维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0344-04

腹腔神经节毁损对胃扩张兔脊髓 *c-fos* 表达的影响

曾令全[1],魏安宁[2],傅 洪[2],杜永洪[1],王燕芹[1],李崇燕[1],王智彪[1]

(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(High Intensity Focused Ultrasound,HIFU)毁损腹腔神经节(Celiac ganglion,CG)对胃扩张兔脊髓 *c-fos* 表达的影响,探讨其治疗疼痛的可能机制。方法:健康成年新西兰大白兔 20 只,随机分为 4 组:非扩张非毁损组(nDnB)、扩张非毁损组(DnB)、扩张毁损组(DB)、非扩张毁损组(nDB),每组各 5 只。在无菌操作下暴露 CG,DB、nDB 组用 HIFU 毁损神经节,nDnB、DnB 组假手术,术后 7 天,均在麻醉下安置胃扩张装置。安置后 7 天,nDB、nDnB 组在麻醉下灌注固定取胸段 6~8(T6~8)脊髓,DB 和 DnB 组采用反复梯度扩张胃 1h 后,灌注固定取脊髓。用免疫组织化学方法检测脊髓前角和后角 Fos 样免疫反应阳性神经元(Fos-like immunoreactivity neuron, FLIN)计数的变化。结果:各组 FLIN 比较,毁损腹腔神经节和(或)扩张胃均不能使脊髓后角及前角 FLIN 明显地增加($P>0.05$)。结论:HIFU 毁损 CG 对胃扩张兔脊髓 *c-fos* 表达无明显影响,这与其它内脏神经毁损对伤害性刺激引起的脊髓 *c-fos* 表达的影响不同,可能是因为对胃伤害性信息的介导存在特殊的中枢机制。

【关键词】腹腔神经节;*c-fos*;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】2006-09-21

Effects of celiac ganglion damage on expression of *c-fos* in spinal cord of gastric distension rabbits

ZENG Lingquan, et al

(*Department of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the influence of high intensity focused ultrasound (HIFU) damaging the celiac ganglion (CG) of rabbits on expression of c-fos in spinal cord following gastric distension, and study the potential mechanism in treating pain. *Mothods*: 20 healthy and grown New Zealand rabbits were randomly divided into four groups: not distend damage (nDB), distend damage(DB), not distend not damage(nDnB), distend not damage(DnB), with 5 in each group. At first, the CG was exposed under aseptic manipulation, then 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 under anaesthesia. In group nDB and nDnB tissue were directly fixed through infusing 4% parafomaldehyde under deep anaesthesia, then spinal cord of thoracic 6~8(T6~8)extracted. In group DB and DnB stomach was distended step by step. Repeat distension for 1h, the spinal cord were extracted in the way similar to that the above two groups. The number of fos-like immunoractivity neurons (FLIN) in spinal cord was displayed using immunohistochemistry technique of Strept Avidin Biotin Complex (SABC). *Results*: Damaged CG and gastric distension as well as damaged CG combined with gastric distension could not induce the FLIN in dorsal horn as well as the anterior gray horn of thoracic slices to significantly increase($P>0.05$). *Conclusion*: HIFU damaging the celiac plexus(CG) has no influence on expression of *c-fos* in spinal cord of gastric distension rabbits. This is different from the expression of *c-fos* in spinal cord caused by other visceral nerves being damage of nociceptive stimulus, which might relate to the special central mechanism of modulating nociceptive signal for stomach.

【Key words】 Celiac ganglion; C-fos; Spinal cord; Gastric distension; Pain

腹腔神经节(Celiac ganglion ,CG)毁损在疼痛治疗中较为常用。目前的毁损性腹腔神经丛阻滞(NCPB)是运用各种设备引导或盲探穿刺腹腔神经丛,然后在局部注射化学性物质(乙醇或酚甘油)破坏神经,阻断支配内脏的交感神经,以缓解内脏痛的方法。对胃以外的内脏痛的研究表明[1-3],P 物质与

作者介绍:曾令全(1972-),男,主治医师,硕士,主要研究方向: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(教技函[2005]33 号)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

背角细胞膜上的 NK-1 受体结合，可以引起 *c-fos* 基因的表达。这种基因表达促使中枢神经的重构和超敏作用的形成。我们已经研究表明高强度聚焦超声(High Intensity Focused Ultrasound,HIFU)可以毁损腹腔神经节[4]，且具有精确性高、治疗彻底、副作用小等优点。高强度超声毁损 CG 后脊髓 *c-fos* 基因的表达是否与一般的内脏疼痛一致？本文观察了 HIFU 毁损 CG 对胃扩张兔脊髓 *c-fos* 表达的影响，探讨腹腔神经节毁损在治疗上腹部癌痛的可能机制。

