

大鼠坐骨神经损伤后早期脊髓背角小胶质细胞活化状态和活化类型的变化规律

刘巍, 陈佳, 唐晓婷, 程智刚, 黄长盛

(湘雅医院麻醉科, 长沙 410008)

【摘要】 目的 研究坐骨神经损伤后脊髓背角小胶质细胞活化状态和活化类型的变化规律。方法 大鼠随机分为对照组(n=24)、实验组(n=24)。实验组采用结扎坐骨神经主干的方法构建大鼠坐骨神经损伤模型。测量大鼠疼痛行为学数据,于术后第1,7,14天取材,采用免疫荧光染色技术检测大鼠腰段脊髓背角不同激活状态的小胶质细胞变化;通过qRT-PCR验证不同类型小胶质细胞相关标记物的变化趋势。结果 假手术组大鼠在术后14d内脊髓背角小胶质细胞形态和数量无明显改变,小胶质细胞标记物也无明显变化。术后1d,CCI大鼠小胶质细胞形态和数量无明显变化,但促炎型(M1型)标记物增加,提示M1型小胶质细胞活化。术后7d和14d,CCI大鼠小胶质细胞数量显著增加,标记物检测显示以M1型活化为主,抑炎型(M2型)小胶质细胞活化不明显。结论 大鼠脊髓背角小胶质细胞在坐骨神经损伤后早期即开始活化,活化持续到至少术后两周,在此期间均以M1型小胶质细胞活化为主。

【关键词】 小胶质细胞;小胶质细胞,活化;坐骨神经;神经损伤;神经病理性疼痛;免疫荧光染色;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)12-0037-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.008

Differential activation of M1 and M2 microglial in spinal cord dorsal horn of rats at the early stage after sciatic nerve injury

LIU Wei, CHEN Jia, TANG Xiao-ting, CHENG Zhi-gang, HUANG Chang-sheng
(Department of Anesthesiology, Xiangya Hospital, Changsha 410008, China)

【Abstract】 Objective To study the type variation of microglial activation in spinal dorsal horn of rats after sciatic nerve injury. **Methods** Healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control and experimental groups, 24 rats in each group. The experimental group underwent ligation of sciatic nerve trunk to generate nerve injury in the rats. The pain behavior in the rats was measured at the 1th, 7th and 14th postoperative days, and the changes of microglial activation in the rat lumbar spinal cord dorsal horn was detected by immunofluorescence staining. qRT-PCR assay was used to validate the activation trends of M1 and M2 types of microglia cells. **Results** No significant changes were found in the microglial cells in the spinal cord dorsal horn of rats in the sham-operation group during 14 days after operation. In the sciatic nerve ligation group at 1 day after operation, no significant change was observed in the number of microglial cells, but the expression of marker of M1 microglia was significantly increased. At 7 and 14 days after operation, the number of microglial cells and the expression of M1 microglia marker in the spinal cord dorsal horn were increased

【基金项目】 国家自然科学基金;P300/CBP 基因定点诱变对神经病理性疼痛的靶向治疗作用(81370027)。

【作者简介】 刘巍,男(1987-),硕士研究生,研究方向:麻醉学。Email:liuwei188@outlook.com。

【通讯作者】 黄长盛,男,(1981-),博士,研究方向:神经病理性疼痛。Email:docthuang2005@hotmail.com。

significantly. **Conclusions** Microglia activation in the spinal dorsal horn starts at the first day after sciatic nerve injury, and lasts at least for two weeks after the operation. M1 microglia activation dominates during this period.

【Key words】 Microglia cells; Sciatic nerve; Nerve injury; Neuropathy pain; Immunofluorescence; Microglia activation; Rat

外周神经损伤可导致神经病理性疼痛^[1],其发病机制复杂,目前尚未完全清楚。当外周神经受损时,脊髓背角小胶质细胞激活并释放大量的促炎介质^[2]参与神经病理性疼痛发病机制。早期使用抑制剂干预小胶质细胞的激活,可以缓解外周神经损伤后引起的痛觉过敏,证明活化的小胶质细胞对疼痛的产生有直接影响^[3]。过去的研究发现脊髓背角小胶质细胞在外周神经损伤后存在不同的活化状态和活化类型。为研究神经损伤后脊髓背角小胶质细胞的活化变化规律,本研究构建大鼠坐骨神经损伤模型,通过免疫荧光染色和 qRT-PCR 研究脊髓背角小胶质细胞的形态、数量及其炎性标记物的变化趋势,为神经病理性疼痛发病机制研究及治疗提供新的线索。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

