

## 促皮质素对甲醛引起大鼠脊髓 *c-fos* 表达的影响及受体分析

黎海蒂<sup>1</sup>, 李希成<sup>1</sup>, 阮怀珍<sup>1</sup> (第三军医大学生理教研室, 重庆 400038, 中国)

### Effect of corticotropin on formalin-evoked *c-fos* expression of spinal cord and receptors analysis in rat

LI Hai-Di<sup>1</sup>, LI Xi-Cheng, RUAN Huai-Zhen  
(Department of Physiology, Third Military Medical College, Chongqing 400038, China)

**KEY WORDS** corticotropin; proto-oncogene proteins *c-fos*; formaldehyde; phentolamine; naloxone; verapamil; spinal cord; immunohistochemistry

**AIM:** To study the effect of corticotropin (Cor) on *c-fos* expression induced by formalin in spinal cord of rat and the role of receptors.

**METHODS:** Using immunohistochemistry and adrenalectomy. **RESULTS:** Cor inhibited the formalin-evoked *c-fos* expression in rat spinal cord in a dose-dependent manner. No obvious effect was seen by ip Cor 10 U·kg<sup>-1</sup>, but 25 U·kg<sup>-1</sup> reduced the evoked *c-fos* expression, that was blocked by phentolamine, naloxone, or verapamil, but not much changed by adrenalectomy. **CONCLUSION:** The formalin-evoked *c-fos* expression of rat spinal cord was suppressed by Cor through the  $\alpha$ -adrenergic receptors, opiate receptors and calcium, but no relation to adrenal glands.

**关键词** 促皮质素; 原癌基因蛋白 *c-fos*; 甲醛; 酚妥拉明; 纳洛酮; 维拉帕米; 脊髓; 免疫组织化学

**目的:** 研究促皮质素(corticotropin, Cor)对甲醛引起大鼠脊髓 *c-fos* 表达的影响和受体的作用。 **方法:** 采用免疫组织化学法和肾上腺摘除术。 **结果:** Cor可抑制甲醛引起大鼠脊髓内 *c-fos* 表达, 并与剂量大小有关, 小剂量(10 U·kg<sup>-1</sup>, ip)对 *c-fos* 表达无明显影响, 大剂量(25 U·kg<sup>-1</sup>, ip)可使之降低, 此效应可被酚妥拉明, 纳洛酮和维拉帕米阻断, 但不受切除双侧肾上腺的影响。 **结论:** Cor可通过

12338-3 R441-1 Q575.16  
 $\alpha$ -肾上腺素能受体, 阿片受体和钙抑制伤害性刺激诱发的脊髓 *c-fos* 表达, 但与肾上腺关系不大。

中脑导水管周围灰质(PAG)和海马在促皮质素(Cor)镇痛中具有重要作用<sup>[1]</sup>, 途径之一是通过脑内5-羟色胺及其受体而发挥镇痛效应<sup>[2]</sup>。然而, 这是 Cor 对急性痛影响的结果, 且甚少涉及其它受体的效应。外周伤害性刺激可使脊髓背角 *c-fos* 表达增多<sup>[3]</sup>。为此, 本文以脊髓背角 *c-fos* 表达为伤害性刺激反应的标志, 观察腹腔注射 Cor 对慢性痛大鼠脊髓 *c-fos* 表达的影响, 并着重分析相关受体和肾上腺在其中所起的作用, 试图进一步了解 Cor 抑制慢性痛的机制。

### MATERIALS AND METHODS

**材料** 促皮质素(Cor), 天津生物化学制药厂; *c-fos* 抗血清, Cambridge Research Biochemicals 产品。ABC试剂盒购自 Vector Co。

Wistar 大鼠 60 只, 体重 220 ± s 12 g, 8-12 wk 龄, 由本校实验动物研究中心提供, 一级, 证书号, 医动字 24301056。

