

文章编号:1005 - 8486(2005)05 - 0340 - 03

论著 ·

单发佐剂性关节炎大鼠脊髓单胺类递质及代谢产物含量分析

蒋袁絮¹, 王 韵², 方 明², 刘红香², 韩济生²

(1. 宁夏医学院药理学教研室, 银川 750004; 2. 北京医科大学神经科学研究所, 北京 100083)

摘要:目的 探讨慢性关节炎疼痛时脊髓单胺类递质和代谢产物含量及释放量的变化。方法 采用完全弗氏佐剂在大鼠一侧后肢造成单发性关节炎模型,用高效液相色谱法分别测定致炎前及致炎后 1~9 周大鼠脊髓灌流液和脊髓背角单胺类递质及其代谢产物的含量。结果 (1)致炎 5 周后脊髓去甲肾上腺素释放量增加而同期含量降低,炎症 1~9 周期间脊髓 3 - 甲氧基 - 4 - 羟基苯乙二醇释放量明显减少;(2)5 - 羟吲哚乙酸脊髓释放量在第 5 周降低而同期含量升高;(3)3,4 - 羟基苯乙酸脊髓释放量明显降低但含量变化不明显,高香草酸未见有明显改变。结论 单胺类递质及代谢产物参与了慢性炎症痛期间内源性镇痛系统的作用。

关键词:佐剂性关节炎;脊髓;单胺类递质;代谢产物;大鼠

中图分类号:R971+.1

文献标识码:A

慢性炎症痛临床常见,其发生机制目前尚不清楚。以往的研究证明脊髓是痛觉调制的关键部位^[1],而单胺类递质在内源性镇痛系统中起着极其重要的作用。有研究表明脊髓水平阿片能、去甲肾上腺素能和 5 - 羟色胺能系统的激活可产生抗伤害性感受作用,单胺下行抑制系统在急性伤害感受和炎症痛过程中的作用已有较多研究^[2~4]。本研究以完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA)造成的单发佐剂性关节炎为模型,测定脊髓中单胺类递质及代谢产物在慢性炎症痛过程中含量和释放量的变化,以探讨其在慢性炎症痛中的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制备

雌性 Wistar 大鼠,体重 160~200g,由北京医科大学实验动物中心提供。每笼 6~8 只群养,室温(20±1)。自然照明,自由饮水、饮食。动物随机分为 5 组,每组 12 只,第 1 组为正常对照组,不做任何处理,另外 4 组在 10%水合氯醛(300mg/kg, ip)麻醉下,向右踝关节腔内注射 CFA 造成单发性关节炎动物模型。

1.2 仪器与主要试剂

1.2.1 仪器:6A 系列高效液相色谱仪, SIL - 6A 自动进样器, L - ECD - 6A 电化学检测器(日本岛津公司);Maclab/4e 四导记录仪及 Chart 和 Peak 软件(澳大利亚 Adinstruments 公司);Alltima C₁₈ 反相柱(250mm×4.6mm, 美国 Alltech 公司)及国产保护柱;P - 1 型蠕动泵(瑞典 Pharmacia 公司)。

1.2.2 主要试剂:样品预处理试剂 A 液为 0.4mol/L 高氯酸, B 液为 20mmol/L 柠檬酸钾、300mmol/L 磷酸氢二钾和

2mmol/L EDTA·2Na 的混合液去甲肾上腺素(NE)、3 - 甲氧基 - 4 - 羟基苯乙二醇(MHPG)、多巴胺(DA)、5 - 羟吲哚乙酸(5 - HIAA)、高香草酸(HVA)、3,4 - 羟基苯乙酸(DOPAC)、辛烷基硫酸钠(octyl sulfate)均为 Sigma 产品;甲醇为色谱纯,高氯酸、一水合柠檬酸、二水合柠檬酸三钠、EDTA·2Na 柠檬酸钾、磷酸氢二钾均为分析纯试剂,北京化工厂产品;实验用水为去离子水再经双蒸处理。

1.3 色谱条件

1.3.1 流动相:选用柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液(0.15mol/L), pH4.3, 含 0.1mol/L EDTA·2Na, 120mmol/L 辛烷基硫酸钠及 10% 甲醇(v/v), 流动相使用前新鲜配制, 循环使用 1 周, 每天经 0.45μm 滤膜负压过滤兼脱气。

