

# 异槲皮甙提高大鼠脑内 cGMP 水平并加强电针镇痛

邱学才 张 鉴 王 元 韩济生 贺师鹏\* 魏莫愁\*

(北京医科大学生理教研室; \*北京医科大学生物物理教研室)

**提要** 在本工作中我们发现, 给大鼠侧脑室注射一种分解 cGMP 的磷酸二酯酶(cGPDE)抑制剂异槲皮甙可使大鼠间脑和低位脑中 cGMP 水平明显提高; 同时还观察到端脑、间脑和脑干等三个脑区中 cAMP 含量普遍下降。脑室注射异槲皮甙 20, 40, 80  $\mu\text{g}$ , 引起与剂量相关的镇痛作用。脑室注射异槲皮甙 20  $\mu\text{g}$  本身只有微弱镇痛作用, 但可明显加强电针的镇痛效果。另外, 凡异槲皮甙引起明显镇痛的大鼠, 电针时也有良好的镇痛作用, 两者间呈正相关关系。以上结果说明脑内 cGMP 在传递电针镇痛中起重要作用。

**关键词** 环磷酸鸟苷; 异槲皮甙; 电针镇痛

中枢 cGMP 能产生镇痛<sup>(1)</sup>并参与针刺的镇痛过程<sup>(2)</sup>。通过大鼠侧脑室注射方法<sup>(2,3)</sup>或脊髓蛛网膜下腔注射方法<sup>(4)</sup>, 增加中枢外源性 cAMP 可明显拮抗电针镇痛和吗啡镇痛的效应, 相反, 增加中枢外源性 cGMP 则加强电针镇痛和吗啡镇痛效应。另外, 通过埋植瘘管向大鼠髓核内注射微量 cGMP 或其衍生物 dbcGMP 亦能加强电针镇痛, 并可延缓电针耐受的发展<sup>(5)</sup>。黄酮类化合物对磷酸二酯酶(PDE)有抑制作用, 其中异槲皮甙是 cGPDE 的抑制剂<sup>(6)</sup>, 可抑制脑内 cGMP 的降解。因此本工作选用异槲皮甙(isoquercitrin)给大鼠作侧脑室注射, 试图提高脑内 cGMP 含量, 观察异槲皮甙本身对痛阈的影响和对电针镇痛的影响。

## 材 料 与 方 法

实验用 180~200 g 的大鼠, 雌雄皆有, 于水合氯醛麻醉下经立体定位仪埋植外径为 0.8 mm 不锈钢侧脑室瘘管, 术后 3~4 天进行实验。实验时用一外径为 0.3 mm 的注射管插入瘘管内, 由微量注射器缓慢推入不同剂量的 cGPDE 抑制剂异槲皮甙溶液 15  $\mu\text{l}$ , 2 min 内注射完毕。分析纯的异槲皮甙( $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ )是由植物问荆中提取的黄酮类化合物, 其水溶性较差, 故实验时先用 0.5% 的二甲基亚砜 20  $\mu\text{l}$  助溶, 然后按要求加入一定体积的人工脑脊液(CSF), 使 15  $\mu\text{l}$  中分别含异槲皮甙 20, 40, 80  $\mu\text{g}$ 。对照组中所用的 CSF 内也含等量的二甲基亚砜。

痛阈的测定是将大鼠装入特制的固定笼内, 用辐射热一甩尾法进行测痛<sup>(7)</sup>。先测定基础痛阈, 然后脑室注射不同剂量的药物或 CSF, 每隔 10 min 测痛一次, 共测 6 次。将测得的痛阈与基础痛阈相比, 以变化百分数表示。为防止尾部皮肤灼伤, 当动物的痛阈升高 150% 仍未见甩尾时, 即停止照射, 以 +150% 为最高限。电针实验是以同样方法先测定基础痛阈后, 在相当于人体双侧“足三里”, “三阴交”部位进针, 用 57-6 D 型电针仪发出的疏密式脉冲波(2~15 Hz), 以逐级递增的电压电针 30 min。电针期间每隔 10 min 停止电针测痛一次, 测得的痛阈与电针前的基础痛阈值相比较, 亦以变化百分数表示。以电针时三次测得的痛阈升高百分数的均值作为针效。每次实验半数动物注射药物, 半数注射 CSF, 3~4 天后两组交换。

