

· 实验研究 ·

针刺神门穴及命门穴对大鼠中缝背核 5-羟色胺和 5-羟吲哚乙酸含量的影响

王 慧^{1*} 王 旭² 唐丹凌² 白丽敏²

(1 贵阳中医学院基础部, 贵州省贵阳市市东路 50 号, 550002; 2 北京中医药大学基础医学院科研实验中心)

基金项目: 贵州省自然科学基金资助项目(黔科合 J 字[2008] 2173)

通讯作者: wanghsy@126.com, (0851) 5606147

[摘 要] 目的 研究针刺神门和命门穴后大鼠中缝背核 5-羟色胺(5-HT) 和 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA) 含量变化, 探讨针刺治疗失眠症的作用机制。方法 将 SD 雄性大鼠 18 只随机分为对照组、针刺神门组、针刺命门组各 6 只, 采用立体定位法将微透析探针置入大鼠中缝背核, 运用微透析法收集大鼠针刺前 40min, 针刺后 20、40、60、80、100、120min 中缝背核细胞外液, 用高效液相—电化学法(HPLC-ED) 检测其 5-HT 和 5-HIAA 含量的变化。结果 与针刺前相比, 针刺大鼠神门和命门穴 20min 后中缝背核 5-HT 的水平显著下降($P < 0.01$), 在其后 2h 维持在低水平; 与对照组相比, 大鼠针刺后 2h 各时相点中缝背核 5-HT 的水平也显著下降($P < 0.01$)。与针刺前的基础值及与对照组相比, 针刺神门和命门穴均显著降低中缝背核 5-HIAA 含量($P < 0.01$)。结论 针刺神门和命门穴能通过调节中缝背核组织中 5-HT 和 5-HIAA 含量从而起到调节睡眠的作用。

[关键词] 针刺; 脑微透析; 中缝背核; 5-羟色胺; 5-羟吲哚乙酸

Effect of Acupuncture at Shenmen (HT 7) and Mingmen (GV 4) on the Contents of 5-HT and 5-HIAA of the Dorsal Raphe Nucleus of Rats

WANG Hui¹, WANG Xu², TANG Huiling², BAI Limin²

(1. Department of Preclinical Medicine, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002; 2. College of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the changes in the contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) of the dorsal raphe nucleus (DRN) of rats after acupuncture at Shenmen (HT 7) and Mingmen (GV 4) to discuss the mechanism of acupuncture treatment for insomnia. **Methods** Eighteen SD male rats were randomized into control group, acupuncture Shenmen (HT 7) group and acupuncture Mingmen (GV 4) group, with 6 in each. A microdialyzer probe was placed into the DRN with stereotaxic technique. The extracellular fluid of DRN 40min before acupuncture and 20, 40, 60, 80, 100, and 120min after acupuncture was collected by microdialysis, and the changes in 5-HT and 5-HIAA contents were determined with high performance liquid chromatography - electrochemical detection (HPLC-ED). **Results** Compared with before acupuncture, the content of 5-HT of DRN was significantly decreased 20min after acupuncture at Shenmen (HT 7) and Mingmen (GV 4) ($P < 0.01$), and thereafter it remained low within 2 hours. Compared with the control group, the content of 5-HT of acupuncture groups 2h after acupuncture at each time point was also significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the basic value before acupuncture and with the control group, acupuncture at Shenmen (HT 7) and Mingmen (GV 4) both could decrease the content of 5-HIAA of DRN ($P < 0.05$). **Conclusion** Acupuncture at Shenmen (HT 7) and Mingmen (GV 4) functions to regulate sleep through regulating the contents of 5-HT and 5-HIAA in the tissues of DRN.

Key Words acupuncture; cerebral microdialysis; dorsal raphe nucleus (DRN); 5-hydroxytryptamine (5-HT); 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)

针刺治疗失眠症具有显著的疗效^[1]。5-羟色胺(5-HT)作为重要的神经递质在睡眠的调节过程中起着重要的作用^[2], 其参与针刺调节睡眠的作用研究较少。神门穴为手少阴心经主穴, 具有宁心安神、

通经活络的作用, 主治与“心”有关的病症。命门穴属督脉要穴, 具有温益肾阳、舒筋镇痉作用。为探讨针刺调节睡眠活动的机理, 了解不同经穴作用的差异, 本实验利用微透析技术研究针刺神门穴及命门

穴后中缝背核5-HT和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)的动态变化,比较针刺不同经穴5-HT及其代谢产物5-HIAA含量变化的差异,为其临床运用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠18只,体重(160±20)g,由北京维通利华动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2006-0009。

1.2 仪器与器具

脑立体定位仪(美国ASI仪器公司生产);色谱仪(1100LC型,美国Agilent公司生产);色谱泵(G1311A型,美国Agilent公司生产);色谱柱:HPLC Column C18(2.1mm×100mm, 3μm, 德国SYKAM公司生产);电化学检测器(DECADE II SDC型,荷兰ANTEC公司生产),铂金电极,动物微透析系统(美国BAS公司生产);微透析管(Microdialysis Probe, 瑞典CMA公司生产),微透析灌注泵(Baby Bee, 美国BAS公司生产)。针具:0.4mm×25mm环球牌无菌针灸针。

