

已能满足一般的应用需要。

参 考 文 献

- 1 C. Kinpui, *Appl. Phys. Lett.*, **43**(7), 634(1983)
- 2 C. Kinpui, *Appl. Phys. Lett.*, **45**(3), 220(1984)
- 3 J. Kreidl, *Lase & Applications*, **5**(9), 32(1986)
- 4 梁振斌 *et al.*, *应用激光*, **8**(2), 59(1988)

(收稿日期:1988年11月10日)

氦-氖激光穴位照射对脊髓后角 SP 及 ENK 的影响 ——免疫组织化学研究

熊进军 李 和 张亦农 王庆堂

(同济医科大学组胚教研室, 430030)

Influence of laser irradiation at acupoint on substance P and enkephalin in spinal cord dorsal horn — an immunohistochemistry study

Xiong Jinjun, Li He, Zhang Yinong, Wang Qingtang

(Department of Histology and Embryology, Tongji Medical University, Wuhan)

Abstract: The changes of pain threshold and two neuropeptides, substance P (SP) and methionine-enkephalin (ENK), were observed after He-Ne laser irradiating at acupoint(LIA) of rats. The pain threshold was very significantly higher after LIA than before ($P < 0.001$). The SP-LI was obviously enhanced ($P < 0.001$), whereas the ENK-LI markedly diminished ($P < 0.001$) in the rats of laser group as compared with those of control group.

Key words: laser, methionine-enkephalin, substance P

激光照射“穴位”(简称光针)具有镇痛作用,已在临床实践和实验研究中获得广泛证明。光针可以抑制脊髓后角痛敏神经元放电^[1],光针镇痛与其能促进体内啡样物质释放有关^[2]。

脊髓后角是痛觉调制的初级中枢,有关痛觉传递假说都涉及到脊髓后角内的 P 物质(SP)和脑啡肽(ENK)^[3]。SP 与伤害性初级传递有关;ENK 是体内啡样物质,与痛觉的调制有关^[4,6]。SP 与 ENK 在脊髓后角的形态分布基本相似^[7],提示两者之间在痛觉的传递上存在密切的功能联系。我们观察了光针后大鼠的痛阈变化,并采用免疫组化方法观察了光针后脊髓后角 SP 和 ENK 的变化规律,为光针镇痛机理提供了某些依据。

实 验 方 法

实验选用健康雄性 Wistar 大鼠 38 只,体重 190~250 g,按配对原则分成激光照射组(实

验组)和正常对照组。两组大鼠分别装入鼠袋中,除掉右下肢“足三里”穴位处的毛,用 WQ-9E 型痛阈测定仪,先测定痛阈^[8,9],然后用 JZZY-2 型氮-氩激光器,功率 4.5 mW,功率密度为 0.995 mW/mm²,距照射部 15 cm,连续照射实验组动物右侧“足三里”40 分钟。照射完后,立即对两组分别测痛,得出实验后痛阈。

用戊巴比妥钠作腹腔麻醉,用 4% 多聚甲醛灌注固定,取脊髓第四节段,放入固定液后固定,置蔗糖缓冲液(4°C)中过夜后,在恒冷箱中切片,片厚为 20 μm,同一配对组的组织块置于同一载物台上,所得的对片按 Sternberger's PAP 法进行免疫组化反应。基本步骤如下:1. 一抗血清(4°C)孵育组织切片 48~72 小时,一抗分别用 P 物质和甲硫氨酸脑啡肽(SP, ENK)抗体,稀释度分别为 1:4000 和 1:3000,抗体取自兔。2. 羊抗兔 IgG(稀释度为 1:30),室温浴 50 分钟。3. 然后再用 PAP 复合物(稀释度为 1:30),室温浴 50 分钟。4. 用 5/10000 DAB/1/10000 H₂O₂ 溶液成色,各步骤之间均用 PBS 充分漂洗。反应后的对片置入同一载玻片上,常规脱水、透明、封片。用 Olympus 多头显微镜对 SP 样免疫反应和 ENK 样免疫反应(SP-LI, ENK-LI)的强弱进行定性观察。用扫描积分显微分光光度计(对成色切片作定量测定,求出相对光密度(R. Opt. D)的平均值。

以吸收试验、置换试验检测抗体的特异性。

实 验 结 果

1. 光针前后痛阈的变化

实验组经光针后,痛阈明显升高,与实验前的基础痛阈相比, $P < 0.001$,差异极为显著。痛阈净增长最高达 270%,最低为 18%,平均为 90%,对照组实验前后两次痛阈比较, $P > 0.05$,差异不显著。其痛阈平均提高 8.52%。

