

鞘内注射蛙皮素在大鼠引起镇痛效应的性别差异

崔宇¹, 夏杰华², 张旭宇², 胡芬¹, 陈宇^{2*}

(中山大学 1.中山医学院生理教研室, 2.附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)激动剂蛙皮素引起镇痛效应的性别差异及其可能的受体机制。【方法】采用痛行为学测试观察鞘内注射蛙皮素在雌雄大鼠引起的镇痛效应以及其拮抗剂美加明对抗其镇痛作用的差异性;利用免疫荧光组织化学方法,观察雌雄大鼠脊髓背角 nAChR 亚单位 $\alpha 4$ 的表达是否存在性别差异,以探讨蛙皮素镇痛效应性别差异的可能机制。【结果】①鞘内给予蛙皮素剂量依赖性地发挥镇痛作用,且在雌性大鼠的镇痛作用大于雄性大鼠;② nAChR 特异的非竞争性拮抗剂-美加明能够阻断蛙皮素的镇痛作用,且阻断效应于雄鼠大于雌鼠;③介导蛙皮素镇痛作用的 nAChR $\alpha 4$ 表达于脊髓背角神经元,但雌雄大鼠间的表达未发现性别差异。【结论】鞘内注射蛙皮素产生的镇痛效应在大鼠具有性别差异,但蛙皮素受体 nAChR $\alpha 4$ 的表达可能与镇痛效应的差异性没有关系。

关键词: 镇痛; 蛙皮素; 烟碱型乙酰胆碱受体; 脊髓

中图分类号: R6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2011)05-0582-06

Gender Difference of the Antinociceptive Effect Induced by Intrathecal Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Epibatidine in Rats

CUI Yu¹, XIA Jie-hua², ZHANG Xu-yu², HU Fen¹, CHEN Yu^{2*}

(1. Department of Physiology, Zhongshan Medical College, 2. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the gender difference of the antinociceptive effect induced by intrathecal nicotinic acetylcholine receptor agonist epibatidine in rats and the potential receptor mechanisms underlying such gender difference. 【Method】 The antinociceptive behavioral test was performed to observe the difference of analgesia induced by intrathecal epibatidine, as well as the inhibition of mecamylamine on the analgesia, between male and female rats. The nAChR $\alpha 4$ expression was observed by immunofluorescence staining to investigate the mechanism underlying the gender difference of epibatidine-induced analgesia. 【Result】 Intrathecal injection of epibatidine induced analgesia in dose-dependent manner with more potent analgesic effect in female rat than male rat. Although non-competent antagonist of nAChR mecamylamine pretreatment partially blocked the analgesia induced by epibatidine, stronger analgesic effect maintained in female than male rats. Immunohistochemistry staining showed that nAChR $\alpha 4$, which mediated the analgesia of epibatidine, was expressed in the neurons of the lumbar spinal dorsal horn. However, no difference in the nAChR $\alpha 4$ expression was detected between male and females rats. 【Conclusion】 There is gender difference in the antinociceptive effect induced by intrathecal epibatidine between male and female rats. Mechanisms other than the expression of nAChR $\alpha 4$ might underlie such gender difference.

Key words: antinociception; epibatidine; nicotinic acetylcholine receptor; spinal cord

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(5):582-587]

收稿日期: 2011-03-20

基金项目: 广东省科技计划(2009B030801110); 广东省卫生厅医学科研基金(B2009064)

作者简介: 崔宇, 博士, 讲师, E-mail: cuiyu2@mail.sysu.edu.cn; * 通信作者, 陈宇, 副主任医师, E-mail: chen@mail.sysu.edu.cn

