

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2016.09.003

• 论 著 •

新生大鼠手术切口对脊髓背角 BDNF 含量的影响 *

丁 绪¹ 李 松² 蔡 捷² 邵 隽^{3△} 邢国刚^{2△}

(¹首都医科大学附属北京儿童医院, 北京市儿科研究所营养研究室, 北京 100045; ²北京大学神经科学研究所, 教育部和卫生部神经科学重点实验室, 北京 100191; ³首都医科大学附属北京儿童医院耳鼻喉头颈外科, 儿童耳鼻喉头颈外科疾病北京市重点实验室, 北京 100045)

摘 要 目的: 探讨新生大鼠手术切口对脊髓小胶质细胞、BDNF 含量的影响。**方法:** 健康新生 SD 大鼠 128 只, 采用随机数字表法分为假手术组 (Sham 组) 和后足切口组 (Incision 组)。后足切口术前、术后分别进行脊髓小胶质细胞标记物钙离子结合蛋白 1 的免疫荧光染色; 酶联免疫吸附测定法检测 BDNF 含量; 测定两组痛阈。术前预先给予小胶质细胞抑制剂米诺环素, 检测 BDNF 含量。**结果:** Incision 组大鼠术后 1、3 d 钙离子结合蛋白 1 阳性染色增加。术后 1 d、3 d、7 d、14 d 脊髓背角 BDNF 含量上调, 3 d 到达顶峰, 之后逐渐降至 Sham 组水平。术前预先给予米诺环素可缓解手术切口造成的 BDNF 上调。术后 6 w、10 w 热痛阈升高。**结论:** 新生大鼠手术切口导致脊髓小胶质细胞激活增多, BDNF 含量呈时间依赖性增加。

关键词 脑源性神经营养因子; 脊髓背角; 新生大鼠; 术后切口痛

EFFECTS OF NEONATAL HIND PAW INCISION ON THE EXPRESSION OF BDNF IN THE SPINAL DORSAL HORN*

DING Xu¹, LI Song², CAI Jie², TAI Jun^{3△}, XING Guo-Gang^{2△}

(¹Nutrition Research Unit, Beijing Pediatric Research Institute, Beijing Children`s Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, ²Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University, Key Laboratory for Neuroscience of the Ministry of Education and the Ministry of Public Health, Beijing 100191; ³Beijing Key Laboratory for Pediatric Diseases of Otolaryngology, Head and Neck Surgery; Beijing Institute of Pediatrics; Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China)

Abstract Objective: To explore the effects of neonatal rat hind paw incision on the activation of spinal microglia and the change of BDNF expression. **Methods:** One hundred and twenty-eight neonatal sprague-Dawley rats were randomly divided into incision-operated and sham group. The alterations of microglia activation and BDNF expression in the spinal cord after operation were detected by immunofluorescence staining and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at 0d (before operation), 1 d, 3 d, 7 d, 14 d, 21 d, 6 w, and 10 w after operation. Changes in the pain threshold after neonatal hind paw incision were tested at 14 d, 6 w and 10 w. We also detected the BDNF content of the hind paw incision rats pretreated with microglia inhibitor minocycline. **Results:** Compared with sham rats, the ipsilateral ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) - positive staining was significantly up-regulated on day 1 and day 3 after the hind paw incision. Moreover, the BDNF content in the spinal dorsal horn was also significantly increased in a

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81500942, 81371237, 61527815); 国家重点基础研究发展计划 (“973”) 项目 (2013CB531905); 北京市优秀人才培养资助项目 (2015000021469G204); 首都医科大学基础 - 临床科研合作项目 (15JL70)。

△ 通讯作者 邢国刚 ggxing@bjmu.edu.cn; 邵隽 taijun@sina.com.

time-dependent manner from day 1 to day 14, peaked on day 3 after neonatal hind paw incision. Pretreatment with minocycline prior to hind paw incision significantly alleviated incision induced up-regulation of the BDNF content. In addition, a prominent increase in the paw withdrawal threshold was also found at 6 w and 10 w after the hind paw incision. **Conclusion:** These data suggest that neonatal hind paw incision elicits the activation of microglia and up-regulates the expression of BDNF in the spinal dorsal horn.

Key words Brain-derived neurotrophic factor; Spinal dorsal horn; Neonatal rat; Post-operation incisional pain

大量临床研究及动物实验均发现,生命早期的切口痛和手术损伤可以导致疼痛系统明显改变,如新生儿期进行过手术的患儿在学龄期痛阈异常,且学龄期再次手术的镇痛及麻醉需求增加。住院新生儿每天需要进行多次侵入型治疗,普遍存在新生儿期损伤和疼痛^[1-3]。儿童疼痛相关医疗费用已经超过儿童哮喘和儿童肥胖,并呈逐年上升趋势^[4]。因此,新生儿期手术切口对疼痛系统的影响及其机制亟待研究。

脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 属于神经营养因子家族。在脊髓, BDNF 主要分布于背角浅层,由背根神经节小中神经元的中枢端、脊髓的小胶质细胞合成并分泌^[5]。在成熟的神经系统中,脊髓 BDNF 在中枢敏化的起始阶段将信息从胶质细胞传递到神经元,激活下游信号通路,参与多种慢性痛^[6-8]。在发育过程中, BDNF 参与生命早期经验对生命后期痛觉的影响^[9]。新生大鼠手术切口增加成年期再次切口导致的脊髓小胶质细胞激活^[2],提示小胶质细胞是新生儿组织损伤造成成年伤害性环路的局部“印记”。但新生大鼠单次手术切口后,脊髓小胶质细胞的激活及对 BDNF 的影响均还有待研究。本研究应用免疫荧光染色实验、酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 和痛行为学检测,研究新生儿期后足切口大鼠脊髓小胶质细胞激活和 BDNF 含量的变化,有助于更好的理解术后切口痛,提供潜在的治疗靶点。

方 法

1. 实验动物及分组

SPF 级健康新生 SD 大鼠 128 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供孕鼠。新生 SD 大鼠采用随机数字表法分为假手术组 (Sham 组) 和手术切口组 (Incision 组),每组分为 8 个时间点,即手术切口前 0 d、手术切口后 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d、6 w、10 w; 每组、每个时间点有大鼠 8 只。术后 21 d、6 w、10 w 大鼠分别相当于断乳期、青少年期、成年期。Sham 组和 Incision 组分别在大鼠

生后三天 (postnatal day 3, P3) 进行假手术操作或手术切口,并按照实验设计饲养至不同时间点,进行行为学检测后取材。

2. 术后切口痛模型的制备

新生大鼠 (P3) 行 2% ~ 3% 异氟烷麻醉,在左侧后足足底进行切口,切开皮肤和筋膜,跖肌肌肉抬起也进行相同长度的切口,切口的长度为从足跟中点到第一个足垫边缘处,用 6-0 的缝合线缝合皮肤^[2]。假手术操作是指对 P3 大鼠进行同样的抓取、母子分离、麻醉,但不进行切口,此组是为了排除新生儿期母子分离的母爱剥夺对大鼠痛感觉的影响^[2]。

3. 蛛网膜下腔插管及给药方法

置麻醉大鼠于腹卧位,以髂棘连线为中线,切开沿背部正中皮肤,平髂棘进针,沿棘突正中间垂直插入自制的导针。进入蛛网膜下腔有明确的突破感,可见尾巴甩动。然后使导针头端向头端倾斜,用无菌的 PE-10 管自导针插入,深入到腰膨大。将 PE-10 管外端自皮下由颈部中间引出,多点固定。用 50 μ l 的微量进样器针头直接插入 PE-10 管内给药^[10]。术后切口痛造模前 30 min 预先给予小胶质细胞抑制剂米诺环素 (minocycline, 每次 10 μ l, 0.35 mg/kg 体重,美国 Sigma 公司) 或生理盐水 (normal saline), 术后 10 h 给予米诺环素或生理盐水一次,术后连续 5 天每天给药 2 次^[2]。

4. 痛行为学指标测定

(1) von Frey 纤维诱发痛的 50% 缩足阈值 (paw withdrawal threshold, PWT) 测定

将大鼠放在底部是金属网的有机玻璃套筒 (尺寸为 18 cm \times 6 cm \times 6 cm) 内,适应环境 15 min,用一系列标准化的 von Frey 纤维刺激大鼠后肢足底中部,直至弯曲稍成 S 形,持续 6 ~ 8 s,观察是否出现缩足反应。大鼠在刺激时间内或在移开 von Frey 纤维时立即出现快速的缩足反应,记为阳性反应。所用 von Frey 纤维共有 8 根,其力度分别是 0.41、0.70、1.20、2.00、3.63、5.50、8.50 和 15.10 g。测定首先从中等力度的 von Frey 纤维 (2.0 g) 开始,采用 Chaplan 等 (1994) 报道^[11]的“up and down”的方法进行,即当某一力度的 von Frey 纤维刺激不能

引起阳性反应时, 则给予相邻较大力度的刺激, 如出现阳性反应, 则给予相邻较小力度的刺激, 如此连续进行, 直至出现第一次阳性和阴性(或阴性和阳性)反应的骑跨, 再向下连续测定4次。不同刺激之间相隔数秒, 以消除上一次反应的影响。50% PWT 采用文献报道公式进行计算。

(2) 辐射热诱发痛的抬足潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL) 测定

将有机玻璃套筒置于玻璃板上, 将大鼠放入, 适应环境 15 min, 室温稳定在 22 ~ 24℃。用热辐射刺激仪(美国 Iitcine life science 公司)照射大鼠左足足垫正下方, 记录照射开始至大鼠出现抬足的时间。截止时间为 25 s, 以防组织损伤。整个实验中, 热刺激强度保持相同。每只大鼠重复三次, 每次间隔至少 5 min, 取三次的平均值为 PWL。

