

· 基础研究 ·

外周电刺激对脊髓损伤后慢性中枢性疼痛的抑制作用

谢永刚 张小洺 姚尚龙

【摘要】 目的 探讨外周电刺激抑制脊髓损伤后中枢性疼痛的可能机制。方法 将脊髓损伤后中枢性疼痛的雄性 SD 大鼠 24 只随机分成不插入不锈钢针组(A组)、在相应穴位插入不锈钢针而不行外周电刺激(PES)组(B组)、在相应穴位插入不锈钢针行 PES 组(C组),每组 8 只,另选取正常大鼠 8 只作为对照组(D组)。通过机械性痛敏压力阈值(PWPT)和热痛敏潜伏期(PWL)对其伤害性刺激的痛觉过敏进行评价,同时观察其自发痛行为现象(包括自噬、搔抓等),然后,经后肢和背部标准穴位插入不锈钢针对中枢性疼痛大鼠行 PES,通过免疫组化检测脊髓背角 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体亚单位表达的变化。结果 与其他两组相比,C 组大鼠中枢性疼痛得以缓解,PWPT 及 PWL 显著增高($P < 0.01$),且 NR-1 表达显著降低($P < 0.01$),3 组大鼠脊髓背角 NR-1 表达比正常大鼠明显增多($P < 0.01$)。结论 外周电刺激对脊髓损伤后中枢性疼痛具有抑制作用。

【关键词】 外周电刺激; 脊髓损伤; 中枢性疼痛; NR-1 亚单位; 抑制作用

The inhibitory effects of peripheral electrical stimulation on chronic central pain after spinal cord injury

XIE Yong-gang, ZHANG Xiao-ming, YAO Shang-long. Department of Anesthesiology of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective To investigate the mechanisms of the inhibitory effects of peripheral electrical stimulation (PES) on chronic central pain (CCP) after spinal cord injury (SCI). **Methods** Twenty-four male Sprague-Dawley rats with CCP following SCI were randomly divided into three groups: a group without stainless steel needles implanted (NSSN group, $n = 8$), a group with a stainless steel needle implanted but no peripheral electrical stimulation applied (NPES group, $n = 8$) and a PES group (PES group, $n = 8$). The rats' CCP was evaluated through observing their response to nociceptive stimulation by means of the paw withdrawal pressure threshold (PWPT) and the paw withdrawal latency (PWL). Spontaneous pain behaviors including autophagia and scratching were observed at the same time. PES was applied via stainless steel needles inserted into standard acupoints on the hind limbs and the back. The expression of the NMDA receptor 1 (NR-1) subunit in the spinal cord horn was measured using immunohistochemical methods. **Results** Compared with the NSSN and NPES groups, CCP in the PES group was alleviated, PWPT and PWL were dramatically increased ($P < 0.01$) and the expression of NR-1 was obviously decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Peripheral electrical stimulation may alleviate chronic central pain after spinal cord injury in rats.

【Key words】 Peripheral electrical stimulation; Chronic central pain; Spinal cord injury; NR-1 subunit; Inhibition

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, 表现为损伤平面以下皮肤感觉消失区域出现形式多样的慢性疼痛, 其典型特征表现为损伤平面以下出现痛觉过敏及自发痛, 因其病程持续极长且临床处理困难而给患者造成极大的痛苦, 已成为临床上最为顽固的疼痛综合征之一。当今, 电刺激已被广泛应用于临床一些慢性疼痛的处理, 然而许多研究表明其临床效果尚存争议。研究发现, N-甲基-D-天门冬氨酸 (N-methyl-D-as-

parate, NMDA) 受体在疼痛传递及中枢致敏方面起重要作用, 其中 NMDA 受体亚单位 NR-1 (N-methyl-D-aspartate receptor 1) 是其发挥功能的重要单元^[1,2]。因此, 本实验将通过慢性中枢性疼痛大鼠行外周电刺激来观察大鼠脊髓背角 NR-1 的变化, 从而探讨外周电刺激 (peripheral electrical stimulation, PES) 抑制 SCI 后慢性中枢性疼痛的可能机制。

材料与方法

一、动物选择与分组

动物选用华中科技大学同济医学院动物中心提供

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉科

的雄性 SD 大鼠,体重 220 ~ 250 g,用 Allen 氏重物坠击法制造 SCI 模型^[3],然后将其随机分为不插入不锈钢针组(A 组)、仅在相应穴位插入不锈钢针而不行 PES 组(B 组)、PES 治疗组(C 组),另选取正常大鼠 8 只作为对照组(D 组)。

