脊神经结扎后慢性病理痛大鼠异位放电的特点分析*

孙 钱 邢国刚 涂会引 韩济生 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的 L5背根异位放电的特点及其时程变化。方法:以 L5脊神经结扎制备大鼠神经病理性痛模型,利用分离背根单纤维细胞外电生理记录异位放电。结果:(1)记录到三类典型的异位放电,即紧张型、簇状及不规律型放电;(2)放电频率随着时间的推移而发生变化,术后 24 h达峰值随后逐渐降低;(3)不同类型的异位放电所占比例也随时间而改变,20 h内以紧张型及簇状放电为主,后期则以不规律型放电占绝对多数,术后 14 d只记录到不规律型放电;(4)记录到一类高频呈周期性的放电,此类放电很罕见,且仅出现在术后 3 d之内。结论:脊神经结扎后,其对应的神经纤维产生大量的不同类型的异位放电,这种放电可能在慢性神经病理性痛的发生发展的早期起着重要作用。

关键词 神经病理性痛;异位放电;脊神经结扎

CHARACTERISTICS AND CHANGES OF ECTOPIC DISCHARGES FROM INJURED FIBERS FOLLOWING SPINAL NERVE LIGATION

SUN Qian, XING Guo-Gang, TU Hui-Yin, HAN Ji-Sheng, WAN You
(Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University, Key Lab for Neuroscience, the Ministry of Education, 38 Xueyuan Road, Beijing 100083)

Abstract Objective: Neuropathic pain rapidly occurs following spinal nerve ligation. The present study aims to investigate the characteristics and changes of ectopic discharges from injured nerve fibers after spinal nerve ligation. Methods: Using L5 spinal nerve ligation as neuropathic pain model of rats, teased fiber recording technique was used to explore the property of ectopic discharges. Results: (1) Three different firing patterns of ectopic discharges (tonic or regular, bursting, irregular) emerged after spinal nerve ligation, the proportions of which changed dramatically; (2) The frequency of ectopic discharges also changed rapidly in the present observation, reaching peak within 24h with gradual decrease in the following days; (3) Proportions of three different firing patterns changed dynamically over time. The tonic and bursting types were dominant in the first 24h, while the irregular became the only pattern at day 14; (4) One kind of special discharges with high frequency developed following spinal nerve ligation, which is characterized by occurring rarely and periodically in the first three days. Conclusion: The ectopic discharges from injured nerve fibers rapidly emerged following spinal nerve ligation. These discharges might be an essential mechanism underlying neuropathic pain.

Key words Neuropathic pain; Ectopic discharge; Spinal nerve ligation

神经病理性痛(neuropathic pain)是指由中枢或外周神经系统损伤或疾病所引起的疼痛综合征,以自发性疼痛(spontaneous pain)、痛觉过敏(hyperalgesia)和痛觉超敏(allodynia)为特征。神经病理性疼痛的发病机制尚不完全清楚,但一直以来,人们普遍认为外周神经损伤后背根神经节(dorsal root

* 本研究得到国家科技部"973"项目(G1999054000)和国家自然科学基金(30330026, 30170319, 30240059)资助
△通讯作者 电子邮件 ywan@bjmu.edu.cn, 传真:010-82801111

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

ganglion, DRG)神经元及损伤部位发放的大量异位电活动在神经病理性痛的发生发展过程中起着重要作用[1~3]。然而,这一观点近年来也受到越来越多的质疑[4]。L5脊神经结扎模型(spinal nerve ligation, SNL)在慢性神经病理性痛的研究中被广泛应用[5],本文利用分离单纤维细胞外电生理记录方法,研究L5脊神经结扎后异位放电的特点。

材料与方法

1. 动物模型的制备

健康雄性 Sprague-Dawley大鼠,220 ~ 270 g,由北京大学医学部实验动物中心提供。按 Kim 和 Chung报道的方法[5],在水合氯醛(300 mg/kg)麻醉下,将大鼠左侧的 L5脊神经分离,在距离 DRG约 5 ~ 10 mm处用 5号丝线紧紧结扎,并在结扎处的远端剪断神经,然后止血、缝合。

2. 手术与固定

动物经 20%氨基甲酸乙酯(1.5 g/kg, i.p.)麻醉后,行常规气管插管和颈外静脉插管术,切除 L2 ~ L6腰椎棘突及椎板,拉起皮瓣,缝制油槽,内充 37℃左右的液体石蜡加以保护。手术后将动物固定于脑立体定位仪上,暴露的脊髓上下节段分别用一对脊柱夹固定。用温控仪将动物体温维持在 37.5 ±0.5℃。