大量研究表明镇痛药物的镇痛效应存在性别差异,例如吗啡对女性的镇痛效果较男性更明显^[1-3]。近年来文献报道其他非阿片类的镇痛药物如胆碱类药物(新斯的明)^[4]、 α_2 -肾上腺素能受体激动剂可乐定^[5]以及非甾体类抗炎药 ibuprofen^[6]等的镇痛效应也可能存在性别差异。神经元烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)激动剂是一类新型的潜在的镇痛药物^[7],有资料显示,蛙皮素(epibatidine)是目前发现的nAChR最强效的激动剂,其镇痛效能与吗啡相当,而镇痛效价比吗啡高200多倍^[8]。然而,蛙皮素镇痛效应是否也存在性别差异目前尚不明确。目前已知蛙皮素主要通过特异性地结合于脊髓nAChR亚单位 α_4 发挥镇痛作用^[9],因此本研究首先通过雌雄大鼠鞘内注射蛙皮素观察其镇痛效应的性别差异;然后通过预先鞘内注射其拮抗剂-美加明(mecamylamine)观察其对蛙皮素镇痛效应的拮抗作用,进一步比较蛙皮素在雌雄大鼠镇痛作用的差异性;进而观察并比较雌雄大鼠腰段脊髓背角nAChR亚单位 α_4 的分布与表达,探讨蛙皮素镇痛效应性别差异的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选择成年Sprague-Dawley (SD)大鼠72只(由中山大学北校区动物中心提供),雌雄各半,体重分别为250~280 g(雄)及200~230 g(雌)。大鼠于12 h光照-黑暗循环、安静环境下单笼饲养,自由摄食饮水。室温维持在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。

1.2 鞘内置管

为给予大鼠鞘内注射药物,按照以往方法行蛛网膜下腔内置管^[10],具体如下:腹腔注射苯巴比妥钠($35 \sim 45 \text{ mg/kg}$)麻醉大鼠后,纵向切开L5间隙水平皮肤,分离椎旁肌,暴露L5间隙。8号针头穿刺,置入充满生理盐水的PE10导管,见管腔中有清亮液体返流证实导管位于蛛网膜下腔后,将导管朝头端方向插入2 cm,使导管尖端接近脊髓腰膨大水平,封闭导管外口。逐层缝合肌肉与皮肤,并把外露于皮肤的导管妥善固定于腰部。术后

第2天,通过置入的导管使用微量注射器注入2%利多卡因5 μL ,随后注入无菌生理盐水7 μL 冲管,即时出现双侧后肢瘫痪的大鼠被认为导管放置到位。术后出现后肢或尾部瘫痪、运动功能障碍或导管位置不到位的大鼠从实验中排除并立即注射过量苯巴比妥钠处死。

1.3 痛反应行为学测试

鞘内置管术后第5天行痛反应行为学测定,测试时间为每天14:00-18:00。将大鼠放入容积为22 cm $\times$ 6.5 cm的塑料容器中,大鼠可以在容器中自由前后活动。待大鼠适应容器的环境后开始测试。将大鼠尾部末端1/3迅速放入恒温的 $(50 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ 热水中,用秒表记录从大鼠尾部入水到尾巴迅速甩离水面的时间,此时间为大鼠热水甩尾潜伏期(单位为s)。为避免损伤,大鼠尾部在热水中停留最长时间设为15 s(cut-off time);超过15 s不甩尾则将大鼠尾部撤离热水,并将此次测试潜伏期定为15 s。按照上述方法连续测3次,每次间隔30 s。取3次测试值的平均值确定为基础痛阈值(BL)。基础痛阈值超过5 s的大鼠从实验中排除。鞘内分别注射10 μL 无菌生理盐水或10 μL 不同剂量的蛙皮素(Sigma, USA; 0.0625、0.125、0.25、0.5或1.0 μg),每隔5 min测一次痛阈值(TL),观察60 min。将所得的BL、TL带入公式求得:% MPE(percent of maximal potential effect) = $(\text{TL} - \text{BL}) / (\text{cut-off time} - \text{BL}) \times 100\%$,并以%MPE值比较蛙皮素的镇痛效能。

为进一步明确蛙皮素镇痛效能的性别差异是否与受体有关,预先给予大鼠鞘内注射nAChR特异的非竞争性拮抗剂-美加明(Sigma, USA)25 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$,5 min后鞘内注射蛙皮素1.0 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$,并在注射后的5 min测痛阈值。

1.4 免疫组织化学

1.4.1 动物灌注和标本处理 行为学测定结束后注射苯巴比妥钠(100 mg/kg)处死大鼠。迅速行升主动脉插管,冷生理盐水快速灌注2 min,待从右心耳流出的液体转为无色透明时改为预冷的40 g/L多聚甲醛溶液灌注40 min。随后仔细将腰段脊髓(L4~L6)取出,继续置入40 g/L多聚甲醛溶液4 $^\circ\text{C}$ 后固定2 h。然后将组织转入150 g/L蔗糖溶液

