论著

文章编号:1000-5404(2008)02-0138-04

坐骨神经结扎大鼠脑脊液补体异常活化与痛觉过敏的关系

王金保[1], 聂发传[1], 顾建腾[1], 崔 剑[1], 林江凯[2] (第三军医大学西南医院:[1]麻醉科, [2]神经外科, 重庆 400038)

摘 要: **目的** 观察坐骨神经慢性压迫性损伤(chronic constriction injury, CCI)后补体的变化特点,探讨脊髓补体异常活化与大鼠痛觉过敏的关系。**方法** 健康雄性SD大鼠40只分为假手术组、CCI组、生理盐水组和CVF组,对CCI组、生理盐水组和CVF组大鼠左侧坐骨神经进行松结扎,而假手术组只暴露左侧坐骨神经但不予任何处理, CVF组大鼠在术后腹腔注射眼镜蛇毒因子(CVF)进行干预,生理盐水组大鼠在术后腹腔注射等量的生理盐水作为对照CCI组。于术前和术后1~7 d每天测定大鼠的热痛阈值,采用免疫比浊法测定4组大鼠血清和脑脊液补体C_3含量,并在第7天处死大鼠取L_4~L_6段脊髓,匀浆后测其补体C_3含量。**结果** ①CCI组大鼠在坐骨神经结扎后出现热痛觉过敏,而假手术组大鼠则无此变化,给予生理盐水并不能影响坐骨神经结扎后出现的热痛敏感现象,而给予CVF却能抑制CCI大鼠热痛敏感的发生;②假手术组、CCI组及生理盐水组大鼠血清补体C_3含量手术前后无统计学差异;与术前相比,CCI组和生理盐水组术后大鼠脑脊液补体C_3浓度升高显著($P<0.01$),CVF组大鼠血清和脑脊液补体C_3含量明显减低;③术后第7天,CCI组大鼠脊髓中补体C_3含量显著高于假手术组,生理盐水组大鼠脊髓中补体C_3含量与CCI组相当,CVF组明显低于CCI组;④大鼠热痛阈值与血清补体含量无相关性,与脑脊液补体含量呈负相关。**结论** 外周神经损伤后,中枢神经系统存在补体异常活化现象,补体的这种变化特点与痛觉过敏的形成密切相关。

关键词: 坐骨神经;补体C_3;痛觉过敏;大鼠

中图法分类号: R-332;R441.1;R614.1 **文献标识码**: A

Relationship between Abnormal spinal complement activity and hyperalgesia in rats following sciatic nerve ligation

WANG Jin-bao[1], NIE Fa-chuan[1], GU Jian-teng[1], CUI Jian[1], LIN Jiang-kai[2] ([1]Department of Anesthesiology, [2]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the dynamic changes of complement protein 3 in rats with the chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve and investigate the relationship between spinal complement activity and hyperalgesia. **Methods** Forty healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group, CCI group, saline group and CVF group. The left sciatic nerve was ligated loosely according to Wang Jin-bao's method in all rats except those underwent sham operation. The rats of CVF group were intraperitoneally injected with cobra venom factor after CCI, while the rats of saline group with saline as control. Pain threshold by thermal stimulation was recorded and the level of complement protein 3 in serum and cerebrospinal fluid (CSF) were determined by the immunoturbidimetry preoperatively and everyday in postoperative seven days, the levels of complement 3 in spinal cord were determined on postoperative day 7. **Results** Thermal hyperalgesia developed after sciatic nerve ligation in CCI group, but not in sham-operation group. Cobra venom factor but not saline relieved the hyperalgesia. The level of complement 3 in serum in sham group, CCI group and saline group showed no changes. The postoperative levels of complement 3 in CSF of CCI group and saline group was significantly higher than that before operation ($P<0.01$). The postoperative level of complement protein 3 in serum and CSF in CVF group exhibited lower than that before operation. The level of complement

基金项目:国家自然科学基金(30772077)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772077)

