论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2456-03

树酯毒素抑制大鼠前列腺炎神经肽表达的实验研究

唐 伟,宋 波,卢根生,李为兵 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 研究树酯毒素(resiniferatoxin, RTX)对大鼠慢性前列腺炎所致前列腺痛的治疗效果。**方法** 用完全福氏佐剂(Complete Freund's adjuvant, CFA)注入大鼠双侧前列腺腹叶,形成慢性前列腺炎症后,将RTX分别注入大鼠腰骶段椎管内和双侧前列腺腹叶,通过免疫组化、放免检测、RT-PCR等方法,检测大鼠腰骶段脊髓和背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)中P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)含量及其mRNA的表达。**结果** 前列腺炎大鼠的SP和CGRP的含量和mRNA表达明显增高。椎管内和前列腺内注射RTX后2种神经肽的含量和mRNA表达都明显降低。**结论** RTX局部注射能有效抑制前列腺炎大鼠SP和CGRP的合成和释放,提示RTX可能有助于慢性前列腺炎的镇痛治疗。

关键词:慢性前列腺炎;疼痛;树酯毒素;神经肽

中图法分类号:R282.71;R697.33;R968 **文献标识码**:A

Resiniferatoxin inhibits neuropeptide expression in rat with prostatitis

TANG Wei, SONG Bo, LU Gen-sheng, LI Wei-bing (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the therapeutic effect of resiniferatoxin (RTX) on prostatic pain from chronic prostatitis. **Methods** Complete Freund's adjuvant (CFA) was injected into rat bilateral ventral prostate to form chronic prostatic inflammation in 15 male SD rats. Two weeks later, RTX was injected into lumbosacral vertebral canal ($n=5$) or bilateral ventral prostate ($n=5$). Another 5 SD rats served as normal control. Neuropeptide level and the mRNA expression of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in lumbosacral spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) were measured by immunohistochemistry, radioimmunoassay, and RT-PCR. **Results** SP and CGRP level and their mRNA expression increased significantly in rat with prostatitis. Neuropeptide level and their mRNA expression were decreased after RTX was injected into vertebral canal and prostate. **Conclusion** Local injection of RTX can effectively inhibit synthesis and release of SP and CGRP, suggesting that RTX may be helpful to the analgesic therapy of chronic prostatitis.

Key words: chronic prostatitis; pain; resiniferatoxin; neuropeptide

前列腺痛是慢性前列腺炎的主要症状之一,镇痛治疗是慢性前列腺炎治疗的重点和难点。疼痛学研究进展表明,辣椒素类药物具有长效的选择性痛觉抑制作用,因此在慢性疼痛的镇痛治疗中可能具有重要价值。本实验用完全福氏佐剂(Complete Freund's adjuvant, CFA)诱导大鼠慢性前列腺炎,选用树酯毒素(resiniferatoxin, RTX)作为治疗药物,观察其对前列腺炎大鼠传入神经中P物质(substance P, SP)、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)2种神经肽的影响,旨在研究RTX在前列腺痛的镇痛治疗中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

3月龄雄性SD大鼠20只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量250~300 g,分为4组,每组5只。A组(对照组)行假手术。B组(炎症组)双侧前列腺腹叶各注射100 μl的CFA(Sigma公司),2周后形成慢性炎症。C组(炎症+椎管内RTX组)前列腺注射CFA,2周后在L5-S2椎管内注射10 nmol/L×50 μl的RTX(Sigma公司)。D组(炎症+前列腺内RTX组)前列腺注射CFA,2周后双侧前列腺各注射10 nmol/L×100 μl的RTX。各组大鼠处理完毕1周后取材。

1.2 大鼠腰骶段椎管内穿刺注射方法

大鼠全麻后,折断尾1-尾2关节,微量进样器穿刺进入椎管,以L6和S1刺突为骨性标志确定穿刺深度,缓慢注射RTX

作者简介:唐 伟(1972-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事前列腺炎方面的研究。电话:(023)60638853

