论著

文章编号:1000-5404(2011)23-2480-05

中分子量羟乙基淀粉对脊髓损伤后神经病理性疼痛的影响

胡新宇,陶 军,杨天德,谢科宇 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院麻醉科)

[摘要] **目的** 研究中分子量羟乙基淀粉对脊髓损伤后损伤平面以下神经病理性疼痛的影响。**方法** SD大鼠72只,采用随机数字法,分为4组,3组建大鼠脊髓(T10-11)中度撞击伤模型并经尾静脉分别给予生理盐水、低分子量羟乙基淀粉、中分子量羟乙基淀粉,余下1组仅去除相应椎板。行为学观察大鼠痛阈变化。术后测脊髓组织内伊文氏蓝含量,观察血脊髓屏障变化,Western blot观察胶质细胞活化情况,ELISA定量IL-1、IL-6、TNF-α表达水平。**结果** 大鼠脊髓损伤后3 d脊髓组织伊文氏蓝含量测定示(生理盐水组:2.58±0.30;低分子量羟乙基淀粉组:2.38±0.48,中分子量羟乙基淀粉组:1.38±0.35)中分子量羟乙基淀粉组较生理盐水组和低分子量羟乙基淀粉组能有效缓解血脊髓屏障的异常开放($P<0.05$);脊髓损伤后10 d神经胶质细胞形态学观察,中分子量羟乙基淀粉组较另2组可显著减轻损伤区巨噬细胞/小胶质细胞活化程度,并可降低损伤段脊髓组织IL-1、IL-6、TNF-α表达水平($P<0.05$);术后10 d大鼠行为学观察,各手术组所测机械痛敏压力阈值较术前明显降低,中分子量羟乙基淀粉组较生理盐水组和低分子量羟乙基淀粉组治疗可使痛阈升高($P<0.05$)。**结论** 中分子量羟乙基淀粉可能通过挽救通透性异常的血脊髓屏障,抑制损伤区域巨噬细胞/小胶质细胞的活化而缓解大鼠脊髓损伤后神经病理性疼痛。

[关键词] 脊髓损伤;中枢性疼痛;血脊髓屏障;羟乙基淀粉;炎症反应

[中图法分类号] R-332; R651.2; R977.7 [文献标志码] A

Effect of medium molecular weight hydroxyethyl starch on neuropathic pain in rats after spinal cord injury

Hu Xinyu, Tao Jun, Yang Tiande, Xie Keyu (Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of medium molecular weight hydroxyethyl starch (HES 130/0.4, Voluven) on below-level neuropathic pain after spinal cord injury (SCI). **Methods** Using random number table, a total of 72 male adult SD rats were randomly and equally divided into four groups. Rats in three groups underwent moderate spinal cord contusion (T_{10-11}) and were given normal saline, low molecular weight HES (HES 40) and medium molecular weight HES (HES 130/0.4, Voluven) through caudal vein, respectively; the other group of rats only underwent laminectomy and were set as control. In behavioral test, paw withdraw pressure threshold (PWPT) were measured to evaluate the central pain. Evans blue (EB) uptake in spinal cord tissues was measured to evaluate the disruption of blood spinal cord barrier. Levels of GFAP, Iba1 and ED1 were measured by Western blotting for the detection of astrocyte and macrophage/microglia activation. ELISA was applied to determine spinal expressions of IL-1, IL-6 and TNF-α. **Results** EB uptake in spinal cord tissues demonstrated that HES 130/0.4 effectively retrieved the compromised BSCB after 3 d of SCI as compared with normal saline and low molecular weight HES (Saline: 2.58±0.30; HES 40: 2.38±0.48; HES 130/0.4: 1.38±0.35; $P<0.05$). Ten days after SCI, as compared with normal saline and low molecular weight HES, immunohistochemistry results showed that HES 130/0.4 significantly lessened macrophage/microglia activation, and ELISA showed HES 130/0.4 significantly reduced expressions of IL-1, IL-6 and TNF-α ($P<0.05$). Behavioral test after ten-day SCI suggested that PWPT was dramatically reduced in all groups of rats, but HES 130/0.4 treatment could significantly raise the PWPT as compared with normal saline and low molecular weight HES ($P<0.05$). **Conclusion** HES 130/0.4 could attenuated below-level neuropathic pain after spinal cord injury, and the mechanism maybe related to remedy of BSCB disruption and inhibi-

[通信作者] 陶 军,E-mail: xqtj0560@sina.com

tion of macrophage/microglia activation .