二、SCI 模型的建立

采用 Allen 氏重物坠击法建立 SCI 后中枢性疼痛大鼠模型^[3]。将大鼠用 10% 水合氯醛(0.3 ml/kg 体重)行腹腔麻醉,在无菌手术条件下行 L₁ 节段椎板切除,充分暴露 L₁ 节段脊髓,用玻璃导管引导 20 g 重的铜棒,从设定 20 cm 的高度坠落至脊髓暴露区域中心,造成 400 g·cm(铜棒的重量与下落高度的乘积)的损伤,然后逐层缝合切口,术后手法排尿并给予一定剂量的抗生素抗感染,直到自主排尿恢复。

三、疼痛行为学测定

大鼠 SCI 后分别于 4,6,8,12,16,24 及 48 h 用机械测痛仪对大鼠的机械性痛觉过敏进行测量,将大鼠放入测量仪的有机玻璃盒内,启动刺激针对大鼠足底进行刺激,金属针在上升过程中以 2.5 g/s 的速度增加压力,最大压力为 50 g,记录大鼠足底收缩时的机械性痛敏压力阈值(paw withdrawal pressure threshold, PWPT),每次间隔 3 min,共进行 3 次,取其平均值。同样,将大鼠放在热测痛仪的玻璃板上,用辐射光源直接照射其足底,大鼠因痛刺激而移开,光源自动关闭的同时记录热痛敏潜伏期(paw withdrawal latency, PWL),每次测量间隔 3 min,共进行 3 次,取其平均值。

四、对 SCI 后慢性中枢性疼痛大鼠行 PES

在造模成功后 15 d,将大鼠置于自制的帆布袋内,使其后肢及尾巴暴露于袋外。把两对不锈钢钢针插入两侧足三里(胫前结节旁 5 mm)和夹脊穴(L₅ 脊柱旁 5 mm)。两个穴位在同一侧形成一个回路。电刺激仪为 HANS LH-800(上海产),电流为连续恒定的矩形波电流,通过两根不锈钢针对大鼠进行电刺激,共进行 45 min,刺激频率为 2 Hz,波宽为 0.6 ms,刺激强度以 0.5,1,2 mA 顺序分别刺激 15 min,共 45 min,每 4 d 治疗 1 次,共 10 次。

五、免疫组化

将大鼠用 10% 的水合氯醛腹腔麻醉,然后用 4% 的多聚甲醛进行心脏灌注,将 L₁ 节段及其上下各 5 mm 脊髓取出,并固定于 4% 的多聚甲醛 4 ~ 6 h,然后石蜡包埋横截面切片,片厚 12 μm,过 L₁ 脊髓节段每 5 至 6 片取其中 1 片,并放置于 0.01 mmol/ml 的磷酸缓冲液中备用。

采用 Streptavidin/Peroxidase 免疫组化试剂盒进行免疫组化染色。一抗采用 0.01 mol/L 的 PBST (pH7.2 ~ 7.4),将小鼠抗 NR-1 血清(美国 ZYMED 公

司提供)稀释为 1:400,室温孵育后再用 0.01 mol/L 的 PBST 彻底清洗 3 次;然后加入生物素标记的兔抗小鼠血清,室温下孵育 1 h;再用 0.01 mol/L 的 PBST 彻底清洗 3 次,再加入亲和素-生物素-过氧化物酶反应物孵育 30 min,并彻底清洗 3 次;裱片封片,4℃ 保存。为证明抗体特异性,用 PBS 代替小鼠抗 NR-1 血清做对照实验,步骤同上,结果均为阴性。组化图像用 HMIAS-2000 型全自动彩色图像分析系统进行分析。

