

高强度聚焦超声阻滞腰交感神经节对后肢动脉闭塞动物模型脊髓 P 物质和外周血 β -内啡肽的影响

傅 洪¹, 魏安宁², 李发琪³, 王智彪³ (1. 重庆市中医院麻醉科 400021; 2. 重庆医科大学附属第二医院麻醉科, 重庆 400010; 3. 重庆医科大学超声生物医学工程研究所, 重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨高强度聚焦超声(HIFU)行腰交感神经节阻滞对周围动脉闭塞动物血浆 β -内啡肽(β -EP)及脊髓 P 物质(SP)的影响。**方法** 26 只家犬按随机数字表法随机分为三组: HIFU 治疗组(A 组, $n=12$), 非治疗组(B 组, $n=12$), 正常对照组(C 组, $n=2$)。A、B 两组建立后肢缺血动物模型, A 组术后 2 周采用 HIFU 阻滞第 2~6 腰交感神经节, B 组不予处理。A、B 两组每次随机选 2 只犬在治疗后不同时间点采用放射免疫法检测血浆 β -EP, 取腰段脊髓行免疫组织化学染色检测 SP 变化; C 组直接检测。**结果** (1) A、B 两组在造模后 2 周血浆 β -EP 水平均低于 C 组($P<0.01$), 治疗后 A 组不同时间点 β -EP 水平高于 B 组($P<0.05$)。 (2) 脊髓 SP 阳性表达主要分布在脊髓背角 I、II 层。A、B 两组在造模后 2 周脊髓腰段 SP 的 OD 值明显高于 C 组($P<0.01$), HIFU 干预后 A 组脊髓腰段 SP 的 OD 值低于 B 组($P<0.05$)。 (3) 犬周围动脉闭塞缺血后血浆 β -EP 与脊髓 SP 的变化呈负相关。**结论** HIFU 阻滞腰交感神经节治疗慢性周围动脉闭塞缺血动物模型, 可有效升高血浆 β -EP 水平和降低脊髓 SP 水平, 提高痛觉阈值, 减轻疼痛。

【关键词】 后肢动脉闭塞; 腰交感神经节阻滞; P 物质; β -内啡肽; 疼痛

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)13-1852-03

Effect of lumbar sympathetic ganglion blocking with high intensity focused ultrasound on substance P of spinal cord and β -endorphine of peripheral blood in hind limb arterial occlusion animal model FU Hong¹, WEI An-ning², LI Fa-qi³, WAN Zi-biao³ (1. Department of Anesthesiology, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China; 2. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital Chongqing 400010, China; 3. Ultrasound Biomedicd Engineering Research Institute, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of lumbar sympathetic ganglion blocking with high intensity focused ultrasound(HIFU) on substance P(SP) of spinal cord and β -endorphine(β -EP) in blood plasma in arterial occlusion animal model. **Methods** 26 canis familiaris were randomly assigned to 3 groups: HIFU therapy group (group A, $n=12$), non-therapy group (group B, $n=12$) and normal control group (group C, $n=2$). In group A and B, the arteria cruralis was liberated and all branches (including arteria profunda femoris) were cutted, then a helical tinsel was inserted into the arteria. In group A, the 2nd ~ 6th ganglion sympatheticums were blocked with HIFU after postoperative 2 weeks. In every time point after the therapy, 2 dogs were randomly selected from groups A and B every time for β -EP examination, and then the spinal cord SP was detected, dogs in group C were directly detected. **Results** (1) Comparison with the group C, β -EP in the groups A and B was significantly decreased ($P<0.01$), β -EP in the group A was higher than that in the group B after therapy ($P<0.05$). (2) In the groups A and B, SP was located in the I, II layers of dorsal horn in spinal cord, postoperative average optical density(OD) of SP was significantly higher than that in the group C ($P<0.01$); the OD in the group A was less than that in the group B after therapy ($P<0.05$). (3) In the model dog of arteria occlusion, blood plasma β -EP was negative correlated with the SP in the spinal cord. **Conclusion** Lumbar sympathetic ganglion blocking for hind limb arterial occlusion animal model by HIFU can increase blood plasma β -EP and decrease SP of spinal cord, and elevate the pain threshold value and then relieve pain.

