



电刺激三叉神经节对蝶腭神经节内一氧化氮合酶和血管活性肠肽阳性神经元的影响

曹月洲, 徐武, 韦俊超, 万琪
(南京医科大学附属第一医院神经内科 210029)

关键词 偏头痛; 一氧化氮合酶; 血管活性肠肽; 蝶腭神经节

摘要 **目的:** 观察实验性偏头痛大鼠副交感神经蝶腭神经节内一氧化氮合酶(NOS)和血管活性肠肽(VIP)阳性神经元的变化。**方法:** 12只雄性SD大鼠随机分为实验组和对照组(均 $n=6$)。实验组为电刺激三叉神经节建立的偏头痛大鼠模型。对照组仅作手术而不刺激三叉神经节。用组织化学的方法观察蝶腭神经节内NOS阳性神经元的变化, 用免疫荧光法观察蝶腭神经节内VIP阳性神经元的变化。**结果:** 实验组和对照组大鼠的蝶腭神经节内均有NOS和VIP阳性神经元, 但实验组NOS和VIP阳性神经元均较对照组显著增加($P<0.01$)。**结论:** 电刺激三叉神经节可以通过三叉-副交感神经反射系统, 显著升高蝶腭神经节中NOS和VIP神经元的数目。偏头痛发病过程中脑膜及颅内大血管的剧烈扩张很可能与蝶腭神经节中NOS和VIP神经元增加有关。

Effects of Trigeminal Ganglion Electrical Stimulation on the Positive Neurons of Nitric Oxide Synthase and Vasoactive Intestinal Polypeptide in Sphenopalatine Ganglion of Migraine Rats CAO Yue-Zhou, XU Wu, WEI Jun-Chao, WAN Qi Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

KEY WORDS migraine; nitric oxide synthase; vasoactive intestinal polypeptide; sphenopalatine ganglion

ABSTRACT **Aim:** To investigate the changes of the positive neurons of nitric oxide synthase(NOS) and vasoactive intestinal polypeptide(VIP) in sphenopalatine ganglion in migraine model of rat. **Methods:** 12 male SD rats were divided randomly into the experimental group and the control group ($n=6$ in each group). The experimental group was termed as migraine model and the rats were treated by electrical stimulating trigeminal ganglion, while the rats of the control group were only operated without electrical stimulating. The positive neurons of NOS and VIP were detected in sphenopalatine ganglion by using histochemical and immunofluorescence histochemical staining, respectively. **Results:** The numbers of both NOS and VIP positive neurons in sphenopalatine ganglion in experimental group were increased significantly compared with those in the control group($P<0.01$). **Conclusion:** The trigeminal autonomic reflex may be activated by trigeminal ganglion electrical stimulation, which then significantly increased the numbers of both NOS and VIP positive neurons in sphenopalatine ganglion. Violent dilation of meningeal vessels and intracranial large vessels maybe involved in the increased numbers of both NOS and VIP positive neurons in sphenopalatine ganglion in pathogenesis of migraine.

[文章编号] 1008-0678(2010)03-0269-04

[中图分类号] R747.2

[文献标识码] A

[作者简介] 曹月洲,男(1979-),汉族,江苏省镇江市人,主治医师,在读硕士研究生,主要从事偏头痛的基础及临床研究。

[通讯作者] 万琪,E-mail:qi_wan@126.com

偏头痛(migraine)是一种常见多发的原发性脑与血管功能障碍性疾病。目前,三叉神经血管学说是解释偏头痛发生机制的主要学说,但该学说尚不能完全解释偏头痛发病过程中颅内血管的剧烈和持续扩张。由于偏头痛发病过程中脑膜及颅内的大血管发生剧烈扩张并偶伴发如眼睑水肿、流泪、结膜充血和鼻充血等自主神经症状^[1],提示副交感神经系统可能参与了偏头痛的疼痛发生和持续过程^[2]。

