

· 实验研究 ·

乳酸对慢性神经病理性痛小鼠认知功能的影响

谈晓祥 邱丽丽 孙杰

【摘要】 目的 探索乳酸对慢性神经病理性痛小鼠认知功能的影响。**方法** 选择 C57BL/6J 雄性小鼠 36 只, 8~10 周龄, 体重 25~30 g。采用坐骨神经损伤(SNI)制备慢性神经病理性痛模型。将小鼠随机分为三组: 假手术组(Sham 组)、坐骨神经损伤组(SNI 组)和坐骨神经损伤+乳酸处理组(SNIL 组), 每组 12 只。Sham 组仅暴露神经, 不进行结扎处理。SNI 组和 SNIL 组制备慢性神经病理性痛模型。乳酸通过生理盐水稀释至终浓度 100 mg/ml。SNIL 组于手术当天至术后第 20 天每天腹腔注射乳酸 0.25 ml。Sham 组和 SNI 组在相同时点给予等体积生理盐水。于手术当天和术后第 21 天测量 MWT, 于术后第 20 天采用旷场实验测量运动距离, 采用新物体识别实验计算新物体探索时间百分比。于术后第 21 天采用 Y 迷宫实验计算轮替率。术后第 22 天处死小鼠, 采用 Western blot 法检测脑源性神经营养因子(BDNF)、早期生长反应因子-1(Egr-1)和细胞骨架活性调节蛋白(Arc)的相对含量。**结果** 与 Sham 组比较, SNI 组和 SNIL 组术后第 21 天 MWT 明显降低, SNI 组新物体探索时间百分比明显降低, 轮替率、海马组织 BDNF、Egr-1、Arc 相对含量明显降低($P < 0.05$)。与 SNI 组比较, SNIL 组新物体探索时间明显延长, 轮替率、海马组织 BDNF、Egr-1、Arc 相对含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 乳酸可以通过增加慢性神经病理性痛小鼠海马突触可塑性相关蛋白的表达, 减轻认知功能损伤。

【关键词】 慢性神经病理性痛; 认知功能; 乳酸; 突触可塑性

Effect of lactic acid on cognitive function in mice with chronic neuropathic pain TAN Xiaoxiang, QIU Lili, SUN Jie. Department of Anesthesiology, Surgery and Pain Management, Zhongda Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210000, China
Corresponding author: SUN Jie, Email: dgsunjie@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of lactic acid on cognitive function in mice with chronic neuropathic pain. **Methods** Chronic neuropathic pain model was established by sciatic nerve injury (SNI). Thirty-six male C57BL/6J mice, aged 8 to 10 weeks, weight 25 to 30 g, were randomly divided into three groups ($n = 12$): group Sham, group SNI and SNI + lactic acid treatment group (group SNIL). In group Sham, only the nerves were exposed and no ligation was performed. Chronic neuropathic pain model was prepared in group SNI and group SNIL. Lactic acid was diluted with normal saline to a final concentration of 100 mg/ml. In group SNIL, lactate 0.25 ml was intraperitoneally injected daily from the day of surgery to the 20th day after surgery. Group Sham and group SNI were given equal volume normal saline at the same time. The MWT was measured on the day of surgery and the 21st day after surgery. On the 20th day after surgery, the moving distance was measured by open field experiment, and the percentage of new object exploration time was calculated by new object recognition experiment. The alternation rate was calculated by Y maze test on the 21st day after surgery. The mice were sacrificed on the 22nd day and the relative protein contents of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), early growth response factor-1 (Egr-1) and activity regulated cytoskeleton (Arc) were detected by Western blot. **Results** Compared with group Sham, MWT in groups SNI and SNIL decreased significantly on day 21 after operation, and in group SNI, the discovery time of new objects was significantly shortened, and the alternation rate, the relatively contents of BDNF, Egr-1 and Arc protein in hippocampus were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group SNI, the discovery time of new objects in group SNIL was significantly extended, and the alternation rate, the contents of BDNF, Egr-1 and Arc protein in hippocampus were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Lactic acid can reduce cognitive impairment of mice with chronic neuropathic pain by in-

DOI:10.12089/jca.2023.10.013

基金项目: 国家自然科学基金(82071196)

作者单位: 210000 南京市, 东南大学附属中大医院麻醉手术与疼痛管理科

通信作者: 孙杰, Email: dgsunjie@hotmail.com

creasing the expression of synaptic plasticity related proteins in hippocampus.