成年雄性 SD 大鼠(使用许可证:SYXK(湘)2011-0001;生产许可证:SCXK(湘)2011-0003)48 只,体重 180~220 g 由中南大学动物实验中心提供,标准饲养,保证昼夜节律,饮食自由。待大鼠充分适应环境后进行实验。实验过程中尽可能减少实验动物的用量并减少实验动物的痛苦。大鼠随机分为两组:坐骨神经结扎组(CCI 组)和假手术组(Sham 组),每组 18 只。

按照 Xie 等^[4]的方法构建大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤(chronic constriction injury, CCI)模型。用 300~350 mg/kg 的 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉去毛,消毒、铺无菌巾后,剪开术区皮肤约 2 cm,钝性分离肌肉,暴露左侧坐骨神经主干。用玻璃分针分离坐骨神经后在坐骨神经主干上,用强生 4-0 铬质肠线以约 1 mm 间距结扎坐骨神经主干 4 处,结扎程度以引起腿部肌肉轻度颤动为宜^[5]。结扎后恢复坐骨神经原解剖位置,然后用强生 3-0 丝线逐层缝合。术后在大鼠前肢皮下肌注射青霉素钠溶液 8 万单位。Sham 组大鼠仅暴露坐骨神经数分钟,不予结扎,其他操作均与 CCI 组相同。所有手术操作均严格遵循无菌原则,为减小操作产生的误差,手术操作均由同一人执行。

1.2 疼痛行为学测定

1.2.1 一般行为学:术后观察大鼠的精神状态、进食、伤口愈合情况等,重点观察大鼠的安静时的姿势、运动能力、以及是否出现自噬现象等。

1.2.2 机械刺激诱发痛:于术前及术后 1、3、5、7、10、12、14 d 采用 Von Frey 纤维丝分别测量两组大鼠左后肢的机械痛阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)。术前机械痛阈值称为机械痛阈基础值^[6]。

1.2.3 热刺激诱发痛:分别于术前及术后 1、3、5、7、10、12、14 d 采用热痛仪检测两组大鼠左后肢的热痛阈值(thermal withdrawal latency, TWL)。术前热痛阈值为热痛阈基础值。

2 标本采集与处理

每组 12 只大鼠于手术后 1、7、14 d 在完成疼痛行为学测量后,取新鲜脊髓腰膨大段组织,存入液氮罐中速冻继而转运至 -80℃ 深低温冰箱中长期保存,用于 qPCR 实验。另取每组 12 只大鼠在手术后 1、7、14 d 在完成疼痛行为学测量后,用 4% 多聚甲醛(PFA)采用先快后慢的方法灌注固定组织,4% PFA 的灌注量约为 200 mL~300 mL。灌注完成后取脊髓腰膨大部分,置于 4% PFA 中后固定 6~8 h,然后转入 15% 蔗糖溶液中过夜,再转入 30% 蔗糖溶液中充分脱水。

2.1 qRT-PCR

用试剂盒提取组织细胞的总 RNA,利用分光光度计定量后取 2 μg 反转录获得 cDNA。使用 SYBR Green 1 嵌合荧光的方法进行实时定量 PCR 扩增。Arg1 引物序列:上游 5'-TATCGGAGCGCCTTTCTCTA-3' 下游 ACAGACCGTGGTTCCTTCAC MRC1 引物序列:上游 TGCCAGCGACATAATAGCAG 下游 ACAAATGCCAACCTTCCTTG NLRP3 引物序列:上游 GCTGCTCAGCTCTGACCTCT 下游 GTCCTTCACAGAGGAGCTTG 内参 β-actin 引物序列:上游 CATCCTGCGTCTGGACCTGG 下游 CATCCTGCGTCTGGACCTGG。引物对照分析使用 2^{-ΔΔCt}法。

2.2 免疫荧光染色

冰冻切片 灌注取材的脊髓标本,多聚甲醛后固定 6~8 h 后,蔗糖脱水处理。脱水完成后,取出脊

髓标本,修剪好组织在冰冻切片机的冰冻托盘上排列好,用组织包埋剂 OCT 包埋标本,放入冰冻切片机待 OCT 完全凝固后,进行切片,切片机温度设为 -20°C ,切片的厚度设为 $10\ \mu\text{m}$ 。切好的组织片贴于标记好的载玻片上,室温下晾干 30 min, -20°C 保存。利用染色免疫荧光检测小胶质细胞激活,并根据脊髓不同板层的小胶质细胞进行计数,对不同激活类型的小胶质细胞进行分类统计。

