



局部注射 $\alpha\beta$ me-ATP对大鼠背部皮肤初级传入纤维的兴奋作用

$\alpha\beta$ me-ATP ($\alpha\beta$ -亚甲基-ATP) 是一种比ATP稳定、不易于被ATP内核苷酶(ATP-endonucleotidase)分解的ATP类似物。 $\alpha\beta$ me-ATP是P2X嘌呤受体的选择性激动剂,在体内的作用与ATP相类似。研究表明,支配皮肤各类感觉神经纤维末端均存在P2X受体[1]。大鼠足底注射ATP及其类似物,可引起该区域热和机械痛过敏,此可被P2X受体拮抗剂所阻断[2]。用电离子透入法将ATP注入人的皮肤也可产生痛觉[3]。在人和动物局部注射PGE₂、角叉菜胶或紫外线照射致炎后, $\alpha\beta$ me-ATP或ATP引发的伤害性感受反应显著增强[3][4]。而且,P2X受体拮抗剂能减轻福尔马林、蜂毒等化学致痛剂造成的伤害性痛反应[5][6]。损伤外周组织、神经以及在应激状态下的多种细胞可释放ATP,这些内源性ATP在病理状态下也可以兴奋伤害性感受器[7][8]。电生理研究证实,ATP及其类似物 $\alpha\beta$ me-ATP可使40%~95%的大鼠离体背根神经节神经元引发内向电流[9]。由于ATP及其类似物 $\alpha\beta$ me-ATP引起的痛觉和痛敏化研究多集中于脊髓机制,而对于外周机制研究目前尚无详细报道。为了明确ATP及其类似物引起的痛觉和痛敏化的外周机制,以及哪类初级传入纤维参与该过程,本研究采用大鼠脊神经背侧皮支分离神经细束的方法,观察相应皮肤感受野注射 $\alpha\beta$ me-ATP对感觉神经传入纤维的兴奋和敏化作用。

1 材料和方法

1.1 手术及传入纤维放电的记录

实验选用成年健康Sprague-Dawley大鼠(体质量220~260 g)26只,雌雄不拘。20%乌拉坦(1 g/kg)腹腔麻醉后剖开背部皮肤,在解剖显微镜下分离出一侧T9~T13脊神经背侧皮支。固定皮瓣做成油槽,内充37℃左右的液体石蜡。在近中枢端将脊神经背侧皮支切断,将其搭放在一对双极铂金丝记录电极上,在显微镜下用游丝镊子从神经干分离细束。将细束分离至能记录出单个神经纤维放电,观察放电的频率、形式。传入单位放电输入VC-11双线记忆示波器(日本光电公司),并用SMUP生物信号数据分析软件(复旦大学医学院生理教研室研制)进行处理。

用刺激电极置于所记录单位的感受野中心,施以强度递增的单个脉冲刺激,直至引发出与自发放电型式和幅度相同的诱发动作电位。根据潜伏期和刺激点至记录点的神经长度,计算出该感觉神经单位的传导速度(CV)。以机械阈值3倍左右的von Frey's毛确定适应性。用辐射热作为热刺激测定感受单位的热敏感性,发热装置(自制)主要由卤钨聚光灯泡组成,光源在皮肤表面聚焦直径约为5 mm范围。用半导体点温计测量动物皮肤表面温度,调节电压及灯泡与皮肤距离,使皮肤温度在20 s内从32℃上升至52℃,上升速率为1℃/s。

根据Horch等[10]的标准确定其属于哪一类神经纤维,并根据适宜刺激进行感受器分型。CV<2.0 m/s为C类纤维,CV在2.0~30 m/s之间为A δ 纤维,CV>30 m/s为A β 纤维。A β 纤维根据其适应性和放电特性分为快适应单位(RA)和慢适应单位(SA)。A δ 纤维如果只对机械刺激反应确定为A δ 机械感受单位(AM);如果既对机械刺激反应也对热刺激反应称为A δ 机械热感受单位(AMH);C类纤维如果只对机械刺激反应确定为C机械感受单位(CM);如果既对机械刺激反应也对热刺激反应称为C机械热感受单位(CMH)。

