神经病理性痛大鼠背根神经节 细胞电生理学特征的改变^{*}

邓伦斌姚 磊 王贺春 曹晓杰 万 有** 韩济生

(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、脑科学与认知科学中心,北京 100083)

摘要 目的:研究神经病理性痛大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)细胞电生理特征的改 变。方法:以单侧L₅和L₆脊神经结扎制备大鼠神经病理性痛模型,运用全细胞电流钳技术进行 电生理记录。结果:引起损伤侧 DGR 中、小直径神经元兴奋的基强度降低,动作电位爆发阈值下 降,小直径神经元的动作电位时程变宽,自发放电的细胞比率明显升高。结论:神经损伤诱导初级 感觉神经元的兴奋性增强,这可能是引起动物神经病理性痛敏的原因之一。

关键词 神经病理性痛;动作电位;背根神经节

CHANGES OF ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES IN DORSAL ROOT GANGLION NEU RONS LSOLATED FROM NEUROPATHIC PAIN RATS

DENGLun-Bin, YAO Lei, WANG He-Chun, CAO Xiao-Jie, WAN You, HAN Ji-Sheng

(Neuroscience Research Institute, Peking University, 38 Xueyuan Road, Beijing 100083)

Abstract Objective : Pain and hyperalgesia can occur when nerves were injured. The present study aims to examine the electrophysiological changes of dorsal root ganglion (DRG) neurons in rats with neuropathic pain. Methods : The neuropathic pain model in rat was prepared by tight ligation of right side L_5 and L_6 spinal nerve. Whole cell current clamp technique was used for electrophysiological recording. Results : The rheobase and the threshold of action potential were reduced in both small and medium DRG neurons after nerve ligation , while the duration of action potential at half amplitude (APD_{0.5}) was broadened in small injured neurons. Nerve injury also induced spontaneous activities in small neurons. No significant changes were observed in other electrophysiological properties. Conclusion : These results suggested that nerve ligation could induce hyperexcitability of nociceptors , which might be an important mechanism underlying chronic neuropathic pain.

Key words Neuropathic pain; Action potential; Dorsal root ganglion (DRG)

疼痛性疾患是困扰人类健康的严重问题。其中 慢性神经病理性痛是常见的病理痛之一,对它的发 生机制尚不清楚。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)细胞是躯体感觉的初级传入神经元,在神经 病理性痛的发生和维持中起着重要的作用^[1]。对 神经损伤后 DRG神经元电生理特征的研究引起人 们的极大兴趣,但由于研究条件的差异,如动物模型 的不同,所得结果不尽相同^[1,2]。大鼠脊神经 L₅/L₆ 紧结扎(spinal nerve tight ligation, SNL)是 Chung 于 1992 年首次建立^[3],为研究慢性神经病理性痛的 外周机制提供了很好的模型。本文运用全细胞电流 钳技术,研究脊神经 L_5/L_6 紧结扎后 DRG神经元电 生理学特征的改变。

材料和方法

雌性 Wistar 大鼠(鼠龄 3~4 周),体重 180g,随 机分为神经病理性痛组和对照组。

国家重点基础研究计划"脑功能和脑重大疾病的基础研究"(G1999054000,万有)、国家自然科学基金(39830160韩济生、 39900043 曹晓杰)资助; **通讯作者 Corresponding author

1. 神经病理性痛大鼠模型的制备

根据 Kim 和 Chung 方法紧结扎大鼠右侧 L_5 、 L_6 脊神经制备神经病理性痛模型^[3],对照组动物接 受假性手术。术后 4~5 天用 von Frey 机械测痛法 测定大鼠 50%缩足阈,阈值明显降低并稳定的动物 视为成功模型。

2.DGR 神经元的急性分离

术后 5~8 天内取材。大鼠断头处死,迅速取出 右侧 L_5 、 L_6 段 DRG,剪除多余的神经纤维后转入含 消化酶(胰蛋白酶 0.56 mg/ ml;胶原酶 1.16 mg/ ml)的 DMEM 液中,于 37 恒温摇床振荡消化 45 min,结束前 10 min 加入胰蛋白酶抑制剂(1.46 mg/ ml)。然后用细胞外液缓慢置换 DMEM 液,细胞静 置贴壁 2 小时后进行电生理记录。

