论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0432-03

胶质细胞活化在慢性前列腺炎大鼠脊髓兴奋性氨基酸变化的作用

张水文,周占松,宋 波 (第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨胶质细胞活化与慢性前列腺炎疼痛大鼠脊髓兴奋性氨基酸变化的关系。**方法** 完全福氏佐剂和3%角叉菜胶前列腺内注射造成慢性前列腺炎疼痛模型,胶质细胞活化抑制剂propentofylline脊髓插管给药,干扰慢性前列腺炎疼痛模型大鼠,免疫组织化学方法观察正常组、疼痛组、干扰组脊髓节段(L_6和S_1)背角的星形胶质细胞和小胶质细胞的活化和谷氨酸的定性定位,并用氨基酸分析仪测量3组脊髓背角谷氨酸和天门冬氨酸的变化。**结果** 疼痛组脊髓背角星形胶质细胞和小胶质细胞活化明显增强,干扰组明显减弱,谷氨酸明显表达于脊髓背角且疼痛组谷氨酸和天门冬氨酸明显增多,干扰组明显减少。**结论** 胶质细胞活化是慢性前列腺炎疼痛大鼠脊髓背角兴奋性氨基酸变化的重要原因,胶质细胞活化抑制剂的应用可能是治疗慢性前列腺炎疼痛的新途径。

关键词: 前列腺炎;疼痛;兴奋性氨基酸;胶质细胞

中图法分类号: R338.1;R446.19;R697.33 **文献标识码**: A

Role of gliocyte activation in change of excitatory amino acid in spinal cord from chronic prostatitis rats

ZHANG Shui-wen, ZHOU Zhan-song, SONG Bo (Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the activation of glial cells and the change of excitatory amino acids (EAA) in the cornu dorsal medullae spinalis induced by pain due to chronic prostatitis. Methods The pain models of chronic prostatitis were induced by injecting complete Freund's adjuvant and 3% carrageenan into the prostate of 40 rats. Another 20 rats served as normal control. Propentofylline was given with PE-10 in spinal cord of 20 rat models. The activation of astrocyte and microglia and Glu in the spinal cord was detected with immunohistochemistry and the change of excitatory amino acids was observed by amino acids analyzer. Results Activation of astrocyte and microglia was significantly increased in the models and significantly reduced in interfered groups. Glu was significantly expressed in cornu dorsal medullae spinalis, and Glu and aspartic acid (Asp) was significantly increased in the models and significantly reduced in interfered groups. Conclusion The activation of glial cells is an important reason for the change of excitatory amino acids in cornu dorsal medullae spinalis induced by pain due to chronic prostatitis of rats. Inhibitor of gliocyte activation will be a new way to treat the pain of chronic prostatitis.

Key words: prostatitis; pain; excitatory amino acids; gliocytes

慢性前列腺炎是泌尿门诊的常见病,疼痛是患者就诊的主要原因,严重影响了患者的生活质量,所以对慢性前列腺炎患者疼痛机制的探讨尤为重要,但国内外在这方面研究并不多。兴奋性氨基酸(excitatory amino acids,EAA)主要包括谷氨酸(Glu)及天门冬氨酸(aspartic acid,Asp),是中枢神经系统内疼痛的重要调质和递质;而近几年来的研究显示胶质细胞在中枢神经系统中不仅仅起支持和营养作用,特别是星形胶质细胞和小胶质细胞,它们还是中枢神经系统内兴奋性氨基酸代谢的重要场所,而且激活的胶质细胞可释放EAA,从而参与病理性疼痛过程[1]。本实验旨在观察慢性前列腺炎疼痛的大鼠模型中胶质细胞活化是否能致脊髓背角兴奋性氨基酸的改变,特别是胶质细胞活化抑制剂丙戊茶碱(propentofylline)能否减少脊髓背角兴奋性氨基酸的释放,从而从胶质细胞活化抑制角度为临床诊治慢性前列腺炎疼痛提供新的靶位线索。

作者简介:张水文(1971-),男,湖北省黄石市人,博士研究生,主治医师,主要从事慢性前列腺炎方面的研究。电话:(023)68754186

通讯作者:宋 波,电话:(023)68754186

收稿日期:2006-05-16;修回日期:2006-10-12

1　材料与方法

1.1　动物分组

60 只健康雄性 3 月龄大鼠，体质量 180 ~ 220 g（由第三军医大学实验动物中心提供），按摸球法随机分成正常不加任何处理的对照组（$n=20$）、慢性前列腺炎疼痛模型组（$n=20$）、脊髓插管给药干扰组（$n=20$）。

1.2　慢性前列腺炎疼痛模型的建立

参考周占松[2,3]的建模方法并加以改进，取大鼠下腹部正中直切口暴露前列腺，于前列腺右侧叶注入 3% 角叉菜胶 30 μl（carrageenan，Sigma 公司）和完全福氏佐剂 30 μl（complete Freund's adjuvant，Sigma 公司），可吸收线缝合伤口，正常饲养 4 周后备用。

