

· 基础研究 ·

腰神经根慢性损伤后背根神经节电生理
与细胞内钙离子浓度变化的研究

郝淑燕 岳寿伟 潘博 时庆 侯怀水 康乐

【摘要】目的 探讨受损背根神经节(DRG)神经元异位自发放电与细胞内 Ca^{2+} 浓度改变的关系。**方法** 纯种成年新西兰大白兔 32 只,随机分为正常组、损伤 10 d 组、损伤 30 d 组、损伤 90 d 组,建立模拟腰椎间盘突出兔腰神经根慢性损伤模型,于损伤后 10 d、30 d、90 d 应用在体电生理技术记录损伤 DRG 异位电活动的改变,应用激光共聚焦扫描显微镜技术结合荧光染色法检测受损 DRG 神经元细胞内 Ca^{2+} 荧光强度变化。**结果** ①兔腰神经根慢性损伤后,受损 DRG 神经元异位自发放电频率和幅度随损伤时间延长而逐渐下降,损伤各组与正常组相比,DRG 放电频率、放电幅度均显著增高($P < 0.05$);②兔腰神经根慢性损伤后受损 DRG 细胞内 Ca^{2+} 浓度呈现不同程度的增高,随着损伤时间的延长, Ca^{2+} 浓度有下降趋势。**结论** Ca^{2+} 与受损神经元的异位电活动的发生及变化相关, Ca^{2+} 浓度升高可导致受损神经元异位电活动的发生及传播。

【关键词】 背根神经节; 钙离子; 离子通道; 激光共聚焦扫描

Electrophysiological changes and intracellular Ca^{2+} concentration in DRG neurons in rabbits with chronic injury of lumbar nerve roots QIE Shu-yan*, YUE Shou-wei, PAN Bo, SHI Qing, HOU Huai-shui, KANG Le,
* Department of Rehabilitation Medicine, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China

【Abstract】Objective To investigate the relationship between ectopic firing and intracellular Ca^{2+} concentration of chronically injured neurons. **Methods** Thirty-two purebred adult New Zealand rabbits was randomly divided into four groups: a control group, a 10d group, a 30d group and a 90d group. Chronically injury model of lumbar nerve root caused by disc herniation were made with rabbits. The in vivo electrophysiologic examination was conducted at the 10th, 30th and the 90th days, respectively post-injury to observe the spontaneous ectopic firing of the injured DRG neurons. Meanwhile, a laser confocal scanning microscope was used in conjunction with fluorescent staining to detect intracellular free Ca^{2+} concentration in injured DRG neurons. **Results** Ectopic firing was observed in DRG neurons post-injury, whose firing frequency and amplitude were significantly higher than the those of the control group($P < 0.05$), and gradually decreased with time. After chronic injury, intracellular free Ca^{2+} concentration in DRG was increased to various extend, which was also gradually decreased with time. **Conclusion** It was shown that the intracellular free Ca^{2+} concentration was correlative to ectopic firing of the injured neurons; increased Ca^{2+} concentration can result in ectopic firing and its propagation in the injured neurons.

【Key words】 Dorsal root ganglion; Ectopic firing; Calcium ion; Ion channels

各种腰椎病变(如腰椎间盘突出、椎管狭窄、外伤及退行性变)均可因腰神经根及背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)在神经通道内受到机械压迫和炎性刺激而出现根性神经痛症状(如痛觉过敏、烧灼痛、感觉异常、感觉倒错等)。研究表明,DRG 的异位电活动是根性神经痛发生的重要的病理生理基础^[1],神经细胞内 Ca^{2+} 浓度与神经损伤的关系也很密切。但到目前为止,尚缺乏受损 DRG 自发放电程度与细胞内 Ca^{2+} 浓度关系的直接证据。我们采用在体电生理记录、激光共聚焦显微镜扫描技术及荧光染色技术,在保持活体细胞正常结构联系的基础上同步研究受损神经

