

阿托品对褪黑素抑制猫丘脑后核群诱发放电的影响

邹 丹¹, 李经才^{1*}, 张瑞德²

(1. 沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国医科大学 神经生理研究室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 研究 M 受体阻断剂阿托品对褪黑素(melatonin, MT) 中枢镇痛作用的影响, 进一步探索 MT 的作用机制。方法 采用猫脑立体定位技术和玻璃微电极细胞外记录法, 以刺激内脏大神经(GSN) 诱发猫丘脑后核群(PO) 单位放电为内脏痛指标, 侧脑室给药, 观察药效。结果 0.1% MT($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, icv) 可明显抑制刺激 GSN 在 PO 诱发的单位放电, 0.1% 阿托品($20 \mu\text{g}$, icv) 可拮抗其对 PO 短潜伏期(58 ± 22) ms 诱发放电的抑制作用, 而 0.1% 吗啡($5 \mu\text{g}$, icv) 对此潜伏期放电的抑制作用则不被等量的阿托品拮抗。结论 MT 有中枢镇痛作用, 在此过程中可能有胆碱能神经的参与, MT 的镇痛机制与吗啡存在着差异。

关键词: 褪黑素; 镇痛; 丘脑; 胆碱能系统; 阿托品

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)03 - 0173 - 03

Effect of atropine on the inhibition of melatonin to the unit discharges evoked in the posterior group of thalamic nuclei in cats

ZOU Dan¹, LI Jing-cai¹, ZHANG Rui-de²

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;

2. Laboratory of Neurophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Aim** To study the effect of atropine, muscarinic cholinergic antagonist, on the central analgesic action of melatonin (MT) and to explore the mechanism of MT analgesia. **Methods** As an indicator of visceral pain, the unit discharges of the neurons in the posterior group of thalamic nuclei (PO) were caused by stimulating the great splanchnic nerve (GSN) of the cat. The cranial stereotaxic and extracellular glass microelectrode record technique were used. The drugs were given through the intra-cranial-ventricle (icv). **Results** 0.1% MT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, icv) was shown to inhibit the unit discharge of the neurons in PO of the cat, whether the long latency or the short latency, which was evoked by stimulating GSN. The inhibition of 0.1% MT ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, icv) on the short latency discharge of neurons in PO was antagonized by 0.1% atropine ($20 \mu\text{g}$, icv). However, 0.1% atropine ($20 \mu\text{g}$, icv) did not show antagonistic effect on the inhibition of 0.1% morphine ($5 \mu\text{g}$, icv) at the same latency. **Conclusion** MT exhibited central analgesic action with mechanism different from morphine. It was suggested that the cholinergic system may be involved in analgesic process of MT.

Key words: melatonin; analgesia; thalamus; cholinergic system; atropine

褪黑素(MT) 是主要由松果腺分泌的一种神经内分泌激素。目前 MT 的镇痛作用已得到普遍认识, 其镇痛作用的机制与阿片系统、免疫系统和单胺

类神经递质^[1,2]有关。脑是 MT 的主要作用部位, 有关 MT 镇痛作用与胆碱能系统的关系尚未见报道。本文用电刺激猫 GSN 诱发 PO 放电作为内脏痛指标, 研究 MT 的中枢镇痛作用, 首次提出 MT 的镇痛机制中可能有胆碱能系统参与, 为 MT 的临床应用提供基础实验资料。

收稿日期: 2002-04-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570820).

