

神经损伤区新生离子通道与异常电活动的关系*

谢益宽 肖文华 李惠清

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘 要

本文报道在因慢性压迫而引起损伤并产生异常传入放电的神经纤维上,应用几种离子通道药物局部作用于神经损伤区或全身注射,观察受伤神经纤维传入电活动的变化。实验表明,在神经损伤后而产生异常传入电活动的背景上, K^+ 通道的阻断剂四乙胺(TEA)使异常放电频率明显增加; Na^+ 通道阻断剂河豚毒素(TTX)浸润神经损伤区使异常放电活动消失; Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定,或影响 Ca^{2+} 通道的 Mn^{2+} , La^{3+} 离子,不但抑制自发的异常电活动,而且可阻止TEA,去甲肾上腺素(NA)或 K^+ 在损伤区诱发的异常放电。相反,增加神经损伤区的 Ca^{2+} 浓度使放电增加。这些离子通道药物对神经损伤区的异常放电的易化或抑制作用与对正常传入神经纤维电活动的不敏感性迥然不同,提示神经损伤后发生的异常传入电活动与损伤区的轴突膜上新生离子通道有关,其中可能有新生的 Ca^{2+} 通道,并参与异常放电的产生。

关键词: 神经损伤,痛觉过敏,离子通道,去甲肾上腺素

外周神经病变或损伤通常造成髓鞘脱落和神经功能障碍。在外周神经病变损伤或由于神经横断后而形成神经瘤的神经病模型上,已经观察到来源于神经损伤区的不同类型纤维的自发异常传入电活动^[1-9],这种异常电活动可能是导致感觉生理功能紊乱的外周因素^[5-9]。一些研究已经证明,神经损伤后的异常传入活动与交感性神经释放NA有密切的联系^[1,4,8]。而外源或内源性的NA并不诱发正常神经纤维产生异常电活动^[8]。神经损伤区对某些与离子通道有关的药物非常敏感,应用这些药物可诱发或消除异常放电^[8,10],表明神经受伤区轴突膜的结构和兴奋性可能发生很大的变化。

本文以异常传入电活动为指标,进一步分析外周神经损伤区的新生离子通道的种类和它们与异常电活动之间的关系。证明除了神经损伤区除了有新生的 K^+ , Na^+ 通道外可能还有新生的 Ca^{2+} 通道,而且NA等内源性物质可能就是通过 Ca^{2+} 的介导而诱发异常放电的。

1991 年 6 月 26 日收到修改稿。

* 国家自然科学基金资助项目、中国医学基金会(CMB)和卫生部重点科研课题基金资助项目。

一、材 料 和 方 法

实验是在成年的 Sprague-Dawley 大鼠(200—300g)上进行的,在 40mg/kg 体重的戊巴比妥钠腹腔麻醉下,分离左侧坐骨神经,在股骨段的中部用 4 号铬制羊肠线轻度结扎神经,以引起小腿肌肉挛缩为度,每隔 2mm 打一结,共 4 结。手术后 5—7 天,动物的手术侧肢体开始呈现痛觉过敏,对伤害性热刺激的缩腿回避反应潜伏期明显减少。详细的手术方法及对动物行为功能测定已有详细的报道^[8,11]。

手术 7 天以后的 2 个月内,在损伤侧肢体表现出痛觉过敏和感觉异常的同时,从神经损伤区的中枢端可记录到异常的传入电活动^[8],动物重新用戊巴比妥钠麻醉,分离出包括结节区在内长达 5—7cm 的坐骨神经段,用皮瓣和结缔组织构筑前后两个不相贯通的液槽,前液槽包含非损伤的神经中枢段,用温液体石蜡油浸泡神经,在此神经段分离神经细束并记录单纤维的传入异常电活动。神经的损伤段位于后液槽内,用生理溶液浸泡。仔细清除神经上的羊肠线残结和神经周围的增生组织,充分使神经的损伤区暴露于溶液中。