通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186

收稿日期:2006-06-28;修回日期:2006-09-15

于 L5-S2 椎管内，尾关节复位缝合。

1.3　免疫组化染色

大鼠全麻后 4% 多聚甲醛经主动脉灌注固定，取出 L6-S1 段脊髓，固定、脱水、包埋、切片后，免疫组化染色按试剂盒 S-P 9001（北京中杉金桥公司）说明书进行。兔抗大鼠 S-P 一抗、兔抗大鼠 CGRP 一抗，分别购自北京中杉金桥公司、美国 Peninsula 公司。

1.4　放免检测

大鼠全麻后生理盐水经主动脉灌洗血液，取出 L6-S1 段脊髓，按 S-P 和 CGRP 放免试剂盒（第二军医大学神经生物研究室）说明书进行脊髓标本预处理和放免检测。

1.5　RT-PCR 实验

大鼠全麻后含 0.1% DEPC 的生理盐水灌洗血液，取出 L6-S1 段背根神经节（DRG），Tripure 试剂（美国 Roche 公司）提取总 RNA，RT-PCR 按试剂盒（上海 Promega 公司、北京天为时代公司）说明书进行。选用 β-actin 作为内参照物。PCR 引物序列：β-actin 上游引物：5′-GAGACCTTCAACACCCCAGC-3′，下游引物：5′-ATGTCACGCACGATTTCCCT-3′，扩增片段长度 263 bp；SP 上游引物序列为 5′-TGGCGGTCTTTTTTCTCGTT-3′，下游引物序列为 5′-GCATTGCCTCCTTGATTTGG-3′，扩增片段长度 114 bp；CGRP 上游引物序列为 5′- CTGGTTGTCAGCATCTTG-3′，下游引物序列为 5′-GTTCTTCCATCAGCCTTT-3′，扩增片段长度 457 bp。PCR 反应条件：94 ℃ 预变性 2 min；94 ℃ 变性 1 min，55 ℃ 退火 1 min，72 ℃ 延伸 2 min，共 33 个循环；72 ℃ 再延伸 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，Quantity One 软件分析各产物条带 OD 值，计算 SP 和 CGRP 的 mRNA 相对表达量。

1.6　统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

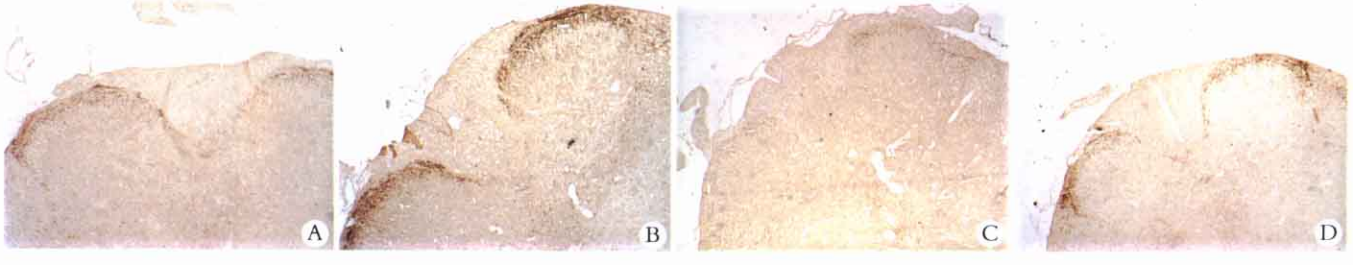
2　结果

2.1　大鼠前列腺慢性炎症观察

在大鼠双侧前列腺腹叶注射 CFA 后 2 周，大体观察见前列腺组织明显增大，形成弥漫性结节状。常规 HE 染色显示：前列腺组织中弥散着大小不等的注射残腔，残腔周围有大量成纤维细胞包围，间质中大量淋巴细胞浸润，说明 CFA 注射 2 周后形成了前列腺慢性炎症。我们观察到前列腺的这种改变可维持至少 5 周。

