文章编号:1000-5404(2009)07-0611-04

论著

# 阿米替林抑制神经性疼痛大鼠脊髓星形胶质细胞的激活

毛庆祥[1,2],杨天德[1] (第三军医大学:[1]新桥医院麻醉科,重庆 400037, [2]大坪医院野战外科研究所麻醉科,重庆 400042)

**摘 要:目的** 观察阿米替林对分支选择结扎模型(spared nerve injury,SNI)大鼠脊髓星形胶质细胞激活程度的影响。**方法** 120只雄性SD大鼠,分为对照组(A)、SNI模型组(B)、单纯给药组(C)、SNI模型+药物干预组(D),经腹腔分别给予0.2 ml生理盐水(A、B)、10 mg/kg阿米替林(C、D),每日2次。术后1、3、5 d取$L_3$~$L_6$脊髓,分别进行星形胶质细胞激活标志物GFAP免疫荧光染色、Western blot和半定量RT-PCR检测,同时观察机械痛阈值改变。**结果** 与A组相比,B组大鼠机械痛阈值随时间下降明显($P<0.05$),GFAP蛋白表达(0.38±0.24,0.84±0.31,1.36±0.43)和mRNA表达(0.55±0.14,0.86±0.16,1.32±0.32)随时间逐渐增强;C组各项指标与A组比较无明显差异;D组大鼠给药后3、5 d机械痛阈值停止下降[(4.5±1.5)、(4.9±1.4)g],GFAP蛋白(0.79±0.25,0.77±0.23)和mRNA(0.63±0.06,0.64±0.17)表达较A组略增高,但不及B组($P<0.05$)。**结论** 阿米替林可能通过抑制星形胶质细胞激活,发挥治疗神经病理性疼痛作用。

**关键词:** 神经性疼痛;星形胶质细胞;抗抑郁药;GFAP
**中图法分类号:** R441.1; R741.02; R971.43 **文献标识码:** A

# Amitriptyline inhibits activation of astrocytes in spinal cord of rat with neuropathic pain

MAO Qing-xiang[1,2], YANG Tian-de[1] ([1]Department of Anesthesiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Anesthesiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To investigate influence of amitriptyline on astrocytic activation in spinal cord of rats after spared nerve injury (SNI). **Methods** A total of 120 male SD rats were randomly divided into 4 groups with 30 rats in each group: control (A), SNI (B), amitriptyline (C), and SNI + amitriptyline (D) groups, which respectively were treated with intraperitoneal injections of 0.2 ml normal saline (A and B), 10 mg/kg amitriptyline (C and D), bid. The $L_3$ to $L_6$ segment of the spinal cord was isolated respectively at 1, 3 and 5 d after surgery. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), marker of astrocytes, was determined by immunofluorescence, Western blot assay and semiquantitative RT-PCR. The changes of mechanical pain threshold were measured. **Results** Compared with control, group B had a markedly decreased rat mechanical pain threshold ($P<0.05$) and an obviously high expression of GFAP at both protein (0.38±0.24, 0.84±0.31 and 1.36±0.43) and mRNA (0.55±0.14, 0.86±0.16, 1.32±0.32) levels at the corresponding time points. However, there was no significant change on these indexes between groups A and C. Mechanical pain threshold of rats in group D did not change any more in 3 and 5 d after surgery (4.5±1.5 and 4.9±1.4 g). In addition, the expression of GFAP at both protein (0.79±0.25, 0.77±0.23) and mRNA (0.63±0.06, 0.64±0.17) levels in group D were higher than those in control but still lower than those of group B ($P<0.05$) in 3 and 5 d after surgery. **Conclusion** Amitriptyline inhibits the activation of astrocytes in SNI animals, which maybe one of its mechanisms in the treatment of neuropathic pain.

**Key words:** neuropathic pain; astrocyte; antidepressant; glial fibrillary acidic protein

抗抑郁药是临床上用于治疗神经性疼痛的常用药物,其镇痛机制包括5-HT能效应、去甲肾上腺素能效应、阿片能效应、阻断NMDA与受体结合和抑制腺苷摄取、阻断$Na^+$、$Ca^{2+}$通道等[1]。近年来研究发现抗抑郁药对胶质细胞活性有一定的影响,而星形胶质细

作者简介:毛庆祥,男,江苏省建湖县人,硕士研究生,医师,主要从事疼痛机制方面的研究。电话:(023)68757077, E-mail: maomaosmmu@126.com
通信作者:杨天德,电话:(023)68755634,E-mail: 31011@sina.com
收稿日期:2008-07-19;修回日期:2008-09-01

胞在神经性疼痛发病和维持过程中有重要作用[2,3]。本研究观察神经性疼痛大鼠给予阿米替林后行为学和脊髓星形胶质细胞活性的改变,为揭示抗抑郁药的镇痛机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组和模型制备

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 120 只,体质量 180 ~ 200 g,由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。SD 大鼠分为 A、B、C、D 4 组,每组 30 只。B、D 组大鼠制作分支选择结扎模型(spared nerve injury, SNI),按 Decosterd 等[4] 的方法将大鼠麻醉后,俯卧位固定于操作台,在右侧大腿后外侧作一纵形切口,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经及其分支,结扎并剪断胫神经和腓总神经,保留腓肠神经,缝合肌肉和皮肤。A、C 组大鼠行假手术,暴露坐骨神经后缝合肌肉和皮肤。肌注青霉素,预防感染。分别给大鼠腹腔注射 0.2 ml 生理盐水(A、B 组)、10 mg/kg 阿米替林(Sigma 公司)(C、D 组),每日 2 次。