当记录到来自损伤区的纤维异常电活动后^[8],为分析异常电活动与离子通道的关系,下列几种药物的溶液分别替换全部的生理溶液,观察它们对异常电活动的影响。局部应用的药物溶液为四乙胺(TEA, 10mmol/L, Sigma),河豚毒素(TTX, 10 μ mol/L 河北水产研究所),异搏定(Verapamil, 5mmol/L, 500, 100, 50, 5 μ mol/L), NA (4 μ mol/L), La (NO)₃ (La³⁺, 10mmol/L), CaCl₂ (Ca²⁺, 5, 10, 20, 40 mmol/L), MnCl₂ (Mn²⁺ 10mmol/L) 和 KCl (K⁺ 10—50mmol/L)。上述药物均溶于生理溶液中,经过换算增加相应的蒸馏水量使渗透压保持生理盐水水平。在分析异常电活动与 NA 的关系时, 5 μ g/次的 NA 作静脉注射。在对照动物中除神经是正常外,其他手术过程,实验方法与神经损伤组相同。动物体温保持在 37—38°C 之间。

二、结 果

手术 7 天以后,便可记录到来自神经损伤区的异常放电活动,对神经损伤区的轻度机械刺激,温度的突然改变,电的或化学等刺激都可强烈地加快原来的自发放电频率或诱发静息状态的纤维放电^[8]。因此,我们把神经损伤区视为异常电活动的发源区。观察几类神经离子通道药物对它们的影响。

1. TEA 的作用

用 K⁺ 通道阻断剂 TEA 代替生理溶液浸泡神经损伤区或注射 Flaxedil (10mg/kg), 在 20—30s 的潜伏期后,原来的自发性异常放电急剧增加,有时可激发处于静息状态的纤维高频放电,用生理溶液冲洗掉 TEA 可快速恢复到原来的放电水平。图 1 表示 A β 纤维的 TEA

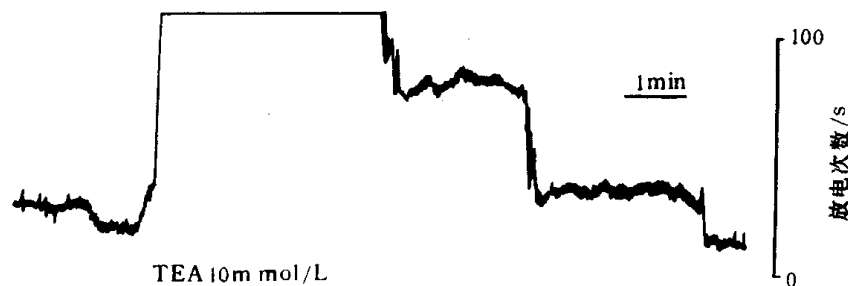


图 1 TEA 对神经损伤区异常放电的兴奋效应
(记录来自单位 A β 纤维,手术后 10 天的坐骨神经)

兴奋性反应。重复使用 TEA 并没有发现适应现象。显然, TEA 阻断损伤区纤维内 K^+ 的外流, 导致神经区的去极化而促成放电。在 40 根损伤的 A 类或 C 类单位纤维的电活动中, 毫无例外地都为 TEA 所兴奋。一个总的倾向是背景放电越活跃, TEA 的兴奋作用越强。用相同浓度的 TEA 浸浴正常的神经干或损伤神经的非损伤区, 尽管浸浴的时间长达 30min 以上, 没有观察到任何兴奋效应或诱发出新的放电活动($n=30$)。说明 TEA 对正常纤维没有兴奋作用, 而只是对神经的损伤区才表现为特异的兴奋效应。静脉注射也有类似的结果。

2. TTX 的作用

在 10 根具有异常放电的神经细束上观察 Na^+ 通道阻断剂 TTX 的作用, 其结果如图 2 所示, 在神经损伤区滴加 TTX 液, 放电突然停止, 最短的潜伏期为 20s, 反复用生理溶液冲洗

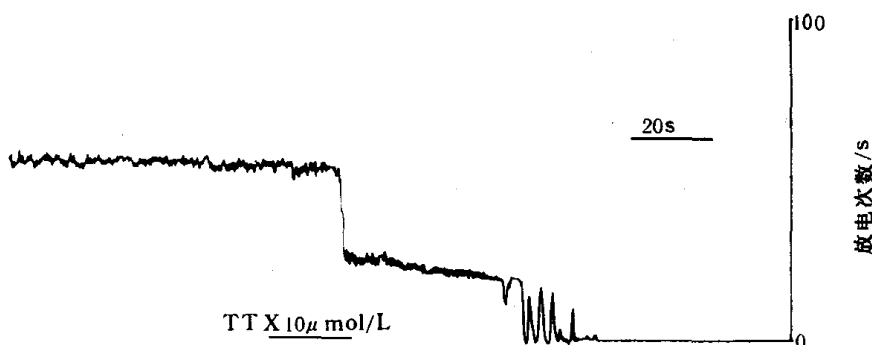


图2 TTX 对受伤神经异常放电的阻断作用

(多单位的放电活动, 神经纤维类型没有鉴定, TTX 被清洗后, 放电不见恢复, 经电刺激未损伤的神经干可记录到动作电位, 说明 TTX 此时并没有影响神经的非损伤区正常功能)

