集, 同侧为主, 对侧变化不明显, 而对照组脊髓背角 *c-fos* 表达很少, 与此同时, 同侧背角内 Som-LI 神经元和 Som-LI/FLI 双染神经元数以及 PPS-mRNA 阳性神经元数也均较对照组明显增多 (Tab 1, Fig 1, 2)。

Tab 1. Effect of corticotropin ($25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip) on numbers of *c-fos* protein-like immunoreactivity (FLI), somatostatin-like immunoreactivity (Som-LI), and preprosomatostatin mRNA (PPS-mRNA) neurons in spinal cord of rats evoked by formaldehyde (For, sc). $\bar{x} \pm s$.

* $P > 0.05$, ^c $P < 0.01$ vs control. ^f $P < 0.01$ vs For. ^g $P > 0.05$, ⁱ $P < 0.01$ vs Cor + For.

Rat	FLI	Som-LI	Som-LI/FLI	PPS-mRNA
Control	4	103 ± 7	0	40 ± 6
Cor	4	105 ± 7 ^a	0	41 ± 6 ^a
For	6	151 ± 10 ^c	327 ± 20 ^c	45 ± 4 ^c
Cor + For	7	41 ± 5 ^f	169 ± 12 ^f	16 ± 2 ^f
Cor $12.5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ + For	7	72 ± 10 ^f	241 ± 16 ^f	27 ± 2 ^f
Cyp + Cor + For	7	39 ± 10 ^g	315 ± 22 ^g	46 ± 4 ^g
Bic + Cor + For	6	42 ± 5 ^g	170 ± 11 ^g	16 ± 2 ^g
Nal + Cor + For	6	41 ± 9 ^g	173 ± 13 ^g	15 ± 2 ^g
Phe + Cor + For	6	42 ± 9 ^g	167 ± 14 ^g	16 ± 2 ^g

腹腔注射 Cor 对甲醛诱发大鼠脊髓背角内 FLI, Som-LI, Som-LI/FLI 及 PPS-mRNA 增多效应的影响 单独 ip Cor 后, 脊髓背角未见到 FLI 神经元, 与 ip 生理盐水对照组比较, 无统计学意义,