3. 在体 DRG神经元单纤维记录

在 L2 ~ L6油槽内分离 L5背根。在立体显微镜下,从 L5背根分离出直径约 30 ~ 40 μm神经细束,将中枢端悬挂在白金丝(直径约 100 μm)引导电极上记录受损 DRG单根纤维放电,并在示波器上显示。根据放电的波幅和波形是否相同确定是否为单纤维放电,记录信号经微电极放大器输入记忆示波器显示并输入到生物电信号采集和处理系统(Micro1401 mk II & Spike 2,英国 CED公司)。

4. 数据采集和分析

采用 Prism 3.0及 Excel统计分析软件对实验数据进行统计分析,实验数据以均数 ±标准误表示。统计分析采用方差分析,以 $P < 0.05$为显著性差异水平。

结　　果

1. 损伤 L5神经纤维异位放电的一般特点

在 51例 SNL模型大鼠的 L5 DRG背根上记录并分析了 843根神经纤维的放电频率。根据放电序列峰峰间期(interspike interval, ISI)特征,可将绝大多数放电归入下述三大类(见图 1):第一类为紧张型或规律型放电,这类放电的 ISI基本相等,其放电频率范围从 14.6 Hz到 58.2 Hz,中位频率为 22.5 Hz,是三类放电中频率最快的;第二类为簇状放电,其特点是较高频率放电之后会有一段静息期,静息期可长可短,但在放电期频率较快,接近于紧张型放电的频率,它的放电频率在 0.4到 33.9 Hz之间。第三类为不规律型放电,其特点是 ISI变化较大,频率较低约为 0.03 Hz到 15 Hz,是三类放电类型中频率最慢的。这三类放电的平均频率为分别为 23.7 ±0.5 Hz (n = 247), 10.0 ±0.4 Hz (n = 242)和 4.5 ±0.2 Hz (n = 354)。

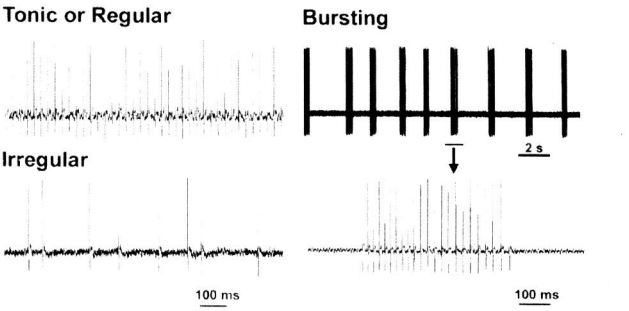

图 1　三种典型的放电类型:紧张型或规律型、簇状和不规律型放电

Fig. 1　Three different firing patterns after spinal nerve ligation. A typical sample of ectopic discharges of three different firing types: tonic or regular, bursting and irregular

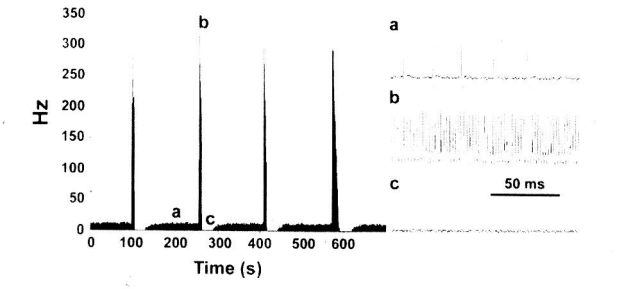

图 2　一类特殊类型的高频放电。左图为时间频率直方图,右图为左图 a, b, c三个时间点所对应的原始放电图

Fig. 2　One example of a special firing pattern. Time-histograms of special discharge (left). Samples of spike traces taken at times a, b and c are shown on the right

2. 一类特殊的异位放电

我们还记录到一类比较特殊的放电(见图 2),这类放电的特点可以归结如下:(1)高频,这种放电的频率最高可以达到 300 Hz以上,而前面所述的几

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

种类型放电的频率一般不超过 70 Hz; (2)周期性,这类纤维在大部分时间内处于静息期或仅为较低频率的基础放电,但在爆发期,放电频率迅速达到高峰,其持续时间较短,并且往往跟随一个后抑制期; (3)罕见,此类放电在异位放电中所占比例不到 2%; (4)短暂,仅出现在术后 3 d之内。

