

蛛网膜下腔植入 APA-BCC 微胶囊对癌痛患者脑脊液中镇痛相关物质含量的影响

郭水龙, 潘静坤, 高宇红, 崔忻, 罗芸, 田磊, 薛毅珑

[摘要] 目的 观察蛛网膜下腔植入微囊化牛肾上腺嗜铬细胞(APA-BCC) 对癌痛患者中枢内源性脑啡肽类和儿茶酚胺类物质含量的影响。方法 随机将不同剂量的 APA-BCC 植入中、重度癌痛患者的腰段脊髓蛛网膜下腔内;应用放射免疫法检测移植前后脑脊液中亮氨酸脑啡肽(L-EK)、 β -内啡肽(β -EP) 和强啡肽 A(DynA) 的含量;应用高压液相法检测去甲肾上腺素(NA) 和肾上腺素(AD) 的含量;应用 NRS 法计算癌痛患者的疼痛缓解程度。结果 移植 APA-BCC 后, 脑脊液中 L-EK 含量上升, 移植剂量为 1.0×10^7 和 1.25×10^7 个细胞时, L-EK 升高最为显著, 分别升高 155.27% 和 154.28%; β -EP、DynA、NA 和 AD 含量无明显改变;完全缓解、部分缓解和无效的患者, L-EK 分别升高 241.07%、130.45% 和 115.78%。结论 APA-BCC 植入对癌痛患者的镇痛效应可能与中枢 L-EK 含量升高有关; 1.0×10^7 和 1.25×10^7 可能是较佳的细胞移植剂量。

[关键词] 移植;镇痛;嗜铬细胞

Effect of APA Microencapsulized Bovine Chromaffin Cells Transplantation on Endogenous Opioid Peptides and Catecholamine Concentration in CSF of Cancer Pain Patients GUO Shui-long, PAN Jing-kun, GAO Yu-hong, et al. Institute of Geriatrics, the General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of APA-BCC (alginate-polylysine-alginate microencapsulated bovine adrenal medullary chromaffin cells) microcapsules transplantation into the subarachnoid space of cancer pain patients on endogenous opioid peptides and catecholamine concentration in cerebrospinal fluid (CSF). **Methods** The different doses of APA-BCC microcapsules were transplanted into the spinal subarachnoid space of cancer patients with moderate or serious pain. The concentrations of Leu-enkephalin (L-EK), β -endorphin (β -EP), dynorphin A (DynA), noradrenaline (NA) and adrenaline (AD) in CSF were tested. **Results** L-EK concentration in CSF increased remarkably after transplantation, and the increase was most remarkable when transplantation doses were 1.0×10^7 and 1.25×10^7 ; there were no remarkable changes of β -EP, DynA, NA and AD after transplantation. **Conclusion** The analgetic effects of APA-BCC microcapsules transplantation may correlate with the increase of L-EK in CSF of cancer pain patients; the dose of 1.0×10^7 and 1.25×10^7 cells may be the most effective dose.

Key words: transplantation; ease pain; chromaffin cell

[中图分类号] R459.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2008)02-0164-02

[本文著录格式] 郭水龙, 潘静坤, 高宇红, 等. 蛛网膜下腔植入 APA-BCC 微胶囊对癌痛患者脑脊液中镇痛相关物质含量的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2008, 14(2): 164-165.