2. SP-LI 和 ENK-LI 分布

在脊髓后角横断面可观察到较强的 SP-LI 产物。低倍镜下,SP-LI 产物聚集成帽状,位于边缘,复盖于后角,阳性反应以中间部最强,内侧部较弱,见图 1(a)。高倍显微镜下,阳性反应以 I-II 层间最强,密度大,包含一些火焰状反应的阳性纤维,在阳性纤维网格间散布一些浅染区。第 II 层清楚可见 SP-LI 阳性纤维背腹行走,呈放射状进入后角深层,可见串珠状纤维。第 III 层反应较弱而且模糊,见图 1(b)。

ENK-LI 产物与 SP-LI 分布基本相似,其阳性纤维较细而稀疏,见图 2(a)。以第 II 层中外侧部反应最强,第 III 层反应较弱,可见少数阳性纤维从边缘进入深层,见图 2(b)。

3. 光针对 SP-LI 和 ENK-LI 的影响



Fig.1

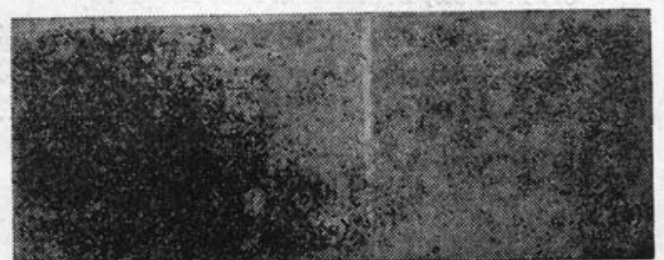


Fig.2



Fig.3

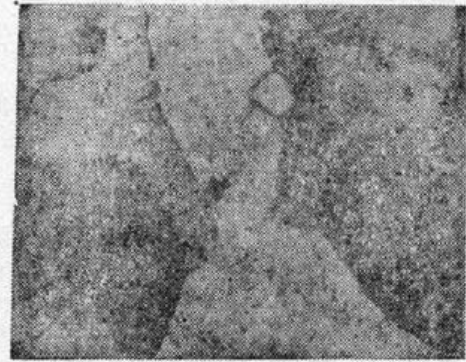


Fig.4

光针后大鼠脊髓 I-III 层 SP-LI 产物同对照组相比,明显增强,第 I、II 层中阳性纤维着色加深,点状物密集,特别在中间部和外侧部较明显(图 3),左右侧变化不明显(图 1(a))。定量分析所得 SP-LI 产物的 R. Opt. D 值,实验组右侧大于对照组, $P < 0.001$, 差异极显著,实验组左右侧比较, $P > 0.1$, 差异不显著。

ENK-LI 的变化与 SP-LI 的变化相反,光针后 ENK-LI 产物减弱,以第 II 层中外侧部较明显(图 4),左右侧变化不明显(见图 2(a))。R. Opt. D 值比较结果,实验组右侧小于对照组, $P < 0.001$, 差异极显著;实验组右侧小于左侧, $P > 0.1$, 差异不显著。

对照试验结果均为阴性。

小 结

1. 光针能明显提高大鼠痛阈值,具有镇痛作用,但存在个体差异。
2. 光针后的大鼠同对照组大鼠在第四腰段脊髓 I-III 层的免疫组化观察,发现实验组 SP-LI 明显增强,而 ENK-LI 显著减弱,提示光针能促进 ENK 的释放,通过 ENK 的作用,抑制 SP 的释放,产生镇痛作用。

本研究内容曾蒙艾民康、张世明教授帮助指导;梁勋厂讲师在痛阈测定上给予了帮助,在此谨致谢意。

参 考 文 献

- 1 秦成德 *et al.*, 激光杂志, **9**(2), 118(1988)
- 2 于 船, 针刺研究, (3), 188(1985)
- 3 Henry J. I., In: Porter R and O'Conner M(eds): Substance P in the Nerve System. Pitman London, 1982, p. 206~217
- 4 Anderson R. K. *et al.*, *Cen. J. Physiol. Pharmacol.*, **56**, 216(1978)
- 5 Hökfelt T. *et al.*, *Brain Res.*, **100**, 235(1975)
- 6 Hökfelt T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 3081(1977)
- 7 Gibson S. J. *et al.*, *J. Comp. Neurol.*, **201**, 65(1981)
- 8 艾民康 *et al.*, 全国针麻研究资料选编, 人民卫生出版社, 1977, 545
- 9 邱 石 *et al.*, 中国药理学报, (4), 153(1983)

(收稿日期: 1989年2月13日)