4℃放置沉底,再转入 300 g/L 蔗糖溶液 4℃放置沉底。组织用 OCT 包埋,-22℃下行冰冻切片,片厚 20 μm。将切片置于冷 0.01 mol/LPBS 溶液中,裱在涂有多聚赖氨酸的清洁载玻片上,风干后置入 -20℃冰箱保存。

1.4.2 免疫荧光组织化学染色及定量分析 加 100 μL TBS 于组织切片,室温浸泡 30 min;加 TBS/Triton,10 min × 2 次;3%正常羊血清封闭 1 h;倾去羊血清,加入 50 μL 混合一抗:豚鼠抗大鼠 AChR α4 多克隆抗体(1:1 000;Chemicon,USA)和小鼠抗大鼠 NeuN 单克隆抗体 (1:400;Chemicon,USA);4℃孵育过夜;TBS 冲洗 10 min;TBS/Triton 冲洗 10 min × 2 次;加入 50 μL 混合二抗:Cy3 标记的羊抗豚鼠荧光二抗(1:400)和 FITC 标记的羊抗小鼠荧光二抗(1:400;Jackson ImmunoResearch,PA);室温避光孵育 2 h;TBS 冲洗 10 min × 3 次;Olympus 荧光显微镜下观察并照相。

根据细胞形态及与神经元标记物(NeuN)免疫荧光染色双染结果确定 nAChR α4 标记的阳性细胞(nAChRα4 immunoreactivity,nAChRα4-IR)。每只大鼠随机取 6 张切片,使用计算机图像分析系

统(Image-Pro-Plus,Silver Spring,USA)测量脊髓背角 I ~ IV 板层阳性细胞面积百分比(positive area ratio (%)),得到每只大鼠 nAChR α4-IR 阳性面积百分比的均数。每实验组选取 5 只大鼠。

1.5 统计学处理

所有实验结果以均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 10.0 统计分析软件进行统计学分析。鞘内注射各个剂量蛙皮素的痛阈值与基础阈值的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。蛙皮素镇痛效应,美加明拮抗效应及免疫荧光组化结果采用 *t*-检验(Independent *t*-test)进行雌雄组间差异比较。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 雌雄大鼠鞘内注射蛙皮素的镇痛作用

行为学测试结果显示,雄、雌大鼠的基础痛阈值分别为(4.03 ± 0.25)_s和(3.16 ± 0.23)_s,两者间存在统计学差异,雄鼠的基础痛阈值较雌鼠高(*P* = 0.022,*P* < 0.05,表 1)。

给予雌、雄大鼠鞘内注射生理盐水或蛙皮素

表 1 鞘内注射不同剂量蛙皮素产生的镇痛效应

Table 1 Antinociceptive effects of intrathecal administration of epibatidine at different doses

($\bar{x} \pm s$)

Group	Base line	0.0625 μg	0.125 μg	0.25 μg	0.5 μg	1.0 μg
Male	4.03 ± 0.25	4.82 ± 0.15	4.37 ± 0.01	5.49 ± 0.33 ¹⁾	6.32 ± 0.73 ¹⁾	10.74 ± 0.56 ¹⁾
<i>P</i>		0.199	0.882	0.003	0.000	0.000
Female	3.16 ± 0.23	4.05 ± 0.20	3.91 ± 0.22	5.13 ± 0.16 ¹⁾	6.76 ± 0.88 ¹⁾	12.86 ± 0.82 ¹⁾
<i>P</i>		0.063	0.149	0.000	0.000	0.000

Data are presented as $\bar{x} \pm s$ (*n* = 6 rats per group), 1) *P* < 0.01 vs. baseline.

