

乙酰胆碱对海马 CA1 区痛反应神经元电活动的影响

肖 宇 杨晓芳 徐满英

摘 要 **目的** 研究侧脑室注射乙酰胆碱(ACh)对大鼠海马 CA1 区痛反应神经元电活动的影响。**方法** 以电脉冲刺激右侧坐骨神经作为伤害性刺激,用玻璃微电极细胞外记录神经元放电。**结果** 脑室注射 ACh (20 μ g/10 μ l) 可使痛兴奋神经元(PEN)放电频率的净增值减少,潜伏期延长;使痛抑制神经元(PIN)放电频率的净增值增加,完全抑制时程明显缩短。**结论** ACh 能够减弱海马 CA1 区内的痛反应神经元对伤害性刺激的反应,表现为镇痛效应。

关键词 乙酰胆碱 海马 CA1 区 痛兴奋神经元 痛抑制神经元 电活动

Effect of Acetylcholine on Electric Discharge of Pain - related Neurons in Hippocampal CA1 Area. Xiao Yu, Yang Xiaofang Xu Manying. Department of Physiology, Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To study the effect of intracerebroventricular (icv) injection on acetylcholine (ACh) on the electric activities of pain - related neurons in the hippocampal CA1 area of rat. **Methods** Trains of the electric impulses applied to the right sciatic nerve were used as noxious stimuli. The discharges of neurons were led out by extracellular recording method with glass microelectrodes. **Results** Icv injection of ACh (20 μ g/10 μ l) caused a decrease of the evoked discharge frequency of pain - excited neurons (PEN) and a prolongation latency as well as an increase of the evoked discharge of pain - inhibited neurons (PIN) and a shortening of inhibitory duration. **Conclusion** The response of pain - related neurons in hippocampal CA1 area to the noxious stimulation is weakened by icv injection of ACh, exhibiting analgesic effect.

Key words Acetylcholine; Hippocampal CA1 area; Pain - excited neurons; Pain - inhibited neurons; Electric activity

乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)作为一种重要的兴奋性神经递质,广泛地分布于哺乳动物的中枢和外周神经系统,参与多种生理功能的调节。近几年研究表明,ACh 在伤害性信息的感觉和调控中起重要作用^[1,2]。中缝大核、束旁核、红核、缰核等部位注射胆碱能受体激动剂,可提高猫和大鼠的痛阈,并抑制内脏和躯体伤害性信息的传递。

海马结构作为边缘系统的重要组成部分,可以接受痛觉传入,是伴有情绪活动的痛反应的较高级中枢。而且在海马内分布着丰富的胆碱能纤维、胆碱能敏感神经元及其受体。但海马内的胆碱能系统与疼痛的关系不是十分清楚。本实验采用细胞外记录神经元放电的方法,观察侧脑室微量注射 ACh 对伤害性刺激引起的海马 CA1 区中痛兴奋神经元(pain - excitation neurons, PEN)和痛抑制神经元(pain - inhibition neurons, PIN)痛诱发电活动的影响,进而分

析 ACh 在海马 CA1 区痛觉信息调制中的作用。

材料与方法

1. 实验动物:实验选用体重为 200 ~ 280g Wistar 大鼠 30 只(哈尔滨医科大学附属第二医院动物中心提供,级别:II,证书号:09 - 2 - 1)。

