

• 基础研究 •

脊髓损伤后慢性中枢性疼痛与脊髓背角 P 物质关系研究

刘志芳 戴红* 高秀来 肖忠新 景鹏

[摘要] 目的 探讨脊髓损伤(SCI)后慢性中枢性疼痛(CCP)与 P 物质的关系。方法 选取 SD 大鼠 28 只,分为正常组(A组)、假手术组(B组),以及用 WADE 法复制出 SCI 后无 CCP 组(C组)和 CCP 组(D组)。取大鼠 T₁₃和 L₂ 脊髓节段,采用免疫荧光组织化学染色法结合激光共聚焦显微镜技术观察脊髓背角 P 物质(SP)的变化。结果 各组大鼠 T₁₃和 L₂ 节段脊髓背角 SP 含量比较为:D组较 C 组减少($P < 0.05$),较 A 组和 B 组明显减少($P < 0.01$);C 组较 A 组和 B 组减少($P < 0.05$);A 组与 B 组无显著性差异。结论 SCI 后 CCP 大鼠脊髓背角 SP 可能对 CCP 有某种程度的抑制作用。

[关键词] 脊髓损伤;慢性中枢性疼痛;脊髓背角;P 物质;免疫组织化学法;共聚焦激光扫描显微镜

Relationship of chronic central pain and substance P in spinal dorsal horn after spinal cord injury LIU Zhi-fang, DAI Hong, GAO Xiu-lai, et al. School of Public Health and Family Medicine, Capital University of Medicine Sciences, Beijing 100054, China

[Abstract] Objective To approach the neurobiochemical mechanism of chronic central pain (CCP) after spinal cord injury (SCI). Methods 28 SD rats were divided into four groups, the normal group (group A), the pseudosurgery group (group B), and groups with CCP (group C) and without CCP (group D) after L₁ spinal cord section injured with WADE method. T₁₃ and L₂ segments of rats' spinal cord were took and concentration changes of substance P (SP) in the spinal dorsal horn between two sections were examined by immunofluorescence histochemistry staining combined with confocal laser scanning microscope. Results Concentration of SP in the group D was decreased significantly compared with groups C, A and B ($P < 0.05-0.01$), that of the group C was less than that of group A and B ($P < 0.05$). Conclusion The rat model established by WADE method is proper to study CCP after SCI. SP in dorsal horn of spinal cord may inhibit the CCP after SCI in some degrees.

[Key words] spinal cord injury (SCI); chronic central pain; spinal dorsal horn; substance P (SP); immunohistochemical assay; confocal laser scanning microscope

中图分类号:R683.2 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)12-0719-03

慢性中枢性疼痛(chronic central pain, CCP)是脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)的合并症之一,为损伤平面以下皮肤感觉消失区域出现的形式多样的慢性疼痛^[1]。近年来,SCI 后 CCP 的机理逐渐受到康复医学界的关注。目前,有关 P 物质(substance P, SP)在外周伤害性刺激引起的急性疼痛中的作用的报道较多,但对其在 SCI 后 CCP 中的作用尚未见报道。本实验旨在观察 SCI 后 CCP 动物模型痛行为学改变和脊髓背角 SP 含量变化,探讨 SP 在 SCI 后 CCP 中可能的作用,为研究其生化机制和治疗方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用首都医科大学动物科学部提供的 SPF 级、健康成年 Sprague Dawley 大鼠 28 只,体重 200—250g。将大鼠分为正常组(A组)、假手术组(B组),以及 SCI 后无 CCP 组(C组)和 CCP 组(D组)。

1.2 方法

作者单位:1. 100054 北京市,首都医科大学公共卫生与家庭医学院(刘志芳、戴红、肖忠新);2. 100054 北京市,首都医科大学基础医学院(高秀来、景鹏)。作者简介:刘志芳(1973-),女,河北徐水县人,硕士,医师,主要研究方向:脊髓损伤中枢性疼痛的生物学机制。*指导教师,通讯作者:戴红。

1.2.1 SCI 模型建立 将大鼠用 6%水合氯醛(0.5 ml/kg)行腹腔麻醉,切除椎板暴露脊髓 L₁ 节段,用重 20g、尖端直径 2 mm 的铜棍在有机玻璃管引导下从 15 cm 处坠落至脊髓,造成 3×10^{-3} kgf·m 的 SCI。术后动物分笼饲养。B 组大鼠麻醉后只做椎板切除术,不损伤脊髓。对 SCI 大鼠,人工挤压排尿每日 3 次,3 日后改为每日 2 次,直至自主排尿(约术后 10 d);同时腹腔注射青霉素 2×10^5 U/周,1 次/天。测定大鼠的痛行为学改变,尤其注意伤后 10—15 d 的痛反应阈值变化。每日对大鼠自发痛行为学的变化(舔咬、搔抓损伤水平以下部位如后部躯干、后足、尾部等)观察 2 次。损伤后 2 周内痛反应阈值明显降低的大鼠或出现自发痛的大鼠记为 D 组;损伤后 2 周痛阈无明显降低的 SCI 大鼠记为 C 组。