[**Key words**] spinal cord injury; neuropathic pain; blood spinal cord barrier; hydroxyethyl starch; inflammation

Corresponding author: Tao Jun, E-mail: xqtj0560@sina.com

目前脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)后神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)发生率较高,其中,中枢性疼痛(central pain, CP)为SCI的顽固性并发症[1]。截至目前,其发病机制尚不完全清楚,治疗手段较多但疗效不确切[2]。经典观念认为,疼痛的发生单纯由神经元介导。近年来人们逐渐认识到,神经胶质细胞(星形胶质细胞、小胶质细胞)以及神经胶质细胞与神经元的相互作用在SCI后的CP中扮演重要角色,其作用主要通过分泌多种细胞因子得以实现[3]。另外,就脊髓损伤而言,血管结构和神经成分被直接破坏,启动复杂剧烈的炎症反应,而神经胶质细胞连同外周血白细胞都不可避免地被卷入其中[4]。所以,脊髓损伤后的神经胶质细胞就将炎症反应与CP的发生联系在一起[5-6]。血脊髓屏障(blood spinal cord barrier, BSCB)在正常情况下维持脊髓内环境稳定,SCI后,由于血管结构受累,BSCB破坏不可避免,对受损脊髓炎症反应的启动、进展和调节至关重要[7]。有研究表明中等分子量羟乙基淀粉可以改善血管内皮细胞的功能,防止和堵塞毛细血管漏,下调炎症介质[8]。因此本实验采用大鼠脊髓损伤模型,以生理盐水和低分子量羟乙基淀粉作为对照,观察中分子量羟乙基淀粉对脊髓损伤后损伤平面以下神经病理性疼痛的影响,探讨血脊髓屏障异常开放是否可以影响炎症反应,进而干预SCI后损伤水平以下NP的发生、发展。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SD雄性大鼠72只(220~250 g),第三军医大学实验动物中心提供。采用随机数字法分为1组(生理盐水组),2组(低分子量羟乙基淀粉组HES 40,平均相对分子质量40×10^3),3组(中分子量羟乙基淀粉组HES 130/0.4,万汶,美国费森尤斯卡比公司,平均相对分子质量130×10^3,取代级0.4),4组(假手术组)($n=18$)。模型建立完毕即刻分别经尾静脉注射生理盐水,HES 40,HES 130/0.4,5% ×每次动物血容量,2次/d;4组仅行椎板去除术。各组分别于术后3 d测BSCB破坏情况($n=4$)、10 d做行为学观察和分子生物学检测($n=4$)、形态学观察($n=4$),其余动物($n=6$)在相应时间点做行为学观察并在伤后60 d处死。本实验符合第三军医大学实验动物伦理委员会要求。

1.2 模型制备

大鼠用1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,行T8椎板去除术,利用NYU大鼠脊髓撞击仪Ⅰ型造脊髓T10~T11中度损伤(撞击杆质量20 g,高度12.5 mm)。以受撞击脊髓的压缩比来判断模型制作成功。术后人工排尿(2次/d)至排尿反射恢复,饮食不限。

1.3 测后肢疼痛阈值以反映损伤水平以下中枢性疼痛

机械性痛觉过敏:机械测痛仪测定机械性痛敏压力阈值(paw withdrawal pressure threshold,PWPT)。每时间点每只动物分别测3次(间隔3 min),取平均值。

1.4 脊髓组织伊文氏蓝(evans blue,EB)含量的测定

根据改良Klohs等[9]的方法评价BSCB完整性。大鼠经股静脉注射EB,测脊髓组织内EB含量以反应BSCB破坏情况。伤后3 d,大鼠麻醉后经股静脉注射2% EB (2 ml/kg),20 min后,经心脏灌注150 ml生理盐水冲净血管内血液,取脊髓(损伤节段为中心2 cm长),剥除硬脊膜,称质量并置于等体积甲酰胺中,置37 ℃水浴48 h,波长632 nm处测光密度值,得光密度值比脊髓湿重数值。各组数值与假手术组相比,得出相对数用于统计学分析。

