[论著]

下丘脑一氧化氮在电针调节吗啡戒断大鼠血清黄体生成素中的作用*

任晓炜 崔彩莲 吴鎏桢** 韩济生
(北京大学神经科学研究所,北京,100083)

摘要 目的:检测电针是否可以促进吗啡戒断大鼠血清黄体生成素(LH)的恢复,并探讨一氧化氮(NO)在这一过程中的作用。方法:在吗啡戒断大鼠模型上,进行2 Hz和100 Hz电针治疗后,用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定大鼠血清LH的含量,用免疫组织化学法观察下丘脑神经元性一氧化氮合酶(nNOS)的表达变化。结果:多次100 Hz电针刺激可以显著增高吗啡戒断大鼠血清LH水平($P < 0.01$)。吗啡戒断状态下,大鼠下丘脑终板血管器官(OVLT)至喙侧视前区(rPOA) nNOS阳性细胞数减少($P < 0.01$, $P < 0.05$)。100 Hz电针治疗一周可使nNOS阳性细胞数恢复至正常水平。结论:多次100 Hz电针可促进吗啡戒断大鼠血清LH的恢复,增强OVLT至rPOA nNOS表达水平,这可能是100 Hz电针促进吗啡戒断大鼠血清LH恢复的机制之一。

关键词 吗啡依赖;吗啡戒断;黄体生成素;电针;神经元性一氧化氮合酶

ROLES OF HYPOTHALAMIC NITRIC OXIDE IN REGULATING SERUM LUTEINIZING HORMONE BY ELECTROACUPUNCTURE IN MORPHINE WITHDRAWAL RATS

REN Xiaowei, CUI Cailian, WU Liuzhen, HAN Jisheng
(Neuroscience Research Institute, Peking University, Beijing, 100083)

ABSTRACT *Objective*: To elucidate whether electroacupuncture (EA) could increase serum luteinizing hormone (LH) levels in morphine withdrawal rats, and the role of nitric oxide (NO) in this event. *Methods*: Rats were made dependent on morphine by multiple injections of morphine. After the rats were given repeated EA, ELISA was used to measure serum LH of the rats, and immunohistochemistry was used to detect the protein expression of neuronal nitric oxide syntheses (nNOS) in organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) and rostral preoptic area (rPOA). *Results*: Multiple 100 Hz EA stimulations significantly increased serum LH levels in morphine withdrawal rats to a higher - than - normal level on the fourth day of EA treatment. Chronic treatment with morphine produced a decrease in the number of nNOS - positive cells in OVLT and rPOA in the rats. This suppressive effect of morphine was significantly reversed by multiple EA. *Conclusion*: Multiple 100 Hz EA can increase serum LH concentrations of the morphine withdrawal rats. The effect of 100 Hz EA is mediated, at least partly by NO in OVLT and rPOA.

KEY WORDS morphine dependent/withdrawal; luteinizing hormone; electroacupuncture; neuronal nitric oxide syntheses

临床及动物实验资料均显示,阿片成瘾者及吗啡依赖大鼠血清黄体生成素(luteinizing hormone, LH)及性激素水平降低,并伴有性欲下降或缺失[1,2]。2/100 Hz经皮电刺激可明显改善海洛因成瘾者的性机能障碍,显著升高其血清LH和睾丸酮(testosterone, T)的水平[3]。动物实验亦证实2/100 Hz电针(electroacupuncture, EA)可以促进吗啡戒断大鼠血清T的恢复,并促进大鼠吗啡戒断后性功能的恢复(待发表资料)。但其机制尚不清楚。

LH分泌的调节是一个非常复杂的过程。它主要受到促黄体生成素释放激素(luteinizing hormone -

* 国家自然科学基金资助(399707132)。
** 通讯作者:E - mail: lzwu @bjmu. edu. cn

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

releasing hormone, LHRH)的调控。另外体内还有多种神经递质也参与调节LHRH的分泌。其中一氧化氮(nitric oxide, NO)是参与此调节过程的重要物质之一,离体及在体实验均发现,NO可以刺激LHRH和LH的释放[4-6]。本工作主要目的是在验证电针是否可以促进吗啡戒断大鼠LH恢复的基础上,观察电针对大鼠下丘脑神经元性一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide syntheses, nNOS)表达的影响,推测NO在电针调节吗啡戒断大鼠血清LH中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

