科学通报
第41卷 第5期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年3月

# 辣椒素引起脊髓背角内γ-氨基丁酸和P物质免疫反应产物的减少

赵志奇 魏 锋 杨焕乔
(中国科学院上海脑研究所，上海 200031)

关键词 γ-氨基丁酸 P物质 辣椒素 脊髓背角 C类纤维

近年来免疫细胞化学显示脊髓背角浅层(I～II层)内含有大量的神经递质和调质，其中大部分存在于初级传入C类纤维末梢，如P物质(SP)和降钙素基因相关肽等．应用抗体微电极技术，我们曾观察到辣椒素作为一种化学性的伤害性刺激急性处理外周神经时，可特异地兴奋C纤维引起SP在胶状质(II层)内释放[1]．电生理实验表明微电泳SP可兴奋背角内伤害性感受神经元[2]．这些结果明确提示SP介导痛觉信息的传入．γ-氨基丁酸(GABA)作为一种中枢神经系统的主要抑制性递质大量分布在背角浅层．参与对脊髓痛觉的调制，基于GABA与SP在背角浅层分布的高度重迭，以及GABA受体拮抗剂Bicuculline可翻转微电泳SP对某些背角伤害性感受神经元的抑制作用[3]，从而提示这二种递质在功能上具有某些内在的联系．有理由设想：初级传入末梢释放的SP，一方面兴奋背角内伤害性感受神经元，将外周痛觉信息传入中枢；另一方面可能通过GABA系统即跨突触激活胶状质内的GABA能神经元，触发内源性镇痛系统以抑制脊髓内痛觉的传递．为此，本文拟定量观察辣椒素局部处理外周神经对脊髓背角内GABA免疫反应染色的影响．

## 1 材料和方法

实验用家猫10只，雌雄不限，体重1.7～3.5 kg，戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg)．其中8只暴露双侧胫神经，包埋在2%琼脂内，在神经干的近侧端和远侧端分别移去小块琼脂(10 mm×5 mm)形成2个间隔2～3 mm的相邻小槽，用于滴加药物．试验分为二组：1) 单纯辣椒素处理组($N=5$)，300 μL辣椒素(Capsaicin, 98 mmol/L, Sigma)处理左侧胫神经干远侧端，用同量的媒剂硅油同法处理右侧胫神经；2) 钌红(RR)预处理/辣椒素处理组，在辣椒素处理前20 min，近侧端小槽内滴加300 μL钌红(100nmol/L, Merck)．此外，另取2只猫，麻醉同上，无菌条件下行单侧第4～7腰(L4～7)背根神经切断术，动物存活一周．

外周神经辣椒素处理30 min或背根神经切断后，动物即经升主动脉插管灌注含4%多聚甲醛和0.5%戊乙醛的0.1 mol/L的磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)1 000 mL．取脊髓L3, L5～7节段，于相同固定液中后固定3～5 h．振动切片(厚30 μm)，按免疫细胞化学PAP法漂浮染色．一部分切片依次孵育在免抗SP血清(Amershen)(1:1 000～2 000)，4℃，48 h)、羊抗免

1995-04-25收稿，1995-06-23收修改稿

IgG(1:50, 37℃, 1 h) 和兔 PAP 复合物(1:200, 37℃, 1 h). 另部分切片依次入小鼠抗 GABA 血清瑞士苏黎世大学脑研究所提供,刘长青博士赠送) (1:10 000, 4℃, 48 h)、羊抗鼠 IgG(1:50, 37℃, 1 h) 和小鼠 PAP 复合物(1:50, 37℃, 1 h). 依葡萄糖氧化酶 –DAB– 硫酸镍铵法作 SP 和 GABA 免疫反应呈色. 切片脱水,透明和树胶封片. 每组每只动物不同节段的切片随机选出十张,用显微镜投影仪计数辣椒素处理同侧和对照侧背角浅层内、中、外 1/3 区域 GABA 免疫反应性(GABA–IR)神经元胞体的数量,同时用计算机图象分析和处理系统(Data, Translation, Inc., USA) 对上述区域内 SP– 和 GABA–IR 纤维末梢的密度进行了灰质半定量分析和统计处理. 本研究用正常兔血清或 PBS 代替两种第一抗体作替代或空白对照实验,结果均为阴性.