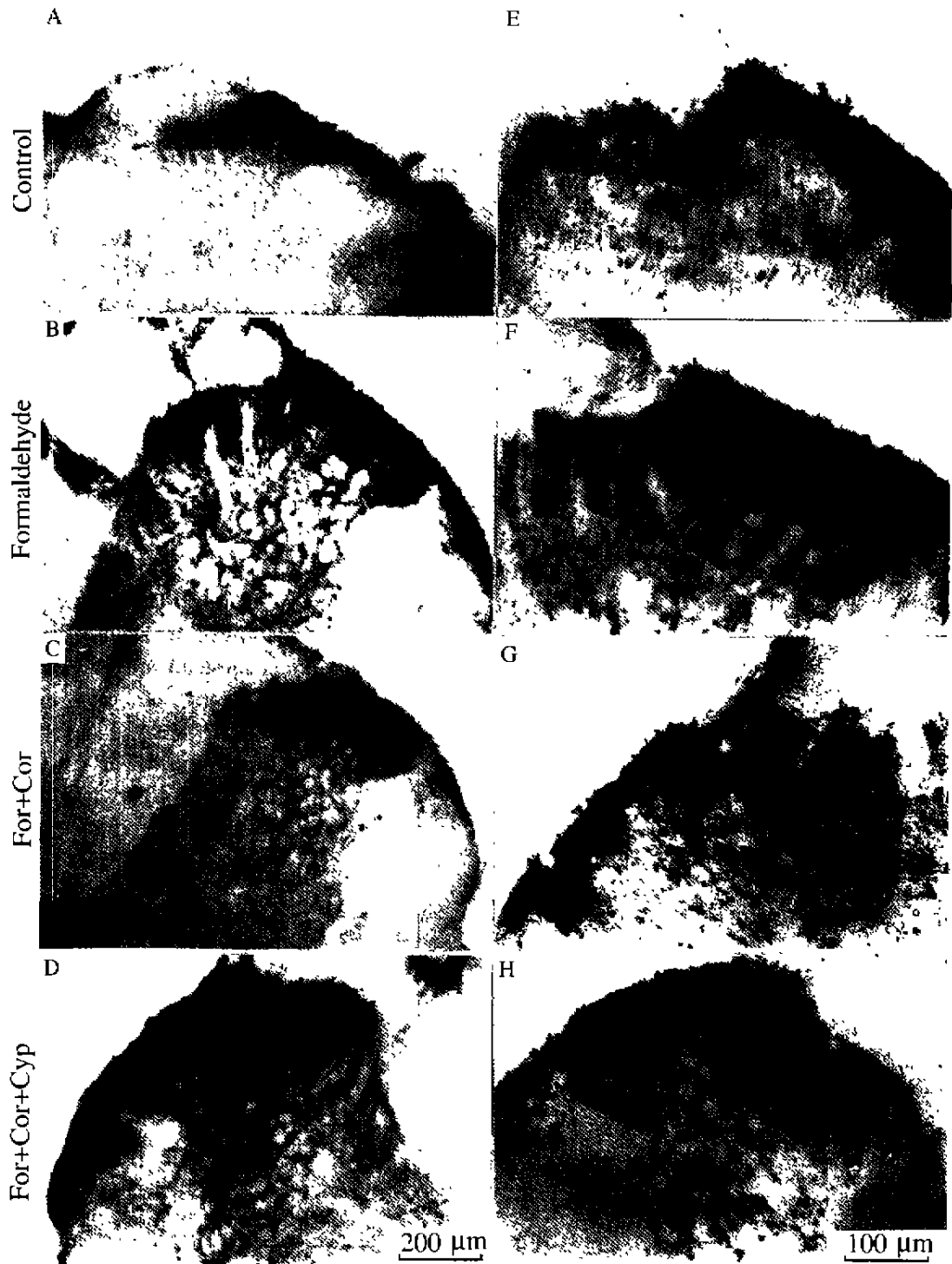


Fig 1. Immunohistochemistry of *c-fos* (A - D, GOD-DAB-Ni stain, $\times 75$) and somatostatin (E - H, DAB-H₂O₂ stain, $\times 190$) in rat spinal dorsal horn.

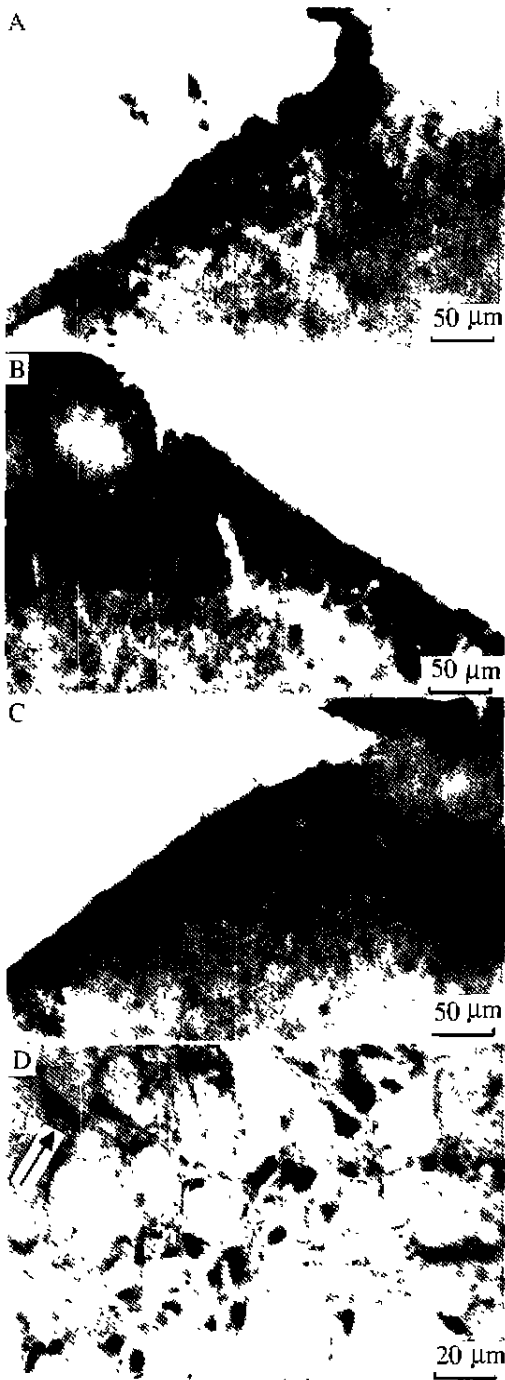


Fig 2. Dig-Som-cRNA *in situ* hybridization of rat spinal dorsal horn. NBT/BCIP stain, $\times 190$. A) Control; B) For; C) For + Cor ($25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip); D) double immunohistochemical staining of *c-fos* and Som (arrows). FLI in nuclei was visualized with the glucose oxidase-DAB-Ni protocol. Som in plasma was visualized with the DAB-H₂O₂ protocol. $\times 450$.

但是 ip Cor $25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $12.5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的同时, 再注射甲醛 2 h 后, 可见脊髓背角 FLI 神经元, Som-LI, Som-LI/FLI 和 PPS-mRNA 神经元数均较甲醛组显著减少, 尤以 ip Cor ($25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) + 甲醛组的减少更为显著 (Tab 1, Fig 1, 2).

