

丹参注射液硬膜外腔注射对髓核移植大鼠痛阈及脊髓背角 P 物质和 CGRP 表达的影响*

李娟红^{1,3} 倪家骧^{1,2}

摘要 目的:研究丹参注射液硬膜外腔注射对髓核移植大鼠痛阈及脊髓背角 SP 和 CGRP 表达的影响。方法:选择雄性 SD 大鼠 24 只,均硬膜外腔植入尾椎髓核后硬膜外腔植管备用。随机分为 4 组,每组 6 只大鼠。术后第 6 天开始药物治疗,髓核+丹参组(DG 组)每日硬膜外腔注入丹参注射液 50 μ l,髓核+地塞米松组(MG 组)每日硬膜外腔注入地塞米松注射液 25 μ g/50 μ l,髓核+生理盐水组(SG 组)每日硬膜外腔注入生理盐水 50 μ l,未注药组(WG)硬膜外腔无药物注入处理。在术前、术后每天分别测定各组大鼠后爪对机械刺激的反应阈值(PWMT)。连续用药 14 天后第 15 天取 L4—L6 脊髓背角,采用免疫组织化学染色方法观察髓核对脊髓背角细胞肽类神经递质 SP 和 CGRP 表达的影响。结果:WG 组与 SG 组、MG 组、DG 组在术后 1—5 天内对机械刺激均产生明显的痛觉过敏,与术前比较 $P<0.05$;用药 14 天后 WG 组与 SG 组、MG 组、DG 组相比脊髓背角神经细胞 SP 和 CGRP 表达显著增加 ($P<0.05$);DG 组大鼠与 MG 组相比,脊髓背角神经细胞 SP 和 CGRP 表达没有显著性差异($P>0.05$);SG 组大鼠与 DG 组、MG 组相比,脊髓背角神经细胞 SP 和 CGRP 表达差异没有显著性意义($P>0.05$)。结论:硬膜外腔注射丹参注射液或地塞米松注射液或生理盐水可改善硬膜外腔移植异体髓核大鼠的痛觉过敏;可降低硬膜外腔移植异体髓核大鼠脊髓背角 SP 和 CGRP 表达。

关键词 椎间盘突出;髓核;硬膜外腔;丹参;P 物质;降钙素基因相关肽;椎间盘性疼痛

中图分类号:R493,R681.5,R285 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-08-0687-03

The effects of salvia miltiorrhiza injected into epidural space of rats on discogenic pain and expressions of SP and CGRP in dorsal horn of spinal cord/Li Juanhong, Ni Jiaxiang/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(8):687—690

Abstract **Objective:**To observe the effects of salvia miltiorrhiza injected into epidural space of rats with allografted nucleus pulposus on the discogenic pain threshold and the expressions of SP and CGRP in rat's L4-5 dorsal horn neurons of spinal cord, so as to provide theoretical evidence for the treatment of discogenic pain.**Method:** Twenty-four male SD rats were randomly divided into four groups with 6 rats in each. Nature saline (SG), salvia miltiorrhiza (DG) and dexamethasone (MG) were administered by injecting into epidural space once per day for 14 days according to different (SG, MG, DG) groups, respectively. Before and after drug injection, the posterior paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) was measured by Von Frey hair, and the expressions of SP and CGRP in L4-5 dorsal horn neurons of spinal cord were detected with immunohistochemistry technique. **Result:** After operation in the first 5 days all the rats of 4 groups had significant hyperalgesia to mechanical stimulation compared with that before operation ($P<0.05$); and then hyperalgesia were improved in SG, DG and MG groups compared with that in WG group. Fourteen days after drug injection, the expressions of SP and CGRP in dorsal horn of spinal cord reduced in MG group, DG group, SG group, respectively ($P<0.05$). **Conclusion:**Salvia miltiorrhiza, dexamethasone or nature saline injected into epidural space can reduce the discogenic hyperalgesia and the expressions of SP and CGRP in rat's L4-5 dorsal horn neurons of spinal cord.

