

脊神经结扎神经病理痛模型大鼠脊髓 星形胶质细胞激活与痛行为的关系*

赵红 姜玉秋 孙钱 孙艳妮 刘风雨 石玉顺 万有

(北京大学神经科学研究所、神经生物学系,教育部神经科学重点实验室,北京 100083)

摘要 目的:研究 L5 脊神经结扎模型大鼠脊髓星形胶质细胞的激活与痛行为之间的关系。方法:44 只雄性 SD 大鼠 180~220 g,随机分成 4 组,分别为假手术组、脊神经结扎 1 天、3 天和 7 天组。行为学上使用 von Frey Hair 测定大鼠在上述各时间点 50% 缩足阈的变化 (n=8),星形胶质细胞的激活使用免疫组织化学方法观察其特异性标志物 GFAP 的染色情况 (n=3)。结果:(1)脊神经结扎后 1 天动物出现机械性痛超敏,3 天和 7 天痛行为稳定并持续存在;假手术组未见显著变化。(2)结扎侧脊髓背角星形胶质细胞在术后 1 天发生激活,3 天和 7 天可见星形胶质细胞强烈的激活反应,假手术组亦可见轻微的激活。(3)脊神经结扎后,星形胶质细胞发生了激活,其激活程度和痛行为的产生和维持紧密相关。结论:脊髓背角星形胶质细胞的激活可能在神经病理痛中发挥作用。

关键词 星形胶质细胞;胶质原酸性蛋白;神经病理痛;脊神经结扎

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE SPINAL ASTROCYTIC ACTIVATION AND NEUROPATHIC PAIN BEHAVIOR FOLLOWING SPINAL NERVE LIGATION

ZHAO Hong, JIANG Yu-Qiu, SUN Qian, SUN Yan-Ni, LU Feng-Yu, SHI Yu-Shun, WAN You

(Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University, Key Lab for Neuroscience, the Ministry of Education, Beijing 100083)

Abstract Objective: To investigate the relationship between the spinal astrocytic activation and neuropathic pain behavior in L5 spinal nerve ligation (SNL) rats. Methods: 44 male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham, SNL 1 d, SNL 3 d and SNL 7 d groups. Animal mechanical allodynia was represented by 50% paw withdrawal threshold (50% PWT) that was assessed with von Frey filaments (n=8). Using immunohistochemistry technique, GFAP was examined to evaluate the activation of astrocytes (n=3). Results: (1) The mechanical allodynia of the left hind paw appeared on day 1 after SNL, and continuously existed from day 3 to day 7. No significant change of mechanical allodynia was observed in sham group. (2) In the ipsilateral (lesion side) lumbar dorsal horn, GFAP immunoreactivity was observed at day 1. This kind of astrocytic activation maintained intense at day 3 and 7, but a slight degree of astrocytic activation was observed in sham group. (3) Astrocytes were activated in the spinal cord in SNL rats, the degree of astrocytic activation correlated well with the development and maintenance of neuropathic pain. Conclusion: Astrocytic activation in the spinal dorsal horn might play a role in neuropathic pain.

Key words Astrocyte; Glial fibrillary acidic protein (GFAP); Neuropathic pain; Spinal nerve ligation (SNL)

* 国家自然科学基金 (30330230, 30570566)和北京市自然科学基金 (7052039)资助
通讯作者

神经病理痛 (neuropathic pain)是指中枢或者外周神经系统损伤或疾病引起的疼痛综合征,以自发性疼痛 (spontaneous pain)、痛觉过敏 (hyperalgesia)和痛超敏 (alldynia)为特征。近年来,胶质细胞的激活成为疼痛研究领域的新亮点^[1]。本实验以 L₅ 脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL)大鼠作为神经病理痛模型,通过测定 SNL 大鼠机械性痛敏的变化和脊髓背角星形胶质细胞的激活情况,进一步探讨神经病理痛大鼠星形胶质细胞的激活和动物痛行为之间的关系。

材料与方法

1. 动物的分组和模型制备

雄性 SD 大鼠由北京大学医学部实验动物中心提供,体重 150 ~ 180 g,随机分为 4 组,分别是假手术组、SNL 1 天、SNL 3 天和 SNL 7 天组。每组 11 只,其中 8 只用于行为学检测,3 只用于免疫组织化学分析。

按照 Kim 和 Chung^[2]方法制作 SNL 模型。大鼠经水合氯醛 (300 mg/kg, ip) 麻醉后,置于俯卧位,背部切开皮肤,钝性分离左侧椎旁肌肉,暴露 L₅ 脊神经,并用 6 号丝线紧紧结扎,止血、缝合并注射青霉素预防感染。假手术大鼠操作与手术大鼠相同,但不结扎神经。