支配脑及脑膜血管的副交感神经纤维主要来自蝶腭神经节和耳神经节,两者均含有一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)和血管活性肠肽(vasoactive intestinal polypeptide, VIP),这两种物质都具有调节脑及脑膜血管扩张的作用^[3,4]。为此,临床上采用阻断蝶腭神经节的方法可缓解偏头痛^[5]。Knyihar-Csillik等^[6]研究证实偏头痛大鼠模型中,脑膜血管周围神经纤维中NOS含量升高。Rahmann等^[7]证实偏头痛患者静脉注射VIP后颅内动脉得到了明显的扩张。这些研究提示蝶腭神经节中的NOS和VIP在偏头痛发病过程中起了重要的作用。然而,蝶腭神经节中的NOS和VIP在偏头痛发病过程中是否有变化尚未见文献报道。为此,本实验建立了偏头痛大鼠模型,试图通过观察蝶腭神经节内NOS和VIP阳性神经元的变化,为今后通过调控蝶腭神经节内的NOS和VIP来防治偏头痛提供形态学依据。

材料与方法

主要仪器与试剂 LZ26台钻车(上海老港新兴医疗器械厂);单臂脑立体定位仪(STOELTING);YLS-9A生理、药理电子刺激仪(山东医药科学院设备站);LeicaCM1900恒冷箱冰冻切片机(德国Leica公司);荧光显微镜(江苏捷达OLYMPUS BX51);硝基四氮唑蓝和还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH-d,美国Sigma公司);兔抗大鼠VIP IgG(英国Abcam公司);FITC标记山羊抗兔IgG(南通碧云天公司)。

实验动物及分组 雄性清洁级SD大鼠12只,体重250~300g(南京医科大学实验动物中心提供),利用随机数字表将大鼠分成两组。对照组($n=6$):立体定位仪定位后钻孔不刺激。实验组($n=6$):造模。

偏头痛大鼠模型建立 参考Knyihar-Csillik等^[6]和沈飞飞等^[8]的方法制作偏头痛大鼠模型。大鼠腹腔注射10%水合氯醛0.3~0.4 mL/100g体重进行麻醉,然后固定在立体定位仪上,门齿固定插设在正中处,头正中部去毛后消毒皮肤,行头顶正中切口,逐层切开皮肤、肌肉,于脑矢状缝中部开口暴露颅盖骨,在前凶后移3

mm,右旁开3mm处用0.8mm牙科钻钻孔,将电极从钻孔处垂直插入三叉神经节(以硬脑膜起计算深度约9.5mm)。电极刺激参数为周期200ms,波幅10V,波宽5ms。刺激时间30min。

蝶腭神经节取材与切片制备 用4%多聚甲醛对实验完毕大鼠进行常规心脏灌注,取实验组右侧(刺激侧)和对照组右侧(钻孔侧)的蝶腭神经节置4%多聚甲醛固定2h,转入30%蔗糖磷酸盐缓冲液(pH7.4),4℃过夜。次日,按神经节长轴将标本固定于冰冻台制冰冻切片,片厚16μm,贴片于APES处理的载玻片上,室温干燥。根据韩群颖等^[9]报道的方法,取美蓝染色后确认为神经节的切片进行NOS组织化学染色和VIP免疫荧光染色。

NOS的组织化学染色 按Dawson等^[10]报道的方法对神经元的NOS进行染色。切片置孵液37℃避光孵育90min。孵液用0.01 mol·L⁻¹ PBS液(pH8.0)配制,含有:0.3% TritonX-100,硝基四氮唑蓝0.6 g·L⁻¹和还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶(NADPH diaphorase, NADPH-d)0.5 g·L⁻¹。0.01 mol·L⁻¹ PBS液(pH7.4)终止反应,切片经常规脱水、透明。封片后在光学显微镜下观察并计算NOS阳性细胞数。

VIP免疫荧光染色 切片经5%牛血清蛋白室温封闭30min,加兔抗大鼠VIP IgG(1:200)4℃过夜,PBS充分洗涤;加FITC标记山羊抗兔IgG(1:100)37℃避光孵育60min,PBS充分洗涤;甘油封片,荧光显微镜下观察并计算VIP阳性细胞数。

阳性细胞计数方法 实验组和对照组所有蝶腭神经节连续切片均隔2取1,各选取4张切片,在100倍镜下计数神经节内NOS和VIP阳性神经元数目及神经元总数。NOS阳性神经元的判断标准为胞质呈明显蓝色;VIP阳性神经元的判断标准为胞质呈明显绿色荧光。计算神经节中NOS和VIP阳性细胞百分率,取平均数。

