

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002125

神经肽 Y 和受体在腰椎动静力失衡大鼠模型中表达
及对痛阈的影响韩 燚¹, 谢玮鑫¹, 肖 洁², 陈雪梅², 李展春¹

(上海交通大学医学院附属仁济医院 1. 骨科; 2. 麻醉科, 上海 200127)

【摘要】目的:观察神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)及 Y1R、Y2R 在椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 组和假手术 (sham operation, SHAM) 组大鼠椎间盘 (intervertebral disc, IVD) 和背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 表达的差异, 以及与大鼠机械缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 的相关关系, 探讨 NPY 及受体与椎间盘源性腰痛的关系。**方法:**选择 6 月龄无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雌性未孕 SD 大鼠 12 只, 随机分为椎间盘退变组和假手术组 ($n=6$), 前者采用动静力失衡大鼠椎间盘退变模型, 后者做假手术处理, 造模后 12 周通过 MRI 和 X 线评估椎间盘退变模型建立是否成功并测量 2 组大鼠 MWT 及 TWL, 使用免疫组织化学法检测 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 及受体的表达, 分析其平均光密度 (mean optical density, MOD) 值与疼痛行为学之间的相关性。**结果:**①疼痛检测发现, 术后 12 周 IDD 组大鼠 MWT 较 SHAM 组大鼠明显降低 [(9.44 ± 2.91) g vs. (17.99 ± 4.40) g, $P=0.002$], TWL 明显降低 [(9.17 ± 0.39) s vs. (13.53 ± 1.69) s, $P=0.002$]。②免疫组织化学法检测显示, 与 SHAM 组相比, IDD 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的表达明显升高 [IVD: (0.15 ± 0.03) vs. (0.11 ± 0.02) , $P=0.021$; DRG: (0.23 ± 0.04) vs. (0.17 ± 0.04) , $P=0.018$], Y1R 表达明显降低 [IVD: (0.10 ± 0.02) vs. (0.13 ± 0.01) , $P=0.009$; DRG: (0.05 ± 0.01) vs. (0.08 ± 0.01) , $P=0.000$], 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 Y2R 的表达差异均无统计学意义。③Pearson 相关性分析表明, 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与 MWT 之间成负相关关系 ($r=-0.605$, $P=0.037$; $r=-0.617$, $P=0.033$); 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 Y1R 的 MOD 值与 MWT 之间成正相关关系 ($r=0.696$, $P=0.012$; $r=0.735$, $P=0.006$)。2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与 TWL 之间成负相关关系 ($r=-0.603$, $P=0.038$; $r=-0.708$, $P=0.010$); 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 Y1R 的 MOD 值与 TWL 之间成正相关关系 ($r=0.624$, $P=0.030$; $r=0.834$, $P=0.001$)。**结论:**在腰椎动静力失衡大鼠模型中, NPY 可能通过外周 Y1R 参与椎间盘源性腰痛的发生发展, 但其具体机制有待进一步研究。

【关键词】神经肽 Y; 动静力失衡; 椎间盘源性腰痛; 疼痛行为学**【中图分类号】**R681.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-16Expression of neuropeptide Y and its receptors in the rat model of
intervertebral disc degeneration induced by unbalanced dynamic and
static forces and its correlation with pain thresholdHan Yi¹, Xie Weixin¹, Xiao Jie², Chen Xuemei², Li Zhanchun¹(1. Department of Bone and Joint Surgery; 2. Department of Anesthesiology, Renji Hospital,
School of Medicine, Shanghai Jiaotong University)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of neuropeptide Y (NPY), Y1 receptor (Y1R), and Y2 receptor (Y2R) in the intervertebral disc (IVD) and dorsal root ganglion (DRG) of rats with intervertebral disc degeneration (IDD) and sham-operated rats, and to investigate the correlation of NPY and its receptors with mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) in rats and the relationship of NPY and its receptors with discogenic low back pain. **Methods:** Twelve 6-month-old female specific pathogen-free Sprague-Dawley rats which were not pregnant were equally and randomly divided into two groups: IDD group

and sham-operation group. An IDD model was induced by unbalanced dynamic and static forces in the IDD group, and sham operation was performed in the sham-operation group. At 12 weeks after the operation, whether the establishment of the IDD model was successful was evaluated by magnetic resonance imaging and X-ray, and MWT and TWL were measured. The expression of NPY and its receptors in the IVD and DRG was determined by immunohistochemistry to analyze the correlation

作者介绍: 韩 燚, Email: maotai5488@163.com,

研究方向: 骨科基础与临床。

通信作者: 李展春, Email: kcb069@163.com。**基金项目:** 国家自然科学基金面上资助项目 (编号: 81871090, 81400904);