3. 损伤 L5神经纤维异位放电的时程变化

(1)放电频率的变化:我们将动物分为 11个组,每组含 3 ～ 10例,分别在术后 0 ～ 4 h, 5 ～ 8 h, 9 ～ 12 h, 13 ～ 16 h, 17 ～ 20 h, 21 ～ 24 h, 2 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d记录异位放电,结果如图 3所示。我们发现 L5脊神经结扎剪断后 4 h内,在 L5背根未记录到异位放电 (n = 5), 5 ～ 8 h有 4/10例记录到放电,随着时间推移所有动物均可记录到异位放电。有趣的是,放电频率随着时间的变化而发生了很大改变, 11个组的平均放电频率分别为: 0 Hz(n > 200)、7.8 ±1.3 Hz(n = 27)、14.8 ±1.0 Hz(n = 121)、21.1 ±1.2 Hz(n = 102)、21.0 ±1.2 Hz(n = 79)、24.9 ±1.9 Hz(n = 76)、16.0 ±1.2 Hz(n = 112)、10.0 ±0.8 Hz(n = 83)、6.3 ±0.5 Hz(n = 129)、5.5 ±0.6 Hz(n = 109)和 2.5 ±0.2 Hz(n = 106)。我们可以从图 3中看出放电频率呈先升高后降低的趋势,在术后 24 h左右达到最高,然后随着时间的推移频率逐渐下降,在我们记录的最长时间点 14 d达到最低。

(2)神经结扎后放电类型的变化:异位放电三种类型各自所占的比例在术后不是一成不变的,而是呈动态变化的趋势。为分析三类放电的变化趋势,我们在不同时间点共观察了 1,080例自发放电纤维,结果如表 1所示,在神经损伤的早期 (24 h以内)放电类型以紧张型和簇状放电为主,尤其在 12 h内以簇状放电占多数;然后随着时间的推移,这两类放电所占比例逐渐下降,而不规律型放电逐渐增加,至术后 14 d我们仅记录到不规律型放电,另两类放电完全消失。

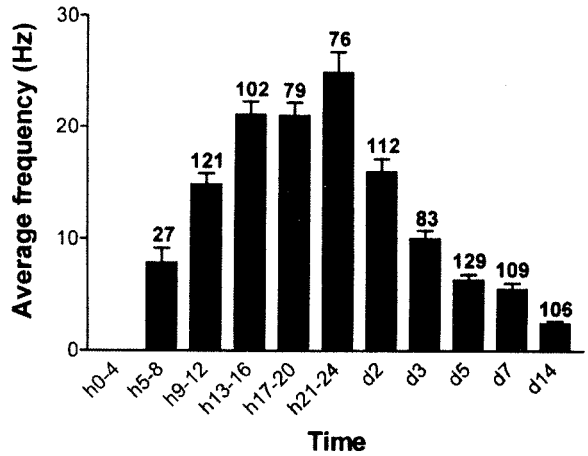

图 3 脊神经结扎后,异位放电平均频率随时间而改变。放电频率在术后 24 h达到最高随后逐渐下降,在观察的最长时间点 14 d达到最低,每个柱上的数字分别代表所取纤维的例数。

Fig. 3 Dynamic changes of ectopic discharges at different time points after spinal nerve ligation (SNL). Average frequencies of ectopic discharges reached peak at hours 20～24 post-operation then gradually declined. Data represented as the mean ±s. e. m. Numbers above the columns refer to the microfilaments sampled.

附表 脊神经结扎后,三类异位放电所占的比例随时间而改变

Table Changes in the proportions of ectopic discharges at different time points after spinal nerve ligation (SNL)

术后时间 Postoperative time	9～12h	13～16h	17～20h	21～24h	2d	3d	5d	7d	14d
紧张型放电 (%) Tonic (%)	26.8	48.9	56.2	54.3	38.0	27.8	8.4	4.9	0.0
簇状放电 (%) Bursting (%)	68.3	46.0	38.1	37.9	25.7	32.6	7.5	16.9	0.0
不规律型放电 (%) Irregular (%)	4.9	5.0	5.7	7.9	36.3	39.6	84.1	78.2	100.0
例数 (n)	41	88	105	142	174	153	95	143	139