作者简介:王金保,男,河南省卫辉市人,硕士研究生,主治医师,主要从事神经病理性疼痛发病机制方面的研究,现在白求恩国际和平医院,发表论文6篇。电话:(023)68773095,E-mail: wjb_72368@163.com

通信作者:聂发传,电话:(023)68765136

收稿日期:2007-07-05;修回日期:2007-10-18

protein 3 in spinal cord was higher obviously in CCI group and saline group than sham group on postoperative day 7 ($P<0.05$), lower in CVF group than CCI group. The thermal hyperalgesia was correlated with the level of complement in spinal cord but not with that in serum. **Conclusion** The complement components in central nerve system are activated abnormally after peripheral nerve injury, and the dynamic changes of complements may have an intimate relation with the formation of hyperalgesia.

Key words: sciatic nerve; complement protein 3; hyperalgesia; rat

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是国际疼痛研究学会 1994 年命名的，是指各种原因所致的以神经病理性改变为基础的顽固性疼痛[1]。它主要表现为痛觉过敏、痛觉超敏和异常疼痛。由于其发病率高，病情顽固，严重影响了人类的身心健康。为了攻克这一顽疾，越来越多的科研工作者投身于 NPP 的研究。遗憾的是，长期以来科学家们一度认为慢性疼痛是一种普通感觉现象，研究的重点放在神经元及传导通路的功能改变上，尽管取得了一些成绩，但 NPP 患者的治愈率和生存质量并没有获得明显改善。新近研究表明，脊髓胶质细胞对慢性疼痛有调节作用，并证实胶质细胞活化是 NPP 发生、发展过程中不可或缺的重要因素[1,2]。这个发现像一枚重磅炸弹，震惊了疼痛研究者，并极大地挑战了“神经元中心论”的主导地位。

研究表明，胶质细胞在感受免疫原刺激或外周神经传入的伤害性信号时，可以表现出免疫细胞特性，即释放大量 IL-1、IL-6、TNF 等细胞因子[2,3]。这些细胞因子作用于脊髓背角痛觉传递神经元，传入神经末梢，使其活性增强，释放神经递质增多，从而传入大脑的伤害性信号增强，产生痛觉过敏和痛觉超敏现象。那么 NPP 患者脊髓中具有免疫活性的胶质细胞激活后是否有补体的合成和释放？它的表达有无规律？以及补体蛋白在 NPP 中发挥什么样的作用？本研究建立 NPP 的经典模型——CCI 模型，观察脑脊液中补体表达的变化特点，并通过干预补体表达观察热痛敏感的变化，来探讨脊髓补体蛋白的表达在 NPP 中的作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

成年健康 SD 大鼠 40 只，雄性，体质量 220～250 g，本校实验动物中心提供[动物合格证号：SCXK(军)2002008]。适应环境 1 周后分 4 组：CCI 组、假手术组、生理盐水组和 CVF 组，每组 10 只。所有大鼠在术前(0 d)和术后 1、2、3、4、5、6、7 d 测定热痛阈值后采集血清和脑脊液标本，并在术后 7 d 处死大鼠测定其脊髓补体 C_3 含量。

1.2　主要实验仪器和试剂

①Ultrospec 4300 s 型紫外分光光度仪(瑞典)；②RYT-1 型热痛刺激仪，第四军医大学生理学教研室研制；③XW-80A 旋涡混合器，上海医科大学仪器长生产；④ －86 ℃电冰箱，美国 Thermo 公司生产；试剂：中华眼镜蛇毒因子(CVF)，昆明倍捷有限公司；补体 C_3 免疫浊度含量测定试剂盒(批号 0610225)，上海西唐生物科技有限公司提供。