5. 免疫荧光染色

动物以 10% 水合氯醛 (4.0 ml/kg 体重, i. p.) 麻醉后, 先用 37℃ 生理盐水冲净血液, 再换用 4℃ 4% 多聚甲醛固定液灌注后取出脊髓, 后固定 6 h。随后用 4℃ 30% 蔗糖浸泡过夜。取腰膨大处, 标本 OCT 包埋后进行冰冻切片, 切片厚度为 30 μm。用 10% 兔血清室温封闭 1 h 后, 加山羊抗大鼠钙离子结合蛋白 1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1) 多克隆抗体 (1:400, 美国 Abcam 公司), 4℃ 孵育过夜; 加一抗稀释液作为空白对照; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 加二抗 (1:500), 室温孵育 1 h; PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 最后用荧光封片剂封片。由 Qcapture 软件获得数据, Image Pro Plus 6.0 分析软件统计积分光密度值 (integrated optical density, IOD)。

6. 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

在不同时间点将大鼠麻醉处死后, 急性取材脊髓背角, 保存于 -80℃ 冰箱。实验时, 将脊髓背角放入玻璃匀浆器中, 每管加入 200 μl 组织匀浆液 [50% Tris-HCl, 40 NaF, 2 EDTA, 250 NaCl, 1 PMSF, 0.5% NP-40, 10 μg/ml Leupeptin, (单位: mmol/L)], 进行组织匀浆, 冰上裂解 1 h; 4℃ 10 000 g 离心 15 min 取上清, 用 BCA (bicinchoninic acid) 蛋白质测定试剂盒 (美国 Pierce 公司) 进行蛋白定量, 用 Model 680 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司) 读板, 测量波长为 570 nm; 以标准品浓度为横坐标、校正吸光度为纵坐标作标准曲线, 计算样品的总蛋白含量。按 ELISA 试剂盒 (美国 Promega 公司) 说明书包被 96 孔板并配制标准品和检测工作液; 分别将标本和不同浓度标准品加入相应的孔中 (100 μl/孔), 用

封口膜密封板子, 震荡混匀, 室温孵育 2 h, TBST 洗 5 次; 加入生物素化的抗体 (100 μl/孔), 室温孵育 2 h, TBST 洗 5 次; 加入标记辣根过氧化物酶的链酶卵白素 (100 μl/孔), 室温孵育 1 h, TBST 洗 5 次; 每孔加入底物 TMB, 每孔加入 100 μl HCl。尽快用酶标仪 450 nm 处测 OD 值。以标准品浓度为横坐标、校正吸光度为纵坐标作标准曲线, 计算样品中所含 BDNF 含量^[8]。

7. 数据处理和统计学检验

采用 GraphPad Prism 5.0 版软件进行数据的统计分析和处理。实验结果用均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。两组间比较用非配对 *t* 检验 (unpaired *t*-test)。两因素多组间比较用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 并继之以 Bonferroni post-hoc 检验。以 *P* < 0.05 作为统计学差异的界限。

结 果

1. 新生儿期手术切口大鼠脊髓背角小胶质细胞激活的变化

大鼠新生儿期手术切口明显上调脊髓小胶质细胞标记物 Iba1 的阳性染色。手术切口前 (0 d), Sham 组与 Incision 组 Iba1 的 IOD 值没有统计学差异。术后 1 d, 与 Sham 组相比, Incision 组切口同侧脊髓 Iba1 的 IOD 值迅速增加 (*P* < 0.001), 术后 3 d 持续增加但增加幅度有所下降 (*P* < 0.05), 术后 7 d 恢复至 Sham 组水平 (*n* = 3, two-way ANOVA 检验, 见图 1)。

2. 新生儿期手术切口大鼠脊髓背角 BDNF 蛋白含量的变化

大鼠新生儿期手术切口明显上调脊髓背角 BDNF 的蛋白表达量。手术切口后 1 d, Incision 组脊髓背角 BDNF 含量开始上升, 由手术前的 (209.05 ± 24.41) pg/mg 总蛋白上升至 (252.28 ± 23.58) pg/mg 总蛋白 (*P* < 0.01), 并于切口后 3 d 达到顶峰 (277.79 ± 21.28) pg/mg 总蛋白, BDNF 的上升持续至术后 14 d (*P* < 0.01 或 0.001), 在 21 d (断乳期) 恢复到与 Sham 组相似水平, 在术后 6 w (青少年期)、10 w (成年期) 均维持与 Sham 组相似含量 (two-way ANOVA)。Sham 组大鼠在术后 7 d (生后 10 d) 前, 脊髓背角 BDNF 含量较高, 之后逐渐降低, 在术后 14 d 降低至 (124.50 ± 25.41) pg/mg 总蛋白, 直至术后 6 w、10 w, BDNF 含量保持稳定 (见图 2A)。

