

· 实验研究 ·

NADPH 氧化酶介导的小胶质细胞活化在神经病理性疼痛和抑郁共病中的作用

徐宁 谢泽敏 唐小慧 潘薇 张广芬 周脉涛

【摘要】 目的 观察神经病理性疼痛和抑郁共病中磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADPH)氧化酶及小胶质细胞的变化,并探讨其相关机制。**方法** 采用保留性坐骨神经损伤模型(SNI模型)。健康成年雄性SD大鼠44只,随机分为四组:假手术+溶剂组(SV组)、假手术+夹竹桃麻素(APO)组(SA组)、SNI+溶剂组(SNV组)、SNI+APO组(SNA组),每组11只。SA组和SNA组术前24 h及术前1 h腹腔注射APO 15 mg/kg,以后每天注射1次直至SNI术后14 d;其余两组在相同时点注射等容量溶剂。术前1 d和术后7、14 d进行机械缩足反射阈值(MWT)测试,术后14 d进行旷场实验、强迫游泳实验和糖水偏好实验等行为学测试。行为学后2 h取大鼠前额叶皮层组织,采用Western blot法检测gp91^{phox}的含量,免疫荧光共标法检测Iba1和gp91^{phox}的表达量。**结果** 与SV、SA、SNA组比较,SNV组MWT明显降低,强迫游泳不动时间明显延长,糖水消耗比例明显减少,gp91^{phox}含量明显增多($P < 0.05$)。与SV、SA、SNA组比较,SNV组Iba1和gp91^{phox}表达量增多。旷场实验中,四组探索总路程差异无统计学意义;糖水偏好实验中,四组总液体消耗量差异无统计学意义。**结论** 神经病理性疼痛可导致抑郁样行为,并引起前额叶皮层的NADPH氧化酶活化;NADPH氧化酶抑制剂APO可减轻疼痛和抑郁样行为,其机制可能与抑制小胶质细胞活化有关。

【关键词】 神经病理性疼痛;抑郁;NADPH氧化酶;小胶质细胞;夹竹桃麻素

Role of NADPH oxidase-mediated activation of microglia in the comorbidity of neuropathic pain and depression XU Ning, XIE Zemin, TANG Xiaohui, PAN Wei, ZHANG Guangfen, ZHOU Maitao. Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

Corresponding author: ZHOU Maitao, Email: zhoumaitao@126.com

【Abstract】 Objective To observe the variation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase and microglia in the comorbidity of neuropathic pain and depression and discuss the related mechanism. **Methods** The spared nerve injury model was used. Forty-four male adult Sprague Dawley rats were randomly divided into the following four groups ($n=11$ each): sham+vehicle group (group SV), sham+APO group (group SA), SNI+vehicle group (group SNV), SNI+APO group (group SNA). In groups SA and SNA, rats were intraperitoneally injected with apocynin (APO) 15 mg/kg 24 hours and 1 hour before SNI and continued once daily until the 14th day. The rats in the other two groups received the equal volume of vehicle. The mechanical withdrawal threshold (MWT) was tested 1 day before SNI and 7 days and 14 days after SNI, and the open field test, the forced swimming test and the sucrose preference test were performed 14 days after SNI. The prefrontal cortex were collected 2 hour after the behavior tests. The expression of gp91^{phox} was detected by Western blot and the expression of Iba1 and gp91^{phox} were detected by double-immunofluorescence staining. **Results** The reduced MWT, the increased immobility time, the decreased sucrose consumption and the increased content of gp91^{phox} were observed in group SNV compared with groups SV, SA and SNA ($P < 0.05$). The expression of Iba1 and gp91^{phox} were increased in group SNV. The total travel distance in the open field test and the total liquid consumption in the sucrose preference test had no significant difference among the four groups. **Conclusion** Neuropathic pain may induce depressive behaviors and activate NADPH oxidase in the prefrontal cortex. Moreover, the inhibition of NADPH oxidase by APO can alleviate neuropathic pain and depression, which is potentially related to the activation of microglia.