(0.0625 μg 和 0.125 μg)后测得的痛阈值与基础阈值相比没有显著差异性(*P* > 0.05,表 1),表明低剂量的蛙皮素对雌雄大鼠均无明显镇痛作用。从 0.25 μg 剂量开始,蛙皮素的镇痛效应在雌雄大鼠均呈现剂量依赖性(表 1;图 1)。

值得注意的是,蛙皮素从 0.5 μg 剂量开始,镇痛效应出现雌、雄差异,其百分比 MPE 值分别为(30.40 ± 3.07)%和(20.85 ± 2.73)%(*P*_{0.5μg} = 0.042,*P* < 0.05);而给予 1.0 μg 蛙皮素后,雌雄大鼠%MPE 值分别为(81.90 ± 2.82)%和(61.15 ± 5.15)%,

两组间有显著差异(*P*_{1.0μg} = 0.005,*P* < 0.01,图 1)。

2.2 美加明拮抗蛙皮素镇痛作用存在性别差异

鞘内单独注射美加明 25 μg 对基础痛阈值没有影响,但却明显阻断 1.0 μg 蛙皮素鞘内注射引起的镇痛效应。在雄性大鼠,注射美加明+蛙皮素组百分比 MPE 仅为(4.59 ± 1.79)%,即与单独鞘内注射蛙皮素引起的镇痛效应相比减低了 92.49%;而在雌鼠组,美加明+蛙皮素组%MPE 为(10.10 ± 1.97)%,即阻断了蛙皮素 87.67%的镇痛效应。美加明的阻断效应雌雄两组间有显著性差

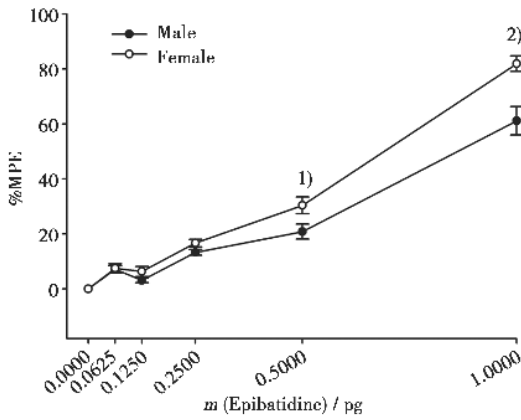


图 1 鞘内注射蛙皮素在雌雄大鼠引起镇痛效应的剂量-反应曲线

Fig.1 Dose-response curve for the antinociception of epibatidine in male and female rats

Data are shown as $\bar{x} \pm s$ ($n = 6$ rats per group/ per dose). Antinociception induced by epibatidine in the female group was significantly higher than that in the male group at 0.5 μg and 1.0 μg . 1) $P < 0.05$ or 2) $P < 0.01$ vs. male group.

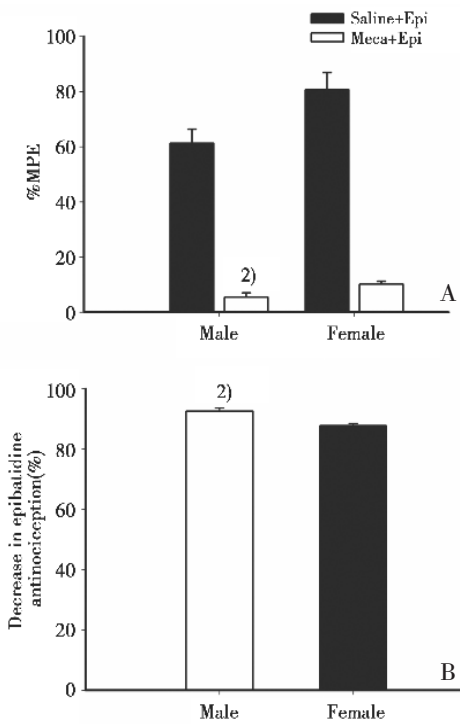


图 2 美加明阻断鞘内注射蛙皮素引起的镇痛效应
Fig.2 The blocking effect of mecamlamine on epibatidine-induced antinociception

A: Intrathecal epibatidine induced antinociception was significantly attenuated by mecamlamine pretreatment in male and female rats. B: The blocking effect was more potent in male than in female rats. Mecamlamine (Meca, 25 μg) was administrated 5 min before epibatidine (Epi) injection ($n = 6$ per group) and antinociceptive behavioral test was performed 5 min after epibatidine injection. 2) $P < 0.01$ vs. female group.