* 通讯作者 Tel: 86-24-23843711-3432, Fax: 86-24-23896050,

E-mail: ljingcai2001@hotmail.com

材料与amp;方法

材料 褪黑素:Sigma 公司产品。临用前用无水乙醇溶解,再加生理盐水稀释,使乙醇体积分数为1%;戊巴比妥钠:Serva 进口分装,上海化学试剂分装厂;盐酸普鲁卡因注射液:沈阳第一制药厂;硫酸阿托品注射液:湖南洞庭药业股份有限公司;盐酸吗啡注射液:沈阳第一制药厂。

实验动物 选用体重2.0~3.5 kg 成年健康猫32只,毛色与性别不限。室温喂养,饮水、饮食不限,光暗周期同昼夜周期。在2%普鲁卡因局麻下,于猫右前肢行静脉插管,建立给药途径,1%戊巴比妥钠(40 mg·kg⁻¹) iv 麻醉。暴露气管,插入气管套管,保持呼吸道畅通。分离左侧 GSN 腹段,在靠近腹腔神经节处结扎其外周端,放置双极银丝保护刺激电极(极间距2.5 mm)于中枢端,用自制的神经蜡封闭电极开口处,防止神经干燥及刺激电流外溢。电极周围置数块明胶海绵,以减少组织渗出液。将头部固定于立体定位仪上,参照 Snider 猫脑定位图谱,在右侧颅骨相当于 PO 核区(AP:4~5.5 mm, RL:3.5~4.5 mm, H:3~4 mm)的位置钻孔,剪开 PO 区的硬脑膜,用40℃3%琼脂封闭钻孔,以防止大脑皮层干燥和脑波动,同时于左侧脑室区(AP:13.5 mm, RL:3.0 mm, H:7.6 mm)开颅,把直径为0.6 mm的不锈钢套管插入侧脑室,并固定于颅骨上,以备侧脑室给药。为避免药液流失,实验中不做第四脑室引流。实验过程中,每小时 iv 1%戊巴比妥钠1 mL以维持动物的麻醉状态。实验时室温维持在28~30℃。

电生理记录 将尖端直径1~3 μm 内充3 mol·L⁻¹ KCl 溶液的玻璃微电极(电极电阻15~20 MΩ),经微电极推进器逐渐推入 PO 区(位置同前),以记录刺激左侧 GSN 向中端诱发的 PO 单位放电。PO 神经元电活动经 MEZ~8201 型微电极放大器放大,输入 VC-9 型示波器及 ATAC-350 数据处理机,并用 X-Y 记录仪记录实验结果,刺激信号为 SEN-7203 型刺激器产生的单脉冲方波,经 SS-102J 隔离器恒流输出,刺激参数为:强度25~30 V,波宽0.5 ms,此强度足以使该神经中 Aδ 及 C 纤维兴奋(以上仪器均为日本光电株式会社生产)。

侧脑室内微量注药 用微量注射器注入0.1% MT 溶液(10 μg·kg⁻¹),然后再注入生理盐水20 μL,将存留在套管内的药液注入。采用同样方法注入0.1%阿托品(20 μg)或0.1%吗啡(5 μg)。推注速度为20 μL·min⁻¹。

组织学检查 部分实验结束后,用滂胺天蓝细

胞外标记技术标定记录电极的位置。检验侧脑室给药位置是否准确,可于部分实验结束后,做第四脑室引流,经过套管向侧脑室注入滂胺天蓝溶液0.5 mL,再注入生理盐水2 mL,如果有蓝色溶液从第四脑室流出,证明套管在侧脑室内。

选择进行观察的神经元单位 在32只猫的 PO 区,观察38个对刺激 GSN 产生放电反应的神经元单位,该诱发放电呈簇状,放电的形式与文献^[5]报道一致。诱发放电的潜伏期同一单位较为恒定,但不同动物,不同单位不尽相同。选择潜伏期平均值为(58±22) ms (n=19) 单一放电,以及潜伏期平均值分别为(63±27) ms 和(238±116) ms (n=19) 的两簇放电,连续记录3次潜伏期和波形稳定的 PO 神经元单位进行观察。

