

【基础研究】

通信作者:杜剑青(1953-),男,陕西铜川人,博士,教授,研究方向:心脏痛觉的神经生物学机制研究;E-mail:dujianq@mail.xjtu.edu.cn。

After 30 minutes of intrapericardial injection of drugs,the rats in each group were perfused with fixative and T3 – T5 spinal cords were taken. Immunohistochemical staining was used to detect the number of pCREB immunopositive cells in the spinal dorsal horn of rats in each group. **Results** The rats in the blank group,the vehicle group and the LRN electrical damage group did not have an EMG response that exceeded the baseline activity by 10%. The number of EMG response in the dorsi trapezius muscle and pCREB immunopositive cells in the spinal dorsal horn of rats in the capsaicin group and the LRN electrical damage + capsaicin group were significantly higher than those in the blank group,the vehicle group and the LRN electrical damage group ($P<0.05$). The number of EMG response in the dorsi trapezius muscle and pCREB immunopositive cells in the spinal dorsal horn of rats in the LRN electrical damage + capsaicin group were significantly higher than those in the capsaicin group ($P<0.05$). **Conclusion** Intrapericardial injection of capsaicin can induce the EMG response of the dorsal trapezius muscle and increase the number of pCREB immunopositive cells in the spinal dorsal horn of rats. LRN has a downward tension inhibition effect on rat's heart nociception.

Key words: capsaicin;phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element binding protein;lateral reticular nucleus;electromyogram;downward tension inhibition

延髓外侧网状核(lateral reticular nucleus,LRN)在下行镇痛系统中发挥重要作用,激活LRN能够抑制脊髓背角神经元的伤害性反应,产生镇痛作用^[1-2]。本课题组前期的研究也表明,激活LRN对大鼠心包内注射致痛物质诱发的背斜方肌放电具有抑制作用^[3-4]。研究表明,心包内注射致痛物质能够诱发c-Fos在脊髓的表达^[5-6]。c-Fos是公认的伤害性感受神经元兴奋的标志物。环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate response element binding protein,CREB)在炎症、神经损伤等诱发的自发性疼痛、痛觉过敏以及中枢敏化的形成过程中发挥重要作用^[7-9]。在脊髓痛觉过敏模型中磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element binding protein,pCREB)具有诱导c-Fos表达的作用,提示pCREB可能是c-Fos表达的必要条件^[10]。伤害性刺激后CREB磷酸化更加敏感和迅速,因此,pCREB作为神经元激活的指标被广泛地应用于痛觉相关研究中。辣椒素作为一种化学致痛物质常被用来诱发心脏伤害性感受反应。辣椒素通过激活伴随交感神经和迷走神经的感觉神经末梢实现痛觉信息向中枢的传递。但致痛物质诱发的下行抑制作用是通过化学或电刺激激活LRN内神经元产生的,LRN对心包内注射辣椒素诱发的心脏伤害性感受是否具有下行紧张性调控作用尚不清楚。本研究拟探讨大鼠心包内注射辣椒素对pCREB在脊髓背角表达的影响及LRN对心脏伤害性感受的下行紧张性调控作用,以期为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性10周龄Sprague Dawley大鼠30只,体质量280~300 g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 戊巴比妥钠粉、辣椒素干粉购自美国Sigma公司,兔抗大鼠pCREB多克隆抗体

购自美国Abcam公司,吐温80、无水乙醇购自广东光华化学有限公司,多聚甲醛、苦味酸购自天津福晨化学试剂厂;蠕动泵购自保定兰格恒流泵有限责任公司,小动物呼吸机购自淮北市淮北正华生物仪器设备有限公司,BL-420A生物信号采集与分析系统及压力换能器购自成都泰盟生物科技有限公司,大鼠脑立体定位仪购自日本Narishige公司,冰冻切片机购自德国Leitz公司,Olympus生物显微镜购自日本Olympus公司。

1.3 试剂的配制 辣椒素溶液的制备:辣椒素干粉1 mg溶于0.5 mL吐温80和0.5 mL无水乙醇混合液中,4℃保存,使用时用生理盐水稀释到 $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。戊巴比妥钠注射液的制备:将戊巴比妥钠粉溶解于生理盐水中,配制成 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的注射液。

