文章编号:1000-5404(2012)17-1719-03

论著

脊髓糖皮质激素受体在神经病理性疼痛中的作用

李 敏,肖菊平,曾俊伟,肖 智,陈远寿,田 虹,刘晓红 (563000 贵州 遵义,遵义医学院基础医学院生理学教研室)

[摘要] **目的** 观察脊髓背角糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)在慢性病理性神经痛中的作用。**方法** 成年SD大鼠分为假手术组、坐骨神经慢性压迫损伤(CCI)组、CCI+生理盐水组、CCI+RU38486治疗组。测定各组大鼠不同时间点热缩足反射潜伏期(TWL);CCI组于术后7、14 d处死大鼠,取L_4~L_6脊髓冰冻切片,应用免疫组织化学方法观察GR表达变化;大鼠蛛网膜下腔埋管,于CCI术后1~14 d鞘内注射生理盐水、GR拮抗剂RU38486,测定其对TWL的影响。**结果** CCI大鼠术后1 d损伤侧下肢TWL即显著降低,到第14天热疼敏仍持续存在;术后7、14 d损伤侧L_4~L_6节段脊髓背角GR表达显著增加($P<0.05$);术后1~14 d鞘内给予GR拮抗剂RU38486可明显减轻CCI所致的热疼敏。**结论** 脊髓背角糖皮质激素受体的激活可促进坐骨神经慢性压迫损伤所致的神经痛的发生和维持。

[关键词] 糖皮质激素受体;神经病理性疼痛;脊髓
[中图法分类号] R322.81; R347.7; R745.42 [文献标志码] A

Role of spinal glucocorticoid receptor in neuropathic pain

Li Min, Xiao Juping, Zeng Junwei, Xiao Zhi, Chen Yuanshou, Tian Hong, Liu Xiaohong (Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of spinal glucocorticoid receptor (GR) in the generation and development of chronic neuropathic pain. **Methods** Healthy adult SD rats were divided into a sham group, a chronic compressive injury of sciatic nerve (CCI) group, a CCI + saline group and a CCI + RU38486 group. The thermal withdrawal latency (TWL) was measured before operation and at 1, 3, 7 and 14 d after operation. The L_{4-6} lumbar segment of spinal cord of the rats in the CCI group was separated for the determination of GR expression by immunohistochemical assay. For the rats of the CCI + saline group and the CCI + RU38486 group, saline and RU38486 (GR antagonist) were intrathecally administered twice a day for 14 d after CCI operation. **Results** TWL decreased at 1 d after CCI operation, and thermal hyperalgesia persisted until the end of the experiment. The immunohistochemical results showed that the expression of GR significantly increased in the ipsilateral dorsal horn at 7 and 14 d after CCI operation. However, the intrathecal administration of RU38486 could significantly suppress the decrease of TWL after CCI operation. **Conclusion** The activation of GR in spinal dorsal horn can promote the pathogenesis of neuropathic pain, suggesting that blocking GR may be a viable therapeutic strategy for neuropathic pain.

[**Key words**] glucocorticoid receptor; neuropathic pain; spinal cord

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30960126, 31000497). Corresponding author: Liu Xiaohong, Tel: 86-852-8609442, E-mail: lxh680718@yahoo.com.cn

糖皮质激素受体(glucocorticoid reccptor,GR)属于核受体超家族成员,是一种激素依赖性转录调节因子。临床常用的糖皮质激素(glucocorticoid,GC)具有抗炎、抑制免疫反应和膜稳定等作用,研究还表明GC参与了痛觉信息的传导。GC可通过降低背根神经节细胞P物质及降钙素基因相关肽的含量而降低初级感觉神经元的兴奋性。我们前期研究[1-2]也发现,在培养的大鼠背根节神经元,GC通过GR激活细胞内蛋白激酶A途径可快速抑制致痛物质ATP诱发的细胞内Ca^{2+}浓度升高和全细胞电流。近年研究[3]发现GR广泛表达于中枢神经系统,在脊髓背角GR与神经元标记物神经元特异核蛋白(NeuN)、星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)共表达,在受到外周伤害性刺激时,脊髓背角表达GR的神经元同时表达c-fos蛋白,表明脊髓伤害性信息传递与脊髓背角表达GR的神经元存在着密切的联系。近来诸多实验研究[4-5]证实GR在神经病理性疼痛时中枢痛敏的形成、发展中发挥重要的作用,但其在神经病理性疼痛中的作用机制尚不十分明确。本研究观察坐骨神经慢性压迫损伤(chronic compressive injury of sciatic nerve,CCI)大鼠脊髓背角GR表达变化以及鞘内注射GR拮抗剂RU38486对神经痛的影响,探讨GR在慢性神经痛中