成年♂SD大鼠,起始体重250 g,由北京大学医学部实验动物部提供。大鼠随机分为两组:吗啡组和生理盐水组。吗啡组大鼠连续腹腔注射(ip)吗啡10 d,每天2次(8:00、20:00),剂量逐日递增,分别为10、20、20、40、40、80、80、100、100、和120 mg·kg^{-1},生理盐水组注射同体积生理盐水。将吗啡处理组大鼠随机分为5组:吗啡依赖组(最后一次注射吗啡后3 h),自然戒断组(natural withdrawal, NW),NW + 束缚组(restrain, RES),NW + 2 Hz电针组和NW + 100 Hz电针组,每组8 - 9只。电针治疗为7 d,前3 d每日两次(8:00,20:00),后4 d每日一次(12:30)。

1.2 药品和仪器

盐酸吗啡(青海制药厂,批号:010202)。518B7 anti - bLHβ亚单位(Jan Roser博士,动物科学系,加利福尼亚州大学,戴维斯,加州,USA)。rLH - RP - 3和抗 - rLH - S - 11(美国国家激素和垂体项目,NHPP,美国国家糖尿病、消化系统病和肾病研究所,NIDDK)。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(北京中山生物技术有限公司)。96孔酶标板(Coastar公司)。nNOS抗体(北京中山生物技术有限公司)。DAB(Sigma公司)。恒冷式冰冻切片机(Leica Jung CM 1800)。LH800韩氏穴位神经刺激仪(北京航空航天大学),简称HANS。

1.3 方法

1.3.1 电针　末次注射吗啡后24 h按下述方法进行电针治疗:将大鼠固定(即束缚)于特制的塑料套筒内,双后肢及尾部自然地露在筒外,将两对直径为0.25 mm的不锈钢针灸针插入大鼠双侧"足三里"(St36,胫骨前结节外侧5 mm)和"三阴交"(SP6,胫骨后1 mm,内踝上3 mm)部位。采用LH800韩氏穴位神经刺激仪进行电刺激。频率分别为2 Hz、100 Hz;方波刺激的波宽在2 Hz时为0.6 ms,在100 Hz时为0.2 ms;刺激强度按0.5 mA - 1 mA - 1.5 mA递增,每一强度持续10 min,共刺激30 min。

1.3.2 ELISA测定大鼠血清LH的含量　分别于大鼠吗啡依赖期(末次吗啡注射后3 h)、戒断期(末次吗啡注射后24 h)、电针4 d和7 d断尾或断头取血1.5 - 2 ml,取血清,- 70 ℃保存待测。

将一抗(518B7 anti - bLHβ subunit)溶于包板缓冲液(0.05 mol·L^{-1}碳酸氢盐缓冲液,pH 9.6)中,浓度为5 μg·ml^{-1},加入96孔板,每孔100 μl,37 ℃过夜;用洗板缓冲液(PBS - 0.05 %Tween - 20)洗板4次,每孔加入250 μl封闭缓冲液(10 %胎牛血清,pH 7.4 - 7.6),4 ℃过夜;洗板3次,配制10个不同浓度的标准品溶液:2000;1000;500;100;50;10;5;2.5;1;0 pg/孔,加入10个孔内,每孔100 μl。其它孔则先加50 μl分析液(PBS - 1 %BSA),然后加血清检测样品50 μl,4 ℃孵育16 - 24 h;洗板6次,每孔加1∶4000的二抗(anti - rLH - S - 11)100 μl,4 ℃孵育16 - 24 h;洗板6次,每孔加1∶5000的三抗(anti - rabbit IgG peroxidase conjugate)100 μl,室温孵育4 h;洗板6次,TMB避光室温显色约30 min后每孔加50 μl终止液(1 mol·L^{-1} H_2SO_4)终止反应;用酶标仪450 nm波长读板。