1.2 机械阈值的测定和药物注射

用von Frey's 毛垂直作用于感受野中心, 以能在1 s内诱发出2个传入放电为标准来确定该单位的阈值 (mechanical von Frey hair threshold, VFH-T), 以毫牛顿(milli-Newton, mN)表示[10], 分别在药物注射前后观察VFH-T的变化。在感受野的中心外1 mm处扎入4号注射针头, 经PE-10导管连接于微量注射器, 内充浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\alpha\beta\text{me-ATP}$, 安装于WZ-50微量注射机(浙江医科大学医学实验仪器厂)以备推注。先记录2 min的单位自发放电作为前对照, 随后由微量注射机匀速推注(10 $\mu\text{l}/5$ min) $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 10 μl , 观察注射过程中5 min和注射后5 min神经放电的变化情况。 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ (美国Sigma公司)溶于生理盐水中, 再用磷酸盐缓冲液调节pH为 7.4。溶剂对照组在感受野内注射10 μl 生理盐水, 其他实验步骤与实验组完全相同。

1.3 资料分析和统计学处理

本实验数据中的放电数均为1 min的平均放电数, 所有数据以均数 \pm 标准误表示, 采用SigmaStat 2.0统计软件进行处理。如果注射药物过程中或注射后自发放电频率较注射前增加30%以上, 则判定注射药物可使该单位自发放电增加[11]。各组间比较采用单因素方差分析, 注射过程中和注射后每分钟的平均放电数, 用配对t检验或非参数秩和检验与注射前的平均放电数进行比较, 以 $P < 0.05$ 作为显著性检验的界值。

2 结果

2.1 各类传入纤维的VFH-T变化

实验共记录到89个感受单位: $A\beta$ 单位24个, 其中RA单位11个(45.8%), SA单位13个(54.2%); $A\delta$ 单位41个, 其中AM单位27个(65.8%), AMH单位14个(34.2%); C类单位24个, 其中CMH单位9个(37.5%), CM单位15个(62.5%)。以上感受单位的感受野大多分布于距大鼠背正中中线0.5~2.5 cm 的范围, 呈圆形或椭圆形, 明显地呈两列排列。

在 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 实验组, $A\beta$ 纤维的VFH-T为(0.301 \pm 0.019) mN, 注射后的VFH-T是(0.288 \pm 0.018) mN, 注射前后无显著性变化($P > 0.05$); $A\delta$ 纤维和C类纤维的VFH-T分别是(0.384 \pm 0.018) mN和(0.943 \pm 0.102) mN, 它们在注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 后的VFH-T降低至(0.304 \pm 0.013) mN和(0.659 \pm 0.071) mN, 与注射前相比均具有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图1)。而生理盐水对照组, $A\beta$ 、 $A\delta$ 和C类纤维的VFH-T分别是(0.299 \pm 0.021) mN、(0.454 \pm 0.057) mN和(0.789 \pm 0.085) mN, 注射生理盐水后的VFH-T是(0.296 \pm 0.022) mN、(0.441 \pm 0.058) mN和(0.790 \pm 0.089) mN, 注射前后 $A\beta$ 、 $A\delta$ 和C类纤维的VFH-T均无显著变化($P > 0.05$)。

