

神经性疼痛对老龄大鼠学习记忆功能和海马超微结构的影响

刘 桦¹ 石翊颀^{1,2} 张喜洋¹ 朱小兵¹

摘要

目的: 观察神经性疼痛对老龄大鼠学习记忆功能及脑脊液 S100B 蛋白表达、海马 CA1 区突触超微结构的影响。

方法: 18 月龄雄性 Wistar 大鼠 60 只, 随机分为 3 组: 正常组(N 组), 假手术组(S 组), 坐骨神经结扎组(C 组), 松扎左侧坐骨神经。各组按术后第 1、7、14、21 天再随机分为 4 个亚组, 每组 5 只。测大鼠热刺激回缩潜伏期(PWTL), 用 Morris 水迷宫测大鼠学习记忆功能, 并记录基础值, 麻醉后抽取脑脊液 ELISA 法检测 S100B 蛋白浓度, 透射电镜观察大鼠海马 CA1 区 GrayI 型突触结构的变化。

结果: ①与基础值比较, C 组 PWTL 缩短显著($P<0.01$)。②与基础值比较, C 组大鼠潜伏期显著延长($P<0.01$)和穿越平台次数显著减少($P<0.01$); 与 N 组和 S 组比较, 差异有显著性($P<0.01$)。③与 N 组和 S 组比较, C 组脑脊液 S100B 蛋白浓度显著升高($P<0.01$)。④透射电镜观察, C 组大鼠海马突触间隙的增宽, 突触囊泡减少。

结论: 神经性疼痛可致老龄大鼠的空间学习记忆能力下降, 脑脊液 S100B 蛋白表达上调和突触可塑性改变可能是其机制。

关键词 神经性疼痛; 老龄大鼠; 学习记忆; S100B 蛋白; 海马; 突触

中图分类号: R971, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2010)-03-0211-04

Effects of neuropathic pain on the abilities of learning and memory and synaptic ultrastructure of hippocampus in aged rats/LIU Hua, SHI Yisa, ZHANG Xiyang, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(3): 211—214

Abstract

Objective: To investigate the effects of neuropathic pain on the abilities of learning and memory, and the level of protein S100B in cerebrospinal fluid (CSF), the change of synaptic ultrastructure of CA1 area in hippocampus of aged rats.

Method: Total 60 male 18-month-old Wistar rats were randomly divided into 3 groups: normal group (N), sham group (S), chronic constriction nerve injury (CCI) group (C). In CCI model sciatic nerve was ligated loosely. Each group was randomly divided into 4 subgroups at 1st, 7th, 14th, 21th d, 5 rats in each group. The paw withdrawal thermal latency (PWTL) was tested, the ability of learning and memory was assessed with Morris water maze (MWM), the concentration of protein S100B in CSF was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after anesthesia, and the synaptic ultrastructure of hippocampus was observed under transmission electron microscopy.

Result: ①In group C, the PWTL was shortened significantly after operation ($P<0.01$), there was no significant difference between group N and group S. ②Compared with group N and group S, in group C the escape latency was significantly longer than before ($P<0.01$), and the frequency of passing through platform was less than that in group N and S ($P<0.01$). ③Compared with group N and group S, the concentration of protein S100B of group C increased significantly ($P<0.01$). ④The width of synaptic gap increased, and the postsynaptic densities decreased, synaptic vesicles densities decreased significantly.

Conclusion: Neuropathic pain could impair the abilities of spatial learning and memory in aged rats; up-regulation of protein S100B expression in CSF and synaptic plasticity of hippocampus might be the mechanism.

Author's address Dept. of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Gansu, 730030

Key words neuropathic pain; aged rats; learning and memory; S100B protein; hippocampus; synapse

研究发现,麻醉和手术是术后认知功能障碍的主要原因,术后疼痛是否参与其机制尚不清楚^[1]。周围神经损伤引起的慢性疼痛,直接影响患者的生存质量^[2]。S100B 蛋白是神经胶质细胞分泌的脑特异性蛋白。在生理情况下, S100B 蛋白在学习记忆中发挥重要作用,对认知功能有重要影响^[3]。Linstedt 等^[4]研究发现, S100B 适于作为评估多种手术后认知功能损害的发生发展和结果的指标。海马 CA1 区与学习记忆功能密切相关,突触是神经信息传递的关键部位,海马神经元和突触结构与功能的完整性是维持学习记忆的前提。本实验拟通过观察老龄大鼠脑脊液中 S100B 蛋白水平,海马 CA1 区突触超微结构改变,探讨神经性疼痛对老龄大鼠学习记忆功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制备