TTX 也不能恢复原来的自发放电活动。而在正常组的单纤维活动的实验中, 部分纤维的放电可被 TTX 所消除, 但潜伏期长达 15—20min, 部分纤维($n=4$)的放电并不为 TTX 所阻断, 如果提高浓度到 $100\mu\text{mol/L}$, 使动物因吸收过量的 TTX 而停止呼吸, 但自发的异位放电还可继续一段时间($n=2$)。这种差异可能是由于神经损伤区的髓鞘脱落, 轴突膜上的 Na^+ 通道表露而易受 TTX 阻断, 而正常神经纤维由于髓鞘的覆盖, TTX 渗入郎飞氏结区相对缓慢之故。

3. 几种影响 Ca^{2+} 通道药物的作用

应用不同浓度($10—20\text{mmol/L}$) Ca^{2+} 溶液作用神经损伤区, 结果表明 10mmol/L 的浓度即可明显地加速损伤纤维的异常放电, 图3示一根 $A\beta$ 纤维对含有 20mmol/L Ca^{2+} 的反应。在 Ca^{2+} 的作用下, 原来的自发性放电频率明显增加($n=13$)。这种高浓度 Ca^{2+} 诱发的兴奋作用可被预先用 Ca^{2+} 通道阻断剂 Mn^{2+} , La^{3+} 等的处理而消失。

使用从 $5\mu\text{mol/L}$ 到 5mmol/L 的一系列不同浓度的 Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定浸泡神经损伤区或静脉注射, 经过 2—15min 的潜伏期, 毫无例外地抑制 $A\beta$ 和 $A\delta/C$ 纤维的异常传入放电(图4(a))。 $50\mu\text{mol/L}$ 的局部浓度就足以阻断异常放电, 尽管在放电停止后用生理溶液置换异搏定, 但在 3—4h 内仍未见异常放电重现($n=12$)。异搏定不但抑制自发的异常放电, 而且可阻断局部应用 TEA(图4(b), $n=15$), 高浓度 KCl(图4(c), $n=6$)或静脉注射 NA(图4(d), $n=4$)而诱发静息纤维异常放电。提示 Ca^{2+} 通道介导异常放电的易化作用。