2.3 统计学方法

行为学测量采用双盲原则进行,实验数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。行为学数据以均数 \pm 标准误的形式表示。两组大鼠的痛阈结果数据分析采用完全随机设计的单因素方差分析方法(ANOVA),两两比较采用 LSD 检验,各种指标的 mRNA 表达量的数据组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 行为学结果

3.1.1 一般行为学结果:CCI 组和 Sham 组大鼠术后体重无明显下降,进食和饮水无明显改变。Sham 组大鼠术后行为学表现较术前无明显改变,而 CCI 组大鼠术后逐渐出现术侧后肢足趾并拢,足外翻,自发性疼痛及触摸痛等体征,并且有舔舐术侧后肢

的情况,但未出现自噬现象。

3.1.2 机械痛阈:两组大鼠术侧后足机械痛阈(MWT)基础值及术后第 1 天的 MWT 值相比较均无统计学差异,从术后第 3 天开始,CCI 组大鼠术侧后足 MWT 值逐渐降低,持续至手术后第 14 天,而在术后第 7 天达最低水平,与 Sham 组大鼠各时间点相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$) (图 1A)

3.1.3 热痛阈:热痛阈的变化与机械痛阈的变化趋势大体一致。CCI 组大鼠术侧后足热痛阈(TWL)基础值及术后第 1 天的 TWL 与 Sham 组相比均无统计学差异,而在手术后第 3 天开始出现 TWL 降低,术后第 7 天 TWL 达最低水平,持续至术后第 14 天,CCI 组各时间点与 Sham 组大鼠相比差异均有统计学意义($P < 0.05$) (图 1B)

3.2 脊髓背角小胶质细胞免疫荧光染色结果

免疫荧光染色结果显示:sham 组大鼠脊髓背角主要以静息状态小胶质细胞为主,细胞胞体较小,突触少且细长。术后 1,7,和 14 d 内 sham 大鼠小胶质细胞形态无明显改变。CCI 术后 1d 脊髓背角仍以静息状态小胶质细胞为主。CCI 术后 7d 和 14d,脊髓背角小胶质细胞显著增生激活,主要以中度活化的小胶质细胞为主,表现为胞体肥大,突触缩短。同时可见少量重度激活的小胶质细胞,表现为突触消失,胞体呈阿米巴样(图 2,见彩插 3)。

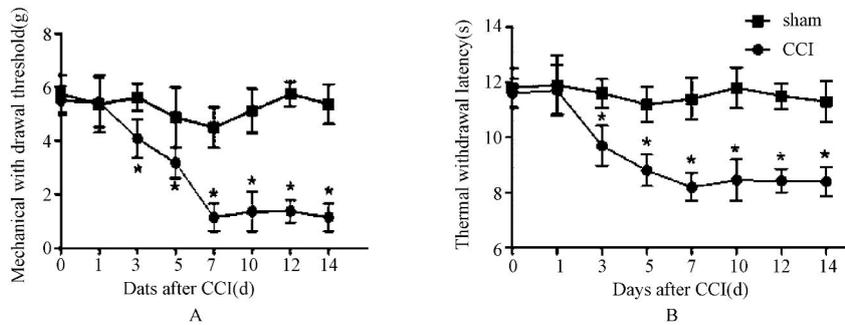


图 1 Sham 组和 CCI 组大鼠在术后各时间点的术侧后肢机械痛阈(A)热痛阈(B)变化。与 sham 组比较, * $P < 0.05$

Fig. 1 Comparison of the changes of MWT (A) and TWL (B) in the sham and CCI

rat groups at different time points after operation. * $P < 0.05$, compared with the sham group.

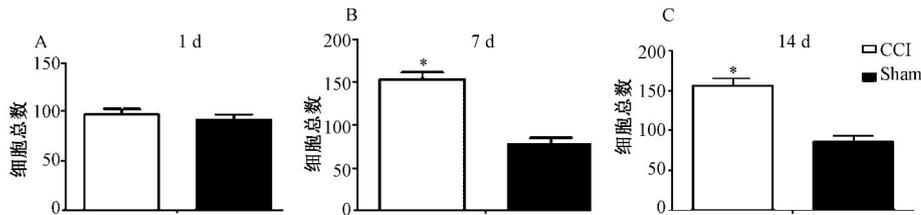


图 3 术后 1d(A),7d(B)和 14 d(C)脊髓背角小胶质细胞数量变化。与 sham 组相比, * $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Changes of microglia number in the dorsal horn of rat spinal cord at 1, 7, and 14 days after operation.

* $P < 0.05$, compared with the sham group.