1.3.2 标准品:精确称取 NE、MHPG、5 - HIAA、DA、DOPAC、HVA 各溶于去离子双蒸水中配成 1mg/mL, - 80 保存, 临用前用去离子双蒸水稀释为 10μg/mL, 定量混合, 并用流动相稀释使其中每种标准品的浓度都一致。

1.4 样品收集和预处理

1.4.1 样品收集:致炎后 1、3、5、9 周, 实验大鼠在 10%水合氯醛(300mg/kg, ip)麻醉下, 经寰枕膜向脊髓蛛网膜下腔插入外径 0.61mm, 内径 0.28mm 的 PE - 10 聚乙烯管至腰膨大部位, 插入长度为 7.5~8.5mm。再将外径 0.91mm 的 PE - 50 聚乙烯管与 PE - 10 管并行向尾部插入 1cm。用恒速泵将人工脑脊液以 1mL/30min 的速度经 PE - 10 管灌流脊髓, 每只动物连续灌流 60min。动物脊髓灌流后迅速断头处死, 取出完整脊髓, 剪出腰膨大并将背腹侧分开。取右背侧腰髓放入 Eppendorf 管置 - 80 冻存。

1.4.2 样品预处理:(1)脊髓灌流液预处理:灌流结束, 各收集管立即于 4℃、12000r/min 离心 20min, 取上清, - 80 冷冻离心抽干, 冻干样品分析前以 300μL A 液复溶, 充分混匀后 4℃、12000r/min 离心 20min, 上清再加入 1/2 A 液体积的 B 液, 4℃、12000r/min 离心 10min;(2)脊髓背部组织的抽

收稿日期:2005 - 04 - 11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800198, 39700188)

作者简介:蒋袁絮(1957 -), 女, 江苏人, 教授, 硕士, 从事神经药理学研究。E - mail:jiangyx@nxmc.edu.cn

提:冻存样品加入 300μL A 液,冰浴中超声匀浆 1min,匀浆液 4 12000r/min 离心 20min,取上清 250μL,下同脊髓灌流液加入 B 液并离心。处理后的样品定量转移至 300μL 进样瓶中,由自动进样器进样。

1.5 观察指标

各组大鼠的脊髓背部组织抽提液和脊髓灌流液经上述预处理后用高效液相色谱法分别测定单胺类递质及其代谢产物的脊髓含量和释放量。

1.6 统计学处理

实验数据均以平均值 ±标准差表示,采用 SPSS 10.0 统

计软件,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 炎症过程中 NE 及代谢产物 MHPG 的变化

与正常对照组大鼠相比,关节炎大鼠脊髓 NE 含量于致炎第 3 周起下降,至第 5 周降至最低,仅为致炎前的 31%,至第 9 周出现明显恢复趋势。而脊髓 NE 释放量在炎症后期的第 9 周升高,NE 代谢产物 MHPG 的脊髓释放量在整个炎症的 1~9 周均明显低于正常,经统计学处理,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),表 1。

表 1 单胺类递质及代谢产物的自发释放量及患侧脊髓背半侧含量 (n = 12)

检测指标		正常对照组	致炎后(周)			
			1	3	5	9
NE	自发释放量 (pmol/L)	5.84 ±0.48	3.60 ±0.13	—	6.42 ±2.00	12.37 ±1.12 *
	含量 (pg)	1.90 ±0.29	1.78 ±0.19	1.97 ±0.18	0.59 ±0.21 **	1.27 ±0.23
MHPG	自发释放量 (pmol/L)	13.09 ±1.52	7.62 ±0.29 **	—	7.24 ±1.68 **	5.29 ±0.30 **
5 - HIAA	自发释放量 (pmol/L)	39.27 ±2.41	35.40 ±4.54	—	26.64 ±3.65 *	36.20 ±1.84
	含量 (pg)	0.71 ±0.14	0.55 ±0.06	1.29 ±0.14 *	1.07 ±0.23 *	0.43 ±0.07
DOPAC	自发释放量 (pmol/L)	6.86 ±0.73	4.61 ±0.73 *	—	2.99 ±0.36 **	3.61 ±0.33 **
	含量 (pg)	0.08 ±0.01	0.09 ±0.01	0.13 ±0.02 *	0.11 ±0.01	0.07 ±0.01
HVA	自发释放量 (pmol/L)	6.03 ±0.52	5.70 ±0.71	—	6.76 ±2.01	7.29 ±1.68