1.3　CCI 模型的制作

参照王金保等[4]方法制作 CCI 模型。将大鼠称体质量后，给予 1% 戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉(40 mg/kg)，取俯卧位，固定于小动物手术台上，用硫化钠脱毛消毒铺巾后，在股骨外侧上方纵形切开皮肤，顺肌纹钝性分离肌肉，暴露坐骨神经，游离周围组织，在坐骨神经三叉分支的近端约 5 mm 处，用多孔胶片包裹后，6.0 的手术缝合线做 4 道结扎，间距约 1 mm，以不影响神经外膜的血运为度，逐层关闭刀口，缝合皮肤前后分别消毒 1 次；假手术组只暴露坐骨神经，不做神经结扎。术后大鼠平卧，置烤灯下取暖，待复苏后，送动物房单笼喂养。

1.4　给药方法

参照兰纲等[5]的做法，CVF 组大鼠在坐骨神经结扎后即刻腹腔注射 CVF 50 μg/kg，术后 1～7 d 每天腹腔注射 CVF 20 μg/kg；生理盐水组大鼠在坐骨神经结扎后相同时间点腹腔注射等容量的生理盐水。

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

将大鼠置于干净的 3 mm 厚的玻璃板上的有机玻璃箱内(20 cm×20 cm×25 cm)，用 RYT-1 型热辐射刺激仪照射大鼠足跖部无毛区，从照射开始至大鼠出现缩腿逃避的时间为 PWTL。为避免长时间热刺激引起组织损伤，30 s 后电源自动切断。每只大鼠双下肢各测定 3 次，每次间隔 6～8 min，取其平均值。各组在实验前均测基础值，如果双下肢 PWTL 相差太大，基础 PWTL <5 s 或 >30 s，则将该大鼠剔除实验。

1.6　标本采集

尾静脉采血 100 μl 迅速离心，4 000 r/min，10 min，用移液器抽取上清液，置于 －20 ℃冰箱待测；脑脊液标本的采集参照富宏等[6]的方法，经皮穿刺延髓池，采集脑脊液 100 μl，同时推注等量的生理盐水以维持颅内压；脊髓匀浆的制作：术后 7 d 处死实验大鼠，取其 L_4～L_6 节段脊髓标本，称其质量后，按 1∶9 比例加入冰盐水，制成 10% 脊髓匀浆，4 ℃下离心(3 000 r/min，5 min)，取上清液。置于 Eppendorf 管中，－86 ℃冰箱内保存待测。

1.7　检测方法

血清、脑脊液和脊髓匀浆中补体 C_3 检测采用免疫比浊法，具体步骤严格按照试剂盒说明书操作。

1.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 13.0 统计软件进行组间重复测量试验方差分析，组内 t 检验；对补体含量与痛阈的相关性采用 pearson 积矩相关分析。

2 结果

2.1 坐骨神经结扎后的痛觉变化

4 组大鼠热痛阈的基础值比较无统计学差异（$P>0.05$）。术后第 1 天 CCI 组大鼠左侧（坐骨神经结扎侧）热痛阈迅速下降，并且热痛敏感持续保持到术后第 7 天；生理盐水组热痛敏感变化与 CCI 组基本相似；CVF 组大鼠在手术后没有出现明显的热痛敏感现象；假手术组大鼠在术后第 1 天 PWTL 虽然有所缩短，但幅度较小，并且在术后第 2 天热痛阈值逐渐恢复到手术前水平（图 1）。

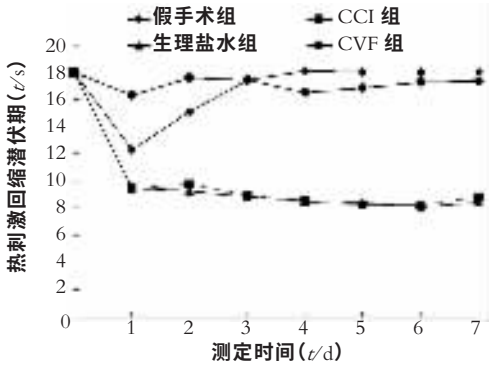


图 1 大鼠坐骨神经结扎后热痛阈值的变化

2.2 4 组大鼠手术前后各时间点血清补体 C_3 含量比较

术前，4 组大鼠血清补体 C_3 含量无统计学差异；假手术组、CCI 组和生理盐水组大鼠手术前后血清补体 C_3 变化不明显（$P>0.05$）；受补体抑制剂-CVF 作用的影响，CVF 组大鼠在给药后血清补体含量较其他 3 组明显减低（$P<0.01$）（表 1）。