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 1.6~2.65kg，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 0~5W，聚焦治疗头发出的声波的频率为 9.8MHz，焦距为 1.0mm，焦域为 1.5mm × 1.0mm × 2.0mm。

1.3 自制胃扩张器

采用去针头的输液器管，其长度为 28cm。在输液器管尖端 1.5cm 区域内用细针刺数孔，在距尖端 3~5cm 处外包上一长约 1.5cm 的硬质管。将避孕套末端 6cm 切下。用丝线将避孕套扎在硬质管上，再在距此处 2cm 处(M 处，图 1 箭头所指)安上同样的硬质管。每具胃扩张器做好后均行压力测试，基础压力：在注入 50ml 气体后压力升高到 10mmHg，以后随注入的气体的增加，压力恒定不变。在 500ml 内，注入相同的气体，压力差异在 ± 1mmHg 之内。



图 1 自制胃扩张器

1.4 动物分组及处理

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)、扩张毁损组 (DB)、非扩张毁损组(nDB)，每组各 5 只。兔术前禁食 18h，用速眠新(864 合剂，长春军需大学兽医研究所研制)0.02~0.04 ml/kg 肌注麻醉实验动物，解剖暴露腹腔神经节。对 DB 和 nDB 组用 HIFU 治疗头 (25W/cm^2，10s) 对准其照射，见神经节即刻发白，对 nDnB 和 DnB 组不照射，然后还纳肠管，逐层关腹，术后禁食物 12h，术后连续 4 天肌注青霉素 20 万单位 /kg。术后 7 天对 20 只兔均在速眠新麻醉下，在上腹部正中切口，长约 5cm，将自制胃扩张器从脑后底部皮下潜行穿至腹部切口皮下。将扩张器前端从切口穿入腹腔。在胃前壁无血管区切 2mm 的小口，将扩张器置入，用荷包缝合将其固定结扎在 M 处硬质管，再沿导管周围作隧道缝合包埋近端，导管上下两处缝合一针，将胃固定在腹壁上，然后逐层关腹。术后连续 4 天肌注青霉素 20 万单位 /kg。术后若出现导管堵塞或脱落、伤口感染、发热或其他疾病者则弃之不用，本实验无 1 例发生上述情况。术后 7 天，进行胃扩张实验，实验前禁食但不禁饮 15h，nDnB 组和 nDB 组在直接麻醉后灌注固定取胸段 6~8 (T6~8)，DnB 组和 DB 组在清醒状态下，扩张器导管接三通，一孔注射气体，一孔接换能器，其信号输入 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。采用梯度扩张胃，每次扩张的最大极限值为兔出现挣扎反应，在每一最大容积下维持 10min，间歇 2min。然后同前两组一样灌注固定取脊髓。

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 1000ml，再以 2000~2500ml 含 4% 多聚甲醛的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(PB，pH7.4，4℃)灌注固定，时间约 60min。取脊髓胸段 6~8(T6~8)。经标记后放入相同固定液中固定 18~24h，常规脱水，透明，石蜡包埋。

1.6 药品和试剂

兔抗 *c-fos* 血清，(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 *c-fos* 免疫组化染色(SABC 法)

用石蜡切片机制备连续横切片，片厚 4μm。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；②3% 双氧水封闭 20min；③3% 正常山羊血清孵育 30min；④兔抗 *c-fos* 血清 4℃湿盒中孵育 18~20h；⑤生物素化羊抗兔 IgG 室温 45min；⑥SABC 复合物室温 45min；以上各步骤之间均用 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline，PBS，pH7.4)洗 5min × 3 次。最后用新鲜配制的 0.05% DAB 显色 5~7min，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 Fos 染色。结果用 BI2000 图像分析系统(成都泰盟公司生产)对免疫组织化学图象进行分析，被测切片放置在连接计算机的显微镜下

维普资讯 http://www.cqvip.com

(20×10)，显示屏上出现此切片的图像，在每个脊髓的前角和后角各任选 6 个视野，计算每单位视野(×200)的 Fos 阳性神经元(Fos-like immunoractivity neurons，FLIN)数目，取平均值。