实验分 8 组: (1) 对照组  $n = 8$ , 其中 3 只鼠不给任何刺激, 2 只鼠剖腹探查, 术后康复 1 wk, 不给任何刺激, 3 只鼠右足底 sc 生理盐水 150  $\mu$ L; (2) 甲醛(For)组  $n = 7$ , 大鼠右足底注射 5% 甲醛 150  $\mu$ L; (3) Cor 10 U·kg<sup>-1</sup> ip + For,  $n = 6$ ; (4) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> ip + For,  $n = 6$ ; (5) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> ip + For + 酚妥拉明 6 mg·kg<sup>-1</sup>,  $n = 10$ ; (6) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> ip + For + 纳洛酮 1 mg·kg<sup>-1</sup>,  $n = 10$ ; (7) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> ip + For + 维拉帕米 6 mg·kg<sup>-1</sup>,  $n = 7$ ; (8) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> ip + For + 摘除双侧肾上腺组  $n = 6$ 。

**Fos 免疫组织化学法** 实验毕大鼠经麻醉后进行组织灌注, 固定, 切片(40  $\mu$ m), ABC 免疫组化染色<sup>[4]</sup>, 用 GOD-DAB-Ni (葡萄糖氧化酶-DAB-硫酸镍胺)使 *c-fos* 显色后, 脱水封片。对照实验以 PBS 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 和正常羊血清代替一抗, 以上两种对照实验, 均未见到免疫反应阳性细胞。

**肾上腺摘除术** 组(8)大鼠在乙醚麻醉下经背部摘除双侧肾上腺, 剖面可见颜色不同的皮质和髓质, 术后 1 wk 进行实验, 实验毕再次剖腹核对摘除情况。

<sup>1</sup> Correspondence to Prof LI Hai-Di, Phu 86-23-6875-2269.  
Fax 86-23-6531-6682. E-mail G.J.S. @ tmmu.edu.cn  
Received 1997-05-19 Accepted 1998-01-04

数据处理,从鼠脊髓L3-4节段,随机选出4片,经图像分析仪作阳性细胞计数,取 $\bar{x} \pm s$ 作为c-fos样免疫反应(c-fos-like immunoreactivity, FLI)数.

## RESULTS

**Cor对甲醛引起脊髓c-fos表达的影响** 于大鼠右后爪底部sc甲醛后2h,在腰段脊髓右侧背角I, II, V, VI层,观察到FLI神经元明显增多,

其中以I, II层分布最为密集,与对照组比较差异非常显著( $P < 0.01$ ) (Tab 1, Fig 1A, B). ip Cor 25 U·kg<sup>-1</sup>后,随即在大鼠右后爪底部sc甲醛,2h后,于脊髓右侧背角,见到FLI减少( $P < 0.01$ ),但ip Cor 10 U·kg<sup>-1</sup>却无此种效应, ( $P > 0.05$ ) (Tab 1, Fig 1C, D).

