

· 实验研究 ·

神经病理性疼痛对溃疡性结肠炎大鼠肠道炎症变化及免疫球蛋白浓度的影响

沈玲 邱海波 陈前波 陆智杰

【摘要】 目的 观察脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)导致的疼痛对溃疡性结肠炎大鼠肠道病理改变及循环中免疫球蛋白浓度的影响。**方法** 健康雄性大鼠 36 只,体重 200~220 g,采用随机数字表法分为三组:SNL 模型组(SNL 组)、假手术组(Sham 组)和对照组(Con 组),每组 12 例。建立稳定的疼痛模型后,三组大鼠均予以三硝基苯磺酸(TNBS)诱导产生溃疡性结肠炎。分别于 SNL 术前、TNBS 造模前及造模后第 7 天和第 14 天采血检测血清免疫球蛋白(IgG、IgM)浓度变化,并于造模后第 7 天取病变明显部位的结肠组织观察炎症病理改变。**结果** 三组大鼠术前 IgG、IgM 浓度差异无统计学意义;脊神经结扎后 SNL 组血清 IgG 浓度略低于 Sham 组,而血清 IgM 浓度明显低于 Sham 组($P<0.05$);TNBS 造模第 7 天 SNL 组大鼠血清 IgG、IgM 浓度升高幅度明显小于 Sham 组和 Con 组($P<0.01$);TNBS 造模第 14 天 SNL 组大鼠血清 IgG 浓度明显低于 Sham 组及 Con 组($P<0.05$);TNBS 造模第 7 天,与 Sham 组和 Con 组比较,SNL 组结肠病变范围更为广泛,炎症程度更为严重。**结论** 神经病理性疼痛抑制机体体液免疫,使血清 IgM、IgG 浓度降低,从而加重肠道炎症病理改变程度。

【关键词】 神经病理性疼痛;溃疡性结肠炎;免疫应答

Effects of neuropathic pain on intestinal pathology and immunoglobulin levels in rats with ulcerative colitis SHEN Ling, QIU Haibo, CHEN Qianbo, LU Zhijie. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital of Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
Corresponding author: LU Zhijie, Email: lzjwxyz@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of spinal nerve ligation (SNL) on the changes of intestinal pathology and the levels of serum immunoglobulin in rats with ulcerative colitis. **Methods** Thirty-six healthy male rats, weighing 200-220 g, were randomly divided into three groups using the random number table method: spinal nerve ligation model group (group SNL), sham-operation group (group Sham) and non-operated control group (group Con), 12 in each group. After the establishment of SNL models, the three groups were given trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS) to induce ulcerative colitis. The serum level of immunoglobulin (IgG, IgM) were measured on the day before SNL, before TNBS modeling and 7, 14 d after TNBS modeling, respectively. Besides, the intestinal pathology were observed on 7 d after TNBS modeling. **Results** The basic values of IgM and IgG before operation were not statistically different among three groups. The level of IgG in group SNL was lower than that in group Sham after SNL operation with no significant difference, but the level of IgM was significantly lower than that of group Sham ($P<0.05$). On 7 d after TNBS modeling, both levels of IgG and IgM in group SNL were significantly lower than those in group Sham and group Con ($P<0.01$). On 14 d after TNBS modeling, the level of IgG in group SNL was significantly lower than that in group Sham and group Con ($P<0.05$). Furthermore, the colon lesions were more extensive and the inflammation was more serious in group SNL than those in group Sham and group Con on 7 d after TNBS modeling. **Conclusion** Neuropathic pain suppress immune activities, reduces the serum level of IgM and IgG and aggravates intestinal inflammation caused by TNBS.

【Key words】 Neuropathic pain; Ulcerative colitis; Immune response

疼痛是机体对抗外界伤害的保护性反射,剧烈的疼痛以及由各种原因引起的慢性病理性疼痛使机体产生不良的应激反应。研究发现,疼痛能够抑

制大鼠自然杀伤细胞的活性并促进肿瘤细胞扩散^[1],提示疼痛能显著抑制机体的免疫功能。神经病理性疼痛是由躯体感觉神经系统损伤或疾病导致的疼痛状态,属于慢性疼痛的一种,通常表现为痛觉过敏和异常疼痛等临床特征。溃疡性结肠炎是结直肠慢性非特异性炎症性疾病,以血性腹泻为主,主要特征是肠道黏膜慢性炎症和溃疡形成,由

作者单位:200438 上海市,第二军医大学附属东方肝胆外科医院麻醉科

通信作者:陆智杰,Email: lzjwxyz@163.com

于其病程漫长,研究中经常用此模型来模拟临床上慢性炎症的状态。

为探讨疼痛对免疫系统功能的影响,本实验拟通过脊神经结扎建立神经病理性疼痛模型,在此基础上建立大鼠溃疡性结肠炎模型模拟慢性炎症过程,通过检测肠道病理改变和循环免疫球蛋白浓度变化,探讨疼痛在急性炎症阶段和慢性炎症阶段对机体免疫系统的影响,为相关基础领域提供新的研究思路。