与正常对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 炎症过程中 5 - HIAA 的变化

关节炎大鼠脊髓 5 - HIAA 含量于 3~5 周明显升高 ($P < 0.05$),至 9 周时降至正常以下。其释放量于致炎后第 5 周明显降低 ($P < 0.05$),表 1。

2.3 炎症过程中 DA 及代谢产物 DOPAC、HVA 的变化

关节炎大鼠脊髓 DOPAC 含量致炎后 3 周有一过性升高,第 5 周后可见恢复趋势,直至第 9 周。脊髓灌流液中 DOPAC 释放量在炎症 1~9 周期间均明显低于正常。DA 的另一代谢产物 HVA 在整个炎症期间脊髓释放量未见明显改变,表 1。脊髓组织和灌流液样品中 DA 在检测中呈现“全或无”现象,只有约一半样品出现与标准品对应的色谱峰,而其它样品在相同保留时间内未能检测到结果。

3 讨论

脊髓 NE 在针刺镇痛中的作用与吗啡极为相似,即 NE 下行系统在针刺镇痛中也起着重要的作用^[5]。有文献报道,脊髓中释放的 NE 或外源性给予肾上腺素受体激动剂可加强吗啡、芬太尼和 DPDPE 的镇痛作用^[6,7]。本实验结果显示在炎症痛的慢性期,脊髓 NE 的含量降低而释放量增加,此结果与上述理论相符。NE 的变化出现在炎症的后期,提示 NE 作为经典的神经递质在炎症痛过程中并不是参与急性期最主要的化学物质,可能内源性的 NE 主要在机体内源性镇痛过程的后期发挥作用。且 NE 释放并不随痛敏的发展而减少,却随着炎症和痛敏的减轻而增加,提示脊髓 NE 可能反映了机体主动对抗炎症痛的活动,NE 释放的增加意味着炎症痛的缓解。MHPG 是 NE 在中枢神经中的主要代谢终产物,测定脊髓灌流液中 MHPG 的含量可反映脊髓 NE 代谢水平。MHPG 含量在炎症的 1~9 周均明显降低提示在整个炎症期间 NE 降解减少而再摄取增多,从而使递质 NE 更多地参与内源性镇痛过程。

由于痛反应机制的复杂性和 5 - 羟色胺 (5 - HT) 受体的多样性,5 - HT 对痛觉的调节也是复杂的^[5]。5 - HIAA 是中枢神经系统中 5 - HT 最主要的代谢产物,脊髓组织和脊髓灌流液中 5 - HIAA 的变化可间接反映 5 - HT 的变化趋势。本实验结果显示脊髓背部腰膨大 5 - HIAA 含量增高,可能是由于同期释放量减少,造成的短时间积聚。而脊髓 5 - HIAA 在炎症期间的释放减少,推测可能是炎症期间 5 - HT 代谢失活减少,亦或存在其它交互影响作用,尚需进一步实验证实。

DA 神经系统所涉及的生理功能较广泛而重要,包括针刺镇痛与应激镇痛^[5]。本研究发现脊髓组织样品和灌流液中 DA 极不稳定,呈一种“全或无”现象,约有一半样品出现明显的 DA 色谱峰,而其它样品在相同保留时间内只能看到噪音范围内的基线波动,此结果与以往报道^[8]类似,其产生原因除动物之间的个体差异外可能还有其它尚待查明的原因。本实验观察到脊髓 DOPAC 释放量在整个炎症痛的 1~9 周期间呈进行性降低趋势,而脊髓组织 DOPAC 含量未见有明显改变,推测在炎症痛期间脊髓 DA 代谢失活减少,提示 DA 系统参与了疼痛过程,但具体作用机制尚待进一步研究阐明。

参考文献:

[1] 韩济生. 痛觉及其调制神经科学原理[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1999. 706.
[2] S Puig, JP Rivot, JM Besson. Effect of subcutaneous administration of the chemical algogen formalin on 5 - HT metabolism in the nucleus raphe magnus and the medullary dorsal horn: a voltammetric study in freely moving rats[J]. Brain Res,1992, 590 :250 - 254.

