

文章编号: 1005-0957 (2005) 02-0033-04

· 动物实验 ·

累加电针提高神经痛大鼠背根神经节 GDNF mRNA 的表达

董志强¹, 马飞¹, 笪翠娣^{1,2}, 谢虹¹, 李为民¹, 王彦青¹, 吴根诚¹

(1. 复旦大学上海医学院中西医结合系, 针刺原理研究所, 上海 200032; 2 复旦大学附属眼耳鼻喉科医院, 上海 200031)

【摘要】目的 观察累加电针对神经痛大鼠背根神经节 (DRG) 中胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) mRNA 表达的影响。方法 实验分为 3 组, 对照组为正常大鼠, 神经痛组为大鼠坐骨神经慢性限制性损伤 (CCI) 致神经痛模型, 神经痛 + 电针组为术后第 7 d 起隔日给予神经痛大鼠累加电针治疗。各组动物处死后, 取 L₄-L₆ DRG, 冰冻切片, 采用原位杂交的方法, 观察累加电针对神经痛大鼠 DRG 中 GDNF mRNA 表达的影响。结果 大鼠坐骨神经结扎后出现显著热痛敏, 累加电针能明显抑制神经痛大鼠热痛敏; CCI 诱发神经痛后, 大鼠 DRG 中 GDNF mRNA 表达明显增高, 累加电针可以使其进一步增高。结论 实验提示内源性 GDNF 可能参与累加电针对大鼠神经痛的治疗作用。

【关键词】 胶质细胞源性神经营养因子; 电针镇痛; 神经痛

【中图分类号】 R245.3 **【文献标识码】** A

Cumulative Electroacupuncture Enhances Expression of GDNF mRNA in Dorsal Root Ganglions of Neuropathic Pain Rats

DONG Zhi-qiang¹, MA Fei¹, DA Cui-di^{1,2}, XIE Hong¹, LI Weim in¹, WANG Yan-qing¹, WU Gen-cheng¹. 1. Department of Integrative Medicine, Institute of Acupuncture Research, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 2. Eye Ear Nose and Throat Hospital, Fudan University, Shanghai 200031, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of cumulative electroacupuncture (EA) on the expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in dorsal root ganglions (DRG) of neuropathic pain rats **Methods** Rats were randomly divided into three groups: control group, neuropathic pain (NP) group and EA group. Chronic constriction injury (CCI) to sciatic nerve was performed on rats to induce neuropathic pain. On the 7th day after surgery, rats with hyperalgesia to radiant heat were selected as neuropathic pain rats and one group received cumulative EA treatment once every other day. Expressions of GDNF mRNA in L₄-L₆ DRG of different groups were examined using in situ hybridization technique **Results** The results showed that CCI surgery induced stable and lasting hyperalgesia and cumulative EA had potent analgesia effect on heat hyperalgesia of neuropathic pain rats. The expression of GDNF mRNA in DRG was significantly increased during neuropathic pain and could be further enhanced by cumulative EA. **Conclusion** Our results suggested that endogenous GDNF might be involved in EA analgesia on neuropathic pain of rats

【Key words】 GDNF; EA analgesia; Neuropathic pain

胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 是于 1993 年由小鼠胶质细胞系 B49 中分离出的糖基化的二硫键结合的同源二聚体蛋白质, 其结构特点属于转化生长因子 (transforming growth factor) 超家族的成员^[1]。GDNF 在中枢和外周神经系统广泛存在, 对多种神经元的发育、存活和再生有着强大的支持作用。近来许多证据表明, GDNF 与病理性疼痛尤其是神经痛有着密切的联系。

针刺是一种有效而副作用极少的治疗神经痛的手段, 这一点在临床及动物实验中均得到证实^[2-4]。本实验室杨向红等^[5]也证明, 电针能明显提高坐骨神经慢性限制性损伤所导致的神经痛大鼠痛阈。一般认为, 针刺镇痛是由痛信号与针刺信号在神经系统的各个层面发生整合, 从而抑制痛信号的

