

自由基清除剂苯-N-叔丁基硝酮抑制大鼠脊髓损伤后中枢性痛觉敏化的行为学观察*

刘少辉¹ 刘 伟¹ 邱少汕¹ 徐锡金^{1,2}

摘要

目的:观察不同时程自由基清除剂左旋捕集剂苯-N-叔丁基硝酮(PBN)消除活性氧(ROS)后,大鼠脊髓损伤(SCI)引发中枢性痛觉敏化的行为表现。

方法:选择健康成年雌性SD大鼠24只,体重180—220g,随机分为阴性对照组、假手术组、SCI+PBN组和SCI+生理盐水(NS)对照组(N=6);鞘内置管后,采用自行改制的O型纽约大学装置建立大鼠SCI模型,SCI+PBN组鞘内注射15μl PBN(3mg/15μl),SCI+NS对照组注射15μl NS,术后30min第1次注射,以后连续注射7d,每天1次;观察和记录第1、3、7、14、21、28、35天时间点大鼠对机械性和热痛敏刺激的感受性变化,并采用BBB运动功能评分标准,对术后第1、5、10、15、20、25、30、35天时间点进行行为评价。

结果:与SCI+NS对照组比较,注射SCI+PBN组大鼠机械性刺激痛阈值增高,热缩足潜伏期延长,BBB行为评价PBN注射组也明显优于对照组($P < 0.01$)。

结论:左旋捕集剂苯-N-叔丁基硝酮具有消除ROS,降低中枢性痛觉敏化的作用,为进一步探讨SCI后ROS下游谷氨酸受体激活和相关细胞因子所致中枢性痛觉敏化的机制提供依据。

关键词 自由基清除剂;苯-N-叔丁基硝酮;脊髓损伤;中枢性痛觉敏化;大鼠;行为学

中图分类号:R744,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2014)-03-0199-05

Behavioral analysis of hyperalgesia of central sensitization after intrathecal injection of phenyl-N-tert-butyl nitron in a rat model of spinal cord injury/LIU Shaohui, LIU Wei, QIU Shaoshan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(3):199—203

Abstract

Objective: To evaluate the behaviors of hyperalgesia after removal of reactive oxygen species(ROS) by free radical scavengers phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) from intrathecal injection in a rat model of central neuropathic pain after spinal cord injury (SCI).

Method: Twenty-four female Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups for varied purposes: control-normal, sham-operation, SCI+NS (intrathecal injection of normal saline) and SCI+PBN (intrathecal injection 15mg/15μl). A 10g rod was dropped over a distance of 25mm onto the exposed T10 cord of rats using the modified weight drop device from New York University (NYU) (150 kDyne, 1s dwell time). PBN were intrathecally injected into the damaged areas at 30min post-surgery, and continuously for 7 days. On the 1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th, 35th day after SCI, BBB rating scale was used to observe the recovery of motor function. Mechanical paw withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were measured repeatedly before and on experimental days 1, 3, 7, 14, 21, 28, and 35 for experiment after each treatment of PBN.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.03.001

*基金项目:广东省自然科学基金(10151503102000008);汕头大学医学院李嘉诚科研基金资助项目(200906)

1 汕头大学医学院细胞生物学与遗传学教研室,汕头,515041; 2 通讯作者

作者简介:刘少辉,男,助理实验师; 收稿日期:2013-06-24

Result: Compared with SCI+NS and SCI+PBN groups, there were statistically significant improvements of locomotor behavior in SCI+PBN group($P < 0.05$). Mechanical allodynia could be statistically significantly attenuate in SCI+PBN group compared to SCI+NS group at the same time thermal hyperalgesia could be significantly attenuate($P < 0.01$).

Conclusion: PBN could remove the reactive oxygen species and induce hyperalgesia of central sensitization on the SCI in rat.

