论著

文章编号:1000-5404(2006)10-1072-03

大鼠鞘内促肾上腺素皮质激素释放激素抗伤害性效应的实验研究

王伍超,葛衡江 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所麻醉科,重庆 400042)

提 要: 目的 探讨鞘内预注促肾上腺素皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)是否对甲醛疼痛模型具有抗伤害性效应。**方法** 采用疼痛行为学观察和辐射热测痛评价CRH对甲醛疼痛模型的镇痛作用,采用免疫组化技术结合计算机图像处理系统观察对脊髓后角c-fos基因表达的影响。**结果** 与NS对照组比较,鞘内预注CRH 0.5 μg可明显降低甲醛致痛大鼠的Ⅱ相疼痛反应时间,同时可以抑制脊髓后角浅层c-fos基因表达增强的效应,提前1 h腹腔内注射CP-154526可抵消这种抑制效应。**结论** 鞘内预注CRH能明显抑制甲醛致痛大鼠的痛反应和脊髓后角的c-fos基因的表达,具有抗伤害性效应。

关键词: CRH;脊髓;抗伤害性效应

中图法分类号: R322.81;R338.3;R977.11 **文献标识码**: A

Antinociceptive efficacy of preemptive intrathecal administration of CRH in rats

WANG Wu-chao, GE Heng-jiang (Department of Anesthesiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether preemptive intrathecal administration of CRH has an antinociceptive efficacy on inflammatory pain model rats. **Methods** The antinociceptive efficacy of preemptive intrathecal administration of CRH was evaluated by the flinch-licking time and the tail flicking latency in formalin-subjected pain model rats. The c-fos gene expression in spinal cord dorsal horn was analyzed by immunohistochemical technique and computer image technique. **Results** Comparing with NS control group, preemptive intrathecal administration of 0.5 μg CRH could markedly inhibit the phase Ⅱ pain reaction and meanwhile decrease c-fos gene expression by 25.02% in the superficial lamella of spinal cord dorsal horn of the model rats. The antinociceptive efficacy could be counteracted by preemptive intraperitoneal injection of CP-154526 (the specific antibody of CRHR1, 10 mg/kg). **Conclusion** CRH could significantly inhibit pain reaction and spinal cord c-fos gene expression, and thereby preemptive intrathecal administration of CRH will contribute to the antinociceptive efficacy because of its potency of inhibiting hyperalgesia.

Key words: CRH; spinal cord; antinociception

促肾上腺素皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)不仅是调节下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPAA)起始因子,还可以作为一种神经递质激活细胞间的信号转导发挥调节作用[1],以应答各种伤害性刺激。在应激过程中,机体对伤害性刺激的反应十分明显,因此CRH在痛觉调节中作用也受到人们的重视。本研究拟采用甲醛炎症性疼痛模型,观察鞘内预注CRH对甲醛诱导的痛觉过敏及脊髓后角c-fos基因表达的影响,观察其镇痛效应,探讨其抗伤害性作用的机制。

1 材料与方法

1.1 主要设备与试剂

成年清洁级SD大鼠40只,雌雄各半,体质量(216±10.5)g(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供);热痛测试仪(第四军医大学生产,RTY-I型,由第三军医大学基础医学部生理学教研室提供);CRH(Sigma公司);CP-154526(辉瑞公司);兔抗人c-fos多克隆抗体(Santa-Cruz公司);PV-6001试剂盒(北京中杉生物技术有限公司)。

1.2 实验分组

40只大鼠采用随机数字表法分为5组,每组8只。NS对照组:鞘内注入生理盐水20 μl;CRH 1、2、3组鞘内分别给予CRH 0.25、0.5、1.0 μg;CP组:提前1 h腹腔内注射CP-154526(10 mg/kg)后鞘内给予CRH 0.5 μg。鞘内给药采用鞘内穿刺注射法,乙醚麻醉下用微量注射器于大鼠脊柱L5-L6间隙穿刺,以尾巴出现颤动或突然的侧向甩动作为穿刺成功的标志[2]。所有药品溶于20 μl生理盐水中,于5 s内推完。停止吸入乙醚后动物将在5 min内恢复翻转反射。