上海市自然科学基金资助项目 (编号: 13ZR1424900); 上海

交通大学医工交叉研究基金资助项目 (编号: YC2016MS53)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190510.1436.014.html>

(2019-05-13)

of the mean optical density (MOD) of NPY and its receptors with pain behaviors (MWT and TWL). **Results:** ①Pain testing results showed that the IDD group had significantly lower MWT and TWL compared with the sham-operation group at 12 weeks after operation [(9.44 ± 2.91) g vs. (17.99 ± 4.40) g, $P=0.002$; (9.17 ± 0.39) s vs. (13.53 ± 1.69) s, $P=0.002$]. ②Immunohistochemical analysis showed that the IDD group had significantly higher expression of NPY in the IVD and DRG and significantly lower expression of Y1R in the IVD and DRG compared with the sham-operation group (IVD: 0.15 ± 0.03 vs. 0.11 ± 0.02 , $P=0.021$; DRG: 0.23 ± 0.04 vs. 0.17 ± 0.04 , $P=0.018$; IVD: 0.10 ± 0.02 vs. 0.13 ± 0.01 , $P=0.009$; DRG: 0.05 ± 0.01 vs. 0.08 ± 0.01 , $P=0.000$). There was no significant difference in the expression of Y2R in the IVD and DRG between the two groups ($P>0.05$). ③Pearson correlation analysis showed that the MOD values of NPY in the IVD and DRG were negatively correlated with MWT and TWL in the two groups ($r=-0.605$, $P=0.037$; $r=-0.617$, $P=0.033$; $r=-0.603$, $P=0.038$; $r=-0.708$, $P=0.010$); the MOD values of Y1R in the IVD and DRG were positively correlated with MWT and TWL in the two groups ($r=0.696$, $P=0.012$; $r=0.735$, $P=0.006$; $r=0.624$, $P=0.030$; $r=0.834$, $P=0.001$). **Conclusion:** In the rat model of unbalanced dynamic and static forces, NPY may be involved in the development and progression of discogenic low back pain through peripheral Y1R, but the specific mechanism needs further investigations.

【Key words】neuropeptide Y; unbalanced dynamic and static forces; discogenic low back pain; pain behavior

腰痛在临床上极为常见,在中老年人中患病率高达 70%,并且随着人口老龄化日益加重,严重影响中老年人生活质量,给患者个人、家庭和社会都带来了沉重的经济负担^[1]。引起腰痛的原因纷繁复杂,包括关节突、椎间盘、神经根、肌肉和韧带等^[2]。其中由椎间盘内部结构变化引起的腰痛称为椎间盘源性腰痛,表现为椎间盘以外组织未受到机械或炎症刺激,无神经根受压等阳性体征^[3]。椎间盘退变是造成椎间盘内部结构变化的主要原因,突出或退变的腰椎间盘中,神经纤维及血管大量分布于纤维环的内 2/3 及髓核中。这些长入的血管肉芽组织及神经纤维能够产生大量的炎性因子以及神经递质。它们自神经末梢释放,作用于突触后膜,激活伤害感受神经元,使疼痛信号通过神经纤维传到背根神经节(dorsal root ganglion, DRG),引起疼痛的产生,神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)等神经肽可能参与了椎间盘源性腰痛的发生发展^[4-6]。本研究拟以腰椎动静力失衡大鼠模型作为研究对象,研究 NPY 及受体在腰椎动静力失衡大鼠模型椎间盘(intervertebral disc, IVD)和 DRG 中的表达差异及与大鼠疼痛行为学之间的关系,探讨神经肽 Y 及受体与椎间盘源性腰痛的关系。

1 材料与方法

1.1 仪器

Micro-CT 成像系统 (Skyscan1176) 和 MRI 成像系统 (Biospec 70/20 USR) (德国 Bruker 公司); Von Frey 纤维丝

(美国 Stoelting 公司); 热痛测定仪 model 400 heated base (美国 IITC life science 公司); 光学显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.2 试剂与动物

多聚甲醛购自美国 Sigma 公司,生理盐水购自上海百特医疗用品有限公司,无菌 PBS 溶液购自美国 Hyclone 公司, DAB 底物试剂盒和 NPY、Y1R、Y2R 抗体购自美国 Abcam 公司,其他试剂均为进口分装或国产分析纯。雌性 SD 未孕大鼠,体质量 290~310 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,许可证号[SCXK(沪)2013-0016]。本研究符合上海交通大学医学院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组及模型制备 将 12 只雌性 SD 大鼠随机分为 2 组:椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)组和假手术(sham operation, SHAM)组($n=6$)。2 组大鼠采用腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉,IDD 组大鼠参考 Zhang 等^[7]动静力失衡模型的方法制备,以后正中入路依次切开皮肤、皮下脂肪和筋膜显露胸椎下段、腰椎和骶骨上段,切除腰段竖脊肌、全部腰椎棘突、棘上韧带、棘间韧带和双侧腰椎关节突关节的后外 1/2,关闭深筋膜和皮肤,假手术组仅切开皮肤后即缝合。术后 2 组大鼠均分开饲养在相同鼠笼,每日摄食量相当,饮水不限,术后均予青霉素 10 万单位腹腔注射 3 d 预防感染。