【Key words】 Chronic neuropathic pain; Cognitive function; Lactic acid; Plasticity of synapses

慢性疼痛作为一种复杂的生理心理活动,是临床上最常见的症状之一^[1]。持续的疼痛会影响患者预后,增加医疗费用,甚至危及患者生命^[2-3]。经历慢性神经病理性痛的患者在出现代谢、内分泌甚至免疫改变的同时常伴有认知功能下降^[4]和神经突触可塑性降低^[5]。突触可塑性作为大脑神经网络功能稳态的标志之一,是学习和记忆的重要组成部分。突触可塑性下降常伴随认知功能紊乱^[6]。大脑中的乳酸主要由葡萄糖或糖原响应神经元活动信号在星形胶质细胞中形成,它作为维持神经功能的能量来源,对于维持神经元兴奋性、可塑性、记忆整合和神经稳态等都发挥着重要的作用^[7-8]。通过阻断星形胶质细胞糖原产生乳酸可以抑制脑内海马长时程增强(long-term potentiation, LTP)和记忆巩固,而注射乳酸可以挽救突触可塑性的下降^[9]。因此,本实验研究探讨乳酸对慢性神经病理性痛小鼠认知功能的影响。

材料与方法

实验动物 本实验研究经东南大学医学院实验动物伦理委员会批准(2020031001)。选择 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,8~10 周龄,体重 25~30 g,由东南大学医学院实验动物中心提供(实验动物许可证号:220222495)。饲养条件:维持环境温度 20~24 ℃,相对湿度 55%~65%,光/暗循环 12 h,保证充足的食物和水供应。

慢性神经病理性痛模型制备 采用坐骨神经损伤(spared nerve injury, SNI)法制备慢性神经病理性痛模型。小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后,置于俯卧位,碘伏棉球消毒,于小鼠后肢上缘切开皮肤,分离肌肉,暴露出坐骨神经主干及三个分支:腓肠神经、腓总神经和胫神经。小心分离出胫神经和腓总神经,并用 6-0 丝线紧紧结扎,在结扎远侧端切断,保留腓肠神经。局部无菌生理盐水冲洗后采用 5-0 缝合线逐层缝合肌肉和皮肤。手术过程中使用保温垫维持体温,术毕小鼠清醒后放回原笼继续喂养。于手术当天和术后第 21 天测机械缩足阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)反映小鼠疼痛程度,MWT 出现明显下降提示慢性神经病理性痛模型制备成功,共制备模型 28 只,成功 24 只,失败小鼠参照随机数字表补齐。

实验分组与处理 采用随机数字表法将小鼠分为三组:假手术组(Sham 组)、坐骨神经损伤组(SNI 组)和坐骨神经损伤+乳酸组(SNIL 组),每组 12 只。Sham 组仅暴露神经,不进行结扎处理。SNI 组和 SNIL 组制备慢性神经病理性痛模型。乳酸通过生理盐水稀释至终浓度 100 mg/ml。SNIL 组于手术当天至术后第 20 天每天腹腔注射乳酸 0.25 ml^[10]。Sham 组和 SNI 组在相同时点给予等体积生理盐水。

MWT 测量 于手术当天和术后第 21 天将小鼠置于透明圆柱形玻璃箱内,足底为金属网。小鼠适应至少 1 h 基本达到安静状态后进行测量。取 1.65~4.17[#](0.008~1.4 g)的 von Frey 纤维共 9 根。从 1.65[#]开始,垂直刺其左后肢足底中间皮肤。每次刺激小鼠的相同位置,若出现抬足、舔足、甩足等反应,记为阳性,下一次使用小一级力度的纤维丝测试。反之,记为阴性,下一次使用大一级的纤维丝,直到出现阳性反应。出现第一次阳性反应后再测试 4 次从而计算得到小鼠的机械缩足阈值^[11]。

