论 著 文章编号:0253-3626(2008)12-1414-04

腹腔神经节毁损对胃扩张兔脊髓 P 物质表达的影响

曾令全[1],魏安宁[2],王智彪[1],杜永洪[1],李崇燕[1],傅 洪[2]
(1. 重庆医科大学生物医学工程系,医学超声工程研究所,重庆 400016;
2. 重庆医科大学附属第二医院麻醉科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察高强度聚焦超声毁损兔腹腔神经节(Celiac ganglion,CG)对胃扩张兔脊髓 P 物质(Substance P,SP)表达的影响,探讨 SP 是否也参与内脏痛的传递。方法:按 2×2 析因设计,将新西兰大白兔 20 只,随机分为 4 组:非扩张非毁损组(nDnB)、扩张非毁损组(DnB)、非扩张毁损组(nDB)、扩张毁损组(DB),每组各 5 只。DB、nDB 组用 HIFU 毁损神经节,nDnB、DnB 组假手术,术后 7 d,安置胃扩张装置。安置后 7 d, nDB、nDnB 组在麻醉下灌注固定取胸段 6~8(T_6~T_8)脊髓,DB 和 DnB 组在扩张胃 1 h 后,灌注固定取脊髓。用免疫组织化学方法检测脊髓后角 SP 光密度(Optical density,OD)。结果:在后角Ⅰ、Ⅱ层内,毁损 CG 使中间区及其后根投射纤维内的 OD 增加(P<0.01),胃扩张后使内、外侧区的 OD 增加(P<0.01),毁损 CG 后,胃扩张使后角Ⅰ、Ⅱ层的内、外侧区 OD 增加值下降(P<0.01)。结论:胃扩张会引起胸段脊髓后角 SP 的表达明显增加;毁损 CG 使胃扩张引起的增加值下降。

【关键词】腹腔神经节;P 物质;脊髓;胃扩张;疼痛
【中国图书分类法分类号】R441.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-07

Effects of celiac ganglion damage on expression of substance P in spinal cord of gastric distension rabbits

ZENG Ling-quan, et al
(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the influence of damaging celiac ganglion(CG) by high intensity focused ultrasound(HIFU)on expression of substance P(SP) in spinal cord following gastric distension in rabbits, and study whether SP participate in transferring pain information as neurotransmitter. *Mothods*: 20 rabbits were randomly divided into four groups in a 2×2 factorial design: not distended not damaged(nDnB), distended not damaged(DnB), not distendedly damaged(nDB), distendedly damaged(DB), with 5 in each group. At first, group nDB and DB were damaged by HIFU, group nDnB and DnB not damaged. 7 days later, they all were installed with the device of gastric distension. In group nDB and nDnB, tissue were directly fixed through infusing 4% parafomaldehyde under deep anaesthesia, then spinal cord of thoracic 6~8 (T_6~T_8) was extracted. In group DB and DnB stomach was distended for 1 h, and the spinal cord were extracted in the way similar to that in the above two groups. Immunohistochemistry technique of strept avidin biotin complex(SABC)was used to display the content of SP in spinal cord. *Results*: In lamina and Ⅱ of dorsal horn, damaged CG could induce the OD in afferent projections and medial zone to increas significantly(P<0.01). Gastric distension could induce the OD in lateral zone to increase significantly(P<0.01). After CG was damaged, the increase of OD in lateral zone significantly descended(P<0.01). *Conclusion*: Gastric distension could induce the expressionof SP in thoracic slices to increase significantly. After CG is damaged, that increase induced by gastric distension in lateral zone lamina Ⅰ and Ⅱ of dorsal horn significantly descends.