传递, 神经系统中阿片肽在针刺镇痛中起重要作用^[6-8]。但由于神经痛发病机制以及针刺调整效应的复杂性, 针刺抗神经痛的机制尚有待于进一步研究, 其他内源性活性物质也可能参与了针刺抗神经痛过程。有证据表明, 在帕金森病大鼠模型上, 中枢神经系统内的 GDNF 可能参与了针刺对大鼠帕金森病的治疗作用^[9]。本实验拟在神经痛大鼠模型上观察累加电针对神经痛大鼠 DRG 中 GDNF mRNA 表达的影响, 进一步探讨 GDNF 在电针抗神经痛中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠, 体重 180-200 g, 购自复旦大学上海医学院动物部。336 型辐射热测痛仪 (IITC NC Life Science Instrument, U. S. A.)。G6805-2 型多功能电针治疗仪 (上海医用电子仪器厂)。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (No 30472232, 30070948)

作者简介: 董志强 (1977-), 男, 博士

1.2 方法

1.2.1 CC模型^[10]:大鼠用戊巴比妥钠麻醉后,钝性分离左侧后肢肌肉,暴露坐骨神经干,每隔 1 mm 轻微结扎一道 4-0 羊肠线,共扎四道。对侧做假手术,只暴露坐骨神经,不结扎。手术后注射青霉素 G10万 U,以预防术后伤口感染。

1.2.2 测痛:手术后第 7 d测痛筛选热痛敏神经痛大鼠。安静环境中,室温 20 ±2 ℃,将大鼠放入 336型辐射热测痛仪的玻璃格子中,全身可以自由活动。待大鼠静置 20 min后,用强光照射大鼠足掌,测定大鼠的抬脚潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL)。为防止大鼠脚底热辐射烫伤,将上限值 (cut-off time)定为 20 s。

1.2.3 电针:安静环境中,室温 20 ±2 ℃,将大鼠躯干固定于木架上,头部与四肢可自由活动,待大鼠静置 20 min后,将 28号针灸针刺入大鼠单侧“环跳”与“阳陵泉”穴,通过电针治疗仪给予“疏密波”(疏波频率约 4 Hz,串长 2.5 s,密波频率约 60 Hz,串长 5 s),强度以引起大鼠后肢肌肉轻微抖动而不嘶叫为宜 (<1 mA)。自手术后第 7 d起给予累加电针治疗,隔日 1次,每次 30 min,持续 3 w。

1.2.4 切片:取材时间点为手术后 2 w, 3 w, 4 w,分别对应电针治疗 1 w, 2 w, 3 w,将大鼠用戊巴比妥钠麻醉,左心室插管灌注固定,先以 250 ml生理盐水速灌冲洗,继之灌入 350 ml含 4%多聚甲醛的 0.1 M磷酸钠缓冲液 (PB, pH 7.4)。灌注完毕后,剥离 L₄-L₆背根神经节,置于上述固定液 4 ℃放置 5 h,随之浸泡在含 20%蔗糖的 0.1 M磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 4-6 h,然后浸泡在含 30%蔗糖的 0.1 M磷酸钠缓冲液 4 ℃放置。待标本沉至容器底部后,在半导体致冷的切片机上 (Reichert-Jung恒冷切片机,德国)制备 30 μm厚冰冻冠状切片,收集于含 30%蔗糖、30%乙醇的 0.05 M磷酸钠缓冲盐溶液 (PBS, pH 7.4),置 -20 ℃保存。