因此, 每只大鼠均以其自身作为对照。

侧脑室注射异槲皮甙后大鼠各脑分区内 cGMP 及 cAMP 含量的测定是在侧脑室注射异槲皮甙 40  $\mu\text{g}$  后, 将大鼠装入特制的有机玻璃笼内, 10 min 后送入微波灭活仪的波导管内, 用 2450 Hz, 辐射功率 10 千瓦的微波照射鼠头 0.72 s, 大鼠脑组织迅速被加热固定<sup>(8)</sup>。取出大鼠后切下鼠头并迅速冷却。剥离鼠脑, 先切取四叠体前缘和丘脑下部后缘, 以下组织作为“低位脑干”, 然后在视交叉水平作冠状断面, 断面前部组织作为端脑, 断面后部组织剥去皮层和海马作为“间脑”。称重后, 投入 10% 的三氯醋酸(TCA)溶液中进行匀浆, 离心(3,000 rpm)10 min, 取上清液, 用水饱和乙醚萃取 TCA 3 次, 每次 3 ml, 将三次提取液合并, 并将体积调至 5 ml。取 1 ml 上清液于 10 ml 小烧杯中, 在 65°C 以下水浴上蒸干备用。每个样品均取双份。

测定 cAMP 是采用 Gilman<sup>(9)</sup> 蛋白竞争法, 此法所用的蛋白激酶从兔骨骼肌中提取, 并用磷酸钙凝胶提纯。标准曲线的范围是 0.5~8 pmol/管。样品提取的回收率为 80~85%。cGMP 按 Steiner<sup>(10,11)</sup> 的放射免疫法测定, 抗血清的滴度为 1:60,000, 它与 cAMP 的交叉反应率为 0.031%, 标准曲线的范围是 12~800 fmol/管, 回收率亦为 80~85%。

## 结 果

### (一) 异槲皮甙提高大鼠不同脑区内 cGMP 的含量

大鼠 34 只, 半数经侧脑室注射异槲皮甙 40  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ , 半数注射 CSF 15  $\mu\text{l}$ 。结果证明异槲皮甙可提高脑内 cGMP 含量, 特别是间脑和脑干升高较为明显。实验组的三个脑区中 cGMP 含量分别是  $0.17 \pm 0.03$ ,  $0.31 \pm 0.04$  和  $0.63 \pm 0.08$  pmol/mg 湿重, 而 CSF 组的相应值为  $0.12 \pm 0.03$ ,  $0.18 \pm 0.02$  和  $0.30 \pm 0.02$  pmol/mg 湿重; 经统计学处理, 间脑和脑干两个分区中两组之间有显著差异(图 1 右)。

与此同时, 我们还测定了同一动物 3 个脑区中 cAMP 含量。实验组中端脑含 cAMP  $0.49 \pm 0.06$  pmol/mg 湿重, 间脑和脑干的含量分别为  $0.78 \pm 0.06$  及  $0.57 \pm 0.03$  pmol/mg 湿重; CSF 组中 3 个脑区的相应数值分别为  $0.73 \pm 0.07$ ,  $1.05 \pm 0.09$  及  $0.82 \pm 0.06$  pmol/mg 湿重。两组相比, 均有显著差异(图 1 左)。