2. 细胞外记录神经元放电:大鼠用 20% 氨基甲酸乙酯(5ml/kg)腹腔注射麻醉实施常规手术,即气管插管、颅骨开窗、分离坐骨神经及按 Pellegrino 图谱 B 坐标系统,将外径 0.8mm 的“H”不锈钢脑室套管插入侧脑室内(A:0.2mm; L/R:1.5mm; H:3.0mm)供注药用。将大鼠的头固定在 SN - 2 立体定位仪上。将内充 3mol/L 氯化钾溶液、尖端直径 0.5 ~ 1.0 μ m,直流电阻为 10 ~ 30M Ω 的玻璃微电极固定在 SM - 21 型微电极操纵器上。用呼吸机维持呼吸,腹腔注 0.1% 氯化筒箭毒碱(1ml/kg)用以制动,松弛肌肉,排除肌细胞电活动对本实验的影响。按 Pellegrino 图谱^[3] B 坐标系统,将微电极插入 CA1 区(A: - 3.2 ~ - 4.0mm; L/R:2.5 ~ 3.0mm; H:2.5 ~ 3.1mm)内,由微电极引导神经元放电,经前级放大器放大,显示于示波器上,并以串脉冲(强度:5mA,波宽:0.3ms,间隔:5ms,脉冲:5个)刺激坐骨神经作为伤害性刺激,引导 PEN 的放电。然后用 ZCZ - 50 型自动抽注仪向侧脑室匀速注入 ACh (20 μ g/10 μ l)在 2min 内注完。观察注药前、后 PEN 电活动的变化,并用 ST - CH707X 型双道磁带记录器记录。连续观察记录 30min。实验结束后,将充灌有 2% 溴胺天蓝的记录微电

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30240058)

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院生理学教研室(肖宇); 200032 上海,复旦大学脑科学研究院(杨晓芳); 150086 哈尔滨医科大学生理学教研室(徐满英)

通讯作者:徐满英,电子邮箱:manyngxu@sohu.com

极通直流电 (25 μ A 阴极, 30s), 标记微电极尖端位置。

3. 观察指标及其计算方法: ①净增值: 单位时间内 (s) 电刺激后诱发放电频率与电刺激前自发放电频率之差 (Hz); ②潜伏期: 从电刺激坐骨神经的伪迹开始到引起 PEN 诱发放电出现的时间 (ms); ③完全抑制时程: 从电刺激坐骨神经的伪迹开始到引起 PIN 痛诱发放电出现的时间 (ms)。

4. 数据处理和统计学分析: 全部数据经 powerlab/8s 数据处理器输入计算机, 用 Chartv5.3 软件系统进行数据分析, 实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理使用方差分析和 *t* 检验。

结 果

1. 侧脑室注射 ACh 对大鼠海马 CA1 区 PEN 电活动的影响: 在 ACh 组, 20 只大鼠 CA1 区完整记录了 25 个 PEN 放电。如图 1 所示, 在脑室内注射 ACh 后 PEN 痛诱发放电频率净增值减少, 潜伏期延长, 在注药后 4min 达到高峰。净增值由注药前的 $9.18 \pm 2.03\text{Hz}$ 减少至 $2.75 \pm 1.03\text{Hz}$; PEN 潜伏期由注药前的 $140 \pm 16.9\text{ms}$ 延长至 $580 \pm 47.7\text{ms}$ 。注药后 2 ~ 12min 期间各项指标与注射 ACh 前或对照组同期数据相比, 差异有显著性 ($P < 0.05, P < 0.01$, 图 2)。

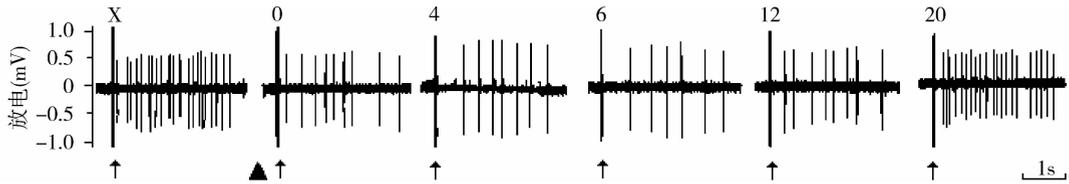


图 1 侧脑室注射 ACh 对海马 CA1 区 PEN 放电的影响

↑: 刺激伪迹; ▲: 注 ACh

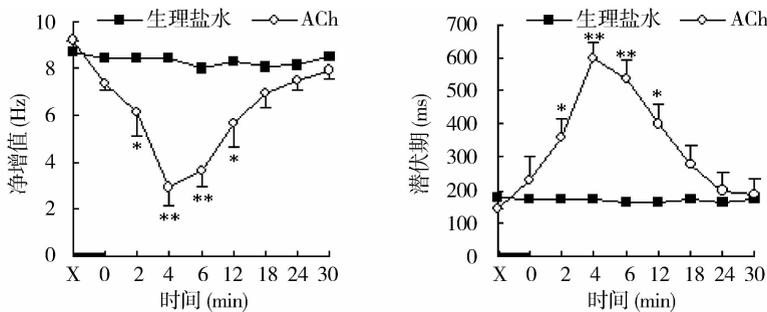


图 2 侧脑室注射 ACh 对大鼠 CA1 区 PEN 诱发放电净增值和潜伏期的影响

■: 注生理盐水或 ACh; X: 注药前; 0、2、……30. 注药后 (min); 与生理盐水组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