1.3　脊髓插管给药

慢性前列腺疼痛模型的大鼠麻醉后暴露并切开寰枕后膜，经切口向脊髓蛛网膜下腔插入外径 0.61 mm，全长 12 cm 的 PE-10 聚乙烯管，插入长度为 6 ~ 7 cm，达到腰膨大处，3 周后每次经导管注入 10% 胶质细胞活化抑制剂 propentofylline（Sigma 公司）10 μl，后用 10 μl 生理盐水冲洗，每日 1 次，连用 1 周。

1.4　兴奋性氨基酸的检测

每组 10 只大鼠腹腔注射过量的 25 g/L 戊巴比妥钠麻醉，迅速取出（L_6 和 S_1）段脊髓背角，-70 ℃冰箱备用，准确称样，分别加入 4% 磺基水杨酸 2 ml，匀浆 30 min 后于 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液于日立 L-8800 型全自动氨基酸分析仪（日本）分析检测，结果以 μmol/g 湿重组织表示。

1.5　免疫组织化学染色和胶质细胞阳性细胞计数

每组 10 只腹腔注射 25 g/L 戊巴比妥钠麻醉，经左心室灌注 250 ml 0.1 mol/L PBS（pH 7.4）清洗，700 ml 4% 多聚甲醛 PBS 液（pH 7.4）固定。取腰段脊髓（L_6 ~ S_1）组织，4% 多聚甲醛 PBS 液 4 ℃过夜后，入 4 ℃ 30% 蔗糖 4% 多聚甲醛 PBS 液直至组织沉底，横向连续冰冻切片（25 μm 厚），每隔 5 片取 1 片置 PBS 液中备用。ABC 法染色。第一抗体 GFAP 工作浓度为 1∶500，CD11B 工作浓度为 1∶200，谷氨酸的工作浓度 1∶1 500（均为 Chemicon 公司），切片置于一抗中 4 ℃孵育过夜，第 2 天换液后，分别与二抗、三抗室温反应 90 min，最终 DAB 显色 3 ~ 10 min（二抗、三抗和 DAB 试剂盒均为武汉博士德公司产品），参考 Stuesse 等的计数方法，在配备 OlympusBX50 光学显微镜的 LEICA Q500MC 图像分析系统下，在 40 × 高倍物镜下，每张切片在脊髓背角区域选取 5 个视野，对视野内阳性细胞计数取平均值，然后对所得数据进行统计分析。

1.6　统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件行 t 检验和方差分析。

2　结果

慢性前列腺炎疼痛模型组，L_6 ~ S_1 脊髓背角星形胶质细胞活化阳性细胞数与对照组相比均显著增加（$P<0.01$），而且胞体变大，突起增粗延长，见图 1。胶质细胞活化抑制剂 propentofylline 脊髓给药后，与疼痛模型组相比星形胶质细胞活化阳性细胞数显著减少（$P<0.01$），而且胞体变小，突起变细变短（图 2）。小胶质活化阳性细胞数与对照组相比均显著增加（$P<0.01$），而且胞体变大，细胞突起变短，形态呈“丰满”状（图 3）。胶质细胞活化抑制剂 propentofylline 脊髓给药后与疼痛模型组相比，小胶质活化阳性细胞数显著减少（$P<0.01$），而且胞体变小，突起变长（图 4）。AST 阳性细胞数和小胶质阳性细胞数的变化见表 1。慢性前列腺炎疼痛的大鼠 Glu 主要表达于脊髓的背角（图 5）。疼痛组 Glu 和 Asp 的释放明显多于正常对照组（$P<0.01$），干扰组 Glu 和 Asp 的释放较之疼痛组明显降低（$P<0.01$），见表 2。

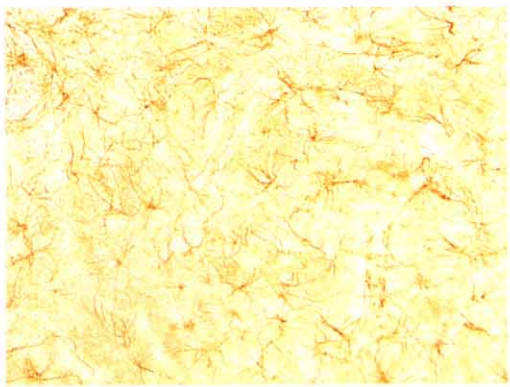


图 1　疼痛组星形胶质活化阳性细胞　（ABC × 400）



图 2　干扰组星形胶质活化阳性细胞　（ABC × 400）

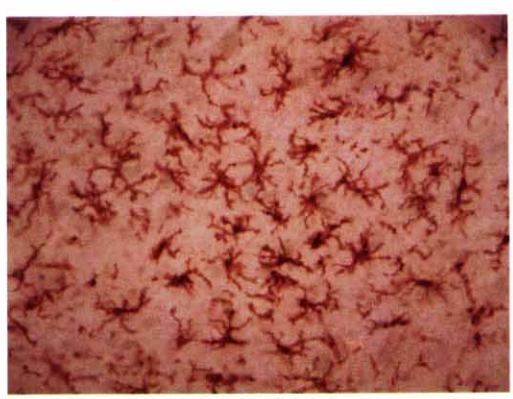


图 3　疼痛组小胶质活化阳性细胞　（ABC × 400）



图4 干扰组小胶质活化阳性细胞 (ABC×400)

