硬膜外应用虎纹镇痛肽-I 对自体神经移植大鼠脊髓背角 c-fos 表达的影响

邓波荣[1]，邬 明[2]（1. 解放军第 161 医院心胸外科，湖北 武汉 430010；2. 广州军区武汉总医院急诊科，湖北 武汉 430070）

［摘 要］ **目的** 通过观察硬膜外给予虎纹镇痛肽-I 对大鼠自体神经移植模型机械痛阈与脊髓背角 c-fos 表达的影响，探讨虎纹镇痛肽-I 对再生神经神经性疼痛的影响。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 60 只随机分成 A、B、C 组，A 组为自体神经移植模型组；B 组为自体神经移植模型加虎纹镇痛肽-I 治疗组；C 组为假手术组。分别制成模型后，术后 27 d 起检测机械刺激阈值及 c-fos 表达计数。**结果** A、B 组各项指标与 C 组比较有显著差异；A 组与 B 组比较 c-fos 表达阳性细胞计数及机械痛阈均有显著差异。**结论** 虎纹镇痛肽-I 能有效减轻再生神经的神经性疼痛程度，促进神经的完善修复。

［关键词］ 周围神经损伤；神经再生；神经性疼痛；c-fos；虎纹镇痛肽-I

［中图分类号］ R651.3 ［文献标识码］ A ［文章编号］ 1672-5042(2010)04-0298-03

Influence of applying huwena analegesic peptide-I on c-fos expression of the dosal spinal horn in nerve autograft rat model

DENG Bo-rong, WU Ming (Department of Cardiothoracic Surgery, 161st Hospital of PLA, Wuhan Hubei 430010, China)

Abstract: Objectives To investigate the influence of huwena analegesic peptide-I (HWAP-I) on neuropathic pain of the regeneration nerve by observing the machinery pain threshold and c-fos expression in sciatic nerve autograft rat model after applying HWAP-I epidurally. **Methods** Totally 60 male Wistar rats were randomly divided into three groups: sciatic nerve autograft group (group A), sciatic nerve autograft with treatment of HWAP-I group (group B) and sham group (group C). The machinery pain threshold and c-fos expression were measured 27 days after the operation. **Results** All indicators in group A and B were significantly different from those in group C. Remarkable differences in machinery pain threshold and c-fos expression were also existed between group A and B. **Conclusions** Appling HWAP-I epidurally can significantly alleviate neuropathic pain of the regeneration nerve and promote its recovery.

Keywords: peripheral nerve injury; regeneration; neuropathic pain; c-fos; HWAP-I

虎纹镇痛肽-I(huwena analgesic peptide-I, HWAP-I)是从珍稀毒蜘蛛虎纹捕鸟蛛粗毒中分离纯化的一种多肽类神经毒素，由 33 个氨基酸构成，是一种作用于突触前膜的 N-型钙离子通道阻断剂，无成瘾性，可阻断中枢的痛觉传导[1-2]。本实验通过观察硬膜外应用虎纹镇痛肽-I 对大鼠坐骨神经自体神经移植模型的机械刺激阈值和脊髓背角 c-fos 表达的影响，探讨虎纹镇痛肽-I 对外周神经再生中神经性疼痛的影响。