肾上腺髓质嗜铬细胞可分泌儿茶酚胺类物质, 如去甲肾上腺素(noradrenalin, NA) 和肾上腺素(adrenalin, AD), 同时还可分泌多种内源性啡肽类物质, 如亮氨酸脑啡肽(leu-enkephalin, L-EK) 和甲硫氨酸脑啡肽等(Met-enkephalin, MEK)^[1,2]。儿茶酚胺中的 NA 和脑啡肽类物质是经典中枢神经递质, 参与中枢镇痛的神经调制。近年来, 国内外将同种或异种肾上腺髓质组织或嗜铬细胞植入蛛网膜下腔以治疗慢性顽固性疼痛, 并取得了良好的镇痛效果^[3-5]。海藻酸钠-多聚赖氨酸-海藻酸钠(alginate-polylysine-alginate, APA) 微胶囊包裹是一种免疫隔离技术, 可以减少移植免疫排斥反应的发生。本实验组和国外研究组的前期实验证明, 微囊化牛嗜铬细胞(bovine chromaffin cell, BCC) 可以正常分泌儿茶酚胺类和脑啡肽类镇痛物质并有良好的长效镇痛效果^[6-11]。本研究组前期的临床实验表明, APA-BCC 脊髓蛛网膜下腔移植可以明显缓解患者的疼痛症状, 且镇痛效果可能与患者脑啡肽浓度的升高有关。本实验在前期临床研究的基础上, 进一步扩大样本数, 同时还检测了患者脑脊液中儿茶酚胺类物质的浓度, 以期更准确全面地探讨 APA-BCC 移植的镇痛机制。

1 材料与方法

基金项目: 1. “十五”军队重点项目基金资助(No. 01 Z031); 2. 国家 863 计划资助(No. 2002 AA216141)

作者单位: 解放军总医院老年医学研究所细胞生物室, 北京市 100853。作者简介: 郭水龙(1977-), 男, 河南新乡市人, 助理研究员, 主要研究方向: 细胞移植。通讯作者: 薛毅珑。

1.1 试剂 I 型胶原酶、海藻酸钠、多聚赖氨酸、鼠抗 TH1 抗(Sigma 公司); DE ME 培养基(Gibco 公司); L-EK、 β -内啡肽(β -endorphin, β -EP) 和强啡肽 A(强啡肽 A, DynA) 检测试剂盒(第二军医大学); 抑肽酶(Boehringer 公司); 鼠抗 D β H1 抗、鼠抗 L-EK1 抗(Che micon 公司); SABC 免疫组化检测试剂盒(中山公司)。

1.2 APA-BCC 的制备 按本组以前报道的方法制备 APA-BCC^[6,10]。

1.3 患者及移植 晚期癌痛患者(主要为肺癌、乳腺癌、直肠癌、结肠癌等, 伴有中、重度疼痛, 需长期使用镇痛药) 32 例, 随机分为 0.5(n=3)、1.0(n=10)、1.25(n=16) 和 1.5(n=3) 4 个剂量组, 1 个剂量等于 1.0×10^7 个 APA-BCC。常规方法在腰 L₃~L₅ 段行脊髓蛛网膜下腔穿刺, 注入 APA-BCC 悬液约 5~8 ml(37.0℃)。移植后 6~8 d 用相同腰穿的方法获取患者的脑脊液。

1.4 脑脊液中内源性啡肽类物质检测 脑脊液收集后, 迅速煮沸 5 min, 1500 r/min 离心 5 min, 吸取上清, 放射免疫法检测 L-EK、 β -EP 和 DynA 浓度。

1.5 儿茶酚胺类物质检测 脑脊液收集后, 加入高氯酸去除蛋白, 用高压液相-电化学法检测脑脊液中 NA 和 AD 的含量。

1.6 疼痛缓解程度 按通用的数字分级法(Number Rating Scale, NRS) 记录患者疼痛变化的情况。NRS 法为 0~10 数字疼痛强度分级法, 0 为无痛, 1~3 为轻度疼痛, 4~6 为中度疼痛, 7~10 为重度疼痛。计算 NRS 下降的百分数[=(疗前 NRS 分值-疗后 NRS 分值)/疗前 NRS 分值 \times 100%]。按照 NRS

下降的百分数将镇痛效果分级:完全缓解(CR)为100%;部分缓解(PR)为25%~99%;无效(NR)为<25%。

1.7 统计学处理 所得数据以($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 10.0和Stata 7.0软件,采用配对 *t* 检验 秩和检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 APA-BCC 移植前后脑脊液中内源性啡肽类物质水平的变化 与移植前比较,APA-BCC 植入后6~8 d时,癌痛患者脑脊液中L-EK含量显著升高($P < 0.001$),升幅达77.4%;而β-EP和DynA的含量无显著变化($P > 0.05$),见表1。