18 月龄雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 450—500g,购自甘肃中医学院 SPF 实验室[许可证号:SYCXK(甘)2004-0006]。按照完全随机化法($n=20$),随机分为正常对照组(N 组)、假手术组(S 组)和坐骨神经结扎组(C 组),每组又按 C 组术后天数分为第 1 天(T1)亚组、第 7 天(T2)亚组、第 14 天(T3)亚组和第 21 天(T4)亚组。C 组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 40mg/kg (20g/L)麻醉后,参照 Bennett 和 Xie^[5]的方法制备左侧坐骨神经慢性挤压伤模型,游离坐骨神经用 4-0 铬制羊肠线环神经干每隔 1mm 轻扎 4 道,结扎力度以引起小腿肌肉出现轻度颤动为准,假手术组左下肢切开游离坐骨神经但不结扎,后两组创面撒青霉素粉末缝合切口,正常对照组大鼠不做任何处理。

1.2 热刺激回缩潜伏期 (paw withdrawal thermal latency, PWTL) 的测定

所有大鼠均在术前(T0)、术后第 1 天(T1)、7 天(T2)、14 天(T3)、21 天(T4)分别采用热辐射法(热痛觉过敏)^[6]测试 PWTL,将大鼠置于干净的 3mm 厚的玻璃板上的有机玻璃箱(20cm×20cm×25cm)内,使其适应 30min 后用热辐射刺激仪 (RYT21 型, 50w,12v)发出 5mm 光斑照射大鼠足底无毛区,记录从照射开始至大鼠出现抬腿回避时间即为 PWTL,照射时间不超过 30s,最长记为 30s。每只大鼠每侧测 5 次,手术侧与非术侧交替,同侧足底照射间隔 10min,两侧足底照射间隔 5min,去掉最大和最小值,计算 3 次 PWTL 差值的平均值(PWTL 差值=术侧 PWTL-对侧

PWTL)。如果双下肢 PWTL 相差太大,基础 PWTL<5s 或>30s,则将该大鼠剔除。

1.3 学习记忆功能测试

用 Morris 水迷宫法,各组大鼠在术前 5 天开始 Morris 水迷宫学习,每天在同一时间段进行,第 5 天进行术前测试,作为术前基础成绩。包括:①定位航行实验:实验历时 4d,第 1 天时大鼠在水池内自由游泳 3min,熟悉环境。以后每天上下午各测试一组次,每组次每只大鼠随机从每个象限的中点内壁式入水 1 次,共 4 次,记录找到平台的时间,即逃避潜伏期。如 120s 仍未找到,将大鼠引上平台休息 15s,并记录为 120s。②空间探索实验:定位航行实验完毕,撤除平台,选平台相对象限为入水点,记录大鼠在 60s 内穿越平台区域的次数。整个实验测试过程中,保持室内灯光、物品摆放等室内环境一致,以排除环境干扰。

1.4 S100B 蛋白浓度的测定

在 T1、T2、T3、T4 时间点进行水迷宫测试后,每组随机取 5 只大鼠,麻醉后固定于大鼠大脑立体定位仪上,颈部剪毛消毒,用 25G 腰麻针从枕骨大孔处抽取脑脊液 0.1—0.15ml,存放于-20℃低温冰箱。采用 ELISA 法测定脑脊液 S100B 蛋白水平(试剂盒购自上海晶天生物科技公司)。包被抗 S100B 抗体与待测样品中 S100B 结合,加入酶标抗体后形成复合物,后者与底物作用呈现显色反应,用 BIO-RAD (Benchmark-Plus)酶标仪在 450nm 处测得的 OD 值,根据标准浓度作标准曲线图,由光密度(the optical density, OD)值计算样品 S100B 浓度。

1.5 海马突触超微结构的观察

每组在相应时间点取 5 只大鼠,麻醉抽取脑脊液后,经左心室升主动脉插管同时剪开右心耳,灌注 4℃生理盐水 150ml 后,快速冲去血液后,再快速灌入 4℃ 4%多聚甲醛+2.5%戊二醛 PBS 固定液 150ml (pH7.4)。立即取脑剥离双侧海马,置于 2.5%戊二醛中固定 2h。PBS 冲洗 3 次,每次 10min,1%锇酸固定,

梯度酒精脱水,以环氧树脂 Epon812 渗透、包埋和超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅双重染色,在日产 JEM-1230 透射电镜下观察并摄片。

1.6 统计学分析

计量资料均以平均值±标准差表示,用统计软件 SPSS13.0 处理,多组数据间进行单因素方差分析,检验方差齐性后,两两比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

本实验大鼠术后无感染无自残现象。假手术组大鼠术后未出现术侧爪内收和运动障碍,CCI 大鼠术后均出现术侧爪内收,术后足轻度外翻和跛行。

2.1 大鼠各时间点热痛敏测试结果

与术前 1d 比较,C 组术后第 1 天 PWTL 缩短 ($P<0.01$),与 N 组和 S 组比较,C 组各时间点的 PWTL 逐渐缩短 ($P<0.01$),见表 1。