Author's address Center of Pain Diagnosis and Treatment, Beijing Xuanwu Hospital, Beijing, China, 100053

Key words lumbar disc herniation; nucleus pulposus; epidural space, salvia miltiorrhiza; substance P; CGRP; discogenic pain

椎间盘突出症是引起头痛、肩背痛及坐骨神经痛的常见原因之一,严重影响患者的生存质量,其发病原因因为椎间盘组织的退行性改变导致椎间盘突出或脱出,导致神经源性疼痛和痛觉过敏,但其发病机制仍不完全清楚。目前普遍认为,髓核物质引发的免疫炎症反应是造成慢性神经源性疼痛、痛觉过敏及中枢敏化的最主要原因^[1-3],因此,上述环节的研究有助于阐述椎间盘突出所致的一系列病理生理变化。

硬膜外腔注射类固醇激素,临床已有广泛应用,但激素用后可升高肝糖原,升高血糖,对明确诊断糖尿病升高更明显,也已有明确的临床研究资料结果。本研

* 基金项目:北京市科委重大课题项目(Y0204003040631)

1 首都医科大学宣武医院疼痛科

2 通讯作者

3 现工作单位:北京老年医院疼痛科,100095

作者简介:李娟红,女,医学硕士,主治医师

收稿日期:2008-06-26

究探讨中药丹参注射液对椎间盘突出症治疗作用、安全性及其可能机制。为开辟除手术治疗以外的其他新的治疗方法提供科学依据,尤其对具有激素禁忌证患者有替代作用,对临床工作具有指导意义。

1 材料与方法

1.1 动物来源和分组

SPF级SD雄性大鼠33只,体质量260—280g,由北京大学医学部实验动物科学部提供[许可证号SCXK(京)2006]。其中24只随机分为4组,丹参组(DG)、地塞米松组(MG)、生理盐水组(SG)和未用药组(WG),每组6只。另外9只雄性SD大鼠用来提供异体髓核。

1.2 主要试剂

兔抗CGRP多克隆抗体(AB8056, abcam);兔抗SP多克隆抗体(AB1566, CHEMICON INTERNATIONAL)。

1.3 硬膜外腔髓核植入及导管放置手术制备

大鼠硬膜外腔开放手术制备:100g/L水合氯醛(400mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,做背侧中线40—50mm纵向切口,暴露L6/S1棘突,钝性分离两旁骶脊肌,切除L5棘突,清晰暴露L4/L5两侧关节突关节和椎孔,用显微钳钝性分离硬膜暴露硬膜外腔。大鼠深麻后处死,取尾椎椎间盘髓核,切成糊状。4组均硬膜外腔植入尾椎髓核(约3.0—4.0mg)后,硬膜外腔置入已经拉细的硬膜外腔导管(约为正常硬膜外导管长度的两倍),注意不造成机械压迫,将硬膜外导管固定于脊间韧带和皮下,然后逐层缝合肌肉、筋膜和皮肤,术后大鼠正常饮食。

1.4 干预措施

术后观察5天,每天用Von Frey 纤毛测大鼠后肢足底机械痛阈,第6天开始硬膜外腔注药每日1次,丹参组每日注入丹参注射液50 μ l,地塞米松组每日注入地塞米松注射液25 μ g/50 μ l,生理盐水组每日注入生理盐水50 μ l,未注药组不做处理。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 大鼠后肢足底对机械性刺激的反应:采用Von Frey 触针刺激,分别在手术前及注药后3、5、7、9、11、13、15天用不同粗细和不同长度的尼龙丝制成刺激强度不同的Von Frey 纤维。将一个30cm $\times$ 20cm $\times$ 25cm的透明有机玻璃箱放置于30cm高的铁丝网架上,将待测大鼠置于箱中。实验者手持纤维通过铁丝网格分别刺激大鼠两侧足底中心部位,刺激强度由小到大,每个强度反复刺激10次(每次间隔3—5s),将出现缩爪反射5次以上的最小纤维强度

定为大鼠的机械刺激回缩阈值。分别检测各组大鼠双后肢足底对Von Frey 触针诱发的回缩阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)。

1.5.2 脊髓背根神经节细胞SP和CGRP表达,采用免疫组织化学方法。

标本采集:4组实验组大鼠用药14天后,在水合氯醛腹腔注射深度麻醉后,开胸暴露心脏,在心尖处剪一小口,用灌注针穿刺入主动脉,同时剪开右心耳引流。先用200ml生理盐水灌注冲洗,然后用4%多聚甲醛缓冲液200ml灌注固定。手术解剖右侧L4/S1椎间孔,取出背根神经节放入4%多聚甲醛缓冲液固定。