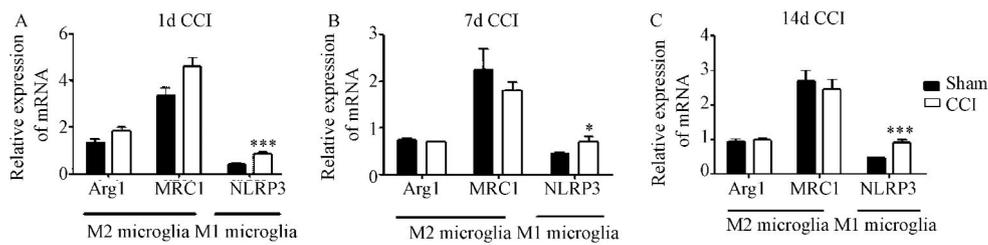


图 4 大鼠脊髓中 M1、M2 型小胶质细胞标记物在术后第 1、7、14 天的表达情况。

Fig. 4 The expression of M1 and M2 microglia cell markers in the rat spinal cord at 1, 7, 14 days after operation.

3.3 脊髓背角小胶质细胞计数

Sham 组大鼠脊髓背角小胶质细胞数量在术后各时间点内无明显差异。CCI 术后 1 d 脊髓背角小胶质细胞数量与 sham 组相比也无明显改变。CCI 术后 7 d 和 14 d, 脊髓背角小胶质细胞数量显著增加(与 sham 组相比, $P < 0.05$; 图 3), 和细胞形态发生改变的时间点一致。

3.4 不同时期大鼠脊髓中 M1、M2 型激活小胶质细胞标记物的表达情况

PCR 结果显示:手术后第 1 天, CCI 组大鼠术侧脊髓中 M2 型小胶质细胞标记物 Arg1 和 MRC1 的 mRNA 表达量与 Sham 组相比较稍有增高, 但差异无统计学意义, 而 M1 型小胶质细胞标记物 NLRP3 的 mRNA 表达量明显高于 Sham 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 4, A)。在神经损伤的后期即手术后第 7 天和第 14 天, CCI 组大鼠术侧脊髓中 M2 型小胶质细胞标记物 Arg1 和 MRC1 的 mRNA 表达量与 Sham 组相比仍无统计学差异, 而 M1 型小胶质细胞标记物 NLRP3 的 mRNA 表达量仍显著高于 Sham 组, 差异有统计学意义 (第 7 天 $P < 0.05$, 第 14 天 $P < 0.001$) (图 4, B 和 C)。

4 讨论

坐骨神经损伤后可以引起局部组织的炎症反应, 引起 5-HT、缓激肽等内源性物质的大量释放, 从而活化外周感受器, 并将伤害性刺激传入脊髓背角。在脊髓背角包绕神经元的星形胶质细胞可以敏锐的感知周围微环境的改变, 并通过合成、释放大量的炎性介质激活小胶质细胞^[7]。与外周的巨噬细胞相同, 小胶质细胞的激活有 M1 型、M2 型激活两种类型^[8]。M1 型小胶质细胞激活可以分泌促炎因子, 引起组织的炎性损伤; M2 型小胶质细胞则具有抑制炎症反应的作用^[9]。不同激活类型的小胶质细胞其形态学也不同。

本研究结果显示:术后 1d, M1 型小胶质细胞标志物 NLRP3 明显升高, 提示小胶质细胞的活化; 此时免疫荧光染色结果显示小胶质细胞形态变化不明显, 提示小胶质细胞激活后其形态学改变滞后于其基因表达。术后 7 d, 细胞计数结果显示小胶质细胞数目明显增多; PCR 结果同样表明 M1 型小胶质细胞标记物仍然显著高于 sham 组。此时免疫荧光染色结果可明显观察到小胶质细胞数目增多, 形态学表现为胞体变大, 突触缩短。此阶段 M1 型小胶质细胞活化数量显著增加, 痛阈逐渐降低。至术后 14 d 脊髓背角中小胶质细胞计数结果仍显示细胞明显增多; 免疫荧光染色显示以胞体变大, 突触缩短的小胶质细胞为主。即不论在神经损伤的早期或后期, 大鼠脊髓背角中均以激活的 M1 型小胶质细胞为主。其形态在第 7 天的免疫荧光染色结果中最为明显, 表现为胞体变大, 突触缩短和减少。M1 型小胶质细胞产生的大量神经毒性促炎介质, 如 IL-1 β 、TNF- α , 等, 导致促炎反应的发生。本实验结果可较好解释小胶质细胞活化的时间变化与痛觉过敏变化规律一致的现象^[10]。术后 14 d 的免疫荧光染色结果同样出现部分形态表现为胞体进一步变大, 突触完全消失的阿米巴样小胶质细胞。有研究表明 M2 型小胶质细胞对神经病理性疼痛具有保护作用, 在术后 7 至 14d 这段时间机械痛阈、热痛阈逐渐有部分恢复。根据实验结果我们推测痛阈逐渐恢复与 M2 型胶质细胞的作用有关, 提示阿米巴样小胶质细胞可能为 M2 型, 它促进了痛阈的恢复。已有研究发现阿米巴样小胶质细胞对神经的保护作用与其对凋亡细胞和组织碎片的吞噬作用有关。在正常情况下表达于细胞内表面的磷脂酰丝氨酸在细胞发生凋亡早期可以转位至细胞膜表面, 从而成为小胶质细胞识别破损细胞的关键性的信号蛋白^[9]。活化的小胶质细胞通过识别细胞表面的磷脂酰丝氨酸, 触发其内吞作用。其他