元的异位电活动与活体细胞内 Ca^{2+} 浓度变化的关系,以初步探讨 Ca^{2+} 在受损神经元电活动中的作用,为病理性神经痛的研究与治疗提供新的实验依据。

材料与方法

一、实验动物与分组

纯种成年新西兰大白兔 32 只(购自山东省农科院实验动物中心),体重 2.5 ~ 3 kg,兔龄 10 ~ 15 个月,随机分为正常组、损伤 10 d 组、损伤 30 d 组和损伤 90 d 组,每组 8 只。

二、动物模型制备

实验大白兔称重后,用 3% 戊巴比妥钠(0.5 ~ 1 ml/kg 体重)耳缘静脉麻醉,在腰骶部沿 $\text{L}_5 \sim \text{S}_1$ 棘突行正中偏左切口,依次切开皮肤、腰背筋膜、多裂肌的

基金项目:山东省自然科学基金(No. Y2001C22)

作者单位:250012 济南,山东大学齐鲁医院康复科(郝淑燕、岳寿伟、时庆、侯怀水、康乐);北京整形外科医院外耳中心(潘博)

外脊侧、荐棘肌筋膜,钝性剥离至横突,无菌暴露左侧 L₇ 椎间外孔,于兔尾根部距肛门约 2 cm 处切断,取尾椎内自体髓核组织约 5 mg,放入内径 1.5 mm、外径 2.5 mm、管壁带孔的中空硅胶管内,自左侧 L₇ 椎间外孔,顺椎间管的自然弧度缓慢插入,压迫左侧 L₇ 神经根。

三、DRG 神经元在体电生理记录

术后 10 d、30 d、90 d 分别取损伤和正常组大白兔,戊巴比妥钠麻醉后行腰部椎板切除术,充分暴露受损或正常的 L₇ DRG,损伤大白兔需仔细剥去 DRG 上的炎性粘连组织,移去压迫的硅胶管,为引导 DRG 神经元的放电、防止外周感受野神经冲动的传入,在 DRG 外周端约 5 mm 处切断脊神经。分离 L₇ 背根,并用 35~37℃ 的液体石蜡覆盖。与 DRG 相连的中枢端悬挂于双极银丝记录电极,放电输入到 AVB-10 生物放大器(高频滤波 3 KHz,低频滤波 50 Hz),放大后的信号引入 VC-10 双线记忆示波器及监视器,同时引入 SCB-68 数据采集卡(National Instruments 公司,美国),进入计算机后通过计数器和 BioBench 软件(NI 公司,美国)对信号进行记录、分析、处理,计算各组放电频率(脉冲/s,计数 5 s)、放电幅度峰值(mV,每秒计数 5 个时间点,共计数 5 s)并进行统计分析。实验中通过 VC-10 双线记忆示波器观察放电的详细情况。

四、DRG 神经元激光共聚焦显微镜(laser confocal scanning microscope, LCSM)扫描

将正常或损伤组进行电生理记录后的 L₇ DRG 快速取出,在人工脑脊液(artificial cerebrospinal fluid, ACSF)培养皿中剪碎,放入 37℃ 的 CO₂ 培养箱中孵育 45 min,将孵育好的标本移入终末浓度为 5 μmol/L 的 Fluo-3/AM,室温下负载 45 min,负载过程中轻轻摇晃促进染色,然后以不含 Fluo-3/AM 的 ACSF 冲洗 3 次,1 000 转/min 离心 10 min,冲洗过程共离心 4 次,以去除细胞外多余的 Fluo-3/AM。将孵育完的负载后标本放在 LCSM 的载物台上,以 20 倍物镜观察,扫描方式为平面扫描,电子放大为 1.0,激发波长为 488 nm,接收波长为 522 nm,光切厚度为 100 μm,利用 LCSM 的无损伤光切功能,对活体神经节进行不同层面的光切,观察不同层面、不同部位的 Ca²⁺ 荧光强度,用 Image-Pro plus 4.5.0.19 图像分析系统测定图像的光度学参数,以平均光密度(average optical density, AOD)来定量表示 Ca²⁺ 浓度变化。

五、统计学分析

测得的结果用 SPSS 10.0 统计软件,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较组间统计学差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组 DRG 自发电位测定

