

· 论 著 ·

神经病理性疼痛大鼠脑脊液中 4 种氨基酸浓度变化及意义

薛庆峰^{1,2}, 杨天德^{1△}

(1. 第三军医大学新桥医院麻醉科, 重庆 400037; 2. 解放军第二八五医院麻醉科, 河北邯郸 056001)

摘要:目的 观察坐骨神经分支选择结扎(SNI)模型大鼠中 4 种氨基酸浓度变化。方法 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组(A 组)、假手术组(B 组)、SNI 模型组(C 组)。在动物模型制作前及制作后 1、3、5 d 测量各组大鼠机械缩足反射阈值(MWT)并在体测量脑脊液(CSF)中谷氨酸(Glu)、天冬氨酸(Asp)、 γ -氨基丁酸(GABA)和甘氨酸(Gly)的浓度变化。结果 术后 1、3、5 d, C 组大鼠 MWT 明显低于 A、B 组($P < 0.01$)。术后 1、3、5 d, C 组大鼠 Glu、Asp 的浓度明显高于 A、B 组($P < 0.01$)。C 组大鼠 GABA、Gly 的浓度在术后 1 d 明显升高, 与 A、B 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 在术后 3、5 d 明显下降, 与 A、B 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 SNI 模型大鼠脑脊液兴奋性氨基酸(EAAs)和抑制性氨基酸(IAAs)失衡, 可能是神经病理性疼痛的机制之一。

关键词:神经病理性疼痛; 天冬氨酸; 谷氨酸; γ -氨基丁酸; 甘氨酸

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.32.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)21-3242-02

The change and significance of four kinds of amino acid in cerebrospinal fluid of rats with neuropathic pain

Xue Qingfeng^{1,2}, Yang Tiande^{1△}

(Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China;
2. Department of Anesthesiology, No 285 Hospital of PLA, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract: Objective To investigate the change and significance of four kinds of amino acid in cerebrospinal fluid of rats after spared nerve injury(SNI). **Methods** A total of 30 male SD rats were randomly divided into 3 groups with 10 rats in each group: control group(group A), sham group(group B) and SNI group(group C). Mechanical withdrawal threshold(MWT) and the concentrations of glutamic acid(Glu), aspartate(Asp), γ -aminobutyric acid(GABA) and glycine(Gly) were measured before operation and after operation. **Results** MWT of group C were lower than that in group A and B after 1, 3, 5 days of operation($P < 0.01$). The concentrations of Glu, Asp in group C were significantly higher than those in group A and B after 1, 3, 5 days of operation($P < 0.01$). The concentrations of GABA, Gly in group C were significantly higher than those in group A and B after 1 day of operation($P < 0.05$). The concentrations of GABA, Gly in group C were significantly lower than that in group A and B 3, 5 after days of operation($P < 0.05$). **Conclusion** The imbalance of EAAs-IAAs in the SNI rats maybe one of mechanisms in the neuropathic pain.

Key words: neuralgia; aspartic acid; glutamic acid; gamma-aminobutyric acid; glycine

神经病理性疼痛机制复杂、治疗困难, 从发生到形成和维持是一个动态的过程。本研究通过制作坐骨神经分支选择结扎(spared nerve injury, SNI)大鼠模型模拟神经病理性疼痛, 并通过观察脑脊液(CSF)中兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAAs)和抑制性氨基酸(inhibitory amino acids, IAAs)的变化, 探究神经病理性疼痛的可能机制。EAAs 包括谷氨酸(glutamic acid, Glu)和天冬氨酸(aspartate, Asp); IAAs 包括 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)和甘氨酸(glycine, Gly)。

1 材料与方 法

1.1 动物与分组 健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量(180~200)g, 30 只, 由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。将大鼠随机分成 3 组, 每组 10 只。A 组为空白对照组, B 组为假手术组, C 组为 SNI 模型组。

1.2 预置微透析管 参照参考文献[1-2]的方法预置微透析管。具体步骤: 用 7% 水合氯醛(1.2~1.5 mg, 腹腔注射)实施麻醉, 刮掉枕部毛发, 将麻醉大鼠正确放入立体定位仪, 在颈部采用后正中切口长 1 cm, 钝性分离颈部肌肉, 使寰枕膜充分暴露, 随后将微透析管通过寰枕膜处切口仔细植入蛛网膜下腔, 导管末端经枕骨后正中皮下隧道于枕部刮毛处穿出缝线固定。

