DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.020
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
1358 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1358-03

慢性前列腺炎疼痛产生的神经机制的实验研究

陈 勇,宋 波,熊恩庆,金锡御 (第三军医大学附属西南医院全军泌尿中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨慢性前列腺炎疼痛的神经机制以及疼痛产生与盆底肌功能障碍的关系。方法 用荧光素逆行双标法和免疫组化方法进行研究,实验组将荧光素碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)注入前列腺,双苯甲亚胺(Bisbenzimide, Bb)注入肛门外括约肌、生殖股神经、股外侧皮神经、髂腹股沟、股神经、髂腹下神经;此后在有双标细胞的切片上行免疫组化检查。结果 在L_1~L_2和L_6~S_2的后根神经节(Dorsal root ganglia, DRG)中发现荧光素双标细胞,对照无双标细胞;部分双标细胞含降钙素基因相关肽(Calcitonin gene-related peptide, CGRP)和P物质(P substance, SP)。结论 前列腺炎引起的会阴部牵涉痛的发生机制可能与发生在DRG水平的轴突反射以及由此引起的神经源性炎症有关,并与盆底肌功能障碍密切相关。

关键词:神经机制;疼痛;前列腺炎
中图法分类号:R338.3;R441.1;R697.+33 文献标识码:A

Possible mechanism of referred pain caused by chronic prostatitis

CHEN Yong, SONG Bo, XIONG En-qing, JIN Xi-yu (Department of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of the referred pains in pelvic pain due to chronic prostatitis and the relation between pain due to prostatitis and pelvic floor muscle dysfunction. Methods The retrograde fluorescent double labeling and immunohistochemistry were used. A total of 24 Wistar rats were divided two groups, 12 in each group. In the first group, Propidium Iodide (PI) was injected into the prostate, Bisbenzimide (Bb) into the external anal sphincter. In the second group, PI was injected into the prostate, Bb into genitofemoral, iliohypogastric, ilioinguinal, femoral and lateral femoral cutaneous nerves. Results The fluorescent double labeled cells were found in the L_1-L_2 and L_6~S_3 dorsal root ganglia (DRG) and some of them were confirmed to contain calcitonin gene-related peptide (CGRP) and P substance (SP) by immunohistochemistry. Conclusion The findings confirm that the peripheral process of DRG cells dichotomizes into prostate, external anal sphincter and somatic parties, and some of these cells contain CGRP and SP, which indicates the referred pains in pelvic floor may be caused by axon reflex in the peripheral process of DRG cells. Meanwhile, neurogenic inflammation might play an important role in this persistent pain status. Pain due to prostatitis is correlated with pelvic floor muscle dysfunction.

Key words: mechanism; pain; prostatitis

疼痛是慢性前列腺炎最主要的症状,也是患者就诊的主要原因,但对疼痛产生的原因无满意的解释。不同患者前列腺炎疼痛部位可有所不同,但疼痛的性质和特点并无明显区别,且均分布在与膀胱尿道神经支配相关的腰、骶神经支配区,其特点与牵涉痛十分相似,对此尚无有说服力的证据。盆底肌功能障碍被认为是前列腺炎的一种特殊类型,一般认为,前列腺炎可产生盆底肌功能障碍;盆底肌功能障碍也可单独引起前列腺炎样症状,但对其产生的神经机制不清楚。本研究拟依托动物模型,用荧光素逆向双标法、解剖及免疫组织化学的方法对其发病机制进行初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

荧光素:PI(碘化丙啶)和Bb(双苯甲亚胺)购自SIGMA公司。PI和Bb注射到组织或器官后,能被神经末梢特异性吸收,并沿轴浆运输到达神经元的胞体,能分别使胞浆和胞核在一定条件下呈现特定的荧光[1]。

兔抗CGRP和SP购自博士德公司,二抗(羊抗兔)和三抗SP复合物(辣根酶标记链亲和素)由本校组织胚胎学教研室提供。

荧光显微镜为日本Olympus公司产品。

1.2 实验分组

实验组:雄性Wistar大鼠24只(由本院实验动物中心提供),体质量180~280 g,分为两组(各12只)。Ⅰ组:4%戊巴比妥钠(1 ml/100 g)腹腔麻醉后下腹部切开显露前列腺,于右侧叶