1.3.2 影像学评估 2 组动物术后饲养 12 周后,行腰椎 X 线及 MRI 检查。使用 Micro-CT 成像系统 (Skyscan1176, Bruker Micro-CT, Germany) 在 90 kV、250 mA、滤光片为 1 mm Cu+Al 条件下拍摄脊柱侧位片,采用 Bruker 公司 Biospec 70/20 USR 进行磁共振扫描检查, T2-TurboRARE 序列扫描参数为 TR2000 ms, TE15 ms; 层厚 1 mm, 层距 0 mm, FOV 为 65 mm × 60 mm。观察大鼠 L4/5、L5/6、L6/S1 椎间盘退变情况。

1.3.3 标本的采集和制备 2 组动物应用 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,称重后剪开胸腔,暴露心脏,左心室向主动脉方向插入灌注针头。剪破右心房放血,先用 400 mL 生理

盐水快速冲洗大鼠体内血液后,再灌注 400 mL 预冷的 4%多聚甲醛溶液(多聚甲醛溶于 4%蔗糖溶液)约 2 h。收集 L5/6 椎间盘,剔除软组织后立即投入到 4%多聚甲醛中,室温固定,EDTA 脱钙,酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。沿着纵轴切 5 μm 厚的切片,依次脱蜡,水化。同时将 L5 节段 DRG 取出,放置于 4%多聚甲醛溶液中固定 3 h,然后转入含 30%蔗糖的 4%多聚甲醛溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。冰冻切片机连续切片 8 μm ,贴片于多聚赖氨酸包被的载玻片上,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3.4 免疫组织化学染色 0.01 mol/L PBS 中漂洗 5 min $\times$ 3 次,用煮沸的枸橼酸进行抗原修复,PBS(0.01 mol/L,pH7.4)冲洗 15 min,0.3% H_2O_2 封闭,室温 30 min。0.01 mol/L PBS 中漂洗 5 min $\times$ 3 次,正常山羊血清封闭,室温 30 min,滴加一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 2 h,然后移至 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,0.01 mol/L PBS 中漂洗 5 min $\times$ 3 次,滴加生物素标记二抗(1:200),37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 中漂洗 5 min $\times$ 3 次,加辣根酶标记的链霉卵蛋白(1:150),37 $^{\circ}\text{C}$,孵育 1.5 h,0.01 mol/L PBS 中漂洗 5 min $\times$ 3 次,DAB 显色,室温下显色 5~10 min,Mayer's 苏木精复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,封片。

1.3.5 观察和显微摄影 在光学显微镜下选取阳性结果区进行拍照,NPY 及受体免疫阳性表现为棕色斑片状或束状。用 Spot Advanced digital-imaging 系统(Diagnostic Instruments, Inc, Sterling Heights, MI, USA)在放大 400 倍的显微镜下随机选择 3 个视野区进行观察。用 Pro Plus(version 5.0.1, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA)软件,以平均光密度(mean optical density, MOD)作为量化指标,对免疫组化阳性表达进行量化。

1.3.6 机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)测定 所有大鼠于造模前 1 d 和造模后 12 周进行 MWT 测定,参考 Chaplan 等^[8]的“Up-Down”方法,将大鼠放置在透明的无机玻璃盒内适应 30 min 后,依次使用各种规格的 Von Frey 纤维穿过铁丝网刺激大鼠后肢足底掌部,使纤维弯成 S 形,持续时间 6~8 s,阳性反应表现为大鼠在刺激时间内出现缩足反应或者舔足现象,2 次测量之间间隔至少 5 min,若出

现阴性反应则换更硬规格的 Von Frey 纤维,若出现阳性反应则换更软规格的 Von Frey 纤维,连续 6 次的刺激结果为最终的撤足反应模式,每只大鼠测定 5 次取其平均值即为 MWT。

1.3.7 热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)测定 TWL 测定时间与 MWT 相同,使用热痛测定仪 model 400 heated base 测定,将大鼠放置在透明的无机玻璃盒内适应 30 min 后,在大鼠后肢足底给予一个逐渐加温的热刺激反应,记录照射开始到大鼠出现抬足回避的时间,每只大鼠测量 5 次,每 2 次间隔时间 5 min,取其平均值即为 TWL。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间的比较采用独立样本 t 检验,同组资料术前术后比较采用配对样本 t 检验,神经肽及受体 MOD 值与大鼠痛阈阈值之间的相关性分析采用 Pearson 相关性分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。采用 Graph PAD Prism5.0 软件将实验数据生成统计图表。