32 只大白兔共记录到 15 个 DRG 神经元传入纤维(复合神经)的自发电活动,其中正常组 1 个,损伤 10 d 组 7 个,损伤 30 d 组 5 个,损伤 90 d 组 2 个。各组放电频率值(脉冲/s)、放电幅度(mV)值如表 1 所示,损伤各组与正常组相比,DRG 放电频率、放电幅度均显著增高($P < 0.05$);单向方差分析结果显示,损伤各组组间 DRG 自发放电频率与放电幅度差异均有统计学意义($P < 0.05$),组间均数的多重比较结果显示损伤 30 d 组与 90 d 组间放电幅度差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各组放电幅度和放电频率差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

二、各组 DRG 神经元 Ca²⁺ 浓度变化

各组 DRG 神经元内游离 Ca²⁺ 光密度值见表 1。损伤各组 DRG 神经元内 Ca²⁺ 荧光强度较正常组有不同程度的增高($P < 0.05$),见图 1,2,3,4,随损伤时间的延长, Ca²⁺ 浓度有下降趋势,与 DRG 神经元自发电位变化趋势相符。

表 1 各组 DRG 自发电位和细胞内 Ca²⁺ 的变化($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	自发电位		
		放电频率(脉冲/s)	幅度(mV)	Ca ²⁺ AOD
正常组	8	4.20 ± 2.36	0.08 ± 0.03	65.97 ± 15.51
损伤 10 d 组	8	115.29 ± 20.39* [△]	1.00 ± 0.33* [△]	247.16 ± 4.78*
损伤 30 d 组	8	63.40 ± 12.54* [△]	0.40 ± 0.15*	212.78 ± 43.81*
损伤 90 d 组	8	22.00 ± 5.66* [△]	0.18 ± 0.04*	88.42 ± 19.82*

注:与正常组相比,* $P < 0.05$;损伤各组间相比,[△] $P < 0.05$



图 1 正常组 L₇ DRG 自发电活动



图 2 腰神经根慢性损伤 10 d 后 L₇ DRG 自发电活动



图 3 腰神经根慢性损伤 30 d 后 L₇ DRG 自发电活动



图 4 腰神经根慢性损伤 90 d 后 L₇ DRG 自发电活动

讨 论

正常状态下,DRG 胞体对感觉轴突提供营养,但不直接传递电活动,更不直接产生自发电活动。研究

表明,神经根损伤后,DRG 较相应神经根对机械刺激及缺氧更敏感,DRG 急性受压可诱发动作电位的发放,在解除压迫后其异位自发放电可持续数分钟^[2],DRG 慢性受压亦可导致其有髓及无髓纤维异常放电^[3]。神经损伤诱发 DRG 神经元产生急剧的功能改变,DRG 神经元的重复性放电可能是 DRG 神经元修复自身和功能代偿的应激表现^[1]。本研究结果表明,兔腰神经根及 DRG 慢性损伤后,受损 DRG 神经元产生自发放电,呈现超兴奋状态,对损伤后不同时间受损 DRG 神经元进行在体电生理记录结果发现,损伤后各组与正常组相比自发电位频率与幅度差异均有统计学意义;随损伤时间的延长,放电频率和幅度呈现下降趋势,这与多数研究发现神经根损伤后 DRG 出现异位电活动的变化相符。

Ca^{2+} 参与细胞内外信息传递、神经递质的合成和释放、激活酶促反应等,是神经细胞信息传递中重要的细胞内第二信使。正常生理状态下,神经细胞内钙大部分为结合钙,储存在线粒体、内质网,与钙调蛋白结合,而游离 Ca^{2+} 大部分存在于细胞外。神经细胞内外存在很大的 Ca^{2+} 浓度梯度差,神经元静息时细胞内游离 Ca^{2+} 浓度为 $10^{-8} \sim 10^{-7} \text{ mol/L}$,细胞外液 Ca^{2+} 浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。 Ca^{2+} 对细胞功能的调节作用主要是通过钙调蛋白(calmodulin, CaM)等钙结合蛋白介导的,CaM 本身无活性,当细胞内 Ca^{2+} 浓度超过 10^{-4} mol/L 时,CaM 与 Ca^{2+} 结合形成 Ca^{2+} -CaM 复合物,变为活性型 CaM,才启动靶酶引起一系列的病理生理反应。