旷场实验 于术后第 20 天采用旷场实验检测小鼠运动能力。将小鼠置于无顶、40 cm×40 cm×45 cm 的白色塑料箱中自由探索 10 min,通过软件记录运动距离。实验在安静环境中进行,每次实验结束用酒精棉球擦除小鼠气味,以免影响下一次实验结果。

新物体识别实验 于术后第 20 天通过新物体识别实验检测小鼠的认知功能。将两个完全相同的物体(A、B)放入实验箱内对称的地方,使小鼠背朝两物体放进检测箱内自由探索训练 10 min。2 h 后,将其中一个物体(随机改变一个物体)改为一个颜色、形状均不相同,材质相同的新物体 C,记录时间为 10 min,观察小鼠对新物体和熟悉物体的探索时间。小鼠前爪放在物体上、鼻子闻物体、舔物体等均属于探究物体。计算新物体探索时间百分比 = $N/(N+F) \times 100\%$ (N, 小鼠对新物体的探索时间;F, 小鼠对熟悉物体的探索时间)。

Y 迷宫实验 于术后第 21 天采用 Y 迷宫实验检测小鼠的认知功能。Y 迷宫由三个等长臂组成,分别为 A、B、C。记录小鼠 8 min 内进入每个臂的顺序。连续进入三个分支为轮替,如:ABC、BCA 或 CAB。然后计算轮替率 = $\text{轮替}/(\text{进臂总次数}-2) \times 100\%$ 。

Western blot 法 于术后第 22 天处死小鼠,裂解小鼠海马蛋白后,将 20 μg 蛋白加入 12.5% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳。然后将分离出来的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5% 牛血清白蛋白在室温下孵育 2 h,将目标蛋白加入小鼠抗 GAPDH (1:20 000,批号:6000-4-1-1g),兔抗脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) (1:1 000,批号:28205-1-AP),兔抗早期生长反应因子-1 (early growth response factor-1, Egr-1) (1:1 000,批号:ab133695),兔抗细胞骨架活性调节蛋白 (activity regulatory cytoskeletal protein, Arc) (1:1 000,批号:ab183183) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。第二天加入抗小鼠 IgG (1:10 000,批号:BS12478),抗兔 IgG (1:10 000,批号:BS13278) 孵育 2 h。在 ECL 发光液中培养,然后用化学发光法检测蛋白条带,采用 ImageJ 软件分析条带的灰度值。通过目的蛋白的灰度值除以内参的灰度值,以校正误差,计算 BDNF、Egr-1 和 Arc 相对含量。

统计分析 采用 GraphPad Prism 8.3 进行统计分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

MWT 手术当天三组 MWT 差异无统计学意义。与 Sham 组比较,术后第 21 天 SNI 组和 SNIL 组 MWT 明显降低 ($P<0.05$)。术后第 21 天 SNI 组和 SNIL 组 MWT 差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 三组小鼠不同时点 MWT 的比较 ($\text{g}, \bar{x}\pm s$)

组别	只数	手术当天	术后第 21 天
Sham 组	12	0.41 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.12
SNI 组	12	0.42 $\pm$ 0.13	0.15 $\pm$ 0.09 ^a
SNIL 组	12	0.43 $\pm$ 0.13	0.19 $\pm$ 0.09 ^a

注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$

运动距离 三组旷场实验运动距离差异无统计学意义 (图 1)。

新物体探索时间百分比 与 Sham 组比较,SNI 组新物体探索时间百分比明显降低 ($P<0.05$)。与 SNI 组比较,SNIL 组新物体探索时间百分比明显升高 ($P<0.05$)。Sham 组和 SNIL 组新物体探索时间百分比差异无统计学意义 (图 2)。