基金项目:重庆市应用基础研究资助项目(2002)
作者简介:陈 勇(1972-),男,四川省宜宾市人,硕士,主治医师,主要从事前列腺炎疼痛机制方面的研究。电话:(023)68754186
收稿日期:2002-11-12;修回日期:2003-05-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

注入 1% PI 10 μl。24 h 后同法麻醉，经肛门旁放射状切口，显露右侧肛门外括约肌，注入 1% Bb 10 μl。24 h 后 4% 的多聚甲醛灌注固定。

Ⅱ组：同法将 1% PI 10 μl 注入前列腺右叶，24 h 后同法麻醉下手术，将 1% Bb 3 μl 分别注入右髂腹下神经、髂腹股沟神经、生殖股神经、股外侧皮神经、股神经干内，动物再存活 24 h 后同法灌注固定。

对照组：① 雄性 Wistar 大鼠 3 只。缩短动物存活时间，PI 注射 6 h 后即注射 Bb，3 h 后灌注，同法取材。②随机取实验组（5 只）对侧脊神经节和胸段神经节作对照，以排除荧光素经血液循环进入脊神经节神经元。

灌注固定的主要步骤为：麻醉下打开胸腔，将灌注针头自左心室插入升主动脉，先以 0.9% 的生理盐水 200 ml 快速灌注，后用 4 ℃含 4% 的多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液灌注 1～2 h。脊神经节标本的处理：经灌注固定后立即解剖获取右侧 T_{13}～S_4 的脊神经节，浸入含有 30% 蔗糖的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液中 4 h。冰冻连续切片，片厚 20 μm，隔两片取一片。每个动物取 4 张玻片，风干后待检。

1.3　荧光素逆行双标细胞观察

立即用荧光显微镜观察、拍照及记录。所用滤色块为 WU。结果判定：PI 阳性细胞表现为胞浆出现橘黄色荧光，胞核无荧光。Bb 阳性细胞表现为细胞核出现蓝色荧光，胞浆无荧光。PI 和 Bb 都呈阳性的双标细胞在胞浆和胞核都出现荧光。

1.4　免疫组化观察

荧光素逆行双标细胞观察后，将 PI 和 Bb 双标记阳性的切片分别行 CGRP 和 S-P 免疫组化检测（SP 法并用硫酸镍铵增强显色）。主要步骤为：切片经 3% H_2O_2 处理 30 min 以封闭内源性过氧化物酶活性，0.3% Triton X-100 /0.1% 牛血清白蛋白（PBS 配）37 ℃孵育 2 h 后于一抗（工作浓度 2 μg/ml）37 ℃孵育 1 h 后置 4 ℃冰箱 72 h，二抗和 SP 复合物于 37 ℃孵育 1 h。显色液配制：2.5% 硫酸镍铵-0.035% DAB-0.03% H_2O_2（用 0.1 mol/L 的醋酸钠溶液配制，pH6.0）。对照实验以正常兔血清或无一抗的 PBS 代替兔抗 CGRP 和 SP，其余操作同上。

镜下观察并照相。结果判定：S-P 或 CGRP 免疫组化染色阳性表现为胞浆内出现稳定的蓝黑色沉淀；免疫组化阳性和荧光素双标阳性的三重标记细胞参照以下方法由从事病理学研究的专家协助判断：①将具有荧光双标细胞的切片，经显微照相并画图确定双标细胞位置，刮除多余标本；② 在确定的标本上进行免疫组化检测，并对阳性反应的细胞拍照；③将同一标本的两组照片进行对照，根据细胞形态、周围毗邻确定三重标记细胞。

2　结果

2.1　荧光双标法结果

Ⅰ组在 L_6～S_3 段和Ⅱ组在 L_1～L_3 段的右侧脊神经节内可观察到 3 种标记细胞：PI 或 Bb 单标细胞及 PI/Bb 双标细胞。双标细胞主要是小细胞分布在 L_1-L_2 和 L_6-S_2 节段，其他节段可见部分单标细胞和极少量双标细胞。对照组未发现荧光素标记细胞，见图 1。