2.2 大鼠各时间点水迷宫测试结果

与术前第 1 天比较,C 组潜伏期延长 ($P<0.01$),穿越平台次数减少 ($P<0.01$),术后第 14 天最为显著。与 N 组和 S 组比较潜伏期显著延长 ($P<0.01$),穿越平台次数减少 ($P<0.01$),见表 2。

2.3 大鼠各时间点 S100B 浓度结果

N 组、S 组大鼠各亚组 S100B 浓度差异无显著, C 组大鼠脑脊液 S100B 浓度术后逐渐升高,与 N 和 S 组比较差异有显著性 ($P<0.01$),在第 14 天达到峰值,见表 3。

2.4 大鼠海马 CA1 区突触透射电镜结果

N 组和 S 组大鼠海马 CA1 区 Gray I 型突触,突触前、后膜结构清晰,突触前终末聚集有较多圆形的突触囊泡,突触间隙清楚。C 组突触突触前、后膜结构模糊不清,突触间隙增大,突触前终末突触囊泡减少,突触后致密物厚度变薄,线粒体肿胀,见图 1。

3 讨论

研究神经病理性疼痛最常用的动物模型包括:坐骨神经慢性缩窄性压迫 (chronic constriction nerve injury, CCI) 模型和坐骨神经部分损伤模型等,通过测量神经损伤侧肢体脚爪皮肤的感觉阈值即主要通过测评对热、机械刺激痛敏 (hyperalgesia) 和冷、触异常痛敏 (allodynia) 来确定模型是否成功。本实验采用 Bennett 等开发出的 CCI 模型,此模型与临床神经病理性疼痛特征有相似之处,保留后肢运动和感觉神经支配,没有自噬伤残肢体现象得到疼痛学界

表 1 大鼠各时间点的 PWTL 差值的比较 ($\bar{x}\pm s, s$)

组别	T0(n=20)	T1(n=5)	T2(n=5)	T3(n=5)	T4(n=5)
N 组	0.04±0.08	0.03±0.11	0.09±1.60	0.11±0.22	0.07±0.21
S 组	0.05±0.11	0.03±0.04	0.08±0.16	0.08±0.15	0.04±0.10
C 组	0.02±0.12	-0.01±0.07 ^{①②}	-3.44±2.22 ^{①②}	-4.60±2.61 ^{①②}	-4.52±2.37 ^{①②}

N 组:对照组, S 组:假手术组, C 组:坐骨神经结扎组;①与 T0 比较 $P<0.01$;②与 N 组和 S 组比较 $P<0.01$

表 2 大鼠各时间点水迷宫成绩的比较 ($\bar{x}\pm s$)

指标/组别	T0(n=20)	T1(n=5)	T2(n=5)	T3(n=5)	T4(n=5)
潜伏期(s)					
N 组	31.0±3.1	32.2±1.8	30.2±1.9	30.5±2.4	29.9±1.9
S 组	30.8±2.3	33.4±1.8 ^③	30.7±1.5	31.5±3.8	29.9±2.0
C 组	29.9±3.6	34.5±2.1	39.4±1.7 ^{①②}	53.1±3.7 ^{①②}	49.7±2.6 ^{①②}
穿越平台次数					
N 组	6.9±1.6	6.6 ±1.1	7.2±1.5	5.8±1.3	6.8±1.3
S 组	6.6±1.6	5.2±0.8	5.6±1.1	5.4±1.1	5.8±1.3
C 组	6.8±1.8	6.2±1.1 ^{①②}	4.4±1.1 ^{①②}	3.8±1.6 ^{①②}	4.0±1.0 ^{①②}

N 组:对照组, S 组:假手术组, C 组:坐骨神经结扎组;①与 T0 比较 $P<0.01$;②与 N 组和 S 组比较 $P<0.01$;③与 T0 比较 $P<0.05$

的广泛应用^[7]。

本实验中,采用 PWTL 差值的均数评价大鼠的痛阈,减少了两足数值悬殊带来的误差,术后观察到大鼠热痛敏(热刺激缩足时间缩短),成功建立了 CCI 模型,以上反应在术后第 14 天与假手术组相比差异

显著。模型组大鼠的术侧 PWTL 在术后第 1 天开显著缩短,第 14 天左右达到峰值,第 21 天稍有回升。而假手术后,术后第 1 天 PWTL 没有明显变化,说明短期的伤害性疼痛不会导致痛阈的下降。这与以前研究结果一致^[8]。