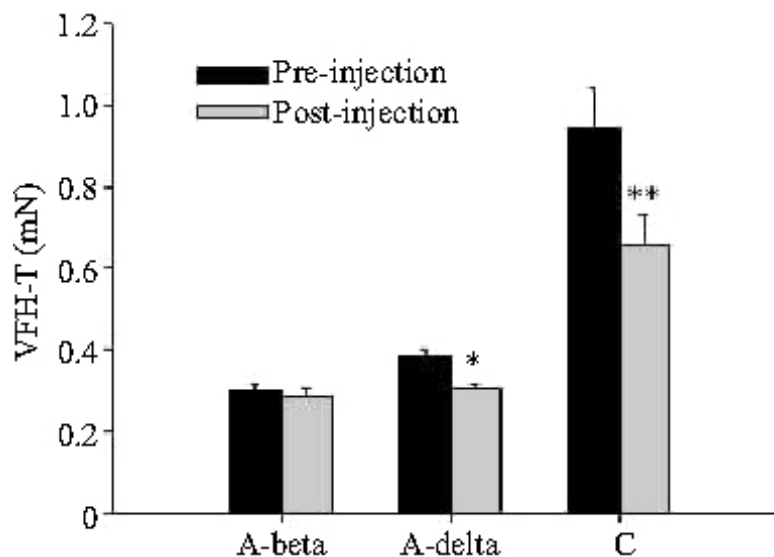


图1 各类纤维感受野注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 平均机械阈值的变化

Fig.1 Local $\alpha\beta\text{me-ATP}$ injection-induced changes of mean mechanical thresholds of the primary afferent fibers in the receptive fields of spinal nerve dorsal cutaneous branches (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs pre-injection group)

2.2 各类传入纤维自发放电的变化

在 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 实验组, 观察的13个A β 纤维中, 有1个单位自发放电频率增加(7.7%); 24个A δ 纤维中, 有16个单位自发放电频率增加(66.7%); 12个C纤维中, 有9个单位自发放电频率增加(75.0%), 其中A δ 和C类纤维的反应比例显著高于A β 纤维(χ^2 检验, $P<0.01$), 而A δ 和C纤维的反应比例间没有显著性差异(χ^2 检验, $P>0.05$)。生理盐水对照组观察的40个单位中, 未见自发放电频率增加的单位。

A β 纤维注射前的平均自发放电频率为 0.23 ± 0.09 /min, 注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 过程中平均自发放电频率为 0.28 ± 0.19 /min, 注射后5 min的平均自发放电频率为 0.22 ± 0.14 /min, 各组间自发放电频率无显著性差异($P>0.05$)。A δ 纤维注射前的平均自发放电频率为 0.73 ± 0.24 /min, 注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 过程中的平均自发放电频率为 3.05 ± 0.65 /min, 注射后的平均自发放电频率为 2.40 ± 0.61 /min, 各组间自发放电频率有显著性差异($P<0.05$)。注射中和注射后的自发放电频率与前对照比较均有显著性增加($P<0.01$)。C类纤维注射前的平均自发放电频率为 0.54 ± 0.21 /min, 注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 过程中的平均自发放电频率为 8.53 ± 2.04 /min, 注射后的平均自发放电频率为 6.68 ± 1.68 /min, 各组间自发放电频率有显著性差异($P<0.05$)。注射中和注射后的自发放电频率与前对照比较有显著性增加($P<0.01$) (图2)。而生理盐水对照组, 各类纤维在注射过程中和注射后自发放电频率均无显著变化。图3为各类纤维感受野注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 的典型原始放电记录。

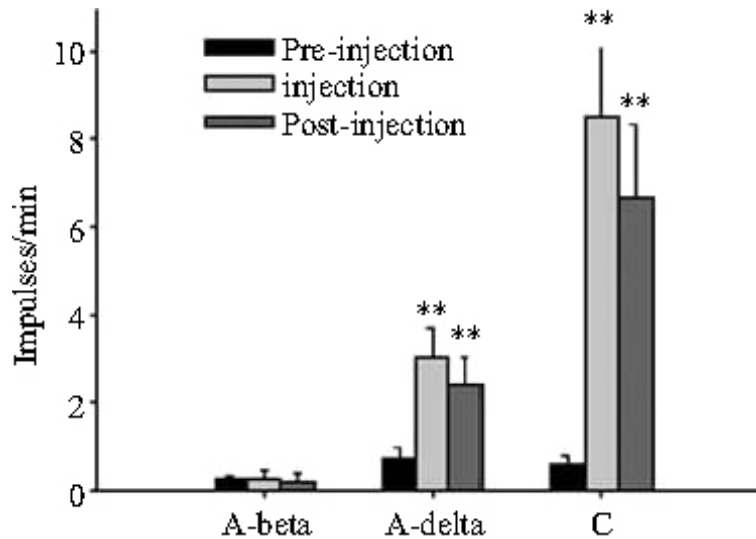


图2 各类纤维感受野注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 平均传入放电率的变化

Fig.2 Local $\alpha\beta\text{me-ATP}$ injection-induced changes of mean discharge rates of the primary afferent fibers in the receptive fields of the spinal nerve dorsal cutaneous branches (** $P<0.01$ vs pre-injection group)