大鼠新生儿期手术切口前预先给予小胶质细胞抑制剂米诺环素 (minocycline), 并于术后 5 天持续

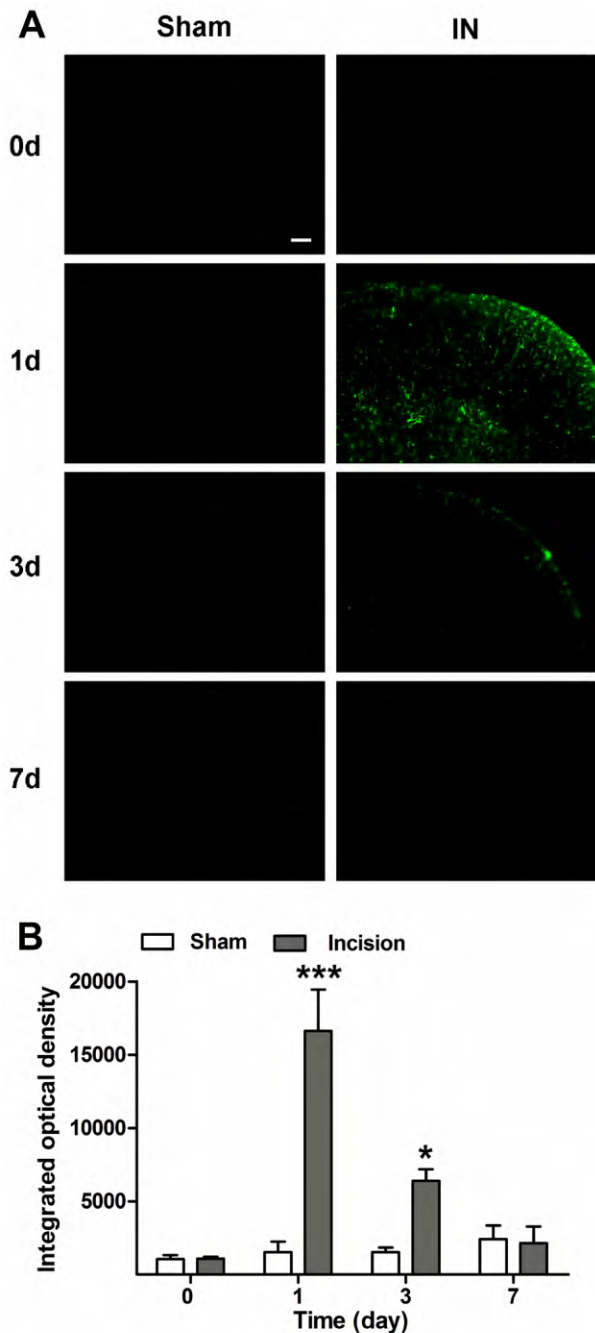


图1 新生大鼠手术切口对脊髓小胶质细胞标记物 Iba1 的影响 (免疫荧光染色测定)

A: 新生大鼠手术切口可以增加同侧脊髓背角小胶质细胞的激活 Scale bar = 100 μm

B: 积分光密度值的统计结果 * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 Sham 组比较, two-way ANOVA 继之以 Bonferroni 检验, $n = 3$

Fig 1 Alterations of the microglia marker Iba1 in the spinal cord after neonatal hind paw incision measured by immunofluorescence staining

A: Up-regulation of activated microglia in ipsilateral spinal dorsal horn occurred on day 1 and day 3 after neonatal hind paw incision. Scale bar = 100 μm.

B: Statistical analysis of integrated optical density. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with sham rats, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, $n = 3$.

给予米诺环素, 明显缓解后足切口造成的脊髓背角 BDNF 含量的增高。切口前给予米诺环素组在切口后 1 d、3 d、7 d BDNF 含量明显低于切口前给予生理盐水的对照组 (saline 组) ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 见图 2B), 与图 2A 中 Sham 组水平相近。手术切口后 14 d, 米诺环素组的 BDNF 含量与对照组无明显差异 (two-way ANOVA, 见图 2B)。

3. 新生儿期手术切口大鼠痛行为的变化

我们在术后 14 d、6 w、10 w, 分别检测了大鼠的机械痛和热痛行为。von Frey 纤维结果显示, 在 14 d、6 w、10 w, Incision 组和 Sham 组两组大鼠的 50% PWT 没有差异。辐射热结果显示, 在手术切口后 14 d, Incision 组和 Sham 组 PWL 无差异 ($P > 0.05$, 非配对 t 检验), 但在手术切口后 6 w, 与 Sham 组大鼠 (18.476 ± 1.01 g) 相比, Incision 组的 PWL 明显增加 (21.05 ± 1.13 g) ($P < 0.01$), 在手术切口后 10 w, Incision 组也有升高 ($P < 0.01$, 非配对 t 检验, 见图 2C、2D)。为了排除新生儿期大鼠后足切口对运动功能的影响, 我们进行了斜板实验, 发现 Incision 组和 Sham 组大鼠的最大倾斜角度没有差异, 说明后足切口对大鼠的运动功能没有明显影响。

