

• 基础研究 •

阿片受体在电针预处理诱导大鼠脑缺血耐受效应中的作用

杨静 熊利泽 王强 刘艳红

【摘要】 目的 探讨阿片受体在重复电针预处理诱导大鼠脑缺血耐受形成中的作用。并研究可能参与作用的阿片肽种类。方法 雄性SD大鼠42只,随机分为空白对照组,戊巴比妥钠组,电针(EA)组,EA+ δ 受体拮抗剂naltrindole(NTI)组,EA+ κ 受体拮抗剂nor-binaltorphimine(BNI)组,NTI组和BNI组。EA组、EA+NTI组和EA+BNI组接受相同电针灸刺激(疏密波2/15Hz,1mA,30min/d)连续5d,EA+NTI组和EA+BNI组分别于每次电针灸开始前给予NTI(1mg/kg)或BNI(2.5mg/kg)腹腔注射;NTI组和BNI组单纯腹腔注射相同剂量的NTI或BNI。最后一次处理24h后采用MCAO模型。再灌注24h进行神经学评分后取脑,经TTC染色计算脑梗死容积。结果 脑梗死容积:EA组明显小于空白对照组($P=0.000$);EA+NTI组与空白组比较没有明显的统计学差异($P=0.219$),而与EA组有明显的统计学差异($P=0.000$);EA+BNI组与空白组比较有明显统计学差异($P=0.000$),与EA组比较没有明显的统计学差异($P=0.319$);说明NTI(1mg/kg)能够阻断EA预处理诱导的脑保护作用,而BNI(2.5mg/kg)不能。结论 阿片受体参与了重复电针灸刺激大鼠百会穴诱导的脑缺血耐受效应, δ 受体发挥了主要作用。

【关键词】 脑缺血耐受;缺血预处理;电针灸;阿片受体; δ 受体;大鼠

Role of opioid receptors in cerebral ischemic tolerance induced by electroacupuncture preconditioning in rats

YANG Jing, XIONG Lize, WANG Qiang, et al

Department of Anesthesiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To explore the role of opioid receptors in formation of cerebral ischemic tolerance induced by repeated electroacupuncture(EA) in rats. Methods Forty-two male SD rats were randomly divided into 7 groups($n=6$ each): control group, pentobarbitone group, EA group, EA+ naltrindole(NTI) group, EA+ nor-binaltorphimine(BNI) group, NTI group and BNI group. EA, EA+NTI and EA+BNI groups received electroacupuncture at the Baihui acupoint for 30 min a day for 5 days; NTI (1mg/kg) and BNI (2.5mg/kg) were intraperitoneally administered before the electroacupuncture stimulation in EA+NTI group and EA+BNI group respectively. NTI group and BNI group only received NTI (1mg/kg) and BNI (2.5 mg/kg) respectively. Twenty-four hours after the last treatment, the right middle cerebral artery was occluded for 120 min. After 24 h reperfusion, the animals were sacrificed and the infarct volume of the brain was determined with TTC staining. Results Cerebral infarct volume: EA group presented smaller cerebral infarct size as compared with the control group ($P=0.000$); there was no significant difference between the infarct volume of EA+NTI and control groups ($P=0.219$); EA+BNI group showed significant difference in infarct size compared with control group ($P=0.000$), while had infarct volume similar to that of EA group($P=0.319$). The results showed that NTI (1mg/kg), a δ -opioid receptor antagonist, when given before EA preconditioning, abolished ischemic tolerance induced by EA, while BNI (2.5mg/kg), a κ -opioid receptor antagonist, could not. Conclusions The present study suggests that δ -opioid receptor plays a role in ischemic tolerance induced by repeated EA in rats.