1.5 组织学观察

动物以过量戊巴比妥钠麻醉,灌注固定,取全长脊髓,置于含25%蔗糖脱水。取脊髓:损伤区为中心2 cm节段。行20 μm连续矢状冰冻切片。切片行免疫荧光双重标记并Hoechst(1∶1 000,Sigma)衬染。一抗:兔源抗GFAP多抗(1∶1 000,Dako),兔源抗Iba1单抗(1∶800,Dako),小鼠源抗ED1单抗(1∶400,Serotec)。二抗:偶联异硫氰酸荧光素(FITC)山羊源抗兔二抗(1∶800,Abcam),偶联德克萨斯红的驴源抗小鼠二抗(1∶800,Abcam)。

染色切片在奥林巴斯FV1000激光共聚焦显微镜上观察并采图。

1.6 脊髓组织蛋白提取和定量

Western blot半定量检测星形胶质细胞(GFAP)、小胶质细胞(Iba1)、活化小胶质细胞/巨噬细胞(ED1),结果应用Quantity One软件分析。酶联免疫吸附法(ELISA)定量检测IL-1、IL-6、TNF-α(美国R&D公司)。

1.7 统计学分析

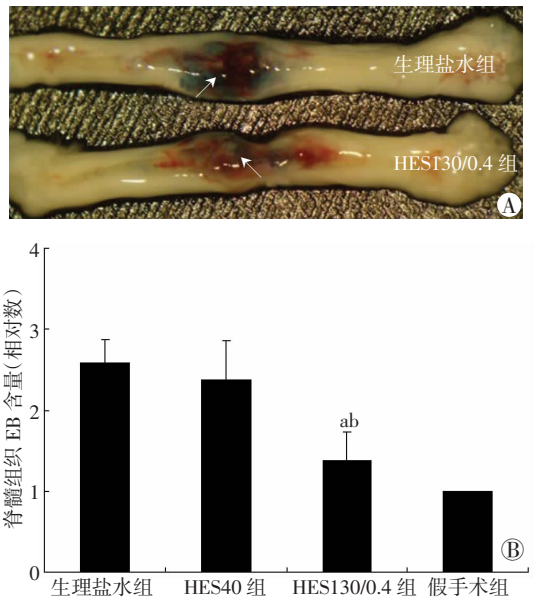
所得数据采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,组间比较行t检验。

2 结果

2.1 HES 130/0.4对BSCB的影响

由预实验可知,中度脊髓撞击伤后,BSCB随即遭到破坏,3 d达最大值。本实验选择在伤后3 d比较各组间BSCB破坏程度:脊髓组织内伊文氏蓝含量HES130/0.4组明显少于生理盐水组。生理盐水组脊髓实质内伊文氏蓝含量明显高于假手

术组，HES130/0.4组显著低于生理盐水组和HES40组（$P<0.05$），见图1。

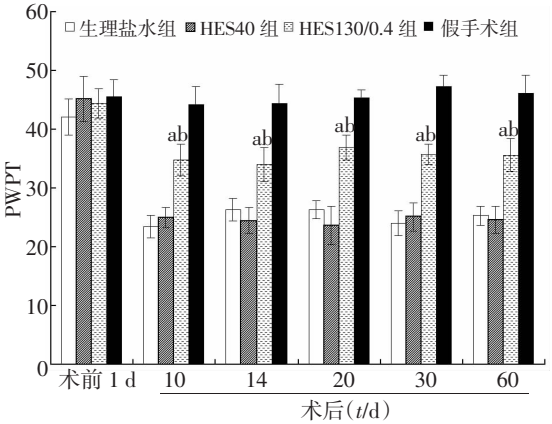


A：脊髓正中矢状切剖面图，箭头所示蓝色成分为伊文氏蓝；B：各组脊髓组织相对伊文氏蓝含量　a：$P<0.05$，与生理盐水组比较；b：$P<0.05$，与HES40组比较