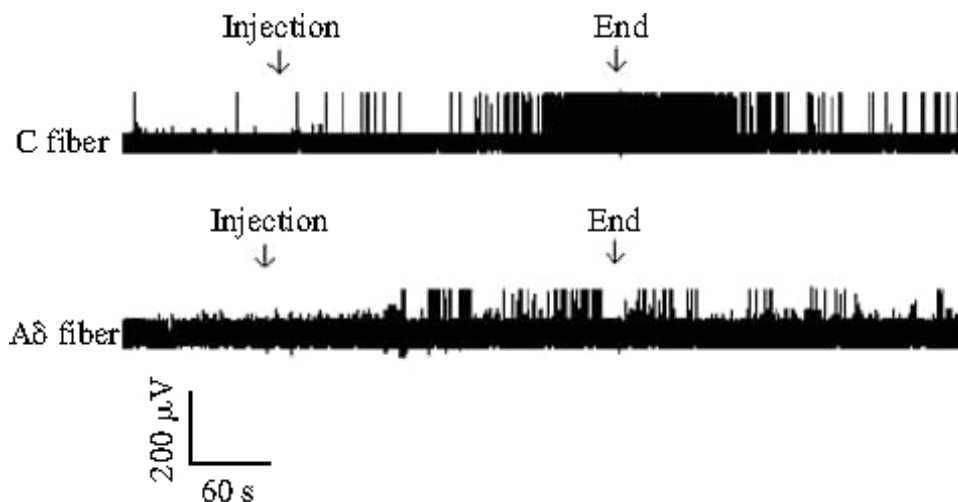


图3 A δ 和C类纤维感受野注射 $\alpha\beta\text{me-ATP}$ 过程中和注射后传入放电的原始记录

Fig.3 Original recording of the afferent discharge in the spinal nerve dorsal

为进一步分析 $\alpha\beta$ me-ATP对感觉神经末梢作用的时序过程，我们观察了感受野注射 $\alpha\beta$ me-ATP过程中和注射后每分钟的放电变化。A β 纤维注射 $\alpha\beta$ me-ATP过程中和注射后各个时段平均自发放电频率与注射前比较均无显著性差异($P>0.05$)。A δ 纤维注射 $\alpha\beta$ me-ATP过程中第2至5 min和注射后的第1至4 min的自发放电频率与前对照比较有显著性差异($P<0.05$)。而C类单位在注射中第2至5 min和注射后第1至5 min各个时段自发放电频率与注射前比较均显著增加($P<0.05$, 图4)。