1.2.2 免疫组化与共聚焦激光扫描检查 SCI 后 15 d,在 6%水合氯醛麻醉下将大鼠灌杀固定。灌注后取出脊髓,固定。可见脊髓砸伤部位几乎断裂,仅有少许硬脊膜相连。剥去硬脊膜,取与损伤节段相邻的吻、尾侧各 1 个脊髓节段(T₁₃和 L₂ 节段),用 Leica CM1850 型冰冻切片机做连续切片(横切),片厚 40 μm。切片隔 2 取 1 为 1 组,共分 3 组,收集于

0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS ,pH7.3) 中备用。

采用 Streptavidin/ Peroxidase 免疫组化试剂盒做荧光免疫组化染色。用 0.01 mol/L PBST(pH 7.2—7.4) 将兔抗 P 物质稀释为 1:500 浓度,室温孵育后,再用 0.01 mol/L PBST 彻底清洗 3 次,然后加入异硫氰酸荧光素(FITC) 标记的山羊抗兔 IgG 血清(以 0.01 mol/L PBST 稀释),室温下避光孵育后,再彻底清洗 3 次,裱片封片,4℃保存。为证明抗体特异性,用正常羊血清代替兔抗 SP 血清做对照实验,步骤同上。采用 Leica TCS-NT 型激光共聚焦显微镜软件操作。FITC 单通道扫描 SP 样阳性结构,计算荧光强度。图像资料储存在 SONY MO 光盘中,经过计算机应用软件进行系列光学图像三维立体重建和图像分析。图像资料在屏幕上观察,将所有图片经 Video Printer 打印。采用社会科学统计软件包 SPSS 10.0 对实验结果进行 *t* 检验和单因素方差分析,并做组间两两间差异显著性比较。

2 结果

2.1 SCI 后 CCP 模型大鼠的慢性痛行为学测定

2.1.1 诱发痛行为 与术前相比,D 组大鼠对非伤害性刺激有强烈的躲避、嘶叫或攻击行为,其痛阈值为(0.697±0.64)g,与 A 组(110g)、B 组(110g)和 C 组(110g)的痛阈值差异有非常高度显著性意义($P < 0.001$)。

2.1.2 自发痛行为(自噬现象) 在 D 组中,6 号鼠术后 10d 开始搔抓、修饰后爪和尾巴,全身颤抖、挣扎、撕咬笼网,自发嘶叫;1 号鼠术后 12d 咬断双后肢、足趾,撕脱皮肤、肌肉,露出骨头(自噬);9 号鼠术后 9d 拔掉下腹部及后肢的毛。这些反应是 SCI 后 CCP 动物模型出现的严重自发痛表现^[14],本次实验中的发生率为 56.25%,与本室以往实验中的发生率以及人类 SCI 后 CCP 的发生率相接近。

2.2 SP 免疫荧光组化染色和激光共聚焦显微镜检查

镜下 SP 样免疫荧光组化染色产物呈绿色荧光,于脊髓背角浅层有颗粒状、串珠状和斑块状 SP 阳性纤维及终末,未见完整细胞形态;中央管周围有中、小圆形细胞,偶见突触,细胞核及其余部位未见阳性结构。对照组大鼠脊髓未见 SP 样免疫阳性结构,可认为本实验所用的兔抗 SP 血清具有特异性。

脊髓背角 SP 样阳性结构的平均荧光强度测定结果见附表。采用单因素方差分析进行组间比较($n = 24$) 结果为:D 组 T_{13} 和 L_2 脊髓背角的 SP 阳性结构平均荧光强度低于 C 组($P < 0.05$),且明显低于 A 组及 B 组($P < 0.01$);C 组低于 A 组和 B 组($P < 0.05$);A 组与 B 组无显著性差异($P > 0.05$);各组内 T_{13} 和 L_2 的 SP 阳性结构平均荧光强度无显著性差异($P > 0.05$)。

附表 各组大鼠脊髓背角 SP 阳性结构平均荧光强度

部位	正常组(A组)	假手术组(B组)	SCI 无痛组(C组)	SCI 疼痛组(D组)
T_{13}	24.176±8.671	23.437±6.754	18.458±5.040 ^a	13.759±3.042 ^{b,c}
L_2	25.142±8.333	25.277±7.472	19.392±4.585 ^a	14.087±2.760 ^{b,c}