【Key words】 cerebral ischemic tolerance; ischemic preconditioning; electroacupuncture; opioid receptor; δ -opioid receptor; rats

收稿日期:2006-04-07

作者单位:100853 北京市,解放军总医院麻醉科(杨静、刘艳红);710032 西安市,第四军医大学西京医院麻醉科(熊利泽、王强)

作者简介:杨静,女,1978年8月生,山东省莱州市人,医学硕士,住院医师。Tel:13552985503

缺血预处理诱导脑缺血耐受是目前脑保护研究的热点之一。我们以往的研究发现,重复电针刺激大鼠百会穴能够诱导脑缺血耐受,产生脑保护作用^[1]。而且2Hz电针刺激的保护作用远较100Hz者强。根据韩济生的研究结果,频率在2Hz左右的刺激主要引起脑啡肽释放,主要通过体内的 μ/δ 受体发挥作用;而频率在100Hz左右的刺激则主要使强啡肽的释放增加,主要通过 κ 受体介导而发挥镇痛作用^[2]。我们因此推测,脑啡肽和 δ 受体在重复电针刺激大鼠百会穴诱导脑缺血耐受中的作用可能比强啡肽和 κ 受体更为重要,并且设计了以下研究进行验证。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 实验动物由第四军医大学实验动物中心提供。清洁级雄性SD大鼠(280~320g)42只,随机分为7组($n=6$):空白对照组,戊巴比妥钠对照组,电针灸(EA)组,EA+ δ 受体拮抗剂naltrindole组(EA+NTI),EA+ κ 受体拮抗剂nor-binaltorphimine组(EA+BNI),BNI和NTI。空白对照组每日腹腔注射生理盐水4ml/(kg·d),连续5d;其余各组每日腹腔注射1%戊巴比妥钠40mg/(kg·d),连续5d。戊巴比妥钠组不做其它处理,EA组,EA+NTI组,EA+BNI组按照相同方法接受电针刺激百会穴(疏密波2/15Hz)30min/d,连续5d,后两组分别于每次电针灸刺激开始前30min和2h给予 δ 受体拮抗剂NTI(1mg/kg)及 κ 受体拮抗剂BNI(2.5mg/kg)腹腔注射;NTI和BNI组只单纯接受NTI(1mg/kg)或BNI(2.5mg/kg)腹腔注射,连续5d。

1.2 电针处理 EA组参照《实验针灸学》^[3]的常用实验动物针灸穴位,在顶骨正中定位百会穴,用30号0.5毫针向前平刺2mm,与百会穴形成回路的另一电极夹于大鼠右侧耳上,接电针刺激仪(WQ-10D1型,北京市海淀电子仪器厂),以大鼠右耳微颤为穴位刺激有效指标。

1.3 大脑中动脉阻闭(MCAO)脑缺血模型 动物术前禁食12h,不禁水。动物通过面罩给予4%异氟醚诱导麻醉,2%异氟醚吸入维持麻醉深度,保留自主呼吸。MCAO模型根据Koiosumi等^[4]的方法,大鼠麻醉后取颈正中切口,暴露右侧颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉,结扎颈总动脉、颈外动脉,于颈总动脉分叉下方剪一切口,将一末端用酒精灯烧成圆头的尼龙线(3-0, Ethicon Inc, Japan)置入颈内动脉17~18mm,结扎颈内

动脉。阻闭120min后抽出尼龙线,恢复再灌注。术中体温由肛温探头连接多功能监测仪(Spacelab, America)监测,用烤灯维持在37~37.5℃。

1.4 观察指标 (1)动物恢复及神经功能损害评估:麻醉苏醒后,将动物放回鼠笼,自由饮食。脑缺血再灌注后24h,由一不了解分组情况的观察者评估记录神经损害评分,方法为6级评分法:0级,无功能障碍;1级,不能伸展左侧前肢;2级,向左侧旋转;3级,向左侧倾倒;4级,无自主活动伴意识障碍;5级,死亡。(2)TTC染色:再灌注24h神经损害评分完成后,动物用氯胺酮深度麻醉后断头处死,用咬骨钳迅速打开颅骨,剪开脑膜,完整取出鼠脑,立即放入-20℃冰盐水中。10min后取出鼠脑,置于特制鼠脑槽中,取冠状面均匀切成2mm厚脑片,共6片。将脑片迅速放入2%TTC溶液中,37℃水浴30min至显色,保存在4%多聚甲醛内,24h后拍照。