基金项目:国家自然科学基金(81503053,81571083)

作者单位:221004 徐州医科大学江苏省麻醉学重点实验室(徐宁、谢泽敏);南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院麻醉科(唐小慧、潘薇、张广芬);中国人民解放军第101医院麻醉疼痛科(周脉涛)

通信作者:周脉涛,Email:zhoumaitao@126.com

【Key words】 Neuropathic pain; Depression; Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; Microglia; Apocynin

神经病理性疼痛(neuropathic pain)是中枢或外周神经系统损伤引起的疼痛综合征。流行病学研究显示 42% 的神经病理性疼痛患者出现抑郁症状,而 37% 的抑郁症患者也伴随疼痛症状^[1,2]。研究表明,磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶分别参与神经病理性疼痛^[3]和抑郁症^[4]的发生,但是否参与神经病理性疼痛和抑郁共病的发生,目前尚不清楚。NADPH 氧化酶也是小胶质细胞源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)的主要来源和小胶质细胞内促发炎症反应的一个重要环节^[5]。gp91^{phox}是 NADPH 氧化酶的一个重要亚基。前额皮层是神经病理性疼痛和抑郁症发生的一个重要脑区^[6,7]。本研究观察神经病理性疼痛和抑郁共病中 NADPH 氧化酶及小胶质细胞的变化,并探讨其相关机制。

材料与方法

实验动物及分组 选择健康成年雄性 SD 大鼠 44 只,12 周龄,体重 200~250 g,由南京军区南京总医院动物实验中心提供,随机分为四组:假手术+溶剂组(SV 组)、假手术+夹竹桃麻素(APO)组(SA 组)、保留性坐骨神经损伤(SNI)+溶剂组(SNV 组)、SNI+APO 组(SNA 组),每组 11 只。SA 组和 SNA 组术前 24 h 及术前 1 h 腹腔注射 APO 15 mg/kg,以后每天注射 1 次直至术后 14 d,SV 和 SNV 组在相同时点注射等容量溶剂。

SNI 模型建立 参考 Isabelle 等^[8]方法建立 SNI 模型,腹腔注射戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉后,切开右后肢外侧皮肤和肌肉,分离股二头肌,并暴露坐骨神经干及其 3 个分支:腓总神经、胫神经和腓肠神经,用 4-0 丝线结扎胫神经和腓总神经后将其切断,并去除断点末端 2~4 mm 的神经干,术后分层缝合伤口。手术过程中保持腓肠神经完整。SV 组和 SA 组仅暴露神经而不切断,其余过程同 SNI。

机械痛阈测定 术前 1 d 和术后 7、14 d 测定机械性缩足反射阈值(mechanical withdraw threshold, MWT)。用 von Frey 丝刺激大鼠右侧后爪 1/3 足底部,从 2.0 g 开始,随后逐渐加大刺激强度,记录大鼠猛然缩足时的刺激强度值,每次刺激至少间隔 10 s,

结果取 5 次测量平均值^[9]。

旷场实验(open field test, OFT) SNI 术后 14 d 行 OFT,观察大鼠运动能力。将大鼠从无顶不透明塑料箱(100 cm×100 cm×40 cm)中间放入,任其自由探索 5 min,并由图像自动监视系统记录其总探索路程。两只鼠之间用 75% 酒精擦拭旷场。

强迫游泳实验(forced swimming test, FST) 于术后 14 d 进行 FST。将大鼠置于直径 30 cm、高 65 cm、水深 40 cm(22~23℃)的透明玻璃圆筒中进行强迫游泳。每只大鼠共游泳 6 min,观察并记录后 5 min 大鼠的不动时间。两只鼠之间需清洁容器并换水。

糖水偏好实验(sucrose preference test, SPT) 于术后 13 d 进行 SPT。测试糖水偏好前 2 h 将大鼠单笼放入笼中适应环境,给予大鼠 1 瓶 100 g 的 1% 蔗糖水及 1 瓶 100 g 的纯净水,为避免位置因素影响,12 h 后交换两个饮水瓶位置,24 h 后称量剩余蔗糖水和纯净水的质量,按以下公式计算糖水消耗比例:糖水消耗比例=蔗糖水消耗量/(蔗糖水消耗量+纯净水消耗量)×100%。

Western blot 检测 SNI 术后 14 d,用 2% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉后断头,取前额叶皮层组织。冰上匀浆,4℃下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,蛋白质浓度用 Bradford 法测定,95℃煮 5 min,使蛋白变性。电泳转膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗,4℃过夜,次日 TBST 漂洗 5 min×3 次,二抗室温孵育 1 h 并漂洗 3 次,ECL 曝光显影。用 Image J 软件分析 gp91^{phox}的表达,用目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度比值来表示 gp91^{phox}的含量。

免疫荧光检测 采用免疫荧光共标的方法检测 gp91^{phox}是否表达在 Iba1 细胞上,以及 Iba1 和 gp91^{phox}的表达量。SNI 术后 14 d,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 60 mg/kg,4% 多聚甲醛心脏灌注后取脑。30% 蔗糖脱水过夜,OCT 包埋后切成 10 μm 厚的冰冻切片。通风橱风干后用 PBS 缓冲液浸泡 10 min,室温封闭 1 h,擦干加一抗,4℃过夜。PBS 缓冲液漂洗 5 min×3 次后加带荧光标记的二抗及 DAPI 孵育 1 h。漂洗 3 次,封片。用徕卡激光共聚焦显微镜拍摄。