1 材料与方法

1.1 分组及模型制备

雄性 Wistar 大鼠 60 只(解放军武汉总医院动物实验中心提供)，体重 180～200 g，随机分成 A、B、C 组。A 组为坐骨神经自体神经移植模型组；B 组为坐骨神经自体神经移植模型加虎纹镇痛肽-I 治疗组；C 组为假手术组。所有大鼠均在标准条件下(标准温度、湿度、12 h 明暗周期，可自由摄食摄水)饲养。首先对 B 组行硬膜外插管，切开大鼠颈后部皮肤，依次分离肌层，暴露出寰枕膜，用五号针挑开寰枕膜与第一颈椎之间的筋膜，但不挑破寰枕膜，然后将 PE-10 聚乙烯管插入硬膜外腔，插入深度为 7 cm，到达脊髓腰膨大水平。在管的中段预先用封口膜缠一小结球以确定插入深度，缝合小球固定在颈背肌，通过留在外面的 PE-10 进行给药[3]。B 组观察 1 周后，三组大鼠行坐骨神经自体神经移植模型制备。1% 硫喷妥钠 5～7 mg/kg 腹腔注射麻醉后，大鼠俯卧，右股后外侧纵行切口，自肌间隙进入，分离出右侧坐骨神经，于坐骨神经中段、胫神经和腓总神经分叉近端操作。A 组及 B 组分离出右侧坐骨神经后于坐骨神经中段，胫神经和腓总神经分叉近端切取神经 10 mm，即用 9/0 无创伤缝线显微镜下行原位神经移植；C 组坐骨神经仅于空气中暴露 5 min 后，还复至原位，术毕逐层关闭切口。所有手术操作均在 SXP-1 型显微镜(上海医用光学仪器厂生产)下进行。术后常规注射青霉素抗炎治疗，分笼饲养。B 组模型制备术后 6 h 起每天硬膜外给予 HWAP-I 50 μg/kg，持续 1 周。

1.2 机械痛阈测试

模型制备术后 27 d 起，进行不同强度的 Von Frey 丝痛阈测试，每 3 d 测定 1 次，每组每次随机挑选 5 只大鼠，由患肢 2、3 跖趾间皮肤敏感处进行测试，每根 Von Frey 丝重复 5 次，每次间隔 2 s，出现 3 次以上的缩爪反应，记为该足 1 次机械痛阈值。

［基金项目］ 湖北省卫生厅科研基金资助项目(JX2B45)

［作者简介］ 邓波荣(1975－)，男，湖北省仙桃市人，主治医师，硕士，主要从事周围神经损伤与修复方面的研究。电话：(027) 50169085，E-mail：dengyang1629@sina.com

［收稿日期］ 2010-04-07 ［修回日期］ 2010-05-15

各大鼠左右足轮流测试,每足测试5次,各取其平均值,为其机械痛阈值。术前各组均测定机械痛阈值。

1.3 c-fos 检测

各组大鼠术后27 d起每6 d检测,每组测痛剩余大鼠中随机挑选5只大鼠,患侧足底均给予轻柔触摸刺激,3 h后予腹腔注射1%硫喷妥钠10~15 mg/kg深麻醉后,心脏灌注生理盐水,再以4%多聚甲醛300 mL心内灌注固定。取脊髓L_4~L_6节段,置于相同固定液中固定24 h,石蜡包埋、切片,以免疫组织化学SP法检测c-fos表达。显微镜下观察fos阳性反应性神经原个数。每只大鼠取5张fos蛋白表达最多的切片,对术侧脊髓背角Ⅰ~Ⅱ层fos蛋白阳性表达细胞进行计数统计。

1.4 统计学处理

用SPSS 11.0软件进行统计分析,所有计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对t检验,组间采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

术前各组机械刺激阈值无差异。A、B组术后均表现为右后肢拖行,右后肢肌肉萎缩及关节僵硬;C组大鼠术后右足承重基本恢复。

2.1 机械痛阈测定

A、B两组术后机械痛阈与基础痛阈比较均有显著差异,$P<0.05$。A、B两组机械痛阈与C组比较均有显著差异,$P<0.05$。C组机械痛阈与基础痛阈比较无差异,$P>0.05$。A组术后45 d机械痛阈与27 d比较显著升高,$P<0.05$。B组术后45 d机械痛阈与27 d比较显著升高,$P<0.05$。B组机械痛阈较A组低,$P<0.05$。见表1。

表1 机械刺激退缩阈值($\bar{x} \pm s$, g)

组别	术前	术后						
		27 d	30 d	33 d	36 d	39 d	42 d	45 d
A组	16.7±3.4	13.4±1.2	6.3±3.0	6.0±3.7	7.3±2.4	9.6±1.6	11.2±3.4	12.5±2.9*
B组	17.4±2.6	10.3±1.2$^{\Delta}$	10.5±1.0	11.5±1.2	12.3±1.1	13.6±1.7	14.5±2.9	15.7±2.8$^{\#\Delta}$
C组	17.6±2.3	18.9±4.5	19.3±5.6	20.0±7.3	19.8±5.7	20.3±4.5	20.6±5.1	21.0±5.7