用消毒生理盐水冲洗并逐层缝合术野切口, 肌注抗生素, 整个操作过程在严格无菌环境下进行, 术后大鼠均给予生理盐水(5 mL, 腹腔注射)以补充体液丢失, 在进行下一步实验前大鼠单笼饲养并持续监测, 表现出任何神经系统功能缺损如行动迟缓、姿态或感觉异常等均被放弃。

1.3 模型制备 在微透析管植入 5 d 后, 大鼠已康复并可自由活动, B 组行假手术, C 组行 SNI 造模。A 组大鼠不进行手术为空白对照; B 组大鼠在右侧大腿后外侧作一纵形切口, 钝性分离肌肉, 显露坐骨神经及其分支后关闭切口, 行假手术; C 组参照 Decosterd 和 Woolf^[3]的方法建立 SNI 大鼠模型, 见封 3 图 1。B、C 组术后肌注抗生素。大鼠术后单笼饲养。

1.4 机械痛阈的测定 大鼠机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)即机械痛阈值。测定方法参照参考文献[4], 分别于造模前及造模后 1、3、5 d 测量各组大鼠右后肢 MWT。

1.5 微透析液的收集 首先将大鼠置于圆形透明树脂盒内以限制其活动, 用标准 PE 管(长 30 cm)将透析探针与微透析泵连接, 以 5 μ L/min 速率灌注透析液(林格氏液: NaCl 145 mmol/L, KCl 3 mmol/L, CaCl₂ 1.26 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/

L, pH 7.2~7.4), 经 2 h 达透析平衡, 由微型计算机完成透析液的温控收集(4 ℃), 样品冻存于-70 ℃冰箱待测。3 组大鼠在造模前及造模后 1、3、5 d 在体测量完成后, 均使用过量水合氯醛麻醉行安乐死。

1.6 高校液相色谱(HPLC)检测 Glu、Asp、GABA、Gly 浓度

用柱前衍生法联合 HPLC 荧光检测法测定透析液中氨基酸的浓度。色谱条件为岛津 LC-10A 高效液相色谱仪, C18ODS 色谱柱, 柱温 40 ℃。流动相 A: 磷酸盐缓冲液 630 mL, 四氢呋喃 20 mL, 甲醇 350 mL; 流动相 B: 甲醇, 进行二元梯度洗脱, 检测时间为 20 min。荧光检测器激发波长为 330 nm, 发射波长为 455 nm。以标准氨基酸浓度对峰高作校正曲线, 计算样品浓度。

1.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 进行配对 *t* 检验和单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠 SNI 模型制作情况 C 组大鼠造模后 5 d 观察到大鼠的自噬现象(腹侧观), 可清晰地看到手术后右侧爪外观灰暗, 被咬噬, 见封 3 图 2。

2.2 3 组大鼠不同时间点 MWT 测量结果 术后 1、3、5 d, C 组大鼠 MWT 明显低于 A、B 组($P < 0.01$)。B 组与 A 组相比差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 3 组大鼠 MWT 测量结果($\bar{x} \pm s, g, n=8$)

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d
A 组	29 ± 5	29 ± 5*	30 ± 6*	32 ± 6*
B 组	30 ± 3	29 ± 4*	30 ± 6*	31 ± 5*
C 组	31 ± 6	16 ± 6	13 ± 6	10 ± 4

*: $P < 0.01$, 与 C 组相比。

2.3 3 组大鼠不同时间点 Glu、Asp、GABA、Gly 浓度测定结果 术后 1、3、5 d, C 组大鼠 Glu、Asp 的浓度明显高于 A、B 组($P < 0.01$)。C 组大鼠 GABA、Gly 的浓度在术后 1 d 明显升高, 与 A、B 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 在术后 3、5 d 均明显下降, 与 A、B 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2~5。

表 2 3 组大鼠不同时间点 Glu 浓度测定结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n=8$)

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d
A 组	3.23 ± 1.08	3.23 ± 1.12*	3.16 ± 1.13*	3.27 ± 1.24*
B 组	3.26 ± 1.06	3.22 ± 1.16*	3.13 ± 1.16*	3.31 ± 1.25*
C 组	3.26 ± 1.13	6.27 ± 1.95	7.91 ± 2.52	9.71 ± 2.89

*: $P < 0.01$, 与 C 组相比。

表 3 3 组大鼠不同时间点 Asp 浓度测定结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n=8$)

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d
A 组	0.36 ± 0.09	0.37 ± 0.08*	0.37 ± 0.09*	0.36 ± 0.08*
B 组	0.36 ± 0.06	0.35 ± 0.06*	0.35 ± 0.07*	0.38 ± 0.05*
C 组	0.37 ± 0.08	0.50 ± 0.11	0.59 ± 0.16	0.67 ± 0.18