1.4 动物分组及模型制备 采用随机数字表法将30只雄性10周龄清洁级Sprague Dawley大鼠随机分为空白组、溶媒组、辣椒素组、LRN电损毁组和LRN电损毁+辣椒素组,每组6只。各组大鼠以 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 戊巴比妥钠($55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)腹腔注射麻醉。空白组大鼠不进行手术处理。溶媒组、辣椒素组、LRN电损毁组和LRN电损毁+辣椒素组大鼠均行心包内插管术。具体措施:于左侧上胸部第1到第3肋软骨处行开胸术,暴露胸腺和心脏。用玻璃探针在大鼠心包膜上开一小孔,将内径0.051 cm、外径0.094 cm、长12~14 cm、远端有数个小洞的硅胶管顺胸腺中线经此孔插入心包约2 cm,依次缝合各层胸壁组织,以固定心包插管。LRN电损毁组和LRN电损毁+辣椒素组大鼠行双侧LRN电损毁,具体方法:将大鼠头部固定于脑立体定位仪上,剪开枕骨处头皮,钝性分离附着于枕骨处的肌肉,剥离骨膜,暴露枕骨。用微型电钻钻透枕骨,保留硬脑膜,用咬骨钳剥离部分枕骨,在胃部水平去除硬脑膜和软脑膜。以写翻为零坐标确定核团位置,确定LRN三维坐标位置为:吻侧0.3~0.5 mm,旁开1.8~

2.2 mm, 脑表面下 2.8 ~ 3.2 mm。用内径为 0.2 mm 的同芯电极,按确定的坐标位置用电动微推进器将同芯电极推入至 LRN,给予双侧 LRN 无序电损毁。电损毁参数:0.1 ms,100 Hz,100 μ A 的阳极电流 30 s。大鼠心包插管后 1 h,回抽心包积液。溶媒组大鼠于心包内注射 0.2 mL 溶媒(含有 0.1 mL 的吐温 80 和 0.1 mL 无水乙醇);辣椒素组及 LRN 电损毁 + 辣椒素组大鼠于心包内注射 0.2 mL 辣椒素(0.01 g \cdot L⁻¹);LRN 电损毁组大鼠不注射任何溶液。暴露各组大鼠左侧背斜方肌,同芯电极以 30° 的角度插入背斜方肌约 1.5 ~ 1.7 mm。心包内注射药物同时,通过 BL-420A 生物信号采集与分析系统记录其肌电(electromyogram,EMG)反应数目,空白组大鼠在维持麻醉 1 h 后记录 EMG。EMG 幅度超出基线活动(20 μ V)的 10%,可认为是由辣椒素诱发的反应。

1.5 灌注取材及切片制备 各组大鼠经心包内注射药物 30 min 后,暴露大鼠心脏,经左心室升主动脉插管灌注固定。先用 150 mL PBS(0.01 mol \cdot L⁻¹,pH 7.4)快速灌流,继之以约 200 mL 含体积分数 30% 饱和苦味酸和含 40 g \cdot L⁻¹ 多聚甲醛的磷酸缓冲液(0.1 mol \cdot L⁻¹,pH 7.4)快速灌注固定,然后再以同样的固定液 250 mL 缓慢滴注,持续 1.5 ~ 2.0 h。灌注完毕后取各组大鼠 T3 ~ T5 脊髓,置于上述新鲜固定液中固定 4 h(4 $^{\circ}$ C)。将固定后的组织转入磷酸缓冲液中(4 $^{\circ}$ C),沉底后,冰冻切片,脊髓切片厚约 30 μ m。T3 ~ T5 脊髓按照切片顺序隔 3 取 1,分 2 组收集于含 0.01 mol \cdot L⁻¹ PBS 的洗片盒中备用。

1.6 免疫组织化学染色法检测大鼠脊髓背角中 pCREB 的表达 各组脊髓切片置于体积分数 3% 过氧化氢中孵育 5 min,PBS(0.01 mol \cdot L⁻¹)漂洗 5 min,山羊血清室温封闭 1 h,加入一抗 pCREB(1 : 1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育 72 h,PBS(0.01 mol \cdot L⁻¹)漂洗 5 min,生物素标记山羊抗兔二抗室温孵育 30 min,PBS(0.01 mol \cdot L⁻¹)漂洗 5 min,辣根过氧化物标记的链霉卵白素室温孵育 2 h,PBS(0.01 mol \cdot L⁻¹)漂洗 5 min,二氨基联苯胺显色并在光学显微镜下观察至细胞质出现黄色或棕黄色而背景未明显黄染终止反应。设立阴性对照,用 PBS 代替一抗。Olympus 光学显微镜(BX51)照相,SPOT 软件对切片进行图像采集,Imag-Pro-Plus 软件计数 pCREB 免疫阳性细胞数目。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著性差异法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 组大鼠背斜方肌 EMG 反应数目比较 结果见表 1。空白组、溶媒组及 LRN 电损毁组大鼠背斜方肌均无超出基线活动 10% 的 EMG 反应。辣椒素组大鼠背斜方肌 EMG 反应数目显著高于空白组、溶媒组和 LRN 电损毁组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。LRN 电损毁 + 辣椒素组大鼠背斜方肌 EMG 反应数目均显著高于空白组、溶媒组、LRN 电损毁组及辣椒素组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 5 组大鼠背斜方肌 EMG 反应数目比较
Tab.1 Comparison of the number of EMG response of rats among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	EMG 反应数目/个
空白组	6	0.0 \pm 0.0
溶媒组	6	0.0 \pm 0.0
辣椒素组	6	2 693.5 \pm 80.0 ^{abc}
LRN 电损毁组	6	0.0 \pm 0.0
LRN 电损毁 + 辣椒素组	6	3 021.2 \pm 110.0 ^{abcd}