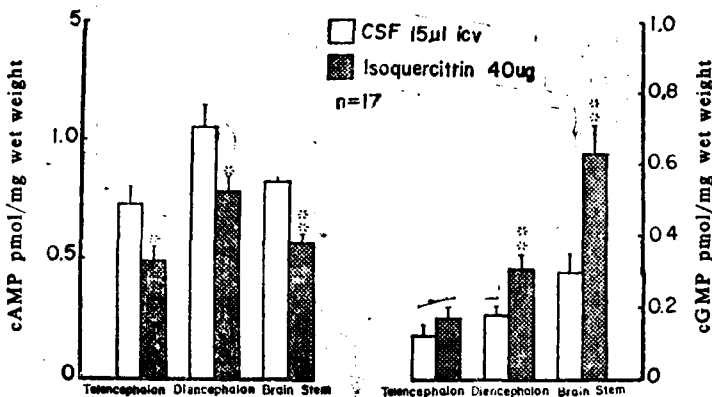


Fig 1. Icv injection of Isoquercitrin increased the cGMP level and decreased the cAMP level in the brain; \* $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

### (二) 异槲皮甙有镇痛作用

39 只动物分成 3 组, 每组 13 只。第一组经侧脑室注射异槲皮甙 80  $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ , 10 min 后

痛阈可升高  $58 \pm 17\%$ ，20 min 时痛阈升高达  $68 \pm 16\%$ ，30 min 后开始降至  $53 \pm 15\%$ ，以后的 30 min 内痛阈仍升高达  $57 \pm 13$ ， $39 \pm 12\%$  和  $36 \pm 14\%$ 。可见痛阈升高现象至少能持续 1 h。若将脑室注射异槲皮甙后痛阈变化百分数与注射同等体积的 CSF 后痛阈变化百分数相比，在 1 h 内 6 次测痛的结果表明，二组间差异显著(图 2)。如果将脑室注射异槲皮甙的剂

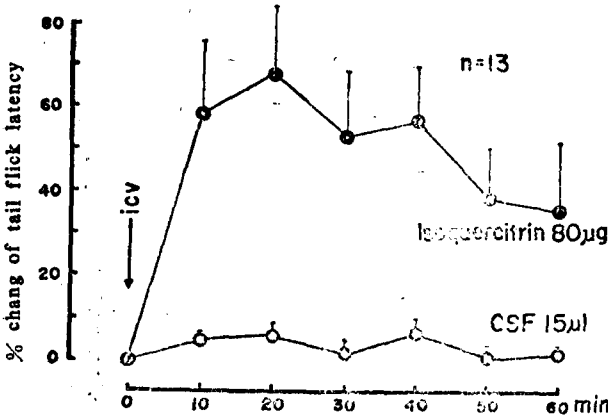


Fig 2. The analgesic effect of icv injection of Isoquercitrin 80 µg

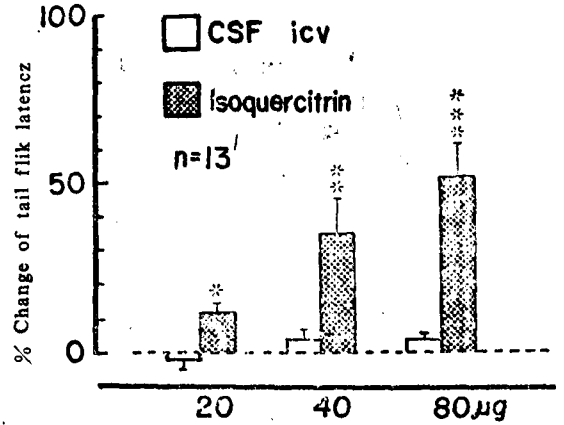


Fig 3. Icv injection of Isoquercitrin (20,40,80 µg) produced a dose-dependent antinoceptive effect

量由 80 µg 降至 40 µg (m=13) 和 20 µg (n=13)，以 60 min 内痛阈变化百分数的平均值计算，该两组所注射的异槲皮甙剂量亦均有镇痛效应，各组痛阈分别升高  $52 \pm 10\%$ ， $35 \pm 11\%$  和  $12 \pm 3\%$ ；但三组注射 CSF 后的痛阈分别升高  $4 \pm 2\%$ ， $4 \pm 3\%$  和  $-2 \pm 3\%$ 。经统计学处理，3 种剂量的异槲皮甙所产生的镇痛效应显著高于 CSF 组，可见异槲皮甙的镇痛效应随剂量的减少而逐渐减弱，呈较好的剂量效应关系(图 3)。