Author's address Dept. of Cell Biology and Genetics, Shantou University Medical College, Shantou, 515041

Key word free radical scavenger; phenyl-N-tert-butyl nitrone; spinal cord injury; hyperalgesia of central sensitization; behavior; rat

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后继发产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)与中枢性痛觉敏化密切相关。ROS及其诱导产生的致炎因子与神经生长因子(nerve growth factor, NGF和brain derived neurotrophic factor, BDNF),使谷氨酸受体蛋白的磷酸化上调及谷氨酸释放增多,诱发疼痛信号转导系统的激活,导致SCI后中枢性痛觉敏化的发生^[1]。本研究采用清除ROS的良好左旋捕集剂苯-N-叔丁基硝酮(phenyl-N-tert-butyl nitrone, PBN),经椎管内注射于大鼠SCI模型,观察不同病程PBN消除ROS后,损伤节段疼痛敏化的行为表现。为进一步阐明SCI后ROS下游谷氨酸受体激活和相关细胞因子所致中枢性痛觉敏化的机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物分组

选取健康成年雌性SD大鼠,体重180—220g,由南方医科大学动物中心提供。将大鼠在实验环境中适应性饲养3d,随机分为阴性对照组、假手术组、脊髓挫伤组。脊髓挫伤组又分为ROS清除剂PBN治疗组(SCI+PBN组)和生理盐水(normal saline, NS)对照组(SCI+NS组),每组6只。在手术前3—5d(体重200—245g),所有动物都要作一组测试以确定行为基线。本研究动物实验方式经学院实验动物伦理审查委员会批准,实验结束后,采用麻醉后处死。

1.2 SCI模型制备及鞘内导管植入和给药方法

用0.3%戊巴比妥钠30mg/kg腹腔内注射麻醉,腰背部脱毛,常规消毒,暴露脊髓棘突。固定胸第8—12棘突,咬开胸第9、10、11棘突,及第9、10椎

板,充分显露硬脊膜,约1cm,避免损伤硬脊膜^[2]。于所暴露脊髓尾端旁侧,在显微手术镜下,缝线针刺穿硬脊膜孔,见少量脑脊液流出时,将充满相应液体的PE-10微管向颈部方向插入约6mm。缝扎固定竖脊肌,穿过皮下,到达颈部,暴露出15cm,以热熔蜡封闭。根据Basso DM等^[3]介绍的脊髓冲击损伤模型,采用自行改制的O型NYU(New York University)装置^[2],根据NYU实验标准,对暴露脊髓大鼠的第10胸段进行撞击(150 kDyne, 1s dwell time),停留1s。撞击后,用伤口周围脂肪组织填充骨缺损部位,创口撒上青霉素粉,分层缝合。在撞击造成损伤后30min,鞘内注射15 μ l PBN(3mg/15 μ l),对照组注射15 μ l NS,注射后用10 μ l NS冲洗微管。连续注射7d,每天1次,共8次^[4]。观察和记录第1、3、7、14、21、28、35天对机械性、热和冷刺激的感受性变化,并采用BBB(Basso-Beattie-Bresnahan)运动功能评分标准,在术后第1、5、10、15、20、25、30、35天进行行为评价。评分采用双盲法。

1.3 动物机械性痛敏的测定

行为学测试时间固定在9:00—12:00,测试人员不知道手术分组情况。在25℃安静的环境中,将大鼠放入25cm×35cm×45cm的透明有机玻璃箱中,箱底为5mm×5mm的金属丝网眼垫,适应20—30min,待其安静后,用von Frey hairs(Stoelting公司,美国)测定大鼠后足50%的缩足阈。折力分别为0.6g、2g、6g、15g为本法测定的50%缩足阈值。首先从2.0g开始,将纤毛垂直刺向大鼠左后爪第三脚趾为基础的角质化垫子间的最敏感的区域。稍用力,直至其弯曲成S形,避开足垫,依据大鼠有无缩足反射,再更换下一折力或上一折力纤毛,每次持续时间最长不超过8s,测试相邻间隔时间为10s。记录大