冰冻切片的处理:标本冰冻切片,厚度为10 μ m,并且以每20取4片的方法取片,采用免疫组织化学方法测定背根神经节SP和CGRP表达,黄褐色为阳性表达。

图像分析:用麦克奥迪医学图像分析系统(Motic6.0)OLMPUS数码相机拍照,在相同分析准下测定进行定量灰度扫描,MN+@ 软件自动分析,通过显微摄像系统放大200倍,每张切片随机选取3个视野,测定DRG中CGRP、SP阳性表达的平均灰度值,分别代表CGRP、SP含量的多少,灰度值越大,表示CGRP、SP含量越多。MN+@ 软件自动分析,计算阳性物质表达面积。取同组平均值,即为每张切片的SP和CGRP的含量。

分析过程:①输图;②图像增强,阴影校正和对比度增强,选择测量区域;③图像分隔,设定阳性辉度阈值,计算机自动识别,最后画面整理;④结果分析。根据阳性面积占整个测量面积百分比,计算出阳性率。

1.6 统计学分析

计量资料表示为均数 $\pm$ 标准差,采用SPSS软件进行统计分析。组间比较单因素ANOVA方差分析,运用GLM过程, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 硬膜外腔注射对大鼠后肢足底Von Frey 触针机械性刺激反应的影响

注射前各组大鼠后肢足底对Von Frey 触针诱发的PWMT与手术前相比显著增加($P<0.05$),各组间相比无显著性变化($P>0.05$);注射后第9天和第15天,丹参组、地塞米松组、生理盐水组大鼠后肢足底PWMT与注射前相比显著增加($P<0.05$),和未注药在上述时间段相比显著增加($P<0.05$);未注药组在上述相同时间段自身相比无显著性变化($P>$

0.05), 见表 1。

2.2 硬膜外腔注射对脊髓后角细胞 SP 和 CGRP 表达的影响

注射后第 15 天, 丹参组、地塞米松组、生理盐水组大鼠 L4/5 脊髓后角细胞 SP 和 CGRP 表达分别与未用药组相比显著降低 $P<0.05$; 丹参组、地塞米松组分别与生理盐水组相比差异没有显著性意义 ($P>0.05$); 丹参组与地塞米松组相比未见明显差异 ($P>0.05$); 丹参组、地塞米松组、生理盐水组各自同组间与硬膜外腔注射药前相比显著降低 ($P<0.05$), 见表 2, 图 1—2。

表 1 4 组大鼠机械刺激右后肢足底回缩阈值变化 ($\bar{x}\pm s$)

时段	丹参组	地塞米松组	生理盐水组	未用药组
治疗前	2.3±0.18	2.3±0.18	2.3±0.18	2.3±0.18
治疗 4d 后	3.4±0.46	4.0±0.29	3.2±0.14	2.0±0.17 ^①
治疗 6d 后	3.8±0.34	4.3±0.31	3.5±0.26	2.5±0.22
治疗 8d 后	4.3±0.47	5.0±0.35	3.9±0.25	2.9±0.16
治疗 10d 后	6.3±0.39 ^②	6.7±0.33 ^②	5.9±0.23 ^②	3.4±0.21 ^①
治疗 12d 后	6.9±0.33 ^②	7.0±0.28 ^②	6.55±0.19 ^②	3.5±0.18 ^①
治疗 14d 后	7.8±0.41 ^②	8.1±0.33 ^②	7.5±0.21 ^②	3.8±0.15 ^①
治疗 16d 后	8.5±0.45 ^②	8.7±0.27 ^②	8.2±0.26 ^②	4.5±0.19 ^①

①未用药组同时段与其他三组两两比较 $P<0.05$; ②丹参组、地塞米松组、盐水组同组间与注药前比较 $P<0.05$ 。

表 2 4 组大鼠脊髓后角 SP 和 CGRP 的表达

($\bar{x}\pm s$, 阳性面积百分比)

	丹参组	地塞米松组	生理盐水组	未用药组
SP	17.2±0.37	16.8±0.23	17.9±0.26	29.8±0.16 ^①
CGRP	24.5±0.39	24.1±0.27	25.2±0.29	36.5±0.21 ^②