2.3 4 组大鼠手术前后脑脊液补体 C_3 含量比较

术前 4 组大鼠脑脊液补体 C_3 含量无统计学差异（$P>0.05$）；与术前相比，CCI 组术后脑脊液中补体 C_3 含量逐渐增高，并且到第 6 天达高峰，之后维持平稳；而假手术组大鼠脑脊液中补体含量术前、术后无变化；生理盐水组大鼠脑脊液中补体 C_3 变化与 CCI 组一致；与前 3 组相比，CVF 组大鼠脑脊液中补体含量明显减低（$P<0.01$）（表 2）。

2.4 4 组大鼠脊髓匀浆补体 C_3 含量比较

手术后第 7 天，CCI 组大鼠脊髓匀浆中补体 C_3 含量较假手术组明显增高，生理盐水组大鼠脊髓中补体 C_3 与 CCI 组相比无统计学差异，CVF 组大鼠脊髓中补体 C_3 含量较 CCI 组明显下降（$P<0.01$）（图 2）。

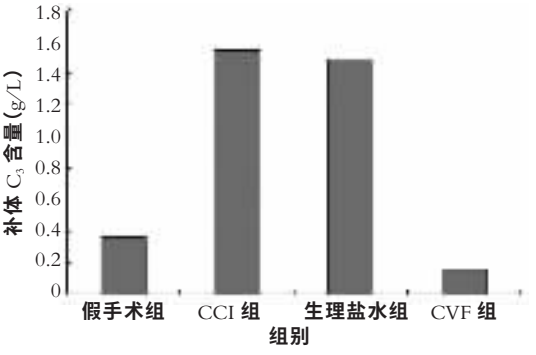


图 2 4 组大鼠手术后 7 d 脊髓匀浆中补体 C_3 含量比较

2.5 大鼠痛阈与血清和脑脊液补体水平的相关分析结果

我们对 CCI 组大鼠热痛阈值与血清和脑脊液补体水平做了 Pearson 积矩相关分析，相关系数分别为：$r=0.216$，$P=0.607$ 和 $r=-0.721$，$P=0.043$。由此可以看出大鼠热痛阈值与血清补体水平无相关性，而与脑脊液中补体水平存在负相关关系，即脑脊液中补体含量增高，大鼠痛觉越敏感。

3 讨论

补体作为免疫反应的参与者，广泛存在于动物的血清中和组织中，参与机体的防御及免疫调节作用，不适当的刺激可以介导免疫损伤反应。在补体蛋白家族中，C_3 含量最多，而且是 3 条激活途径中的共同通路，其功能显著，因此常常将 C_3 作为补体激活的指标。血浆中的补体蛋白主要是肝细胞分泌的，而中枢神经系统内补体蛋白主要是由胶质细胞释放的。

外周神经损伤后，在受伤区域及其附近也可见到补体蛋白的大量表达。Rosalein 等[7]将大鼠右侧坐骨神经钳夹 30 s 后再用手术缝合线结扎，4 h 后发现髓鞘变性，并且在变性的髓鞘及轴突上发现有大量的补

表 1 4 组大鼠手术前后血清补体 C_3 含量比较（g/L，$\bar{x} \pm s$）

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
假手术组	0.908 ± 0.230	0.889 ± 0.129	0.865 ± 0.218	0.861 ± 0.225	0.895 ± 0.292	0.838 ± 0.247	0.907 ± 0.254	0.886 ± 0.137
CCI 组	0.904 ± 0.251	0.920 ± 0.188	0.880 ± 0.257	0.883 ± 0.262	0.891 ± 0.200	0.860 ± 0.273	0.925 ± 0.283	0.873 ± 0.223
生理盐水组	0.911 ± 0.187	0.915 ± 0.220	0.906 ± 0.150	0.876 ± 0.271	0.922 ± 0.211	0.849 ± 0.202	0.868 ± 0.164	0.844 ± 0.130
CVF 组	0.884 ± 0.19	0.092 ± 0.011[a]	0.115 ± 0.062[a]	0.098 ± 0.007[a]	0.104 ± 0.023[a]	0.080 ± 0.015[a]	0.214 ± 0.042[a]	0.094 ± 0.033[a]

