

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.01.0005

·论著·

三叉神经痛大鼠三叉神经节内谷氨酸表达分布的研究

胡秀敏¹,江远仕²,张盛涨³

(1.广东医学院,广东 湛江 524023;

2.广东医学院附属福田区人民医院 汕头大学第二附属医院耳鼻喉头颈外科,广东 深圳 518000;

3.广东医学院附属深圳市福田区人民医院耳鼻喉头颈外科,广东 深圳 518000)

【摘要】目的 研究三叉神经痛(TN)大鼠时其三叉神经节(TG)内谷氨酸(Glu)表达与分布的关系。**方法** 皮下注射硝酸甘油构建三叉神经痛大鼠模型;应用免疫组化技术检测大鼠三叉神经节 Glu 含量与分布。**结果** 皮下注射硝酸甘油构建三叉神经痛大鼠的三叉神经节内 Glu 含量增多且其主要分布在三叉神经节表层。**结论** Glu 可能与三叉神经痛发生有密切关系。

【关键词】 硝酸甘油;谷氨酸;三叉神经痛;三叉神经节**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)01—0015—03

Distribution of glutamic acid expression within the trigeminal ganglia in rats with trigeminal neuralgia. HU Xiu-min¹, JIANG Yuan-shi², ZHANG Sheng-zhang³. 1. Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, Guangdong, CHINA; 2. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, People's Hospital of Futian District of Shenzhen Affiliated to Guangdong Medical School, the Second Affiliated Hospital of Shantou University, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA; 3. Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, People's Hospital of Futian District of Shenzhen Affiliated to Guangdong Medical School, Shenzhen 518000, Guangdong, CHINA

[Abstract] **Objective** To study the distribution of glutamate (Glu) expression within the trigeminal ganglia (TG) in rats with trigeminal neuralgia (TN). **Methods** Rats models with TG were constructed by subcutaneous injection of nitroglycerin trigeminal neuralgia. Immunohistochemical technique was applied to detect the contents and distribution of Glu. **Results** The level of glutamic acid was found increased in trigeminal ganglion in the rat models, and it was mainly distributed in the surface layer of trigeminal ganglion. **Conclusion** Glu may have close relationship with TN.

【Key words】 Glyceryl trinitrate; Glutamate; Trigeminal neuralgia; Trigeminal ganglion

基金项目:广东省自然科学基金(编号:040112155);深圳市重点科研基金(编号:20110421225)

通讯作者:江远仕。E-mail:jysh@163.com

参考文献

- [1] Massilamany C, Gangplara A, Steffen D, et al. Identification of novel mimicry epitopes for cardiac myosin heavy chain- α that induce autoimmune myocarditis in A/J mice [J]. Cell Immunol, 2011, 271(2): 438-449.
- [2] Bevan AL, Zhang H, Li Y, et al. Nitric oxide and Coxsackievirus B3 myocarditis: differential expression of inducible nitric oxide synthase in mouse heart after infection with virulent or attenuated virus [J]. J Med Virol, 2001, 64(2): 175-182.
- [3] 韩丽娜, 李铁岭, 丁国雷, 等. 人心肌C蛋白诱导实验性自身免疫性心肌炎模型的建立 [J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(8): 690-696.
- [4] Haasken S, Auger JL, Binstadt BA. Absence of β_2 integrins impairs regulatory T cells and exacerbates CD 4^+ T cell-dependent autoimmune carditis [J]. J Immunol, 2011, 187(5): 2702-2710.
- [5] Maffei A, Di Pardo A, Carangi R, et al. Nebivolol induces nitric oxide release in the heart through inducible nitric oxide synthase activation [J]. Hypertension, 2007, 50(4): 652-656.
- [6] Zenebe WJ, Nazarewicz RR, Parihar MS, et al. Hypoxia/reoxygenation of isolated rat heart mitochondria causes cytochrome c release and oxidative stress; evidence for involvement of mitochondrial nitric oxide synthase [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 43(4): 411-419.
- [7] Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart [J]. Cardiovasc Res, 2007, 75(2): 283-290.
- [8] Hulsmans M, Van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2012, 14: 264-276.
- [9] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(4): 1620-1624.
- [10] Matsumoto Y, Park IK, Kohyama K. Matrix metalloproteinase (MMP)-9, but not MMP-2, is involved in the development and progression of C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy [J]. J Immunol, 2009, 183(7): 4773-4781.