轮替率 与 Sham 组比较,SNI 组轮替率明显降低 ($P<0.05$)。与 SNI 组比较,SNIL 组轮替率明显

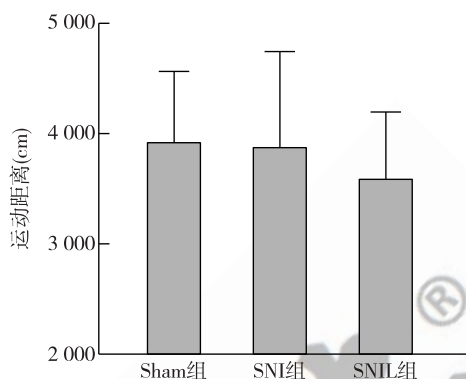
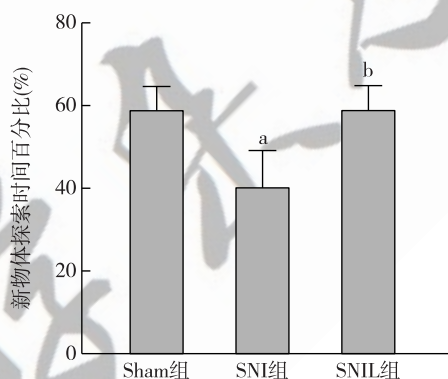


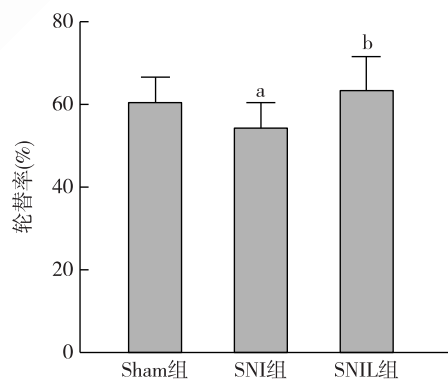
图 1 三组小鼠旷场实验中运动距离的比较



注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 SNI 组比较,^b $P<0.05$

图 2 三组小鼠新物体探索时间百分比的比较

升高 ($P<0.05$)。Sham 组和 SNIL 组轮替率差异无统计学意义 (图 3)。

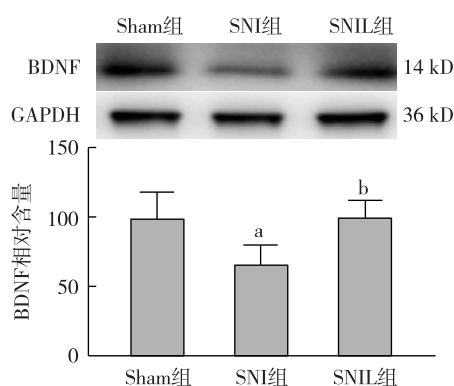


注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 SNI 组比较,^b $P<0.05$

图 3 三组小鼠轮替率的比较

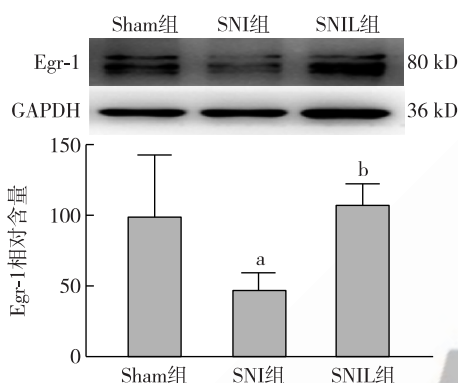
海马组织 BDNF、Egr-1、Arc 相对含量 与 Sham 组比较,SNI 组海马组织 BDNF、Egr-1、Arc 相对含量明显降低 ($P<0.05$)。与 SNI 组比较,SNIL 组海马组织 BDNF、Egr-1、Arc 相对含量明显升高 ($P<0.05$)。Sham 组和 SNIL 组海马组织 BDNF、Egr-1、