讨 论

外周神经损伤引起的慢性神经病理痛持续时间长,迁延不愈难以控制,对病人的身心健康危害很大,因此对其发病机制的研究一直是疼痛领域的热点。一般认为外周神经损伤后导致损伤部位以及 DRG神经元产生大量的异位电活动,这种不带感觉编码信息的放电不断轰击脊髓背角,造成中枢敏化

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

而导致疼痛。在本实验中我们以 SNL 作为疼痛模型,研究了 L5脊神经结扎后异位放电的特点以及它的变化规律。

1. 异位放电的时程变化

在本次实验中,我们发现 L5脊神经结扎后异位放电呈现两个明显的变化,即平均放电频率的改变以及不同放电类型所占比例的改变,这两种变化都提示一点;在神经损伤后的不同时间点,DRG神经元的兴奋性有很大差异。有趣的是,如果我们以本次实验结果与神经瘤模型做一个比较,发现两者的异位放电有很大的差别,比如在神经瘤模型中异位放电出现比较晚,而脊神经结扎后异位放电在 24 h 之内就已经达到高峰,再如在神经瘤模型中 DRG神经元发出的异位放电的频率要远低于脊神经结扎[1,6]。神经损伤的部位不同可能是造成这种差异的原因,由于脊神经结扎离 DRG更近,所以对 DRG神经元的损伤可能要大于坐骨神经结扎。

2. 不同类型异位放电的意义

与以往的体外实验类似[7],在本次实验中我们也记录到三类典型的异位放电,我们是根据放电的峰峰间期做这一分类。这种分类究竟有没有意义?如果有,它的意义何在?迄今仍没有满意的答案。但是大量的文献报道,在突触传递过程中,簇状放电的传递效率以及可靠性要远远高于单次放电[8,9]。此外,也有文献报道簇状放电在感觉信息的传递中具有特殊的意义[10]。因而,我们有理由推测不同类型的异位放电在疼痛中的意义可能也不尽相同,簇状放电这一类型是否在慢性神经病理性痛的发生发展过程中也起着特殊的作用值得进一步研究。而且,如前所述,既然三类放电各自所占的比例在神经损伤后发生了极大的变化,那么是否这种变化影响着慢性神经病理性痛的发生发展也值得进一步探讨。

3. 高频放电在慢性神经源性痛中的可能意义

本实验记录到一类特殊的高频异位放电,这一类放电的特点已如前述,尽管这类放电的型式比较特殊,但对它在慢性神经病理性痛中的潜在病理意义我们并不清楚,关于它的发生机制我们也并不明了。虽然从其放电形式看,非常接近于诱导脊髓背角长时程增强(long-term potentiation, LTP)的电刺激,但由于下面两个客观原因,我们认为它不能等同于诱导脊髓 LTP的人工电刺激。首先是这种放电在异位放电中占的比例很低,而诱导脊髓 LTP则需以很强的电刺激刺激坐骨神经才能触发,也就是说需要同时兴奋较多的神经纤维才能诱发;其次是脊神经结扎后的异位放电主要见于 A类纤维,而脊髓的 LTP则需要 C纤维兴奋才能诱发。虽然如此,我们仍然可以想象,这种时断时续的高频电刺激长时间轰击脊髓背角,有可能在脊髓的中枢敏化中起着特殊的作用。

参 考 文 献

1 Wall PD, Devor M. Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. Pain, 1983, 17◇321～339.

2 Wall PD, Gutnick M. Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. Exp Neurol, 1974, 43◇580～593.

3 Yoon YW, Na HS, Chung JM. Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. Pain, 1996, 64◇27～36.

4 Li Y, Dorsi MJ, Meyer RA, et al. Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. Pain, 2000, 85◇493～502.

5 Carlton SM, Lekan HA, Kim SH, et al. Behavioral manifestations of an experimental model for peripheral neuropathy produced by spinal nerve ligation in the primate. Pain, 1994, 56◇155～166.

6 Liu CN, Wall PD, Ben Dor E, et al. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. Pain, 2000, 85◇503～521.

7 Liu X, Chung K, Chung JM. Ectopic discharges and adrenergic sensitivity of sensory neurons after spinal nerve injury. Brain Res, 1999, 849◇244～247.

8 Izhikevich EM, Desai NS, Walcott EC, et al. Bursts as a unit of neural information: selective communication via resonance. Trends Neurosci, 2003, 26◇161～167.

9 Lisman JE. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. Trends Neurosci, 1997, 20◇38～43.

10 Krahe R, Gabbiani F. Burst firing in sensory systems. Nat Rev Neurosci, 2004, 5◇13～23.

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.