【Key words】Celiac ganglion; Substance P; Spinal cord; Gastric distension; Pain

P 物质(Substance P,SP)作为一种神经递质,在脊髓参与痛觉传递。对躯体神经系统的研究表明,阻断传导的神经后,外周伤害性刺激所导致脊髓内的 SP 增加水平下降[1]。本实验运用实验兔胃扩张疼痛模型[2],以及高强度聚焦超声对腹腔神经节(Celiac ganglion,CG)的阻滞作用[3],来观察 CG 毁损对胃扩张兔脊髓 SP 表达的影响,探讨 SP 是否也参与内脏痛的传递。

作者介绍:曾令全(1972 -),男,硕士,主治医师,研究方向:顽固性疼痛的治疗。

基金项目:国家杰出青年基金(NO.30325027)、教育部创新团队项目(教计函[2005]33 号)资助。

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 只新西兰大白兔（由重庆医科大学动物中心提供）雌雄不拘，体重 1.6～2.65 kg，年龄 5～10 月。

1.2 海极星牌 CZF 型超声波治疗仪

重庆医科大学超声研究所研制，由功率源、治疗头、循环脱气水系统组成。电功率 0~5 W，聚焦治疗头发出的声波的频率为 9.8 MHz，焦距为 1.0 mm，焦域为 1.5 mm×1.0 mm×2.0 mm。

1.3 自制胃扩张器

同以前实验[2]，简单描述如下：采用去针头的输液器管，在输液器管尖端刺数孔，将部分避孕套扎管上。每具扩张器的压力测试，基础压：在注入 50 ml 后压力升高到 10 mmHg，以后随注入气体的增加，压力恒定不变，在 500 ml 内，注入相同气体，压力差异在 ± 1 mmHg 之内。

1.4 动物分组及处理

同以前实验[4]，简单描述如下：按 2×2 析因设计，将 20 只兔随机分为 4 组，即非扩张非毁损组（nDnB）、扩张非毁损组（DnB）、非扩张毁损组（nDB）、扩张毁损组（DB），每组各 5 只。用速眠新麻醉试验动物，取上腹部正中切口，长约 5 cm，将肠管移向一侧，用玻璃针挑开后腹膜，以左侧肾上腺为标志，寻找 CG。对 DB 和 nDB 组用 HIFU 治疗头（25 W/cm^2，10 s）对准其照射，见 CG 发白为止。对 nDnB 和 DnB 组不照射，术后 7 d 均在麻醉下，安置胃扩张器，安置后 7 d，进行胃扩张实验。nDnB 组和 nDB 组直接在麻醉后灌注固定取胸段 6~8（T_6~T_8），DnB 组和 DB 组在清醒状态下梯度扩张胃，BL-410 生物机能实验系统（成都泰盟公司生产）连续记录压力变化。每次扩张的最大极限为兔出现挣扎反应，在每一最大容积下维持 10 min，间歇 2 min。然后同前两组一样灌注固定取脊髓。另取 4 只兔，解剖暴露 CG，随机抽取 2 只为试验组，用 HIFU 治疗头（25 W/cm^2，10 s）对准其照射，另 2 为正常对照组，对 CG 只进行假照，4 h 后用玻璃分针取 CG 行 HE 染色作光镜观察。

1.5 脊髓标本的固定及制备

在灌注固定前深度麻醉动物，经左心室插管至升主动脉，先快速灌注生理盐水 1 000 ml，再以 2 000~2 500 ml 含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（PB，pH7.4，4℃）灌注固定，时间 60 min。取脊髓胸段 6~8（T_6~T_8）。经标记后放入相同固定液中固定 18~24 h，常规脱水、透明、石蜡包埋。

1.6 药品和试剂

兔抗 P 物质（SANTA CRUZ 公司产品），生物素标记的羊抗兔 IgG、SABC 复合物和 DAB 购自武汉博士德生物工程公司。

1.7 SP 免疫组化染色（SABC 法）

用石蜡切片机制备连续横切片，片厚 4 mm。粘贴于预先涂有 0.1% 多聚赖氨酸的玻片上，37℃温箱烘干备用。用 SABC 法进行免疫组化反应。简要过程如下：（1）切片脱蜡至水；（2）3% 双氧水封闭 20 min；（3）3% 正常山羊血清孵育 30 min；（4）兔抗 SP 血清 4℃湿盒中孵育 18~20 h；（5）生物素化羊抗兔 IgG 室温 45 min；（6）SABC 复合物室温 45 min；以上各步骤之间均用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（Phosphate-buffered saline，PBS，pH7.4）洗 5 min × 3 次。最后用新鲜配制的 0.05% DAB 显色 5~7 min，镜下控制显色程度。常规梯度酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。阴性对照：每次染色均设空白对照（PBS 取代一抗）和替代对照（正常山羊血清取代一抗）。染色结果用 Olympus BX50 显微镜观察并摄片。