2 结果

2.1 2 组大鼠术后 MRI 及 X 线影像学比较

造模后 12 周,MRI 结果显示,与 SHAM 组相比,IDD 组的 L5/6 椎间盘 T2 加权像信号强度明显降低,表现为“黑间盘”。X 线结果显示,椎间隙明显狭窄,终板下骨质硬化,相邻椎体可见明显骨质增生。如图 1 所示。

2.2 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 及受体表达差异

与 SHAM 组相比,IDD 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的表达明显升高[IVD: (0.15 ± 0.03) vs. (0.11 ± 0.02) , $t=2.733$, $P=0.021$; DRG: (0.23 ± 0.04) vs. (0.17 ± 0.04) , $t=2.836$, $P=0.018$], Y1R 表达明显降低[IVD: (0.10 ± 0.02) vs. (0.13 ± 0.01) , $t=3.240$, $P=0.009$; DRG: (0.05 ± 0.01) vs. (0.08 ± 0.01) , $t=5.291$, $P=0.000$], Y2R 的表达差异无统计学意义 [IVD: (0.10 ± 0.01) vs. (0.10 ± 0.02) , $t=0.259$, $P=0.801$; DRG: (0.15 ± 0.03) vs. (0.14 ± 0.03) , $t=0.279$, $P=0.786$]。如图 2 所示。

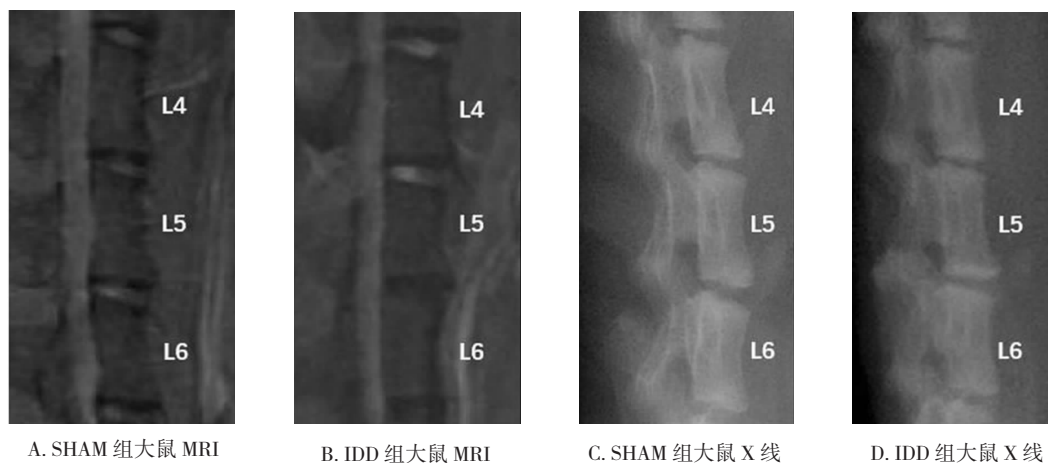
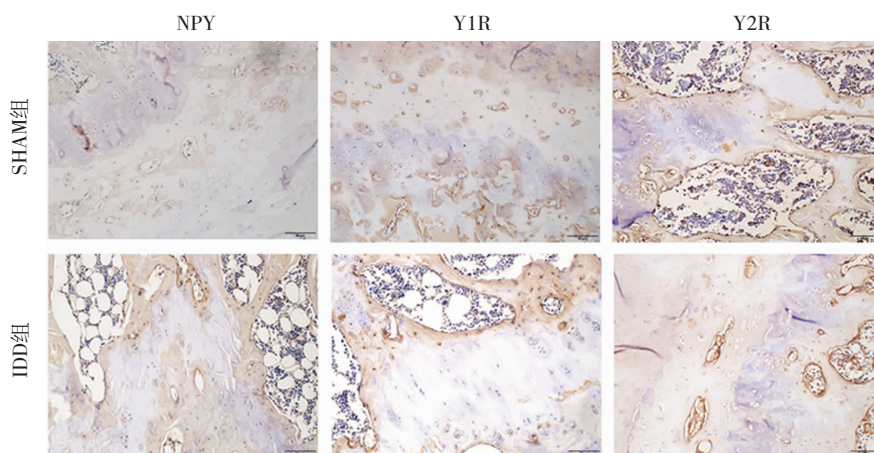
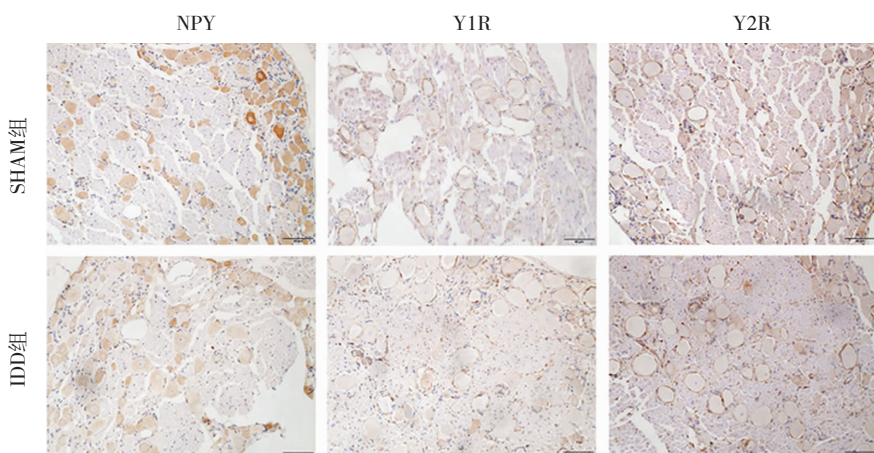