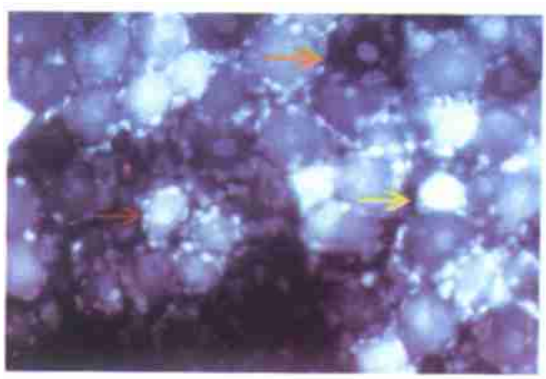


图 1　腰骶段 DRG 中可见 3 种荧光标记细胞　（× 400）

Fig 1　Three kinds of labeled cells in the lumbosacral DRG cells　（× 400）

2.2　免疫组化结果

将具有荧光双标细胞的切片，经显微镜照相并画图确定双标细胞的位置后，做免疫组化 S-P 染色，在显微镜下观察。可见到部分呈免疫组化阳性反应的细胞。阳性细胞的特点为：胞浆内有许多蓝黑色沉淀，分布均匀，胞核内无颗粒样物质。免疫细胞化学反应切片的照片与荧光素标记的同一张切片的照片对比，发现部分被荧光素双标的细胞含 SP 和 CGRP。免疫组化对照实验结果为阴性，见图 2、3。

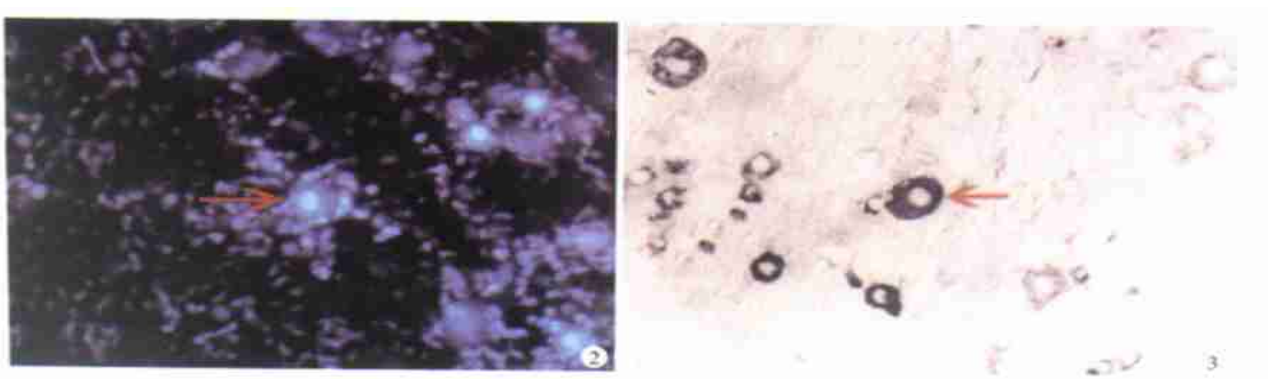


图 2　荧光双标细胞　（S-P× 400）

Fig 2　Fluorescent double-labeled cells　（S-P× 400）

图 3　荧光双标细胞胞浆 SP、CGRS 阳性　（S-P× 400）

Fig 3　Strongly stained CGRP and SP in the cytoplasm of double-labeled DRG cells　（S-P× 400）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

荧光素逆向双标法是研究神经通路和牵涉痛的经典方法之一，其原理为：将两种荧光素注射到两种不同组织或器官，在同一神经元细胞发现胞核和胞浆被标记，则说明该神经元细胞同时支配这两种组织或器官[1,2]。

前列腺炎疼痛主要部位在会阴部、阴茎和阴囊。在人体支配这些部位的神经主要为髂腹沟神经、生殖股神经、阴部神经，而在大鼠则为髂腹股沟神经、生殖股神经、股外侧皮神经、股神经，这些神经纤维都来自T_{12}（大鼠T_{13}）~L_3脊髓节段发出的腰丛。同时，许多学者认为前列腺炎疼痛与盆底肌功能障碍相关。在大鼠，盆底肌接受来自L_6~S_1的阴部神经的支配。