鼠对不同折力纤毛的一系列反应。若大鼠出现快速的缩足反射或舔足反应,则记为阳性反应,以“X”表示,若无反应,则视为阴性反应,以“O”表示,可得到一串以“O”或“X”组合的序列,以出现“X”的前一次“O”作为起点,选择包括该起点的6次连续刺激反应,如“OXOXXO”,作为推算50%机械缩足反应阈值(mechanical paw withdrawal threshold, MWT)的关键序列,推算公式 $50\% \text{ MWT(g)} = (10^{[Xf + \kappa\delta]}) / 10000$, 其中, X_f 为序列中最后一根 von Frey 纤毛的对数值; κ 为根据测量所得“X”、“O”序列查表后得到的值, δ 为各个纤毛力度取对数后的均差,在此约等于0.224。当术后50%缩足阈值小于6g时认为出现痛敏。术前3d和1d,术后第1、3、7、14、21、35天时测定假手术组、SCI损伤组和SCI损伤+PBN治疗组的50%缩足阈值^[5]。

1.4 热痛敏检测

利用Hargreaves检测方法,测量大鼠受到热伤害性刺激后其脚爪回缩的潜伏时间,即热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)。当大鼠适应周围环境后,把大鼠单个放到其下有抬高的玻璃平台下面,用发光热源进行照射。从发光源照射到脚爪上到关掉热源这段时间,为大鼠脚爪回缩的潜伏期的时间,保持发光热源的照射强度不变。每只大鼠测定5次,每次持续8—10s,每次间隔3min,取后3次平均值为大鼠TWL值。这样,在假手术组大鼠产生一个稳定的8—10s的脚爪回缩的潜伏期。比较SCI+PBN实验组大鼠的脚爪回缩的潜伏期和仅SCI对照组大鼠的脚爪回缩的潜伏期,以确定各组大鼠对热痛敏的表现差异。

1.5 统计学分析

采用Sigma Stat 3.5软件进行统计学分析,计量资料用均数±标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用配对 t 检验,50%MWT采用重复测量资料的双因素方差分析,Bonferroni检验水准调整法分别比较每两组各时点数值的差异。

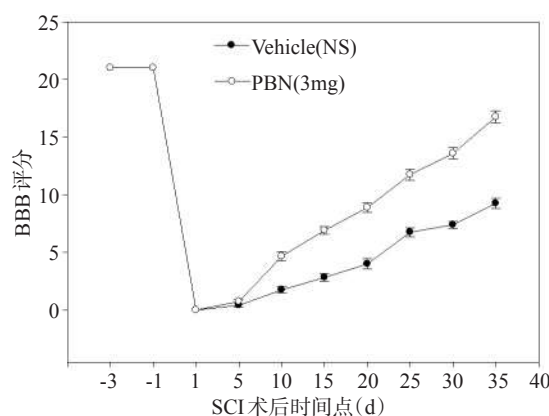
2 结果

2.1 大鼠运动协调功能恢复状况

通过BBB等级评分系统对两SCI组和SCI+PBN治疗组大鼠后肢运动功能恢复情况进行评估,

结果两组大鼠BBB评分值在伤后第10天开始,各时间点差异都非常显著(见图1),治疗组恢复程度明显高于对照组。其中第20天时间点,对照组为SCI组BBB等级为(4.010±0.426)分,SCI+PBN组为(8.883±0.423)分;第35天时间点,对照组为SCI组BBB等级为(9.250±0.463)分,SCI+PBN组为(16.750±0.524)分;两组时间点评分值之间的差异非常显著($P < 0.05$)。