a：$P<0.01$，与假手术组、CCI 组和生理盐水组比较

表 2 4 组大鼠手术前后脑脊液补体 C_3 含量比较（$\bar{x} \pm s$，g/L）

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
假手术组	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.005 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.001
CCI 组	0.004 ± 0.001	0.043 ± 0.012[a]	0.089 ± 0.010[a]	0.221 ± 0.003[a]	0.277 ± 0.032[a]	0.415 ± 0.01[a]	0.557 ± 0.092[a]	0.558 ± 0.028[a]
生理盐水组	0.005 ± 0.000	0.049 ± 0.007[a]	0.078 ± 0.016[a]	0.250 ± 0.041[a]	0.322 ± 0.043[a]	0.385 ± 0.038[a]	0.660 ± 0.103[a]	0.567 ± 0.119[a]
CVF 组	0.005 ± 0.001	0.000 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]	0.000 ± 0.000[b]

a：$P<0.01$，与假手术组比较；b：$P<0.01$，与 CCI 组和生理盐水组比较

体 C_{3C}表达。但外周神经损伤后是否会引起中枢系统补体的活化目前还没有人对此研究。近年来，越来越多的研究提示活化的胶质细胞是 NPP 发生、发展的重要因素[1,2]，而外周神经损伤是 NPP 的主要病因，这就从理论上为外周神经损伤激活中枢补体提供了可能。

本研究我们通过建立 CCI 模型，观察大鼠血清和脑脊液的补体变化情况，采用昆明倍捷公司提供的 CVF 动补体激活途径（主要是经典途径和替代途径），进而短时间内耗竭大鼠体内的补体，来观察它对大鼠 PWTL 的影响，探讨脊髓补体活化在 NPP 中的作用。结果显示，CCI 大鼠在手术前后血清补体水平无变化，而手术后脑脊液补体水平升高。表明外周神经损伤仅仅激活了中枢神经系统的胶质细胞，而对全身免疫系统没有产生影响，从另一个角度证实了 NPP 时胶质细胞活化。外周神经损伤后，脑脊液中补体水平在术后第 1 天即有上升，第 6 天达高峰，我们据此推测，外周神经损伤后首先引起小胶质细胞活化，进而引起星状胶质细胞的激活，两种胶质细胞的先后活化使脑脊液中补体水平不断升高并逐渐达到高峰。正常情况下，脑脊液中有少量补体蛋白的存在，在外周神经损伤后，胶质细胞（包括小胶质细胞和星状胶质细胞）活化，表达补体蛋白量迅速增加。我们的研究结果提示，脑脊液中补体的表达量与大鼠痛觉过敏有密切关系。CCI 组大鼠手术后痛觉过敏逐渐形成，其脑脊液中补体 C_3 含量也进行性升高。假手术组大鼠手术后无痛觉过敏产生，其脑脊液补体 C_3 含量也没有明显变化。给予补体抑制剂——CVF 后降低了 CCI 大鼠脑脊液中补体的含量，却提高了其热痛阈值（PWTL）。做 Pearson 积矩相关分析也显示，脑脊液补体含量与大鼠痛觉过敏程度有很大相关性。