【Key words】 hind limb arterial occlusive; lumbar sympathetic ganglion blocking; substance P; β -EP; pain

高强度聚焦超声(HIFU)具有热效应(10 s 内, 焦阈温度可超过 70 °C)和空化效应及无创、精确、可重复、对大血管影响小等特点, 在一定条件下处理机体组织可达到彻底阻滞的效果。有研究在国内开展了 HIFU 作用于神经的动物实验, 结果表明 HIFU 能够阻断兔坐骨神经及腹腔神经节的传导, 并且阻滞程度与剂量呈量效关系^[1-2]。傅洪等^[3-4]首次报道了利用 HIFU 实现体外毁损腰交感神经节的实验研究, 本研究拟在此基础上, 观察 HIFU 治疗后一定时间内血浆 β -内啡肽

(β -EP)及脊髓 P 物质(SP)的改变并分析其相关性, 从而在分子层面了解腰交感神经阻滞(LSGB)的影响, 揭示 HIFU 治疗周围动脉闭塞缺血性疾病及其疼痛可能的作用机制, 为其临床中的应用提供理论根据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选择健康成年杂种犬 26 只, 由重庆医科大学实验动物中心购买, 体质量 13~16 kg, 随机分为三组: 治疗组(A 组, $n=12$); 非治疗组(B 组, $n=12$); 正常对照组(C

组, $n=2$)。

1.2 试剂与仪器 (1)846 合剂,由长春军事医学科学院生产,批号吉兽药试字(2008)005013;(2)血浆 β -EP 试剂盒由第二军医大学神经生物学教研室提供;(3)SP 试剂盒购于中杉金桥生物技术有限公司(北京);(4)SABC 免疫组织化学试剂盒和 DAB 显色剂均购于博士德生物技术有限公司(武汉);(5)高强度聚焦超声肿瘤治疗机(重庆海扶公司,型号 JC,0~15 000 W 可调)。

1.3 方法

1.3.1 A 组和 B 组均按文献[5]建立下肢缺血动物模型 术前常规禁食 12 h,禁饮 6 h,846 合剂(0.15 mL/kg)麻醉起效后,仰卧、四肢外展并固定,腹股沟区常规消毒铺巾;沿左股动脉行径逐层切开分离,游离出股动脉,结扎、切断其所有分支,20 G 留置针于股动脉向远心端穿刺,置入螺旋状金属丝(长 20 cm,外径 0.8 mm)1 根并缝合固定,缝扎股动脉切口使其缩窄一半,逐层缝合。造模后第 8 天 A、B 两组经腹应用银夹标识左侧第 2~6 腰交感神经节,标记后 7 d A 组在麻醉状态下应用 HIFU 治疗机对第 2~6 腰交感神经节分别处理 300 s,处理声强为 2 123 W/cm²,术中均以青霉素静脉滴注。

1.3.2 血浆及脊髓标本制备 待动物完全麻醉后,(1)抽右侧股静脉血 4 mL 即刻注入含 0.3 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠 40 μ L 和抑肽酶 2 000 U 预冷塑料试管内,4 $^{\circ}$ C 离心后取上清液,保存于-40 $^{\circ}$ C 冰箱。(2)迅速开胸,经左心室插管至主动脉,剪开右心耳,予以生理盐水灌注至流出液清亮,再灌注 40 g/L 多聚甲醛(pH=7.4)固定 1 h 后,取材患侧 L₁~L₅ 脊髓置入 40 g/L 多聚甲醛中固定 4 h,后投入 200 g/L 蔗糖液中过夜。冷箱中对标本进行 20 μ m 连续切片。