(收稿日期:2014-06-26)

三叉神经痛(TN)是一种原发性神经痛,累及面部三叉神经一支或两支分布区,表现为反复性、慢性头痛。发作时表现为以面颊上下颌及舌部明显的剧烈电击样、针刺样、刀割样或撕裂样疼痛,突发突止,间歇期完全正常,可伴有恶心、呕吐、畏声、畏光等症状。目前三叉神经痛发病机制还不是很清楚。谷氨酸(Glu)是公认的神经系统兴奋性递质,它能通过谷氨酸受体参与三叉神经系统内的痛觉信息的传递^[1], Glu 也是神经系统分布很广泛的一种重要的神经递质,广泛参与各种神经的调节,可能与三叉神经痛的发作有密切联系。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物与分组:健康 SD 大鼠 16 只,体重 220~260 g;由广东省实验动物中心提供动物编号:SCXK(粤)2013-0008。实验动物合格证号:按体重均衡原则将大鼠随机分成对照组(生理盐水, n=8 只)、模型组(硝酸甘油组, n=8 只),分别皮下注射硝酸甘油与生理盐水后,1 h 灌注取材。②主要试剂与仪器:硝酸甘油(广州明兴制药有限公司,批号 MC 2407),免抗鼠谷氨酸多克隆抗体(Millipore Corporation,一抗),批号:2204896,PV-6001二步法免疫组化检测试剂(北京中杉金桥生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠三叉神经痛模型的建立 参照Tassorelli等^[2]皮下注射硝酸甘油,SD 大鼠按 10 mg/kg 颈部皮下注射硝酸甘油。一般注射后 5~10 min 大鼠出现双耳发红、爬笼次数增多、后肢频繁挠头、烦躁不安等现象,约 40 min 后达到高峰。此现象可持续 3~5 h,之后大鼠呈现蜷卧、活动减少状态,此为造模成功。对照组大鼠皮下注射等体积生理盐水,大鼠仅在 20 min 内略有挠头现象,之后趋于正常,也未出现双耳发红、爬笼次数增多和其他烦躁不安现象。

1.2.2 免疫组化标本留取 对照组在皮下注射生理盐水、模型组注射硝酸甘油 1 h 后,然后用 10% 的水合氯醛以 400 mg/kg 给大鼠腹腔麻醉,打开胸腔,在心尖处剪一个小口,灌注针经左心室插入升主动脉,同时把右心耳剪开以便于血液以及灌注液流出,另一端接 50 ml 注射器,开始先用生理盐水快速灌注大约 500 ml 生理盐水至肝脏变白,右心流出生理盐水,再注射约 200 ml 4% 的多聚甲醛(溶于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 7.4)溶液,灌注先快后慢大约 20 min 灌完,在灌注之前可以先注射适量肝素使血液肝素化。灌注过程中用止血钳止住腹主动脉,固定后断头取三叉神经节,置于 4% 多聚甲醛 0.1 mol/L PBS 液中固定 4 h。全自动脱水机脱水后石蜡包埋,石蜡切片机切片,切片厚度为 3 μm,贴于 APES 硅胶防脱