那么，脊髓胶质细胞释放的补体蛋白是否参与 NPP 的形成呢？事实上，许多中枢系统疾病都存在补体系统的激活，并且相当部分中枢系统疾病的发生、发展都与补体蛋白的表达有着密切联系[8,9]。McGeer 等[10]研究发现，Parkinson disease 动物模型大脑受累区域有小胶质细胞活化和补体蛋白 mRNA 的高水平表达，给予抗炎因子降低补体水平，可以明显减少多巴胺神经元的死亡。Bonifatin 等[8]指出 Aβ 淀粉蛋白聚集可以直接激活补体系统的经典通路和替代通路，反过来，补体的活化又加剧了 Alzheimer 病患者脑内的氧化应激反应。研究还表明在神经元上有 C_{3a}和 C_{5a}受体表达[3]。由此我们推测 NPP 时脊髓背角补体活化可能作为胶质细胞-神经元间的信使而参与 NPP。理由如下：第一，NPP 时存在胶质细胞激活现象，而活化的胶质细胞具有合成和释放补体的潜能；第二，脑脊液中补体表达在 CCI 后进行性升高，并在第 6 天达高峰，而这与 NPP 大鼠痛觉过敏形成时间基本吻合[1,11]，相关分析也支持了脑脊液中补体表达量与痛觉过敏的关系；第三，既往研究表明，神经元上表达的离子型谷氨酸受体 AMPA 和 NMDA 可以介导补体触发效应，使神经元容易受到补体蛋白的作用[12]；第四，NPP 时活化的胶质细胞释放的细胞因子在 NPP 的形成和发展中具有关键作用，而补体蛋白与细胞因子具有相互诱发和协同作用[12,13]，它们两者都参与 NPP 是不难理解的。

补体活化在 NPP 中的研究是一个崭新的课题，它不仅丰富和发展了 NPP 的胶质细胞学说，更是为 NPP 的诊断和治疗提供了一个新思路。能不能通过检测脊髓补体的含量来判定 NPP 的发展阶段？可不可以通过阻断补体激活途径或者提高神经元细胞膜的抗补体攻击能力来治疗 NPP 呢？相信今后会有更多的学者给予关注和研究。

参考文献：

[1] Tsuda M, Inoue K, Salter M W. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia[J]. Trends Neurosci, 2005, 28(2): 101 – 107.

[2] Fields R D, Stevens-Graham B. New insights into neuron-glia communication[J]. Science, 2002, 298(5593): 556 – 562.

[3] Marchand F, Perretti M, McMahon S B. Role of the immune system in chronic pain[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(7): 521 – 532.

[4] 王金保，聂发传. 改良坐骨神经慢性压迫性损伤模型的建立[J]. 华北国防医药，2007，19(3)：1 – 3.

[5] 兰　纲，杨　康，吴　蔚，等. Cvf 在大鼠移植心脏缺血再灌注损伤中的保护作用研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(4)：357 – 359.

[6] 富　宏，陶迎红，王学美，等. 经皮穿刺延髓池抽取兔和大鼠脑脊液的方法[J]. 中国比较医学杂志，2006，16(11)：684 – 687.

[7] de-Jonge R R, van-Schaik I N, Vreijling J P, *et al*. Expression of complement components in the peripheral nervous system[J]. Hum Mol Genet, 2004, 13(3): 295 – 302.

[8] Bonifati D M, Kishore U. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation[J]. Mol Immunol, 2007, 44(5): 999 – 1010.

[9] Rus H, Niculescu F. The complement system in central nervous system diseases[J]. Immunol Res, 2001, 24(1): 79 – 86.

[10] McGeer P L, McGeer E G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease[J]. Parkinsonism Relat Disord, 2004, 10(Suppl 1): S3 – S7.

[11] Watkins L R, Maier S F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states[J]. Physiol Rev, 2002, 82(4): 981 – 1011.

[12] Twining C M, Sloane E M, Schoeniger D K, *et al*. Activation of the spinal cord complement cascade might contribute to mechanical allodynia induced by three animal models of spinal sensitization[J]. J Pain, 2005, 6(3): 174 – 183.

[13] Milligan E D, Twining C, Chacur M, *et al*. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats[J]. J Neurosci, 2003, 23(3): 1026 – 1040.

（编辑　王　红）