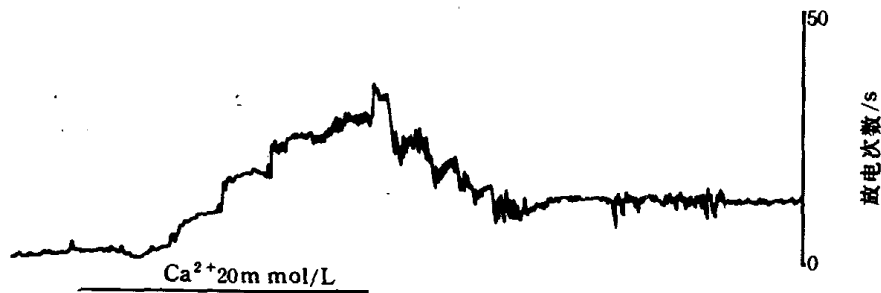


图3 Ca^{2+} 作用于神经损伤区对 $\text{A}\beta$ 纤维异常放电活动的兴奋性影响

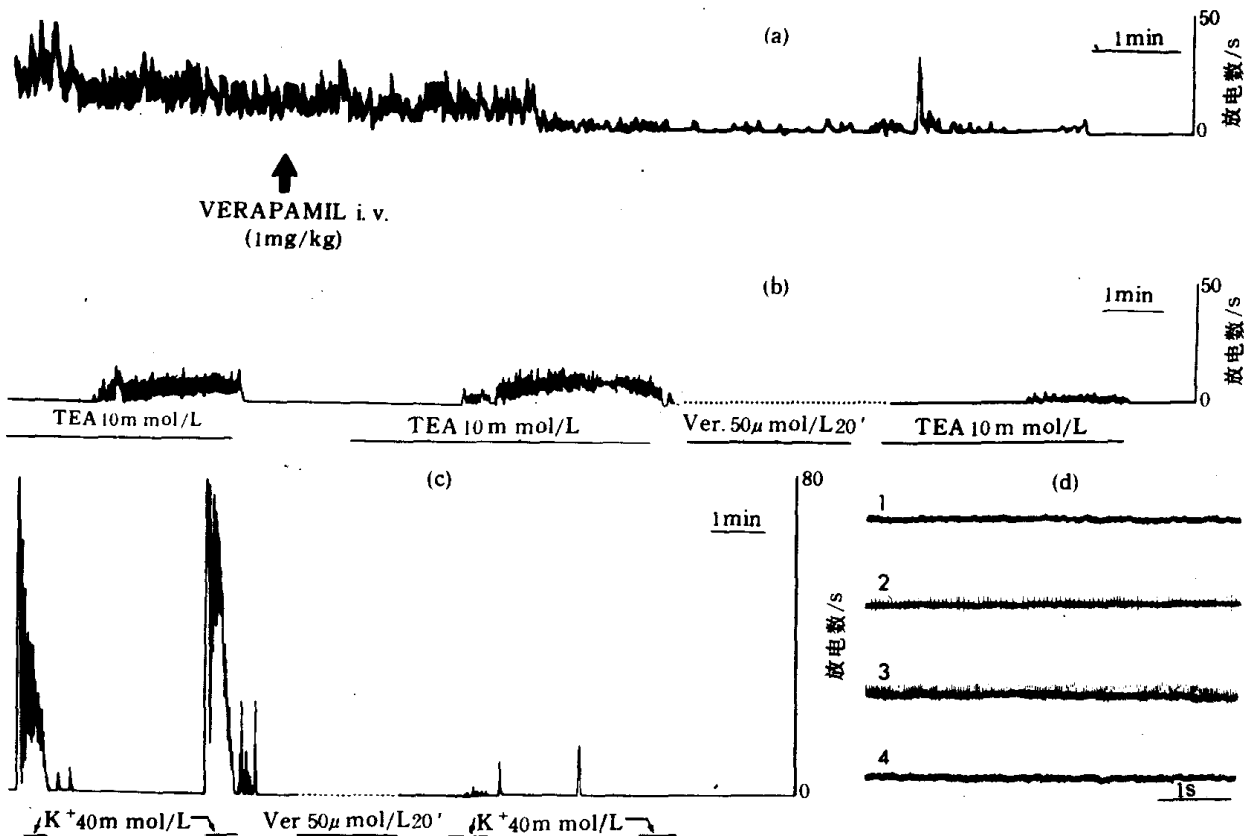


图4 Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定对自发及诱发异常放电的抑制

((a) 静脉注射(1mg/kg)对自发放电的作用; (b) 示局部应用异搏定(Ver.)后消除 TEA 诱发 $\text{A}\beta$ 纤维的放电; (c) 示高浓度 K^+ (40mmol/L) 激活 $\text{A}\beta$ 纤维的异常放电与异搏定对它的抑制; (d) 静脉注射异搏定(1mg/kg)阻断局部应用 NA 诱发的 C 类纤维的放电. 1——NA 作用前, 2, 3——分别为两次局部应用 NA 至神经损伤区的诱发放电, 示 NA 无适应性, 4——静脉注射异搏定后, NA 的诱发放电消失)

应用 La^{3+} , Mn^{2+} 等影响 Ca^{2+} 通道的离子浸泡神经损伤区, 也同样可减少或消除异常放电, 局部应用 La^{3+} 不但使 14 根已鉴定的纤维中的 13 根异常放电完全抑制, 而且明显的抑制 TEA 的诱发性放电(图 5(a)). 应用 Mn^{2+} 也可消除自发或诱发的异常放电(图 5(b), $n=15$).

在 8 只正常动物分离出的 24 根 $\text{A}\beta/\text{A}\delta$ 类纤维上观察上述几类影响 Ca^{2+} 通道药物对自发放电的作用, 结果证明这几类药物直接作用于神经干上对神经的自发放电没有任何影响.