载玻片上,63℃ 12 h 烤干备用。切片常规脱蜡至水,4 罐二甲苯依次脱蜡 8 min 后无水乙醇(100%、95%、85%、75%)脱水依次 3 min,热修复抗原:将切片放入盛有 0.01 mol/L 枸橼酸钠缓冲溶液(pH 6.0)对抗原中进行修复,自然冷却后 PBS 洗 3 遍,3% H₂O₂ 室温孵以灭活内源性酶活性进行封闭,然后暗室室温 10 min, PBS 洗 3 遍,滴加一抗(Anti 谷氨酸抗体,兔抗大鼠 1:2 000,购于 Millipore Corporation),4℃ 冰箱过夜,复温 30 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min;滴加二抗(PV-6001 北京中杉金桥生物有限公司),室温 90 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min;二氨基联苯胺(Diamino-benzidine,DAB)显色,蒸馏水冲洗 5 min,苏木精复染 1 min,梯度酒精脱水,蒸馏水冲洗 5 min,二甲苯透明,中性树胶封片。阴性对照用 0.01 mol/L 的 PBS 代替一抗显色,其他步骤不变,结果均为阴性。为了保证可比性,实验组和对照组切片在同一反应条件、同一染缸中进行,其他反应条件保持不变。

1.3 图像分析 TG 染色后,显微镜下拍照,用 Image tool 图像分析系统观察分析光密度。

1.4 统计学方法 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析,计量数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间数据间的统计采用方差分析。以 $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

皮下注射硝酸甘油组大鼠谷氨酸阳性免疫反应细胞主要分布在三叉神经节表层细胞,TG 的神经细胞内呈棕褐色染色,位于胞浆、胞核处,胞核素木苏复染呈现蓝色。注射生理盐水组大鼠 TG 谷氨酸感觉神经元大部分呈现阴性反应。于每只大鼠 TG 切片中隔 5 张取 1 张切片,用图像分析系统软件分析 Glu 阳性神经元的光密度变化。硝酸甘油组和生理盐水组阳性神经元的平均光密度分别为(0.354 5±0.257 1) 和(0.166 2±0.064 3)。硝酸甘油组 TG 中 Glu 的表达较生理盐水组明显增加($F=403.387, P<0.01$),见图 1。

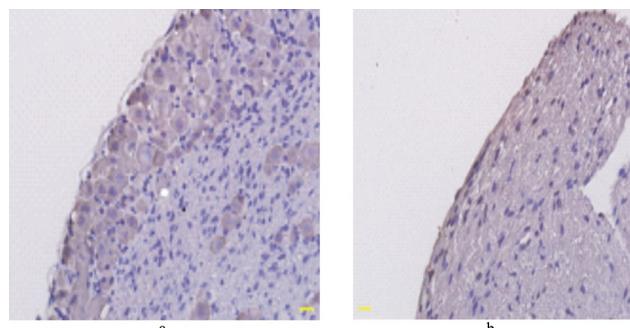


图 1 谷氨酸在各组 SD 大鼠三叉神经节中的表达
注:a,谷氨酸在三叉神经节中的表达(硝酸甘油组 PV-6001二步法, $\times 200$);
b,谷氨酸在三叉神经节中的表达(生理盐水组 PV-6001二步法, $\times 200$)。

3 讨 论

三叉神经痛是临幊上一种比较常见的疾病,具有广泛的发病年龄,从 10 岁到 90 岁均可发病,其中以 40 岁以上的中年人居多,近年来儿童的发病率逐渐增加,女性多见。三叉神经痛以两侧或一侧面部三叉神经分布区内反复发作的阵发性剧烈痛为主要表现,发作时表现为以面颊上下颌及舌部明显的剧烈电击样、针刺样、刀割样或撕裂样疼痛,突发突止,间歇期完全正常,可伴有恶心、呕吐、畏声、畏光等症状,严重影响患者的生命质量,被认为是人类最痛苦的疾病之一。三叉神经分为继发性和原发性三叉神经痛,以后者多见,且发病机制与病因不明,可能涉及外周、中枢及免疫因素等。继发性三叉神经痛是由于肿瘤、外伤、炎症等原因引起的痛,目前临幊上虽然有多种治疗方法,但效果均不理想。