[基金项目] 国家自然科学基金(30960126, 31000497)
[通信作者] 刘晓红,电话:(0852)8609442, E-mail: lxh680718@yahoo.com.cn

的作用,为后续研究其分子与细胞机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和器材

兔GR抗体、羊抗兔IgG及DAB试剂盒均购自北京中山金桥公司;RU38486为Sigma公司产品,溶于10%乙醇;BME-410C型自动热痛刺激仪为中国医学科学院生物医学工程研究所产品;PE-10导管为美国健康医疗仪器国际公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 健康成年雄性SD大鼠,体质量200~250 g,购自第三军医大学实验动物中心[许可证号SCXK(渝)2007-0005]。大鼠适应环境1周后,在标准清洁级动物实验室内完成实验。SD大鼠分为4组:假手术组、CCI组、CCI+生理盐水组、CCI+RU38486组。假手术组大鼠仅暴露坐骨神经不进行结扎。

1.2.2 鞘内置管 大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠3 ml/kg,麻醉后取俯卧位,在L_3~L_4作长约3 cm的皮肤纵切口,切开该处背棘肌的后筋膜,钝性分离L_4棘突两侧肌肉,切除L_4棘突和邻近椎板,暴露L_4与L_3棘突间隙,以25 G针穿破黄韧带及硬脊膜,可见清亮的脑脊液溢出。经破口处插入PE-10导管2 cm(导管全长15 cm,容量10 μl),18 G硬膜外穿刺针在大鼠皮下穿一隧道,将导管的另一端送至颈背部,外露2 cm固定,外口用打火机封闭,防止脑脊液外溢。术后3 d肌注青霉素抗感染。大鼠清醒后若出现双侧下肢瘫痪,说明存在脊髓损伤,不纳入实验;术后第2天,经PE-10导管注入2%盐酸利多卡因(20 μl),大鼠两后足瘫软,30 min左右恢复,即鞘内置管成功。

1.2.3 CCI模型制作 参照Bennett等[6]的方法建立坐骨神经慢性压迫性损伤模型。大鼠鞘内置管5 d后,腹腔注射1%戊巴比妥钠3 ml/kg,麻醉后俯卧位固定;在股骨外侧上方纵向切开皮肤,顺肌纹钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,用5.0铬制羊肠线轻度结扎左坐骨神经干,共结扎4道,结扎间距约为1 mm;结扎强度以引起小腿肌肉轻度颤动为宜。术后当天肌注青霉素避免感染。假手术组大鼠仅暴露坐骨神经不进行结扎。

1.2.4 鞘内给药 CCI+RU38486组每只大鼠于CCI术后鞘内给予10 μl RU38486溶液(含RU38486 4 μg),再用10 μl生理盐水冲洗导管,2次/d,连续14 d;CCI+生理盐水组每只大鼠注射20 μl生理盐水。

1.2.5 热痛阈测定 热辐射法测定大鼠热缩足潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)。按Hargreaves等[7]的方法,利用BME-410C自动热痛刺激仪的小型聚光灯产生一定强度的光,通过聚焦产生热量,将光辐射焦点对准大鼠足跖底中部,从照射开始至大鼠出现抬腿回避时为TWL。为防止热辐射损伤,光照最长时限定为30 s。连续测3次,每次间隔5 min,取其平均值。热刺激强度在整个实验过程中维持一致。

1.2.6 GR免疫组织化学显色 大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉后迅速开胸暴露心脏,经升主动脉插管,先以400 ml生理盐水冲净血液,随即灌注含4%多聚甲醛的0.01 mol/L PBS 500 ml固定。取腰段脊髓浸入4 ℃ 4%多聚甲醛3 h,随后30%蔗糖多聚甲醛溶液中过夜。脊髓连续冰冻切片,片厚20 μm,置0.01 mol/L PBS中。按照下列步骤进行免疫组织化学显色:0.01 mol/L PBS中漂洗,5min×3次;0.3% H_2O_2封闭,室温30 min;0.01 mol/L PBS中漂洗,5 min×3次;正常山羊血清封闭,室温30 min;滴加兔抗GR抗体(1∶50),37 ℃温箱孵育1 h,然后移至4 ℃冰箱过夜;0.01 mol/L PBS中漂洗,5 min×3次;然后滴加山羊抗兔IgG溶液(1∶100),37 ℃,1 h;0.01 mol/L PBS中漂洗,5 min×3次;DAB显色,室温下显色5~10 min,自然风干后梯度酒精脱水,二甲苯透明,DPX封片。

1.3 统计学处理

免疫组织化学染色标本在光镜(×200)下进行计算机图像分析(IPP 6.0图像分析软件),每组30张切片,根据阳性显色细胞轮廓统计GR阳性细胞数目。数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件行t检验,多组均数间显著性比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠行为学改变