图1　脊髓损伤后3 d各组脊髓组织伊文氏蓝含量分析

2.2　HES 130/0.4对损伤水平以下病理性疼痛的作用

脊髓中度撞击伤后后肢即瘫痪，后逐渐恢复功能，到伤后10 d达到足底着地程度。本研究选择术前1 d和术后10、14、20、30、60 d，对各组大鼠PWPT进行测量。术前各组间PWPT无显著性差异。生理盐水组术后10 d开始，所有动物PWPT均显著降低，且随后各时间点较10 d无明显差异，可见在伤后10 d即形成稳定的病理性疼痛。在伤后各时间点，生理盐水组、HES40组、HES130/0.4组痛阈均较损伤前明显降低，且均低于假手术组，但HES130/0.4组高于生理盐水组和HES40组，差异存在统计学意义（$P<0.05$），见图2。



a：$P<0.05$，与生理盐水组比较；b：$P<0.05$，与HES40组比较

图2　中分子量羟乙基淀粉对大鼠脊髓损伤后机械痛敏的影响

2.3　HES 130/0.4对炎症反应的影响

脊髓中度撞击伤后，活化小胶质细胞/巨噬细胞在伤后10 d达到高峰，本研究选择在伤后10 d比较各组炎症反应程度。

2.3.1　HES 130/0.4对神经胶质细胞的影响　Iba1和ED1分别为巨噬细胞/小胶质细胞内钙结合蛋白和溶酶体膜蛋白标记物，可反映巨噬细胞/小胶质细胞活化程度。伤后10 d，损伤段：生理盐水组脊髓内Iba1和ED1表达较假手术组显著增强，HES40组Iba1和ED1较生理盐水组未见明显差异，HES130/0.4组Iba1和ED1表达强于假手术组，但弱于生理盐水组和HES40组（图3）。