**酚妥拉明和纳洛酮对Cor引起脊髓c-fos表达变化的影响** 在ip Cor 25 U·kg<sup>-1</sup>和足底sc甲醛之

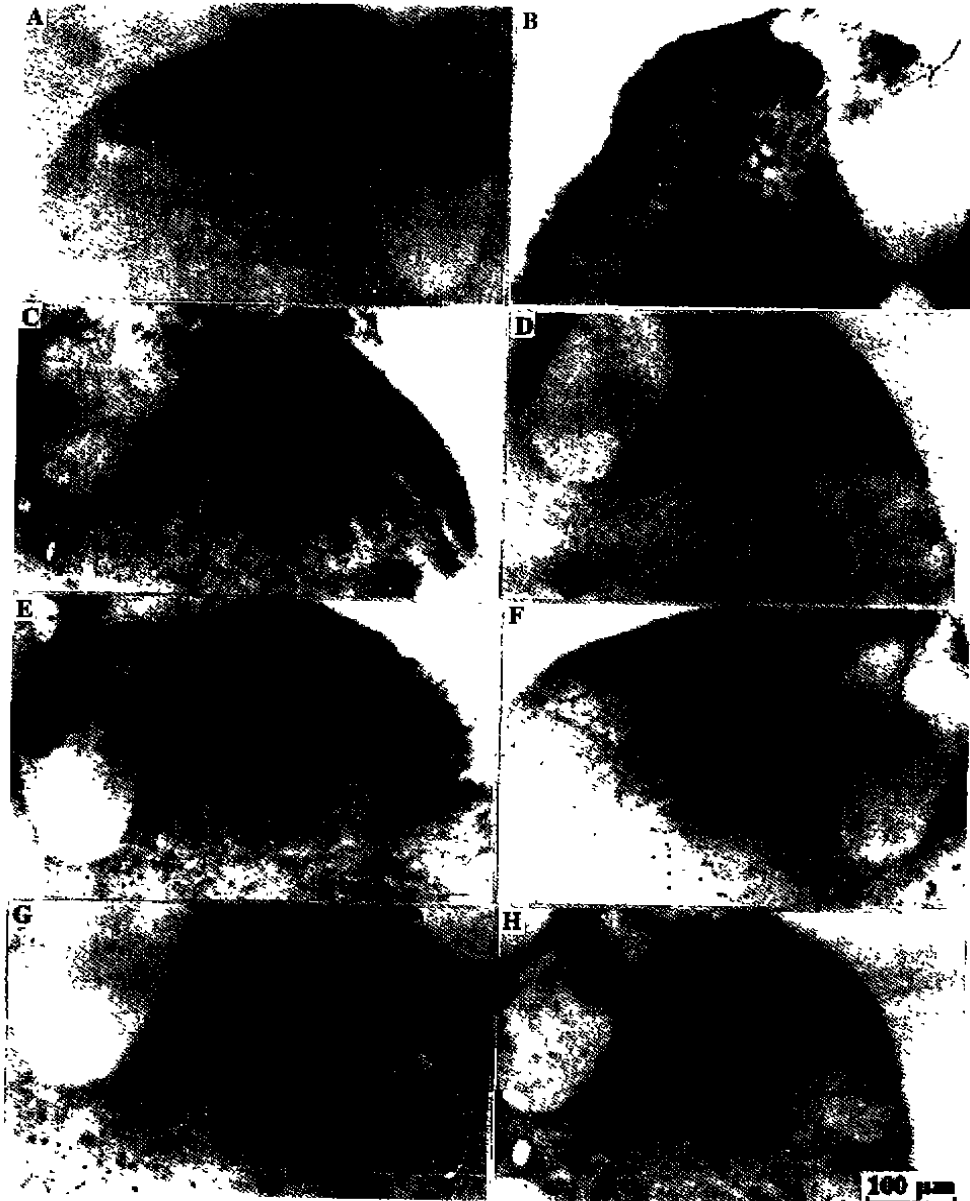


Fig 1. The c-fos-like, immunoreactivity (FLI) neurons in rat spinal cord. GOD-DAB-Ni stain,  $\times 75$ . A) Control, very sparse FLI neurons. B) For sc in hindpaw, the FLI neurons were densely distributed in spinal dorsal horn. C) Cor 10 U·kg<sup>-1</sup> + For, the FLI neurons were slightly decreased. D) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> + For, the FLI neurons were decreased. E) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> + For + phentolamine. F) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> + For + naloxone. G) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> + For + verapamil, the FLI neurons were increased. H) Cor 25 U·kg<sup>-1</sup> + For + adrenalectomy, no change in FLI neurons as compared with D.

Tab 1. Effect of corticotropin (Cor) on *c-fos*-like immunoreactivity (FLI) neurons in spinal cord of rats evoked by formalin (For).  $\bar{x} \pm s$ . <sup>c</sup> $P < 0.01$  vs control. <sup>d</sup> $P > 0.05$ , <sup>e</sup> $P < 0.01$  vs For. <sup>f</sup> $P > 0.05$ , <sup>g</sup> $P < 0.01$  vs Cor ( $25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) + For.