结果

1 MT 对 PO 诱发放电的影响

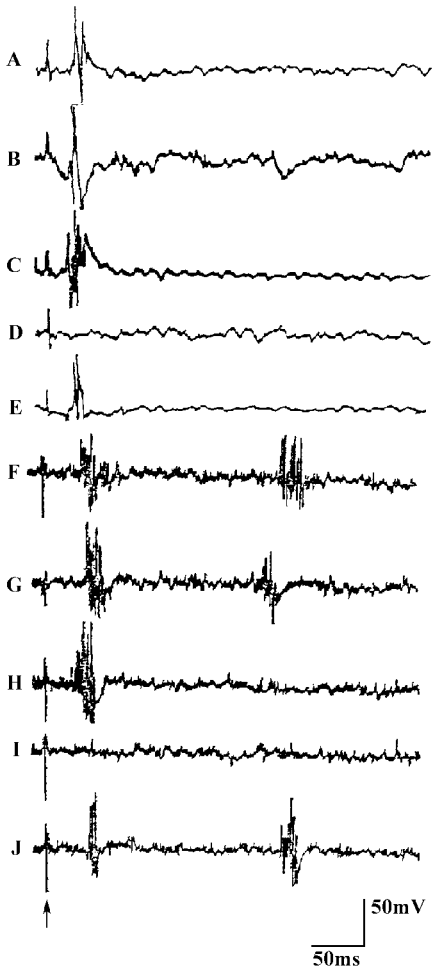
选择猫 PO 痛敏神经元(n=10),其中 PO 一簇诱发放电(n=5)和两簇诱发放电(n=5)的潜伏期见上文。0.1% MT(10 μg·kg⁻¹, icv) 给药后,两诱发放电组分别出现 PO 诱发放电的完全抑制,抑制时间达(62±4) min。用等量的 MT 溶媒(含1%无水乙醇的生理盐水溶液), icv (n=6),对 PO 诱发放电无明显影响。

2 阿托品对 MT 中枢镇痛作用的影响

选择猫 PO 痛敏神经元(n=16),一簇诱发放电(n=8)和两簇诱发放电(n=8)的潜伏期见上文。0.1%阿托品(20 μg) icv, 10 min 后,给予0.1% MT (10 μg·kg⁻¹, icv)。在一簇诱发放电组,MT 对 PO 的抑制作用消失。在两簇诱发放电组,MT 对第一成分(短潜伏期放电)的抑制作用消失,但对第二成分(长潜伏期放电)的抑制作用仍存在。可见,阿托品可拮抗 MT 对第一成分的抑制作用,对第二成分无明显影响。60 min 后再次予等量的 MT 出现两放电组诱发放电的完全抑制,达(90±6) min 之久。单独予0.1%阿托品(20 μg, icv),观察60 min,对 PO 诱发放电无明显影响(n=6)。如图1所示。

3 阿托品对吗啡中枢镇痛作用的影响

选择猫 PO 痛敏神经元(n=12),一簇诱发放电(n=6)和两簇诱发放电(n=6)的潜伏期同上文。给予0.1%阿托品(20 μg, icv),两组诱发放电无明显变化。10 min 后,给予0.1%吗啡(5 μg, icv),吗啡对两放电组 PO 诱发放电完全抑制,持续(64±6) min 后恢复。



A: The unit discharge of short latency in PO evoked by stimulating the great splanchnic nerve (GSN) (as control); B: The unit discharge still exists after icv injection of 0.1% atropine (20 μg , 10 min later); C: The unit discharge still exists after icv injection of 0.1% MT (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 60 min later); D: The unit discharge is inhibited completely by icv injecting 0.1% MT (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) again (3 min later); E: Recovery of the response in PO (90 min later); F: The double-cluster unit discharges in PO evoked by stimulating GSN (as control); G: The double-cluster unit discharges still exist after icv injection of 0.1% atropine (20 μg , 10 min later); H: The first component of the double-cluster unit discharges still exist after icv injection of 0.1% MT (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), but the second component disappears (60 min later); I: The unit discharge is inhibited completely by icv injection of 0.1% MT (10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) again (3 min later); J: Recovery of the response in PO (90 min later); \uparrow : Artifact of stimulating GSN afferent fibers