腹腔注射 Cor 抑制甲醛引起脊髓背角 FLI, Som-LI, Som-LI/FLI 和 PPS-mRNA 神经元增多效应受体分析 在大鼠中缝核内预先分别注射赛庚啶, 荷包牡丹碱, 纳洛酮, 酚妥拉明后再 ip Cor ($25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$), 同时注射甲醛, 与 ip Cor ($25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) + For 组比较, 只有赛庚啶组大鼠脊髓背角内 FLI, Som-LI, Som-LI/FLI 和 PPS-mRNA 都有不同程度的增加 ($P < 0.01$, Tab 1, Fig 1), 而荷包牡丹碱, 纳洛酮, 酚妥拉明则无影响。

DISCUSSION

本实验结果表明, ip Cor 可通过抑制甲醛引起的脊髓背角 *c-fos* 表达, Som-LI 和 PPS mRNA 神经元的增多效应, 从而在脊髓水平抑制了伤害性刺激的传入, 而这种抑制作用与中缝核内 5-HT 受体有关。

大鼠足底注射甲醛 2 h 后, 痛级均数显著升高^[10], 与此同时同侧腰段脊髓背角的 I, II, V, VI 层 *c-fos* 表达, 以及 Som-LI 和 PPS mRNA 阳性细胞均增多^[8]。本文在大鼠右后肢足底注射甲醛来引起持续的紧张性伤害性刺激后也见到同样的现象, 由此表明脊髓背角内 *c-fos* 表达和 Som-LI 的增多可作为伤害性信息反应的标志, 伤害性刺激还可使 Som 合成加速。

Cor 作用于脊髓表面可抑制伤害性刺激引起的脊髓神经元电活动^[11], 因此 ip Cor 有可能对伤害性刺激引起的背角 *c-fos* 表达, Som-LI 神经元的增多发生直接的抑制作用。但是, 海马和中脑导水管周围灰质 (PAG) 内注射 Cor 可抑制甲醛诱发的背角 *c-fos* 表达。因此, 本文 ip Cor 抑制甲醛引起的背角 *c-fos* 表达和 Som-LI 神经元的增多效应有可能通过海马和 PAG 而起作用。

Cor ip 产生镇痛作用时, 海马, 下丘脑内 5-HT 含量增加, 其途径可能是通过激活 PAG 转而激活中脑中缝核^[11]。因为中缝核在痛觉调制中起重要作用, 并且它有广泛的纤维投射到各脑区和脊髓, 而且中缝核内含有 5-HT 受体^[12]。因此, 从本实

验结果看 ip Cor 引起的镇痛作用中, 中缝核内的 5-HT 受体可能发挥了重要作用。

REFERENCES

- 1 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 - 92.
- 2 Li HD, Li XC, Zhao BY, Ruan HZ, Huan WH, Lu ZH, *et al.* Interaction between γ -aminobutyric acid content of the brain regions and cell immunity in the analgesic effect of adrenocorticotrophic hormone in rats. *Acupunct Res* 1993; 18: 58 - 63.
- 3 Zhao BY, Li HD, Li XC, Ruan HZ, Chen CH, Chen XY, *et al.* The relation of periaqueductal gray and hippocampus in the analgesia of ACTH in rats. *Chin J Neurosci* 1996; 3: 28 - 32.
- 4 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.
- 5 Ruan HZ, Li XC, Cai WQ, Li HD, Zhao BY, Zhang X. Participation of substance P in noxious stimulus evoked *c-fos* expression in spinal cord. *Chin Sci Bull* 1994; 30: 1725 - 9.
- 6 Ohkubo T, Shibata M, Takahashi H, Inoki R. Role of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal Cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 252: 1261 - 8.
- 7 Kuraishi Y, Hirota N, Sato Y, Hino Y, Satoh M, Takagi H. Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn. *Brain Res* 1985; 325: 294 - 302.
- 8 Ruan HZ, Li XC, Cai WQ. Somatostatin involved in transmission of nociceptive information induced by substance P in the spinal cord. *Chin Sci Bull* 1997; 42: 426 - 9.
- 9 Li XC, Li HD, Yan SZ, Yuan H, Zhao BY, Liu ZZ. Effect of intraperitoneal and intracerebroventricular injection of ACTH on 5-HT content of several brain sites in rats. *Acta Physiol Sin* 1987; 39: 227 - 34.
- 10 Ruan HZ, Li XC, Cai WQ. Somatostatin inhibited pain modulation action of substance P in spinal cord. *Acta Physiol Sin* 1997; 49: 13 - 17.
- 11 Ma XS, Zhang GL. Effect of adrenocorticotropin on nociceptive discharge of dorsal horn neurons in rats. *Chin J Appl Physiol* 1993; 9: 282 - 84.
- 12 Palacios JM, Probst A, Cortes R. The distribution receptors in the human brain: high density of [3 H]LSD binding sites in the raphe nuclei of the brainstem. *Brain Res* 1983; 274: 150 - 5.

(责任编辑 杨雪芳)