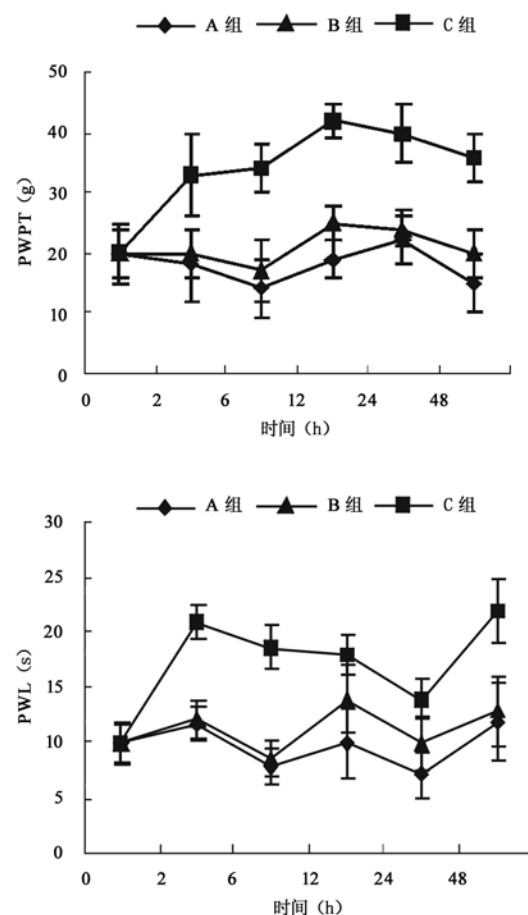
六、统计学分析

计量单位以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、PES 对慢性中枢性疼痛的影响

对中枢性疼痛大鼠行 PES 后,分别于 2,6,12,24 和 48 h 测量大鼠 PWPT 和 PWL,可见两者显著增高($P < 0.01$);A 组 PWPT 和 PWL 未发生变化;B 组仅在 2 h 后两者略微增高($P < 0.05$),见图 1。

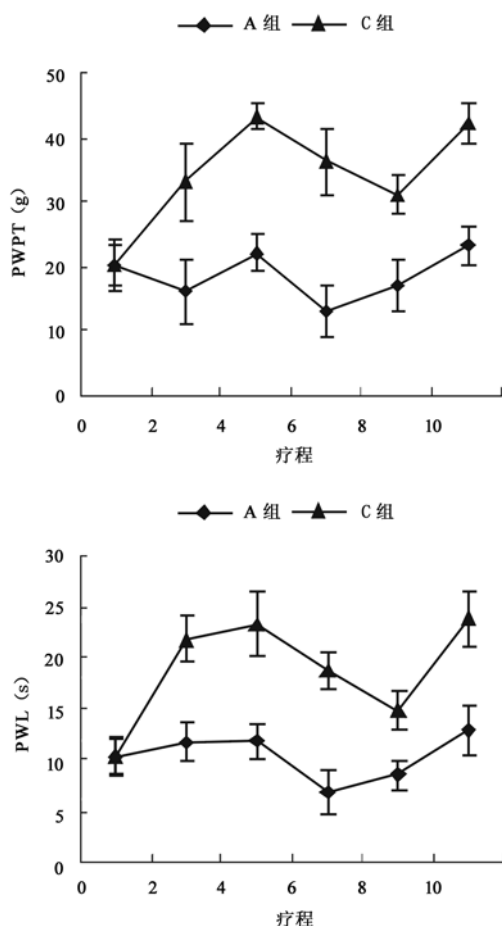


注: C 组与 A 组相比, $P < 0.01$; B 组与 A 组相比, $P < 0.05$

图 1 外周电刺激后 PWPT 和 PWL 的变化

二、重复 PES 对大鼠慢性中枢性疼痛的影响

以上结果证明, PES 可以抑制 SCI 后慢性中枢性疼痛。每次 PES 前记录其痛阈值, PES 之前 C 组与 A 组痛阈值基本相等, 伴随着治疗的进行, C 组的痛阈值与对照组相比逐渐升高, 见图 2。数据表明 A 组大鼠中枢性疼痛也有一个渐进的缓解过程 ($P < 0.05$), 但 C 组中枢性疼痛的减轻程度更明显 ($P < 0.01$)。