讨论

术后切口痛广泛存在, 10% ~ 50% 的患者在常见手术后产生术后痛, 2% ~ 10% 为严重程度疼痛。术后切口痛主要是手术损伤外周神经纤维造成的神经病理痛及持续性炎症^[12], 大鼠后足手术切口是一种被证实和临床相关的常用术后切口痛模型, 损伤皮肤和肌肉, 导致外周神经末梢损伤和局部炎症反应^[2]。在成熟的神经系统中, 脊髓背角 BDNF 参与神经病理痛等多种慢性痛^[6], 并且在术后切口痛的产生和维持中发挥重要作用。在发育过程中, 新生儿期母爱剥夺的动物成年期存在痛觉异常, 同时杏仁核、延脑头端腹内侧的 BDNF 表达改变^[9]。在新生儿期手术切口、成年期再次手术切口大鼠, 脊髓小胶质细胞的激活增强, 而小胶质细胞可以合成、释放 BDNF^[2]。但新生大鼠单次手术切口损伤后, 脊髓背角小胶质细胞的激活及 BDNF 的改变均还不清楚。

本研究通过免疫荧光染色, 发现新生大鼠手术切口后 1 d、3 d 同侧脊髓背角的小胶质细胞被快速激活, 术后 7 d 恢复至 Sham 组水平。形成免疫印记的小胶质细胞在形态或功能上是否存在持续性改变, 该问题一直存在争议。有文献表明, 小胶质细