2. 动物机械性痛敏的测定

按 Chaplan 等^[3]报道的“up and down”方法,用 von Frey 纤维 (Stoelting 公司,美国)测定大鼠后足 50% 的缩足阈。15 g 为本法可测定的最大 50% 缩足阈值,0.25 g 为本法测定的最小 50% 缩足阈值。当 50% 缩足阈值小于 4 g 时认为出现痛敏。术前和术后 1 天、3 天和 7 天测定假手术组和手术组 50% 缩足阈值。

3. 免疫组织化学实验

术后 1 天、3 天和 7 天,动物 10% 水合氯醛 (300 mg/kg, ip) 麻醉后,打开胸腔,行左心室灌流。取腰膨大段于恒冷切片机中做连续切片,切片厚度 14 μm。

脊髓切片经水化、灭活内源性过氧化氢酶、封闭,加入 GFAP 多克隆抗体 (Dako 公司) 1 : 750, 4 过夜后,依次加入生物素标记的二抗 (SP-9001, 中山)、辣根过氧化物酶标记链酶卵白素 (SP-9001, 中山),之后 3,3 联苯二胺 (DAB) 显色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片后显微镜下照相。

4. 统计学处理

行为学采用上述公式计算的动物足底 50% 的缩足阈值,免疫组化采用 Metamorph 软件对结扎侧脊髓背角浅层进行平均灰度分析,每个脊髓标本选取 5 张切片,求其灰度的平均值。数据统计分析采用 Prism 4.0 软件进行,其结果用平均值 ± 标准误差 (mean ± s e m) 表示。多组数据间差异用单因素方差分析 (one way ANOVA) 并继之以 Dunnett's *post hoc* 检验,以 $P < 0.05$ 作为检验水准。

结 果

1. 脊神经结扎后大鼠左侧足底 50% 缩足阈下降

脊神经结扎后 1 天,大鼠结扎侧足底 50% 缩足阈较术前基础值有明显的下降,即动物出现机械性痛超敏,3 天和 7 天,该痛行为稳定并持续存在 (与手术前正常动物比较, $P < 0.01$)。假手术组动物足底 50% 缩足阈较术前基础值未有显著变化 (与手术前正常动物比较, $P > 0.05$, 见图 1)。

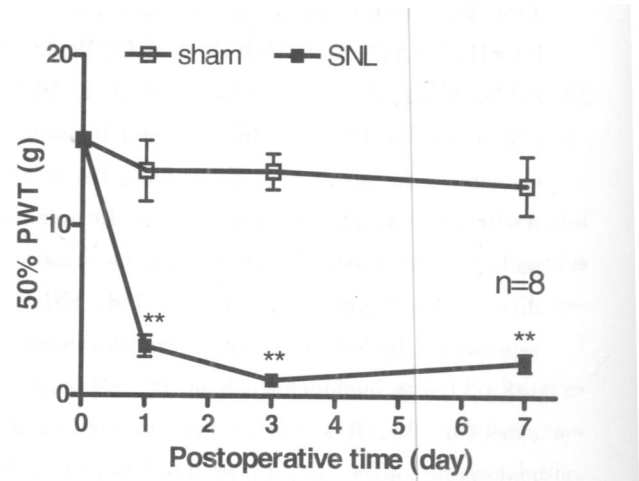


图 1 大鼠脊神经结扎后机械性痛敏的变化。术后 7 天内假手术大鼠和 SNL 模型大鼠结扎侧足底 50% 缩足阈的变化。

** : $P < 0.01$, 与术前正常对照组相比

Fig 1 Tactile allodynia in rats after SNL. The change of 50% paw withdrawal threshold (50% PWT) in sham and SNL rats within 7 days ** : $P < 0.01$, compared to the pre-operation control

2. 免疫组织化学方法显示脊髓背角 GFAP 染色加深,胶质细胞激活

采用免疫组织化学 (DAB 显色) 的方法,观察假手术 (sham) 以及脊神经结扎后 1 d (SNL 1d), 3 d (SNL 3d) 和 7 d (SNL 7d) 各时间点星形胶质细胞的反应 (见图 2A 和 2B)。从图中可以看出, SNL 1 d

结扎侧脊髓背角 GFAP染色较假手术组增强, SNL 3 d和 SNL 7 d GFAP染色较假手术组有明显的增强, 即提示神经损伤后 1 d星形胶质细胞发生了激活, 3 d和 7 d星形胶质细胞发生了强烈的反应; 未结扎侧的星形胶质细胞未发生此种改变。假手术组亦可见结扎侧脊髓背角星形胶质细胞的轻微激活。