**(三) 异槲皮甙加强电针镇痛**

18 只大鼠先测定基础痛阈，然后分别给侧脑室注射异槲皮甙 20 µg 或 CSF，立即进行电针。电压由 1 v 开始，10 min 后增至 1.5 v，20 min 后再增至 2.5 v。脑室注射 CSF 组在

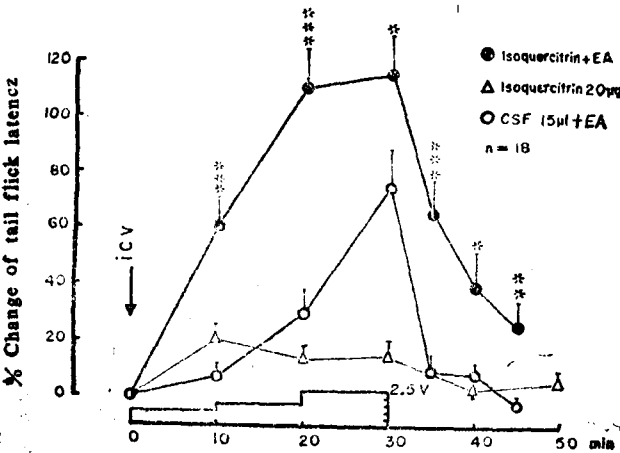


Fig 4. The EA analgesia was potentiated by the icv injection of 20 µg of isoquercitrin

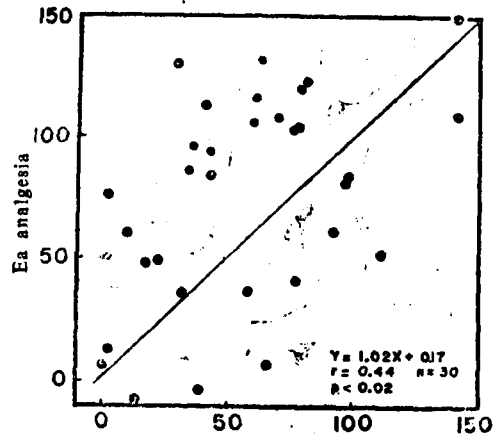


Fig 5. The positive correlation between isoquercitrin analgesia and EA-analgesia

电针后的 10, 20 及 30 min 痛阈分别升高  $7 \pm 5\%$ ,  $30 \pm 9\%$  和  $75 \pm 14\%$ , 而异槲皮甙组则升高  $61 \pm 10\%$ ,  $111 \pm 14\%$  和  $116 \pm 14\%$ 。在停针后 10 min CSF 组的痛阈已回到电针前的水平, 但实验组在停针 15 min 时痛阈仍明显高于 CSF 组。两组间差异非常明显。脑室单独注射异槲皮甙 20  $\mu\text{g}$  后 50 min 内所引起的镇痛效应非常微弱, 50 min 内平均波动于  $12 \pm 3\%$ , 与同组注射 CSF 后 50 min 内痛阈变化百分数 ( $-2 \pm 3\%$ ) 相比, 亦有显著差异, 如图 4 所示。

#### (四) 异槲皮甙的镇痛效应与电针镇痛效应相关

将 30 只大鼠经侧脑室注射异槲皮甙 40  $\mu\text{g}$  后的痛阈升高百分数为  $x$ , 以其电针镇痛效应为  $y$ 。发现凡异槲皮甙能引起明显镇痛的大鼠, 电针能产生显著镇痛作用, 异槲皮甙无明显镇痛者, 电针的镇痛作用也较差。将两者作直线相关处理, 求得  $y = 1.02x + 0.17$ ,  $r = 0.44$ ,  $P < 0.02$ 。显示二者间有一定正相关关系(图 5)。