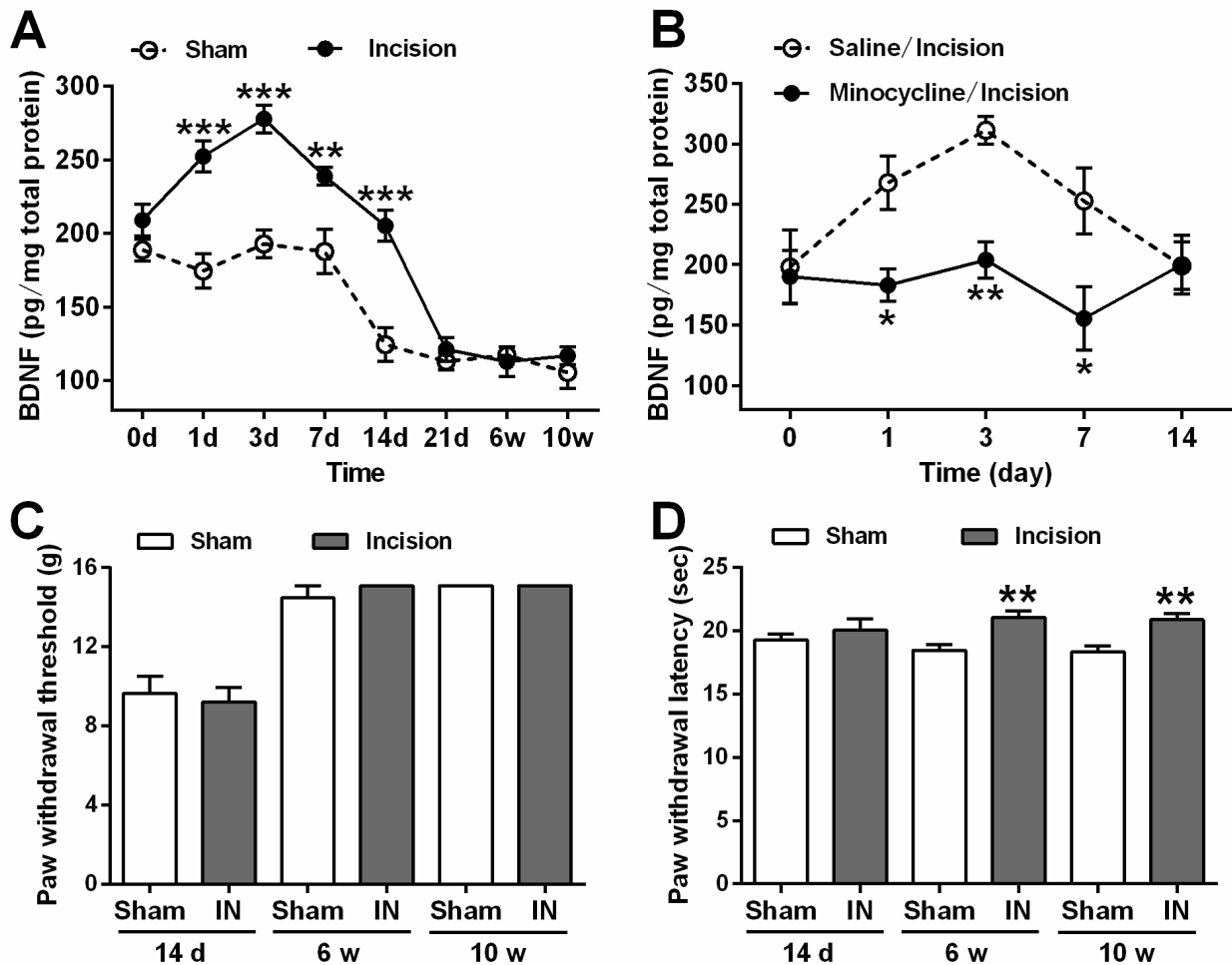


图2 新生大鼠手术切口对脊髓背角 BDNF 含量及痛阈的影响

A: 新生大鼠手术切口导致脊髓背角 BDNF 含量的上调 (ELISA 定量测定)。新生大鼠手术切口可以呈时间依赖性的上调脊髓背角 BDNF 的表达。与 Sham 组相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, two-way ANOVA 继之以 Bonferroni 检验, $n = 5$ 。
 B: 新生大鼠后足切口前鞘内给予米诺环素明显缓解了手术切口导致的 BDNF 含量上调。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 与 Sham 组比较, two-way ANOVA 继之以 Bonferroni 检验, $n = 5$ 。
 C: 新生大鼠手术切口后 14 d、6 w、10 w 的机械痛阈值。 $P > 0.05$, 与 Sham 组比较, 非配对 t 检验, $n = 5$ 。
 D: 新生大鼠手术切口后 14 d、6 w、10 w 的热痛阈值。 $**P < 0.01$, 与同一时间点的 Sham 组比较, 非配对 t 检验, $n = 5$ 。

Fig 2 Alterations of the BDNF content in the spinal dorsal horn and the pain threshold after neonatal hind paw incision in rats

A: Up-regulation of the BDNF content in the spinal dorsal horn occurred in a time-dependent manner after neonatal hind paw incision. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, as compared with sham rats, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, $n = 5$.
 B: Pretreatment with microglial inhibitor minocycline (0.35 mg/kg) prior to hind paw incision significantly alleviated incision induced up-regulation of the BDNF content, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, as compared with sham rats, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, $n = 5$.
 C: Mechanical threshold after neonatal hind paw incision. $P > 0.05$, compared with sham rats in the same time point, unpaired t test, $n = 5$.
 D: Thermal withdrawal latency after neonatal hindpaw incision. $**P < 0.01$, compared with sham rats, unpaired t test, $n = 5$.

胞可能存在持续性改变。鞘内给予内毒素急性激活脊髓小胶质细胞 24 h、14 d 后检测, 脊髓小胶质细胞仍处于激活状态^[13,14], 且小胶质细胞是一种能存储免疫记忆的长寿细胞。但有文献报道, 新生大鼠后足切口后 8 w, 小胶质细胞处于未激活状态^[2]。我们的结果显示, 大鼠脊髓背角小胶质细胞在新生大鼠切口后快速激活, 但术后 7 d 很快恢复。有文献认为, 新生儿组织损伤造成成年伤害性环路的局部印记, 这一印记在基础情况下被增强的下行抑制

通路所掩盖, 不表现出来, 但在再次损伤时发挥主要作用^[3], 该学说支持本研究的结果。

根据文献, 新生小鼠可以表达静止及激活的小胶质细胞。新生 0 天的啮齿类动物脑中有 Iba1 染色阳性的变形虫状小胶质细胞^[15]。鸡胚胎脊髓中具有 CD45⁺ 的小胶质细胞^[16]。用新生小鼠 (生后 1~3 天) 脊髓可以培养出小胶质细胞。但本文中应用的小胶质细胞标记物 Iba1 主要表达于激活的小胶质细胞, 是一种可与骨架蛋白连接的 Ca²⁺ 结合蛋白, 参

与激活的小胶质细胞的变形和吞噬^[15]，我们的免疫荧光染色结果中，Sham组Iba1阳性染色较弱，提示Sham组的小胶质细胞大多处于静止状态。

我们的ELISA结果显示，新生儿期后足切口大鼠脊髓背角BDNF含量呈时间依赖性增加，而后足切口前预先给予米诺环素可以明显缓解切口导致的BDNF含量上调，说明新生大鼠手术切口可能通过激活背角小胶质细胞而上调BDNF的含量。脊髓背角BDNF含量上调的最高峰在切口后3d，BDNF含量上调持续至14d，在21d、6w、10w均恢复至与Sham组类似水平，说明新生大鼠手术切口导致BDNF含量的增高迅速，与小胶质细胞染色结果一致。脊髓背角小胶质细胞激活的高峰（术后1d）早于BDNF含量增高的高峰（术后3d），且持续的时间更短，提示有可能早期小胶质细胞激活后释放的BDNF，进一步激活了星形胶质细胞、感觉神经元等其他细胞，感觉神经元释放了更多的BDNF^[5]。另外，我们的研究还发现，与Sham组0至7d（生后10天）相比，Sham组术后14d（生后17天）脊髓背角BDNF含量明显下降，提示发育过程中BDNF含量的下调，与文献报道相一致^[17]。