表3 大鼠各时段脑脊液中 S100B 蛋白浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/ml, n=5)

组别	T1	T2	T3	T4
N 组	20.65±1.95	20.70±1.91	20.73±1.48	20.98±1.66
S 组	20.38±2.44	20.35±2.38	20.50±2.26	20.89±2.28
C 组	36.99±5.59 ^②	42.94±2.79 ^{①②}	58.86±6.20 ^{①②}	58.62±5.28 ^{①②}

N 组:对照组, S 组:假手术组, C 组:坐骨神经结扎组;①C 组与 T1 比较, $P<0.01$; ②与 N 组和 S 组比较, $P<0.01$

图1 各组CA1区突触超微结构



(醋酸铀-柠檬酸铅染色, ×30000)

Morris 水迷宫^[9]是用于啮齿类动物学习记忆功能评估的重要工具,由英国生理学家 Morris 设计并首次使用。目前已成为一种研究空间学习和记忆机制方面的标准模式。逃避潜伏期表明获取空间信息的能力,而探索时间表明记忆储存及提取再现能力。但是,重复进行神经精神功能测验,结果常会出现一定程度的改善^[10]。张春美等^[11]研究后也认为运动训练可以促进海马内 c-fos、c-jun mRNA 的表达,从而促进学习记忆。此实验中,术前各组大鼠水迷宫成绩无差异,术后第 1 天 C 组大鼠的潜伏期明显延长,穿越平台次数减少,说明术后第 1 天即引起大鼠学习记忆功能的障碍,术后第 14 天时最为严重。假手术组大鼠的逃避潜伏期在术后第 1 天延长,推测手术切口引起的伤害性疼痛,影响了大鼠的运动能力,游泳速度下降,而第 7 天后伤口痊愈,逃避潜伏期与术前比较无差异。

S100B 蛋白是神经胶质细胞分泌的特异性蛋白。在生理情况下, S100B 蛋白在学习记忆中发挥重要作用,对认知功能有重要影响。研究表明,细胞外 S100B 蛋白作用依赖于它的浓度:低浓度的 S100B 蛋白具有神经营养作用,促进神经的生长、修复;高浓度的 S100B 蛋白有神经毒性^[12]。S100B 的 mRNA 及其表达产物随年龄增长有上升趋势,长期超阈值表达可造成递质系统紊乱和突触病理改变,导致学

习记忆能力下降^[13]。S100B 蛋白作为一种反映认知功能的生物指标已受到广泛关注。本实验中, CCI 组大鼠的脑脊液 S100B 蛋白浓度显著高于对照组和假手术组,而学习记忆能力下降,推测星形胶质细胞参与了学习记忆过程。S100 蛋白增多可导致过量的 NO 产生神经毒性,引起递质系统的紊乱和突触的病理改变,导致学习记忆能力下降^[14]。长期的 S100B 蛋白高表达如何引起突触的改变,其机制尚待进一步研究。

学习记忆是最重要的脑高级功能之一,突触修饰是其最受重视的神经机制,而海马是与记忆有关的重要脑区。海马 CA1 区与学习记忆功能密切相关,突触是神经信息传递的关键部位,海马神经元和突触结构和功能的完整性是维持学习记忆的前提,海马损伤主要表现在海马内部各个区如 CA1 区、CA3 区、齿状回等的细胞丢失,突触传递的兴奋性与抑制性改变,从而引起认知功能改变^[15]。突触囊泡是位于突触前膜的清亮小泡,小泡内富含神经递质。突触小泡的数密度是神经元活性的直观标志物,囊泡增多,神经递质释放增多,突触活性增加。功能性改变必然有其物质和形态学基础,故观察大鼠海马神经元突触形态变化有利于探讨 CCI 影响脑高级功能的神经机制。Pais-Vieira M^[16]等通过大鼠慢性疼痛模型首次证实,疼痛可以造成大鼠的认知功能损害。本实验结果表明, CCI 后大鼠学习记忆能力下降,同时电镜观察到海马 CA1 区神经元突触超微结构的改变,推测神经性疼痛引起认知功能的损伤与神经元细胞超微结构改变有关。

综上所述, CCI 所致神经性疼痛,对老龄大鼠的学习记忆功能有抑制作用,其机制可能与疼痛上调 S100B 蛋白的表达,海马突触结构改变有关。

参考文献

- [1] 曾涛,温剑虎.术后认知功能障碍[J].中国行为医学科学,2005,11:1055—1056.
- [2] 陈菁,陈建梅,楚燕飞,等.联合应用 NGF、CNTF 和 GDNF 对大鼠坐骨神经结构和功能恢复影响[J].中国康复医学杂志,2006,11:967—970.
- [3] Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, et al. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative

(下转第227页)