材料与方法

实验动物及分组 SPF 级 SD 雌性大鼠 36 只,7 周龄,体重 200~220 g,由第二军医大学实验动物中心提供,自由饮水和取食,12 h 昼夜周期,室内温度控制在 22~26℃。所有进行行为学测试的动物需适应环境 3 d 后进入实验。采用随机数表法将大鼠分为三组:脊神经结扎组(SNL 组)、假手术组(Sham 组)和对照组(Con 组),每组 12 只。

脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)疼痛模型的建立 SNL 组根据 Kim 等^[2]描述的方法建立 SNL 疼痛模型:腹腔注射 2%戊巴比妥钠将大鼠麻醉后,以两侧髂关节水平连线与脊柱交汇点为中心,纵向切开约 3 cm 长的皮肤,钝性分离皮下组织及肌肉直至找到 L₆ 横突,用咬骨钳将其移除后暴露 L₅ 神经,分离 L₅ 神经并用丝线扎紧。观察无明显活动性出血后逐层缝合肌肉皮肤。Sham 组暴露并分离 L₅ 神经但不进行结扎,Con 组不做任何 SNL 处理。

溃疡性结肠炎模型的建立 建立 SNL 疼痛模型后,三组大鼠禁食 24 h,术前将三硝基苯磺酸(TNBS) 50 mg/kg 与无水乙醇等比例均匀混合,用 2%戊巴比妥钠将大鼠麻醉后,将硅胶导管从大鼠肛门轻柔插入结肠内约 8 cm,采取头低尾高的体位缓慢注入配制好的 TNBS,灌注完成后将大鼠倒提 30 s 防止灌注液体外溢。

病理组织学观察 于造模后第 7 天取病变明显部位的结肠组织,沿肠系膜纵轴剪开,用生理盐水冲洗干净并置于 4%多聚甲醛中固定,随后石蜡包埋切片,HE 染色,并于光学显微镜下放大 400 倍拍照保存。

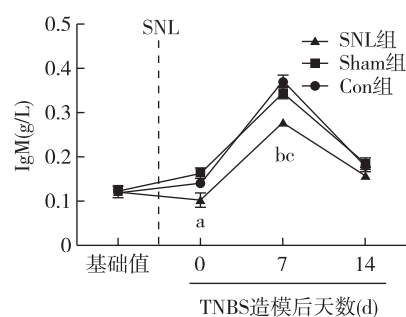
免疫球蛋白检测 分别于 SNL 术前、TNBS 造模前及造模后第 7 天和第 14 天,用 1 ml 注射器从大鼠左心室抽取新鲜血液放入促凝管中,离心后取上清,检测血清中 IgG、IgM 和 IgA 的浓度。

统计分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理。正态分布计量资料以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示,组间比较采用单因素方差分析,不同时点比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

建立 SNL 疼痛模型前,三组大鼠血清 IgM 浓度基础值差异无统计学意义。建立 SNL 后,Sham 组大鼠血清 IgM 浓度明显高于建模前,而 SNL 组大鼠血清 IgM 浓度明显低于建模前($P < 0.05$)。给予 TNBS 灌注诱导大鼠溃疡性结肠炎 7 d 后,三组大鼠 IgM 浓度均有所升高,但 SNL 组 IgM 浓度升高幅度明显小于 Sham 组和 Con 组($P < 0.01$);TNBS 造模 14 d 后,三组大鼠血清 IgM 浓度与建模前差异无统计学意义(图 1)。



注:与 Sham 组比较,* $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 Con 组比较,^c $P < 0.01$

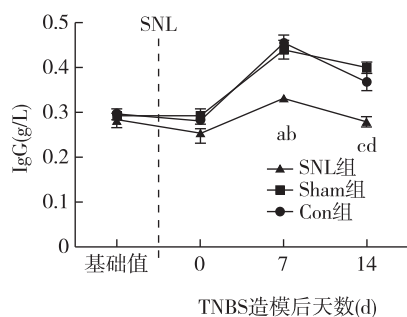
图 1 三组大鼠血清 IgM 浓度的比较

建立 SNL 疼痛模型前,三组大鼠血清 IgG 浓度差异无统计学意义。建立 SNL 后,Sham 组大鼠血清 IgG 浓度较建模前略微升高,SNL 组大鼠血清 IgG 浓度较建模前降低,两组差异无统计学意义。给予 TNBS 灌注诱导大鼠溃疡性结肠炎 7 d 后,三组大鼠 IgG 浓度均有所升高,但 SNL 组 IgG 浓度升高幅度明显小于 Sham 组和 Con 组($P < 0.01$);TNBS 造模 14 d 后,三组大鼠血清 IgG 浓度有所回落,且 SNL 组大鼠血清 IgG 浓度明显低于 Sham 组和 Con 组($P < 0.05$) (图 2)。

TNBS 造模后第 7 天,三组大鼠肠道病理学组织均可见溃疡及黏膜上皮脱落,伴大量炎性细胞浸润。SNL 组病理改变更为严重,可见片状溃疡、糜烂,并出现大量的细胞核溶解。Sham 组和 Con 组肠道病理改变不明显(图 3)。