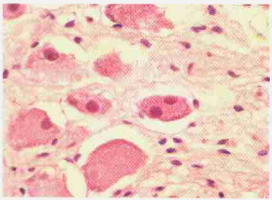
1.9 统计学处理

数据以($\bar{x}\pm s$)表示，用 SAS 统计软件包分析，对 Fos 变化作析因设计分析，以 $P<0.05$ 认为差异有显著性。

2 结 果

2.1 HIFU 治疗后神经节的形态结构改变

神经节间质水肿；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[11]，见图 2。



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 2 腹腔神经节

2.2 脊髓 Fos 含量的变化

光镜下 FLIN 均集中分布于脊髓背角Ⅰ、Ⅱ层，少数散在分布在Ⅴ、Ⅹ及侧角，核呈黄色，胞浆不着色。胸段背角数目较少。在前角运动神经元黄色多限于胞浆。见图 3~4。

2.3 各组脊髓前角和后角 FLIN 比较

各组后角 FLIN 比较，采用析因设计方差分析。主效应：毁损腹腔神经节使脊髓后角 FLIN 增加 4.63($P>0.05$)，扩张胃使脊髓后角 FLIN 增加 2.69($P>0.05$)，毁损腹腔神经节与扩张胃交互作用使脊髓后角 FLIN 增加 0.36($P>0.05$)。前角 FLIN 比较，主效应：毁损腹腔神经节使脊髓前角 FLIN 减少 0.3($P>0.05$)，扩张胃使脊髓前角 FLIN 增加 3.7($P>0.05$)，毁损腹腔神经节与扩张胃交互作用使脊髓前角 FLIN 增加 0.7($P>0.05$)。见表 1。

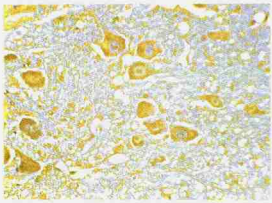


图 3 前角的 FLIN 在前角运动神经元黄色多限于胞浆



图 4 FLIN 均集中分布于脊髓背角Ⅰ、Ⅱ层，少数散在分布在Ⅴ、Ⅹ及侧角，核呈黄色，胞浆不着色

表 1 各组脊髓前后角 FLIN 数量比较($n=15$，$\bar{x}\pm s$)

	DB	DmB	nDB	nDmB
后角(个)	32.93±8.12	28.66±13.89	30.2±9.89	25.2±11.8
前角(个)	23.33±5.95	24.33±9.19	20.33±9.18	19.93±7.07

3 讨 论

近年来人们创立了一种对神经元功能活动进行细胞水平定位的新型形态学方法—*c-fos* 癌基因表达法，该方法是利用神经元受到兴奋性刺激时其 *c-fos* 癌基因的表达急剧增加和 Fos 蛋白迅速堆积于细胞核的特点，用原位杂交法或免疫组化法在神经组织切片上染出受兴奋的神经元。*c-fos* 癌基因表达法的建立，使形态和功能结合起来，为痛觉研究开辟了新的途径。*c-fos* 原癌基因是即刻早期基因的一种，在生理及病理性刺激时，能被快速诱导，在将细胞信号外转变为长期持久的细胞表现型的改变中起作用。脊髓神经根损伤是 Fos 强有力的诱导条件。对神经递质、激素、神经冲动等外界刺激的传入

维普资讯 http://www.cqvip.com

信息在数分钟内即刻作出反应,进行表达。正常的原癌基因及其蛋白产物对细胞生长、分化和功能活动至关重要[5]。在包括神经元在内的绝大多数正常细胞中,*c-fos* 也有低水平表达[6],其转录激活在5min 内即可发生。Fos 蛋白一般在刺激后 20~30min 即可检出,60~90min 达到高峰,可持续 2~5h。

脊髓前角 *c-fos* 表达无明显改变可能与时间有关。王建华的研究表明[7]:坐骨神经切断后,*c-fos* 的表达呈一过性,从开始至结束共约 3 天,增值时间为术后 36h。HIFU 毁损神经节后 7 天 *c-fos* 表达可能已经恢复原水平。因此本实验与以往的结论是一致的。