目前，新生儿期手术切口对成年后痛阈的影响存在争议。有些研究表明，新生儿期损伤导致生命后期的痛阈降低，例如：婴儿期（6~24个月）中等程度烧伤会导致学龄儿童（9~16岁）机械痛阈降低^[1]。但有些研究表明，新生儿期损伤导致生命后期的痛阈升高，例如：需要儿外科手术的极低体重早产儿在11岁的时候进行定量感觉测试，发现有较明显的热痛觉减退^[18]。在新生儿重症室进行过至少3天治疗导致学龄儿童（9~14岁）的热痛阈升高^[19]。还有些文献认为，痛阈的升高或降低与手术切口、检测部位是否相同有关。我们的结果显示，新生儿期手术切口导致青少年期、成年期的热痛痛阈增加，但不影响术后14d的热痛痛阈。这与最新研究相一致，新生儿期损伤激活了下行抑制通路，二者相互抵抗，在术后14d没有显示出痛阈的改变，但切口部位的损伤逐渐恢复，发育异常的过强的下行抑制通路导致成年后出现痛阈增加^[3]。新生大鼠手术切口热痛阈增加远远晚于脊髓背角小胶质细胞激活及BDNF含量升高，也可能是由于在生长发育的过程中，下行抑制通路的作用才逐渐显现出来。且小胶质细胞释放的BDNF可能激活其他细胞上的分子信号通路，如神经元上NMDA受体等^[6]，导致痛阈异常出现的延迟。此外，我们的研究还发现，Incision组和Sham组的50%PWT在术后14d、

6w、10w均无差异，与临床报道的热痛阈上调较机械痛阈变化明显相一致^[19]，但也有可能与我们使用的“up and down”检测方法有关，该方法的最大值为15.1，有可能掩盖了机械痛阈的上调。在我们的研究中，与2w相比，Sham组大鼠6w、10w的机械痛阈明显升高，与文献报道相一致，可能与疼痛感觉系统的发育有关^[3]。

综上，新生儿期后足切口大鼠脊髓背角小胶质细胞激活增加，BDNF含量呈时间依赖性上调，这些变化可能参与新生儿期手术切口对后期痛阈的影响，提示BDNF有可能成为缓解新生儿期手术切口损伤的重要靶点。

参考文献

- [1] Wollgarten-Hadamek I, Hohmeister J, Demirakca S, *et al.* Do Burn Injuries During Infancy Affect Pain and Sensory Sensitivity in Later Childhood? *Pain*, 2009, 141(1~2): 165 ~ 172.
- [2] Beggs S, Currie G, Salter MW, *et al.* Priming of Adult Pain Responses by Neonatal Pain Experience: Maintenance by Central Neuroimmune Activity. *Brain*, 2012, 135(2): 404 ~ 417.
- [3] Walker SM, Fitzgerald M, Hathway GJ. Surgical Injury in the Neonatal Rat Alters the Adult Pattern of Descending Modulation From the Rostroventral Medulla. *Anesthesiology*, 2015, 122(6): 1391 ~ 1400.
- [4] Groenewald CB, Wright DR, Palermo TM. Health Care Expenditures Associated With Pediatric Pain-Related Conditions in the United States. *Pain*, 2015, 156(5): 951 ~ 957.
- [5] Calabrese F, Rossetti AC, Racagni G, *et al.* Brain-Derived Neurotrophic Factor: a Bridge Between Inflammation and Neuroplasticity. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 430.
- [6] Ding X, Cai J, Li S, *et al.* BDNF Contributes to the Development of Neuropathic Pain by Induction of Spinal Long-Term Potentiation Via SHP2 Associated GluN2B-Containing NMDA Receptors Activation in Rats With Spinal Nerve Ligation. *Neurobiol Dis*, 2015, 73: 428 ~ 451.
- [7] Zhao J, Seereeram A, Nassar MA, *et al.* Nociceptor-Derived Brain-Derived Neurotrophic Factor Regulates Acute and Inflammatory but Not Neuropathic Pain. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 31(3): 539 ~ 548.
- [8] 廖斐斐, 耿山景, 刘小旦, 等. 脊神经结扎诱导神经病理痛大鼠脊髓背角BDNF的含量和表达上调. *中国疼痛医学杂志*, 2009, 15 (3):162~165.
- [9] Chung EK, Bian ZX, Xu HX, *et al.* Neonatal Maternal