Arc 相对含量差异无统计学意义(图 4—6)。



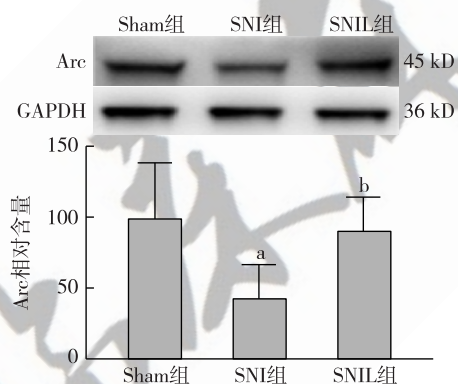
注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 SNI 组比较,^b $P<0.05$

图 4 三组小鼠海马组织 BDNF 相对含量的比较



注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 SNI 组比较,^b $P<0.05$

图 5 三组小鼠海马组织 Egr-1 相对含量的比较



注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 SNI 组比较,^b $P<0.05$

图 6 三组小鼠海马组织 Arc 相对含量的比较

讨 论

神经损伤诱发慢性神经性痛是目前最流行的啮齿动物疼痛模型,制备该模型的常见方法有坐骨神经结扎和 SNI 两种。坐骨神经结扎操作复杂,结扎程度和处理标准难以控制,SNI 相对简洁可控,稳

定性也较高。本实验研究通过测量并比较手术当天和术后第 21 天的 MWT,显示 SNI 可引起小鼠痛觉过敏,从而出现慢性神经病理性痛。

慢性神经病理性痛在给患者带来不适的心理感受的同时,也会给生理造成实质性的组织损伤。本实验研究在保留腓肠神经对运动无明显影响的前提下,通过行为学 Y 迷宫和新物体识别结果显示,SNI 小鼠认知功能与假手术小鼠相比明显下降。临床研究中也发现慢性持续的疼痛可导致认知功能下降,但可用的干预手段有限^[12]。BDNF、Egr-1 和 Arc 在一定程度上可反映大脑突触的可塑性。BDNF 对于维持 LTP 起着关键作用,而 LTP 是维持大脑发挥正常学习和记忆功能的重要条件^[13]。Egr-1 作为维持 LTP 后期形成海马体依赖性长期记忆和重新巩固先前记忆所必需的,对于调节突触可塑性、学习和记忆也发挥着关键作用^[14]。Arc 是突触可塑性不可或缺的组成部分,包括 LTP 和突触稳态的维持^[15]。本实验研究通过对小鼠海马组织三种蛋白的检测,发现慢性神经病理性痛可导致小鼠突触可塑性下降。

乳酸作为临床上反映微循环氧供需的指标,外周微循环高的乳酸水平提示过多的无氧糖酵解,患者预后常常不佳。而在大脑内神经元可以摄取细胞外乳酸作为其能量代谢底物的重要补充,以满足突触活动增强时对大量能量的需求^[16]。乳酸可通过提高突触可塑性的水平来促进学习和记忆以及发挥神经保护作用^[17]。乳酸对于突触可塑性有积极影响^[18-19],本实验研究通过对 SNI 小鼠补充乳酸,其认知功能得到了改善。Western blot 对小鼠海马组织 BDNF、Egr-1 和 Arc 进行检测,也表明乳酸的干预让突触可塑性得到了恢复。

本实验研究还有一些不足之处。首先,为了更好地验证实验动物出现慢性神经病理性痛,需要同时测量机械痛和热痛阈值,本实验研究仅测量机械痛阈值,缺少热痛阈值的测试。其次,本实验研究通过外周给予乳酸进行干预,应该补充分析海马组织内乳酸含量的差异。最后,BDNF、Egr-1 和 Arc 表达虽然可以反映突触可塑性的改变,但缺乏特异性,未来需要进一步补充电生理结果。

综上所述,通过 SNI 诱导小鼠慢性神经病理性痛导致的认知功能下降与大脑神经元突触可塑性下降有关。乳酸可以通过增加慢性神经病理性痛小鼠海马突触可塑性相关蛋白的表达,减轻认知功能损伤。