3. 电流钳记录

Table 1

DRG神经元按大小分为三类:细胞直径大于 40 mm的为大神经元,小于 30 mm的为小神经元以 及,二者之间的为中神经元^[4]。实验在室温(22 ±2) 下进行。

采用 EPC-9 膜片钳放大器 (HEKA 公司)和 Pluse 8.0 软件进行刺激及数据采集。电极由垂直 二步电极拉制器 (PC-10, Narishige)拉制,经抛光仪 (MF-9, Narishige)抛光后阻抗为 2~5 M 。在全 细胞电压钳模式下封接细胞,封接电阻大于 1 G 。 实验所用细胞外液为 (mM):135 NaCl,4.5 KCl,5 CaCl₂,5 MgCl₂,5 HEPES,10 D-glucose,渗透压为 320~330 mOsm,用 NaOH 将 pH 值调至 7.3。细胞 内液配方为 (mM):135 Kgluconate, 2 MgCl₂, 1.1 EGTA, 5 HEPES, 5 MgA TP,0.5 Na₂ GTP,内液渗 透压为 300 mOsm,用 KOH 调节 pH 值至 7.2。

细胞成功封接及破膜后,将电压钳模式转为电

表1 对照组和神经病理痛组 DRG 神经元的电生理特征

流钳记录模式,并取消钳制电流使细胞处于静息状态。进行电流钳记录时须满足:(1)破膜前封接电阻 大于1 GW;(2)在全细胞电流钳模式下,输入电阻 值大于400 MW;(3)细胞静息电位必须低于-40 mV;(4)细胞动作电位必须出现超射现象。

给细胞一系列的时程为 5 ms 的去极化递增电 流(从 0 pA 到 400 pA,每次增加 40 pA)诱发动作电 位爆发。统计细胞静息电位值(resting potential, Vrest)、动作电位峰值(action potential peak amplitude, V_{peak})、动作电位爆发阈(action potential threshold,V_{threshold})和动作电位半峰时程(action potential duration at half amplitude,APD_{0.5})等参数。 此外,给细胞一段长时程(500 ms)的去极化基强度 刺激,研究神经元动作电位的爆发,并比较损伤后神 经元动作电位爆发模式的改变。

4. 数据采集和分析

使用 Prism 软件对实验结果进行分析统计,所 获结果以平均值 ±标准误表示。经卡方检验(²) 和方差分析 (ANOVA) 并继以 Newman Keul 's 检 测,以 *P* < 0.05 为差异显著性标准。

结 果

1.DRG神经元的分类

根据细胞直径大小将 DRG 神经元分为大、中、 小三类,直径分别为 42.8 ± 0.9 μ m(n = 14)、32.8 ± 0.7 μ m(n = 18)和 26.4 ± 0.5 μ m(n = 20)。 除形态差异外,大、中、小神经元的电生理特征也各 不相同,其中小直径细胞动作电位爆发阈值 (V_{threshold})最高,兴奋性最低,动作电位半峰时程 (APD_{0.5})最宽;而大直径细胞兴奋性最高,动作电位 半峰时程最短(表 1)。

	Small		Medium		Large	
	$\begin{array}{c} \text{Control} \\ (n = 16) \end{array}$	Neuropathy $(n = 15)$	$\begin{array}{c} \text{Control} \\ (n = 15) \end{array}$	Neuropathy $(n = 16)$	$\begin{array}{c} Control \\ (n = 14) \end{array}$	Neuropathy $(n = 9)$
V _{rest} (mV)	- 46.6 ±1.3	- 45.8 ±1.1	- 45.6 ±0.7	- 46.3 ±0.0.6	- 45.9 ±1.1	- 47.0 ±1.2
V _{peak} (mV)	107.3 ±3.2	106.0 ±4.1	102.6 ±3.3	97.5 ±3.7	93.7 ±3.1	96.3 ±4.1
V _{threshold} (mV)	- 11.7 ±0.6	- 16.7 ±0.6 * *	- 13.8 ±0.9	- 18.1 ±1.1 **	- 25.4 ±1.2	- 26.6 ±1.6
$APD_{0.5}(ms)$	2.6 ±0.2	4.2 ±0.6 * * *	2.5 ±0.2	2.6 ±0.3	1.0 ±0.1	1.0 ±0.1