Figure 1 Effect of icv injection of atropine on the unit discharge inhibited by melatonin in the posterior group of the thalamic nuclei (PO) of the cat

讨论

本文应用电刺激猫内脏大神经诱发的丘脑后核痛放电作为内脏痛的模型,研究 MT 的中枢镇痛作用及其机制。实验结果表明:MT 对第一成分(A δ 神经纤维传导的快痛)和第二成分(C 类神经纤维传导的慢痛)均有镇痛作用。文献^[3]报道:MT 可显著加强电针镇痛效应,下丘脑弓状核 β -内啡肽的合成与释放加强,可能是其发挥镇痛效应机理之一。在生理解剖上,脑内的 β -内啡肽的神经元胞体集中于下

丘脑弓状核区,其纤维可投射到室旁核等核团,并能沿第三脑室壁投射到中脑导水管周围灰质等区域,通过中脑导水管周围灰质、中缝核群和蓝斑核的下行内源性痛调制系统,阻断痛的上传。此外,有文献^[4,5]报道,MT 与内啡肽、脑啡肽之间可能存在正反馈机制。

乙酰胆碱(ACh)在痛与镇痛的过程中是一个重要的中枢神经递质,当脑内 ACh 含量增加时,丘脑束旁核和中脑网状结构中两个痛兴奋神经元的电活动同时减弱,两个痛抑制神经元的电活动同时加强^[6]。在临床研究中也发现疼痛病人给与针刺产生镇痛时,侧脑室脑脊液中 ACh 含量增加。神经解剖学研究表明:在海马、下丘脑弓状核以及蓝斑核等均有胆碱能神经元。

在 MT 的镇痛过程中是否有胆碱能纤维系统的参与,目前尚未见报道。本实验 icv 0.1%阿托品(20 μg),10 min 后,给予 0.1% MT(10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),对于 PO 短潜伏期诱发放电,MT 镇痛作用消失,即痛放电仍存在。此结果提示,在 MT 的镇痛过程中可能有胆碱能系统参与。icv 0.1%阿托品(20 μg),10 min 后,给予 0.1%吗啡(5 μg),对于 PO 诱发的单簇放电和两簇放电均出现簇状放电的完全消失,表明 MT 镇痛和吗啡镇痛在机理上存在着差异。至于 MT 是如何对这些递质系统发挥影响,以及是否还影响到其他神经递质系统,还有待于进一步研究。

References:

- [1] Maestroni GJM, Conti A. The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD $_4^+$, Thy-1 $^+$ cells to release opioid agonist(s) with immunoenhancing and anti-stress properties [J]. *Neuroimmunol*, 1990, **28**(2):167-176.
- [2] Eison AS, Freeman RP, Guss VB, et al. Melatonin agonists modulate 5-HT 2A receptor mediated neurotransmission: behavioral and biochemical studies in the rat [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **273**(1):304-308.
- [3] Zhou MM, Yu CX, Cao XD, et al. Potentiation effect of melatonin on acupuncture analgesia and relationship with β -endorphin in CNS [A]. *Proceedings of the 3rd Congress of Chinese Society for Neuroscience* (中国神经科学学会第三届全国学术会议论文摘要汇编)[C]. Beijing: Beijing Medical University, 1999. 204-205.
- [4] Wei W, Shen YX, Ding CH. Effects of melatonin on morphine-induced mice dependence and relation with enkephalin [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1998, **14**(1):72-74.
- [5] Esposti D, Esposti G, Lissoni P, et al. Action of morphine on melatonin release in the rat [J]. *J Pineal Res*, 1988, **5**(1):35-39.
- [6] Zhao DC, Xu T, Sun MZ. The effects of acetylcholine on the electric activities of pain reaction neurons in nucleus parafascicularis of thalamus and midbrain reticular formation in rats [J]. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 1988, **40**(4):326-334.