*:与A组27 d比较,$P<0.05$;#:与B组27 d比较,$P<0.05$;Δ:与A组相同时间点比较,$P<0.05$

2.2 fos蛋白阳性细胞计数

A、B组计数与C组比较均有显著差异,$P<0.05$。A组组内比较,术后45 d和27 d的计数比较有统计学差异,$P<0.05$。B组组内比较,随时间进展fos蛋白阳性细胞计数有下降趋势,但45 d和27 d的计数比较无统计学差异,$P>0.05$。A、B组间比较fos蛋白阳性细胞计数差异显著,$P<0.05$。见表2。

表2 脊髓背角c-fos表达阳性细胞计数($\bar{x} \pm s$)

组别	27 d	33 d	39 d	45 d
A组	16.7±3.2	16.0±2.8	15.6±2.1	12.3±1.7*
B组	9.8±1.8$^{\Delta}$	10.3±1.2$^{\Delta}$	9.7±1.6$^{\Delta}$	8.9±1.9$^{\#\Delta}$
C组	3.0±1.0	3.2±1.1	3.3±1.2	3.0±0.9

*:与A组27 d比较,$P<0.05$;#:与B组27 d比较,$P>0.05$;Δ:与A组相同时间点比较,$P<0.05$

3 讨论

坐骨神经自体神经移植模型再生神经生长进入去神经支配区域时,触觉可诱发疼痛和脊髓背角浅层c-fos表达及疼痛相关行为。重复触觉刺激引起脊髓背角浅层c-fos表达明显增高和机械痛阈稳定和明显的降低,说明被损神经再次支配靶器官,但感觉功能没有正常恢复。伴随着感觉功能恢复,动物表现出机械痛觉超敏状态[4-7]。而本实验结果表明应用虎纹镇痛肽-I组fos表达阳性细胞数及机械刺激退缩阈值均有显著差异,显示应用虎纹镇痛肽-I能明显减轻再生神经的神经性疼痛。

神经元钙通道的主要作用是调控去极化诱导的Ca^{2+}内流。Ca^{2+}内流可以触发细胞内Ca^{2+}依赖的一系列生理反应,包括神经元兴奋性的调节、神经递质释放、激活第二信使和基因转录等[8]。其功能主要为触发神经递质释放,这些物质包括:谷氨酸、乙酰胆碱、去甲肾上腺素、多巴胺、γ-氨基丁酸、P物质及降钙素基因相关肽等,其中谷氨酸和P物质与疼痛关系最为密切。谷氨酸作用于突触后膜NMDA、AMPA、海藻酸受体及代谢型谷氨酸受体,P物质作用于突触后膜神经激肽-1受体,通过开放偶联的阳离子通道,以及G蛋白、蛋白激酶C、一氧化氮、Ca^{2+}等参与的一系列胞内信号转导过程,介导痛觉通路的兴奋性突触传递,从而将外周伤害性信息传入高位中枢,产生痛觉。

N-型钙通道主要分布于疼痛传递与调控通路的神经元突触末梢[9],但在背根神经细胞以及脊髓背角神经的突触末梢分布最为密集。这些初级传入神经(主要是C纤维和A-δ纤维)在感受各种伤害性疼痛刺激包括热伤害、机械伤害以及炎性疼痛刺激中具有重要作用。研究表明,阻断N-型钙通道后对急性热疼痛效果不明显,而对炎症性和慢性神经病理性疼痛效果较明显[10]。

研究发现轴突再生中可能发生形态学和基因表达变化[11-12]，外周神经损伤后功能可能不是恢复为正常，而是表现出功能和结构上的改变，并在再生过程中持续下来。本实验表明硬膜外应用虎纹镇痛肽-I能有效减轻再生神经的神经性疼痛，促进再生神经功能的完善与恢复，其对外周神经损伤的神经功能和结构影响的具体机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 蒋兴凯，陈 蕾，马 冲，等. N-型钙通道及其阻断剂研究进展[J]. 国外医学·药学分册，2007，34(2)：93-98.