1.3.3 免疫组织化学法　将吗啡依赖、戒断以及电针治疗7 d的大鼠经多聚甲醛灌注固定后分离全脑,冰冻切片,厚度25 μm,冷风吹干,- 70 ℃保存待免疫组化染色。主要观察下丘脑终板血管器官(organum vasculosum of the lamina terminalis, OVLT)至喙侧视前区(rostral preoptic area rPOA)区域的nNOS下表达。

染色前将切片取出,室温晾干,PBS水化10 min;用3 % H_2O_2甲醇溶液室温下放置20 min,消除内源性过氧化物酶;蒸馏水冲洗,PBS浸泡5 min;将切片放入盛有0.1 mol·L^{-1} pH 60的枸橼酸缓冲液(修复液)修复盒内,至微波炉中修复。修复完毕后取出修复盒,室温冷却10分钟;PBS洗片;Histostain (tm) - SP Kit封闭,室温孵育1 h,倾去封闭液;一抗(1∶200)稀释,室温下过夜;PBS洗片;二抗孵育:Histostain(tm) - SP Kit室温1 h;PBS洗片;SA - HRP Histostain(tm) - SP Kit,室温孵育1 h;PBS洗片;0.1 mol·L^{-1}醋酸缓冲液孵育3 min,倾去;DAB - 硫酸镍铵醋酸缓冲液孵育3 min,倾去;滴加含1 % H_2O_2 DAB - 硫酸镍铵醋酸缓冲液,避光显色5 min。自来水反复冲洗,脱水,透明,中性树脂封片,光镜下读片。

1.4 数据处理及统计学检验

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

切片位置的确定依靠第三脑室,前连合和视交叉三个解剖学标志来确定。数码相机拍照,图像用 Scion Image(一种基于 NIH Image 的图像分析软件)进行分析,与背景相比有明显边界,核区无染色的黑紫色颗粒确定为阳性细胞。每只大鼠计数 6 - 8 张切片,每组 3 - 5 只大鼠。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad 软件公司 Prism 3.0 统计软件进行统计学处理和绘图。两组数据间比较采用 t 检验,多组数据间比较采用单因素方差分析进行统计。以 $P < 0.05$ 作为有统计学差异的界限。

2 结果

2.1 多次 2 Hz 和 100 Hz 电针对吗啡戒断大鼠血清 LH 含量的影响

图 1 所示为电针 4 d 大鼠血清 LH 的含量。与生理盐水对照组相比,吗啡自然戒断、束缚及 2 Hz 电针对戒断大鼠血清 LH 含量均无显著影响;仅 100 Hz 电针使戒断大鼠血清 LH 含量显著增高,与吗啡自然戒断组和生理盐水对照组比较,$P < 0.01$。d7 100 Hz 电针使戒断大鼠血清 LH 含量仅有增加趋势,但无统计学差异($P > 0.05$)。

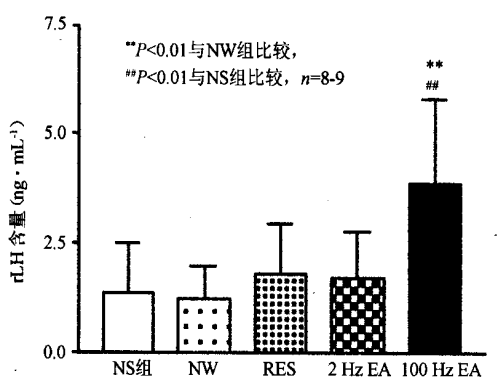

图 1 电针 4 d 对吗啡戒断大鼠血清黄体生成素的影响

2.2 吗啡依赖和戒断大鼠下丘脑 OVLT 和 rPOA nNOS 表达的变化及多次电针的调节作用

2.2.1 吗啡依赖和戒断大鼠下丘脑 OVLT 和 rPOA nNOS 表达的变化 与生理盐水组相比,吗啡依赖大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数显著降低($P < 0.01$)。吗啡戒断时大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数与依赖期相比有所升高($P < 0.05$),但仍显著低于生理盐水组($P < 0.05$),见图 2。