1.3.3 检测方法 (1)血浆 β -EP 用放射免疫法测定;(2)脊

髓 SP 免疫组织化学测定;参照 SABC 免疫组织化学试剂盒中流程要求操作,滴加一抗浓度为 1:500,DAB 显色,复染后封片。另以 PBS 和 10%山羊血清替代第一抗,分别作为阴性对照和替代对照。OlymPus BX50 显微镜观察染色结果并摄片。使用定量显微镜 570(Leica)图像分析软件测量 SP 阳性区平均光密度。每侧背角高倍镜下随机选取 5 个视野,分别测定 SP 阳性表达 OD 值并计算均值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较先进行方差齐性检验,后采用配对 t 检验,组内比较采用单因素方差分析,并以 LSD 法比较两两差异。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 β -EP 水平变化 A 组 2 只动物分别于造模后 6 d 和治疗后 4 d 死亡,B 组 1 只在造模后 9 d 死亡。A 组存活 10 只与 B 组存活 11 只动物在造模后 2 周(治疗 0 周) β -EP 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但均低于 C 组($P<0.05$)。治疗 1 周后 A 组 β -EP 水平逐渐升高,并在对应时间点与 B 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),并且随时间推移,至治疗后 4 周基本达到造模前水平($P>0.05$),而 B 组呈下降趋势,2 周时比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

2.2 脊髓 SP 的分布及水平变化 脊髓 SP 阳性表达主要分布在脊髓背角 I、II 层,呈棕黄色颗粒状、条索状和串珠状分布,对照组阳性表达少。A、B 两组在造模后 2 周脊髓腰段 SP 的 OD 值差异无统计学意义($P>0.05$),但均明显高于 C 组($P<0.05$)。治疗 1 周后 A 组 SP 的 OD 值逐渐下降,并在相应时间点与 B 组差异有统计学意义($P<0.05$),随着时间的推移,至 2 周时基本达到造模前水平($P>0.05$);而 B 组呈上升趋势,4 个月时上升最明显($P<0.05$)。见表 2。

表 1 三组各时点血浆 β -EP 水平比较 (pg/mL, $\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	治疗后					
		0 周	1 周	2 周	4 周	2 个月	4 个月
A 组	10	36.23 $\pm$ 6.42 Δ	35.78 $\pm$ 6.19 Δ	41.57 $\pm$ 9.57* Δ	88.21 $\pm$ 9.33*	85.91 $\pm$ 11.55*	87.31 $\pm$ 9.67*
B 组	11	42.20 $\pm$ 8.22 Δ	36.97 $\pm$ 12.15 Δ	25.13 $\pm$ 5.28 Δ	31.03 $\pm$ 7.51 Δ	26.77 $\pm$ 6.23 Δ	23.53 $\pm$ 6.03 Δ
C 组	2	95.23 $\pm$ 8.62	—	—	—	—	—

注:与 C 组相比, $\Delta P<0.05$;同时点与 B 组相比,* $P<0.05$;—表示无数据。

表 2 三组脊髓背角 SP 的 OD 值在不同时点的变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	治疗后					
		0 周	1 周	2 周	4 周	2 个月	4 个月
A 组	10	0.30 $\pm$ 0.05 Δ	0.28 $\pm$ 0.04 Δ	0.20 $\pm$ 0.01*	0.21 $\pm$ 0.02*	0.17 $\pm$ 0.03*	0.14 $\pm$ 0.06*
B 组	11	0.27 $\pm$ 0.03 Δ	0.26 $\pm$ 0.01 Δ	0.30 $\pm$ 0.05 Δ	0.25 $\pm$ 0.06 Δ	0.33 $\pm$ 0.07 Δ	0.39 $\pm$ 0.05 Δ
C 组	2	0.17 $\pm$ 0.03	—	—	—	—	—