①未用药组脊髓后角 SP 同时段与其他三组两两比较 $P<0.05$; ②未用药组脊髓后角 CGRP 同时段与其他三组两两比较 $P<0.05$ 。

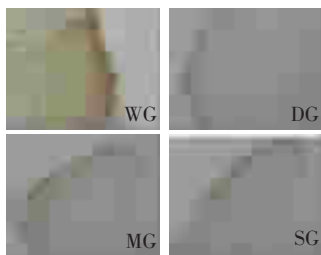


图 1 脊髓后角 SP 的表达

DG: 丹参组, MG: 地塞米松组, SG: 生理盐水组, WG: 未用药组

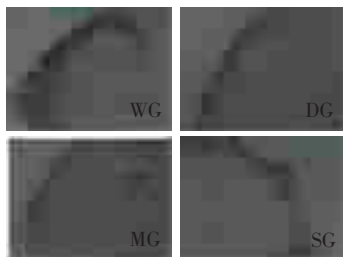


图 2 脊髓后角 CGRP 的表达

DG: 丹参组, MG: 地塞米松组, SG: 生理盐水组, WG: 未用药组

3 讨论

椎间盘源性下腰痛是因腰椎间盘发生退变后引起腰背部或(和)下肢疼痛的疾患, 是一种常见病。MRI 应用以来发现一些有放射性下肢痛者仅有纤

维环撕裂而神经根无受压; 而一些无腰腿痛症状的人行 CT 或 MRI 检查却有高达 30% 左右的椎间盘突出征象。这些事实动摇了机械性压迫学说, 越来越多的证据提示突出间盘对神经根的压迫牵拉因素可能不是引起症状和功能损害的主要因素。下腰痛发生的生化机制越来越受到人们的关注, 正常神经受压时并无疼痛发生, 只有炎症神经受压时才引起疼痛。手术证实, 椎间盘突出附近的神经根常有充血、水肿、炎症变化。这种炎性神经对疼痛异常敏感, 术中稍一触及神经即可引起患者严重疼痛。神经根炎发生机制主要是椎间盘变性, 纤维环薄弱破裂后, 液状的髓核液从破口溢出, 沿椎间盘和神经根之间的通道扩散。髓核液里的糖蛋白和 p 蛋白质对神经根有强烈的化学刺激性, 同时大量“H”物质(组织胺)的释放: 神经根又无神经束膜化学屏障, 因而产生化学性神经根炎; 由于直接的髓核化学刺激或继发于髓核的免疫反应, 已被认为与腰痛的产生密切相关。髓核中的化学性物质引起伤害感受器发放冲动造成疼痛的同时, 神经元本身又可合成和释放神经肽, 如 P 物质、VIP 等, 构成正反馈回路加重炎症反应过程, 从而导致持续性盘源性疼痛。

SP, CGRP 作为主要的肽能神经递质是近年来一个非常活跃的研究领域。研究表明, SP, CGRP 神经为损害性感受器传导痛觉, 同时具有强的扩血管能力, 也能促使组织重建, 在疼痛疾病的发生中起重要作用。疼痛疾病的发生与感觉神经系统释放 SP, CGRP 变化有关, 是广泛存在于神经系统内的神经递质和或神经调质。它们在感觉信息的传递中有非常重要的作用。目前已经证实 SP 是一种兴奋性神经递质或调质, 是由 C 类神经纤维释放的化学信息物质, 主要起传导痛觉的作用, SP 的羟基末段的六肽片段是其生物活性所必需, 参与伤害性信息的传递^[4-5]。CGRP 是目前已知的在背根节及脊髓后角中的与疼痛信息密切相关的神经递质, 它参与痛觉信息的传递和调制。正常大鼠脊髓背角的 I、II 和 V 层分布有 CGRP 免疫活性物质(CGRP2LI), 以背角 I 和 II 层最多, 它具有非常广泛的生物学效应, 是迄今为止发现的最强大的内源性血管舒张物质^[6-7]。目前认为, 含 CGRP 的感觉神经元既参与伤害性刺激向脊髓的传递^[8], 又参与调节所支配外周组织的炎症和免疫反应^[9-10]。

丹参是我国传统医药学中应用最早而且最广泛的药物之一, 也是采用现代医学方法进行研究的主要中药之一, 丹参注射液在椎间盘突出症患者硬膜外腔中应用有临床报道^[11], 但能否对脊髓内的 SP 和

CGRP 表达产生影响尚未见文献报道。丹参具有扩血管,改善微循环,改善脂质代谢过程^[12-13]。对神经细胞有保护作用^[14]。体内外实验证明,丹参对大鼠脑微粒体钠钾 ATP 酶活性有促进作用^[15-16]。此外,丹参还具有一定的抗氧化作用和抗炎作用,尤其对急性和亚急性炎症有良好治疗作用^[17]。近年研究发现丹参对多种细菌有明显的抗菌作用且无耐药性^[24]。这些特性都具有硬膜外腔注射用药的优势。