 V_{rest} , rest potential; V_{peak} , peak amplitude; $V_{threshold}$, threshold potential of action potential; $APD_{0.5}$, action potential duration at half-amplitude: mean $\pm SE = {}^{*}P^{*} < 0.01$, ${}^{*}P^{*} < 0.001$, significantly different from the control

Electrophysiological properties of control and neuropathic DRG neurons

2. 神经结扎后 DRG 神经元基本电生理特征的 改变

神经病理痛组 DRG大、中、小神经元的直径分 别为 41.3 ±0.7µm(n = 9)、33.5 ±0.7µm(n = 16) 和 26.4 ±0.5µm(n = 16),与对照组相比均 无明显改变。

神经病理痛大鼠,引起中、小直径 DRG 神经元 兴奋的基强度降低。在正常对照组,小、中、大直径 DRG 神经元的基强度 (rheobase) 分别为 288.6 ± 16.9 pA (n = 14)、362.9 ± 16.5 pA (n = 14) 和 404.3 ± 48.0 pA (n = 14)。在神经病理痛组,三 类神经元的基强度分别为 177.9 ± 10.3 pA (n = 16)、222.5 ± 10.9 pA (n = 16) 和 396.4 ± 49.6 pA (n = 11)。与对照组相比,中、小直径神经元差 异显著 (分别为 P < 0.01 和 P < 0.05) (见图 1)。





Fig. 1 Comparison of rheobase of DRG neurons in control and neuropathic pain rats. *P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from the control

另外还发现,神经病理痛大鼠中、小 DRG神经 元动作电位的爆发阈值降低。对照组中、小 DRG 神经元的动作电位爆发阈值分别为 - 11.7 ± 0.6 mV和 - 13.8 ± 0.9 mV,神经结扎后分别为 - 16. 7 ± 0.6 mV和 - 18.1 ± 1.1 mV,两组相比差异显 著(P < 0.01)。此外,神经结扎后小直径细胞动作 电位的复极化时间延长,动作电位的半峰时程 (APD_{0.5})从 2.6 ± 0.2 ms显著增加到 4.2 ± 0.6 ms(P < 0.001)。而细胞的其它电生理特征(静息 电位水平 V_{rest}和动作电位峰值 V_{peak}),无显著性改 变(表 1)。

神经损伤后部分细胞出现自发放电现象。对照 组中只有一例大神经元自发放电,占细胞总数的7. 1%(1/14)。神经损伤后有1例中直径神经元和3 例小直径神经元自发放电,分别占细胞总数的 6. 3%(1/16)和 20%(3/15),与对照组相比自发放电 的小细胞比率显著升高(²检验, P < 0.05)。

3. 神经结扎后细胞动作电位爆发模式的改变

图 2 显示,长时程(500 ms)的基强度刺激导致 两种模式的动作电位爆发:位相放电(phasic firing, 动作电位数目 = 1)(图 2A)和重复放电(repetitive firing,动作电位数目 4)(图 2B)。

对照组中分别有 20 % (3/15)的大直径神经元、 50 % (7/14)的中直径神经元和 73.3 % (11/15)的小 直径神经元爆发重复动作电位。神经损伤后,具有 重复放电的大、中、小神经元的比率分别为 42.9 % (3/7)、45 % (9/20)和 46.6 % (7/15),统计结果显示 二者无显著性差异(²检验, *P* > 0.05)。



图 2 正常情况下 DRG 神经元动作电位的两种放电模式. A : 位相放 电 :B :重复放电

Fig. 2 Two firing patterns of action potential of DRG neurons in a normal rat. A : Phasic firing. B : Repetitive firing

讨 论

背根神经节 (DRG) 是躯体初级感觉神经元细 胞体的聚集处,由大小不同、电生理特征各异的大、 中和小神经元组成。一般来说,直径较大的神经元 主要是非伤害性感受的 A 和 A 纤维,而直径较小 的神经元则为伤害性感受的 A 和 C 类纤维^[5,6]。 本研究发现:大、中、小神经元的动作电位参数与生 理状态下 A / A 、A 和 C 纤维的特征相吻合,表明 急性分离方法没有破坏细胞的基本电生理特性。