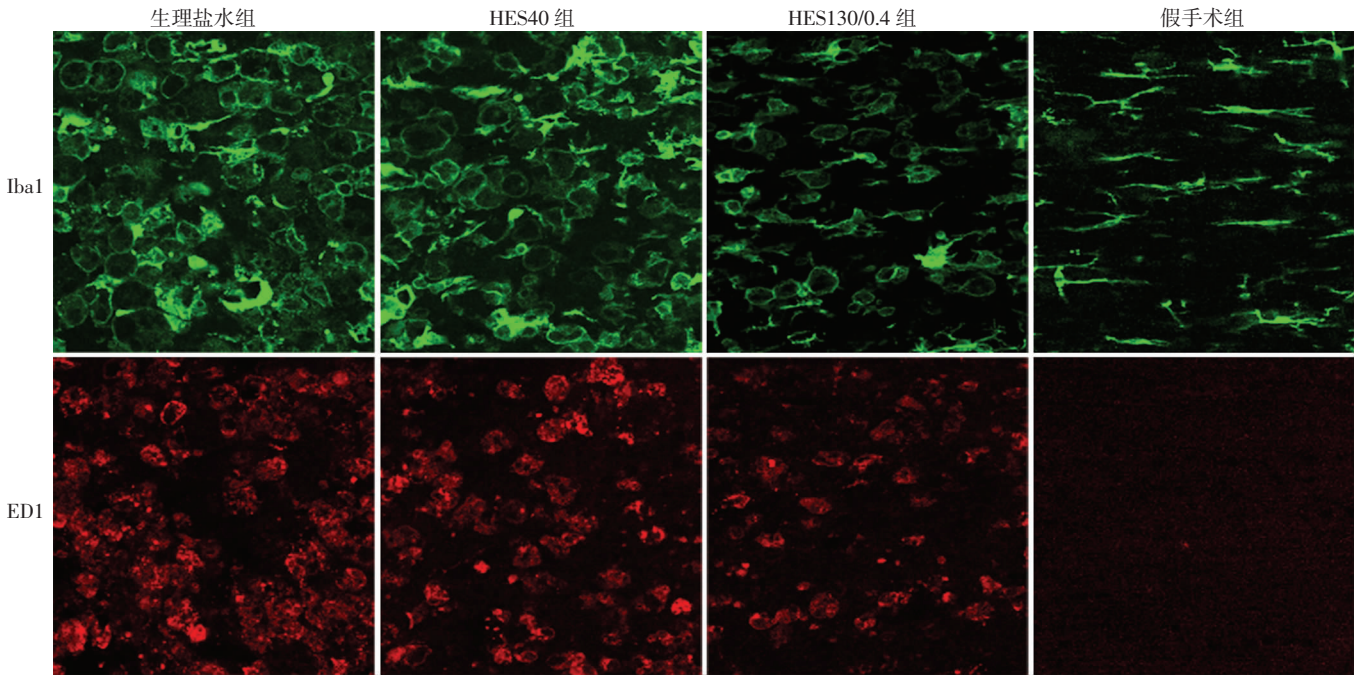


图3　大鼠脊髓损伤后10 d免疫荧光检测各组损伤段脊髓活化小胶质细胞/巨噬细胞（Iba1和ED1）的表达

GFAP 是星形胶质细胞的特异性标志物,伤后 10 d 的损伤区,生理盐水组、HES40 组、HES130/0.4 组 GFAP 的表达无差异;Iba1 和 ED1 的表达,生理盐水组、HES40 组、HES130/0.4 组均高于假手术组,但 HES130/0.4 组二者均低于生理盐水组和 HES40 组,差异存在统计学意义($P<0.05$),见图 4。

2.3.2 HES 130/0.4 对炎性细胞因子表达的影响 对伤后 10 d 脊髓组织 IL-1、IL-6、TNF-α 的表达进行观察。损伤段:生理盐水组与 HES40 组间未见明显差异,HES130/0.4 组较生理盐水组和 HES40 组均明显下降($P<0.05$),见图 5。

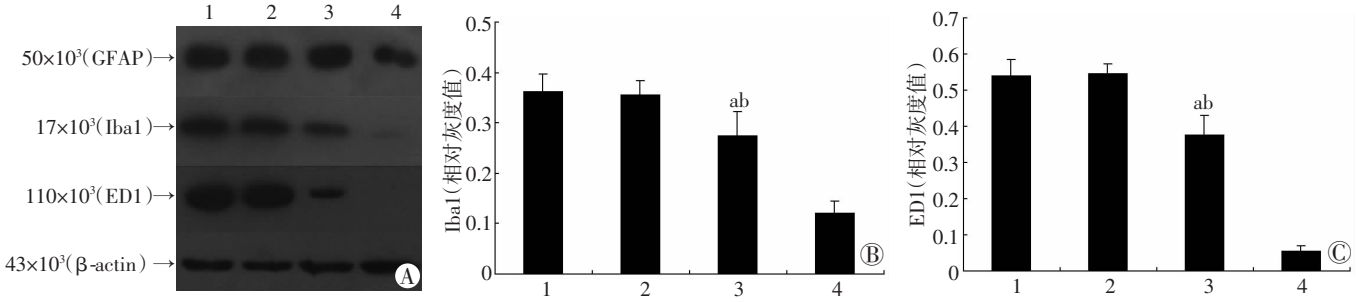
3 讨论

中枢性疼痛(central pain, CP)是脊髓损伤后继发的严重合并症,其逐年增高的发病率越来越多的引起人们的关注。研究表明,脊髓实质内胶质细胞的活化[10],炎症因子和趋化因子的表达上调等因素与 SCI 后 CP 在发生上有一定相关性[11],SCI 后,神经胶质细胞被炎症因子等激活导致疼痛发生,同时激活的胶质细胞又可以促进炎症因子释放,加重炎症反应,形成恶性循环[12]。

血脊髓屏障是由星形胶质细胞附着于毛细血管壁的血管周足与毛细血管内皮细胞的紧密连接所组成。SCI 后脊髓实质损伤导致 BSCB 通透性增加,脊髓内的胶质细胞及炎症因子被激活[13],活化的小胶质细胞及其同源的外周巨噬细胞一同,在 SCI 后炎症的执行和调节中有重要作用。这些炎症细胞及介质对脊髓的毒性作用可以进一步诱发和加重 BSCB 的破坏,导致脊髓继发性损伤。