因此，本实验将荧光素PI和Bb分别注入前列腺和生殖股神经、髂腹股沟神经等，前列腺和肛门括约肌，结果分别在腰、骶部的DRG中发现PI/Bb双标细胞，双标细胞主要是小细胞在DRG中小细胞与痛觉传导有关[7]。而对照组神经节未发现双标细胞。本实验提示腰、骶部的DRG细胞周围突有分支同时投射到前列腺和肛门括约肌及前列腺和会阴部体表牵涉部位，这为慢性前列腺炎牵涉痛的发生提供了神经解剖学基础。

前列腺接受交感和副交感神经的双重支配。一般认为副交感神经的传入纤维与盆腔内脏感觉有关，而交感神经的传入纤维的功能尚不清楚。本实验中，荧光双标细胞主要在L_1~L_2和L_6~S_2节段，而其他节段出现较少，可能与此有关。人类交感神经中枢在T_{10}~L_2，副交感神经中枢在S_2~S_4，而大鼠交感神经中枢位于L_1~L_2，副交感神经中枢位于L_6~S_1，与双标细胞节段有所差别，造成这种差别的原因还须进一步研究。

初级感觉传入纤维可通过轴突反射和背根反射实现传出功能[3]，其末梢释放的物质（SP，CGRP等）可引起神经源性炎症。神经源性炎症不仅可引起内脏的疼痛和炎症，而且是牵涉痛发生的重要机制[4]，例如，急性心肌梗死可引起左肩周炎，导致左肩疼痛。本研究用荧光素逆向双标法及免疫组化S-P法证实：腰、骶部DRG细胞的有分支投射到前列腺和肛门括约肌及前列腺和会阴部，且具有分支投射的部分细胞含有CGRP和SP。

因此，我们认为：慢性前列腺炎患者会阴部疼痛发生的机制很可能是由于腰、骶部DRG细胞周围突分支中的“轴突反射”引起。即来自前列腺的痛觉冲动，其中一部分上传至脊髓背根节，释放SP、CGRP并作用于脊髓后角神经元，引起痛觉信息向上位中枢的传递。另一部分在腰、骶部DRG细胞周围突的分叉处沿另一分支向外周传递[5]，到达会阴部和盆底肌（肛门括约肌、尿道括约肌等），并在其神经末梢释放某些神经介质如CGRP和SP，在外周诱发神经源性炎症，从而诱发痛觉冲动的产生，这些冲动再沿局部的感觉神经末梢传向中枢，产生牵涉性会阴部的症状。

同样，盆底肌功能障碍产生的痛觉冲动也可通过DRG细胞的轴突反射，到达前列腺，并引起前列腺的神经源性炎症，产生相应的疼痛症状。因此，慢性前列腺炎与盆底肌功能障碍可形成恶性循环，导致难以治愈的疼痛。这可以解释临床上慢性前列腺炎和有前列腺炎样症状但前列腺液检查正常者具有相同的功能性尿道梗阻和会阴部疼痛[6]。

在慢性前列腺炎病理生理机制中引入牵涉痛和神经源性炎症的理念，可望开辟治疗慢性前列腺炎疼痛的新的治疗方法。但对于是哪些因素激发并维持神经源性炎症以及DRG以上的痛觉信息传递尚需进一步的研究。

参考文献：

[1] Lu G W, Willis W D. Branching and/or collateral projections of spinal dorsal horn neurons[J]. Brain Res, 1999, 1(19): 50-82.

[2] 张新潮，彭裕文. 下腰痛患者下肢或下腹部牵涉痛发生机制的探讨[J]. 颈腰痛杂志，1998，10(2)：103-106.

[3] Lin Q, Wu J, Willis W D. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats[J]. J Neurophysiol, 1999, 82(5): 2602-2611.

[4] Procacci P, Marcesca M. Referred pain from somatic and visceral structures[J]. Curr Rev Pain, 1999, 3: 96-99.

[5] Bahr R, Blumberg H, Ganing W. Do dichtomizing afferent fibers exist which supply visceral organs as well as somatic structure? A contribution to the problem of referred pain[J]. Neurosci Lett, 1981, 24(1): 25-28.

[6] 宋 波，金锡御，刘志平. 功能性膀胱下尿路梗阻与前列腺炎[J]. 中华泌尿外科杂志，1995，16(2)：78.

[7] 徐天乐，王晓民，张 旭. 神经科学进展[M]. 北京：科学出版社，2002. 394-398.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net