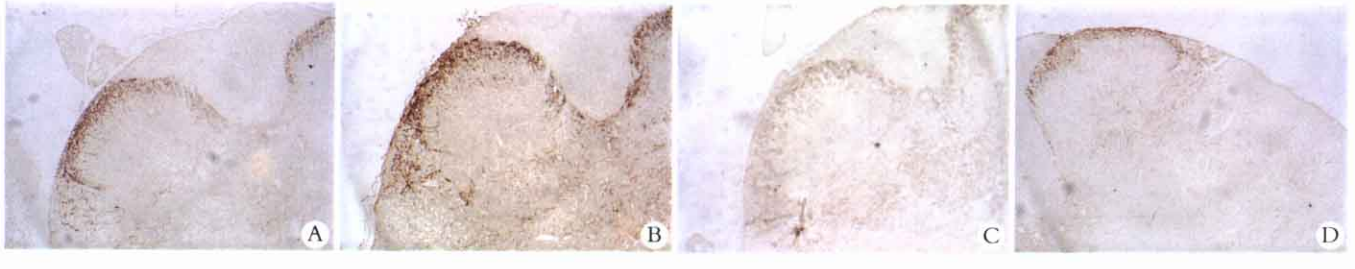
2.2　免疫组化观察

各组大鼠 L6-S1 段脊髓中 SP、CGRP 阳性染色主要集中在脊髓背角浅层（Ⅰ、Ⅱ层）的传入神经纤维。B 组的 SP、CGRP 染色明显高于 A 组；C 组和 D 组的 SP、CGRP 染色明显低于 B 组（图 1、2）。同时我们观察到大鼠椎管内注射 RTX 后 5 周，脊髓背角 S-P 染色较注射后 1 周有恢复性增高。



A：A 组；B：B 组；C：C 组；D：D 组

图 1　各组大鼠脊髓背角的 SP 阳性　（S-P × 100）



A：A 组；B：B 组；C：C 组；D：D 组

图 2　各组大鼠脊髓背角的 CGRP 阳性　（S-P × 100）

2.3　放免检测结果

大鼠 L6-S1 段脊髓中 SP、CGRP 含量比较，B 组中两者明显高于 A 组（$P<0.05$），C 组和 D 组中两者都明显低于 B 组（$P<0.01$，$P<0.05$）（表 1）。

2.4　RT-PCR 检测结果

大鼠 L6-S1 段 DRG 中 SP、CGRP 的 mRNA 相对表达量比较，B 组中两者明显高于 A 组（$P<0.01$），C 组和 D 组中两者都明显低于 B 组（$P<0.01$）（表 2）。

表1 各组大鼠 L6-S1 段脊髓背角中 SP、CGRP 含量(pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	SP	CGRP
A 组	20.23 ± 0.27[a]	32.20 ± 7.52[b]
B 组	31.02 ± 2.65	100.60 ± 25.56
C 组	14.78 ± 2.46[a]	13.51 ± 7.30[a]
D 组	23.64 ± 1.34[a]	45.56 ± 1.69[b]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$, 与 B 组比较

表2 各组大鼠 L6-S1 段 DRG 中 SP、CGRP 的 mRNA 相对表达量

组别	SP	CGRP
A 组	0.044 ± 0.004[a]	1.065 ± 0.140[a]
B 组	0.099 ± 0.013	1.762 ± 0.167
C 组	0.022 ± 0.005[a]	0.447 ± 0.178[a]
D 组	0.060 ± 0.011[a]	1.170 ± 0.159[a]

a: $P<0.01$, 与 B 组比较

3 讨论

CFA 常用于制作大鼠慢性炎症模型,其原理是以结核杆菌等复合物作为抗原的迟发性过敏反应或自身免疫性疾病,急性期主要为炎症性痛,慢性期主要为神经源性痛。本实验将 CFA 用于制作大鼠慢性前列腺炎模型,结果显示双侧前列腺腹叶注射 CFA 后 2 周,前列腺外观呈弥漫性结节状,HE 染色见纤维增生及大量淋巴细胞浸润,说明大鼠前列腺注射 CFA 后形成慢性前列腺炎模型。