阳性细胞百分率 = 阳性神经元数 / 神经元总数。

统计学方法 实验数据均应用SPSS11.5软件进行统计学处理,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验,设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

蝶腭神经节的NOS检测 NOS的组织化学染色显示神经节内神经元胞体呈圆形或卵圆形,NOS阳性神经元胞质内含有大量的蓝色颗粒,胞核不着色,在神经节内分布无明显特异性(图1)。实验组蝶腭神经节内NOS阳性细胞百分率为 $(80.85 \pm 7.43)\%$ (图1A),对照组为 $(68.16 \pm 5.48)\%$ (图1B),两组间差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

蝶腭神经节的VIP检测 在荧光显微镜下可观察到大鼠蝶腭神经节内VIP阳性神经元胞体发出绿色荧光,胞核不发光。VIP阳性神经元在神经节内分布无明显特异性(图2)。实验组蝶腭神经节内VIP阳性细胞百分率为

(61.42 ± 5.55)% (图2A), 对照组VIP阳性细胞百分率为(23.80 ± 3.91)% (图2B), 两组间差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。

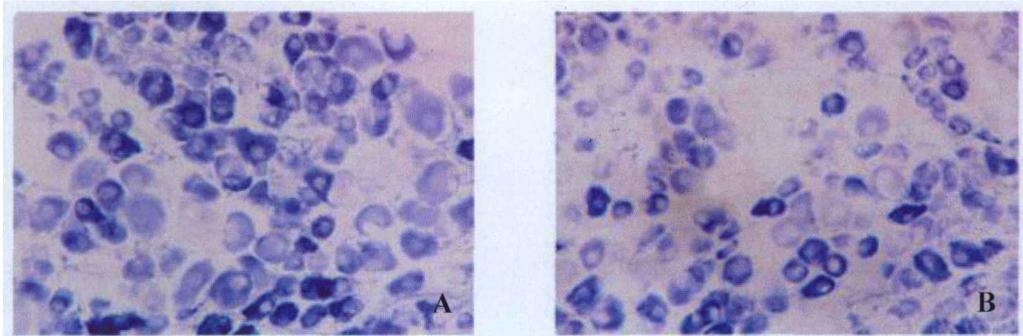


图1 大鼠蝶腭神经节内NOS阳性细胞分布呈蓝色(NADPH-d染色, ×100)

Fig 1 Distribution of nNOS-positive neurons in the sphenopalatine ganglion of rats(NADPH-d staining, ×100)

注: A为实验组; B为对照组

Notes: A. Experimental group; B. Control group

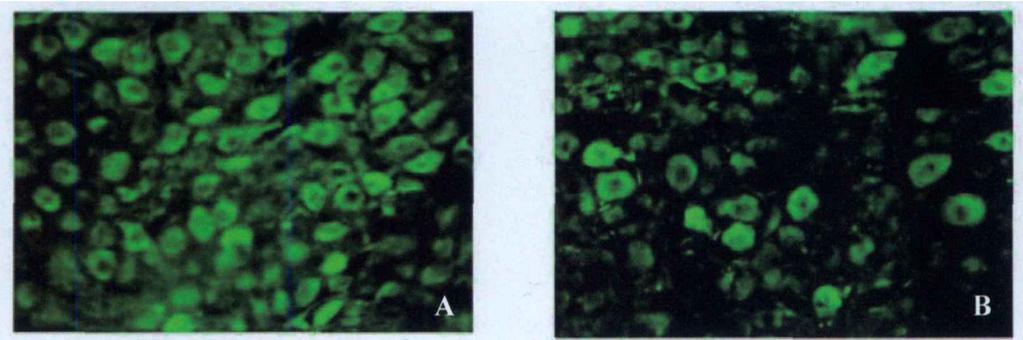


图2 大鼠蝶腭神经节内VIP阳性神经细胞分布呈绿色(FITC-labelled染色, ×100)

Fig 2 Distribution of VIP-positive neurons in the sphenopalatine ganglion of rats(FITC-labelled staining, ×100)