1.8 检测方法

每只动物随机取脊髓胸段切片各 3 张行 SP 染色。结果用成都泰盟公司的图像分析仪的免疫组织化学图象分析软件包，检测脊髓背角Ⅰ、Ⅱ层内 SP 免疫反应阳性纤维及其终末的光密度（Opticat density，OD）值。在同一标准框下测每个背角Ⅰ、Ⅱ层内 SP 免疫阳性染色区域，可分为外侧区、中间区、内侧区、后根投射区，分别测定这 4 个区域的 OD 值。

1.9 统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SAS8.1.0.9 统计软件包分析，对 SP 变化作析因设计方差分析，$P<0.05$ 为差异有显著性。

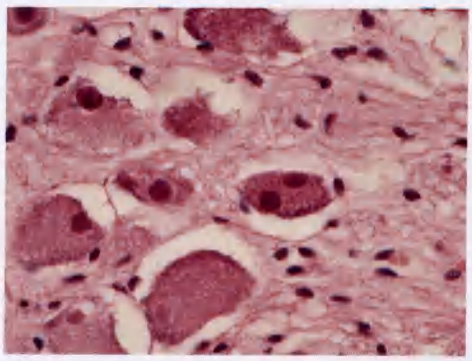
2 结 果

2.1 神经节的形态结构改变

试验组在 HIFU 治疗后 CG 间质水肿；神经元核缩小，染色加深，尼氏体变细，胞核偏位，核仁消失；卫星细胞缩小，核浓缩；大空泡形成等改变，见图 1。而正常对照组的神经元清晰可见核大而圆，核仁明显，胞质可见尼氏体，见图 2。

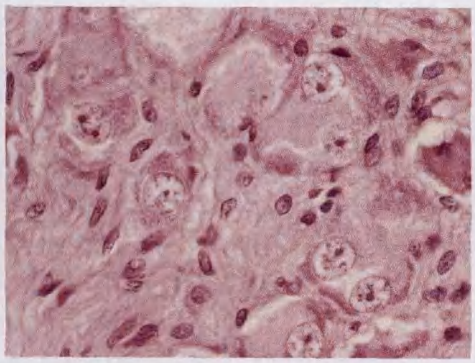
2.2 脊髓 SP 含量的变化

光镜下 SP 免疫阳性反应均集中分布于脊髓背角Ⅰ、Ⅱ层，呈棕黄色颗粒状、索状和串珠状分布。背景呈淡黄色。nDB 组 SP 主要分布在中间区及其后根投射纤维内，DnB 组 SP 主要分布在Ⅰ、Ⅱ层内、外侧区，DB 组 SP 各区均有分布。免疫染色所进行的对照实验均呈阴性反应。见图 3~6。



所有的神经元细胞出现核仁消失或模糊，核缩小，染色加深，胞核偏位，有大空泡形成

图 1 CG HE 染色（×1 000）



神经元清晰可见核大而圆,核仁明显,胞质可见尼氏体

图 2 正常 CG HE 染色(×1 000)



脊髓胸段 SP 免疫阳性反应物呈淡黄色颗粒状、索状分布,着色浅,颗粒少

图 3 nDnB 组(×400)

2.3 各组 OD 比较

采用用 SAS 分析软件中 GLM 过程的分析方法，进行了二因素二水平析因设计的方差分析,其结果如下。

2.3.1 脊髓后角内、外侧区 单独效应:毁损 CG 使 OD 增加($P<0.05$),胃扩张使 OD 有明显增加($P<0.01$),毁损 CG 与胃扩张存在交互作用($P<0.01$),毁损与胃扩张对脊髓 OD 存在拮抗作用。见表 1。