1.2.5 原位杂交 (漂浮法):切片预处理如下: (1) 切片漂浮于 0.1 M PBS液 (pH 7.4) 5 min; (2) 含 4%多聚甲醛的 0.1 M PBS液固定 5 min; (3) 0.1 M PBS液漂洗, 15 min ×4次; (4) 含 1.5 μg/ml蛋白酶 K的 TE液 (含 1 mM EDTA) 的 0.01 M Tris-HCl缓冲液, pH 8.0) 消化, 37 ℃, 30 min; (5) 0.1 M PBS液漂洗, 15 min ×2; (6) 含 0.25%乙酸酐的 0.1 M三乙醇胺处理以降低背景, 10 min; (7) 含 50%甲酰胺的 4 ×SSC (saline sodium citrate)平衡 20 min。将切片挑入含 0.5 μg/ml地高辛标记的 GDNF mRNA 探针 (5'-AGTATTTTGGTCGTA-CATTGTCCTCGGCCCTTACAGGAACCGCTACAAATAT-3'^[11] nucleotides (nt 478-528)的杂交液 (50%甲酰胺, 5 ×SSC, 2% Blocking Reagent, 0.02% SDS)中,在 37 ℃反应 20 h进行原位杂交。杂交完毕,按以下程序漂洗切片: 2 ×SSC, 15 min ×2; 2 ×SSC (含 RNase A 20 μg/ml), 37 ℃, 30 min; 0.1 ×SSC, 42 ℃, 15 min ×2。然后脑切片按如下步骤进行 DIG免疫化学显色反应: (1) Buffer I中平衡 2 min; (2) Buffer 中孵育, 37 ℃, 30 min; (3) 碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体 Fab片段以 1:2500稀释于抗体稀释液中,放入脑切片, 37 ℃孵育 2 h; (4) Buffer 中漂洗 15 min ×2; (5) Buffer 中平衡 5

min; (6) NBT和 BCIP显色液中室温下避光显色 7 h; (7) TE液中漂洗 5 min ×2,以终止显色反应。PBS液中贴片,凉干,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片。

1.2.6 图像处理:应用计算机图像分析系统进行图像处理 (Leica Q500 W, Gemany)。每张切片在 ×50的镜下,测量视野内的平均光密度和阳性面积占总面积的百分比。每只大鼠取 6张切片,每个神经节各取两张,计算平均值。

1.3 统计学处理

SPSS10.0计算机统计软件进行数据处理,所有数据均用平均值 ±标准误 (x ±s)表示。单因素方差分析 (one way ANOVA)进行数据比较, P < 0.05有显著性意义。

2 结果

2.1 累加电针镇痛效果

CC术后第 7 d,大鼠出现显著、稳定的热痛敏 (对照组 PWL: 12.48 ±0.46 s,神经痛组 PWL: 5.24 ±0.33 s)。给予累加电针治疗后,神经痛大鼠缩爪潜伏期延长,痛敏减弱,第 3次电针之后,与神经痛组相比有显著性差异 (PWL: 9.99 ±0.35 s vs 5.57 ±0.24 s, P < 0.05, n = 12),并且随着电针次数的增加,神经痛大鼠缩爪潜伏期进一步延长 (累加电针持续 3 w后, PWL: 10.34 ±0.58 s vs 5.46 ±0.36 s, P < 0.001, n = 12),提示电针对神经痛大鼠具有显著累加镇痛作用。

2.2 GDNF mRNA表达变化

无探针、正义链孵育、RNA酶预处理的切片不显示杂交信号。GDNF mRNA 阳性信号呈蓝紫色,阳性细胞为 DRG内神经元周围的雪旺氏细胞和卫星细胞 (图 1, A 箭头所指为雪旺氏细胞和卫星细胞)。图像分析结果显示,与对照组相比,神经痛大鼠 DRG中 GDNF mRNA 阳性细胞平均光密度及阳性面积占总面积的百分比均明显增加,而累加电针可以使两项指标进一步增加。(图 2)。