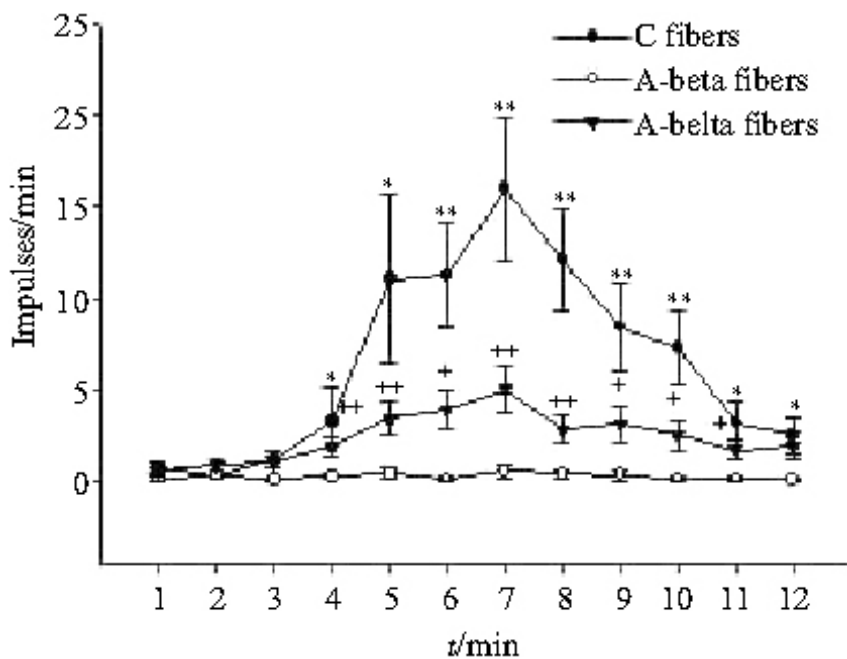


图4 各类纤维感受野注射 $\alpha\beta$ me-ATP过程中和注射后每分钟平均传入放电的时序变化

Fig. 4 Time course of local $\alpha\beta$ me-ATP injection-induced changes in discharge of the primary afferent fibers in the receptive fields of spinal nerve dorsal cutaneous branches 1-2 min: Pre-injection; 2-7 min: During injection; 7-12 min: After injection. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ for C fibers, + $P<0.05$, ++ $P<0.01$ for A δ fibers vs pre-injection

3 讨论

以往的研究表明局部注射 $\alpha\beta$ me-ATP可在该区域引起热和机械痛过敏行为[2]。本实验结果发现，与对照组相比，注射 $\alpha\beta$ me-ATP后A δ 和C类纤维的机械阈值明显降低，自发放电频率显著增加，而且在注射 $\alpha\beta$ me-ATP 2 min 后传入放电开始增加，一直能持续至注射药物后5 min。A β 纤维的机械阈值和自发放电频率均无显著变化，说明 $\alpha\beta$ me-ATP引起的痛敏化可能是由A δ 和C类纤维的兴奋和敏化形成的。

本实验中所记录的背部皮肤各类传入纤维的机械阈值，较文献报道的离体爪部光滑皮肤的机械阈值偏小[12]，原因可能为在体实验与离体实验、背部有毛皮肤与爪部光滑皮肤之间的差异。在体实验中神经末梢附近有丰富的血液循环，而且有毛皮肤的角质层也较爪部皮肤薄，因此背部皮肤各类纤维的机械阈值偏低。对于痛敏化的研究，目前主要从脊髓背角神经元的功能改变进行，而对于各类传入纤维的变化鲜有报道[13]。本实验中局部注射 $\alpha\beta$ me-ATP后A δ 和C类纤维的机械阈值显著降低，表明 $\alpha\beta$ me-ATP引起的痛过敏是由A δ 和C类纤维参与形成的。

所记录到的各类皮肤感受单位的分布比例与文献报道基本一致[12]。由于每个实验组中各类感受单位亚

型的例数较少,加之感觉神经传入放电的变异较大,所以没有分别观察 $\alpha\beta$ me-ATP对每一类感受单位亚型的作用。Dowd等[14]在大鼠关节传入神经发现,关节腔内给予 $\alpha\beta$ me-ATP后,50%的C多型伤害感受单位和65%的A δ 机械伤害感受单位传入放电显著增加。本实验中也发现 $\alpha\beta$ me-ATP可使66.7%A δ 和75.0%C类皮肤初级传入纤维兴奋,表明 $\alpha\beta$ me-ATP对皮肤和关节初级传入纤维的作用相类似,主要作用于A δ 和C类纤维,这也与形态学研究所证明的P2X嘌呤受体主要在感觉神经末梢的细传入纤维表达相一致[1]。

A δ 和C类纤维在注射 $\alpha\beta$ me-ATP的过程中和注射后,自发电频率比前对照显著增多可持续10 min。行为学研究也表明,ATP及 $\alpha\beta$ me-ATP皮下注射后1 min内即可引起明显的时间较长的痛过敏反应[2]。与此不同的是, $\alpha\beta$ me-ATP在伤害性感觉神经元胞体激发的内向电流在数百毫秒内就失活[15]。这种时间的差异可能是外源性 $\alpha\beta$ me-ATP激活了感觉神经末梢的P2X嘌呤受体,以及由此引起一系列继发反应的结果。 $\alpha\beta$ me-ATP是P2X1和P2X3受体的选择性激动剂,而P2X1受体在初级感觉神经元的表达较少[15],因此P2X3受体是介导这种效应的主要受体亚型。研究发现谷氨酸和P物质是外周感觉神经末梢信息传递的主要递质,而初级传入神经元上的P2X3受体激活后又可易化谷氨酸和P物质的释放[16][17],因此当 $\alpha\beta$ me-ATP兴奋了感觉神经末梢的P2X3受体,使初级传入神经元去极化,导致谷氨酸与P物质向外周末梢释放,则这些谷氨酸和P物质可进一步延长和加强初级感觉神经元的去极化,甚至引起伤害性反应。此外,P2X受体也存在于肥大细胞和交感神经[11],因此外周组织的 $\alpha\beta$ me-ATP也可能使交感神经兴奋和肥大细胞脱颗粒,使其释放去甲肾上腺素、前列腺素和组胺等物质,这些物质进而使初级感觉神经元兴奋,形成外周感觉神经末梢之间的跨节段兴奋传递[18][19]。