我们对结扎侧脊髓背角浅层进行了平均灰度值分析, 用此值代表星形胶质细胞的激活程度 (见图 2C)。脊神经结扎后 1天, 星形胶质细胞发生了激活, 3天和 7天, 星形胶质细胞的激活程度逐渐增加。

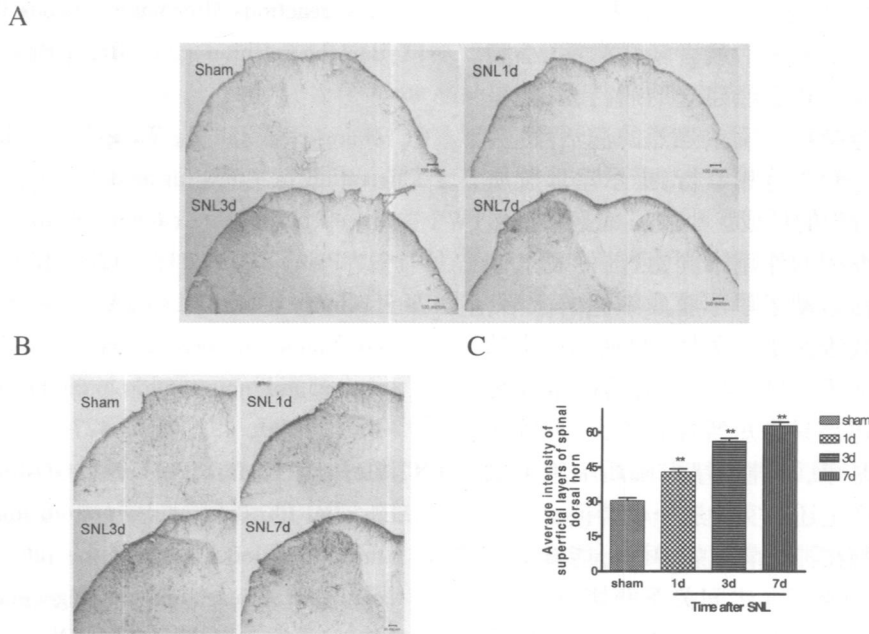


图 2 免疫组化染色显示脊神经结扎后不同时间点脊髓背角 GFAP染色变化。(A)脊神经结扎后 1 d、3 d和 7 d脊髓 GFAP免疫组织化学染色。Scale bar = 100 μm。(B)为(A)图结扎侧脊髓背角的放大图。Scale bar = 50 μm。(C)为(A)图结扎侧脊髓背角浅层平均灰度值的定量分析。*、*: P < 0.01, 与假手术组相比

Fig 2 GFAP immunoreactivity in the spinal dorsal horn after spinal nerve ligation (A) Immunostaining of GFAP in the spinal dorsal horn at days 1, 3 and 7 after SNL. Scale bar = 100 μm. (B) Two-fold higher magnification in (A). Scale bar = 50 μm. (C) Quantification of average intensity in the superficial layers of the ipsilateral spinal dorsal horn as shown in (A). *、*: P < 0.01, compared with the sham group

讨 论

1. 星形胶质细胞的激活反应与神经病理痛行为的关系

中枢神经系统中的星形胶质细胞执行着多种功能, 如参与构成血脑屏障, 调节细胞外离子和神经递质的浓度, 维持细胞外 pH 值的稳定等。许多刺激可以激活星形胶质细胞, 如神经损伤、炎症、神经系统感染以及各种致痛因子等。星形胶质细胞激活后发生一系列的改变, 如增生、肥大、GFAP合成增多和前炎症因子释放增多等。1994年, Garrison等^[4]通过免疫组织化学技术发现在坐骨神经压迫模型中星形胶质细胞是激活的, 如果用药物 MK-801 阻断异常的疼痛传导也可以阻断胶质细胞的激活, 胶质细胞的激活和放大性疼痛之间有很强的相关性, 这样就将胶质细胞和疼痛联系起来。后来随着研究的