3 讨论

以往的研究认为 GDNF是靶组织源性,即由外周组织合成,然后被神经末梢摄取,逆向运输至 DRG初级感觉神经元胞体,但这不能很好地解释 GDNF在轴突的顺向运输现象。最近的研究发现,DRG初级感觉神经元周围的胶质细胞,即雪旺氏细胞和卫星细胞,也能合成和分泌 GDNF,然后被神经元内化,再顺向运输至外周和中枢末端^[12,13],这也同时解释了在脊髓背角 GDNF蛋白只存在于浅层感觉传入纤维末梢。本实验通过原位杂交技术,验证了 GDNF mRNA在 DRG中只存在于雪旺氏细胞和卫星细胞,而神经元胞体中没有阳性信号。

本实验结果表明,累加电针可以提高神经痛大鼠 DRG中 GDNF mRNA的表达,提示累加电针可以激活内源性 GDNF系统的功能。最近,多个实验室分别报道了蛛网膜下腔给予 GDNF或是通过基因工程技术使 GDNF高表达,均可以显著抑制大鼠神经痛^[14-16]。许多证据也表明,GDNF可能通

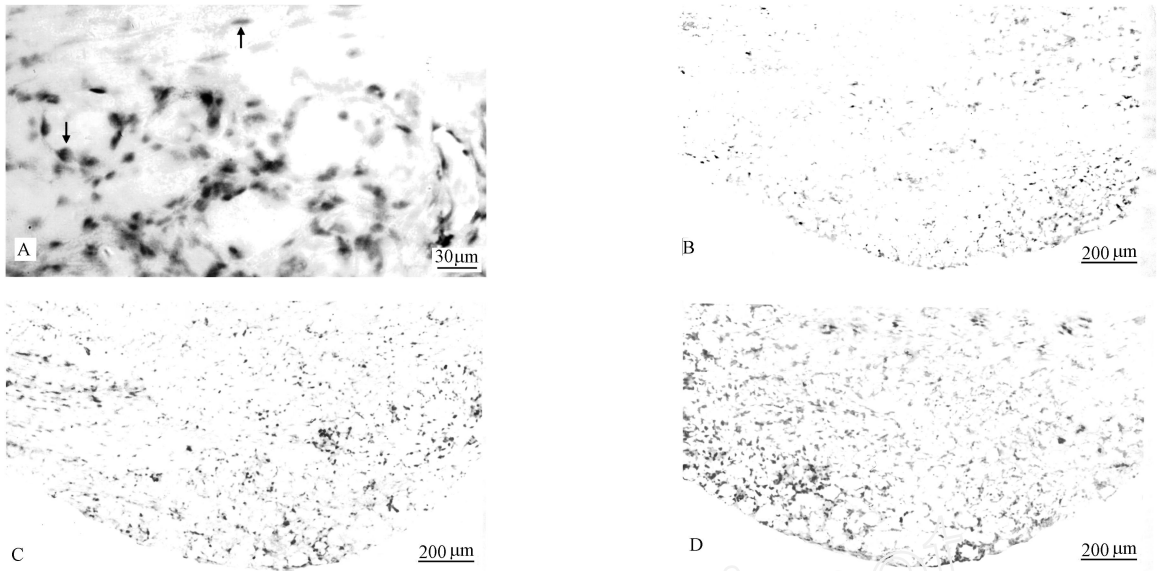


图 1 原位杂交结果显示累加电针对神经痛大鼠 DRG 中 GDNF mRNA 表达的影响
A 箭头所指为雪旺氏细胞和卫星细胞, B = 对照组, C = 神经痛组, D = 神经痛 + 电针组

Figure 1 Effect of accumulative EA on the expression of GDNF mRNA in DRG of neuropathic pain rats

Photomicrographs show the change of the expression of GDNF mRNA. (A) Arrows point to positive signal of GDNF mRNA, B = Control group, C = NP group, D = NP + EA group.