以往的大量研究表明空腔脏器扩张会引起脊髓后角内 *c-fos* 的表达增强,机械扩张膀胱和尿道[1],扩张结肠和直肠[2],能使脊髓 Fos 阳性神经元大量增多。但本实验并未发现在脊髓内 *c-fos* 的表达增强。其原因是什么?①是否与不同的脊髓节段有关?1992 年 Traub 等[8]以不同压力反复扩张(20、40、80 mmHg)大鼠直肠和结肠后,发现这 3 种情况均引起脊髓腰段 *c-fos* 表达增强,表达区域主要位于脊髓第Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ层和Ⅹ层。*c-fos* 表达尤以 80mmHg 最为显著,此时结肠壁已有炎症表现,因此这是一种伤害性刺激。接着他们使用同样的刺激方法研究了大鼠脊髓胸腰段和腰骶段的 *c-fos* 表达,发现伤害性刺激(80mmHg)诱导的 *c-fos* 表达在腰骶段明显强于胸腰段。而胃肠道的交感神经来自于脊髓的胸腰段,腰骶段接受的是副交感神经的投射。为了深入研究这种不平衡现象,Traub[9]又通过胃扩张获得了相似的结果,1994 年他在扩张胃和食管后发现延髓孤束核 *c-fos* 表达明显增加,在脑髓的相应区域 *c-fos* 表达未发现变化,而孤束核正是副交感神经传入纤维的投射部位,上述现象并不能用两种神经纤维在内脏不同的分布密度来解释,因为在降结肠及直肠交感神经和副交感神经的分布密度大致相同。另外胸腰段的脊髓在其他因素刺激下可出现 *c-fos* 表达增加,如鞘内注射秋水仙碱或腹腔内注射乙酸。为了进行深入研究,Traub 在上述实验方法的基础上加用膈下迷走神经切断术和脊髓(T5)横断术,发现迷走神经切断后,刺激所致的延髓 *c-fos* 表达较对照组明显减少,而脊髓横断后,刺激所致的胸髓 *c-fos* 表达较对照组明显增加。说明内脏伤害性刺激后中枢神经系统 *c-fos* 的表达主要由副交感神经所介导。在正常大鼠刺激后胸髓 *c-fos* 表达较少可能与较高级中枢的下行性抑制有关,但有证据表明这种抑制并非由迷走神经所介导[10]。②是否与不同的器官有关?同属于胸段脊髓的十二指肠机械扩张实验与此实验结果不同[3]。同扩张膀胱、尿道、结肠、直肠一样,机械刺激十二指肠诱发的 FLIN 出现在脊髓Ⅱ~Ⅵ层和Ⅹ层,标记密集段为 T6~T9。此实验说明在胸段对不同的器官即使是相同性质的刺激也不一定引起脊髓 *c-fos* 的表达。

分析出现这种现象的原因:其一与传递伤害信息的递质有关。我们的实验发现 HIFU 毁损 CG 和毁损 CG 扩张胃都会引起脊髓后角 SP 的增加,而实验已经证明躯体神经系统 P 物质参与伤害性刺激诱发的脊髓 *c-fos* 基因的表达。Lima 等[11]报道伤害性机械刺激后 Fos 阳性细胞则较均匀地分布于背角Ⅲ~Ⅴ层,而伤害性化学和热刺激诱发的 Fos 阳性细胞绝大多数位于背角Ⅰ~Ⅱ层。我们实验观察机械扩张产生的 SP 也主要分布于背角Ⅰ~Ⅱ层,说明对机械扩张引起增高的 SP 与 *c-fos* 基因表达不在相同部位,是否有其他神经递质也参与介导 *c-fos* 的表达。也就是说 SP 并非是介导机械性刺激引起的 Fos 的增高的充要因素。这些说明:SP 不是传递伤害信息的唯一递质,其它物质如速激肽家族中其他肽类,降钙素基因相关肽(CGRP),兴奋性氨基酸等均存在传入神经末梢中,受到伤害刺激后释放,共同参与脊髓伤害性信息的传递与调控。已有研究表明胃降钙素基因相关肽(CGRP)可能是传导胃伤害性信息的另一重要递质。而 CGRP 在是否参与介导 *c-fos* 表达方面还有待研究。其二脊髓的下行抑制有关?Holzer P 等[12]在胃炎性痛时发现脊髓中 NOS 有明显的变化,但 *c-fos* 的变化仅出现在孤束核(NTS),这说明脊髓接受到的伤害性信息在脊髓水平即得到整合而未进一步上传,在脊髓中存在着某种下行性抑制通路,本实验的研究结果与已有的类似研究结果一致。

总之,HIFU 毁损 CG 对胃扩张的镇痛机制与十二指肠、结肠、直肠和膀胱扩张的镇痛机制不同。其原因可能是对胃伤害性信息的介导存在特殊的中枢机制。

参 考 文 献

[1] Irder LA, Groat WC. Increased c-fos exprssion in spinal neurons

(下转第 406 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

状骨质增生,说明骨挫伤具有骨小梁显微骨折的特征。

骨挫伤病理组织学诊断难以获得,文献亦少有骨挫伤病理组织学报道。本文 1 例病人临床因怀疑骨骼感染性病变而作活检,病理证实存在骨髓的水肿,出血和骨小梁的显微断裂,进一步支持骨挫伤是一类骨骼轻微损伤,骨小梁显微骨折,微血管断裂。