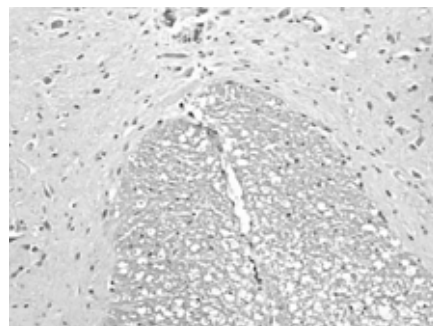
注: C 组与 A 组比较, $P < 0.01$

图 2 反复外周电刺激不同疗程时热痛敏压力阈值和热痛敏潜伏期的变化

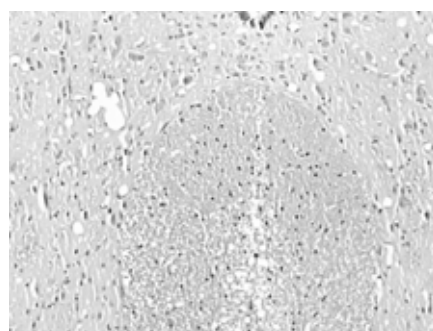
三、PES 对 NMDA 受体亚单位 NR-1 在脊髓背角浅层表达的影响

在进行 10 个阶段的 PES 之后, 分别检测 A 组大鼠、C 组大鼠和 D 组大鼠 NMDA 受体亚单位 NR-1 在脊髓背角浅层的表达情况, 三组均呈棕黄色表达, 但 A 组大鼠比 D 组大鼠表达颜色明显加深, 而该表达在 C 组大鼠及 D 组大鼠之间却无明显区别, 见图 3。在脊髓背角 I ~ II 层测量 NR-1 免疫染色平均光密度, 其中 A 组与 D 组大鼠及 C 组相比, 光密度显著增高 ($P < 0.001$); 而 C 组与 D 组则无明显差异, 结果见图 4, 慢性中枢性疼痛大鼠 NR-1 免疫活性的增强

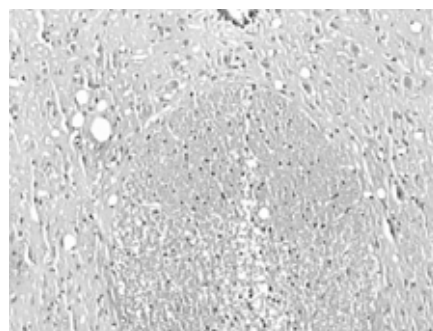
明显被 PES 所抑制。



D 组

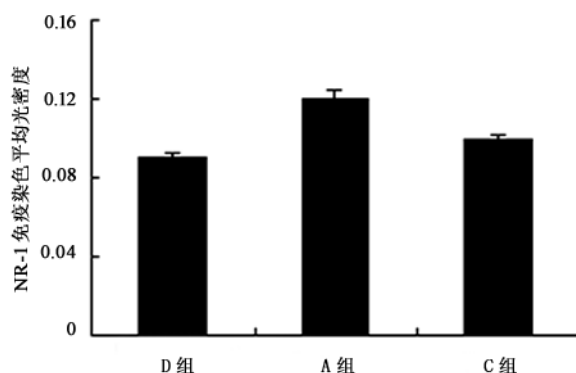


A 组



C 组

图 3 各组大鼠 L₁ 脊髓背角 NR-1 亚单位的不同表达



注: A 组与 D 组及 C 组相比光密度显著增高, $P < 0.001$; D 组与 C 组相比无明显差异

图 4 NR-1 免疫染色平均光密度

讨 论

我们的研究采用 Allen 重物坠击法建立动物模型,其症状与临床常见 SCI 最为接近,该造模方法目前已得到公认。Allen 重物坠击法所引起 SCI 后中枢性疼痛的发生率为 52%^[4],且其引起的中枢性疼痛行为反应与临床上中枢性疼痛特征相似,慢性痛超敏和自噬现象发生率均较高。另外,脊髓背角 I~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^[5],因此,研究 SCI 后脊髓背角的生物化学变化特点对于揭示 SCI 后中枢性疼痛的信息传递、调控、整合和发生机制具有重要意义。所以,我们通过检测 PES 后脊髓背角浅层 NR-1 亚单位的变化来揭示 PES 抑制 SCI 后慢性中枢性疼痛的可能机制。

我们证明了 PES 对大鼠慢性中枢性疼痛的抑制作用,然而,大量的电生理实验证明 PES 的镇痛效应在正常大鼠是很短暂的,这些结果说明 PES 用于正常大鼠和慢性中枢性疼痛大鼠的效应是不同的^[6]。Ma 等^[7]证明经皮电刺激能明显降低炎症所诱发的脊髓背角神经元的敏感性。Thorsen 等^[8]也发现了加强经皮电刺激对神经痛的抑制作用,而我们的研究结果与上述结论一致,而且还发现在反复 PES 之后,其镇痛效应逐渐增强,这充分说明了 PES 治疗 SCI 后慢性中枢性疼痛的有效性。