慢性炎症反复刺激使 C 类神经的兴奋性增高,导致痛觉的外周神经敏感化和中枢神经敏感化,因此长时效抑制 C 类神经的药物对治疗慢性疼痛可能是一种较好的选择。C 类神经释放的痛觉递质主要是谷氨酸和神经肽。在盆神经中,谷氨酸还与传导膀胱直肠扩张感觉的 Aδ 类神经有关,因此本实验中选用 SP 和 CGRP 2 种神经肽作为观察疼痛的指标。C 类神经在中枢端末梢释放的 SP 和 CGRP 能引起痛觉,经"轴突反射"在外周端末梢的释放则引起神经源性痛。本实验结果显示,前列腺炎大鼠 L6-S1 段脊髓中 SP、CGRP 含量和 DRG 中 mRNA 表达都明显增高,说明 CFA 引起的大鼠前列腺炎能够产生前列腺痛。

疼痛学研究表明,辣椒素类药物能选择性抑制痛觉神经,而对正常的触压觉、本体感觉和运动神经无影响,因此被认为是一种高选择性的镇痛药物[1]。辣椒素类药物选择性作用的基础是辣椒素受体(vanilloid receptor 1, VR1), VR1 仅存在于 2 类痛觉神经:C 类神经和Ⅱ型 Aδ 类神经[2]。VR1 是一种非选择性阳离子通道,H^+、热刺激、炎症介质都能激活 VR1,通道开放后多种阳离子内流,痛觉神经兴奋性增强[3]。VR1 被称为伤害性刺激的整合分子,缺乏 VR1 的小鼠对化学和热刺激缺乏痛觉[4]。辣椒素类药物因剂量和用药方式不同对痛觉神经有 3 种效应:兴奋、脱敏、神经毒[3]。镇痛研究中主要应用其脱敏和神经毒作用,实现可逆性镇痛(如慢性疼痛)和不可逆性镇痛(如癌性疼痛)。新型辣椒素类药物 RTX 因具有强效的痛觉抑制作用,而无明显的兴奋作用,已逐渐取代了辣椒素的应用,因此我们的实验选用了 RTX。

目前,辣椒素药物的镇痛研究主要集中在体神经,而对内脏神经的镇痛研究较少,主要用于膀胱内灌注治疗不稳定膀胱,其机制是抑制 C 类神经和尿路上皮的 VR1[5]。临床上治疗前列腺疾病有骶管内注射和前列腺内注射的尝试。在我们的实验中,椎管内注射 RTX 主要作用于盆神经的 DRG,而前列腺内注射作用于前列腺传入神经。实验结果表明,椎管内和前列腺内注射 RTX 都能明显抑制 SP、CGRP 的合成和释放,提示局部注射 RTX 有助于前列腺痛的镇痛治疗。有学者报道,RTX 一次用药的痛觉抑制可长达数周[6]。我们观察到椎管内注射 RTX 对脊髓 SP 的抑制作用在 5 周后减弱,说明 RTX 对 C 类神经有可逆性的脱敏作用。

RTX 的痛觉脱敏作用具有高选择性、长效性、可逆性等优点,因此其在慢性前列腺炎的镇痛治疗中可能具有良好前景。本实验结果对临床上前列腺痛的治疗提供了初步的动物实验依据。

参与文献:

[1] KARAI L, BROWN D C, MANNES A J, *et al*. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control[J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1344-1352.

[2] TENDER G C, WALBRIDGE S, OLAH Z, *et al*. Selective ablation of nociceptive neurons for elimination of hyperalgesia and neurogenic inflammation[J]. J Neurosurg, 2005, 102(3): 522-525.

[3] SZALLASI A, BLUMBERG P M. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms[J]. Pharmacol Rev, 1999, 51(2): 159-212.

[4] CATERINA M J, LEFFLER A, MALMBERG A B, *et al*. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor [J]. Science, 2000, 288(5464): 306-313.

[5] FOWLER C J. Intravesical treatment of the overactive bladder[J]. Urology, 2000, 55(Suppl 5A): 60-64.

[6] SZALLASI A, JOO F, BLUMBERG P M. Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog[J]. Brain Res, 1989, 503(1): 68-72.

(编辑 薛国文)