注:a:与 A 组和 B 组比较, $P < 0.05$;b:与 A 组和 B 组比较, $P < 0.01$;c:与 C 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

CCP 是指中枢神经系统本身病变所造成的自发痛(spontaneous pain)和诱发痛(evoked pain)^[2]。自发痛是指在有可见刺激条件下出现的疼痛;诱发痛包括痛觉过敏和痛觉超敏(allodynia),后者指非伤害性刺激(如机械性轻压、轻触等刺激)作用于损伤邻近部位引起的疼痛^[3,4]。

Bedbrook 指出,SCI 后感觉传入缺失造成的神经调节机制紊乱导致的中枢兴奋性升高是 CCP 的主要原因之一^[1]。Melzack 提出了 CCP 的“模式发生机制”学说^[5]。我室通过临床研究发现,SCI 后 CCP 患者中慢性痛超敏占一定比例,且自发痛是使患者痛不欲生的主要原因之一^[6]。

本研究建立动物模型采用的 WADE 法是公认的与临床上常见的 SCI 类型最为接近的致伤方法,其引起的动物痛行为反应与 CCP 临床症状相似(如患者发生严重自发痛时有搔抓、捶打、掐捏下肢等表现),慢性痛超敏和自噬现象发生率较高,而且 CCP 症状的出现有一定的潜伏期,也与临床情况相似。国外的动物模型与临床损伤情况相距较远^[7],多造成急性痛超敏,对自噬现象未见系统报道^[8]。

Melzack 等推测,当脊髓完全离断时,因缺乏感觉传入信息,高位中枢对疼痛的抑制机制减弱或消除,主要感觉、运动等多种传入通路上的神经元会产生异常的高频发放,从而产生 CCP^[5]。神经元池的异常高频发放是中枢兴奋性增高的表现,其生理学过程必然以与之相关的神经生化物质的系列改变为基础。脊髓背角 II 层是整个脊髓背角神经活性物质和受体种类最多及含量最丰富的部位,又是痛觉传导的第一驿站,因此,研究 SCI 后脊髓背角的生物化学变化特点对于揭示 SCI 后 CCP 的信息传递、调控、整合和发生机制具有重要意义。脊髓中的 SP 有 3 个来源:①从背根神经节释放到背角浅层;②脊髓上中枢神经元释放下行;③背角浅层含有 SP 的神经元^[9]。脊髓中的 SP 与痛觉信息处理具有密切而复杂的关系,既有传导外周伤害性刺激引起的痛觉作用,又有镇痛作用^[10]。

本研究发现,SCI 后 15d,D 组大鼠脊髓背角浅层 SP 阳性反应物较 C 组、A 组和 B 组大鼠减少。这可能与 CCP 的特殊性有关。Melzack 指出,CCP 的发生机制与外周皮肤痛觉的机制截然不同,它以非伤害性刺激引起的痛超敏和自发痛为主,其传导递质可能与外

周伤害性刺激引起的疼痛递质不同^[5]。有报道称,用 NK1 受体拮抗剂 CP96345 做鞘内注射,可减弱甲醛引起的外周痛觉反应、炎性疼痛和切口痛及坐骨神经切断后出现的痛觉异常^[11]。伤后 1—2h 脊髓背角 SP 增多,提示 SP 可能是这种类型疼痛的递质。而特异性 P 物质 NK1 受体拮抗剂可介导 SCI 大鼠的自噬行为,即严重 CCP 时的自发痛表现^[12,13]。

本研究采用 WADE 法造成大鼠脊髓背侧和旁侧严重损伤,传导皮肤痛觉的通路完全或大部分损伤,必然导致传导这种疼痛的递质 SP 减少。但对 CCP 而言,SP 与 NK1 受体结合可能起到治疗和预防严重自发痛的镇痛剂作用。本实验结果给这种推测提供了直接的证据。脊髓背角 SP 浓度在 CCP 大鼠 SCI 早期至 15d 可能是一个由高到低的发展变化过程,随着其浓度的降低,CCP 逐渐加重,造成 CCP 的迟发效应。

Piercey 等发现,鞘内注射 SP 拮抗剂可引起实验动物后肢局部麻痹,感觉异常^[14]; Vincent 等报道,SP 可抑制谷氨酸的兴奋性反应^[15]。这些文献提示,SP 在 SCI 后的过度减少,使其对谷氨酸兴奋性反应的抑制减弱,且参与 SCI 后中枢兴奋性升高的生理变化,促进 CP 的发生。总之,在不同的疼痛中,SP 的功能变化差异很大,表明它可能通过不同的机制参与不同疼痛疾患的调节。