[2] 刘嘉勤，陈威华，邓梅春，等. 虎纹蜘蛛毒素-I对大鼠急性内脏疼痛的抑制性效应及与ω-芋螺毒素的比较研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2005，21(1)：24-29.

[3] 廖 智，戴舒佳，刘秀文，等. 大鼠硬膜外和静脉注射虎纹毒素-I后的组织分布[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2003，17(2)：146-150.

[4] 邬 明，陈 谦，唐忠志，等. 大鼠坐骨神经PDLLA/NGF套管模型脊髓背角c-fos表达的研究[J]. 华南国防医学杂志，2009，23(1)：11-14.

[5] 邬 明，陈 谦，唐忠志，等. 坐骨神经挤压模型大鼠脊髓背角c-fos表达的研究[J]. 解放军医学杂志，2008，33(8)：974-976.

[6] 邬 明，陈 谦，唐忠志，等. 大鼠自体神经移植模型脊髓背角c-fos表达的研究[J]. 实用医学杂志，2008，10(19)：3296-3298.

[7] 周秋雯，徐建国. 慢性疼痛动物模型的研究进展[J]. 医学研究生学报，2008，6(21)：638-642.

[8] Miller RJ. Rocking and rolling with Ca^{2+} channels[J]. Trends Neurosci, 2001, 24(8): 445-449.

[9] Bell TJ, Thaler C, Castiglioni AJ, et al. Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway[J]. Neuron, 2004, 41(1): 127-138.

[10] Vanegas H, Schaible H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia[J]. Pain, 2000, 85(1-2): 9-18.

[11] Shinder V, Govrin-Lippmann R, Cohen S, et al. Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury[J]. J Neurocytol, 1999, 28(1): 743-761.

[12] Zhong J, Dietzel ID, Wahle P, et al. Sensory impairment and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice[J]. Neurosci, 1999, 19(2): 4305-4313.

（编辑：余汇洋）

·个案与短篇·

耳鼻喉手术体位垫的制作

陈 瑶，聂智荣 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所手术室，重庆 400042）

[关键词]耳鼻喉手术；体位垫；制作
[中图分类号]R472.5 [文献标识码]B [文章编号]1672-5042(2010)04-0300-01

手术中体位垫的作用十分重要，它是手术室护理工作的重要器材之一。舒适的体位可以减轻患者的痛苦，合格的体位可以使手术野充分暴露，使手术医生顺利进行手术操作，反之可能引起生理或解剖并发症。我科自行设计了耳鼻喉手术中固定头颈部两侧的体位垫，应用于30例手术患者，在使用中得到了护理人员和患者的双重认可，现将制作方法介绍如下。

1 制作方法

保留前列腺手术、关节镜手术中使用过的冲洗液袋或3 L袋若干，装入不等量的水（自来水即可），注入亚甲蓝液以区别于未使用过的无菌冲洗液。用明火烧灼等简易方法对开口处进行封闭，制成重量、大小不等的水袋备用。

2 使用方法

麻醉成功后，于患者胸背部垫胸垫，颈部垫大小适宜的颈垫，防止颈椎受伤，然后根据手术患者的身高、体重及不同手术部位选择合适大小的体位垫，将体位垫放于头颈部两侧，固定头部，防止头部偏移，影响手术操作，最后将所有的床单整理平整，防止压伤皮肤。需注意的是每个水袋的使用不宜超过50次，以免封闭处开裂。

3 优点

使用自制的体位垫后护理人员反应使用方便、术中安全、患者无不适感。此体位垫防水性好，血迹或引流液等不会渗透到体位垫内部，可有效避免交叉感染，且制作成本低廉，感染手术使用过后可直接丢弃。同时还消除了手术环境污染的隐患，取代传统咽喉部手术中固定头颈部两侧所使用的沙袋，可避免沙袋使用过程中因洒漏而造成的手术环境污染。使用过后便于清洁，将用过的体位垫进行常规消毒（用消毒液擦拭体位垫表面），使手术患者在接触体位垫时，避免受到先行手术患者体液和血液的污染，减少术中感染机会，有利于保证手术治疗的效果。

[收稿日期]2010-03-01 [修回日期]2010-04-03

（编辑：朱志立）