在研究神经痛的动物模型中发现,电压依赖性钙通道是神经系统信息传递的重要的通道蛋白,钙通道的结构、表达和分布的变化将影响到神经系统兴奋性的改变。目前认识到的电压依赖性钙通道有四种亚型:L 型,N 型,T 型,P/Q 型,其中 L 型钙通道被认为与神经损伤后慢性疼痛的关系密切^[4,5]。腰神经根损伤后,各种离子通道的共同作用所致的大量 Ca^{2+} 内流以及细胞内钙库动员的增加可导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, Ca^{2+} 作为细胞内重要的第二信使又参与神经损伤和神经痛的形成。因此,直接检测细胞内游离 Ca^{2+} 是深入探讨神经细胞损伤时神经生化变化的较好的方法。本实验初次应用激光共聚焦扫描显微镜结合 Ca^{2+} 荧光探针 Fluo-3/AM 荧光染色直接检测 DRG 神经元损伤后不同时间细胞胞浆中游离 Ca^{2+} 荧光强度,结果显示,DRG 神经元损伤后细胞内 Ca^{2+} 浓度呈现不同程度的增高,随着受损时间的延长,DRG 神经元内 Ca^{2+} 荧光强度有下降趋势。

LCSM 系统是近年推出的集激光技术、电子技术、光学设计以及计算机于一体的影像检测仪,它的突出特点是照明点与探测点共轭,具有高分辨率与深度识别能力,可对生物样品进行无损伤光切,它的另一个特点是可实时观察活组织及活细胞内各种离子的动态变化,其中应用 LCSM 以荧光标记法测定细胞内 Ca^{2+} 浓度是测定 Ca^{2+} 浓度的较为准确的方法。本实验中,我们应用 Fluo-3/AM 与细胞温孵的方法对活体 DRG 细胞进行了荧光染色。但由于 Fluo-3 有较强的亲水性,难以进入细胞内,而在其负性基团部位结合上亲脂的乙酰羟甲基酯(AM)成为 Fluo-3/AM 后,其在细胞温孵时容易透过细胞膜,被胞浆内的酯酶水解为不能渗透细胞膜的 Fluo-3 而滞留在胞浆内,后者与细胞内游离 Ca^{2+} 结合形成 Fluo-3 - Ca^{2+} 复合物,其最大激发波长为 488 nm,最大接收波长为 560 nm,其 Ca^{2+} 结合形式的荧光强度较游离形式高 40 倍,可避免自发荧光的干扰。

本实验对腰神经根慢性损伤后损伤神经元异位电活动与细胞内 Ca^{2+} 浓度之间的关系及变化规律进行了初步研究,发现 DRG 异位电活动的发生与 DRG 神经元内游离 Ca^{2+} 浓度的变化规律相一致,表明 Ca^{2+} 浓度与损伤神经元的异位电活动的发生及变化相关, Ca^{2+} 浓度升高可导致损伤神经元异位电活动的发生及传播。作为病理性神经痛研究的初步探讨,我们希望此可作为后续研究的平台,能够借以对初级感觉神经元及中枢的兴奋性、离子通道的异常表达和分布等进行深入的探讨,从分子生物学水平阐述病理性疼痛的发病机制,为临床治疗各种慢性疼痛提供科学依据。

参 考 文 献

- 1 谢益宽. 慢性痛的发生机理. 科学通报 B 辑,1999,44:2353-2362.
- 2 Sugawara O, Atsuta Y, Iwahara T, et al. The effects of mechanical compression and hypoxia on nerve root and dorsal root ganglia. An analysis of ectopic firing using an in vitro model. Spine, 1996, 21:2089-2094.
- 3 Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat. Pain, 1998, 77:15-23.
- 4 Shembalkar PK, Till S, Boettger MK, et al. Increased sodium channel SNS/PN3 immunoreactivity in a causalgic finger. Eur J Pain, 2001, 5: 319-323.
- 5 Wang YX, Pettus M, Gao D, et al. Effects of intrathecal administration of ziconotide, a selective neuronal N-type calcium channel blocker, on mechanical allodynia and heat hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. Pain, 2000, 84:151-158.

(修回日期:2004-06-14)

(本文编辑:郭正成)