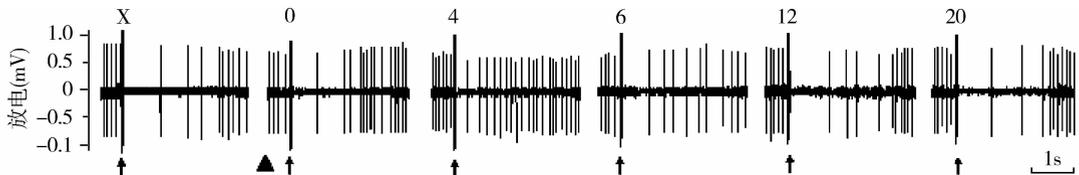


图 3 侧脑室注射 ACh 对海马 CA1 区 PIN 放电的影响

↑: 刺激伪迹; ▲: 注 ACh

注药后 14 min 诱发放电频率的净增值和潜伏期开始逐渐恢复。在生理盐水组, 10 只大鼠完整记录到 12 个 PEN 放电, 注入生理盐水前、后 PEN 的放电频率和潜伏期没有明显变化 ($P > 0.05$)。

2. 侧脑室注射 ACh 对大鼠海马 CA1 区 PIN 电活动影响: 在 ACh 组, 20 只大鼠 CA1 区完整记录了 20 个 PIN 放电。如图 3 所示, 在脑室内注射 ACh 后 PIN 痛诱发放电频率净增值增加, 而完全抑制时程缩短, 注药后 4min 电活动变化最为明显。净增值由注药前的 $-6.12 \pm 1.78\text{Hz}$ 增加至 $-1.45 \pm 0.82\text{Hz}$; 完全抑制时程由注药前的 $440 \pm 37.8\text{ms}$ 缩短至 $130 \pm 19.5\text{ms}$ 。注 ACh 后 2 ~ 12min, PIN 诱发放电频率的净增值和完全抑制时程与注 ACh 前或对照组同期相比具有显著差异 ($P < 0.05, P < 0.01$, 图 4)。注 ACh 后 14min, PIN 诱发放电活动开始逐渐恢复。

在生理盐水组, 10 只大鼠完整记录到 10 PIN 放电, 注入生理盐水前、后 PIN 的放电频率和完全抑制时程没有明显变化 ($P > 0.05$)。

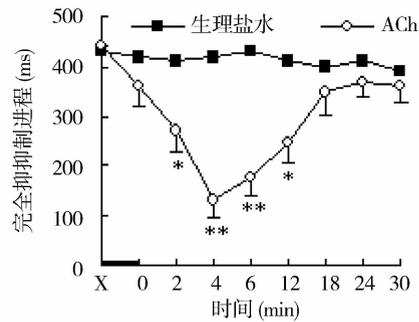
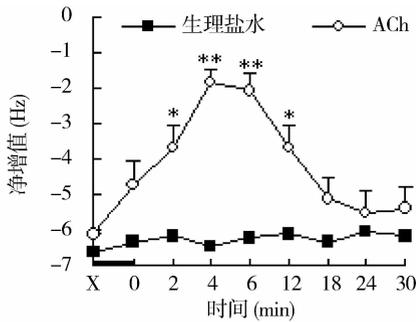


图4 侧脑室注射 ACh 对正常大鼠 CA1 区 PIN 诱发放电净增值和潜伏期的影响

■: 注生理盐水或乙酰胆碱; X: 注药前; 0、2、……30. 注药后 (min); 与生理盐水组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