总之,骨挫伤是一类 X 线平片及 CT 表现阴性,MRI 有明显异常的骨损伤。早期明确诊断,制定正确的治疗方案,减少不必要的随访和其它检查,减少病人因延误诊断带来的伤痛,避免发展为更严重的损伤和发生严重的并发症。因此,MRI 检查对 X 线、CT 不能解释症状的患者是必须的,建议作为骨关节损伤的一种常规补充检查。

参 考 文 献

[1] 郑卓肇,范家栋,吕兴隆.前交叉韧带损伤:MRI 多征象分析[J].中国医学影像技术,2004;20(9):1311-1314.

[2] Galloway HR,Meikle GR, Despois M.Patterns of injury in patients with radiographic occult fracture of neck of femur as determined by magnetic resonance imaging[J]. Astralas Radiol, 2004;48:21-24.

[3] 卢铃铨,许民生,吴前芝,等.质子脂肪抑制序列在四肢隐性骨折中的诊断价值[J].中华放射学杂志,2004;38:1324-1328.

[4] Kapelov SR,Teresi LM, Bradley WG,et al.Bone contusions of the knee:increased lesion detection with fast spin-echo MR imaging with spectroscopic fat saturation[J].Radiology 1993;189:901-904.

[5] Kaplan PA, Gehl RH, Dussault RG, et al. Bone Contusions of the Posterior Lip of the Medial Tibia Plateau (Contrecoup lnjury) and Associated lnternal Derangements of the Knee at MR lmaging[J].Radiology,1999;211:747-753.

[6] 吕发金,黄永火,罗天友,等.骨挫伤与膝关节附属结构损伤关系的 MRI 评价[J].实用放射学杂志,2005;21:61-64.

[7] Mink JH,Deutsch AL.Occult cartilage and bone injuries of the knee:detection,classification,and assessment with MR imaging [J]. Radiology,1989;170:823-829.

[8] Mack MG,Keim S, Balzer J,et al.Clinical impact of MRl in acute wrist fractures[J].Euro Radiol,2003;13:612-617.

[9] Donnelly LF,Klostermeier TT,Klosterman LA.Traumatic elbow effusions in pediatric patients: are occult fractures the rule[J].AJR, 2002;179:531-532.

(上接第 347 页)

after irritation of the lower urinary tract 5h the rat[J].J Neurosci, 1992;12(12):4878.

[2] Lanteri-Miner M,Lsnardon P,de Pommery J,et al. Spinal and hindbrain structures involved in Visceroception and visceronociception as revealed by the expression of Fos,Jun and Krox 24 proteins[J]. Neuroscience,1993;55(3):737.

[3] Jotce A,Deleo,Dennis W,et al.Differential c-fos-like protein expression in mechanically versus chemically induced visceral nociception[J].Molecular Brain Research,1991;11:167-170.

[4] 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.

[5] 韩济生,主编.神经科学纲要[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.273.

[6] Morgan JI,Cohen DR,Hempstead JL,et al.Mapping Pattens of c-fos expression in the central nervous system after seizure[J]. Science,1987;237:192.

[7] 王建华,洪光祥,王发斌.大鼠坐骨神经切断后脊髓前角运动神经元 *c-fos* 表达方式与凋亡的研究 [J]. 中华显微外科杂志,2001;24(1):49-50.

[8] Traub RJ, Hechman P,ladarola MJ,et al.Fos-like proteins in the lumbosacral spinal cord following noxious and non-noxious colorectal distention in the rat[J].Pain,1992;49:393-403.

[9] Traub RJ,Lim F,Sengupta JN,et al.Noxious distention of viscera results in differential c-Fos expression in second order sensory neurons receiving sympathetic or parasympathetic input[J]. Neurosci Lett,1994;180(1):71-75.

[10] Traub RJ,Sengupta JN,Gebhart GF.Differential *c-fos* expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat[J]. Neuroscience,1996;74(3):873-884.

[11] Lima D,Avelino A,Coimbra A.Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli[J]. Neuroreport,1993;4(6):747.

[12] Holzer P.Local microirculalory reflexs and afferent signaling in response to gastric acid challenge[J].Gut,2000;47(supple.Ⅳ):46-48.