2.3.2 脊髓后角中间区及其后根投射纤维内单独效应 毁损 CG 使 OD 明显增加($P<0.01$),胃扩张使 OD 明显增加($P<0.01$),毁损 CG 与胃扩张不存在交互作用($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组脊髓 SP 免疫反应阳性产物的 OD 值($n=15, \bar{x}\pm s$)

组别	内、外侧区	中间区及其后根投射纤维内
nDnB	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.02
nDB	0.21 ± 0.04	0.23 ± 0.03
DnB	0.25 ± 0.03	0.21 ± 0.05
DB	0.24 ± 0.03	0.25 ± 0.03
FD	52.15**	11.15**
FB	4.91*	34.49**
F 交互	22.78**	3.44

注:析因分析,*$P<0.05$;**$P<0.01$



脊髓胸段 SP 免疫阳性反应呈深黄色颗粒状、索状分布在中间区及后根投射纤维内,着色深,颗粒多

图 4 nDB 组(×400)



脊髓胸段 SP 免疫阳性反应物呈棕黄色颗粒状、索状和串珠状分布在内、外侧区,着色较深,颗粒较多

图 5 DnB 组(×400)

3 讨 论

内脏痛及其机制的研究一直是疼痛领域的难点。我们通过建立实验兔的胃扩张疼痛模型[2],进行了兔的行为学反应和电生理方面的研究[5],证实内脏的疼痛信息是通过内脏传入神经传导到脊髓。本实验进一步运用此模型来研究 CG 毁损对胃扩张引起的脊髓 SP 的改变的影响,探讨 SP 是否也参与内脏痛的传递。

本实验观察到毁损 CG 会导致脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层各区和感觉神经根内 SP 明显增加。其原因可能为 CG 损伤后,脊髓后角或背根神经节(DRG)内 SP 产生增多,向外周运输。外周的 SP 具有抗神经损伤的作用,既可作为神经营养剂刺激受损的神经元生长,轴突分支增加,末梢发育,也可防止受损的神经退化和刺激其再生。SP 是感觉神经元生长、发育、成熟的标志[6,7]。周跃等[8]用放射免疫法测定健康家兔脊神经节损伤后 1~4 周,DRG 和脊髓后角 SP 含量的变化，发现术后脊髓中 SP 含量在伤侧较术前和非伤侧显著性增高($P<0.05$),尤以术后 2~4 周变化



脊髓胸段 SP 免疫阳性反应物呈呈棕黄色颗粒状、索状和串珠状分布在各区，着色较深颗粒较多

图 6　DB 组（×400）

最显著。

本实验还观察到胃扩张会引起胸段脊髓后角 SP 的显著增高。据研究过度胃扩张是一种伤害性刺激，其引起的不适和疼痛是由胃内的高阈机械感觉纤维介导，高阈机械感觉纤维兴奋的阈值为膨胀压≥30 mmHg[9]。我们在以往的实验中已经观察到兔出现拟痛行为反应的压力：DnB 组为 40.47 mmHg，DB 组为 83.12 mmHg[2]。因此本实验中当兔出现拟痛行为反应，胃扩张成为是一种伤害性刺激。SP 在极度疼痛下释放，感觉异常（一种疼痛的低阈值）则不会引起变化[10]。Traub 等[11]观察到在结肠损伤后 72 h 内 SP 和降钙素基因相关肽（Calcitonin gene-related peptide，CGRP）在结肠和脊髓内释放，神经节内含肽细胞体减少，证明 SP 是由神经节细胞产生后向脊髓和远端运输的。

损伤 CG 与胃扩张后脊髓内 SP 表达区域不同，可能是因为脊髓内介导疼痛和调制神经损伤反应的神经元分布不同。调制神经损伤反应的神经元主要位于脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层的中间区，CG 毁损后，大量的SP 通过后根持续向 CG 方向运输。介导疼痛的神经元位于脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层的内、外侧区，胃扩张时由 CG 释放和自身产生的 SP 都集中于此区域内。