## 讨 论

在明确了外源性 cAMP 和 cGMP 可分别拮抗和加强针刺镇痛后, 进一步证明脑内两种环核苷酸参与针刺镇痛的过程, 还需要从两个方面进行研究。一是测定针刺过程中脑内两种环核苷酸的含量和释放速度。有关这方面的工作证明, 电针镇痛时大鼠端脑中 cAMP 含量显著减少, 脑干 cGMP 含量升高, 并可被纳洛酮翻转<sup>(12)</sup>。在家兔的实验中观察到电针时尾核灌流液中 cAMP 含量下降, 这种效应也可被纳洛酮翻转<sup>(13)</sup>。还有报道认为电针能有效地抑制吗啡成瘾大鼠和小鼠的吗啡撤药反应, 同时也抑制撤药反应过程中 cAMP 的升高<sup>(14)</sup>。这些结果表明脑内 cGMP 水平的升高, cAMP 水平的降低可能是电针引起镇痛的重要环节之一。

另一方面的研究是通过药理实验以改变脑内 cGMP 或 cAMP 的含量, 观察其对针刺镇痛的影响。我们曾在这方面作过试验, 通过侧脑室注射 cAPDE 抑制剂氨茶碱和 cAPDE 激动剂咪唑, 以提高脑内 cAMP 水平或降低脑内 cAMP 水平, 观察其对电针镇痛的影响。结果表明, 氨茶碱可对抗电针镇痛效应, 而咪唑则起加强作用<sup>(15)</sup>。这一结果表明改变内源性 cAMP 含量与外源性注射 cAMP 的结果是符合的, 两者互相印证, 共同说明 cAMP 可能是对抗电针镇痛的一个重要因素。同时, 启示我们去设法提高脑内 cGMP 水平, 以便得到加强针刺镇痛的效果。

在本工作中, 我们使用了较强的 cGPDE 抑制剂异槲皮甙<sup>(6)</sup>, 给大鼠作侧脑室注射后, 观察到异槲皮甙本身有镇痛作用, 并提高脑内 cGMP 水平及降低 cAMP 水平, 同时还具有明显的加强电针镇痛效应。这一结果说明异槲皮甙的中枢镇痛效应可能是通过提高脑内 cGMP 水平以及降低脑内 cAMP 水平而产生的, 同时也说明脑内 cGMP 在电针镇痛过程中的重要作用。异槲皮甙主要抑制 cGPDE 的活性, 对 cAPDE 影响较小, 但本实验中出现脑内 cAMP 水平的降低, 可能是脑内两种环核苷酸之间相互调节的结果, 即 cGMP 生成增加时, 对腺苷酸环化酶有抑制作用, 因此脑内 cAMP 生成有一定减少。此外, 本实验还观察到异槲皮甙的镇痛效应与电针镇痛之间存在着正相关关系。可以推测, 有些动物电针效果较好, 可能是因为在电针时脑内生成足够的 cGMP 参与镇痛, 在这些动物中使用药物抑制 cGMP 的降解, 即可使电针镇痛效应加强; 在另一些电针效应差的动物, 电针时脑内 cGMP 生成不足, 因此在这些动物中即使用药物抑制 cGMP 的降解, 也不能产生明显镇痛作用。

以上结果进一步证实了我们以往提出过的设想, 即电针能引起脑内内源性阿片样物质 (OLS) 的释放, 作用于相应的神经元上的阿片受体, 激活鸟苷酸环化酶, 使中枢内 cGMP 水