表1 APA-BCC 移植前后癌痛患者脑脊液中L-EK、β-EP和DynA水平的变化(ng/L , $\bar{x} \pm s$)

项目	n	移植前	移植后6~8 d
L-EK	30	12.00 ± 8.68	21.29 ± 14.07 ^a
β-EP	30	57.13 ± 32.62	43.75 ± 22.87
DynA	30	4.98 ± 2.84	5.22 ± 3.52

注:a.与移植前比较, $P < 0.001$ 。

2.2 APA-BCC 移植前后脑脊液中儿茶酚胺类物质水平的变化 与移植前相比,APA-BCC 植入后癌痛患者脑脊液中儿茶酚胺类镇痛物质NA和AD的浓度无明显变化($P > 0.05$),见表2。

表2 APA-BCC 移植前后癌痛患者脑脊液中NA和AD水平的变化($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

指标	n	移植前	移植后
NA	32	3.65 ± 3.49	4.05 ± 2.90
AD	30	10.07 ± 9.40	8.63 ± 6.86

2.3 APA-BCC 移植剂量与脑脊液中L-EK含量变化的关系 当APA-BCC的移植剂量为1.0和1.25时,患者脑脊液中L-EK升高明显,分别比移植前升高155.27%和154.28%,而0.5和1.5剂量组升高较少,分别比移植前升高57.37%和61.01%,见表3。

表3 不同剂量APA-BCC微胶囊移植前后癌痛患者脑脊液中L-EK含量的变化

组别	n	L-EK 升高百分数(%)
0.5 剂量组	3	57.37 ± 33.92
1.0 剂量组	8	155.27 ± 146.60
1.25 剂量组	16	154.28 ± 224.64
1.5 剂量组	3	61.01 ± 63.03

2.4 APA-BCC 移植镇痛效果与脑脊液L-EK含量变化的关系 与移植前相比,CR组(完全缓解)患者脑脊液中L-EK含量升高最明显,达241.07%,但与PR、NR组相比,并无统计学意义,见表4。

表4 APA-BCC 移植后镇痛效果与L-EK含量升高的关系

镇痛效果	n	L-EK 升高(%)
CR	4	241.07 ± 155.75
PR	18	130.45 ± 205.99
NR	6	115.78 ± 138.51

3 讨论

已知机体的镇痛过程与中枢神经系统中某些细胞产生的一些化学递质相关,如内源性阿片肽类物质和NA。研究已证明,肾上腺髓质嗜铬细胞可以分泌多种与镇痛相关的物质,如NA、AD、亮啡肽、甲啡肽等^[11]。本研究结果显示,移植BCC能引起人脑脊液中脑啡肽类镇痛物质(L-EK)含量的升高,且L-EK的升高与镇痛效果之间有一定的量效关系,但未改变脑脊液中β-EP、DynA和儿茶酚胺类物质的含量。脑啡肽是参与中枢镇痛的三类内源性啡肽类物质,嗜铬细胞可以分泌L-EK和M-EK两种脑啡肽,却无法合成分泌β-EP和DynA。推测β-EP

和DynA可能并不参与BCC的镇痛作用,同时也表明宿主脑脊液中脑啡肽类物质含量升高可能是由嗜铬细胞直接分泌引起的,而与宿主细胞受刺激间接分泌啡肽类物质无关。

因此,我们推测BCC移植的镇痛机理可能是:移植的BCC分泌大量脑啡肽并引起宿主脑脊液中脑啡肽含量改变,大量的脑啡肽作为神经递质参与抑制痛觉信息的上行传递,这是镇痛作用的主要原因,而BCC分泌的儿茶酚胺类镇痛物质则可能通过增强脊髓痛觉下行抑制通路而起辅助镇痛作用,两类镇痛物质之间的协同效应可显著增强镇痛效果。临床实践也证明,吗啡类镇痛药与α2肾上腺素能受体激动剂—可乐定同时使用可显著增强阿片止痛药的中枢镇痛效果并减少其使用量^[1]。此外,国外最近的研究显示,鞘内移植BCC可显著降低福尔马林引起的脊髓c-Fos蛋白表达,抑制伤害感受神经元的活性^[12]。