注:与空白组比较^a $P < 0.05$;与溶媒组比较^b $P < 0.05$;与 LRN 电损毁组比较^c $P < 0.05$;与辣椒素组比较^d $P < 0.05$ 。

2.2 5 组大鼠脊髓背角中 pCREB 的表达 结果见表 2。空白组大鼠 T3 ~ T5 脊髓背角中 pCREB 免疫阳性细胞数与溶媒组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。辣椒素组大鼠 T3 ~ T5 脊髓背角 pCREB 免疫阳性细胞数显著高于空白组和溶媒组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。LRN 电损毁组大鼠脊髓背角 pCREB 免疫阳性细胞数与空白组和溶媒组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。LRN 电损毁 + 辣椒素组大鼠脊髓背角 pCREB 免疫阳性细胞数显著高于空白组、溶媒组、辣椒素组、LRN 电损毁组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 5 组大鼠脊髓背角 pCREB 免疫阳性细胞数目比较
Tab.2 Comparison of the number of pCREB immunopositive cells in the spinal dorsal horn of rats among the five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	pCREB 阳性细胞数目/个
空白组	6	10.50 \pm 1.38
溶媒组	6	11.33 \pm 1.21
辣椒素组	6	111.00 \pm 6.87 ^{ab}
LRN 电损毁组	6	14.17 \pm 1.47
LRN 电损毁 + 辣椒素组	6	164.33 \pm 9.07 ^{abcd}

注:与空白组比较^a $P < 0.05$;与溶媒组比较^b $P < 0.05$;与辣椒素组比较^c $P < 0.05$;与 LRN 电损毁组比较^d $P < 0.05$ 。

3 讨论

心源性疼痛的发生通常是由于各种原因导致心肌缺血发作时释放多种化学物质引起的,如钾离子、5-羟色胺、缓激肽、三磷酸苷等,并激活伴随心交感和心迷走神经的传入纤维末梢^[11-13]。研究表明,心肌和心脏表层的 C 类纤维末梢广泛分布着辣椒素

受体(瞬时型感受器电位香草醛亚型),其能够被多种化学性致痛物质激活,是心脏重要的伤害性感受器之一^[14-15]。QIN 等^[16]研究发现,大鼠心包内注射辣椒素激活了心脏传入纤维末梢,显著改变了脊髓内心脏伤害性感受神经元的活动。

CREB 是一种促使基因转录增强的真核生物结合型转录因子,以去磷酸化的无活性形式存在于细胞核中,通过磷酸化激活后发挥其作用。许多 CREB 的靶基因被证实与中枢敏感性有关,如 c-Fos、强啡肽、脑啡肽、降钙素基因、相关肽受体基因等,这些由 CREB 介导的基因表达,在各种伤害性刺激引起的神经元长时程可塑性变化中发挥重要作用^[17-18]。观察 c-Fos 在中枢神经系统的空间表达状况是探索伤害性感受神经通路最常用的方法之一^[19]。但伤害性刺激后 CREB 磷酸化更加迅速和敏感,因此, pCREB 作为伤害性刺激后神经元激活的指标较 c-Fos 更敏感^[20]。

由于本研究对大鼠手术创伤较大,为了避免手术创伤对大鼠脊髓背角中 pCREB 表达的影响,各组大鼠均在手术完毕 1 h 后进行心包内注射药物,心包内注射药物 30 min 后灌注取材检测 pCREB 的表达。本研究发现,辣椒素组和 LRN 电损毁+辣椒素组大鼠的背斜方肌 EMG 反应数目以及脊髓背角中 pCREB 免疫阳性细胞数均显著高于空白组、溶媒组和 LRN 电损毁组,表明大鼠心包内注射辣椒素能诱发背斜方肌 EMG 反应(心脏-躯体运动反射的指标),辣椒素作为一种化学刺激物能够激活心脏伤害性感受传入纤维末梢,同时证明 pCREB 可作为心脏伤害性感受观测指标之一。这与本课题组前期研究一致^[21]。

LRN 是中枢内源性镇痛系统的一个重要结构。本课题组前期的研究表明,局部化学刺激或电刺激激活 LRN 神经元对心脏伤害性感受产生显著的镇痛效应^[4],但是对于 LRN 是否对心脏伤害性感受具有下行紧张性抑制作用不清楚。本研究中 LRN 电损毁+辣椒素组大鼠组大鼠 pCREB 免疫阳性神经元在脊髓背角的表达较辣椒素组显著增多,提示 LRN 对大鼠心脏伤害性感受具有下行紧张性抑制作用,而其机制还需进一步的研究。

参考文献:

[1] 韩济生. 神经科学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2009:657-659.