- [3] Omote K, Kawamata T, Kawamata M, et al. Formalin - induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system[J]. Brain Res, 1998, 814:194 - 198.
- [4] Reimann W, Schlutz H, Selve N. The antinociceptive effects of morphine, desipramine and serotonin and their combinations after intrathecal injection in the rat[J]. Anesthesia and Analgesia, 1999, 88:141 - 145.
- [5] 韩济生. 经典神经递质和神经肽及其受体——经科学纲要[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1999. 455.
- [6] Yang SW, Chen JY, Dafny N. Adenosine and opiate - like substances mediate antinociception at the spinal cord[J]. Brain Res, 1995, 673:170 - 174.
- [7] Meert TF, Dekock M. Potentiation of the analgesic properties of fentanyl - like opioids with alpha(z) - adrenoceptor agonists in rats[J]. Anesthesiology, 1994, 81:677 - 688.
- [8] 田津斌, 方明, 刘雪松, 等. 大鼠脑脊液、脊髓灌流液和脊髓背部单胺类递质及代谢产物的含量比较[J]. 北京医科大学学报, 1998, 30:5 - 8.

(责任编辑:任义芳)

Changes of Spinal Monoamine Transmitter and Their Metabolites in Rats with Adjuvant Monoarthritis

JIANG Yuan-xu¹, WANG Yun², FANG Ming², et al

(1. Dept. of Pharmacology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004;

(2. Neuroscience Research Center, Beijing Medical University, Beijing 100083)

Abstract: Objective To explore law of monoamine transmitters and their metabolites in the model rats of adjuvant - induced monoarthritis. Methods Monoarthritic rat model was produced by injecting water - in - oil complete Freund adjuvant (CFA) into the right tibio - tarsal joint, and then monoamine transmitters and their metabolites in the spinal cord before and during 1 - 9 weeks of CFA injection were measured by reversed - phase high performance liquid chromatography. Results (1) The release of NE from spinal perfusate were increased in arthritic rats 5 weeks after inoculation, and the content of NE in dorsal spinal cord were decreased at the same period, while MHPG showed a significant reduction from 1 - 9 weeks. (2) The spontaneous release of 5 - HIAA was decreased at 5 weeks after injection of CFA. At the same time, the content of 5 - HIAA in dorsal spinal cord showed a opposite changes. (3) During the period of inflammatory pain, the release of DOPAC decreased markedly, but its content had a little change. The release of HVA had not any change. Conclusion Spinal monoamine transmitter and their metabolites take part in the action of endogenous antinociception in adjuvant - induced monoarthritic inflammatory pain.

Key words: adjuvant monoarthritis; spinal cord; monoamine transmitter; metabolites

(上接第 339 页)

Alteration of Intermedin Receptors in Rat with Acute Heart Failure

JIA Yue-xia¹, LI Gui-zhong¹, YANG Jing-hui², et al

(1. Dept. of Pathophysiology, Ningxia Medical College, Yinchuan 750004;

2. Institute of Cardiovascular Research, Peking University First Hospital, Beijing 100083)

Abstract: Objective To investigate the alteration of functional receptors for intermedin in acute myocardial injury induced by isoproterenol (ISO) in rats. Methods Myocardial ischemia injury in rats was induced by subcutaneous injection with ISO (60 mg/kg/day, 3days), as experimental group, sham operation group as control. Intermedin (IMD) protein levels in ventricular tissues were examined by Western blot analysis. IMD binding sites in myocardial sarcolemma were determined by radioligand assay. Results Rats treated with ISO, histological sections showed severe myocardial ischemic injury. The plasma LDH activity, plasma MDA content and myocardial MDA content were higher than controls (all $P < 0.01$). Heart function decreased greatly and severe heart failure was observed. Western blot analysis revealed that the IDM protein level in ISO - induced rats was 4 - folds lower than that of controls. IMD receptors were up - regulated by 118 % ($P < 0.01$), While the affinity to apelin was decreased (Kd increased by 34 %, $P < 0.05$). Conclusion These results suggest that IDM protein level is down - regulated and the IMD receptor system is up - regulated in ISO - induced myocardial ischemic injury. These changes probably are involved in the development of cardiac injury.

Key words: cardiac failure; rat; Intermedin; myocardium; isoproterenol