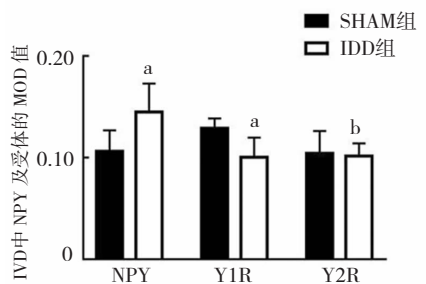
图 1 2 组大鼠 MRI 及 X 线结果比较



A. 2 组大鼠 IVD 中 NPY 及受体免疫组化染色结果

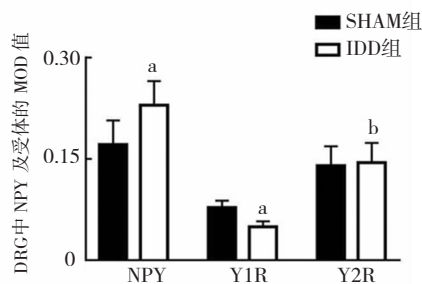


B. 2 组大鼠 DRG 中 NPY 及受体免疫组化染色结果



a: 与 SHAM 组相比较, $P < 0.05$; b: 与 SHAM 组相比较, $P > 0.05$

C. 2 组大鼠 IVD 中 NPY 及受体的 MOD 值比较



a: 与 SHAM 组相比较, $P < 0.05$; b: 与 SHAM 组相比较, $P > 0.05$

D. 2 组大鼠 DRG 中 NPY 及受体的 MOD 值比较

图 2 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中神经肽 NPY 及受体的免疫组织化学染色结果比较(400×)

2.3 2 组大鼠 MWT 和 TWL 观察结果

与术前 1 d 相比,术后 12 周时 SHAM 组大鼠 MWT 及 TWL 差异无统计学意义[MWT: (17.99 ± 4.40) g vs. (21.82 ± 2.34) g, $P = 0.068$; TWL: (13.53 ± 1.69) g vs. (13.94 ± 2.77) g, $P = 0.758$];IDD 组大鼠 MWT 明显降低 $[(9.44 \pm 2.91)$ g vs. (20.84 ± 2.33) g, $P = 0.002$],TWL 同样明显降低 $[(9.17 \pm 0.39)$ s vs. (14.60 ± 2.47) s, $P = 0.002$]。见表 1。

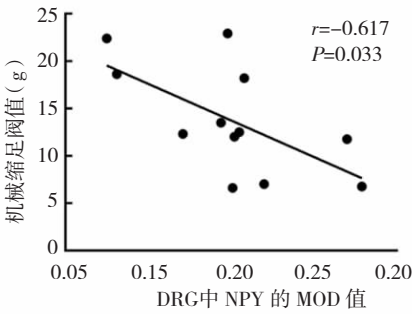
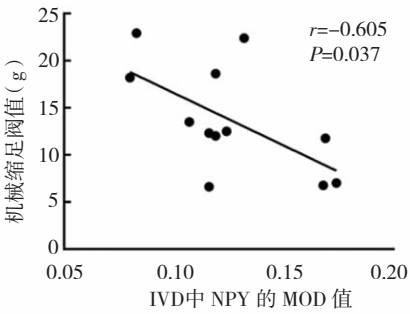
2.4 神经肽 Y 及受体在 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中的表达及与痛阈阈值的关系