本实验通过硝酸甘油组与生理盐水组作比照,硝酸甘油组 Glu 表达明显高于生理盐水组,通过 Glu 表达与分布揭示 TN 与 Glu 的密切关系。对神经递质 Glu 与疼痛的研究,至今仍是社会研究的一个热点,21 世纪的大量研究表明,Glus 在各种类型疼痛中均具有一定的重要作用,Glus 作为神经系统内普遍存在的—种兴奋型神经递质,在口面部信息感觉的传递中同样发挥重要作用。研究人员研究发现,谷氨酸是负责 TN 信息传递和调节的关键递质而且口面部痛觉的异常敏化就伴随三叉神经传导路上谷氨酸释放的异常增多^[3-5]。有实验表明,在大鼠组织发生炎症或神经损伤所致的病理性疼痛时,外周或脊髓内谷氨酸水平升高^[6]。

目前,临幊上治疗 TN 方法也众多,药物品种更是繁多,药物治疗如普坦类佐米曲普坦可以抑制三叉神经神经元的兴奋性,曾被喻为治疗三叉神经痛的“金标准”^[7]。手术治疗如微血管减压术、神经周围支撕脱术、颅底神经高位切除切断术、经皮穿刺射频温控热凝治疗等^[8],但效果均不理想,且容易复发。TN 的理想术式是能做到选择性毁损痛觉纤维,保留其他的感觉和运动纤维,减少并发症,降低复发率。实施高度选择性切断三叉神经感觉根(TNSR)上的痛觉纤维,保留其他感觉及运动纤维治疗 TN 是基础和临幊的重要课题,江远仕等^[9-10]开展 TNSR 的表层神经纤维束切断术(STS)。术后患者痛觉消失,运动、温度、

触压觉功能保留尚完好,从临幊上证明了三叉神经痛的痛觉纤维可能位于三叉神经节的表层。

由本实验推断,在三叉神经节表面初级传入纤维中,谷氨酸可能作为一种神经递质作用于突触后膜上的谷氨酸受体而直接参与伤害性信息的传递,导致中枢敏化,从而导致大鼠三叉神经支配区面部和口腔疼痛。

综上所述,Glus 可能存在于三叉神经节的表层并且参与 TN 的病理生理过程,其与三叉神经痛发生有密切关系。

参 考 文 献

- [1] Ivanov A, Pellerino C, Rama S, et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons [J]. *Physiol*, 2006, 572(3): 789-798.
- [2] Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat [J]. *Brain Res*, 1995, 682(3): 167-181.
- [3] Sessle BJ. Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain [J]. *International Review of Neurobiology*, 2011, 97(5): 179-206.
- [4] Barroso-Chinea P, Castle M, Aymerich MS, et al. Expression of the mRNAs encoding for the vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the rat thalamus [J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2007, 501(3): 703-715.
- [5] Furuta T, Timofeeva E, Nakamura K, et al. Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(8): 1789-1797.
- [6] Kumar N, Laferriere A, Jonathan S, et al. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2010, 11(13): 552-561.
- [7] Fong TAT, Shawver LK, Sun L, et al. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 99-106.
- [8] Sakas DE, Whittaker K, Abbasi KH, et al. Experimental microneuro surgery of the trigeminal nerve: surgical technique for ganglionectomy and rhizotomy in the cat [J]. *J Neurosci Methods*, 1996, 65(2): 137-141.
- [9] 江远仕, 杨伟炎, 钟世镇, 等. 三叉神经根表层神经束切断术治疗三叉神经痛的研究[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2010, 24(16): 721-724.
- [10] 江远仕, 王少洪, 张长椿, 等. 三叉神经根表层纤维束切断术治疗三叉神经痛的可行性研究[J]. 中国临床解剖学杂志, 2002, 20(3): 163-165.

(收稿日期:2014-07-29)