1.3 甲醛致痛模型的制备

鞘内注药后10 min,将5%甲醛100 μl注入大鼠右后足掌心皮下制备疼痛模型。操作完毕,立即将动物置于干净透明塑料箱内,观察其痛行为学变化。

作者简介:王伍超(1975-),男,山东省单县人,硕士研究生,医师,主要从事疼痛基础与临床方面的研究。电话:(023)68757347, E-mail: wchao118@126.com

收稿日期:2005-11-14;修回日期:2006-03-13

1.4　疼痛行为学观察

甲醛炎性致痛模型行为学反应评分如下：0 分：大鼠行为正常，双后肢均承重；1 分：大鼠被注射肢体轻触玻璃台面，轻微承重或不承重；2 分：大鼠完全缩回被注射侧肢体；3 分：舔、咬或抖动被注射侧肢体。本实验采用 Abbort 等[3] 所推荐的以缩腿及舔爪时间之和（即行为学评分 >2 的时间）作为行为学反应的指标。甲醛刺激后立即用秒表连续记录大鼠 1 h 内每 5 分钟的缩腿舔爪时间。

1.5　热辐射刺激甩尾反射潜伏期（tail flicking latency，TFL）的测定

将大鼠置于特制塑料筒内，尾和双后肢附于隔热塑料台面上，将尾下 1/3 涂黑。以热痛测试仪发出的辐射热聚焦在大鼠尾部下 1/3 处作为痛点，用电子秒表记录开始照射至出现甩尾反应的潜伏期作为 TFL，实验前先测 3 次，间隔 10 min，取其均值作为“0”min 时的基础 TFL。调节辐射强度使基础 TFL 在 7 ~9 s，截断时间点定为 15 s 是为了防止时间过长对组织的损害。各组在甲醛致痛后 15、30、60、120 min 分别测定。

1.6　取材及切片制备

各组大鼠甲醛致痛后 2 h 处死取材。用戊巴比妥钠（60 mg/kg）腹腔注射麻醉大鼠后，自左心室插管后剪开右心耳，快速灌注生理盐水，待流出的液体清亮后，以预冷的 4% 多聚甲醛 PBS（pH 7.4）350 ml 先快后慢灌注 30 min。取 L4 ~ L5 脊髓节段约 1 cm，移入固定液中 4 ℃过夜，常规石蜡包埋，连续切片，片厚 5 μm。

1.7　免疫组织化学染色

从每只大鼠切片中抽取 4 张，参照说明书二步法免疫组织化学染色，DAB 显色，封片、镜检。以神经元细胞核染成棕黄色为阳性细胞。实验对照用 PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）分别取代兔抗鼠 c-fos 抗体和羊抗兔 IgG-HRP 孵育切片，免疫反应呈阴性。

1.8　图像分析

每只大鼠抽取 4 张，于光镜（10 倍）下观察，采用图像分析处理系统，测定 c-fos 基因表达阳性产物的积分吸光度值（IOD 值），取平均值代表 C-FOS 蛋白表达强度。

1.9　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 10.0 统计软件行方差分析。

2　结果

2.1　CRH 对甲醛模型大鼠疼痛行为学的改变

所有大鼠右侧足底皮下注射甲醛后，出现躁动不安，嘶叫，注射足抬起不着地，舔咬或抖动注射足等痛反应，10 ~ 15 min 后，注射足明显肿胀、充血。其伤害性痛行为反应呈典型的双相变化，即注射后即刻开始，持续约 5 min 急性疼痛反应（Ⅰ相），5 ~ 10 min 的静息期；后出现可持续 40 min 的继发性疼痛反应（Ⅱ相）。