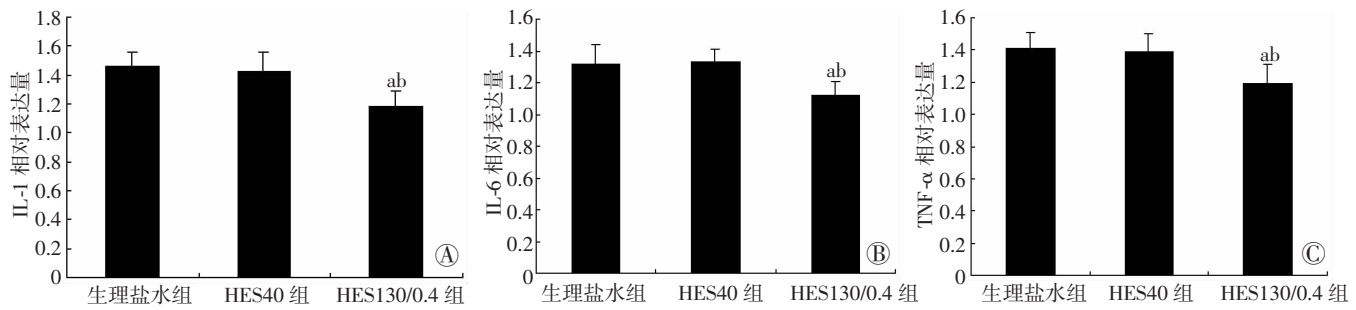
近年研究表明中等分子量羟乙基淀粉可以改善血管内皮细胞的功能,防止和堵塞毛细血管漏,减轻血脊髓屏障开放。其主要机制是一种物理性的“补漏”作用,而且其效果优于同浓度的林格乳酸盐液和 5% 白蛋白血清[14]。HES 130/0.4 除具有上述作用外在多种炎症病理状态下可以下调炎症介质。如脓毒症或内毒素血症大鼠接受 HES 130/0.4 输注后肺内的炎症介质生成明显减少[15],包括 TNF-α、IL-1、IL-6、中性粒细胞趋化因子等。本研究利用 HES 130/0.4 干预 SCI 后血脊髓屏障的异常开放,进而影响炎症反应来干预脊髓损伤后损伤平面以下 CP 的发生和维持。结果显示 HES 130/0.4 可以改变 BSCB 通透性,减轻炎症反应,进而缓解 SCI 后中枢性疼痛的发生。

目前,鲜见通过调节 BSCB 功能来干预 SCI 后 CP



1:生理盐水组;2:HES40 组;3:HES130/0.4 组;4:假手术组;A:Western blot 检测特异性标记物表达; B:各组 Iba1 相对灰度值 a:$P<0.05$,与生理盐水组比较;b:$P<0.05$,与 HES40 组比较; C:各组 ED1 相对灰度值 a:$P<0.01$,与生理盐水组比较; b:$P<0.01$,与 HES40 组比较

图 4 大鼠脊髓损伤后 10 d Western blot 半定量检测损伤段脊髓 GFAP、Iba1、ED1 特异性标记物表达



A: IL-1 相对表达量;B: IL-6 相对表达量;C: TNF-α 相对表达量;a:$P<0.05$,与生理盐水组比较;b:$P<0.05$,与 HES40 组比较

图 5 大鼠脊髓损伤后 10 d ELISA 定量检测各组损伤段脊髓 IL-1、IL-6、TNF-α 的相对表达量

的研究。通过本实验的初步研究,我们对脊髓损伤节段和腰段的胶质细胞活化情况进行了观察,未见 HES 130/0.4 影响2个节段脊髓星形胶质细胞反应,也未见其影响腰段巨噬细胞/小胶质细胞活化,但在脊髓损伤区节段,HES 130/0.4 可降低巨噬细胞/小胶质细胞活化程度,并使损伤区 IL-1、IL-6、TNF-α 表达下调。提示 IL-1、IL-6、TNF-α 表达下调可能为 HES 130/0.4 缓解损伤水平以下 NP 的原因之一;而受损脊髓,这些细胞因子主要由剧烈活化的巨噬细胞/小胶质细胞所分泌[16-17],所以 HES 130/0.4 干预后巨噬细胞/小胶质细胞活化水平的下调可以进一步支持上述推测。HES 40 治疗组未见 HES 130/0.4 上述作用,一方面证明低分子量 HES 对 SCI 后 BSCB 破坏可能没有作用,另一方面说明扩容作用不是 HES 130/0.4 影响 SCI 后 BSCB、炎症和损伤水平以下神经病理痛的原因。