图1 大鼠SCI+NS组和SCI+PBN治疗组后肢运动功能BBB等级评分



2.2 大鼠机械痛阈测定

各组大鼠分别在术前3天、1天测定左、右足50%MWT,取其平均值为基础值。如果任一只足的基础值≤6g时,则剔除。术前,3组大鼠左、右足50%MWT无明显区别;术后第3天各组都出现不同程度的阈值下降,随后假手术组基本处于正常状态,而SCI损伤组和SCI+PBN治疗组机械痛阈都明显下降,但SCI对照组下降程度明显大于SCI+PBN治疗。第21天时,SCI对照组机械痛阈为(2.453±0.459)g,而SCI+PBN治疗组机械痛阈则为(6.442±0.650)g;第35天时,SCI对照组机械痛阈为(3.203±0.335)g,SCI+PBN治疗组机械痛阈为(5.598±0.599)g,两组时间点之间的机械痛阈差异非常显著($P < 0.01$),见图2。

2.3 大鼠对热痛缩腿反应潜伏期的测定

SCI+PBN组在术后第1天到第7天持续给药期间,TWL(s)明显上升[TWL_{1d}=(14.667s±0.995)s;TWL_{7d}=(16.501±0.671)s],术后第21天至第35天(术后第7天后停止给药)TWL逐渐下降,趋于正常

水平 [$TWL_{21d}=(13.500\pm0.920)s$; $TWL_{35d}=(14.160\pm0.872)s$]; 而 SCI+NS 组在术后第 1 天开始就表现出 TWL 明显下降, 术后第 7 天 $TWL_{7d}=(8.500\pm1.176)s$, 第 35 天时 $TWL_{35d}=(6.333\pm0.827)s$ 。停药后各时间段 SCI+NS 组与 SCI+PBN 组相比较具有显著性差异 ($P<0.01$), 见图 3。

图 2 各组大鼠左后足机械痛阈的比较

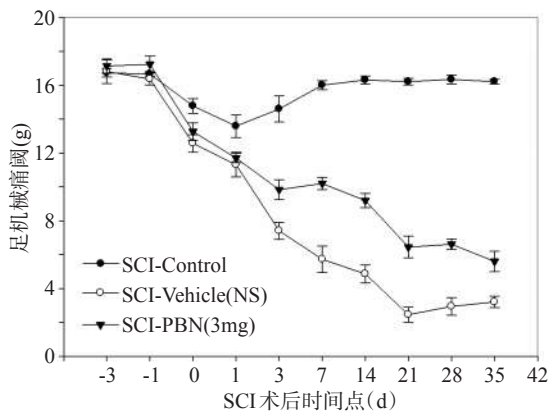
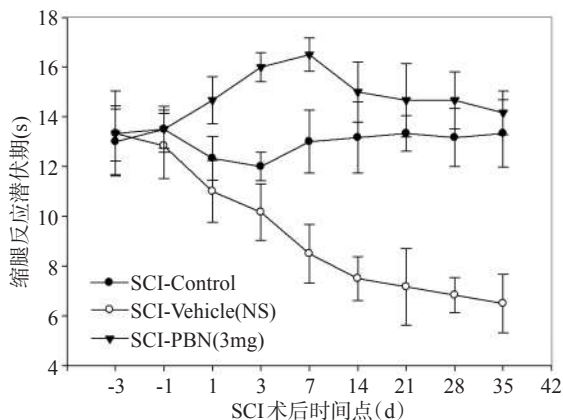


图 3 各组大鼠对热痛缩腿反应潜伏期的比较



3 讨论

在绝大多数的 SCI 患者中, 不论是完全或不完全性损伤, 通常在损伤后 1 个月内都会产生慢性中枢性神经疼痛 (central neuropathic pain, CNP) 综合征或称为超敏疼痛^[6], 包括不依赖外周刺激发生的自发性疼痛和正常非伤害性的刺激引起的外周诱发性疼痛。这种疼痛是永久性的, 并常导致患者产生抑郁症, 严重地影响患者的生存质量, 甚至于产生自杀的严重后果。SCI 后中枢性疼痛敏化与其继发损