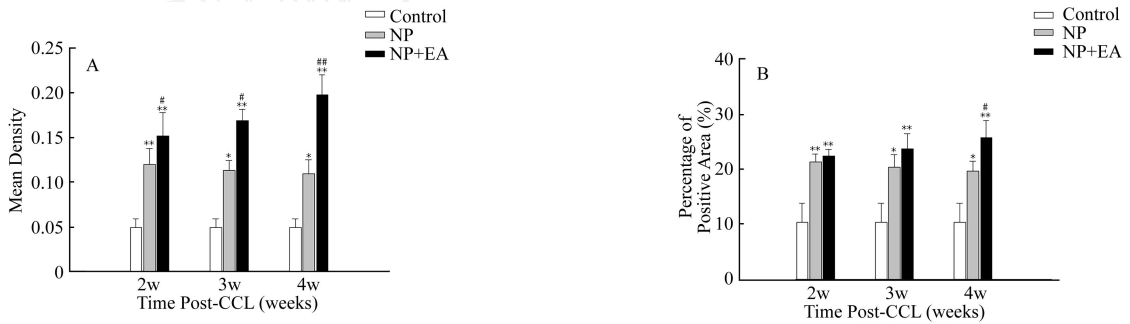


图 2 累加电针对神经痛大鼠 DRG 中 GDNF mRNA 表达的影响 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 对照组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs 神经痛组 A 平均光密度变化, B 阳性面积占总面积百分比变化 ($n = 6$)

Figure 2 Effect of accumulative EA on the expression of GDNF mRNA in DRG of neuropathic pain rats * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs NP group ($n = 6$)

过多种途径对神经痛发挥抑制作用。比如, GDNF 可以抑制促使神经痛发生的 A 类传入纤维出芽和神经肽 Y 的表达增加, 阻断粗的有髓传入纤维的异位电活动。另外, GDNF 还可以促进某些内源性镇痛物质如生长抑素的释放。本实验室的研究也发现, 如果蛛网膜下腔给予针对 GDNF 特异性、高亲和力受体 GFR-1 的反义寡核苷酸, 阻断 GFR-1 的表达, 则可以减弱累加电针对大鼠神经痛的治疗作用 (待发表)。这表明内源性 GDNF 可能参与了累加电针对大鼠神经痛的治疗过程, 其作用机制有待于进一步研究。

参考文献

[1] Lin LH, Doherty DH, Lile JD, et al GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. Science, 1993, 260 1130-1132.
[2] 廖小七. 浅刺电针法治疗坐骨神经痛 92 例 [J]. 上海针灸杂志, 1997, 16(3) 18

Liao XQ. 92 examples on treatment of sciatica by superficial electroacupuncture [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 1997, 16(3) 18 (Chinese).
[3] 陆新华. 针刺治疗坐骨神经痛的疗效分析 [J]. 上海针灸杂志, 1998, 17(2) 26.
Lu XH. Analysis on treatment of sciatica by acupuncture [J]. Shanghai Journal of Acupuncture and Moxibustion, 1998, 17(2) 26 (Chinese, English abstract).
[4] Huang B G, Min B I, Kim J H, et al Effects of electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model of neuropathic pain [J]. Neurosci Lett, 2002, 320 49-52.
[5] 杨向红, 王彦青, 高秀, 等. 电针对大鼠神经痛敏分数的影响 [J]. 针刺研究, 2002, 27(1) 60-63.
Yang XH, Wang YQ, Gao X, et al Effects of electroacupuncture on hyperalgesia score of neuropathic pain rats [J]. Acupunct Res, 2002, 27(1) 60-63 (Chinese, English abstract).
[6] Han J S, Terenius L. Neurochemical basis of acupuncture analge-

sia[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1982, 22 193-220

[7] Liu X, Zhu B, Zhang SX Relationship between electroacupuncture analgesia and descending pain inhibitory mechanism of nucleus raphe magnus[J]. Pain, 1986, 24 383-396

[8] Sluka KA, Deacon M, Stibal A, et al Spinal blockade of opioid receptors prevents the analgesia produced by TENS in arthritic rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 289 840-846

[9] Liang X B, Luo Y, Liu X Y, et al Electroacupuncture improves behavior and upregulates GDNF mRNA in MFB transected rats [J], NeuroReport, 2003, 14 1177-1181.