讨 论

疼痛是与组织损伤和潜在损伤相关的不愉快



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$,^c $P < 0.05$;与 Con 组比较,^b $P < 0.01$,^d $P < 0.05$

图 2 三组大鼠血清 IgG 浓度的比较

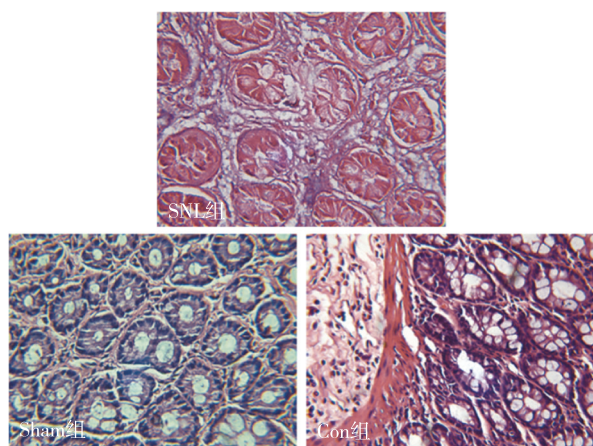


图 3 三组大鼠结肠病理组织改变(HE, ×400)

的主观感觉和情感体验,有研究表明,急性或慢性疼痛都会不同程度抑制机体免疫系统^[3, 4],但很少有研究深入探讨疼痛在炎症的早期和晚期分别如何影响机体的体液免疫系统。

神经病理性疼痛的特征是异常性疼痛、痛觉过敏及持续性自发疼痛,属于慢性疼痛中的一种。本实验通过建立 SNL 神经病理性疼痛模型来模拟临床上慢性疼痛,该模型通过结扎坐骨神经分支 L₅ 脊神经,诱发 L₅ 神经支配区域机械性痛阈和热痛阈显著降低。随后采用 TNBS 诱导建立溃疡性结肠炎模型,该模型的特点是结肠组织呈慢性炎症改变,病程长^[5],有利于分别探讨疼痛在急性炎症阶段和慢性炎症阶段对机体体液免疫的影响。另有研究表明,不同剂量的 TNBS 对结肠病变和生存率有不同的影响^[6],本实验为了突出疼痛对免疫系统的影响,选取相对较低的 TNBS 剂量(50 mg/kg),该剂量既能成功诱导溃疡性结肠炎病变,又能维持相对较轻的炎症改变,不至于完全掩盖疼痛在其中的作用。

血清免疫球蛋白参与溃疡性结肠炎的发生发展,这与结肠一系列抗原如结肠上皮细胞抗原、大肠杆菌脂多糖抗原等刺激 B 细胞产生免疫球蛋白有关^[7],因此血清免疫球蛋白经常被认为是评价溃疡性结肠炎转归的免疫学指标。循环中 IgA 浓度太低未检出, IgM 和 IgG 在 SNL 建模后均有所升高,推测是手术创伤早期体液免疫激活所引起。而脊神经结扎的大鼠 IgM 和 IgG 浓度均低于对照组,说明神经病理性疼痛在一定程度上抑制了机体体液免疫的激活。

在 TNBS 造模后的急性期和慢性期,脊神经结扎大鼠 IgM、IgG 浓度均明显低于对照组,进一步表明神经病理性疼痛可抑制体液免疫的激活。另一方面,在 TNBS 造模后第 7 天的急性病变期病理检测发现,脊神经结扎的大鼠结肠病变范围更为广泛,炎症程度更为严重,甚至出现了核溶解现象,这可能与神经病理性疼痛大鼠体液免疫激活水平较低有关。值得注意的是,更为严重的溃疡性结肠炎使肠黏膜局部免疫复合物形成并迅速积累,可能一定程度上影响了血清 IgG 的浓度。

综上所述,神经病理性疼痛在一定程度上抑制机体体液免疫,使血清 IgM、IgG 浓度降低,从而加重炎症病理改变。

参 考 文 献

- [1] Kim SY, Kim NK, Baik SH, et al. Effects of postoperative pain management on immune function after laparoscopic resection of colorectal cancer: a randomized study. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(19): e3602.
- [2] Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 1992, 50(3): 355-363.
- [3] Generaal E, Vogelzangs N, Macfarlane GJ, et al. Basal inflammation and innate immune response in chronic multisite musculoskeletal pain. *Pain*, 2014, 155(8): 1605-1612.
- [4] Thumbikat P, Shahrara S, Sobkoviak R, et al. Prostate secretions from men with chronic pelvic pain syndrome inhibit proinflammatory mediators. *J Urol*, 2010, 184(4): 1536-1542.
- [5] Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-colitis. *International reviews of immunology*, 2000, 19(1): 51-62.
- [6] Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, et al. The TNBS-induced colitis animal model: an overview. *Ann Med Surg (Lond)*, 2016, 11: 9-15.
- [7] Wang X, Jiang Y, Zhu Y, et al. Circulating memory B cells and plasmablasts are associated with the levels of serum immunoglobulin in patients with ulcerative colitis. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(5): 804-814.

(收稿日期:2016-09-27)