本研究结果提示硬膜外腔注射丹参能明显改善硬膜外腔异体髓核植入大鼠的机械痛阈,其机制可能是通过降低背根神经节 SP 和 CGRP 向中枢端的释放,从而降低脊髓背角的 SP 和 CGRP 的合成,进而降低了大鼠的机械痛阈;但在临床大量应用之前,还需要做一系列丹参注射于硬膜外腔的毒理试验和长期的硬膜外腔结构的影响的研究。

已知椎间盘突出症是多因素、多环节、多靶点的综合反应,绝非单一因素造成。本研究仅从某些方面进行研究,从一个侧面论证了一定药物硬膜外腔注射有助于缓解椎间盘突出症患者的腰腿痛,还有其他方面因素的影响有待于进一步的研究;提示硬膜外腔注射用药有可能成为某些疾病治疗的新的给药途径,但其安全性和适应证还有待于大量的系列的基础和临床的深入研究。

参考文献

- [1] Anzai H, Hamba M, Onda A, et al. Epidural application of nucleus pulposus enhances nociceptive responses of rat dorsal horn neurons[J]. Spine, 2002, 27(3): E50—55.
- [2] Onda A, Yabuki S, Kikuchi S. Effects of neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- α on nucleus pulposus-induced abnormal nociceptive responses in rat dorsal horn neurons[J]. Spine, 2003, 28: 967—972.
- [3] Obata K, Tsujino H, Yamanaka H, et al. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation[J]. Pain, 2002, 99(1-2):121—132.
- [4] Cuellar JM, Montesano PX, Carstens E. Role of TNF- α in sensitization of nociceptive dorsal horn neurons induced by application of nucleus pulposus to L5 dorsal root ganglion in rats[J]. Pain, 2004, 110(3):578—587.
- [5] Onda A, Murata Y, Rydevik B, et al. Immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor in rat dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn following exposure to herniated nucleus pulposus[J]. Neurosci Lett, 2003, 352:49—52.
- [6] Huang YX, Chu ZH, Zhang SL, et al. The influence and significance of acupuncture on the plasma motilin, somatostatin and endothelin in healthy subjects [J]. J Fourth Mil Med Univ, 1998, 19(1):28—30.
- [7] Booth BP, Tabrizi-Fard MA, Fung H. Calcitonin gene-related peptide dependent vascular relaxation of rat aorta. An additional mechanism of nitroglycerin [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59 (12):1603—1609.
- [8] Wang S, Yang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-x1 with non-peptide small molecule antagonists [J]. Semin Oncol, 2003, 30:133—142.
- [9] Yan L, Zhao H, Li YQ. Co-localization of GABAB receptor and serotonin in neurons of the central endogenous pain control system of the rat [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2001, 22 (10): 868—872.
- [10] Yan L, Zhao H, Li YQ. Localization of GABA B receptor in the central endogenous pain control system of rats[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2001, 22(10): 873—877.
- [11] 夏令杰, 孟凡民. 硬膜外腔注射不同组合药物对兔神经根炎症及硬膜外腔粘连的疗效观察 [J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(8): 479—482.
- [12] Maki T, Kawahara Y, Tanonaka KY, et al. Effects of tanshinone VI on the hypertrophy of cardiac myocytes and fibrosis of cardiac fibrosis of neonatal rats [J]. Planta Med, 2002, 68(12):1103—1107.
- [13] Ko JS, Ryu SY, Kim YS, et al. Inhibitory activity of diacylglycerol acyltransferase by tanshinones from the root of salvia miltiorrhiza [J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(4):446—448.
- [14] Lam BY, Lo AC, Sun X, et al. Neuroprotective effects of tanshinones in transient focal cerebral ischemia in mice [J]. Phytomedicine, 2003, 10(4):286—289.
- [15] 何素冰, 何丽娜, 扬军. 丹参酮对大鼠皮层神经细胞钙超载损伤的保护作用[J]. 中成药, 2002, 24(5):371—373.
- [16] Lo CJ, Lin JG, Kuo JS, et al. Effect of salvia miltiorrhiza bunge on cerebral infarct in ischemia-reperfusion injured rats [J]. Am J Chin Med, 2003, 31:191—200.
- [17] Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid [J]. Phytochemistry, 2003, 62(2):121—125.