*: $P < 0.01$, 与 C 组相比。

表 4 3 组大鼠不同时间点 GABA 浓度测定结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n=8$)

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d
A 组	3.63 ± 0.62	3.54 ± 0.67*	3.61 ± 0.65*	3.59 ± 0.58*
B 组	3.60 ± 0.63	3.52 ± 0.64*	3.53 ± 0.66*	3.51 ± 0.55*
C 组	3.54 ± 0.67	5.04 ± 1.65	2.63 ± 1.19	1.92 ± 0.89

*: $P < 0.05$, 与 C 组相比。

表 5 3 组大鼠不同时间点 Gly 浓度测定结果($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n=8$)

组别	术前	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d
A 组	4.18 ± 1.13	4.20 ± 1.08*	4.13 ± 1.37*	4.19 ± 1.06*
B 组	4.26 ± 1.03	4.25 ± 1.06*	4.15 ± 1.66*	4.13 ± 1.05*
C 组	4.20 ± 1.08	4.93 ± 2.28	3.25 ± 1.13	1.51 ± 0.87

*: $P < 0.05$, 与 C 组相比。

3 讨 论

1969 年, Olney 首次报道 Glu 除作为兴奋性递质参与神经元的正常信息传递外, 还具有神经毒性作用, 即过量的 Glu 能过度兴奋中枢神经系统 Glu 敏感神经元而达到致死的程度^[5]。研究表明 Glu、Asp 涉及多种中枢神经系统的功能^[6], 且能使神经元损伤^[7]。而 GABA 等 IAAs 对神经元损伤有一定保护作用^[8]。Johansen^[8]研究表明抑制 GABA 的摄取, 使细胞外 GABA 浓度增高, 可明显地减轻神经元变性坏死, 提示 GABA 有保护脑神经细胞的作用。这表明 IAAs 在生理状态下扮演着与 EAAs 同等重要但作用相反的角色; 在神经细胞内, Glu 的浓度约为 10 mmol/L, 囊泡内为 60~150 mmol/L, 细胞外为 0.6 μmol/L, 细胞内、外存在 10⁶ 的浓度差。以往的研究, 大多采用将大鼠断头取脊髓制备组织匀浆, 离心取上清液进行检测的方法, 这些传统的实验方法使得细胞破裂, 无法准确真实地反映活体细胞外液中 EAAs 和 IAAs 的水平, 本研究使用微透析技术在体监测细胞外液中 EAAs-IAAs 浓度的动态改变, 准确直观的反映了细胞外液中具有生物活性的 EAAs-IAAs 浓度的动态改变。本研究采用 SNI 模型, 该模型大鼠产生疼痛的个体差异性较小, 产生痛觉过敏的时间快于慢性坐骨神经缩窄损伤模型和脊神经结扎模型, 且疼痛效果优于其它疼痛模型^[9], 是较理想的神经病理性疼痛机制研究模型。本研究结果显示, SNI 大鼠 CSF 中 Glu 和 Asp 的持续升高发挥了兴奋性毒性作用, GABA 和 Gly 在损害初期(1 d)机体应激性的升高, 随后降至非常低的水平, EAAs-IAAs 平衡关系被破坏。在正常状态下 EAAs-IAAs 在脊髓水平应该保持平衡, 然而, 外周持续性的疼痛所导致的长期的病理状态打破了这个平衡, 导致脊髓突触传递和调制的异常变化, 即中枢敏化, 这样会反过来有助于持续性和慢性疼痛的发展^[1]。本研究检测了 SNI 大鼠脊髓水平 Glu、Asp、GABA、Gly 浓度的动态变化, 结果证明 SNI 大鼠脊髓水平 EAAs-IAAs 的失衡, 可能是神经病理性疼痛的机制之一。最新的一些研究表明多种类型慢性疼痛与氨基酸等位基因的变化有关^[10]。有学者证实脊髓氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase DAO)可作为治疗慢性疼痛的靶分子^[11]。Li 等^[12]发现糖尿病所引起的神经病理性疼痛中有 mGluR5 的表达使得脊髓背角神经元 Glu 的含量增加。更有令人振奋的证据表明, 怀孕可抑制脊髓释放 Glu 从而减弱神经性疼痛^[13]。所有这些最新的研究成果都从不同方面和角度佐证了本研究的准确性和重大意义, 基于此, 作者认为在神经病理性疼痛的治疗中重视恢复脊髓水平 EAAs-IAAs 的平衡尤为重要。(下转第 3265 页)

无肌无力危象、呼吸功能不全等并发症发生,是一种安全、可靠的麻醉方法。

参考文献:

