

# 亚硝基铁氰化钠对脊髓背角神经元 诱发与自发反应的影响\*

王润萍, 林青<sup>1</sup>, 李菁锦, 吕国蔚\*\*

(首都医科大学神经生物系, 北京 100054;

<sup>1</sup> 美国德州大学医学院解剖与神经科学系, Galveston, TX77555-1069)

**摘要:** 用微透析方法在麻醉麻痹大鼠的脊髓局部应用一氧化氮(NO)供体亚硝基铁氰化钠(sodium nitroprusside, SNP), 以碳丝微电极在腰膨大处行细胞外记录, 观察 NO 对机械刺激大鼠后足部皮肤引起的诱发反应和自发反应的影响。脊髓深层神经元透析 1  $\mu\text{mol/L}$  SNP, 10~20 min 后, 非伤害性机械刺激诱发的反应增强, 伤害性机械刺激诱发的反应减弱; 透析 20~30 min 后, 伤害性和非伤害性机械刺激诱发的反应均减弱; 透析 20  $\mu\text{mol/L}$  SNP 7~15 min 内伤害性和非伤害性机械刺激诱发的反应均降低。1  $\mu\text{mol/L}$  和 20  $\mu\text{mol/L}$  的 SNP 均在一定时间内使自发放电增强。结果提示: 不同浓度的 NO 对脊髓非伤害性和伤害性信息传递具有不同的作用; NO 参与脊髓神经元抗伤害作用并促进其自发活动。

**关键词:** 伤害性机械刺激; 非伤害性机械刺激; 微透析; 一氧化氮

学科分类号: R426

## Effect of sodium nitroprusside on the spontaneous and induced responses of rat spinal cord dorsal horn neurons\*

WANG Run-Ping, LIN Qing<sup>1</sup>, LI Qing-Jin, LU Guo-Wei\*\*

(Department of Neurobiology, Capital University of Medical Science, Beijing 100054;

<sup>1</sup> Department of Anatomy and Neuroscience, The University of Texas Medical Branch, Galveston, TX77555-1069)

**Abstract:** The present study was performed on anesthetized and paralyzed Wistar rats. Extracellular recordings were made from the lumbar enlargement of the spinal cord using carbon filament electrodes. NO donor sodium nitroprusside (SNP) was locally microdialyzed to the spinal cord, and effects of NO on spontaneous response and the responses induced by mechanical stimulation of the hind-foot were observed. After dialyzing for 10~20 min, SNP at a concentration of 1  $\mu\text{mol/L}$  increased the induced responses to innocuous mechanical stimulation and decreased those to noxious mechanical stimulation. The induced responses to both innocuous and noxious mechanical stimulations were all decreased after dialyzing the same dose of SNP for 20~30 min. The decrease was shown within 7~15 min dialysis when SNP was used at a concentration of 20  $\mu\text{mol/L}$ . SNP at both concentrations of 1 and 20  $\mu\text{mol/L}$  increased spontaneous spikes of the recorded spinal units. These effects were shown preferentially in deep units. The data suggest that in the deeper neurons of the spinal cord NO of different concentrations has different effects on transmission of nociceptive and nonnociceptive signals induced by mechanical stimulation, and NO is involved in the antinociception in spinal neurons and facilitates their spontaneous activity.

**Key words:** noxious mechanical stimulation; innocuous mechanical stimulation; microdialysis; nitric oxide

越来越多的实验证实, NMDA-PKC-NO 在致炎后痛觉过敏和痛觉超敏以及正常动物伤害性信息传递

中均起作用<sup>[1]</sup>。NO 参与脊髓中枢敏感化的形成, 一氧化氮合酶(NOS)的选择性阻滞剂 7-NI 强烈抑制

NMDA受体介导的“Wind-up”和后放<sup>[2]</sup>。脊髓内产生的NO对炎症和正常动物的“Wind-up”现象均起重要作用。NO对不同的脊髓细胞可引起兴奋和抑制两种不同的效应<sup>[3~5]</sup>。