1.5 脑梗死灶测量 用数码相机(KODAK, DC240 USA)拍照后输入计算机,用图象处理软件(ADOBE, PHOTOSHOP 6.0)计算梗死面积(粉红色区为正常脑组织,白色区为梗死区),各脑片梗死面积之和乘以厚度(2mm)作为脑梗死容积。

1.6 统计学方法 脑梗死容积用均数±标准差表示。对所有组别的脑梗死容积进行方差分析(SPSS软件),再用Dunnett-t检验(SPSS软件)检验进行两两比较,并对EA组,EA+NTI组,EA+BNI组,BNI组、NTI组和戊巴比妥钠对照组与空白组间进行多组与一组的比较。神经功能评分用Kruskal-Wallis方法检验(SPSS软件)。P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

6只大鼠缺血再灌注后未达24h即死亡(可能因颅内出血所致),3只大鼠取脑时可见明显蛛网膜下腔出血,均被排除出本实验。补做相应数量的大鼠以保证每组6只的样本量。

2.1 再灌注24h后脑梗死容积(图1,2) EA组明显<空白对照组($P=0.000$),EA+NTI组与空白对照组比较没有明显的统计学差异($P=0.219$),与EA组有明显的统计学差异($P=0.000$);而EA+BNI组与空白对照组比较有明显统计学差异($P=0.000$),与EA组比较没有明显的统计学差异($P=0.319$);BNI组和NTI组与空白对照组比较都没有明显的统计学差异(P 值分别为0.351和0.480)。空白对照组与戊巴比妥钠组梗死容积间没有统计学差异($P=0.865$)。

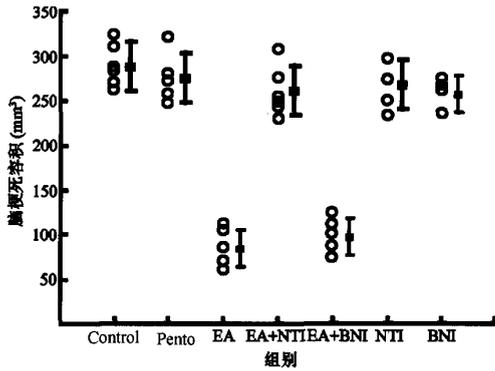


图1 大鼠 MCAO120min 再灌注 24h 后脑梗死容积(n=6) Control=对照组; Pento=戊巴比妥钠组; EA=电针组; EA+NTI=电针+ δ 受体拮抗剂 naltrindole 组; EA+BNI=电针+ κ 受体拮抗剂 nor-binaltorphimine 组

2.2 神经学评分(表 1) 各组间神经学评分有明显的统计学差异($P=0.000$)。因为目前尚没有较为完善的统计学方法,故未对此神经学评分进行各组之间的两两比较。但 EA 组和 EA+BNI 组的神经功能损害评分低于其它各组,与脑梗死容积的结果相一致的。

3 讨论

本研究发现 δ 受体拮抗剂 NTI(1mg/kg)能够阻断重复电针刺激大鼠百会穴诱导的脑缺血耐受效应;但是 κ 受体拮抗剂 BNI(2.5mg/kg)没有消除重复电针灸预处理的脑保护作用。说明 δ 受体参与了重复电针灸刺激大鼠百会穴诱导的脑缺血耐受机制,而 κ 受体在此过程中可能作用不大。

NTI 和 BNI 分别是 δ 受体和 κ 受体的高度特异性拮抗剂,有很好的选择性。因为 NTI 发挥最佳拮抗作用的时间是腹腔注射后 30min,而 BNI 则是腹腔注射后 2h,所以在本实验中二者的给药时间有所不同。