注: A为实验组; B为对照组

Notes: A. Experimental group; B. Control group

讨 论

目前, 偏头痛的发病机制仍不完全清楚, 其中三叉神经血管学说占主导地位。该学说认为偏头痛的发病涉及3种机制: ①脑膜的颅内脑外血管扩张; ②血管周围神经释放血管活性肽引起神经源性炎症; ③中枢痛觉传导的抑制降低。颅内疼痛敏感组织主要为脑膜及脑膜血管, 分布并感受和传导这些敏感组织信号的主要是三叉神经第一支、三叉神经节以及与脑干三叉神经脊束核、脊髓区域的连接。这些三叉神经细胞与颅内各种结构的连接构成了三叉神经血管系统。目前认为这些传入神经纤维兴奋是诱发偏头痛疼痛的原因。

由于三叉神经血管系统存在行径变异, 分布于硬脑膜的三叉神经无髓C纤维受到刺激时, 释放血管活性物质如降钙素基因相关肽(CGRP)、P物质(SP)及神经激肽

A等, 产生神经源性炎症, 使脑膜血管扩张、血浆成分外渗、肥大细胞脱颗粒。进而刺激沿逆行、顺行两条途径兴奋性传导。逆行传导使原有的神经源性炎症进一步加强; 顺行传导沿着三叉神经眼支传至三叉神经脊束核尾部, 冲动达到延脑化学感受器, 可引起恶心、呕吐; 传入至下丘脑底部、额叶前区, 可出现畏光; 传到大脑皮质则产生疼痛^[1]。故本实验通过单侧电刺激大鼠三叉神经节来模拟偏头痛发作过程。

既往研究表明, NO是一种小分子神经递质, 由NOS催化底物L-精氨酸而生成。NOS广泛存在于神经系统, 现已知道其有3种亚型, 即在正常状态下表达的神经元型(nNOS)和内皮型(eNOS)以及在损伤后诱导表达的诱导型(iNOS)。大量的研究已经证明, NADPH-d不仅是识别神经元的染色方法, 而且也是鉴定脑与周围组织NOS的经典方法。NADPH-d组化方法所显示的阳性神经元即

反映了 NOS 阳性神经细胞^[9,10]。NOS 作为 NO 的合成酶,广泛存在自主神经系统中,特别在副交感神经节后纤维以及神经元胞体中均可见 NOS 的表达。正常大鼠脑及脑膜血管周围有大量的 NOS 阳性纤维分布,而在大鼠偏头痛模型中,脑膜周围 NOS 阳性神经纤维显著增加^[3,6]。Toda 等^[12]发现对麻醉的狗行电刺激蝶腭神经节能舒张同侧诸如大脑中动脉和后交通动脉等大脑动脉,静脉注射 NOS 抑制剂能明显抑制神经刺激的反应。Bolay 等^[13]揭示切除蝶腭神经的节后纤维可以引起脑膜血流持续性下降。本实验结果表明,在偏头痛大鼠的蝶腭神经节内 NOS 阳性细胞百分率较对照组明显增加($P < 0.01$),提示偏头痛大鼠的脑及脑膜血管之所以在 NO 的作用下发生扩张,很可能与蝶腭神经节内 NOS 阳性神经元的增加有关,NOS 通过分布在脑膜血管处的节后副交感神经的轴索,促使 NO 释放增加,导致血管扩张。

VIP 是一种由 28 个氨基酸组成的肽类物质,近年来研究认为 VIP 也有类似副交感的作用,主要由副交感神经节后纤维所释放。研究表明在人及动物的脑及脑膜动脉周围均存在有 VIP 阳性神经纤维,并且静脉注射 VIP 能引起脑及脑膜动脉的扩张^[14-16]。本实验结果表明,在偏头痛大鼠的蝶腭神经节内 VIP 阳性细胞百分率较对照组明显增加,提示蝶腭神经节内 VIP 阳性神经元增加,并通过其周围突逆行运输的方式将 VIP 运输至节后副交感神经分布的脑及脑膜血管周围,引起血管扩张,从而在偏头痛发病中起作用。