术后 12 周,2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与

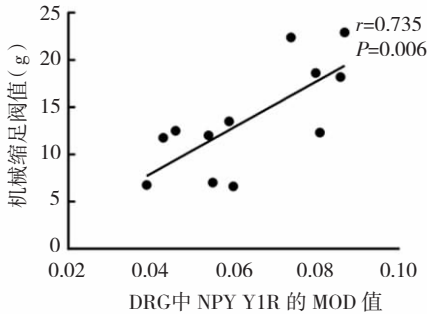
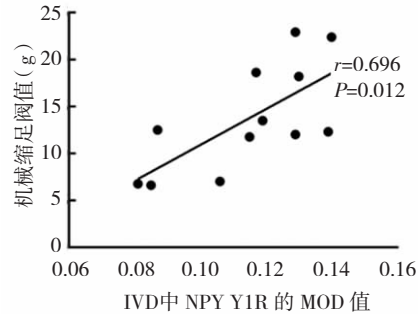
MWT 之间成负相关关系($r = -0.605$, $P = 0.037$; $r = -0.617$, $P = 0.033$);2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 Y1R 的 MOD 值与 MWT 之间成正相关关系($r = 0.696$, $P = 0.012$; $r = 0.735$, $P = 0.006$)。2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与 TWL 之间成负相关关系($r = -0.603$, $P = 0.038$; $r = -0.708$, $P = 0.010$);2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 Y1R 的 MOD 值与 TWL 之间成正相关关系($r = 0.624$, $P = 0.030$; $r = 0.834$, $P = 0.001$)。如图 3 所示。2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 Y2R 的 MOD 值与 MWT 和 TWL 之间均无相关关系($P > 0.05$)。

表 1 2 组大鼠术前及术后机械痛阈、热痛阈阈值的比较

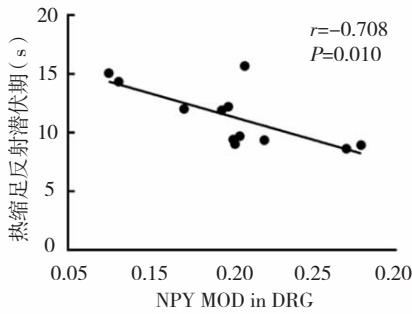
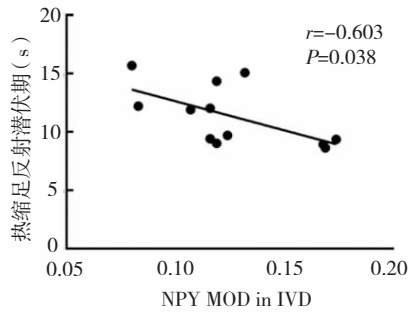
组别	MWT (g)				TWL (s)			
	术前	术后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	术前	术后	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
SHAM组	21.82 ± 2.34	17.99 ± 4.40	2.319	0.068	13.94 ± 2.77	13.53 ± 1.69	0.325	0.758
IDD组	20.84 ± 2.33	9.44 ± 2.91	6.032	0.002	14.60 ± 2.47	9.17 ± 0.39	5.822	0.002
<i>t</i> 值	0.727	3.969			0.434	6.145		
<i>P</i> 值	0.484	0.003			0.674	0.000		



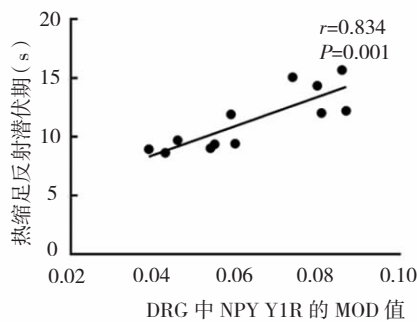
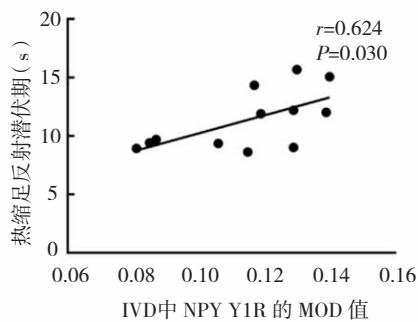
A. 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与机械缩足阈值均呈负相关关系