从各组鞘内预注不同剂量 CRH 时的缩腿舔爪变化趋势（图 1）可见，注射甲醛出现双相反应：Ⅰ相的反应峰值出现在注射后 0 ~5 min，Ⅱ相的反应峰值出现在注射后 25 ~ 35 min。鞘内预注不同剂量的 CRH 可以降低第 2 期的反应峰值，以 CRH 0.5 μg 给药时抑制最明显，且以 30 ~ 45 min 为著，但是 CP 组于 NS 组间差别不显著。

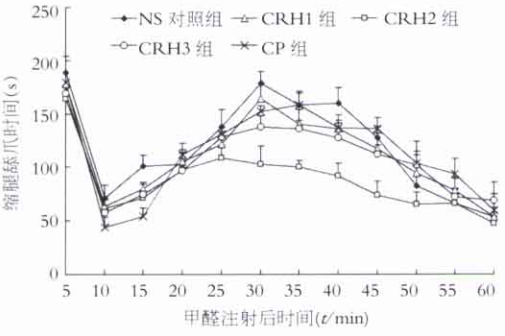


图 1　各组鞘内预注不同剂量 CRH 时的缩腿舔爪时间变化趋势

2.2　各组大鼠甲醛致痛后 TFL 变化

各组间基础 TFL 差异不显著（$P > 0.05$），甲醛致痛后 15 min，NS 对照组 TFL 降至 3.69 s，相当于基础值的 40%，并持续在这一水平，60 min 后有所升高，说明动物机体处于痛觉过敏状态。CRH1、CRH3 组 TFL 高于 NS 对照组，但差别不显著，CRH2 组显著高于对照组（$P < 0.05$），同时高于 CP 组。CP 组和对照组组间差异不显著（$P < 0.05$）。各组大鼠甲醛致痛后 TFL 变化情况见表 1。

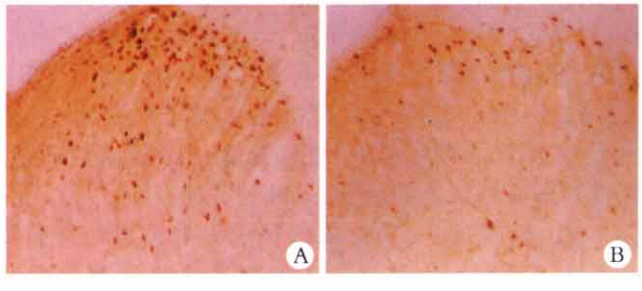
表 1　各组大鼠甲醛致痛后 TFL 变化情况［$n = 8$，$(\bar{x} \pm s)$s］

组别	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
NS 组	9.00 ±0.37	3.69 ±0.48	3.12 ±0.51	3.46 ±0.41	4.43 ±0.54
CRH1 组	9.31 ±0.49	3.81 ±0.46	3.67 ±0.35[a]	3.90 ±0.52	4.00 ±0.54
CRH2 组	8.80 ±0.42	4.83 ±0.88[ab]	5.26 ±0.91[ab]	4.89 ±1.02[ab]	4.56 ±1.24[ab]
CRH3 组	8.82 ±0.36	3.56 ±0.62	3.21 ±0.41	4.15 ±0.58[a]	4.62 ±0.88
CP 组	9.30 ±0.35	3.76 ±0.53	4.05 ±0.43	4.45 ±0.54	4.24 ±0.53

a：$P < 0.05$，与 NS 组比较；b：$P < 0.05$，与 CP 组比较

2.3　CRH 对甲醛致痛大鼠 c-fos 基因表达的影响

c-fos 基因表达的产物 C-FOS 蛋白。在脊髓后角 C-FOS 蛋白呈棕黄色颗粒，位于细胞核内，细胞质不显色。甲醛致痛 2 h 后，各组 C-FOS 蛋白阳性神经元表达增加，密集分布于浅表层（Ⅰ-Ⅱ层）的内侧部，颈部（Ⅴ-Ⅵ层）亦有中等量深染阳性神经元。NS 对照组 C-FOS 蛋白表达明显增加，鞘内给予 CRH 各组 C-FOS 蛋白阳性神经元的 IOD 值均降低，以 CRH 0.5 μg 组降低最为明显（图 2）二者比较有显著差异（$P < 0.01$），见表 2。CP 组与 NS 对照组无明显差异（$P > 0.05$）。