鉴于三叉神经血管学说不能完全解释偏头痛发病过程中颅内血管的剧烈和持续的扩张。为此,Bolay 等^[13]提出三叉-副交感神经反射弧学说,认为三叉神经激活后可激活上泌涎核(副交感节前神经元),继而通过上泌涎核激活蝶腭神经节(副交感节后神经元),NOS 和 VIP 等可经其节后纤维运输至脑及脑膜血管周围,从而(直接或间接)造成一系列级联反应,包括颅内血管扩张,血浆蛋白外渗和释放局部炎症分子,激活毗邻脑膜的感受器周围的神经末梢,因而引起脑血流量持续性的增加。

本实验揭示,在偏头痛大鼠模型中蝶腭神经节中 NOS 和 VIP 阳性神经元较对照组明显增加。为此,我们推测:在偏头痛发病过程中起初可能是三叉神经血管系统激活,而后通过三叉-副交感神经反射弧激活副交感神经,引起脑血管剧烈和持续的扩张,导致持续性头痛

的发生。如果事实正是如此,那么就有可能从改变副交感神经的功能入手来降低脑及脑膜血管的扩张,从而为偏头痛的治疗提供一个新的治疗靶点。

参考文献

- [1] Dora B. Migraine with cranial autonomic features and strict unilaterality[J]. *Cephalalgia*, 2003, 23: 561-562
- [2] Burstein R, Jakubowski M. Unitary hypothesis for multiple triggers of the pain and strain of migraine[J]. *J Comp Neurol*, 2005, 493: 9-14
- [3] Edvinsson L, Elsas T, Suzuki N, et al. Origin and co-localization of nitric oxide synthase, CGRP, PACAP, and VIP in the cerebral circulation of the rat[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 53: 221-228
- [4] Yarnitsky D, Goor-Aryeh I, Bajwa ZH, et al. 2003 Wolff award: possible parasympathetic contributions to peripheral and central sensitization during migraine[J]. *Headache*, 2003, 43: 704-714
- [5] Maizels M, Geiger AM. Intranasal lidocaine for migraine: A randomized trial and open-label follow-up[J]. *Headache*, 1999, 39: 543-551
- [6] Knyihar-Csillik E, Tajti J, Chadaide Z, et al. Functional immunohistochemistry of neuropeptides and nitric oxide synthase in the nerve fibers of the supratentorial dura mater in an experimental migraine model[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 53: 193-211
- [7] Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, et al. Vasoactive intestinal peptide causes marked cephalic vasodilation, but does not induce migraine[J]. *Cephalalgia*, 2008, 28: 226-236
- [8] 沈飞飞, 万琪, 季燕, 等. 电刺激三叉神经节诱导偏头痛大鼠脑膜非特异炎症[J]. *神经病学与神经康复学杂志*, 2009, 6: 47-51
- [9] 韩群颖, 王鹤鸣, 童鑫康, 等. 大鼠翼腭神经节形态特点的观察[J]. *解剖学杂志*, 2000, 23: 259-262
- [10] Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, et al. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88: 7797-7801
- [11] Pietrobon D, Striessnig J. Neurobiology of migraine[J]. *Nature*, 2003, 4: 386-398
- [12] Toda N, Ayajiki K, Tanaka T, et al. Preganglionic and postganglionic neurons responsible for cerebral vasodilatation mediated by nitric oxide in anesthetized dogs[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 700-708
- [13] Bolay H, Reuter U, Dunn AK, et al. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model[J]. *Nat Med*, 2002, 8: 136-142
- [14] Hansen JM, Sitarz J, Birk S, et al. Vasoactive intestinal polypeptide evokes only a minimal headache in healthy volunteers[J]. *Cephalalgia*, 2006, 26: 992-1003
- [15] Edvinsson L, Gulbenkian S, Barroso CP, et al. Innervation of the human middle meningeal artery: immunohistochemistry, ultrastructure, and role of endothelium for vasomotility[J]. *Peptides*, 1998, 19: 1213-1225
- [16] Boni LJ, Ploug KB, Olesen J, et al. The in vivo effect of VIP, PACAP-38 and PACAP-27 and mRNA expression of their receptors in rat middle meningeal artery[J]. *Cephalalgia*, 2009, 29: 837-847

(2009-11-03 收稿 2010-01-26 修回)