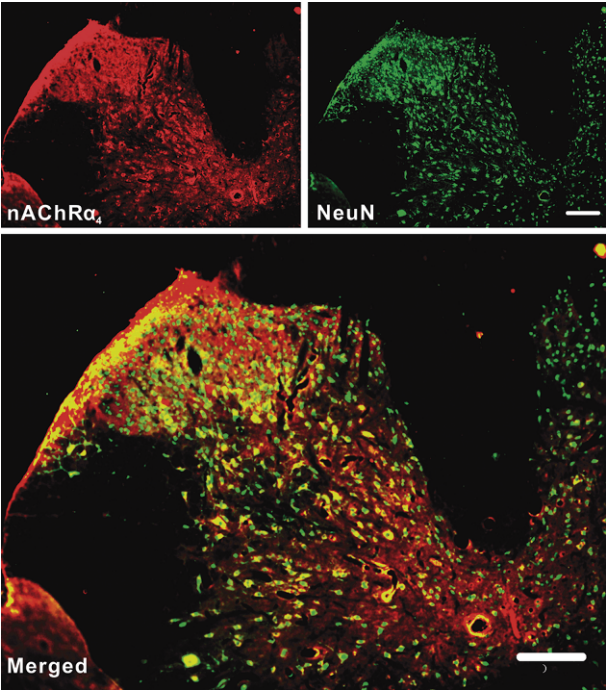


图 3 大鼠脊髓背角 nAChRα4 表达于神经元

Fig.3 Expression of nAChRα4 in the spinal dorsal horn of rat

Double-immunostaining showed that nAChRα4-IR neuron, which was indicated by colocalization (yellow) of nAChRα4 (red) with NeuN (green), distributed largely in deep lamina of the spinal dorsal horn. Bar: 100 μm .

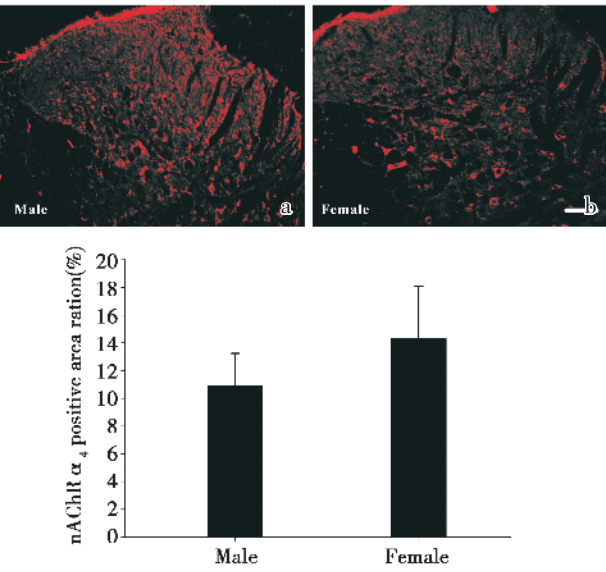


图 4 雌雄大鼠腰段脊髓背角 nAChRα4 表达

Fig.4 nAChRα4 expression in lumbar spinal dorsal horn in male (a) and female (b) rats ($n = 5$ per group)

Bar: 100 μm . Immunohistochemistry quantification reveals no difference in the nAChRα4 expression between female and male rats.

异($P = 0.008, P < 0.01$, 图 2)。

2.3 雌雄大鼠脊髓背角 nAChR α_4 的表达

免疫荧光组化染色结果显示, nAChR α_4 广泛分布于大鼠脊髓背角神经元细胞膜上。另外, 脊髓腹角及中央管周围神经元亦表达 nAChR α_4 (图 3)。图像分析结果显示虽然雌鼠 nAChR α_4 -IR 阳性面积百分比值较雄鼠高, 但两组间没有统计学差异($P > 0.05$, 图 4)。

3 讨 论

本研究发现: ①给予大鼠鞘内注射 nAChR 激动剂蛙皮素能够剂量依赖性的产生镇痛作用, 且在雌性大鼠的镇痛效应强于雄性大鼠; ②提前给予 nAChR 抑制剂美加明能够显著阻断蛙皮素的镇痛作用, 且在雄性大鼠的阻断效应明显大于雌性大鼠; ③nAChR α_4 表达于雌雄大鼠脊髓背角神经元, 但没有显著性别差异。以上结果提示, nAChR 激动剂的镇痛效应存在性别差异, 但此差异性不依赖于其受体表达。