[10] Ma F, Xie H, Dong ZQ, et al Effect of intrathecal administration of nocistatin on orphanin FQ/nociceptin analgesia in the nerve injury rat[J]. Brain Res, 2003, 988 (1-2) 189-192.

[11] Stromberg I, Bjorklund L, Johansson M, et al Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo [J]. Experimental Neurology, 1993, 124 201-412.

[12] Russell FD, Koishi K, Jiang Y, et al Anterograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptors in rat hypoglossal nerve[J]. Neuroscience, 2000, 97 (3) 575-580.

[13] Howard B R, Christopher S B. Anterograde axonal transport of internalized GDNF in sensory and motor neurons[J]. NeuroReport, 2002, 13 (5) 659-664.

[14] Wang R, Guo W, Ossipov M H, et al Glial cell line-derived neurotrophic factor normalizes neurochemical changes in injured dorsal root ganglion neurons and prevents the expression of experimental neuropathic pain[J]. Neuroscience, 2003, 121 815-824.

[15] Boucher T J, Okuse K, Bennett D L, et al Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states[J]. Science, 2000, 290 124-127.

[16] Hao SI, Mata M, Wolfe D, et al HSV-mediated gene transfer of the glial cell-derived neurotrophic factor provides an antiallodynic effect on neuropathic pain[J]. Molecular Therapy, 2003, 8 (3) 367-375.

收稿日期 2004-10-08

·相关链接·

神经病理性疼痛与背根神经节

神经病理性疼痛是由于神经损伤所引起,从神经损伤(伤害性刺激)到疼痛产生,在神经系统发生了一系列复杂的电学和化学的变化。其基本过程是:伤害性刺激在外周初级感觉神经元换能,转变成电信号,经脊髓、脑干和丘脑的传递和调制,最后在大脑皮层产生痛觉。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)作为痛觉传入的第一级神经元在痛觉的外周机理中起着极为重要的作用。

·DRG和痛觉传入纤维:DRG是感觉传入的第一级神经元,属于假单极初级感觉神经元,胞体发出单个轴突在节内延伸一段长度后分为两支:一支为外周神经轴突,伸向外周组织,接受感觉信息;另一支为中枢轴突,将外周传入信息送至脊髓背角,完成初级感觉信息的传递。

·DRG细胞的异位放电:充分的证据表明神经损伤所致的痛觉过敏(hyperalgesia)、痛性感觉异常(allodynia)和自发的持续性疼痛都是由初级传入神经元的变化所引起。

·损伤及邻近未损伤神经纤维的作用:脊神经扎(spinal nerve ligation, SNL)神经损伤模型中至少有2组传入纤维产生异位放电:损伤及邻近未损伤传入纤维。二者都被假设成能诱发并维持神经病理性疼痛,到底神经病理性疼痛由哪一种诱发和维持仍是一个有争议的问题。目前采用了3种不同的方法来研究这个问题:选择性脊神经切断术,电生理记录,分子生物学及免疫组化方法。

·DRG细胞传入纤维的分工:脊神经损伤所致的热/冷痛觉过敏及触诱发痛可能由不同的DRG细胞传入纤维介导。SNL所致的热痛敏同伤害性热刺激一样由辣椒素敏感的C纤维传导,而触诱发痛由A类纤维传导。

·DRG神经元的离子通道:DRG神经元中存在几乎所有的各种离子通道,它们对感觉信号起放大和精细微调用。在神经病理性疼痛中发现了离子通道表达和/或分布的变化,通道电流也表现出不同的变化,DRG的异位放电与离子通道的变化密切相关。

(引自罗放.神经病理性疼痛的背根神经节机制.国外医学·麻醉学与复苏分册,2003,24(2) 68-70)