在本实验中,电针组较对照组的脑梗死容积明显减小,表现出了明显的脑保护作用,支持本实验室以前的实验结论。而单纯的 NTI 组和 BNI 组与空白组比较没有明显的统计学差异,而与电针预处理组相比有明显的统计学差异,说明两种拮抗剂既无脑保护作用亦无脑损伤作用,排除了其本身对本研究产生干扰的可能性。

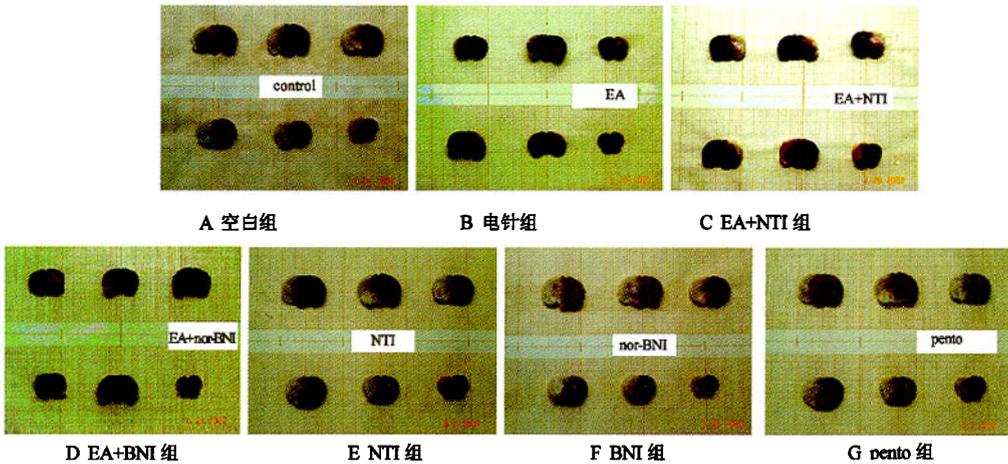


图2 再灌注 24h 后脑梗死灶染色(白色未染色区为梗死灶)

表 1 缺血 120min 再灌注 24h 后时各组鼠神经功能损害评分

组别	神经功能损害评分						n	中(位)数变化范围
	0	1	2	3	4	5		
Control	0	0	4	2	0	0	6	2(2-3)
Pento	0	0	5	1	0	0	6	2(2-3)
EA	1	4	1	0	0	0	6	1(0-2)
EA+NTI	0	1	4	1	0	0	6	2(1-2)
EA+BNI	0	5	1	0	0	0	6	1(1-2)
NTI	0	0	5	1	0	0	6	2(2-3)
BNI	0	0	5	1	0	0	6	2(2-3)

Martin(1967)最早提出脑内存在着阿片受体,现已证明在脑内至少存在着 μ 、 δ 和 κ 3种阿片受体。主要是 δ 受体和 μ 受体,可以介导许多生理活动,如对疼痛的调节、镇痛以及对行为、自主活动和神经内分泌系统的作用等^[5~7]。Schultz等^[8]首次提出内源性阿片肽在心肌缺血耐受的快速相中发挥重要作用,可能是心肌缺血耐受的触发和最终效应因子。有研究^[9]发现脑啡肽可能通过 δ 阿片受体诱导了心肌缺血耐受效应。而关于阿片受体和内源性阿片肽在脑缺血耐受方面的研究尚不成熟。Baskin等^[10]首先发现脑缺血患者脑脊液中亮氨酸脑啡肽、 β -内啡肽的含量均有显著升高,应用阿片受体拮抗剂纳络酮可以改善脑缺血的症状。但是随后也有研究发现用3种 κ 受体激动剂可以提高局部脑缺血的猫的存活率,改善神经功能,减少组织损伤和脑水肿。还有研究发现阿片受体参与了低氧预处理诱导的神经保护作用,而且用外源性阿片受体激动剂(如吗啡),特别是 δ 受体激动剂可以模拟此种保护作用^[11~15]。由此认为, δ 1受体的激活参与了急性脑缺氧耐受产生的结论^[13]。本研究发现 δ 受体拮抗剂NTI(1mg/kg)能够阻断重复电针灸刺激大鼠百会穴诱导的脑缺血耐受效应,说明 δ 受体参与了重复电针灸刺激大鼠百会穴诱导的脑缺血耐受机制; κ 受体拮抗剂BNI(2.5mg/kg)没有消除重复电针灸预处理的脑保护作用,但是也不能排除增大剂量后出现阳性结果的可能。目前尚无证据证实某种内源性阿片肽通过阿片受体参与了重复电针灸预处理。脑啡肽对 δ 阿片受体有较高的选择性,但重复电针刺激是否促进了脑啡肽的释放,脑啡肽和 δ 阿片受体结合后是否又作用于某种信号传导通路,通过某种或某几种最终效应因子而诱导脑缺血耐受,产生脑保护作用,还需进一步研究。内源性阿片肽对心脏等多个器官均有保护作用,如果通过研究得到更为直接确实的科学依据,将为发展新的类阿片肽器官缺血保护药物提供一定的根据和支持。