## 2　结果与讨论

在单纯辣椒素处理组,对照侧脊髓背角内 GABA–IR 成分的分布与正常相似(图 1(a)), 主要密集分布于背角浅层(I～II 层);在辣椒素处理侧, GABA–IR 纤维末梢密度和神经元的数目均有明显减少(图 1(b)), 尤其见于 L5～7 水平的背角浅层内侧部(表 1);其节段变化最为明显的区域为 L7 水平,与对照侧相比,其 IR 密度减少了 31%～54%, 而 GABA–IR 胞体数目在背角浅层内、中、外 1/3 部分别减少了 59.9%、35.4% 和 44.1%( 图 1(c)). 而 L3 节段脊髓双侧的染色密度无明显差异(表 1).

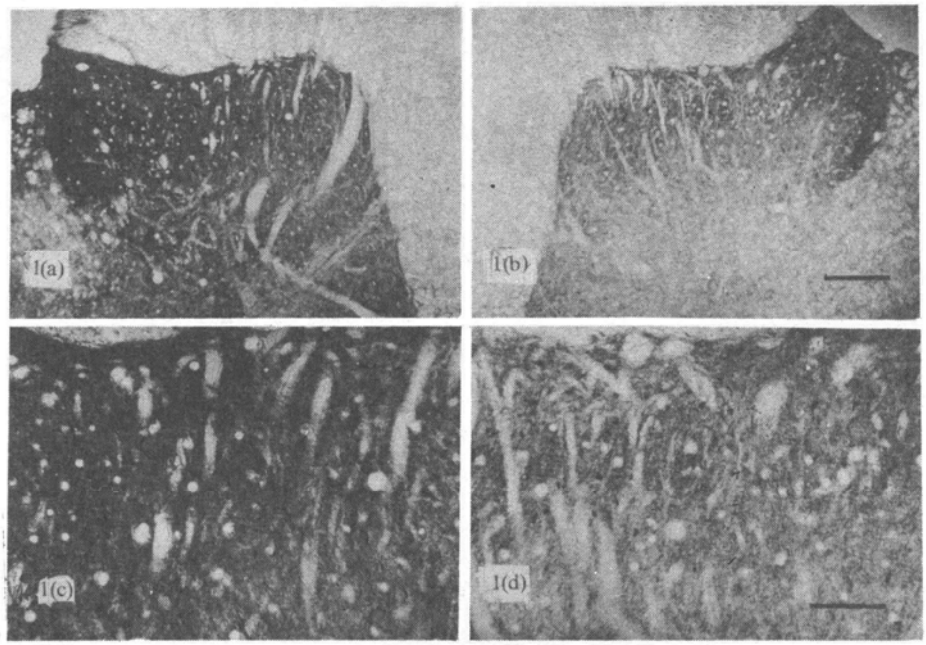


图 1　辣椒素局部处理单侧胫神经后 GABA–IR 在第 7 腰髓横切片上的分布和变化

低倍镜显示: 对照侧脊髓背角内正常的 GABA–IR 纤维末梢密集分布于背角浅层(a);辣椒素处理侧脊髓背角浅层内的 GABA–IR 纤维末梢的密度明显减少,以内侧尤为显著(b);在高倍镜下辣椒素处理侧脊髓背角浅层内侧部(d)的 GABA–IR 胞体和末梢的分布比在对照侧同一区域(c)的分布明显稀少,染色变浅.

标尺长度: 在 a 和 b 为 250 μm, c 和 d 为 100 μm

钌红预处理后,比较脊髓各节段内对照侧和实验侧背角浅层 GABA–IR 的纤维密度和胞体数目,无明显差异,显示辣椒素所致的 GABA–IR 减少已被阻断. 此外,单侧背根切断后,切断侧和对照侧背角内 GABA–IR 的纤维密度或胞体数目也基本一致. 在 L7 节段,实验