研究证实 M2 型小胶质细胞的痛觉保护作用与其参与受损细胞吞噬作用,以及将受损的其他细胞碎屑如破坏的髓鞘吞噬^[11]有关。阿米巴样小胶质细胞的吞噬功能产生痛觉保护作用的同时也诱导了活化的小胶质细胞内的转化生长因子 β 、白介素 1 受体拮抗剂以及白介素 10 等抑炎介质的合成和释放。但是由于 M2 型小胶质细胞数量有限,痛阈恢复不明显。

因此,小胶质细胞活化为促炎的 M1 型可能是神经病理性疼痛发病机制中的重要组成部分。从第 7 天至第 14 天,以 M1 型小胶质细胞活化为主。阿米巴样小胶质细胞极可能为起保护作用的 M2 型,这与机械痛阈、热痛阈数据变化趋势一致。其形态表现为胞体进一步变大,突触完全消失。M2 型小胶质细胞的神经保护作用促进了痛阈的逐渐恢复。

通过本次实验结果可提示神经损伤后引起的痛觉过敏与 M1 型小胶质细胞关系密切,在神经损伤的早期就抑制小胶质细胞的 M1 型活化对神经损伤引起的痛觉过敏具有明显的保护作用^[12]。另外活化的 M2 型小胶质细胞对神经损伤引起的痛觉过敏也具有一定的保护作用。我们推测如果不能在早期抑制小胶质细胞的 M1 型活化,若能够促进 M1 型活化向 M2 型活化转变,对机体也有积极的意义。

5 结论

坐骨神经损伤早期即可引起脊髓背角小胶质细胞激活,活化持续到至少术后两周,在此期间均以促进炎症的 M1 型小胶质细胞活化为主。M1 型小胶质细胞活化可能是外周神经损伤所致神经病理性疼痛的重要机制。

参考文献:

[1] Ochoa JL. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes [J]. *Neurology*, 2009, 72

(14): 1282 - 1283.

- [2] Romero-Sandoval EA, Horvath R J, Deleo JA. Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008, 9(7): 726 - 734.
- [3] McMahon SB, Malcangio M. Current challenges in glia-pain biology [J]. *Neuron*, 2009, 64(1): 46 - 54.
- [4] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87 - 107.
- [5] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury [J]. *Pain*, 1990, 43(2): 205 - 218.
- [6] Jongen JL, Smits H, Pederzani T, et al. Spinal autofluorescent flavoprotein imaging in a rat model of nerve injury-induced pain and the effect of spinal cord stimulation [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(10): e109029.
- [7] 杨美蓉, 杜冬萍. 小胶质细胞活化与神经病理性疼痛 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2009, 15(2): 114 - 116.
- [8] Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, et al. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta [J]. *J Neuroimmunol*, 2009, 210(1-2): 3 - 12.
- [9] 付佩彩, 喻志源, 李彩红, 等. 布美他尼对 LPS 诱导的小胶质细胞活化及炎性分泌的影响 [J]. *卒中与神经疾病*, 2015, 22(1): 6 - 8, 64.
- [10] Peters CM, Jimenez-Andrade JM, Kuskowski MA, et al. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat [J]. *Brain Res*, 2007, 1168: 46 - 59.
- [11] Stolzing A, Wengner A, Grune T. Degradation of oxidized extracellular proteins by microglia [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 400(2): 171 - 179.
- [12] Raghavendra V, Tanga F, Deleo JA. Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306(2): 624 - 630.

[修回日期] 2015 - 09 - 18