Lin等<sup>[6]</sup>以前的实验发现,NO供体(SIN-1 hydrochloride)增强脊髓背角深层的广动力范围(WDR)神经元对机械刺激的诱发反应,而不影响自发放电反应。Pehl等<sup>[7]</sup>在脊髓薄片上的细胞外记录表明,NO对脊髓背角的X层绝大多数神经元的自发放电有兴奋作用。为进一步研究NO在脊髓感觉传入中的作用,本实验以大鼠为对象,用两种不同浓度的NO供体SNP进行局部微透析,观察SNP对大鼠后足部感觉信息传导的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 手术

Wistar大鼠(首都医科大学动物科学部提供),雌雄不拘(200~250g),雄性体重200~300g。以2%的戊巴比妥钠(40~50mg/kg)腹腔注射麻醉,行气管插管、颈静脉插管术,行椎板切除术暴露腰膨大处脊髓节段。以氯化筒箭毒(0.1%,0.2ml)麻痹,接人工呼吸机,固定于脑立体定位仪上,脊髓暴露部位椎板以脊髓固定夹固定,使动物呈悬吊状态,以减小呼吸波动对脊髓稳定性的影响。用游丝镊撕开硬脊膜和蛛网膜,以银球电极在脊髓背表面找到对足部触压刺激反应较多的区域后,在记录部位局部软脊膜上开窗以利碳丝微电极刺入。用不锈钢针引导微透析管(表面涂以薄层硅胶,留有3mm空隙作为透析区,在空气中干燥至少6h,一端以速干胶连于细不锈钢针备用,微透析管的通透率为4~10%<sup>[8]</sup>)横穿过脊髓,未涂胶区留在脊髓内,深度约平中央管。在脊髓暴露部位周围用琼脂糖筑槽,灌温石蜡油保湿。休息1h后,用灌流泵经颈静脉插管给持续麻醉药(50mg戊巴比妥钠、5mg氯化筒箭毒溶于44ml生理盐水中,输液速度为1~2ml/h)。实验过程中注意保持大鼠呼气末CO<sub>2</sub>浓度为3~4%,肛温为37±1℃。

### 1.2 微透析给药

透析管经聚乙烯管(PE-10型)接微量注射机(WZS-50,浙江医科大学医学仪器实验厂),在寻找细胞、记录前对照和冲洗药物时通过微量注射机持续灌流生理盐水(去离子水配制,储存于4~6℃冰箱中,用前标定pH值至7.4,以孔径为2.5μm的过滤器过滤,灌流速度5μl/min)。找到对机械刺激足部皮肤发生反应的细胞后,将透析液换为SNP溶液(1μmol/L或20μmol/L,用前临时配

制,用时注意避光)。微透析的作用范围为透析管周围半径750μm,不超过一个脊髓节段。

### 1.3 刺激与记录

找到对按压皮肤发生反应的神经元后,以标记笔标出对伤害性和非伤害性刺激反应最强的感受野。非伤害性刺激由一柔软毛刷垂直于感受野进行轻刷,伤害性刺激由两个不锈钢动脉夹提供,依靠动脉夹的弹性分别对感受野轻捏和重捏。刷作用于人产生触觉,轻捏引起轻微痛觉,重捏则导致较强烈的痛觉,但不产生可见的损伤。实验中每次均在标定的同一感受野给予刺激。记录时先记自发反应10s,然后每间隔10s依次给予刷、轻捏和重捏刺激,每种刺激均持续10s。根据神经元对不同机械刺激的反应,将记录单位分为三类:低阈值(LT)神经元(对刷刺激产生最大反应)、WDR神经元(对三类刺激均起反应但对重捏刺激的反应最强)、高阈值(HT)神经元(仅对伤害性刺激发生反应)。

找到对上述刺激产生诱发反应的单位后,记录前对照,然后将透析液从生理盐水换为SNP溶液,灌流10~20或20~30min,记录反应单位的自发放电和对三种机械刺激的反应,再换回生理盐水冲洗,每隔30~60min重复记录,直到诱发反应部分或完全地恢复到给药前水平。用单管碳丝微电极(2~6MΩ)在微透析管头尾侧一个节段的范围内记录,信号经探头输入放大器(MEZ-8201,日本光电株式会社),同时输入监听器(自制)、记忆示波器(VC-11日本光电株式会社),并经Power Lab生物信号记录系统(澳大利亚AD Instrument Pty Ltd)输入计算机,采集原始波形并记录频率的变化。