神经结扎后,DRG神经元胞体直径大小、膜静 息电位(V_{rest})和动作电位峰值(V_{peak})均无明显改 变,但引起中、小直径神经元兴奋的基强度 (rheobase)和动作电位爆发阈值(V_{threshold})降低,小 神经元动作电位的半峰时程(APD_{0.5})显著增加。上 述结果提示,神经损伤后中、小DRG神经元的兴奋 性升高,神经元的传导能力增强。由于DRG中、小 神经元是主要的伤害感受神经元,其过度兴奋将直 接导致机体的痛阈降低。这可能是神经病理性"痛 觉过敏"(hyperalgesia)症状发生的主要原因之一。

研究还发现,神经结扎诱使了部分中、小DRG 神经元自发放电,其中小直径神经元自发放电的比 率显著升高。Study 在慢性限制性损伤模型(chronic constriction injury, CCI)中也曾发现DRG神经元 的自发放电现象^[4]。与本实验不同的是,CCI 模型 自发放电的细胞比率较高且主要发生在中直径神经 元上,估计这种差异的产生与损伤模型相关。小直 径神经元的自发放电可能产生两方面的效应:一是 导致机体自发性疼痛;二是通过持续的外周放电轰 击脊髓背角神经元,使其兴奋性异常升高,产生"中 枢敏化 '效应^[2]。

已有研究报道^[7],生理状态下 DRG 神经元以 位相放电(phasic firing)为主,神经损伤诱导细胞动 作电位异常编码,表现重复放电模式(repetitive firing)。本实验结果显示,对照组中超过 50 %的 DRG 神经元具有重复动作电位,神经损伤后,细胞动作电 位的爆发模式没有明显改变。这一结果显然不同于 以往的文献报道。造成这种差异的原因可能包括损 伤模型和记录条件不同等。特异的钙依赖性钾电流 (Ca²⁺-dependent K conductance, SKCa)激活诱导 动作电位出现缓慢的后超极化(after-hyperpolarization, AHPslow),因此能限制神经元动作电位的 重复爆发^[9],而消化酶可破坏 SKCa 通道的结构,使 该电流的功能丧失^[9]。由此推测细胞的消化条件 可能也是造成上述差异的原因之一。

急性分离消化了 DRG神经元的轴、树突,使细 胞失去从周围环境获取信息的能力。因此可以肯 定,上述电生理特征的变化是由神经元胞内机制控 制的;DRG细胞膜上表达有多种离子通道,部分离 子电流与疼痛的发生密切相关^[1]。对疼痛相关离 子通道的研究将有助于揭示慢性神经病理性痛的外 周机制,并为临床治疗提供新的思路。

参考文献

- Bridges D, Thompson SWN, Rice ASC. Mechanisms of neuropathic pain. British J Anaesthesia, 2001, 87u12 ~ 26.
- 2 Zhang JM, Donnelly DF, Song XJ, et al. Axotomy increases the excitability of dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. J. Neurophysiol, 1997, 78t2790 ~ 2794.
- 3 Kim, SH, and Chung, JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. Pain, 1992, 501355 ~ 363.
- 4 Study RE, Kral MG. Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy. Pain, 1996, 651235 ~ 242.
- 5 Harper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. J Physiol, 1985, 359 31 ~ 46.
- 6 Rose RD, Koerber HR, Sedivec MJ, et al. Somal action potential duration differs in identified primary afferents. Neurosci Lett, 1986, 63:259 ~ 264.
- 7 Yoshimura N, Groat WC. Increased excitability of afferent neurons innervating rat urinary bladder after chronic bladder inflammation. J. Neuroscience, 1999, 1914644 ~ 4653.
- 8 Cohe AS, Weinreich D, Kao JP. Nitric oxide regulates spike frequency accommodation in nodosee neurons of the rabbit. Neurosci Lett, 1994, 173ul7 ~ 20.
- 9 Zhang L , Weiner JL , Vallante TA , et al. Wholecell recording of the Ca²⁺-dependent slow afterhyperpolarization in hippocampal neurons: effects of internally applied anions. Pflugers Arch , 1994 , 426\247 ~ 253.