注:与 C 组相比, $\Delta P<0.05$;同时点与 B 组相比,* $P<0.05$;—表示无数据。

2.3 血浆 β -EP 与脊髓 SP 的关系 血浆 β -EP 与脊髓 SP 呈明显负相关,A 组 $r=-0.628$, $P<0.05$;B 组 $r=-0.701$, $P<0.01$ 。

3 讨论

周围动脉闭塞性疾病是临床常见疾病,70 岁以上老年人发病率达 15%~20%^[5-6]。临床症状主要表现为 5P 征,其中疼痛(短距离运动痛甚至静息痛)表现尤为明显,治疗原则为控

制病因、改善和增进下肢血液循环^[7]。研究表明,腰交感神经链具有收缩血管、增加血管阻力及减少血流量等作用,腰交感神经切除术因能消除动脉痉挛使机体血管扩张、改善患肢局部的血供,是目前此类疾病的有效治疗措施^[2,8-10]。

SP 和 β -EP 均为中枢神经系统中调控疼痛的重要物质。SP 作为痛感递质,不但具备多种生物学效应,如导致疼痛、降低血压、扩张血管和毛细血管通透性增加等^[11],而且在高级神

经中枢及其下行调制中发挥镇痛功能^[12]。SP 及其受体丰富地分布在脊髓 I、II 和 X 层。内源性阿片肽有三大家族成员,其中 β -EP 具有强烈的麻醉镇痛作用^[13]。在一项横断面研究中发现慢性神经性疼痛患者脑脊液和血浆中 β -EP 水平明显低于正常健康者, β -EP 水平的降低导致痛域降低,反而增加对疼痛的敏感性^[14]。另一项对偏头痛患者配对治疗的研究发现,偏头痛患者,尤其是慢性偏头痛患者,其基础血浆 β -EP 水平较低,经治疗后偏头痛症状改善, β -EP 水平增加^[15]。本研究观察到下肢缺血模型建成后,动物活动性降低,还存在不同程度跛行,结果中发现动物模型组(A、B 两组)血浆 β -EP 水平明显低于正常对照组,而腰段脊髓 SP 的 OD 值明显高于对照组,经 HIFU 治疗后血浆 β -EP 逐渐上升,而脊髓 SP 下降,与上述相关研究相仿。本研究还注意到,肢体慢性缺血时脊髓 SP 水平与血浆 β -EP 呈明显负相关。其机制可能是缺血缺氧导致感觉神经末梢刺激增加,继而引发疼痛,急性期时,脊髓释放的 SP 和降钙素基因相关肽(CGRP)共同进入血,诱发内皮细胞释放一氧化氮(NO),NO 作用于血管产生舒张平滑肌、增加血流量等效应,进而引起后角 P 物质产生减少^[16]。与此同时,中枢性镇痛物质 β -EP 释放增加,不但产生比等量吗啡强 20 倍的直接镇痛作用^[17],还通过抑制 P 物质的释放和交感神经系统活动及其介质的释放发挥间接镇痛作用^[18]。在疼痛的慢性期, β -EP 水平的升高减少脊髓 P 物质的释放,导致脊髓后角 P 物质积聚,SP 通过负反馈抑制中枢 β -EP 的释放,降低血浆中的 β -EP 水平。HIFU 阻滞腰交感神经节治疗,一方面使机体血管扩张,改善局部的血供,减轻炎症反应和对痛觉神经末梢的参加,另一方面促进神经末梢 CGRP 和 SP 释放增加,通过正反馈进一步促进 β -EP 释放,终止了缺血疼痛的恶性循环,降低脊髓后角 SP 水平, β -EP 也逐渐恢复至接近正常水平^[19]。