统计分析 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分

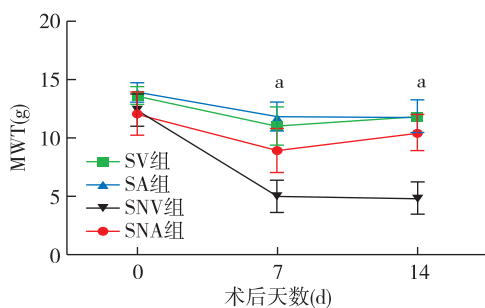
析。正态分布计量资料以均数±标准误($\bar{x} \pm SEM$)表示,组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析,两两比较采用 Tukey 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

术后 7、14 d,SV、SA、SNA 组 MWT 明显高于 SNV 组($P < 0.05$)(图 1)。

与 SNV 组比较,SV、SA、SNA 组强迫游泳不动时间明显缩短($P < 0.05$)糖水消耗比例明显增加($P < 0.05$);四组总探索路程、总液体消耗差异无统计学意义(表 1)。

与 SNV 组比较,SV、SA、SNA 组前额皮层 gp91^{phox} 含量明显减少($P < 0.05$)(图 2)。



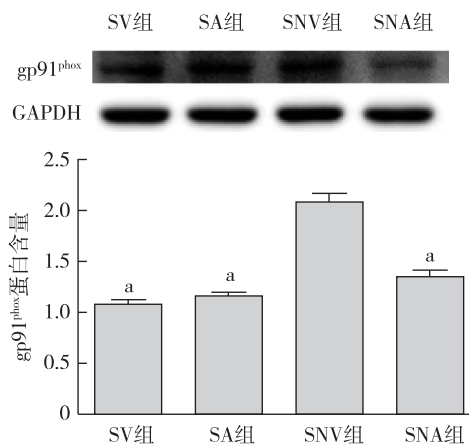
注:与 SNV 组比较,* $P < 0.05$

图 1 四组大鼠 SNI 前不同时间点同侧后足 MWT 的比较

与 SNV 组比较,SV、SA、SNA 组 Iba1 和 gp91^{phox} 表达量减少(图 3)。

讨 论

本研究结果显示,SNI 建模后第 14 天大鼠强迫游泳不动时间明显延长,糖水消耗比例明显减少,验证了神经病理性疼痛可引起抑郁样行为。SNI 术后第 14 天 gp91^{phox} 含量增加,在小胶质细胞上的 gp91^{phox} 表达量增加,提示 SNL 可活化大脑前额叶皮层 NADPH 氧化酶,增加氧化应激损伤;



注:与 SNV 组比较,* $P < 0.05$

图 2 四组大鼠前额皮层 gp91^{phox} 含量的比较

Iba1 表达明显增加,表明小胶质细胞活化。而用 APO 治疗后可明显逆转上述变化,说明 APO 可通过抑制 NADPH 氧化酶活化从而减轻小胶质细胞活化,最终缓解神经病理性疼痛和抑郁共病的发展。

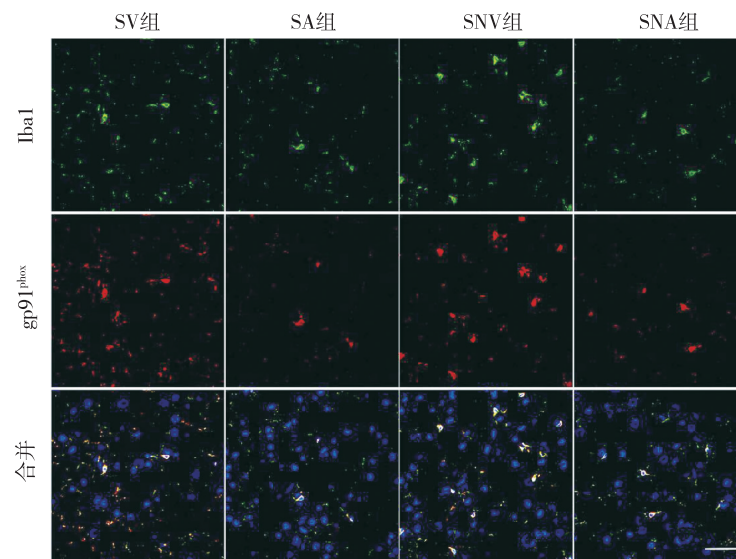
NADPH 氧化酶可产生多种超氧化物,它参与了神经病理性疼痛、抑郁症、术后认知功能障碍^[10]以及创伤性脑损伤、阿尔兹海默症等一些疾病^[11]。APO 是具有抗氧化作用及清除 ROS 产生的一类 NADPH 氧化酶抑制剂。小胶质细胞是中枢神经系统中一类重要的免疫细胞,它的激活及其引起的炎症因子释放还参与其他多种神经精神类疾病的发生。在神经病理性疼痛^[12]和抑郁^[13]等动物模型中,小胶质细胞被证实在这类疾病的发病初期起到了重要作用。本研究发现 APO 可能是通过降低大脑内前额叶皮层的 NADPH 氧化酶活性而抑制小胶质细胞的活化,从而减轻神经病理性疼痛和抑郁。