B. 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY Y1R 的 MOD 值与机械缩足阈值均呈正相关关系



C. 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与热缩足反射潜伏期均呈负相关关系



D. 2 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY Y1R 的 MOD 值与热缩足反射潜伏期均呈正相关关系

图 3 2 组大鼠 NPY 及 Y1R 的表达与痛阈的相关性

3 讨论

椎间盘退变是临床上的一种常见病和多发病,是在自然因素、环境因素等多种因素共同作用下逐渐形成的复杂过程,椎间盘退变是引起腰痛的主要原因之一^[9]。腰椎动静力失衡模型能通过破坏腰部肌肉以及相关韧带,造成腰椎的动静力平衡失衡,能够较好地模拟人体长期反复劳损而导致的椎间盘退变过程,是理想的椎间盘源性腰痛模型。本研究中,大鼠造模后 12 周出现了椎间盘退变的明显特征,包括椎间盘 T2 加权像信号强度降低、腰椎序列紊乱、终板钙化和椎间隙狭窄等,伴随机械痛觉过敏和热痛觉过敏,符合椎间盘源性腰痛的行为学特征,表明模型制备成功。

正常人的椎间盘仅有少部分血管和神经分布在纤维环的外 1/3,但是在突出或退变的腰椎间盘中,纤维环的内 2/3 及髓核中分布有大量血管及神经纤维,它们会分泌大量的炎性介质以及神经肽如 P 物质 (substance P, SP)、降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP) 和 NPY 等^[10-12],刺激神经末梢,使疼痛信号通过有髓鞘的 A δ 纤维和无髓鞘的 C 纤维传到 DRG,再通过脊髓丘脑束传递到丘脑与体觉皮层,导致疼痛产生。本实验结果显示,与 SHAM 组相比,IDD 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 的表达明显上升,Y1R 表达明显下降,Y2R 表达无统计学差异,同时伴随着机械痛觉过敏和热痛觉过敏增强,并且 IVD 和 DRG 中 NPY 的 MOD 值与 MWT 和 TWL 之间存在显著负相关关系,Y1R 的 MOD 值与 MWT 和 TWL 之间存在显著的正相关关系,说明 NPY 及外周 Y1R 表达变化可能参与了椎间盘源性腰痛的发生发展。

NPY 是一个含有 36 个氨基酸的肽段,由中枢及外周交感神经系统合成并释放,NPY 在外周通过作用于 Y1R 来发挥镇痛作用^[13]。Taylor 等^[14]指出 NPY 可以通过 Y1R 抑制 SP 的释放发挥镇痛作用,炎症条件下 NPY 与 Y1R 的亲和力增加,其镇痛作用会得到进一步增强。此外,NPY 在突出或退变的腰椎间盘中还具有促进新生血管形成的作用,Robich 等^[15]指出 NPY 可能作为启动血管生成重建的“总开

关”,促进血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等表达上调,下调血管生成抑制因子发挥强烈的促血管生成作用。本实验结果显示,与 SHAM 组相比,IDD 组大鼠 IVD 中 NPY 表达升高,Y1R 表达下降,伴随机械痛觉过敏和热痛觉过敏增强,推测随着腰椎间盘退变进行性加重,神经纤维和血管组织大量浸润,NPY 的表达明显升高。它一方面能够促进新生血管形成,增加血流来改善退变椎间盘组织的营养供应;另一方面也能发挥镇痛作用阻止神经病理性疼痛的发生发展,但升高的 NPY 可能通过负反馈作用抑制 Y1R 的表达,使 Y1R 的表达下降,削弱了 NPY 本来具有的镇痛作用,引起疼痛的加重。

正常情况下,NPY 主要存在于脊髓后角的中间神经元以及交感节后神经元,和去甲肾上腺素共表达于交感节后神经元,尤其在脊髓后角浅层表达丰富^[16]。作为痛觉传入的第一级神经元,DRG 的胞体通常不表达 NPY,其表达水平上升与多种因素有关,如神经损伤、局部炎症和外部刺激等。Y1R 主要表达于大鼠和小鼠的小型和中型肽能神经元,占大鼠 DRG 神经元的 25%,且常与 CGRP 共存,在小鼠中比例较低,为 7%^[17]。椎间盘退变往往伴随着局部炎症形成^[18],炎症会直接促使脊髓后角 NPY 及 Y1R 的表达改变,Ji 等^[19]发现注射完全弗氏佐剂可以造成大鼠双侧脊髓后角的 NPY 和 Y1R 表达水平明显上升。研究表明 NPY 在脊髓后角能够通过作用于 Y1R 降低神经元的兴奋性^[20]和抑制疼痛相关肽的释放等^[14]发挥镇痛作用。本实验结果显示,与 SHAM 组相比,IDD 组大鼠 DRG 中 NPY 表达升高,Y1R 表达下降,伴随机械痛觉过敏和热痛觉过敏增强,我们推测 DRG 中 NPY 表达的升高主要通过作用于 Y1R 发挥镇痛作用,局部炎症造成了 DRG 中 NPY 和 Y1R 表达同时升高,但升高的 NPY 同样可能通过负反馈作用抑制 Y1R 的表达,最终结果是 Y1R 的表达下降,与受体相结合的 NPY 减少,加重了疼痛。