侧背角浅层 GABA-IR 的密度比对照侧(100%)略有增加，为 103.9%±4.54%，但统计结果无显著性差异($p>0$, 2)．

表 1 在不同节段的处理侧脊髓背角浅层内、中和外 1/3 区域内，辣椒素所致的 GABA-IR 和 SP-IR 纤维素末梢的相对密度情况[a)]

| 编号 | GABA | | | 物质 P | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 外侧部 | 中间部 | 内侧部 | 外侧部 | 中间部 | 内侧部 |
| L7 | 69.0±8.9** | 55.4±4.9*** | 45.9±6.1*** | 71.5±5.5*** | 52.9±7.6*** | 42.4±5.0*** |
| L6 | 77.1±9.1* | 52.7±11.8* | 51.9±12.6* | | | |
| L5 | 85.2±11.1 | 76.1±10.1 | 81.8±4.1* | | | |
| L3 | 100.3±1.4 | 100.3±4.5 | 103.8±2.0 | 101.7±3.0 | 100.2±1.4 | 100.8±5.9 |

a) 每组数据是以对照侧为 100% 所测得的处理侧脊髓背角浅层内 GABA-IR 和 SP-IR 纤维末梢的相对密度，用平均数±标准差表示．并用配对 t 检验比较这一相对密度变化的显著性，***$p<0.001$, **$p<0.01$, *$p<0.05$

与 GABA-IR 变化结果相似，在 L5～L7 节段辣椒素处理侧背角浅层内 SP-IR 减少了 29% 至 58% 不等，以 L7 尤为显著(图 2)，而 L3 水平两侧背角无差异(表 1)，钉红也完全阻断辣椒素引起的 SP 的减少(图 3)..

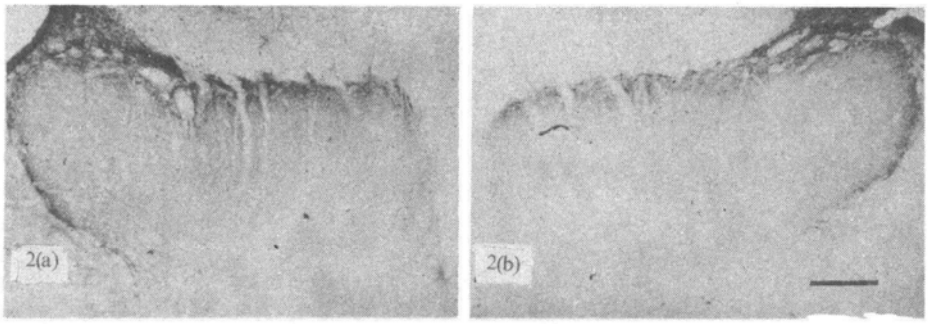


图 2 辣椒素局部处理单侧胫神经后 SP-IR 在第 7 腰髓横切片上的分布和变化
与对照侧(a)背角内正常的 SP-IR 纤维末梢密度相比，在处理侧(b)脊髓背角浅层内有明显的 SP-IR 的排空．
标尺长度：在 (a)和 (b)为 200 μm

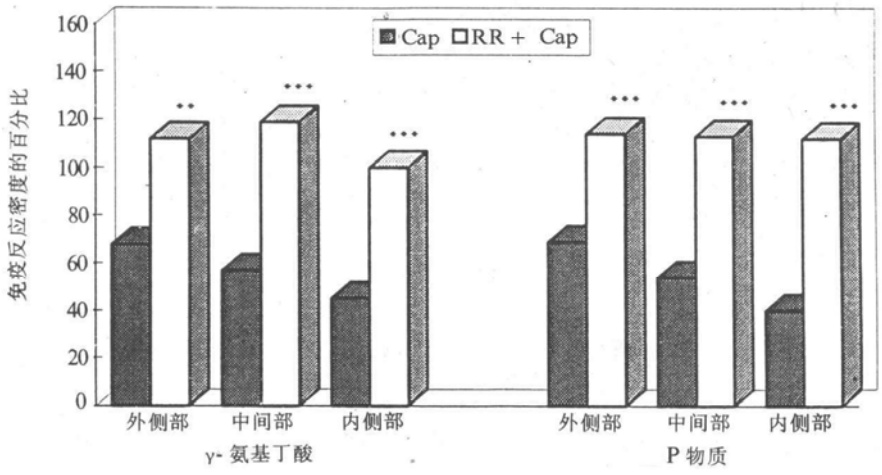


图 3 钉红预处理阻断辣椒素引起的脊髓背角浅层内 GABA- 和 SP-IR 的减少
钉红可完全阻断辣椒素的作用，与无钉红处理组相比有非常显著的意义(***$p<0.001$, **$p<0.01$)