### 1.4 结果分析

对每种反应均计算10s的平均反应频率。因各记录单位实际反应频率相差太大,数据均做标准化处理,以对照的百分数表示神经对药物反应的变化,并将各自的对照值作为100%。结果用mean±SE表示,对自发放电和三种刺激诱发反应给药前后的有关数据进行配对t检验,显著性水准为0.05。

## 2 结果

### 2.1 1μmol/L SNP对大鼠脊髓神经元放电的影响

在7只大鼠脊髓背角513~867μm深度记录到8个神经元反应,因LT和HT神经元例数较少,且给药前后对刺激的反应与相应深度的WDR神经元相比近似,所以未做单独分析。

#### 2.1.1 对诱发放电的影响

深层8个记录单位中

有 1 例 HT, 1 例 LT 和 6 例 WDR 神经元。包括 1 例 HT 神经元和 5 例 WDR 神经元在内的 6 例神经元, 透析  $1 \mu\text{mol/L}$  的 SNP 后 10~20 min, 对刷、轻捏和重捏的相对反应分别相当于给药前的  $127 \pm 8\%$ 、 $109 \pm 13\%$  和  $76 \pm 9\%$ , 其中对刷和重捏的反应分别显著地高和低于给药前 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1)。

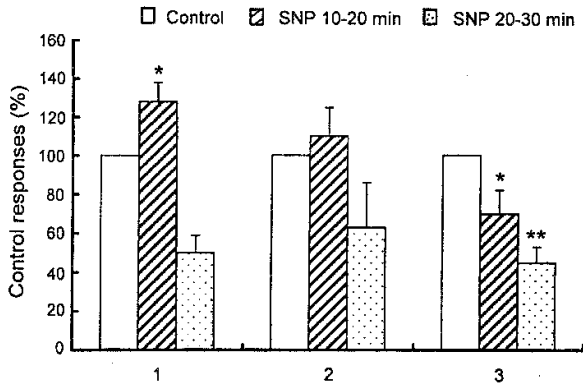


图 1. 微透析 SNP ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 的对机械刺激诱发反应的影响

Fig. 1. Effect of microdialysis of SNP ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) on mechanical stimulation induced responses. 1, brush; 2, light pinch; 3, strong pinch. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , vs control (paired  $t$  test).

对其中 5 例(包括 HT 神经元)继续透析 SNP, 观察反应变化。以给药 10~20 min 的反应频率作为对照, 用药 20~30 min 后, 对刷、轻捏和重捏的反应频率分别下降  $52 \pm 16\%$  ( $P > 0.05$ )、 $62 \pm 27\%$  ( $P > 0.05$ ) 和  $46 \pm 12\%$  ( $P < 0.01$ )。对重捏的反应与给药前相比有非常显著的意义 (Fig. 1)。8 例深层记录单位中有 1 例给药 30 min 后才开始记录, 它对三种刺激的反应均减弱, 对刷反应的减弱最明显, 但自发放电增强。

### 2.1.2 对自发放电的影响 给药后 10~30 min

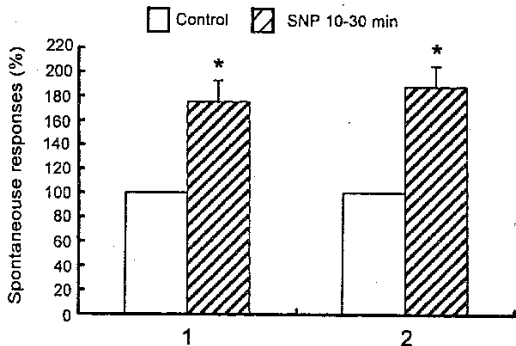


图 2. SNP 为  $1 \mu\text{mol/L}$  和  $20 \mu\text{mol/L}$  对自发反应的影响  
Fig. 2. Effect of SNP on spontaneous responses. 1,  $1 \mu\text{mol/L}$ ; 2,  $20 \mu\text{mol/L}$ . \* $P < 0.05$  vs control (paired  $t$  test). Note that spontaneous responses are increased by both  $1$  and  $20 \mu\text{mol/L}$  SNP.