参考文献

- 1 Xiong LZ, Lu ZH, Hou LC, et al. Pretreatment with repeated electroacupuncture attenuates transient focal cerebral ischemic injury in rats. *Chin Med J*, 2003, 116: 108-111.
- 2 Han JS, Wang Q. Mobilization of specific neuropeptides by peripheral stimulation of identified frequencies. *News*

- 3 林文注,王佩,主编.实验针灸学.上海:上海科学技术出版社,1999.288.
- 4 Koiosumi J, Yoshida Y, Nakazawa T. Experimental studies of ischemic brain edema; a new experimental model of cerebral embolism in rats in which re-circulation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*, 1986, 8:1-8.
- 5 Di Chiara G, North RA. Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci*, 1992, 13:185-193.
- 6 Standifer KM, Rossi GC, Pasternak GW. Differential blockade of opioid analgesia by antisense oligodeoxynucleotides directed against various G protein alpha subunits. *Mol Pharmacol*, 1996, 50: 293-298.
- 7 Sanchez-Blanco P, Carcia-Espana A, Garzon J. *In vivo* injection antisense oligodeoxynucleotides to G alpha subunits and supraspinal analgesia evoked by μ and δ opioid agonists. *Pharmacol Exp Ther*, 1995, 275:1590-1596.
- 8 Schultz JE, Rose E, Yao Z, et al. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat heart. *Am J Physiol*, 1995, 268(5Pt2):H2157-H2161.
- 9 Sigg DC, Coles JA Jr, Oeltgen PR, et al. Role of δ -opioid receptor agonists on infarct size reduction in swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282: H1953-H1960.
- 10 Baskin DS, Widmayer MA, Browning JL, et al. Evaluation of delayed treatment of focal cerebral ischemia with three selective kappa-opioid agonists in cats. *Stroke*, 1994, 25:2047-2053.
- 11 Zakusov VV, Iasnetsov VV, Ostrovskaia RU, et al. Effect of opiate receptor agonists and antagonists on the resistance of animals to hypoxic hypoxia. *Biull Eksp Biol Med*, 1984, 98:680-682.
- 12 Tang AH. Protection from cerebral ischemia by U-50,488E, a specific kappa opioid analgesic agent. *Life Sci*, 1985, 37:1475-1482.
- 13 Mayfield KP, D Alecy LG. Delta-1 opioid agonist acutely increases hypoxic tolerance. *Pharmacol Exp Ther*, 1994, 268:683-688.
- 14 Zhang J, Qian H. Rapid hypoxia preconditioning protects cortical neurons from glutamate toxicity through delta-opioid receptor. *Stroke*, 2006, 37:1094-1099.
- 15 Lim YJ, Zheng S. Morphine preconditions Purkinje cells against cell death under *in vitro* simulated ischemia-reperfusion conditions. *Anesthesiology*, 2004, 100:562-568.