本研究的剂效结果显示,每人每次使用1.0~1.25 × 10⁷个细胞为较佳剂量,低剂量的镇痛效果较差,提高剂量到1.5 × 10⁷个细胞时疗效不再提高,并且单次使用高剂量易出现背部沉重压迫感、下肢震颤等较严重的锥体外系症不良反应。

本实验结果显示,BCC移植的镇痛效应与中枢脑啡肽类物质浓度的升高有关,但目前对嗜铬细胞移植的镇痛作用机制仍不十分明确,比如BCC分泌的多种神经营养因子在镇痛过程中的作用。我们将在今后的实验中逐步探讨嗜铬细胞移植的镇痛作用机制,为其发展成为一种新的疼痛治疗方法奠定基础。

[参考文献]

[1] Livett BG, Dean DM, Whelan LG, et al. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells[J]. Nature, 1981, 289(22): 317—319.

[2] Duplan H, Li RY, Vue C, et al. Grafts of immortalized chromaffin cells bioengineered to improve met-enkephalin release also reduce formalin-evoked c-fos expression in rat spinal cord[J]. Neurosci Lett, 2004, 370(1): 1—6.

[3] Sage J, Wang H, Tresco P, et al. Transplants of immunologically isolated xenogeneic chromaffin cells provide a long-term source of pain-reducing neuroactive substances[J]. J Neurosci, 1993, 13: 2415—2423.

[4] Lu Y, Jing R, Yeomans DC, et al. Porcine chromaffin cells, culture, and transplant for antinociceptive effects in rodents and primates[J]. Neurol Res, 2004, 26(7): 707—712.

[5] Winn SR, Emerich DF. Managing chronic pain with encapsulated cell implants releasing catecholamines and endogenous opioids[J]. Front Biosci, 2005, 10: 367—378.

[6] Moustafa T, Girod S, Tortosa F, et al. Viability and functionality of bovine chromaffin cells encapsulated into alginate-PLL microcapsules with a liquefied inner core[J]. Cell Transplant, 2006, 15(2): 121—133.

[7] 薛毅琰,何立敏,李留树,等. APA微囊化牛肾上腺嗜铬细胞注射于脊髓蛛网膜下治疗20例慢性疼痛患者的初步观察[J]. 中华器官移植杂志, 2000, 21(6): 372—374.

[8] Xue YL, He LM, Li LS, et al. Pain relief by xenograft of subarachnoid microencapsulated bovine chromaffin cells in cancer patients[J]. Prog Nat Sci, 2000, 10(12): 1—6.

[9] 郭水龙,薛毅琰,罗芸,等. 培养微囊化牛肾上腺嗜铬细胞的儿茶酚胺和亮氨酸脑啡肽的分泌[J]. 中国临床康复, 2004, 8(11): 2078—2079.

[10] Xue YL, He LM, Li LS, et al. Primary study on microencapsulated bovine adrenal BCC xenogenic implantation for treatment of chronic pain[J]. Chin Med J, 2000, 62(11): 245.

[11] 徐龙河,薛毅琰,罗芸,等. APA微囊化嗜铬细胞移植对神经性疼痛大鼠的效应[J]. 军医进修学报, 2004, 25(2): 131—133.

[12] Sol JC, Li RY, Sallerin B, et al. Intrathecal grafting of porcine chromaffin cells reduces formalin-evoked c-Fos expression in the rat spinal cord[J]. Cell Transplant, 2005, 14(6): 353—365.

(收稿日期:2007-05-23 修回日期:2007-08-07)