[2] MILLAN M J. Descending control of pain[J]. *Prog Neurobiol*, 2002,66(6):355-474.

[3] HAN M, LIU X H, SUN N, *et al*. Lateral reticular nucleus modulates the cardio-somatic reflex evoked by intrapericardial capsaicin in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2013,37(9):1511-1518.

[4] 韩曼, 刘晓华, 杜剑青. 脊髓 5-羟色胺受体参与延髓外侧网状核大鼠心脏伤害性感受的下行性抑制调控[J]. 南方医科大

学学报,2017,37(9):1190-1194.

[5] HUA F, HARRISON T, QIN C, *et al*. c-Fos expression in rat brain stem and spinal cord in response to activation of cardiac ischemia-sensitive afferent neurons and electrostimulatory modulation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004,287(6):H2728-2738.

[6] ALBUTAIHI I A, DEJONGSTE M J, TERHORST G J. An integrated study of heart pain and behavior in freely moving rats (using fos as a marker for neuronal activation)[J]. *Neurosignals*, 2004,13(5):207-226.

[7] SHAO X M, SUN J, JIANG Y L, *et al*. Inhibition of the cAMP/PKA/CREB pathway contributes to the analgesic effects of electroacupuncture in the anterior cingulate cortex in a rat pain memory model[J]. *Neural Plast*, 2016,2016:5320641.

[8] CAO H, REN W H, ZHU M Y, *et al*. Activation of glycine site and GluN2B subunit of NMDA receptors is necessary for ERK/CREB signaling cascade in rostral anterior cingulate cortex in rats: implications for affective pain[J]. *Neurosci Bull*, 2012,28(1):77-87.

[9] 李亚楠,周海燕. ERK-CREB 信号通路参与慢性疼痛中枢敏化的形成[J]. 药物评价研究,2019,42(4):805-808.

[10] JI R R, RUPP F. Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-Fos induction[J]. *J Neurosci*, 1997,17(5):1776-1785.

[11] TOMAI F, CREA F, GASPARDONE A, *et al*. Mechanisms of cardiac pain during coronary angioplasty[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1993,22(7):1892-1896.

[12] CREA F, GASPARDONE A. New look to an old symptom: angina pectoris[J]. *Circulation*, 1997,96(10):3766-3773.

[13] NERDRUM T, BAKER D G, COLERIDGE H M, *et al*. Interaction of bradykinin and prostaglandin E1 on cardiac pressor reflex and sympathetic afferents[J]. *Am J Physiol*, 1986,250(5 Pt 2):R815-R822.

[14] HAHNER M R, LI D P, CHEN S R, *et al*. Cardiac vanilloid receptor 1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats[J]. *J Physiol*, 2003,551(Pt 2):515-523.

[15] WANABE H, MURAKAMI M, OHBA T, *et al*. The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease[J]. *Circ J*, 2009,73(3):419-427.

[16] QIN C, FARBER J P, MILLER K E, *et al*. Responses of thoracic spinal neurons to activation and desensitization of cardiac TRPV1-containing afferents in rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006,291(6):R1700-1707.

[17] JI R R, RUPP F. Phosphorylation of transcription factor CREB in rat spinal cord after formalin-induced hyperalgesia: relationship to c-Fos induction[J]. *J Neurosci*, 1997,17(5):1776-1785.

[18] WHITE D M, WALKER S, BRENNEMAN D E, *et al*. CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor[J]. *Brain Res*, 2000,868:31-38.

[19] HARRIS J A. Using c-Fos as a neural marker of pain[J]. *Brain Res Bull*, 1998,45(1):1-8.

[20] 王迎斌,王书宝,谢建琴. 鞘内注射 KN-93 对神经病理性疼痛大鼠热痛觉过敏和脊髓背角 pCREB 的影响[J]. 临床麻醉学杂志,2009,25(2):151-153.

[21] 韩曼, 刘晓华, 杜剑青. 中脑导水管周围灰质腹外侧区微注射内吗啡肽 1 诱导大鼠心脏伤害性感受的下行性抑制[J]. 南方医科大学学报,2018,38(9):1066-1070.