本实验定量分析了辣椒素引起脊髓背角浅层内SP-IR的明显减少，与我们用抗体微电极技术所检测的辣椒素引起胶状质内SP的释放结果完全一致[1]. Wall实验室[4]首先报道1.5%辣椒素处理外周神经30 min, 7 d后才可见SP排空，第14 d排空最为显著. 而本实验仅在30 min后即可见背角浅层内SP排空，并局限于被处理的胫神经末梢在脊髓内投射的主要区域(L5～7和Scl)，如L7内侧其SP-IR减少了一半以上. 这二种结果的差异除实验的条件不同外，主要原因可能是本实验应用的辣椒素浓度(98 mmol/L)比他们的(49 mmol/L)高一倍，高浓度的辣椒素可能兴奋更多的初级传入C类纤维，导致短时间内在中枢端末梢瀑布般释放. 事实上，静脉注射辣椒素后，5～10 min即可见成年豚鼠血管壁上分布的C类纤维末梢有SP的排空[5]，也支持了我们的结果.

本工作的一个重要发现是，辣椒素处理外周神经不仅引起其神经中枢端末梢支配区域内SP-IR减少，也可引起此区域内GABA-IR纤维密度减弱(下降31%～54%)和阳性胞体(下降35%～60%)的减少. 辣椒素的功能拮抗剂钌红可完全阻断辣椒素的作用，提示背角内GABA-IR和SP-IR减少可能是辣椒素的特异作用所致. 虽然在猫的腰段背根神经节存在少量GABA能神经元，但切断背根对背角内GABA-IR并无影响. 背角内GABA-IR神经元数目的减少为辣椒素激活GABA能中间神经元引起GABA排空提供了直接证据. 既然外周伤害性刺激可跨突触引起脊髓背角内源性鸦片肽的释放，那么，可能存在相似的机制：辣椒素可能通过兴奋C类纤维释放一些神经递质来跨突触激活背角内GABA能中间神经元. 事实上，SP灌流离体脊髓薄片可导致GABA释放[6]，Bicuculine可翻转微电泳SP对一些背角神经元产生的抑制[3]，从而有力地提示辣椒素所造成的GABA排空可能属于SP所致，即辣椒素兴奋背角C类纤维末梢释放SP，后者可继发兴奋背角内GABA能中间神经元. 我们最近的工作已表明SP受体拮抗剂可部分阻断辣椒素的作用[1]. 综合上述，SP不仅能向中枢传导外周伤害性信息，也可激发GABA系统来调制脊髓水平的伤害性信息的传导.

## 参　考　文　献


1 Zhao Z Q, Yang H Q, Zhang K M *et al*. Release and depletion of substance P by capsaicin in substantia gelatinosa studied with the antibody microprobe technique and immunohistochemistry. Neuropeptides, 1992, 23: 161～167

2 Song X J, Zhao Z Q. Interaction between substance P and excitatoryamino acid receptors in modulation of nociceptive responses of cat spinal dorsal horn neurons. Neurosci Lett, 1994, 168: 49～52

3 Zhu L X, Li C, Ji C. Dual action of substance P in nociception and pain modulation at spinal level. Scientia Sinica, Ser B, 1987, 30: 727～738

4 Ainsworth A, Hall P, Wall P D *et al*. Effects of capsaicin applied locally to adult peripheral nerve. II. Anatomy and enzyme and peptide chemistry of peripheral nerve and spinal cord. Pain, 1981, 11: 379～388

5 Papka R E, Furness J B, Della N G *et al*. Time course of effect of capsaicin on ultrastructure and histochemistry of substance P-immunoreactive nerves associated with the cardiovascular system of guinea-pig. Neuroscience, 1984, 12: 1 277～1 292

6 Sakuma M, Yoshioka K, Suzuki H *et al*. Substance Pevoked release of GAGA from isolated spinal cord of the pnewborn rat. Neuroscience, 1991, 45: 323～330


1) Wei F, Zhao Z Q. Blockade of capsaicin-induced reduction of GABA-IR by spantide in cat spinal superfical dorsal horn. Neuroscience, 1996 (*in press*)