- [1] Kanzaki M, Obara T, Sasano S, et al. Long-term clinical outcome after extended thymectomy combined postoperative high-dose steroid therapy for juvenile myasthenia gravis[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2008, 14(2): 119-122.
- [2] Wagner AJ, Cortes RA, Strober J, et al. Long-term follow-up after thymectomy for myasthenia gravis: thoracoscopic vs open[J]. *J Pediatr Surg*, 2006, 41(1): 50-54.
- [3] Essa M, El-Medany Y, Hajjar W, et al. Maximal thymectomy in children with myasthenia gravis[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, 24(2): 187-191.
- [4] Mekis D, Kamenik M. Remifentanyl and high thoracic epidural anaesthesia: a successful combination for patients with myasthenia gravis undergoing transsternal thymectomy[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2005, 22(5): 397-399.
- [5] White MC, Stoddart PA. Anesthesia for thymectomy in children with myasthenia gravis[J]. *Paediatr Anaesth*, 2004, 14(8): 625-635.
- [6] Bagshaw O. A combination of total intravenous anesthesia

and thoracic epidural for thymectomy in juvenile myasthenia gravis[J]. *Paediatr Anaesth*, 2007, 17(4): 370-374.

- [7] Liu W, Liu G, Fan Z, et al. Myasthenia gravis in pediatric and elderly patients[J]. *Chin Med J*, 2003, 116(10): 1578-1581.
- [8] Lindner A, Schalke B, Toyka KV. Outcome in juvenile-onset myasthenia gravis: a retrospective study with long term follow-up in 79 patients[J]. *J Neurol*, 1997, 24(4): 515-520.
- [9] Anlar B, Ozidirum E. Thymectomy in children with myasthenia gravis(letter)[J]. *Neuropediatrics*, 1999, 30(1): 49.
- [10] Itoh H, Shibata K, Nitta S. Sensitivity to vecuronium in seropositive and seronegative patients with myasthenia gravis[J]. *Anesth Analg*, 2002, 95(1): 109-113.
- [11] Mann R, Blobner M, Esselborn S, et al. Preanesthetic train-of-four fade predicts the atracurium requirement of myasthenia gravis patients[J]. *Anesthesiology*, 2000, 93(2): 346-350.
- [12] Abel M, Eisenkraft JB. Anesthetic implications of myasthenia gravis[J]. *Mt Sinai J Med*, 2002, 69(1/2): 31-37.
- [13] Michelle C, White B, Peter A. Anesthesia for thymectomy in children with myasthenia gravis[J]. *Pediatric Anesthesia*, 2004, 14(8): 625-635.

(收稿日期:2011-08-23 修回日期:2011-09-14)

(上接第 3243 页)

参考文献:

- [1] Yan LH, Hou JF, Liu MG, et al. Imbalance between excitatory and inhibitory amino acids at spinal level is associated with maintenance of persistent pain-related behaviors[J]. *Pharmacol Res*, 2009, 59(5): 290-299.
- [2] 薛庆峰, 杨天德. 阿米替林对 SNI 大鼠脑脊液中 EAAs-IAAs 浓度的影响[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(11): 1501-1504.
- [3] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [4] 毛庆祥, 杨天德. 阿米替林对神经病理性疼痛大鼠 GLAST 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(3): 390-393.
- [5] Olney JW. Brain lesion, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate[J]. *Science*, 1969, 164(880): 719-721.
- [6] Mao QX, Yang TD. Amitriptyline upregulates EAAT1 and EAAT2 in neuropathic pain rats[J]. *Brain Res Bull*, 2010, 81(4/5): 424-427.
- [7] Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system[J]. *Neuron*, 1988, 1(8): 623-634.

- [8] Johansen FF. Enhancement of GABA neurotransmission after cerebral ischemia in the rat reduces loss of hippocampal CA1 pyramidal cells[J]. *Acta Neurol Scand*, 1991, 84(1): 1-6.
- [9] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000, 87(9): 149-158.
- [10] Costigan M, Belfer I, Robert S, et al. Multiple chronic pain states are associated with a common amino acid-changing allele in KCNS1[J]. *Brain*, 2010, 133(9): 2519-2527.
- [11] Zhao WJ, Gao ZY, Wei H, et al. Spinal d-amino acid oxidase contributes to neuropathic pain in rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(1): 248-254.
- [12] Li JQ, Chen SR, Chen H, et al. Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain[J]. *J Neurochem*, 2010, 112(1): 162-172.
- [13] Kumar N, Laferriere A, Yu JS, et al. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate[J]. *J Neurochem*, 2010, 113(2): 552-561.

(收稿日期:2011-08-24 修回日期:2011-09-22)