- Separation Increases Brain-Derived Neurotrophic Factor and Tyrosine Kinase Receptor B Expression in the Descending Pain Modulatory System. *Neurosignals*, 2009, 17(3): 213 ~ 221.
- [10] 杨静静, 刘小旦, 方东, 等. 电压门控型钠离子通道 Nav1.8 在骨癌大鼠 DRG 神经元细胞膜上的表达上调. *中国疼痛医学杂志*, 2013, 19(12): 734 ~ 738.
- [11] 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.
- [12] Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent Postsurgical Pain: Risk Factors and Prevention. *Lancet*, 2006, 367(9522): 1618 ~ 1625.
- [13] Hains LE, Loram L, Weiseler JL, *et al.* Pain Intensity and Duration Can Be Enhanced by Prior Challenge: Initial Evidence Suggestive of a Role of Microglial Priming. *J Pain*, 2010, 11(10): 1004 ~ 1014.
- [14] Clark AK, Staniland AA, Marchand F, *et al.* P2X7-Dependent Release of Interleukin-1 β and Nociception in the Spinal Cord Following Lipopolysaccharide. *J Neurosci*, 2010, 30(2): 573 ~ 582.
- [15] Imai Y, Kohsaka S. Intracellular Signaling in M-CSF Induced Microglia Activation: Role of Iba1. *Glia*, 2002, 40(2): 164 ~ 174.
- [16] Caldero J, Brunet N, Ciutat D, *et al.* Development of Microglia in the Chick Embryo Spinal Cord: Implications in the Regulation of Motoneuronal Survival and Death. *J Neurosci Res*, 2009, 87(11): 2447 ~ 2466.
- [17] Nakamura M, Tsuji O, Bregman BS, *et al.* Mimicking the Neurotrophic Factor Profile of Embryonic Spinal Cord Controls the Differentiation Potential of Spinal Progenitors into Neuronal Cells. *PLoS One*, 2011, 6(6): e20717.
- [18] Walker SM, Franck LS, Fitzgerald M, *et al.* Long-Term Impact of Neonatal Intensive Care and Surgery on Somatosensory Perception in Children Born Extremely Preterm. *Pain*, 2009, 141(1~2): 79 ~ 87.
- [19] Hermann C, Hohmeister J, Demirakca S, *et al.* Long-Term Alteration of Pain Sensitivity in School-Aged Children With Early Pain Experiences. *Pain*, 2006, 125(3): 278 ~ 285.

• 国际译文 •

雄性和雌性小鼠由不同的免疫细胞介导机械痛敏

过去几十年里, 神经科学家已经构建了慢性疼痛的神经生物学通路。但是, 这些研究结果, 基本都来自于雄性动物。主要原因是, 研究者担心雌性小鼠发情期的变化会影响实验结果, 所以在实验中大多使用雄性动物。这样带来的问题是, 单纯使用雄性动物研究, 可能无法获得完整的生物学信息。如果人类两性也存在差异, 这将会影响疼痛的治疗。

已有大量实验证明, 免疫活性细胞在疼痛病生理过程中起着重要的作用。研究者曾经报导过, Toll 样受体 4 (TLR4) 参与机械痛敏是雄性特异的。产生该性别差异的原因可能是, TLR4 所在的小胶质细胞, 并不参与雌性小鼠的机械痛敏的形成过程。为了回答这个问题, 研究者设计了以下实验: (1) 利用坐骨神经分支选择性损伤模型 (SNI) 建立机械痛敏, 7 天后向鞘内注射胶质细胞抑制剂 (米诺环素、氟代柠檬酸和丙戊茶碱)。三种抑制剂在雄性身上均产生明显的镇痛作用, 而雌性在任何剂量均无该效应。(2) 已有研究表明, P2X4R 是小胶质细胞参与 SNI 机械痛敏的重要受体。鞘内注射其阻断剂 TNP-ATP 逆转雄性小鼠的机械痛敏, 然而雌性小鼠则没有效果。(3) 使用该痛觉信号转导通路上关键分子的抑制剂, 例如 p38 MAPK 抑制剂 SB203580, BDNF 抑制剂 Y1036 和 TrkB-Fc 也可以逆转雄性小鼠的机械痛敏, 对雌性小鼠无效。(4) 在脊髓后角基因表达方面, SNI 后, 与小胶质细胞活化相关的基因 *Itgam*、*Emr1*、*Irf5* 和 *Irf8* 在两性中均同等增加, 无显著差异。只有 *P2rx4* 在雄性中表达上调, 雌性无显著变化。以上结果表明, 小胶质细胞不参与雌性小鼠的机械痛敏, 在雌性小鼠身上存在着一条旁路途径, 其起到与小胶质细胞相似的作用。

研究者接下来要解决的问题是: 雌性小鼠通过那条旁路途径介导机械痛敏? 以往研究表明, T 细胞参与小鼠机械痛敏, 提示雌性可能优先使用“适应性免疫细胞”来产生机械痛敏。研究者在缺乏 T 细胞的裸鼠身上发现, 在缺乏这些适应性免疫细胞时, 雌性使用雄性依赖的小胶质细胞通路产生机械痛敏。进一步研究表明, 在重新获得 T 细胞时, 雌性便会切换到不依赖胶质细胞的通路。因此, 雌性比雄性小鼠外周血中多 2 倍以上的 T 细胞, 可能是导致性别差异的原因。结论: 在雄性小鼠身上, 主要以小胶质细胞通路来介导机械痛敏。在雌性小鼠身上, 主要以 T 细胞介导机械痛敏。

(Sorge RE, *et al.* *Nature Neuroscience*, 2015, 18: 1081~1083. 王铖译 刘风雨校)