然而,本研究的设计尚存在不足之处,例如,并未探索 APO 是如何通过 NADPH 氧化酶抑制小胶质细胞的,也并未通过直接抑制小胶质细胞来观察

表 1 四组大鼠 OFT、FST 和 SPT 实验结果的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	总探索路程(cm)	强迫游泳不动时间(s)	糖水/总液体消耗(%)	总液体消耗(ml)
SV 组	11	1 945.2±180.8	71.9±7.7 ^a	85.8±3.6 ^a	48.4±5.3
SA 组	11	1 816.1±129.8	57.3±6.8 ^a	79.6±2.8 ^a	46.8±5.0
SNV 组	11	1 944.3±61.6	117.1±12.4	47.5±7.5	42.8±4.8
SNA 组	11	1 830.0±207.5	75.0±9.1 ^a	70.3±5.3 ^a	49.1±6.4

注:与 SNV 组比较,* $P < 0.05$

图3 四组大鼠前额皮层 Iba1 和 gp91^{phox}表达量的比较

其对神经病理性疼痛和抑郁共病发生的影响;只研究了 NADPH 氧化酶和小胶质细胞的关系,没有研究 NADPH 氧化酶与神经元和星型胶质细胞的关系;只研究了前额叶皮层,杏仁核和伏隔核等相关脑区也有待研究。就这些问题将来仍可进行进一步研究。

综上所述,神经病理性疼痛与抑郁共病可引起大鼠前额叶皮层的 NADPH 氧化酶活化,APO 可通过抑制 NADPH 氧化酶而减轻小胶质细胞的活化,最终缓解疼痛及抑郁样行为。由此推测,NADPH 氧化酶介导的小胶质细胞活化可能参与了神经病理性疼痛和抑郁共病的发生。

参 考 文 献

- [1] Radat F, Margot-Duclo A, Attal N. Psychiatric comorbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicentre cohort study. *Eur J Pain*, 2013, 17(10): 1547-1557.
- [2] Wiech K, Tracey I. The influence of negative emotions on pain: behavioral effects and neural mechanisms. *Neuroimage*, 2009, 47(3): 987-994.
- [3] Kim D, You B, Jo EK, et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(33): 14851-14856.
- [4] Seo JS, Park JY, Choi J, et al. NADPH oxidase mediates depressive behavior induced by chronic stress in mice. *J Neurosci*, 2012, 32(28): 9690-9699.
- [5] Sharma AK, Singh V, Gera R, et al. Zinc oxide nanoparticle induces microglial death by NADPH-oxidase-independent reactive oxygen species as well as energy depletion. *Mol Neurobiol*, 2016. doi: 10.1007/s12035-016-0133-7
- [6] Guida F, Luongo L, Marmo F, et al. Palmitoylethanolamide reduces pain-related behaviors and restores glutamatergic synapses homeostasis in the medial prefrontal cortex of neuropathic mice. *Mol Brain*, 2015, 8: 47.
- [7] Qi WJ, Wang W, Wang N, et al. Depressive-like history alters persistent pain behavior in rats: Opposite contribution of frontal cortex and amygdala implied. *Psych J*, 2013, 2(2): 133-145.
- [8] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [9] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [10] 邱丽丽, 纪木火, 张慧, 等. NADPH 氧化酶下调海马内微清蛋白表达在老年小鼠术后认知功能障碍中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(5): 481-484.
- [11] Dohi K, Ohtaki H, Nakamachi T, et al. Gp91phox (NOX2) in classically activated microglia exacerbates traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*, 2010, 7: 41.
- [12] Clark AK, Malcangio M. Fractalkine/CX3CR1 signaling during neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 121.
- [13] Arakawa S, Shirayama Y, Fujita Y, et al. Minocycline produced antidepressant-like effects on the learned helplessness rats with alterations in levels of monoamine in the amygdala and no changes in BDNF levels in the hippocampus at baseline. *Pharmacol Biochem Behav*, 2012, 100(3): 601-606.

(收稿日期:2016-09-25)