1.3 药品与试剂

5-HT和5-HIAA标准品购自Sigma公司。色谱级甲醇(Fisher)、磷酸二氢钠、辛烷磺酸钠、乙二胺四乙酸、氯化钾均为分析纯。实验用水为超纯水。

1.4 动物分组及针刺方法

雄性SD大鼠18只,采用随机数字表法分为3组,对照组、针刺神门组、针刺命门组,每组6只。根据《实验针灸学》^[3],并以比较解剖和骨度分寸法取穴,用0.4mm×25mm规格毫针,针刺神门穴,直刺约1mm;命门穴,直刺约5~6mm;持续20min。

1.5 微透析管的埋置和微透析液的收集

动物用20%氨基甲酸乙酯(1g/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位固定。用颅骨钻钻开直径为2mm的颅窗,仔细挑破硬脑膜,按照Paxinos和Watson大鼠脑立体定位图谱,将微透析管插入中缝背核(AP: -7.3mm, L/R: 0mm, H: 6.4mm)。用Ringer液以2L/min的速度灌注,每20min收集透析液40μl。微透析管置入60min后正式收集微透析液,以取得稳定的基础值。针刺前40min收集2次作为对照,然后收集针刺结束后20、40、60、80、100、120min各时相点的透析液,用于测定5-HT和5-HIAA的含量。样本收集器的温度设定为4℃。收集完毕后的微透析液样品置于-80℃冰箱保存。

1.6 5-HT和5-HIAA测定

利用1100LC型高效液相色谱仪系统测定透析液

中5-HT和5-HIAA。流动相:磷酸二氢钠:100mM,辛烷磺酸钠:0.74mM,乙二胺四乙酸:0.027mM,氯化钾:8mM,甲醇10%,流速0.2ml/min。

1.7 探针回收率的测定

将探针置入0.34ng/μl的混合对照品液中,与脑内微透析相同的灌注液、流速和间隔时间收集体外透析液,并按前述色谱条件进行测定,计算各物质的相对回收率分别为5-HT:11.99%,5-HIAA:11.60%。

1.8 组织学鉴定

实验结束后,用外径为0.3mm的单极不锈钢电极插入引导管通以3mA阳极直流电10s电损毁大鼠中缝背核,取脑置于4%多聚甲醛溶液,2天后做脑组织切片,观察引导管轨迹顶部是否位于中缝背核,仅对定位准确的大鼠实验数据进行统计。

1.9 统计学方法

采用SPSS 17.0统计分析软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠中缝背核5-HT含量比较

表1示,针刺神门穴和命门穴后20min,中缝背核5-HT含量明显下降,与对照组相比,针刺后各时相点之间5-HT含量差异有统计学意义($P < 0.01$)。与针刺前相比,针刺神门穴和命门穴后20min,5-HT水平显著下降($P < 0.01$),在其后的2h维持在低水平,针刺神门穴与命门穴所引起的中缝背核5-HT含量变化之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示针刺神门穴和命门穴能降低中缝背核5-HT含量,且持续时间长于2h。

2.2 各组大鼠中缝背核5-HIAA含量比较

表2示,与对照相比,针刺神门穴明显降低中缝背核5-HIAA的含量($P < 0.01$)出现在针刺后20min,持续至针刺后120min。而针刺命门穴明显降低中缝背核5-HIAA的含量($P < 0.01$)出现在针刺后60min,并持续至针刺后120min。与针刺前相比,针刺神门和命门穴均显著降低中缝背核5-HIAA含量($P < 0.01$),但针刺神门穴降低中缝背核5-HIAA的含量要先出现于命门穴,针刺神门和命门穴降低中缝背核5-HIAA含量的效应均持续至针刺后2h。针刺神门穴与命门穴所引起的中缝背核5-HIAA含量变化之间差异无统计学意义。提示针刺神门穴与命门穴均能降低中缝背核5-羟色胺的代谢产物5-HIAA的含量,针刺神门穴该效应出现时间较命门穴快。

表 1 各组大鼠针刺前后不同时间点中缝背核 5-HT 含量比较(pg/μl, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	针刺前	针刺后 20min	针刺后 40min	针刺后 60min	针刺后 80min	针刺后 100min	针刺后 120min
对照组	6	1.2±0.60	0.87±0.33	0.76±0.31	0.80±0.37	0.81±0.39	0.81±0.33	0.79±0.32
针刺神门组	6	1.0±0.50	0.05±0.04 ^{*△}	0.03±0.02 ^{*△}	0.04±0.02 ^{*△}	0.05±0.05 ^{*△}	0.06±0.04 ^{*△}	0.05±0.05 ^{*△}
针刺命门组	6	0.9±0.41	0.06±0.02 ^{*△}	0.06±0.02 ^{*△}	0.05±0.03 ^{*△}	0.03±0.02 ^{*△}	0.04±0.02 ^{*△}	0.04±0.01 ^{*△}