伤产生的活性氧密切相关^[7]。ROS 诱导中枢性痛觉性敏化的产生, 可能通过三个方面实现: 一方面是 ROS 通过激活谷氨酸受体来实现。谷氨酸受体广泛存在于中枢和外周神经系统, 在脊髓背角神经元上有特异性分布, 因此其受体的激活从而介导了外周伤害性信息的传递^[5,8]。一方面是通过促进致炎细胞因子 (IL-1 α , IL-1, IL-6 和 TNF-) 的产生^[9]。如 IL-1 可通过上调 P 物质及神经生长因子的表达, 敏化脊髓后角神经元, 也可使脊髓神经元处于过度兴奋状态, 易化突触, 并可通过抑制神经胶质细胞清除突触间谷氨酸, 使神经元处于高度兴奋状态^[10]。还有一方面就是 ROS 通过影响神经营养因子的释放, 特别是神经生长因子和脑源性神经营养因子^[11-12]。NGF 的增加, 可以导致 BDNF 的上调, 后者可调控脊髓背角神经元的功能, 激发突触效能的改变^[13]。因而在 SCI 后 ROS 的消除将减少脊髓致炎细胞因子和神经营养因子的产生, 从而可以达到防止或减轻中枢和周围疼痛敏化的产生。PBN 是一种良好的自由基自旋捕集剂, 在组织中能很好地消除堆积的 ROS, 从而消除或减低 SCI 后疼痛敏化的产生。因此, 为探讨 SCI 后自由基清除剂 PBN 清除 ROS 的作用对大鼠 SCI 后中枢和周围疼痛敏化产生的影响, 本研究采用大鼠脊髓挫伤型中枢神经性疼痛模型, 通过腰椎置留管在撞击造成损伤后 30min, 鞘内注射自由基清除剂 PBN, 每天 1 次, 连续注射 7d, 观察不同时间大鼠后肢对机械性和热痛敏刺激的感受性变化, 并采用 BBB 评分标准, 对术后相应时段进行了行为评价。

从本实验结果可以看出, 两组大鼠 BBB 评分值在伤后第 10 天开始, 各时间点差异都非常显著 ($P<0.05$), 自由基清除剂 PBN 治疗组恢复程度明显高于对照组。其中第 20 天时间点到第 35 天时间点, 两组时间点评分值之间的差异显著 ($P<0.05$)。这一现象与大鼠 SCI 区的病理生理变化的表现相一致。有研究资料显示, SCI 后第 1 小时后脊髓谷氨酸耗尽, 第 6 小时许多促炎症反应性细胞因子产生达高峰, 第 24 小时为中性粒细胞产物产生的高峰, 第 48 小时血液中神经生长因子达到高峰, 第 14 天有些大鼠开始产生异常性疼痛, 第 35 天所有大鼠表现出异常性疼痛^[14]。因此本实验 BBB 评分结果提示, 鞘内注射

自由基清除剂PBN在SCI大鼠自发恢复的基础上,有利于脊髓损伤大鼠神经运动功能的恢复。

由于大鼠对热痛缩腿反应潜伏期的测定是动物处于相对自由活动状态下,并以辐射热为刺激源,因此不会引起皮肤非痛感受器(触觉、压觉感受器)的兴奋,主要引起多觉型伤害感受器的兴奋^[15]。本实验通过检测鞘内注射自由基清除剂PBN组大鼠热痛缩腿反应潜伏期显示(图3),在术后第1天到第7天持续给药期间,表现出TWL明显上升,术后第7天停止给药后,于第21天至35天TWL逐渐下降,并逐渐趋于正常水平;而对照组在术后第1天开始就表现出TWL明显下降,并持续下降到第35天。停药后各时间段两组相比较也具有差异显著性($P < 0.01$)。这一结果与通常情况下接受150 kDyne挫伤的大鼠,在T10水平用无限度装置持续1s,位于这个水平的损伤在97%的损伤大鼠中产生机械性疼痛和热痛觉过敏相一致。进一步说明自由基清除剂PBN能有效阻止或减轻中枢和周围疼痛敏化的产生。此外,通过对大鼠机械性痛觉过敏的观测(图2),也进一步证实给予自由基清除剂PBN组在术后第1天到第7天持续给药期间,TWL明显比对照组减弱,虽然术后第21天至第35天TWL也成逐渐下降趋势,但与对照组相比,各时间段的差异非常显著($P < 0.01$)。从而进一步反映出SCI后鞘内注射自由基清除剂PBN具有明显减弱机械性痛觉刺激的作用。