不断深入, 人们逐渐发现胶质细胞在许多痛模型中是激活的^[5-7]。在本次实验中, 我们对脊神经结扎后不同时间点星形胶质细胞的反应做了一系列观察, 发现星形胶质细胞在脊神经结扎后的 1天发生了激活, 3天和 7天, 星形胶质细胞发生了强烈的激活反应。星形胶质细胞的激活主要发生在结扎侧的脊髓背角, 未结扎侧和脊髓腹角未见星形胶质细胞的激活。这和文献已有的报道相一致, 神经损伤后, 星形胶质细胞在神经投射的区域发生了激活^[8,9]。脊髓是传递从外周到大脑疼痛信息的中继站, 传递疼痛的初级传入神经元轴突末梢终止于脊髓背角的不同层面, 在此与不同类型的脊髓次级神经元发生联系。其中中等直径有髓鞘 A 纤维和小直径无髓鞘 C纤维终止于脊髓背角浅层^[10], 这两种纤维介导伤害性信息的传递。因此, 脊髓背角浅层被认为是和疼痛传导相关的部位。星形胶质细胞在此处发生

激活提示这类细胞可能参与了伤害性信息的传导。

脊神经结扎后 1 天动物即出现明显的机械性痛敏, 3 天和 7 天动物维持在高水平的痛敏状态。假手术组未见明显的行为学变化。星形胶质细胞的激活也发生在脊神经结扎后的 1 天, 3 天和 7 天, 激活的程度呈上升的趋势。脊髓中的胶质细胞包括星形胶质细胞和小胶质细胞。根据已有文献报道^[11], 脊神经结扎后小胶质细胞不激活或者轻微激活, 小胶质细胞的抑制剂不能反转已经建立的痛行为; 而星形胶质细胞在脊神经结扎后发生强烈的激活反应, 并且与痛行为的发生和维持相平行, 提示星形胶质细胞可能参与了痛行为的形成。小胶质细胞和星形胶质细胞在疼痛中发挥的作用不同, 目前的观点认为小胶质细胞的激活启动了星形胶质细胞的激活, 而星形胶质细胞的激活程度与放大性疼痛的产生和维持相关^[12]。星形胶质细胞与痛行为的产生和维持的整个过程相关还是只是短暂性相关, 星形胶质细胞的激活是因还是果, 单纯的星形胶质细胞的激活可否诱发痛敏的产生还需实验进一步验证。

2 星形胶质细胞在神经病理痛中的可能意义

星形胶质细胞和神经元之间关系密切, 它们对神经元周围微环境的改变非常敏感, 能迅速发生反应。发生反应的胶质细胞能释放大量的神经活性物质和促炎性因子, 这些物质能增加初级传入神经末梢痛递质的释放和增加痛觉传递神经元的兴奋性来扩大痛觉传递, 并和神经元之间形成了一个反馈环路^[13]。由此可见胶质细胞不再是中枢神经系统中的一个静止不动的成分, 而是处于一个与神经元不断进行信息交流的动态过程。胶质细胞通过胶质网络传递信号, 从而与神经元互补, 共同参与疼痛的传导。有关胶质细胞和疼痛关系的深入认识, 将为研制慢性痛的药物提供新的靶点。

参 考 文 献

- 1 李卉丽, 秦绿叶, 万有, 等. 疼痛研究的新亮点: 星形胶质细胞. 生理科学进展, 2003, 34: 45 ~ 48.
- 2 Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 1992, 50: 355 ~ 363.
- 3 Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.

- J Neurosci Methods, 1994, 53: 55 ~ 63.
- 4 Garrison CJ, Dougherty RM, Carlton SM. GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol*, 1994, 129: 237 ~ 243.
- 5 Fu KY, Light AR, Matsushima GK, et al. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw. *Brain Res*, 1999, 825: 59 ~ 67.
- 6 Zhang RX, Liu B, Wang L, et al. Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia. *Pain*, 2005, 118: 125 ~ 136.
- 7 Colburn RW, DeLeo JA. The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull*, 1999, 49: 419 ~ 427.
- 8 Hajos F, Csillik B, Knyihar-Csillik E. Alterations in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the upper dorsal horn of the rat spinal cord in the course of transganglionic degenerative atrophy and regenerative proliferation. *Neurosci Lett*, 1990, 117: 8 ~ 13.
- 9 Murray M, Wang SD, Goldberger ME, et al. Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. *Exp Neurol*, 1990, 110: 248 ~ 257.
- 10 Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*, 1992, 355: 75 ~ 78.
- 11 Colburn RW, Rickman AJ, DeLeo JA. The effect of site and type of nerve injury on spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Exp Neurol*, 1999, 157: 289 ~ 304.
- 12 Winkelstein BA, DeLeo JA. Nerve root injury severity differentially modulates spinal glial activation in a rat lumbar radiculopathy model: considerations for persistent pain. *Brain Res*, 2002, 956: 294 ~ 301.
- 13 Watkins LR, Maier SF. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev*, 2002, 82: 981 ~ 1011.