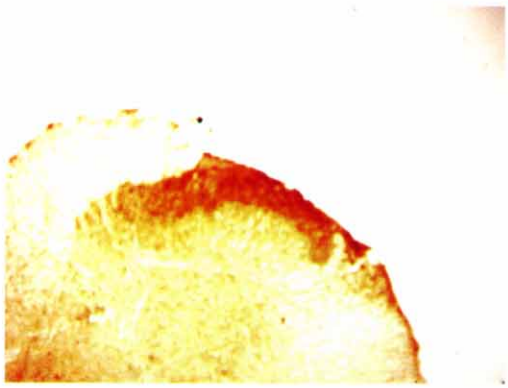


图5 慢性前列腺炎疼痛大鼠脊髓背角 Glu 的表达 (ABC×100)

表1 星形胶质细胞和小胶质细胞活化阳性细胞数的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	星形胶质细胞	小胶质细胞
对照组	38.8±3.6[a]	38.4±2.8[a]
疼痛组	66.5±5.2	55.7±4.1
干扰组	41.6±3.1[a]	42.3±3.4[a]

a:$P<0.01$,与疼痛组比较

表2 大鼠脊髓背角 Glu、Asp 的变化(μmol/g, $\bar{x}\pm s$)

组别	Glu	Asp
对照组	3.97±0.16[a]	3.25±0.12[a]
疼痛组	5.31±0.24	4.57±0.17
干扰组	4.22±0.18[a]	3.52±0.14[a]

a: $P<0.01$,与疼痛组比较

3 讨论

兴奋性氨基酸(EAA)主要包括谷氨酸(Glu)及天门冬氨酸(Asp),是中枢神经系统内疼痛的重要调质和递质。由于胶质细胞没有轴突,以往认为它们不参与细胞之间的信息交流,但现在越来越多的证据表明,脊髓胶质细胞的激活与一些痛觉过敏的产生和疼痛持续状态有密切的关系[4];胶质细胞的激活可释放 EAA,反过来,EAA 也能激活胶质细胞的活化,一旦激活后脊髓小胶质细胞和星形胶质细胞将持续正反馈方式互相作用,释放多种神经兴奋性物质驱使疼痛敏化状态。所以胶质细胞的活化可能是慢性疼痛长期持续的原因之一。

而慢性前列腺炎疼痛正是具有慢性、持续性、难治性及部位的多变性等特点,很多患者在前列腺炎症消失后,仍有疼痛症状的持续存在,并表现为对现有镇痛治疗效果不佳。有学者认为慢性前列腺炎疼痛可能起源于单一病因,多因素参与,并最终发展成慢性神经病理状态[5],这种神经病理状态很可能有脊髓胶质细胞的参与。本研究结果显示慢性前列腺炎大鼠脊髓背角星形胶质细胞和小胶质细胞的活化与对照组相比显著增加,胶质细胞活化抑制剂 pronpetofylline 脊髓给药后与疼痛模型组相比,星形胶质细胞和小胶质细胞的活化明显抑制,提示胶质细胞活化确实参与了慢性前列腺炎性疼痛的过程。而且兴奋性氨基酸 Glu 和 Asp 疼痛组显著增加,干扰组明显减少,和胶质细胞活化相对应,说明胶质细胞活化抑制剂 pronpetofylline 可能是通过抑制胶质细胞的活化从而减少疼痛物质 Glu 和 Asp 的释放,胶质细胞的活化导致 Glu 和 Asp 的过多释放是慢性前列腺炎疼痛的慢性持续性、难治性特点的主要原因。

由于对炎性内脏疼痛与胶质细胞活化关系的研究国内外尚少见文献报道,所以对胶质细胞活化在前列腺炎性疼痛中的作用的研究不但有望对慢性前列腺炎疼痛的诊治提供新的靶位线索,也为炎性内脏痛的发生、发展的神经病理学研究提供实验依据,其详细的分子机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Watkins L R, Milligan E D, Maier S F. Glial activation: a driving force for pathological pain[J]. Trends Neurosci, 2001, 24(8): 450-455.

[2] 周占松,宋 波,卢根生,等. 前列腺炎性疼痛与脊髓星形胶质细胞活化关系的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(18): 1853-1854.

[3] 周占松,宋 波,黄 华,等. 前列腺炎疼痛对背根神经节细胞兴奋性的影响及 $P2X_3$ 表达的变化[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1206-1208.

[4] Watkins L R, Milligan E D, Maier S F. Spinal cord glia: new players in pain[J]. Pain, 2001, 93(3): 201-205.

[5] Schaeffer A J. Etiology and management of chronic pelvic pain syndrome in men[J]. Urology, 2004, 63(3 Suppl 1): 75-84.

(编辑 汪勤俭)