A：NS 对照组；B：CRH2 组

图 2　甲醛注射 2 h 后 C-FOS 蛋白表达　（二步法 ×200）

表2 各组大鼠 C-FOS 蛋白阳性神经元 IOD 值($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

组别	脊髓 Rexed 分层		总计
	Ⅰ-Ⅱ	Ⅴ-Ⅵ	
NS 组	116.02±6.10	107.45±6.78	223.47±11.54
CHR1 组	102.82±4.44	98.21±3.99	206.00±7.85
CRH2 组	87.31±6.62[a]	73.32±3.00[a]	160.64±8.69[a]
CRH3 组	104.91±5.68	102.31±4.46	213.78±7.94
CP 组	113.51±4.90	104.46±7.71	217.97±11.30

a: $P<0.05$, 与 NS 组和 CP 组比较

3 讨论

HPAA 兴奋释放的中枢介质 CRH, 可能是应激时最核心的神经内分泌反应。CRH 神经元散步于从大脑皮质到脊髓的广泛区域, 其中主要位于下丘脑。CRH 在各种应激反应中释放增加, 除了下丘脑调节 HPAA 的作用外, 还可以作为一种神经递质激活细胞间的信号转导发挥调节作用。研究表明 CRH 在外周和中枢神经系统均有镇痛作用。CRH 在外周炎症灶表达上调[4], 提示 CRH 在炎症反应中具有一定的作用。在炎症局部注入 CRH 能减轻 5-HT 诱导的水肿, 减少炎症灶 CD11b 阳性细胞的渗出, 刺激免疫细胞释放内源性阿片肽从而产生镇痛作用[5]。若局部使用 μ、δ 阿片受体阻断剂或纳洛酮, 都可降低 CRH 的镇痛作用。脑室注入 CRH 还可通过调节海马 CA_1 和 CA_2 区的电生理活动实现对痛觉的调制[6]。

甲醛实验是一种能较好模拟临床慢性疼痛的实验模型, 其引起的疼痛反应可分为两个时相即Ⅰ相与Ⅱ相。本实验中, 观察到大鼠痛行为学改变呈双相反应与文献报道一致, 说明动物模型建立成功。从表 1 看出, 鞘内预注 CRH 各组在Ⅰ相时与 NS 对照组无明显差异, Ⅱ相时仅 CRH2 组与 NS 对照组差异显著。对Ⅰ相无效可能是由于Ⅰ相反应主要是直接刺激痛觉神经所致, Ⅱ相反应则是继发于炎症疼痛。表 2 中 15 min 后, 实验各组 TFL 均较 0 min 大幅下降, Ⅱ相痛阈降低并持续 60 ~ 120 min, 说明大鼠处于痛觉过敏状态。外周组织炎症损伤后伤害性信息经外周传入神经的 Aδ 和 C 类纤维传入脊髓后角, 释放化学物质(如谷氨酸和 P 物质), 引起神经元活动增强, 投射神经元兴奋, 将伤害冲动传入高级中枢, 产生痛觉过敏。在此过程中, 脊髓中枢敏感化起着重要作用。鞘内给予 CRH 0.5 μg 后, 15、30、60 min 时的痛阈高于对照组, 差异显著, 说明鞘内预注 CRH 可能作用于脊髓痛觉环路, 调整对伤害性信息的感受, 来减弱Ⅱ相反应。