内, 自发放电频率增加到  $175 \pm 35\%$ , 显著高于对照 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2)。微透析 5 min 后, 绝大多数深层单位都有阵发或持续性自发放电增强现象, 自发反应与诱发反应的增强无关, 但当诱发反应明显受抑时, 自发反应也同时被抑制。冲洗过程中自发反应先一过性增强, 然后减弱或平息。诱发反应恢复前自发放电均部分或全部恢复。

### 2.2 $20 \mu\text{mol/L}$ SNP 对大鼠脊髓神经元放电的影响

共记录 4 例 WDR 神经元, 给药后 15 min 内对刷、轻捏、重捏三种机械刺激的诱发反应分别降低  $55 \pm 18\%$  ( $P < 0.05$ )、 $61 \pm 8\%$  ( $P < 0.01$ ) 和  $68 \pm 11\%$  ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3)。

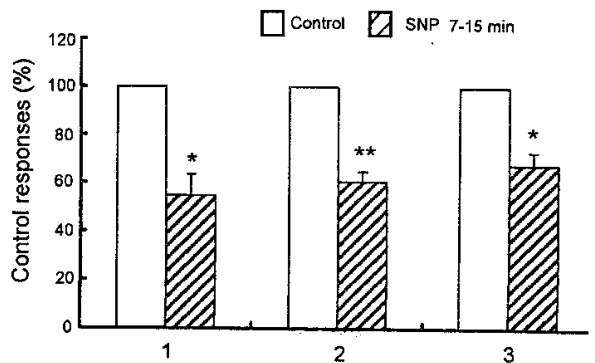


图 3. 透析  $20 \mu\text{mol/L}$  的 SNP 7~15 min 时机械刺激诱发的反应下降

Fig. 3. Mechanical stimulation induced responses decreased after dialyzing  $20 \mu\text{mol/L}$  SNP for 7~15 min. 1, brush; 2, light pinch; 3, strong pinch. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs values before dialyzing  $20 \mu\text{mol/L}$  SNP (paired  $t$  test).

给药后 15 min 内自发放电频率达  $188 \pm 35\%$ , 与给药前相比有显著差异 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3)。20~30 min 时自发和诱发放电均明显降低, 诱发反应消失。冲洗后自发放电明显增强, 之后再次减弱; 冲洗 1~3 h 自发放电恢复后, 诱发放电开始恢复。

## 3 讨论

外周注射福尔马林引起脊髓释放谷氨酸, 可增强脊髓对刺激的反射活动<sup>[9]</sup>。脊髓给予 NMDA 引起痛觉过敏<sup>[10, 11]</sup>, 而 NMDA 受体阻滞剂可取消福尔马林引起的行为学表现<sup>[12]</sup>。NMDA 受体通道开启导致  $\text{Ca}^{2+}$  内流, 激活  $\text{Ca}^{2+}$  依赖的 NOS, 以 L-精氨酸为底物合成 NO, NO 作为逆行信使作用于突触前神经末梢发挥作用。NOS 拮抗剂不能阻滞伤害性反射的发生, 但能阻滞伤害性反射的易化<sup>[13]</sup>。Wu 等发现, 同样剂量的 SNP ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) 可以引起不同脊髓交感

节前神经元兴奋性突触后电流<sup>[4]</sup>和抑制性突触后电流<sup>[5]</sup>。本实验的结果表明,透析 10~20 min 后,同样剂量的 NO 供体 SNP 对同一记录单位不同机械刺激诱发反应的影响不同,非伤害性刺激的诱发反应增强,伤害性刺激的诱发反应减弱。

本实验中持续透析浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  的 SNP 20~30 min 后,脊髓背角神经元对三种机械刺激的反应频率均下降,有的甚至低于给药前水平,原因可能有二:(1)随着透析时间的延长,记录点的药物浓度逐渐增高,相对高浓度的 SNP 对伤害性和非伤害性机械刺激诱发的放电均产生抑制;(2)持续一定时间的自发放电使神经元逐渐耗竭。如透析的 SNP 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时,记录单位的诱发反应被显著抑制的时间提前至 15 min(最快 7 min)内,冲洗后部分诱发反应恢复的时间延长,提示药物浓度在抑制产生的过程中起重要作用。冲洗过程中自发放电在一段时间内均有增强现象,且用药浓度为 2~20 mmol/L 时增强更明显,表明耗竭不起主要作用。1  $\mu\text{mol/L}$  的 SNP 在透析 20~30 min 后,记录单位对刷和轻捏的反应与用药前相比未见显著差异,可能与数据的变异范围太大有关。