假手术组未出现神经痛表现。大鼠CCI术后出现结扎侧下肢足趾并拢背屈、舔舐、悬空等神经痛表现,但无运动功能障碍。鞘内注射RU38486可减轻结扎侧后足的足趾背屈、舔舐、悬空等自发神经痛行为,而鞘内注射生理盐水对神经痛无缓解作用。

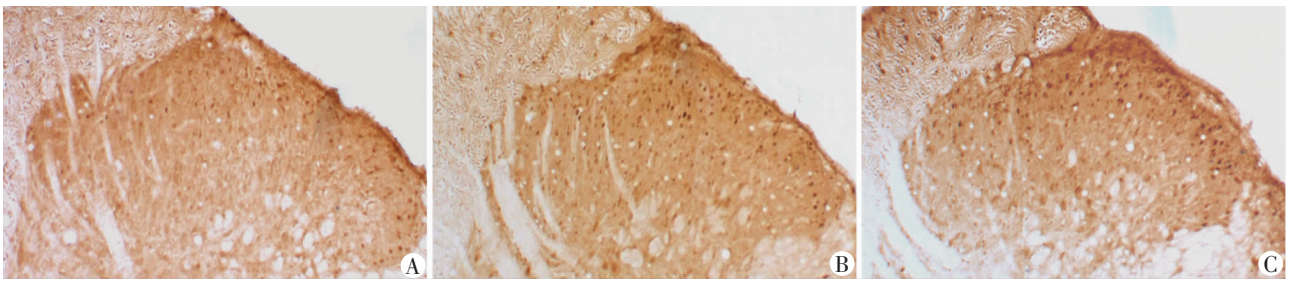
2.2 CCI大鼠脊髓背角GR受体表达的变化

假手术组GR免疫阳性细胞主要位于脊髓背角浅层,从细胞形态显示主要为神经元。与假手术组(65.86±4.53)相比,CCI模型大鼠损伤同侧L_4~L_6节段脊髓背角浅层GR阳性细胞数量在术后7 d(96.67±6.35)和14 d(99.33±7.69)明显增加($P<0.05$,图1)。提示CCI可导致损伤大鼠脊髓背角GR表达增加。

2.3 GR拮抗剂RU38486对CCI所致热痛敏的影响

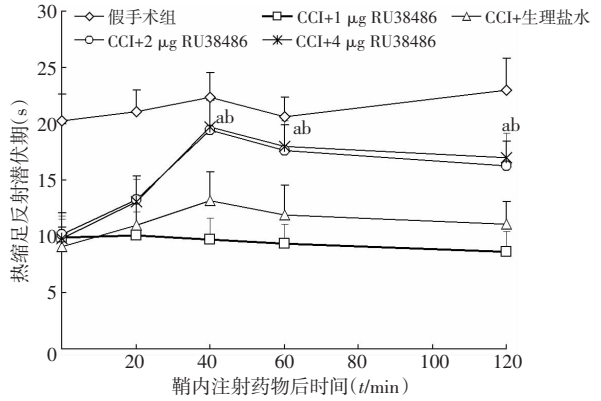
2.3.1 RU38486对CCI大鼠TWL影响的量效和时效关系

在CCI术后第1天,鞘内注射生理盐水、RU38486(1、2、4 μg)前30 min,注射后20 min、40 min、1 h、2 h测定TWL的变化。结果表明,鞘内给予2、4 μg RU38486后40 min可明显延长CCI大鼠TWL,与注射前相比,差异具有统计学意义($P<0.05$);注射RU38486后1、2 h CCI大鼠TWL逐渐下降(图2)。表明RU38486在注射后40 min镇痛效应达高峰。



A:假手术组;B:CCI组CCI术后7 d;C:CCI组CCI术后14 d

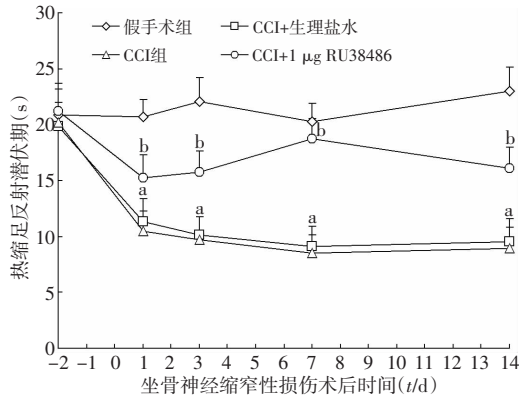
图1 2组大鼠脊髓背角糖皮质激素受体表达的变化 (PV二步法 ×100)