有研究发现,SP 受体拮抗剂对抑郁症有很好的疗效,而对慢性痛及 CCP 患者而言,脑脊液中 SP 含量的减少和患者的负性精神活动有关^[16],提示 SP 含量的减少在病理性疼痛的产生过程中可能主要影响痛情绪中枢从而影响患者的痛情绪体验^[17]。

本研究结果显示,SCI 后无痛组大鼠背角 II 层 SP 阳性反应物少于正常组和假手术组大鼠,符合 Faden 等提出的脊髓损伤后 1—2h 脊髓背角 SP 含量升高,损伤后 1—3 周含量下降的规律^[18],即 SP 的含量随时间而变化。SCI 后脊髓背角的 SP 减少可能和大鼠的精神活动及情绪反应有关,与大鼠的运动功能障碍也有一定关系^[18]。而 SCI 后 CCP 组大鼠脊髓背角 SP 减少则表明,SCI 后 CCP 具有与伤害性刺激引起的疼痛和急性痛机制不同的分子基础,反映了疼痛机制的复杂性,提示 SCI 后脊髓可表达和合成不同的神经递质、受体等神经信息物质。这是 SCI 后脊髓可塑性的表现,也可能是 SCI 后 CCP 的直接原因之一。

综上所述,WADE 法建立的 SCI 后 CCP 动物模型适用于 SCI 后 CCP 发生机制的实验研究;SP 可能对 SCI 后中枢性疼痛有某种程度的抑制作用。

[参考文献]

- [1] George B. The total care and management of spinal cord injury [J]. Springer Verlag, 1981, 6: 108—112.
- [2] 徐晓军,郝军霞. 神经源性疼痛的动物模型的建立[J]. 中国疼痛医学杂志, 1995, 1(2): 16—19.
- [3] 谢益宽. 慢性痛的发生机理[J]. 科学通报, 1999, 44(22): 2353.
- [4] 吕国蔚. 痛觉过敏的中枢敏化机制及分子基础[J]. 中国疼痛医学杂志, 1996, 2(2): 114.
- [5] Melzack R, Loeser JD. Phantom body pain in paraplegics evidence for a central pattern general mechanism for pain[J]. Pain, 1978, 4: 195.
- [6] 戴红,谭郁玲,张洪,等. 陈旧性胸腰段脊髓损伤中枢性疼痛的发生机制探讨[J]. 中国康复医学杂志, 2001, 16(4): 212.
- [7] 戴红,肖忠新,胥少汀,等. 一种新的实验性脊髓损伤中枢性疼痛的动物模型的建立[J]. 中国康复医学杂志, 2002, 17(1): 18.
- [8] Hao JX, Xu XJ, Yu YX, et al. Transient spinal cord ischemia induces temporary hypersensitivity of dorsal horn wide dynamic range neurons to myelinated, but not unmyelinated, fiber input [J]. J Neurophysiol, 1992b, 68: 384.
- [9] Massari VJ, Tizabi Y, Park CH, et al. Distribution and origin of bombesin substance P and somatostatin in cat spinal cord [J]. Peptides, 1983, 4: 673—681.
- [10] 江澄川. 疼痛的基础与临床[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.
- [11] 胡兴国,张云翔,曾因明,等. 鞘内吗啡对切口痛疼痛模型大鼠脊髓背角 P 物质的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(11): 663—665.
- [12] Christensen MD, Everhart AW, Pickelman JT. Mechanical and thermal allodynia in chronic central pain following spinal cord injury[J]. Pain, 1996, 68(1): 97—107.
- [13] Wall PD, Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats[J]. Pain, 1983, 17: 321—339.
- [14] Piercey MF, Schroeder LA, Folkers K, et al. Sensory and substance P and methionine-enkephalin immunoreactivity[J]. J Neurosci, 1981, 2: 1369—1386.
- [15] Vincent JD, Barker JL. Substance P: Evidence for diverse roles in neuronal function from cultured mouse spinal neurons [J]. Science, 1979, 205: 1409—1411.
- [16] Almay BGL, Johansson F, Von Knorring L, et al. Substance P in CSF of patients with chronic pain syndromes[J]. Pain, 1988, 33: 3—9.
- [17] Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity[J]. Nature, 1983, 306: 686.
- [18] Faden AI, Thomas P, Jacobs, et al. Changes in substance P and somatostatin in the spinal cord after traumatic spinal injury in the rat[J]. Neuropeptides, 1985, 6: 215—225.

(收稿日期: 2003-11-10)