Lin 等<sup>[6]</sup>在脊髓给予 NO 供体 SIN-1 后背角深层 WDR 神经元对刷、压和捏的反应均增高,而浅层 WDR 神经元的变化方向不一。他们所用的 NO 供体(SIN-1)浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ 。Pehl 等<sup>[7]</sup>发现,NO 对绝大多数 X 层神经元的自发放电有兴奋作用,而对 I/II 层的自发放电主要是抑制作用。他们所用的 SNP 浓度为  $10^{-4}$ ~1  $\mu\text{mol/L}$ 。本实验所用的浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ ,鉴于微透析管的通透率为 4~10%,实际有效浓度较 Pehl 等所用浓度低,而 Lin 等所用 NO 供体的有效浓度更低。据 Pehl 等<sup>[7]</sup>的实验,SNP 的效应是同浓度 SIN-1 的 100 倍。如果将 SNP 的浓度换算为 SIN-1 的浓度,则相当于 Lin 等所用浓度的 10 和 200 倍,提示本实验结果与 Lin 等先前实验的差别可能主要与脊髓局部 NO 供体浓度的不同有关。

本实验中,低浓度的 NO 供体 SNP 促进脊髓深层神经元对非伤害性信息传递,抑制伤害性信息传递;高浓度的 SNP 则对伤害性和非伤害性信息的传递均表现为抑制,提示脊髓局部低或高浓度的 NO 均参与机体的抗伤害作用,非伤害性信息传递的增强有可能通过脊髓闸控机制<sup>[14,15]</sup>参与抗伤害作用。SNP 增强自发活动的作用可能与炎症或损伤过程中

自发痛的产生与维持有关。

## 参 考 文 献

- [1] 吕国蔚. 痛觉过敏的中枢敏感化机制及其分子基础. 中国疼痛医学杂志, 1996, 2(2): 114~119.
- [2] Stanfa LC, Misra C, Dickenson AH. Amplification of spinal nociceptive transmission depends on the generation of nitric oxide in normal and carrageenin rats. *Brain Res*, 1996, 737: 92~98.
- [3] Kurihara T, Yoshiokak. The excitatory and inhibitory modulation of primary afferent fiber-evoked responses of ventral roots in the neonatal rat spinal cord exerted by nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 1996, 118(7): 1743~1753.
- [4] Wu SY, Dun SL. Nitric oxide and excitatory postsynaptic current in the rat sympathetic preganglionic neurons *in vitro*. *Neuroscience*, 1997, 79(1): 237~245.
- [5] Wu SY, Dun NJ. Potentiation of IPSCs by nitric oxide in immature rat sympathetic preganglionic neurones *in vitro*. *J Physiol (Lond)*, 1996, 495(Pt 2): 479~490.
- [6] Lin Q, Palecek J, Paleckov V *et al*. Nitric oxide mediates the central sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol*, 1999, 81: 1075~1085.
- [7] Pehl U, Schmidt HA. Electrophysiological responses of neurons in the rat spinal cord to nitric oxide. *Neuroscience*, 1997, 77(2): 563~573.
- [8] Dougherty PM, Palecek J, Paleckov V *et al*. The role of NMDA and non-NMDA excitatory amino acid receptors in the excitation of primate spinothalamic tract neurons by mechanical, chemical, thermal, and electrical stimuli. *J Neurosci*, 1992, 12: 3025~3041.
- [9] Skilling SR, Smulling DH, Beitz AJ *et al*. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J Neurochem*, 1988, 51: 127~132.
- [10]Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci*, 1992, 12: 3665~3670.
- [11] Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-D-aspartate-produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. *Eur J Pharmacol*, 1992, 214: 93~96.
- [12] Meller ST, Cummings CP, Traub RJ *et al*. The role of Nitric Oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenin the rat. *Neurosci*, 1994, 60(2): 367~374.
- [13] Kelley FK, Jane EH, George LW. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett*, 1992, 148: 1~5.
- [14] Wall PD, Melzack R. *Textbook of Pain*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.
- [15] Melzack R. From the gate to the neuromatrix. *Pain*, 1999, 6 Suppl: S121~S126.