注:与对照组同时时间点比较, * $P<0.01$;与本组针刺前比较, $\Delta P<0.01$

表 2 各组大鼠针刺前后不同时间点中缝背核 5-HIAA 含量比较(pg/μl, $\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	针刺前	针刺后 20min	针刺后 40min	针刺后 60min	针刺后 80min	针刺后 100min	针刺后 120min
对照组	6	75.10±18.90	71.20±19.72	71.10±20.12	72.00±21.44	71.99±22.99	71.33±23.43	68.49±22.13
针刺神门组	6	59.65±28.48	29.83 [±]	27.75±19.30 ^{*△}	19.24±18.58 ^{*△}	26.58±23.71 ^{*△}	23.49±16.37 ^{*△}	23.31±21.49 ^{*△}
针刺命门组	6	69.20±13.80	55.7±28.59	50.50±25.52 [△]	39.92±22.01 ^{*△}	31.25±21.50 ^{*△}	36.87±19.07 ^{*△}	37.54±18.77 ^{*△}

注:与对照组同时时间点比较, * $P<0.01$;与本组针刺前比较, $\Delta P<0.01$

3 讨论

针刺治疗失眠的关键在于调节阴阳,疏通经络。针刺神门具有宁心安神、通经活络的作用,是临床常用的治疗失眠症的穴位;命门为先天之太极,是人体精、气、神的根源,为五脏六腑之本,十二经脉之根,呼吸之门,三焦之原,水火之府,阴阳之宅,精气之海,死生之窦,其功能位于十二官之上^[4]。命门穴属督脉,督脉因其“总督诸阳”,具有整体调整作用而多被使用。对于针刺作用的中枢机制,采用分析脑匀浆或脑脊液中生化物质的含量来进行,不能直接反映活体细胞外液中生化物质的动态变化,限制了对脑细胞直接生存的微环境的研究。微透析技术的发展使研究脑内神经递质的作用成为可能^[5],该技术将灌注取样和透析技术结合,适合深部组织和重要器官的生化研究。

5-HT 是一种重要的神经递质,在睡眠调节中起到重要作用,中枢神经系统的 5-HT 能神经元胞体大部分位于网状结构的中缝核群,其纤维投射到丘脑、下丘脑、海马、基底神经节和大脑皮层。中缝核是中枢神经系统中富含 5-HT 能神经元的一个重要核团,只有少量的 5-HT 神经元分布在中缝核以外的区域,如脚间核、蓝斑的周围区等。刺激中缝核引起运动和皮层唤醒^[6]。本研究结果显示,针刺神门及命门穴,可明显降低大鼠中缝背核细胞外液中 5-HT 含量,提示针刺神门及命门穴可能部分是通过改变中缝背核细胞外液中 5-HT 含量从而起到治疗失眠的作用。

本研究还发现针刺神门及命门穴也明显降低中缝背核 5-HIAA 的含量。5-HIAA 是 5-HT 生成的无活性的酸性代谢终产物,是脑内 5-HT 的主要代谢途径。5-HT 经 A 型单胺氧化酶(MAO)作用生

成 5-羟吲哚乙醛,后者在醛脱氢酶的催化下生成 5-HIAA。本研究测得的 5-HT 比其代谢产物 5-HIAA 低得多,这种细胞外液中单胺递质与其代谢产物的比率,反映了活体对该神经递质的灭活与再摄取能力。由于释放入突触间隙的 5-HT 被重新摄取进入突触末梢后,一部分被囊泡摄取以备再释放,另一部分被胞浆内 MAO 降解后再释放,若胞内 MAO 性增高,则会出现虽然 5-HT 神经元兴奋性升高,但 5-HT 释放并不增加,而 5-HIAA 增高。因此 5-HIAA 的变化也可间接反映 5-HT 的变化。5-HT 的作用表现与其受体的类型和剂量有关,鉴于 5-HT 作用机制的复杂性,5-HT 受体和受体亚型各自有不同的作用,因此,针刺后 5-HT 含量变化与受体之间的关系有待进一步探讨。

本研究结果表明,针刺大鼠神门穴及命门穴,可以降低中缝背核 5-HT 含量,同时也降低其代谢产物 5-HIAA 的含量,提示针刺以上穴位可通过改变脑内神经递质含量从而改变大脑皮质的兴奋性。

参考文献

[1] 王鸿雁. 针刺神门为主治疗失眠 100 例疗效观察[J]. 针灸临床杂志, 2001, 17(3): 41-42.
[2] 李国彰. 神经生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 334-335.
[3] 郭义. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 417.
[4] 张家玮. 命门功用探究(上)[J]. 江苏中医药, 2002, 23(2): 15-17.
[5] 刘明芳, 东贵荣, 阎成海. 微透析技术及其在中医药研究中的应用[J]. 中医药信息杂志, 2007, 24(4): 1-3.
[6] Carlson NR 著, 苏彦捷等译. 生理心理学[M]. 2 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 181.

(收稿日期: 2010-10-09; 修回日期: 2011-03-04)

[编辑: 行之]