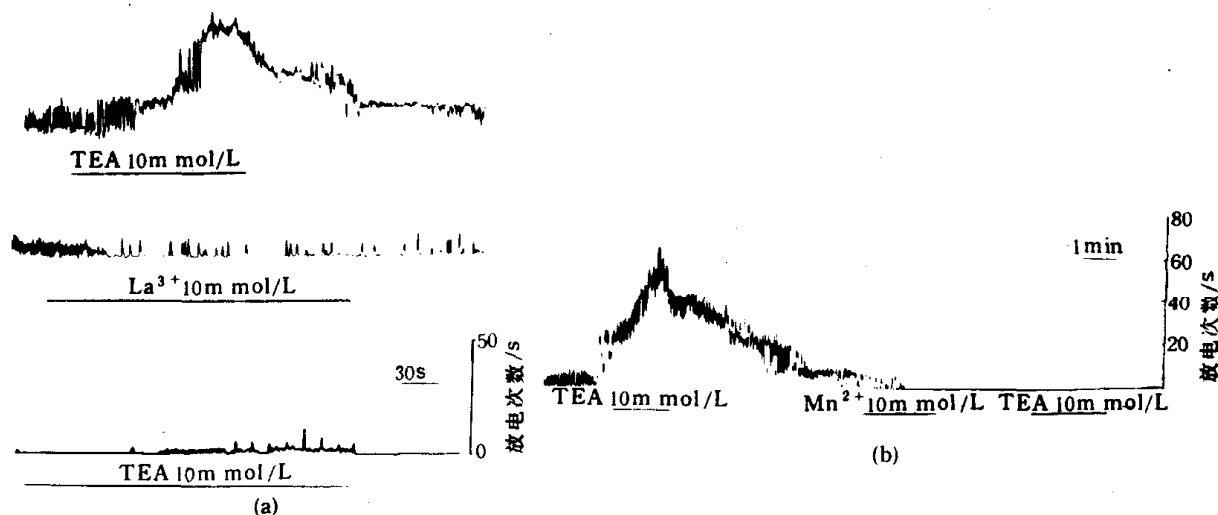


图5 Ca^{2+} 通道药物 La^{3+} , Mn^{2+} 对自发和诱发异常电活动的影响

((a)示 $\text{A}\delta$ 纤维异常放电的顺序记录, Ca^{2+} 的拮抗剂 La^{3+} 抑制自发放电和阻断 TEA 的兴奋效应; (b)局部应用 Mn^{2+} 对 TEA 诱发 $\text{A}\beta$ 纤维异常放电的抑制)

上述的结果表明,神经损伤区域对 K^+ , Na^+ , 和 Ca^{2+} 通道的药物异常敏感,这种敏感性意味着这一区域芽生区的轴突膜可能形成了新的离子通道,其中 Ca^{2+} 通道可能也是介导神经受伤区产生异常放电的主要因素之一。

三、讨 论

当神经受到损伤,在裸露的轴突膜上形成新的离子通道的时程需要 6—7 天^[10]. 在我们的动物模型上,异常电活动也恰好出现在术后 6—7 天以后^[8]. 用术后不同时期的神经作实验表明,手术后 5 天内,从神经细束上很少能记录到异常电活动,同时损伤区对上述离子通道药物的反应很弱,提示异常电活动的产生与轴突膜上新生的离子通道的出现有相关性. 除了已知神经损伤而髓鞘脱落区的结间轴突膜上有新生的 K^+ , Na^+ 离子通道存在外^[10], 利用异搏定, Mn^{2+} , La^{3+} 和外源性 Ca^{2+} , 高浓度 K^+ 作用于损伤区可以显著地影响神经的异常放电,提示在损伤区可能存在着新生 Ca^{2+} 通道的可能性。

现在的问题是,为什么郎飞氏结处的离子通道常不产生自发放电,而在神经损伤区新形成的离子通道则可成为异常放电的起搏点? 其中哪种通道起主要作用? 外周神经损伤的一个共同特点是胞体与外周感受器或靶器官的联系被阻断或受到损害,受伤区的轴突髓鞘脱落,神经冲动传导受阻,同时,损伤区的胞体端的轴突发生肿胀或芽生等现象. Freeman 等证明再生的轴突生长锥具有活跃的电活动,这是由于轴突的生长锥电压敏感的 Ca^{2+} 通道被激活的结果. 这种 Ca^{2+} 电流可促使神经介质的释放^[12]. 最近证明,NA 对很多中枢和外周神经系统都具有缓慢的去极化作用^[13,14], 是在 α 受体的参与下,与 K^+ 的电导降低和 Ca^{2+} 的电导增加有关^[15,16]. 神经再生过程中突起处轴突膜的 Ca^{2+} 激活的阳离子选择性通道的活动极为活跃,特别是 Ca^{2+} 通道异乎寻常的紧张性开放为轴突的去极化提供一个必要的条件^[15]. 在我们的实验中,应用异搏定和 Mn^{2+} , La^{3+} 这种 Ca^{2+} 通道阻断剂可以有效地阻断这种电活动,而提高纤维外的 Ca^{2+} 浓度或应用高浓度 K^+ 溶液可兴奋异常放电. 上述的资料提示了 Ca^{2+} 通道参与异常电活动的可能性。