本实验还观察到在 CG 毁损后，再行胃扩张，脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层的内、外侧区 SP 仍有增加，但增加值下降。仍有增加的原因可能是：小部分感觉神经纤维未通过 CG，而是通过其它途径向上传导的。研究表明，交感干神经节、内脏神经节、腹腔神经节、肾上腺神经节以及与这些交感干神经节相对应的脊神经节，都有神经纤维分布于腺胃和肌胃，这些神经纤维是行经内脏神经、腹腔神经丛、肾上腺神经丛、肠系膜前神经丛和肝神经达到腺胃和肌胃的。增加值下降的原因：一、主要因为 CG 毁损后，SP 产生减少，传入通路被阻断，向脊髓运输的 SP 相应减少；二、可能与毁损后，通过迷走神经的传入增加。下丘脑向下发放抑制性冲动，来维持平衡状态。Kang 等[12]采用颈部迷走神经单根神经纤维电活动记录技术，发现在热，盐酸等炎性刺激下，对机械性胃扩张敏感的 C 纤维电活动增加。有研究表明在 CG 毁损后，胃肠道的抗炎能力下降。本实验中胃内置入了扩张器，在 CG 毁损后可能会引起轻微炎性反应，导致胃机械扩张时迷走神经的传入增加。

总之，本实验观察到急性胃扩张会引起胸段脊髓后角 SP 的显著增高，SP 主要分布在脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层的内、外侧区，毁损 CG 后，胃扩张使脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层的内、外侧区的 SP 增加值下降，提示 SP 作为神经递质在脊髓后角Ⅰ、Ⅱ层的内、外侧区参与内脏疼痛信息的传递。

（致谢：感谢超声医疗国家工程研究中心提供资助！）

参 考 文 献

[1] 关景芳，聂　卫，王　理，等.利多卡因对致痛大鼠 L_{4-5} 脊髓 P 物质分布影响的实验研究[J]. 河北医药，2003，25(9)：643-644.

[2] 曾令全，魏安宁，傅　洪，等. 实验兔胃扩张疼痛模型的建立及其机制[J]. 中国疼痛医学杂志，2006，12(4)：234-247.

[3] 曾令全，魏安宁，傅　洪，等. 高强度聚焦超声毁损兔腹腔神经节的效果[J]. 中华麻醉学杂志，2006，26(5)：425-427.

[4] 曾令全，魏安宁，傅　洪，等.腹腔神经节毁损对胃扩张兔脊髓 c-fos 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报，2007，32(4)：344-347.

[5] 曾令全，魏安宁，傅　洪，等.高强度聚焦超声和乙醇阻滞腹腔神经节对内脏大神经放电的影响[J]. 重庆医科大学学报，2006，31(2)：141-144.

[6] 虞　琴. P 物质与神经系统[J]. 宜春学院学报（自然科学），2006，28(4)：86-88.

[7] 李晓光，高慎强，孙惠清.单侧咀嚼大鼠颞颌关节内 P 物质表达[J]. 重庆医学，2007，36(9)：826-828.

[8] Sulaiman H，Gabella G，Davis C，et al. Growth of nerve fibres into murine peritoneal adhesions[J]. J Pathol，2000，192(3)：396-403.

[9] Noriyuki Ozaki and G.F.Gebhart Characterization of mechanosensitive splanchnic nerve afferent fibers innervating the rat stomach[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2001，281(6)：G1449-G1459.

[10] Basbaum A I. Spinal mechanisms of acute and persistent pain [J]. Reg Anesth Pain Med，1999，24(1)：59-67.

[11] Traub R J，Hutchcroft K，Gebhart GF. The peptide content of colonic afferents decreases following colonic inflammation[J]. Peptides，1999，20(2)：267-273.

[12] Kang YM，Bielefeldt K，Gebhart GF，et al. Sensitization of Mechanosensitive Gastric Vagal Afferent Fibers in the Rat by Thermal and Chemical Stimuli and Gastric Ulcers[J]. J Neurophysiol，2003，91(5)：1981-1989.

（责任编辑：关蕴良）