Cor/ U·kg <sup>-1</sup>	For	Miscellaneous	Rat	FLI neurons
-	-	-	8	3.2 ± 0.8
	For		7	132 ± 19 <sup>c</sup>
10	For		6	145 ± 23 <sup>d</sup>
25	For		6	45 ± 15 <sup>f</sup>
25	For	phentolamine	10	142 ± 8 <sup>i</sup>
25	For	naloxone	10	135 ± 24 <sup>i</sup>
25	For	verapamil	7	139 ± 26 <sup>i</sup>
25	For	adrenalectomy	6	58 ± 12 <sup>g</sup>

前 1 min, 先行 ip 酚妥拉明或纳洛酮, 均可减弱 Cor 的抑制作用, 使脊髓背角 FLI 增多 ( $P < 0.01$ ) (Tab 1, Fig 1E, F).

维拉帕米和摘除肾上腺对 Cor 引起脊髓 *c-fos* 表达变化的影响 在 ip Cor  $25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$  和足底 sc 甲醛之前 1 min, 先行 ip 维拉帕米或切除双侧肾上腺后, 见到维拉帕米可阻断 Cor 的抗伤害作用, 使脊髓背角 *c-fos* 表达增多, 而切除双侧肾上腺却无此种效应 (Tab 1, Fig 1G, H).

## DISCUSSION

甲醛等慢性伤害性刺激可引起痛敏(痛级均数增加)和脊髓背角 *c-fos* 表达增多<sup>[3,4]</sup>. 本实验观察到 ip 较大剂量的 Cor 对甲醛引起的脊髓背角 *c-fos* 表达增多有抑制作用, 该效应可被纳洛酮和酚妥拉明所翻转. 海马内注射 Cor 可抑制伤害性刺激引起的背角 *c-fos* 表达增多, 并可被 PAG 内注入纳洛酮所阻断<sup>[1]</sup>, 脊髓表面滴注 Cor 可抑制大鼠背角神经元伤害性放电<sup>[5]</sup>, 以及酚妥拉明可翻转鞘内注射去甲肾上腺素抑制伤害性刺激引起的大鼠背角 *c-fos* 表达的增多效应, 由此提示 ip Cor 有可能通过海马和脊髓, 并由阿片受体和  $\alpha$  肾上腺素

能受体介导, 从而抑制了脊髓背角伤害性神经元的活动使脊髓背角 *c-fos* 表达减少, 于是产生镇痛效应.

维拉帕米是钙拮抗剂具有阻断电压依赖性钙通道的作用<sup>[8]</sup>, 本实验见到维拉帕米可阻断 Cor 抑制伤害性刺激引起的背角 *c-fos* 增多效应, 表明在 Cor 的镇痛效应与胞内钙的降低有关, 然而却与肾上腺的关系不大, 因为切除肾上腺后对 Cor 的镇痛作用没有影响, 这与去肾上腺后不影响 Cor 引起的中枢内 5-羟色胺(镇痛物质)含量增加的报告<sup>[9]</sup> 相类似.

## REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- Ruan HZ, 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.
- Ma XS, Zhang GL. Effect of adrenocorticotropin on nociceptive discharge of dorsal horn neurons in rats. *Chin J Appl Physiol* 1993; 9: 282-4.
- Walker JM, Berntson GG, Sandman CA, Kastin AJ, Akil H. Induction of analgesia by central administration of ORG 2766, an analog of ACTH<sub>4-9}</sub>. *Eur J Pharmacol* 1981; 69: 71-9.
- Jones SL. Noradrenergic modulation of noxious heat-evoked *c-fos*-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat sacral spinal cord. *J Comp Neurol* 1992; 325: 435-45.
- Dong Z, Xue CS. Effect of verapamil on  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{(2+)}\text{Mg}^{(2+)}$ -ATPase activity in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol Sin* 1994; 15: 452-5.
- 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 rat. *Acta Physiol Sin* 1987; 39: 227-34.