总之,HIFU 阻滞腰交感神经节治疗慢性周围动脉闭塞缺血动物模型,可有效升高血浆 β -EP 水平和降低脊髓 SP 水平,提高痛觉阈值,减轻疼痛。而有关治疗的详细分子机制尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李信明,魏安宁,陆杰,等. 高强度超声损伤兔坐骨神经后恢复情况的实验研究[J]. 中华麻醉学杂志,2004,24(3): 198-202.
- [2] 曾令全,魏安宁,傅洪,等. 高强度聚焦超声和乙醇阻滞腹腔神经节对内脏大神经放电的影响[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(2):141-144.
- [3] 傅洪,魏安宁,李发琪,等. 高强度聚焦超声与无水乙醇毁损腰交感神经节对犬后肢动脉闭塞病变影响的比较研究[J]. 中国疼痛医学杂志,2007,13(2):96-101.
- [4] 傅洪,魏安宁,李发琪,等. 高强度聚焦超声阻滞犬腰交感神经节的实验研究[J]. 检验医学与临床,2010,7(5): 395-399.
- [5] Bian JF, Ang ZD, Ning MF. Constructed model of canine ischemic hind extremity [J]. Chin J Exp Surg, 1996, 13 (6):325-326.
- [6] Selvin E, Erlinger TP. Prevalence of and risk factors for peripheral arterial disease in the United States: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999~2000 [J]. Circulation, 2004, 110(6):738-743.
- [7] Forsythe RO, Hinchliffe RJ. Management of peripheral arterial disease and the diabetic foot [J]. J Cardiovasc Surg, 2014, 55(2):195-206.
- [8] 刘青龙,秦振龙,王绣伯,等. 补阳还五汤与腰交感神经节切除对坐骨神经损伤模型大鼠足部皮肤温度的影响[J]. 河北中医,2013,35(1):110-111.
- [9] 姚秀高,周永高,陈建龙,等. 腰交感神经毁损治疗下肢交感神经维持性疼痛的临床研究[J]. 中国疼痛医学杂志, 2014, 20(6):434-436.
- [10] Straube S, Derry S, Moore RA, et al. Cervico-thoracic or lumbar sympathectomy for neuropathic pain and complex regional pain syndrome [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013, 2(9):291-298.
- [11] Chen K, Zhang ZF, Liao MF, et al. Blocking PAR2 attenuates oxaliplatin-induced neuropathic pain via TRPV1 and releases of substance P and CGRP in superficial dorsal horn of spinal cord [J]. J Neurol Sci, 2015, 352(1/2):62-67.
- [12] 李仲廉. 临床疼痛治疗学 [M]. 2 版. 天津:天津科学技术出版社,2004:12.
- [13] 杨帆,李雅琴,刘孝兵,等. 肉毒毒素治疗带状疱疹后神经痛的疗效观察及其对血浆 β -内啡肽的影响 [J]. 河北医学, 2014, 20(6):937-940.
- [14] Bäckryd E, Ghafouri B, Larsson B, et al. Do low levels of beta-endorphin in the cerebrospinal fluid indicate defective top-down inhibition in patients with chronic neuropathic pain? A cross-sectional, comparative study [J]. Pain Med, 2014, 15(1):111-119.
- [15] Misra UK, Kalita J, Tripathi GM, et al. Is β endorphin related to migraine headache and its relief [J]. Cephalalgia, 2013, 33(5):316-322.
- [16] Kobayashi Y, Sekiguchi M, Konno S, et al. Increased intramuscular pressure in lumbar paraspinal muscles and low back pain; model development and expression of substance P in the dorsal root ganglion [J]. Spine, 2010, 35 (15):1423-1428.
- [17] Bruehl S, Burns JW, Chung OY, et al. What do plasma beta-endorphin levels reveal about endogenous opioid analgesic function [J]. Eur J Pain, 2012, 16(3):370-380.
- [18] Chavarría-Bolaños D, Martínez-Zumaran A, Lombana N, et al. Expression of substance P, calcitonin gene-related peptide, β -endorphin and methionine-enkephalin in human dental pulp tissue after orthodontic intrusion: a pilot study [J]. Angle Orthod, 2014, 84(3):521-526.
- [19] Russell FA, King R, Smillie SJ, et al. Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2014, 94(4):1099-1142.