参 考 文 献

- [1] 鲁义, 姚嘉茵, 龚楚链, 等. 老年髋关节置换术患者术后慢性疼痛的相关因素及其预测. 临床麻醉学杂志, 2019, 35(12): 1197-1200.
- [2] Zhang GF, Zhou ZQ, Guo J, et al. Histone deacetylase 3 in hippocampus contributes to memory impairment after chronic constriction injury of sciatic nerve in mice. *Pain*, 2021, 162(2): 382-395.
- [3] Foley HE, Knight JC, Ploughman M, et al. Association of chronic pain with comorbidities and health care utilization; a retrospective cohort study using health administrative data. *Pain*, 2021, 162(11): 2737-2749.
- [4] Doorley JD, Mace RA, Popok PJ, et al. Feasibility randomized controlled trial of a mind-body activity program for older adults with chronic pain and cognitive decline; the virtual “active brains” study. *Gerontologist*, 2022, 62(7): 1082-1094.
- [5] Mutso AA, Radzicki D, Baliki MN, et al. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J Neurosci*, 2012, 32(17): 5747-5756.
- [6] Lipstein N, Chang S, Lin KH, et al. Munc13-1 is a Ca^{2+} -phospholipid-dependent vesicle priming hub that shapes synaptic short-term plasticity and enables sustained neurotransmission. *Neuron*, 2021, 109(24): 3980-4000.
- [7] Karagiannis A, Gallopin T, Lacroix A, et al. Lactate is an energy substrate for rodent cortical neurons and enhances their firing activity. *Elife*, 2021, 10: e71424.
- [8] Yamagata K. Lactate supply from astrocytes to neurons and its role in ischemic stroke-induced neurodegeneration. *Neuroscience*, 2022, 481: 219-231.
- [9] Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*, 2011, 144(5): 810-823.
- [10] Carrard A, Elsayed M, Margineanu M, et al. Peripheral administration of lactate produces antidepressant-like effects. *Mol Psychiatry*, 2018, 23(2): 392-399.
- [11] 蔡雪纯, 杨航, 陈彦兆, 等. $\alpha 5$ 亚基 γ -氨基丁酸 A 受体在坐骨神经损伤大鼠认知功能中的作用. 临床麻醉学杂志, 2022, 38(11): 1194-1199.
- [12] Batallé G, Bai X, Pouso-Vázquez E, et al. The recovery of cognitive and affective deficiencies linked with chronic osteoarthritis pain and implicated pathways by slow-releasing hydrogen sulfide treatment. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(10): 1632.
- [13] Sanna F, Serra MP, Boi M, et al. Neuroplastic changes in c-Fos, Δ FosB, BDNF, trkB, and Arc expression in the hippocampus of male Roman rats; differential effects of sexual activity. *Hippocampus*, 2022, 32(7): 529-551.
- [14] Zhang JF, Tao LY, Yang MW, et al. CD74 promotes perineural invasion of cancer cells and mediates neuroplasticity via the AKT/EGR-1/GDNF axis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Lett*, 2021, 508: 47-58.
- [15] Sarkar T, Patro N, Patro IK. Perinatal exposure to synergistic multiple stressors leads to cellular and behavioral deficits mimicking Schizophrenia-like pathology. *Biol Open*, 2022, 11(3).
- [16] Xue X, Liu B, Hu J, et al. The potential mechanisms of lactate in mediating exercise-enhanced cognitive function; a dual role as an energy supply substrate and a signaling molecule. *Nutr Metab (Lond)*, 2022, 19(1): 52.
- [17] El Hayek L, Khalifeh M, Zibara V, et al. Lactate mediates the effects of exercise on learning and memory through SIRT1-dependent activation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *J Neurosci*, 2019, 39(13): 2369-2382.
- [18] Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci*, 2018, 19(4): 235-249.
- [19] Lu L, Wang H, Liu X, et al. Pyruvate kinase isoform M2 impairs cognition in systemic lupus erythematosus by promoting microglial synaptic pruning via the β -catenin signaling pathway. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 229.

(收稿日期: 2022-12-25)