综上所述,通过腰椎置留管在撞击造成SCI后鞘内注射自由基清除剂PBN,可以较有效地清除继发产生的ROS,有助于损伤大鼠后肢运动功能的恢复,并具有明显的减弱机械性疼痛和热痛觉过敏的发生作用。一方面为临床应用ROS清除剂降低或消除SCI后中枢性和外周性疼痛敏化提供依据,也为进一步利用自旋捕集剂PBN清除ROS的药理学机制,探讨SCI后ROS下游产物谷氨酸受体激活和相关细胞因子所致中枢疼痛敏化的机制,提供了良好的基础模型。

参考文献

- [1] 刘晓瑜,徐锡金,霍霞.活性氧在脊髓损伤性中枢疼痛敏化中作用机制的研究进展[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(2):223—224.
- [2] 徐锡金,霍霞,朴英杰,等.大鼠脊髓损伤后植入人发角蛋白的实验研究[J].中国临床解剖学杂志,2001,19(2):243—244.
- [3] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection[J]. *Exp Neurol*, 1996, 139(2):244—256.
- [4] Kim HK, Park SK, Zhou JL, et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain[J]. *Pain*, 2004, 111(1—2):116—124.
- [5] Kim HK, Zhang YP, Gwak YS, et al. Phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(2):432—439.
- [6] Hulsebosch CE, Hains BC, Crown ED, et al. Mechanisms of chronic central neuropathic pain after spinal cord injury[J]. *Brain Res Rev*, 2009, 60(1):202—213.
- [7] Lee DZ, Chung JM, Chung K, et al. Reactive oxygen species (ROS) modulate AMPA receptor phosphorylation and cell-surface localization in concert with pain-related behavior[J]. *Pain*, 2012, 153(9):1905—1915.
- [8] Korinek M, Kapras V, Vyklicky V, et al. Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects[J]. *Steroids*, 2011, 76(13):1409—1418.
- [9] Eliav E, Benoliel R, Herzberg U, et al. The role of IL-6 and IL-1beta in painful perineural inflammatory neuritis[J]. *Brain Behav Immun*, 2009, 23(4):474—484.
- [10] Park ES, Gao X, Chung JM, et al. Levels of mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 391(3):108—111.
- [11] Ho CM, Su CK. Ketamine attenuates sympathetic activity through mechanisms not mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in the isolated spinal cord of neonatal rats[J]. *Anesth Analg*, 2006, 102(3):806—810.
- [12] 卢虎英,徐基民,刘兰群,等.减重步行训练结合督脉电针对脊髓损伤大鼠运动功能和脑源性神经营养因子的影响[J].中国康复医学杂志,2013,28(6):553—557.
- [13] Geng SJ, Liao FF, Dang WH, et al. Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation[J]. *Exp Neurol*, 2010, 222(2):256—266.
- [14] Wang J, Cochran V, Abdi S, et al. Phenyl N-t-butyl nitron, a reactive oxygen species scavenger, reduces zymosan-induced visceral pain in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2008, 439(2):216—219.
- [15] Yezierski RP, King CD, Morgan D, et al. Effects of age on thermal sensitivity in the rat[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2010, 65(4):353—362.