a:$P<0.05$,与同组注射前比较;b:$P<0.05$,与 CCI + 生理盐水组比较

图 2　CCI 大鼠鞘内注射药物后短时程热缩足潜伏期的变化

2.3.2　鞘内注射 RU38486 对 CCI 所致热痛敏的影响　　与假手术组比较,CCI 模型大鼠损伤侧下肢在术后第 1 天即对热刺激敏感,TWL 明显降低($P<0.05$),到 14 d 热疼敏仍持续存在。术后第 1 ~ 14 天鞘内注射 GR 拮抗剂 RU38486 可明显改善 CCI 所致的热痛敏($P<0.05$),而鞘内注射生理盐水对热痛敏无治疗作用。见图 3。



a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与 CCI 组比较

图 3　各组大鼠热缩足反射潜伏期的变化

3　讨论

脊髓背角既是接受外周伤害性信息并向上位脑结构传递的中继站,又是调制伤害性信息传递的脑干下行抑制/易化系统的投射纤维的终止部位,对伤害性信息的传递和调制发挥着重要的作用。研究表明脊髓背角神经元及胶质细胞均表达 GR,那么脊髓背角有可能成为 GR 调节痛觉的重要位点。Wang 等[5]发现,CCI 可致大鼠脊髓背角 GR 表达增加,而摘除肾上腺可显著减轻神经痛症状。与 Wang 等[5]的研究一致,本实验免疫组化结果显示 CCI 可致损伤侧相应节段脊髓背角 GR 表达增加,并且在时间上与神经痛痛敏的发生、发展相一致,提示脊髓背角 GR 表达增加可能与外周神经损伤所致的慢性神经痛的发生、发展密切相关。

RU38486 是糖皮质激素胞浆受体拮抗剂,可阻止糖皮质激素与其胞浆受体的结合。本实验发现鞘内给予 GR 拮抗剂 RU38486 可明显减轻 CCI 所致的神经痛,表明外周神经损伤时脊髓背角 GR 的激活促成了中枢痛敏的发生与维持。目前,神经病理性疼痛与中枢 GR 表达变化的确切关系还不清楚。Wang 等[5]研究发现,CCI 大鼠脊髓白细胞介素-6(IL-6)和蛋白激酶 C-γ 亚型(PKC-γ)水平的升高可能促成了脊髓 GR 的表达增加。可见,在外周神经损伤时,炎性细胞因子可能在中枢 GR 表达变化中起着关键作用。

GR 除在脊髓水平均参与神经病理性疼痛的调制,在脊髓上水平亦可调节伤害性信息的传递[8-10]。Ulrich-Lai 等[8]发现,外周神经损伤可导致大鼠杏仁核 GR 表达增加,表明神经病理性疼痛时伤害性感觉的增强可能与杏仁核 GR 的改变密切相关。此外,杏仁核内给予皮质酮通过作用于 GR 可引发焦虑行为以及躯体痛痛阈的降低,表明在杏仁核 GC 可通过 GR 促进伤害性感觉的增强以及痛情绪反应的产生[9]。

本研究显示,脊髓背角 GR 表达增加促进了 CCI 所致的慢性神经痛的发生、发展,表明中枢 GR 在慢性神经痛的发生中起到重要作用,控制中枢 GR 活性或许能为临床有效治疗慢性神经痛提供新思路。

参考文献:

[1] Liu X H, Zeng J W, Zhao Y D, *et al*. Rapid inhibition of ATP-induced currents by corticosterone in rat dorsal root ganglion neurons [J]. Pharmacology, 2008, 82(2): 164 - 170.

[2] 刘晓红, 曾俊伟, 肖智, 等. 地塞米松快速抑制大鼠背根神经节细胞中 ATP 所致的钙升高[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (14): 1329 - 1332.

[3] Mao J. Central glucocorticoid receptor: a new role in the cellular mechanisms of neuropathic pain[J]. Rev Neurosci, 2005, 16(3): 233 - 238.

[4] Alexander J K, DeVries A C, Kigerl K A, *et al*. Stress exacerbates neuropathic pain *via* glucocorticoid and NMDA receptor activation[J]. Brain Behav Immun, 2009, 23(6): 851 - 860.

[5] Wang S, Lim G, Zeng Q, *et al*. Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury[J]. J Neurosci, 2005, 25(2): 488 - 495.

[6] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33(1): 87 - 107.

[7] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al*. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. Pain, 1988, 32(1): 77 - 88.

[8] Ulrich-Lai Y M, Xie W, Meij J T, *et al*. Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain[J]. Physiol Behav, 2006, 88(1/2): 67 - 76.

[9] Myers B, Greenwood-Van-Meerveld B. Divergent effects of amygdala glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the regulation of visceral and somatic pain[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(2): G295 - G303.

[10] Capasso A, Loizzo A. Functional interference of dexamethasone on some morphine effects: hypothesis for the steroid-opioid interaction [J]. Recent Pat CNS Drug Discov, 2008, 3(2): 138 - 150.

(**收稿**:2012-02-12;**修回**:2012-03-30)

(编辑　王小寒)