综上所述,在椎间盘源性腰痛的发展过程中,IDD 组大鼠 IVD 和 DRG 中 NPY 表达上升及 Y1R 表达下降,可能是机体为了抵消神经病理性疼痛的发生发展而产生的一种适应性的保护机制,本研究

结果显示 NPY 及 Y1R 可能作为治疗椎间盘源性腰痛潜在的药物靶点。本研究只探讨了 NPY 及受体在大鼠 IVD 和 DRG 中的变化及与痛阈阈值的关系,且样本量较低,它们在椎间盘源性腰痛过程中可能的信号转导机制,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain[J]. *Lancet*, 1999, 354(9178): 581-585.
- [2] Petersen T, Laslett M, Juhl C. Clinical classification in low back pain: best-evidence diagnostic rules based on systematic reviews[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 188.
- [3] McCarron RF, Wimpee MW, Hudkins PG, et al. The inflammatory effect of nucleus pulposus. A possible element in the pathogenesis of low-back pain[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1987, 12(8): 760-764.
- [4] Schroeder M, Viezens L, Schaefer C, et al. Chemokine profile of disc degeneration with acute or chronic pain[J]. *J Neurosurg Spine*, 2013, 18(5): 496-503.
- [5] Krock E, Rosenzweig DH, Chabot-Dore AJ, et al. Painful, degenerating intervertebral discs up-regulate neurite sprouting and CGRP through nociceptive factors[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(6): 1213-1225.
- [6] Barczewska M, Juranek J, Wojtkiewicz J. Origins and neurochemical characteristics of porcine intervertebral disc sympathetic innervation: a preliminary report[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 63(1): 50-57.
- [7] Zhang K, Ding W, Sun W, et al. Beta1 integrin inhibits apoptosis induced by cyclic stretch in annulus fibrosus cells via ERK1/2 MAPK pathway[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(1): 13-24.
- [8] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [9] Geurts JW, Willems PC, Kallewaard JW, et al. The impact of chronic discogenic low back pain: costs and patients' burden[J]. *Pain Res Manag*, 2018, 2018: 4696180.
- [10] Miyagi M, Millicamps M, Danco AT, et al. ISSLS Prize winner: increased innervation and sensory nervous system plasticity in a mouse model of low back pain due to intervertebral disc degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2014, 39(17): 1345-1354.
- [11] Intondi AB, Zadina JE, Zhang X, et al. Topography and time course of changes in spinal neuropeptide Y immunoreactivity after spared nerve injury[J]. *Neuroscience*, 2010, 165(3): 914-922.
- [12] Lai A, Moon A, Purmessur D, et al. Annular puncture with tumor necrosis factor- α injection enhances painful behavior with disc degeneration in vivo[J]. *Spine J*, 2016, 16(3): 420-431.
- [13] Shi TJ, Li J, Dahlstrom A, et al. Deletion of the neuropeptide Y Y1 receptor affects pain sensitivity, neuropeptide transport and expression, and dorsal root ganglion neuron numbers[J]. *Neuroscience*, 2006, 140(1): 293-304.
- [14] Taylor BK, Fu W, Kuphal KE, et al. Inflammation enhances Y1 receptor signaling, neuropeptide Y-mediated inhibition of hyperalgesia, and substance P release from primary afferent neurons[J]. *Neuroscience*, 2014, 256: 178-194.
- [15] Robich MP, Matyal R, Chu LM, et al. Effects of neuropeptide Y on collateral development in a swine model of chronic myocardial ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(6): 1022-1030.
- [16] Magnussen C, Hung SP, Ribeiro-da-Silva A. Novel expression pattern of neuropeptide Y immunoreactivity in the peripheral nervous system in a rat model of neuropathic pain[J]. *Mol Pain*, 2015, 11: 31.
- [17] Shi TJ, Zhang X, Berge OG, et al. Effect of peripheral axotomy on dorsal root ganglion neuron phenotype and autonomy behaviour in neuropeptide Y-deficient mice[J]. *Regul Pept*, 1998, 75-76: 161-173.
- [18] Navone SE, Marfia G, Giannoni A, et al. Inflammatory mediators and signalling pathways controlling intervertebral disc degeneration[J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(6): 523-542.
- [19] Ji RR, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. Expression of neuropeptide Y and neuropeptide Y(Y1) receptor mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia following peripheral tissue inflammation[J]. *J Neurosci*, 1994, 14(11 Pt 1): 6423-6434.
- [20] Iwagaki N, Ganley RP, Dickie AC, et al. A combined electrophysiological and morphological study of neuropeptide Y-expressing inhibitory interneurons in the spinal dorsal horn of the mouse[J]. *Pain*, 2016, 157(3): 598-612.

(责任编辑:冉明会)