综上所述,HES 130/0.4 可以缓解 SCI 后损伤水平以下中枢性疼痛,其原因可能为通过挽救异常通透的 BSCB,抑制损伤区域以巨噬细胞/小胶质细胞活化为代表的炎症反应,并下调 IL-1、IL-6、TNF-α 表达。现有关于 SCI 后 NP 的机制研究多关注腰段脊髓和背根神经的机制[18],本研究提示 HES 130/0.4 减轻损伤水平以下 NP 的机制可能是通过影响损伤节段脊髓的炎症反应,提示损伤水平以下 NP 的发生、发展也可能相关于受损脊髓节段,可补充对该种疼痛的机制认识。由于 SCI 后 NP 的影响因素错综复杂,其具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Gao Y J, Ji R R. Targeting astrocyte signaling for chronic pain[J]. Neurotherapeutics, 2010, 7(4): 482-493.

[2] Zhou L J, Yang T, Wei X, *et al*. Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(2): 322-334.

[3] Wen Y R, Tan P H, Cheng J K, *et al*. Microglia: a promising target for treating neuropathic and postoperative pain, and morphine tolerance [J]. J Formos Med Assoc, 2011, 110(8): 487-494.

[4] Mautes A E, Weinzierl M R, Donovan F, *et al*. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis[J]. Phys Ther, 2000, 80(7): 673-687.

[5] 毛庆祥,杨天德. 阿米替林抑制神经性疼痛大鼠脊髓星形胶质细胞的激活[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 611-614.

[6] Milligan E D, Watkins L R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(1): 23-36.

[7] Maikos J T, Shreiber D I. Immediate damage to the blood-spinal cord barrier due to mechanical trauma[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(3): 492-507.

[8] Feng X, Liu J, Yu M, *et al*. Protective roles of hydroxyethyl starch 130/0.4 in intestinal inflammatory response and survival in rats challenged with polymicrobial sepsis[J]. Clin Chim Acta, 2007, 376(1/2): 60-67.

[9] Klohs J, Steinbrink J, Bourayou R, *et al*. Near-infrared fluorescence imaging with fluorescently labeled albumin: a novel method for non-invasive optical imaging of blood-brain barrier impairment after focal cerebral ischemia in mice[J]. J Neurosci Methods, 2009, 180(1): 126-132.

[10] Hains B C, Waxman S G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2006, 26(16): 4308-4317.

[11] Wu F X, Bian J J, Miao X R, *et al*. Intrathecal siRNA against Toll-like receptor 4 reduces nociception in a rat model of neuropathic pain [J]. Int J Med Sci, 2010, 7(5): 251-259.

[12] Detloff M R, Fisher L C, McGaughy V, *et al*. Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 2008, 212(2): 337-347.

[13] Pan W, Kastin A J. Cytokine transport across the injured blood-spinal cord barrier[J]. Curr Pharm Des, 2008, 14(16): 1620-1624.

[14] Marx G, Pedder S, Smith L, *et al*. Resuscitation from septic shock with capillary leakage: hydroxyethyl starch (130 kd), but not Ringer's solution maintains plasma volume and systemic oxygenation [J]. Shock, 2004, 21(4): 336-341.

[15] Tian J, Lin X, Guan R, *et al*. The effects of hydroxyethyl starch on lung capillary permeability in endotoxic rats and possible mechanisms [J]. Anesth Analg, 2004, 98(3): 768-774.

[16] Prewitt C M, Niesman I R, Kane C J, *et al*. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord[J]. Exp Neurol, 1997, 148(2): 433-443.

[17] Trivedi A, Olivas A D, Noble-Haeusslein L J. Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes[J]. Clin Neurosci Res, 2006, 6(5): 283-292.

[18] 杜璐,张金海,阮怀珍. 炎性痛大鼠脊髓和背根节 P2X3 受体的表达变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 99-102.

(**收稿**:2011-08-07;**修回**:2011-10-08)

(编辑 王 红)