外周组织受到伤害性刺激时,局部组织的ATP含量上升,通过激活外周神经和肥大细胞上的P2嘌呤受体,引起痛过敏,这种“外周敏化”过程在P2X嘌呤受体作用阻断后明显减弱。因此,P2X嘌呤受体拮抗剂有可能成为一种有效的外周镇痛剂,从而避免镇痛药物全身应用的副作用。

(责任编辑:陈望忠)

参考文献:

- [1]North RA. P2X3 receptor and peripheral pain mechanisms[J]. J Physiol, 2004, 554: 301-8.
- [2]Bland-Ward PA, Humphrey PP. Acute nociception mediated by hind-paw P2X receptor activation in the rat[J]. Br J Pharmacol, 1997, 122: 365-71.
- [3]Hamilton SG, Warburton J, Bhattacharjee A, et al. ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia[J]. Brain, 2000, 123: 1238-46.
- [4]Hamilton SG, Wade A, McMahon SB. The effect of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat[J]. Br J Pharmacol 1999, 126: 326-32.
- [5]Kennedy C, Assis TS, Currie AJ, et al. Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics[J]. J Physiol, 2003, 553: 683-94.
- [6]Zheng JH, Chen J. Modulatory roles of the adenosine triphosphate P2x-purinoceptor in generation of the persistent nociception induced by subcutaneous bee venom injection in the conscious rat[J]. Neurosci Lett, 2000, 278: 41-4.
- [7]Cook SP, McCleskey EW. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP[J]. Pain, 2002, 95: 41-7.
- [8]Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves[J]. J Physiol, 1959, 216: 494-504.
- [9]Burgard EC, Niforatos W, van Biesen T, et al. P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons[J]. J Neurophysiol, 1999, 82: 1590-8.
- [10]Horch KW, Tuckett RP, Burgess PR. A key to the classification of cutaneous

mechanoreceptors[J]. J Invest Dermatol, 1977, 69: 75-8.

[11]Zhang YH, Chen Y, Zhao ZQ. Alteration of spontaneous firing rate of primary myelinated afferents by ATP in adjuvant-induced inflamed rats[J]. Brain Res Bull, 2001, 54: 141-4.

[12]Leem JW, Wills WD, Chung JM. Cutaneous sensory receptors in the rat foot[J]. J Neurophysiol, 1993, 69(5): 1684-99.

[13]Clifford JW, Michael WS. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain[J]. Science, 2000, 288: 1765-8.

[14]Dowd E, McQueen DS, Chessell IP, et al. P2X receptor mediated excitation of nociceptive afferents in the normal and arthritic knee joint[J]. Br J Pharmacol, 1998, 125: 341-46.

[15]North RA. The molecular physiology of P2X receptors[J]. Physiol Rev, 2002, 82: 1013-67.

[16]Gu JG, MacDermott AB. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses [J]. Nature, 1997, 389: 749-53.

[17]Nakatsuka T, Mena N, Ling J, et al. Depletion of substance P from rat primary sensory neurons by ATP, an implication of P2X receptor-mediated release of substance P[J]. Neuroscience, 2001, 107: 293-300.

[18]贾军, 赵晏, 史文春, 等. 电刺激大鼠脊神经皮支对远距离机械感受单位电活动的影响[J]. 生理学报, 2002, 54(2): 125-8.

[19]孙启新, 赵晏, 张世红, 等. 电刺激大鼠皮神经外周端对相邻脊髓节段皮神经内A β 纤维的机械感受特性的影响[J]. 生理学报, 2002, 54(6): 501-7.