临床及动物实验证实, 不同类型的镇痛剂, 其镇痛效应存在显著的性别差异^[11]。例如, 吗啡、可乐定在雌鼠的镇痛效果弱于雄鼠; 鞘内注射新斯的明则是雌鼠的镇痛效能较雄鼠高五倍^[12]。蛙皮素是一种高效的神经元烟碱型乙酰胆碱受体激动剂, 具有跟乙酰胆碱及烟碱类似的结构和功能^[13], 近年来研究表明, 蛙皮素通过与神经元烟碱受体结合而发挥强大的镇痛作用^[14]。神经元型 nAChR 由不同的 α 亚单位 (α_2 - α_{10}) 和 β 亚单位 (β_2 - β_4) 组成同源五聚体结构或由 α 亚单位组合成同源五聚体结构。在中枢神经系统, nAChR 广泛分布于皮层、海马、脊髓等部位, 参与认知、注意力、觉醒、痛觉调制等功能。已有文献报导烟碱影响的大鼠的认知能力存在性别差异, 雌性的敏感性低于雄性^[15]。然而, 烟碱受体激动剂镇痛效应的性别差异目前尚存在争议^[16]。本研究发现 nAChR 激动剂蛙皮素的镇痛作用也存在性别差异, 且在雌鼠的镇痛作用高于雄鼠。有研究显示, nAChR 非竞争性拮抗剂美加明能够剂量依赖性地阻断蛙皮素的镇痛作用^[17]。由于本研究发现蛙皮素的镇痛

效应存在性别差异, 因此, 为了进一步明确这种差异性, 我们给予大鼠提前注射美加明, 发现 25 μg 的美加明能够显著降低蛙皮素的镇痛作用, 且这种阻断效应在雄鼠比雌鼠更为显著, 提示蛙皮素镇痛效应的性别差异性可能存在 nACh 的受体机制。然而关于镇痛效应性别差异的机制目前尚不清楚。

有研究显示, 雌雄大鼠神经系统内阿片受体密度以及阿片类药物镇痛效应存在性别差异^[3]。因此, 受体表达的差异亦可能是蛙皮素镇痛效应出现性别差异的重要机制之一。nAChR α_4 亚单位在脊髓分布最广, 目前的研究普遍认为其与 β_2 亚单位组成 $\alpha_4\beta_2$ 聚合体与镇痛效应密切相关。敲除小鼠的 α_4 基因或阻断其表达, 可削弱激动剂与配体的亲和力, 导致烟碱诱发的镇痛效应下降^[4]。有研究发现雌鼠大脑内 nAChR 的受体密度较雄鼠高^[18]; 而雌激素可增加猴背侧脊核和蓝斑核 nAChR 的表达^[19]。为了明确鞘内注射蛙皮素镇痛效应的性别差异是否与脊髓烟碱受体分布和表达差异有关, 本研究对比了雌鼠和雄鼠腰段脊髓 nAChR α_4 的表达情况。我们研究表明, 大鼠腰段脊髓背角 nAChR α_4 均表达于神经元, 且其表达量未发现性别差异。因此我们推测, 蛙皮素镇痛效应的性别差异可能与雌雄大鼠烟碱受体表达的密度无关, 而是其他因素导致了镇痛效应的性别差异。例如, 有文献显示, 雌雄大鼠体内抗伤害系统结构和功能的存在性别差异^[1]; 另外, 有研究提示烟碱系统在雌性抗伤害过程中所起的作用远较在雄性中重要^[15]。新近的研究还发现在雌性动物, nAChR 激动剂可促进脊髓去甲肾上腺素类递质的释放而产生镇痛, 但在雄性中却缺乏这样的作用^[12, 20]。此外, nAChR 介导的信号转导途径也可能存在性别差异。

综上所述, 本研究发现 nAChR 激动剂蛙皮素的镇痛效应在大鼠存在性别差异, 且雌性的敏感性高于雄性。由于介导蛙皮素镇痛作用的受体 nAChR α_4 表达未检测到性别差异, 因此引起镇痛效应性别差异的潜在机制尚需要进一步研究。在临床麻醉中, 性别差异往往是导致麻醉镇痛药物用药过量或镇痛不足的一个重要原因, 因此本研