平增加；同时电针能抑制腺苷酸环化酶活性，使中枢内 cAMP 水平降低。两种环核苷酸在中枢内的改变可能正是实现针刺镇痛的重要环节。

致谢 本工作所用异槲皮甙为本院药理学系植化教研室朱珍燕副教授提供

### 参 考 文 献

1. Cohn MJ, et al. Guanosine 3', 5'-monophosphate: A central nervous system regulator of analgesia. *Science* 1978; 199:319.
2. 邱学才等. 脑室注射 cAMP 及 cGMP 对大鼠电针镇痛和吗啡镇痛的影响. *中华医学杂志* 1981; 61:225.
3. 陈祥贵、郑涛. 脑室注射环-磷酸鸟苷 (cGMP) 对大鼠电针镇痛的影响. *针刺研究* 1981; 3:204.
4. 邱学才等. 大鼠蛛网膜下腔注射 dbcAMP 或 dbcGMP 分别对抗或加强电针镇痛. *同上*. 1984; 9:72.
5. 邱学才等. 缰核内注射 cGMP 或 dbcGMP 对大鼠电针镇痛及电针耐受的影响. *科学通报* 1982; 27:1147.
6. 贺师鹏等. 某些中药的黄酮类化合物对磷酸二酯酶抑制作用的研究. *北京医学院学报* 1982; 14:253.
7. 任民峰、韩济生. 一种改进的甩尾测试及其在针刺镇痛实验中的应用. *生理学报* 1978; 30:204.
8. 邱学才等. 大鼠脑内 cAMP 和 cGMP 的含量: 微波照射和断头两种处死方法的比较. *北京医学院学报* 1984; 16:281.
9. Gilman AG. A protein binding assay for adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 67:305.
10. Steiner AL, et al. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissues and body fluids. *J Biol Chem* 1972; 247:1114.
11. 贺师鹏等. 高灵敏度 ( $10^{-15}$  M) 的 cGMP 放射免疫测定法. *生物化学与生物物理进展* 1983; (6):60.
12. 徐超等. 电针对鼠全脑和不同脑区 cAMP 和 cGMP 含量的影响. *北京医学院学报* 1981; 13:31.
13. 许绍芬等. 尾核中环腺苷酸在针刺镇痛中的作用. *生理学报* 1980; 32:338.
14. Ho WKK, et al. The influence of electroacupuncture on naloxone induced morphine withdrawal. III. The effect of cyclic-AMP. *Neuropharmacology* 1979; 18:865.
15. 邱学才, 韩济生. 脑室注射氨茶碱或咪唑对大鼠电针镇痛的影响. *生理学报* 1983; 35:340.

## ISOQUERCITRIN INCREASES BRAIN cGMP LEVEL AND POTENTIATES ELECTROACUPUNCTURE (EA) ANALGESIA

QIU Xue-Cai, ZHANG Jian, WANG Yuan, HAN Ji-Sheng, \*HE Shi-Peng and \*WEI Mo-Chou

(Department of Physiology; \*Department of Biophysics, Beijing Medical University, Beijing)

**ABSTRACT** In a previous study we have reported that icv injection of aminophylline or imidazole serving as inhibitor or activator of phosphodiesterase for cAMP respectively, was capable of increasing or decreasing the brain level of endogenous cAMP. EA analgesia was found to be markedly antagonized by aminophylline and significantly augmented by imidazole. In the present study we have found that icv injection of isoquercitrin, an inhibitor of cGMP phosphodiesterase, resulted in an increase of cGMP level in the diencephalon and lower brain stem, as well as a generalized decrease of cAMP level in the telencephalon, diencephalon and brain stem in the rat. Icv injection of isoquercitrin (20, 40, 80  $\mu$ g) produced a dose-dependent antinociceptive effect. The effect of EA analgesia was significantly potentiated by the icv injection of 20  $\mu$ g of isoquercitrin which, by itself, exhibited only very weak analgesic effect. Moreover, a positive correlation was found between the isoquercitrin analgesia and EA analgesia in the same group of 30 rats. The results seem to support the conclusion that central cGMP plays an important role in mediating EA analgesia.

**Key words** cGMP; Isoquercitrin; Acupuncture; Analgesia