PES 抑制慢性中枢性疼痛的可能机制:PES 的镇痛效应主要是通过改变脊髓、海马和大脑等区域内的某些递质和受体的表达而发挥作用。研究证明突触长时程增强效应(long term potentiation, LTP)可以通过改变突触前刺激而在突触后产生,对 C 纤维的较强反复的伤害性刺激可以导致突触效应及脊髓背角广泛运动神经元(wide dynamic rang, WDR)活性的增强,而 NR-1 受体亚单位参与了 LTP 所介导的中枢敏感性的改变过程^[9,10]。痛觉信号在中枢的传递是由特异性的伤害感受性神经元和 WDR 共同传递的,WDR 是介导脊髓背角对伤害性或非伤害性刺激发生反应的一类神经元,慢性中枢性疼痛动物在损伤平面以上 WDR 的晚期放电潜伏期缩短,阈值降低,放电频率增加,因此认为 SCI 后上位中枢对脊髓感觉下行抑制的解除和 WDR 神经元兴奋性的增高是导致痛觉异常的原因之一^[11,12]。相关电生理及药理学研究证明, NR-1 在慢性中枢性疼痛中发挥重要作用^[13,14]。我们同样发现脊髓背角浅层 NR-1 亚单位表达的增强,这说明 SCI 后脊髓背角神经元的敏感性增加可能与 NR-1 亚单位的基因表达变化所导致的 NR-1 形态学变化有关,而 PES

恰好是通过抑制 NR-1 亚单位的过度表达而抑制 SCI 后的慢性中枢性疼痛。

总之,PES 可以抑制 SCI 后慢性中枢性疼痛,其主要作用是通过脊髓水平的 NR-1 亚单位所介导,然而要对其机制研究取得突破性进展,尚需结合生理、生化及分子生物学进行进一步研究,以便为临床上 SCI 后中枢性疼痛的治疗提供更好的理论指导。

参 考 文 献

- 1 Caude RM, Perez FM, King C, et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression and phosphorylation following excitotoxic spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett*, 2003, 349:37-40.
- 2 Brown KM, Wrathall JR, Yasuda RP, et al. Glutamate receptor subunit expression after spinal cord injury in young rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 2004, 152:61-68.
- 3 Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fractured is location of spinal column. A preliminary report. *JAMA*, 1991, 57:878-880.
- 4 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动物模型的建立. *中国康复医学杂志*, 2001, 17:18-22.
- 5 Hawwa N, Baliki M, Atweh SF, et al. Attenuation of neuropathic pain by segmental and supraspinal activation of the dorsal column system in awake rats. *Neuroscience*, 2002, 3:541-553.
- 6 Ainsworth L, Budelier K, Clinesmith M, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) reduces chronic hyperalgesia induced by muscle inflammation. *Pain*, 2006, 120:182-187.
- 7 Ma YT, Sluka KA. Reduction in inflammation-induced sensitization of dorsal horn neurons by transcutaneous electrical nerve stimulation in anesthetized rats. *Exp Brain Res*, 2001, 137:94-102.
- 8 Thorsen SW, Lumsden SG. Trigeminal neuralgia: sudden and long-term remission with transcutaneous electrical nerve stimulation. *Physiology*, 1997, 20: 415-419.
- 9 Sandkuhler J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*, 2000, 88: 113-118.
- 10 Willis WD. Long-term potentiation in spinothalamic neurons. *Brain Res*, 2002, 40:202-214.
- 11 Miki K, Lwata K, Tsuboi Y, et al. Dorsal column-thalamic pathway is involved in thalamic hyperexcitability following peripheral nerve injury: a lesion study in rats with experimental mononeuropathy. *Pain*, 2000, 85:263-271.
- 12 Obata K, Yamanaka H, Dai Y, et al. Contribution of degeneration of motor and sensory fibers to pain behavior and the changes in neurotrophic factors in rat dorsal root ganglion. *Exp Neurol*, 2004, 188:149-160.
- 13 Garry EM, Jones E. Nociception in vertebrates: key receptors participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. *Brain Res Rev*, 2004, 46:216-224.
- 14 Leem JW, Choi EJ, Eun SP, et al. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA glutamate receptor antagonists differentially suppress dorsal horn neuron responses to mechanical stimuli in rats with peripheral nerve injury. *Neurosci Lett*, 1996, 211:37-40.

(收稿日期:2006-08-12)

(本文编辑:熊芝兰)