究的结果为临床上更精确地个体化用药提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Craft RM. Sex differences in drug-and non-drug-induced analgesia[J]. *Life Sci*, 2003, 72(24): 2675-2688.
- [2] Cook CD, Barrett AC, Roach EL, et al. Sex-related differences in the antinociceptive effects of opioids: importance of rat genotype, nociceptive stimulus intensity, and efficacy at the mu opioid receptor [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2000, 150(4): 430-442.
- [3] Candido J, Lutfy K, Billings B, et al. Effect of adrenal and sex hormones on opioid analgesia and opioid receptor regulation [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 42(4): 685-692.
- [4] Hood DD, Eisenach JC, Tuttle R. Phase I safety assessment of intrathecal neostigmine methylsulfate in humans[J]. *Anesthesiology*, 1995, 82(2): 331-343.
- [5] Kiehl JM, Bodnar RJ. Roles of gender and gonadectomy in pilocarpine and clonidine analgesia in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1992, 41(1): 153-158.
- [6] Walker JS, Carmody JJ. Experimental pain in healthy human subjects: gender differences in nociception and in response to ibuprofen[J]. *Anesth Analg*, 1998, 86(6): 1257-1262.
- [7] Unruh AM. Gender variations in clinical pain experience [J]. *Pain*, 1996, 65(2-3): 123-167.
- [8] Decker MW, Rueter LE, Bitner RS. Nicotinic acetylcholine receptor agonists: a potential new class of analgesics[J]. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4(3): 369-384.
- [9] Khan IM, Stanislaus S, Zhang L, et al. A-85380 and epibatidine each interact with disparate spinal nicotinic receptor subtypes to achieve analgesia and nociception [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297(1): 230-239.
- [10] 陈宇, 崔宇, 刘伟峰, 等. 吗啡耐受大鼠背根神经节磷酸化 p38 MAPK 的表达[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(6): 657-661.
- [11] Averbuch M, Katzper M. A search for sex differences in response to analgesia[J]. *Arch Intern Med*, 2000, 160(22): 3424-3428.
- [12] Chiari A, Tobin JR, Pan HL, et al. Sex differences in cholinergic analgesia I: a supplemental nicotinic mechanism in normal females [J]. *Anesthesiology*, 1999, 91(5): 1447-1454.
- [13] Gerzanich V, Peng X, Wang F, et al. Comparative pharmacology of epibatidine: a potent agonist for neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Mol Pharmacol*, 1995, 48(4): 774-782.
- [14] Spande TF, Garraffo HM, Yeh HJ, et al. A new class of alkaloids from a dendrobatid poison frog: a structure for alkaloid 251F[J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(6): 707-722.
- [15] Yilmaz O, Kanit L, Okur BE, et al. Effects of nicotine on active avoidance learning in rats: sex differences[J]. *Behav Pharmacol*, 1997, 8(2-3): 253-260.
- [16] Craft RM, Milholland RB. Sex differences in cocaine- and nicotine-induced antinociception in the rat[J]. *Brain Res*, 1998, 809(1): 137-140.
- [17] Badio B, Daly JW. Epibatidine, a potent analgetic and nicotinic agonist [J]. *Mol Pharmacol*, 1994, 45(4): 563-569.
- [18] Centeno ML, Henderson JA, Pau YK, et al. Estradiol increases alpha7 nicotinic receptor in serotonergic dorsal raphe and noradrenergic locus coeruleus neurons of macaques[J]. *J Comp Neurol*, 2006, 497(3): 489-501.
- [19] Saksida LM, Galea LA, Kavaliers M. Predator-induced opioid and non-opioid mediated analgesia in young meadow voles: sex differences and developmental changes[J]. *Brain Res*, 1993, 617(2): 214-219.
- [20] Lavand'homme PM, Eisenach JC. Sex differences in cholinergic analgesia II: differing mechanisms in two models of allodynia[J]. *Anesthesiology*, 1999, 91(5): 1455-1461.

(编辑 徐杰)