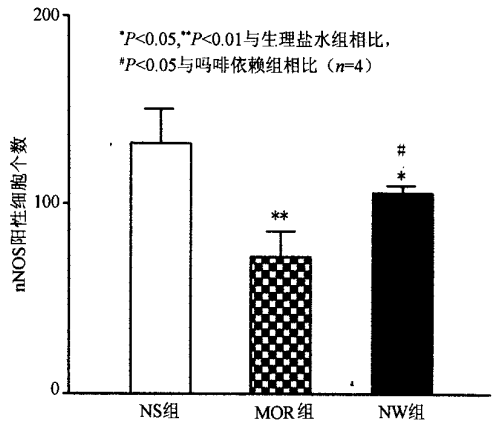

图 2 吗啡依赖和戒断大鼠下丘脑 OVLT 和 rPOA nNOS 表达的变化

2.2.2 多次 2 Hz 和 100 Hz 电针对吗啡戒断大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 表达的影响 结果如图 3 所示,单纯束缚组对吗啡自然戒断组大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数无明显影响;2 Hz 电针组大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数与单纯吗啡自然戒断大鼠相比有所恢复,但无统计学差异($P > 0.05$);100 Hz 电针可使吗啡自然戒断组大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数显著增多($P < 0.05$)。

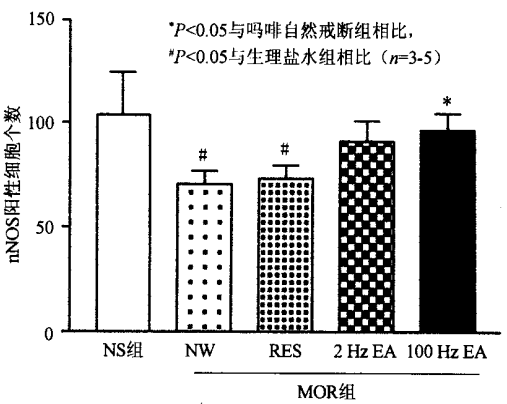

图 3 电针 7 d 后吗啡戒断大鼠下丘脑 OVLT 和 rPOA nNOS 表达的变化

3 讨论

许多研究已证实,吗啡可抑制下丘脑 - 垂体 - 性腺轴的功能。我们以往临床研究也表明,HANS 戒毒仪可以促进海洛因成瘾者血清 LH 的恢复。因此我们设计动物实验来验证这一现象。结果显示,连续 4 d 给予 100 Hz 电针后,吗啡戒断大鼠血清 LH 明显增高,这与临床结果相一致[3],也证实了我们实验前的假设。至于 100 Hz 电针的作用优于 2 Hz 电针,结合我们早期的研究工作做如下解释:吗啡依赖大鼠戒断初期表现出很明显的戒断症状以及显著的

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

体重丢失,而 100 Hz 电针能迅速有效地抑制大鼠戒断症状和戒断引起的体重丢失[7],使其平稳地渡过急性戒断期,不致过分消耗,这对于下丘脑 - 垂体 - 性腺轴功能的尽快恢复具有重要意义。所以这可能是 100 Hz 较 2 Hz 表现出较强促进血清 LH 增加的原因之一。

近来的研究表明,一氧化氮可以通过作用于下丘脑 LHRH 神经元调节 LHRH 或直接作用于垂体前叶细胞调节 LH 的分泌。将 NOS 抑制剂微量注射入去势 ♂大鼠第三脑室,注射后 20 min 时 LH 脉冲式分泌被阻断,60 min 时血清 LH 浓度进一步降低[4]。在 NO 慢性缺乏的条件下,免疫组织化学法测定显示,正中隆起处 LHRH 显著减少,并伴有 LH 释放的减少[5]。在体内 NO 是由 NOS 催化产生的。此酶在氧和几个辅助因子的协助下将精氨酸转化成等摩尔数的胍氨酸和 NO。NOS 有三种同工酶,nNOS,诱导性 NOS 和内皮性 NOS。分布于下丘脑的主要是 nNOS,主要分布在 OVLT,下丘脑内侧视前区,内侧视前核,而这些部位也是 LHRH 神经元聚集的脑区。目前没有资料显示 LHRH 神经元与 NOS 共存,但在这些部位 NOS 神经元是环绕 LHRH 神经元存在的。虽然 LHRH 神经元并不表达 NOS,但它们在解剖位置上如此接近也为 NO 调节 LHRH 分泌提供基础[8]。所以本工作在验证了电针可以促进吗啡戒断大鼠血清 LH 恢复后(见结果 2.1),观察电针后相关脑区的 nNOS 的表达变化,以探讨 NO 是否参与电针对 LH 的调节。