近年研究证实,疼痛刺激可以激活海马,从而对伤害性信息进行调节^[4]。本实验以刺激坐骨神经作为伤害性痛刺激,直接在海马 CA1 区记录痛反应神经元的放电活动。证实海马确实分布着大量的 PEN 和 PIN。本研究室的系列实验结果证明,中枢核团内痛相关神经元的电活动变化与痛行为的变化相伴随,所以把 PEN 和 PIN 的电活动作为痛反应指标是切实可行的。本实验应用细胞外电生理实验技术,观察侧脑室微量注射 ACh 对大鼠海马 CA1 区痛相关神经元电活动的影响,从而探讨海马 CA1 区和 ACh 在痛觉调制中的作用。

大量的研究表明,内源性毒蕈碱易化通路在痛觉调制中是一个重要的系统。全身或鞘内注射胆碱能激动剂可以产生镇痛作用,而胆碱能抑制剂则降低痛阈。中缝大核、束旁核、红核、缰核等部位注射胆碱能激动剂,可提高猫和大鼠的痛阈,并抑制内脏和躯体伤害性信息的传递^[5]。基底前脑 ACh 释放增加 30% 可以产生镇痛作用,减少 30% 就会导致痛觉过敏^[6]。海马结构参与了中枢神经系统许多重要功能的调节,并被认为是学习记忆的中枢。近年来,海马在痛觉感受和痛相关行为表现中的作用也得到广泛的认可和研究。ACh 作为海马结构中一种重要的活性物质,参与海马生理功能的调节^[7]。应用活体微量渗析技术和高效液相色谱分析技术研究发现疼痛可以激活海马内胆碱能神经元,导致 CA1 区锥体细胞 ACh 释放增加。本实验数据表明,侧脑室注入 ACh 使 CA1 区 PEN 诱发放电频率减少,潜伏期延长,抑制了 PEN 的痛诱发放电活动;使 PIN 诱发放电频率增加,完全抑制时程缩短,增强了 PIN 的电活动。这些结果表明外源性给予 ACh 能够减弱 CA1 区痛相关神经元对伤害性刺激的反应,通过 PEN 和 PIN 的相互作用表现为镇痛效应。说明, ACh 参与了海马 CA1 区伤害性信

息的处理。

由于侧脑室注射牵涉范围广、影响因素多,可能影响到中枢的多个部位。海马与隔核、尾核、中缝大核、前脑、纹状体等与痛觉的调制密切相关的核团有着广泛的纤维联系。

已有研究证实,隔核和前脑的胆碱能纤维投射至 CA1 区能够影响 CA1 区突触可塑性和 CA1 区锥体细胞的电活动^[8]。因此, ACh 是直接作用于海马 CA1 区,发挥作用,还是先作用于其他核团内的神经元,再间接地影响 CA1 区神经元活动,目前还不清楚,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Jones PG, Dunlop J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology*, 2007, 53(2): 197 - 206
- 2 Hamurtekin E, Gurun MS. The antinociceptive effects of centrally administered CDP - Choline on acute pain models in rats: the involvement of cholinergic system. *Brain Res*, 2006, 1117 (1): 92 - 100
- 3 Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. A stereotaxic atlas of the rats brain. 2nd edition. New York: Plenum Press, 1979: 81 - 85
- 4 Echeverry MB, Guimaraes FS, Oliveira MA, do Prado WA, Del Bel EA. Delayed stress - induced antinociceptive effect of nitric oxide synthase inhibition in the dentate gyrus of rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 2002, 74(1): 149 - 156
- 5 Harte SE, Hoot MR, Borszcz GS. Involvement of the intralaminar parafascicular nucleus in muscarinic - induced antinociception in rats. *Brain Res*, 2004, 1019(1 - 2): 152 - 161
- 6 Iwamoto ET, Marion L. Characterization of the antinociception produced by administered muscarinic agonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, 266 (1): 329 - 338
- 7 Ovsepien SV. Differential cholinergic modulation of synaptic encoding and gain control mechanisms in rat hippocampus. *Neurosci Res*, 2008, 61(1): 92 - 98
- 8 Remondes M, Schuman EM. Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. *Nature*, 2002, 416(6882): 736 - 740

(收稿: 2009 - 12 - 11)

(修回: 2009 - 01 - 08)