在实验中我们观察到,神经损伤区对离子通道药物的反应有一个时间限制因素。如前所述,手术后的前 5—7 天,对药物的反应迟钝,而一旦结节的结被吸收,来自末梢的传入冲动可进入损伤区时,异位放电减少,神经的损伤区对上述几类离子通道药物又变得不敏感了。这就是选取手术后 7—60 天内记录异常电活动的原因。我们推测,神经受伤处轴突膜产生了新的离子通道,产生异位电活动,对各种刺激变得异常敏感^[8],神经受伤处形成具有类似末梢感受器的功能,这似乎是一种末梢功能代偿现象。当神经修复,外周感受器的冲动可通过损伤区后,代偿功能就失去了它的生物学意义,这时新生的离子通道就消退了,这就可以理解神经对离子通道药物反应不敏感的原因了。下列的资料也支持我们的猜想,Ferreira 等发现末梢炎症痛觉过敏与伤害性感受器与 Ca^{2+} 及 cAMP 浓度有关,注射 NA,肾上腺素, Ca^{2+} 载体都可一一引起痛觉过敏。使用 Ca^{2+} 通道阻断剂异搏定和 La^{3+} 则可减缓疼痛^[17],最近胡三觉等也观察到刺激交感神经或局部注射 NA 可使由复合致痛剂诱发的多觉型伤害性感受器放电显著增多^[18]。这些结果与我们在神经损伤区所见到的现象十分类似。在神经损伤的情况下,神经再生区发展起类似感受器的功能,暂时性地代偿失去末梢感受器的活动。受伤神经区的异常电活动的痛觉过敏与正常神经末梢在炎症过程中痛觉过敏可能有类同的机制。

参 考 文 献

- [1] Wall, P. D. & Gutnick, M., *Exp. Neurology*, **43** (1974), 580—593.
- [2] Govrin-Lippmann, R. & Devor, M., *Brain Res.*, **159** (1978), 406—410.
- [3] Lamotte, R. H. & Campbell, J. N., *J. Neurophysiol.*, **41** (1978), 509—528.
- [4] Scadding, J. W., *Exp. Neurology*, **73** (1981), 345—364.
- [5] Meyer, R. A. et al., *Brain Res.*, **352** (1985), 255—260.
- [6] Habler, H.-J., Janig, W. & Koltzengurg, M., *Neurosci. Lett.*, **82** (1987), 35—40.
- [7] Blumberg, H. & Janig, W., *Exp. Neurology*, **76** (1982), 468—482.
- [8] 谢益宽、肖文华, 中国科学 B 辑, 1989, 8; 843—851.
- [9] Sherratt, R. M., Bostock, H. & Sears, Y. A., *Nature*, **283** (1980), 570—572.
- [10] Chiu, S. Y., Sherager, P. & Ritchie, J. M., *Brain Res.*, **359** (1985), 338—342.
- [11] Bennett, G. J. & Xie, Y.-K., *Pain*, **33** (1988), 87—107.
- [12] Freeman, J. A. et al., *J. Neurosci. Res.*, **13** (1985), 257—283.
- [13] Yoshimura, M., Higashi, H. & Nishi, S., *Neurosci. Lett.*, **61** (1985), 305—342.
- [14] Akasu, T. et al., *J. Physiol.*, **361** (1985), 165—184.
- [15] Lipton, S. A., *Neurosci. Lett.*, **82** (1987), 21—28.
- [16] McCormick, D. A. & Prince, D. A., *J. Neurophysiol.*, **59** (1988), 976—996.
- [17] Ferreira, S. H. & Nakamura, M., *Prostaglandins*, **18** (1979), 179—190.
- [18] Hu, S. J., *Pain*, **38** (1989), 85—90.