在一定程度上, c-fos 基因被诱导的数量与所受刺激强度一致, 因此, 其产物 C-FOS 蛋白在脊髓后角的表达可作为伤害性刺激的标志[7]。本实验中, NS 对照组脊髓后角Ⅰ-Ⅵ各层均有 C-FOS 蛋白表达, 以Ⅰ-Ⅱ层为最多。鞘内给予 CRH 后可不同程度地抑制脊髓的 c-fos 表达, 以 CRH2 组的抑制作用最为明显。总之在 3 个鞘内 CRH 预注剂量 0.25、0.5、1.0 μg 中, 只有 0.5 μg 时可以明显降低痛觉信息的传入, 抑制痛阈的降低, 减弱脊髓后角 c-fos 基因表达, 似乎说明这种抗伤害性效应无剂量依赖性, 并且可被腹腔预注的 CRHR1 的特异性拮抗剂 CP-154526 所抵消。国外学者证实脑室内注入 CRH 可以产生镇痛效应。但是发现 CRH 的有效剂量范围在毫微克水平且非常窄, 在不同物种有效剂量不同, 但在鼠、兔都是毫微克水平[8]。脊髓浅层(Rexed Ⅰ-Ⅱ层)是 1 个可以接受上传的痛觉相关信息同时有 CRH 及其分布的区域, 伤害性刺激作用下, CRH 参与抑制脊髓后角痛觉敏化的机制可能有: ①有研究表明在体外培养的小胶质细胞发现有 CRH-R1 mRNA 分布, CRH 可以通过作用于 CRH-R1 后改变脊髓后角胶质细胞增殖状态; ②最近发现 CRH 还可影响脊髓胶质区(即 Rexed Ⅱ层)神经元突触可塑性, 抑制长时程增强效应(long-term potentiation, LTP), 而 LTP 被认为是脊髓痛觉敏化的部分原因; ③鞘内注入 CRH 后, 可能提高脑脊液内 CRH 浓度, 作用于 CeA 内的受体, 参与下行抑制伤害性信息的上传。

综上所述, 鞘内 CRH 能防止甲醛所致的中枢敏感化, 抑制痛行为, 具有预先镇痛效应。可能与其抑制脊髓 C-FOS 蛋白表达有关, 具体机制尚有待进一步探讨。

参考文献:

[1] HOARE S R, SULLIVAN S K, PAHUJA A, *et al*. Conformational states of the corticotropin releasing factor 1 (CRF1) receptor: detection, and pharmacological evaluation by peptide ligands[J]. Peptides, 2003, 24(12): 1881-1897.

[2] 林献忠, 李继勇, 陈冀衡, 等. 大鼠经皮穿刺鞘内给药方法在疼痛基础研究中的应用[J]. 福建医科大学学报, 2004, 38(2): 185-187.

[3] ABBORT F V, FRANKLIN K B, WESTBROOK R F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats[J]. Pain, 1995, 60(1): 91-102.

[4] WANG W, JI P, RIOPELLE R J, *et al*. Functional expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor 1 in cultured rat microglia [J]. J Neurochem, 2002, 80 (2): 287-294.

[5] MCLOON L K, SANDNAS A M, NOCKLEBY K J, *et al*. Reduction in vesicant-induced cellular inflammation and hyperalgesia by local injection of corticotropin releasing factor in rabbit eyelid[J]. Inflamm Res, 2002, 51(1): 16-23.

[6] MELZACK R, WALL P D. The challenge of pain[M]. Updated 2nd ed. London: Penguin Books, 1996: 339.

[7] SUN W Z, SHYU B C, SHIEH J Y. Nitrous oxide or halothane, or both, fail to suppress c-fos expression in rat spinal cord dorsal horn neurones after subcutaneous formalin[J]. Br J Anaesth, 1996, 76 (1): 99-105.

[8] LARIVIERE W R, MELZACK R. The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia[J]. Pain, 2000, 84 (1): 1-12.

(编辑 龙 亮)