本实验表明,吗啡依赖大鼠下丘脑 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数显著减少。停用吗啡后 24 h 即吗啡戒断状态下大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数与依赖期相比有所增加,但仍低于正常对照组。这与相关文献报道的结果是一致的,即吗啡依赖引起下丘脑 nNOS 免疫活性降低,给予纳洛酮催促戒断后则可使下丘脑 nNOS 免疫活性有所增加[9]。这可能是由于吗啡与 NO 能神经元上的 μ 受体结合抑制 NO 分泌,从而抑制 LH 的分泌[10]。电针治疗一周后可以促进吗啡戒断大鼠 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数的恢复。下丘脑 OVLT 和 rPOA nNOS 阳性细胞数的增多,提示这两个部位的 NO 分泌在电针治疗后也会有所增加。故而,NO 可能是电针促进血清 LH 恢复的原因之一。当然,要验证这个推测还需要直接证据:(1) 测定电针后下丘脑 OVLT 和 rPOA 处 NOS 催化产生 NO 时另一种代谢产物胍氨酸的变化,从而估测 NOS 的活性是否增加,可间接反映 NO 的释放量是否增加[7];(2) 核团局部给予 NOS 的抑制剂后电针是否仍然可以促进血清 LH 增高。

4 参考文献

1 Cushman P Jr. Sexusal behavior in herion addiction and methadone maintenance[J]. NY State J Med, 1972, 72: 1261 - 1265

2 Adams ML, Sewing B, Forman JB, et al. Opioid - induced suppression of rat testicular function[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1993, 266(1): 323 - 328

3 吴鎏桢,崔彩莲,韩济生. 2/100 Hz 跨皮肤电刺激对男性海洛因成瘾者性机能障碍及血清性激素水平的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(1): 15 - 18

4 Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS, et al. Evidence in support of nitric oxide (NO) involvement in the cyclic release of prolactin and LH surges[J]. Brain Res, 1994, 660(1): 175 - 179

5 Barnes MJ, Lapanowski K, Rafols JA, et al. GnRH and gonadotropin release is decreased in chronic nitric oxide deficiency[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2001, 226(7): 701 - 706

6 McCann SM, Kimura M, Walczewska A, et al. Hypothalamic control of FSH and LH by FSH - RF, LHRH, cytokines, leptin and nitric oxide[J]. Neuroimmunomodulation, 1998, 5(3 - 4): 193 - 202

7 Wu LZ, Cui CL, Tian JB, et al. Suppression of morphine withdrawal by electroacupuncture in rats: dynorphin and kappa - opioid receptor implicated[J]. Brain Res, 1999, 851(1 - 2): 290 - 296

8 Bhat GK, Mahesh VB, Lamar CA, et al. Histochemical localization of nitric oxide neurons in the hypothalamus: association with gonadotropin - releasing hormone neurons and co - localization with N - methyl - D - aspartate receptors[J]. Neuroendocrinology, 1995, 62(2): 187 - 197

9 Uzbay IT, Oglesby MW. Nitric oxide and substance dependence[J]. Neurosci Biobehav Rev, 2001, (25): 43 - 52

10 Faletti AG, Mastronardi CA, Lomniczi A, et al. Beta - endorphin blocks luteinizing hormone - releasing hormone release by inhibiting the nitricoxidergic pathway controlling its release[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(4): 1722 - 1726

收稿日期:2003 - 09 - 03　修回日期:2004 - 01 - 11

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.