### 1.2 机械痛阈值测定

制作 SNI 模型前,测定大鼠右后肢机械痛阈值。将大鼠置于有机玻璃罩内,底为筛状金属板,适应 30 min 后,用 BME-403 VonFrey 纤维针(中国医学科学院生物医学工程研究所)通过金属板筛孔垂直接触大鼠右侧后爪固定部位,并施压使针弯曲,刺激后爪,持续 1.5 s,2 次刺激间隔时间 > 30 s,连续刺激 10 次,若大鼠后肢上抬次数超过 5 次,则认为大鼠对该力度的刺激有缩腿反应[5]。从小至大选用不同力度刺激后爪(VonFrey 纤维针),记录能引起大鼠缩腿反应的纤维针刻度,即为机械痛阈值。

术后 1、3、5 d 处死大鼠前,再次测定右后肢的机械痛阈值,方法同上。

### 1.3 免疫荧光染色

大鼠饲养 1、3、5 d 处死取材(每组 5 只),麻醉后剪开胸腔,暴露心脏,剪开右心耳,0.01 mmol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS)300 ml 和 4% 多聚甲醛 200 ml 左心室灌注。取 $L_3$ ~ $L_6$ 脊髓,4% 多聚甲醛固定 12 h 后,作冰冻冠状切片(厚度 20 μm),每段脊髓取 10 张切片,经 0.3% Triton X-100 打孔,羊血清封闭后,加 GFAP(胶质纤维酸性蛋白)多克隆抗体(Sigma 公司)37 ℃孵育 2 h,然后过夜,再加 FITC 二抗孵育 1 h,每个脊髓标本观察 5 张切片,在激光共聚焦显微镜下观察脊髓切片荧光强度,计算每张切片每平方毫米星形胶质细胞数目,取平均值进行统计分析。

### 1.4 Western blot 检测 GFAP 蛋白

术后 1、3、5 d 分别取大鼠脊髓组织(每组 5 只)进行 Western blot 检测。大鼠处死后,用 0.01 mmol/L PBS 200 ml 灌注,取 $L_3$ ~ $L_6$ 脊髓,加入 RIPA 和 PMSF,冰上研磨,离心,取上清,分光光度计定量,- 20 ℃保存。各取 50 μg 蛋白 SDS-PAGE 方法电泳,再转膜,脱脂奶粉封闭后加入 GFAP 多克隆抗体,37 ℃摇晃 4 h,再用辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗,37 ℃孵育2 h。特异性的反应条带通过 ECL 化学发光系统显色。采用 Quantity One 软件分析结果。

### 1.5 总 RNA 提取和半定量 RT-PCR 检测

术后 1、3、5 d 分别取大鼠脊髓组织(每组 5 只)进行总 RNA 抽提(与 Western blot 检测同时取材)。50 mg 组织加 1 ml TRNzol,冰上研磨,取上清,依次加氯仿、异丙醇、75% 乙醇振荡离心,最后溶于 RNase - free $ddH_2O$。分光光度计(260 nm/280 nm)定量,甲醛变性凝胶电泳测其完整性。按照逆转录试剂盒(日本 TOYOBO 公司)操作步骤,20 μl 反应体系,将 1 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA,-70 ℃保存。以 1 μl cDNA 为模板进行 PCR,扩增反应参数:94 ℃ 30 s、61 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min,30 个循环。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶上电泳,Bio-Rad 凝胶成像系统照相,Quantity One 软件分析。GFAP 的上下游引物分别为:5′-TAATGACTATCGCCGCCAACTG-3′ 和 5′-TTCGCCCTCCA-GCAATTTCC-3′,扩增片段长度 274 bp;β-actin 上下游引物分别为:5′-ACGGTCAGGTCATCACTATCG-3′ 和 5′-AGCACTGTGTTG-GCATAGAGG-3′,扩增片段长度 166 bp。

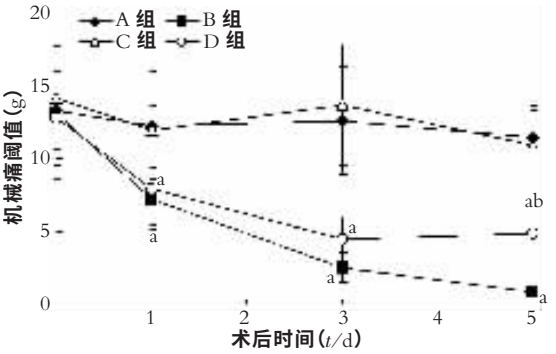
### 1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,进行配对 $t$ 检验和单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠行为学改变

术后,B、D 组大鼠的机械痛阈值逐渐降低。术后第 5 天,D 组大鼠的机械痛阈值较 B 组明显增高,说明阿米替林可以提高神经性疼痛大鼠的机械痛阈值,缓解疼痛。C 组大鼠的机械痛阈值则没有明显改变,说明单纯给予阿米替林不会提高机械痛阈值。见图 1。

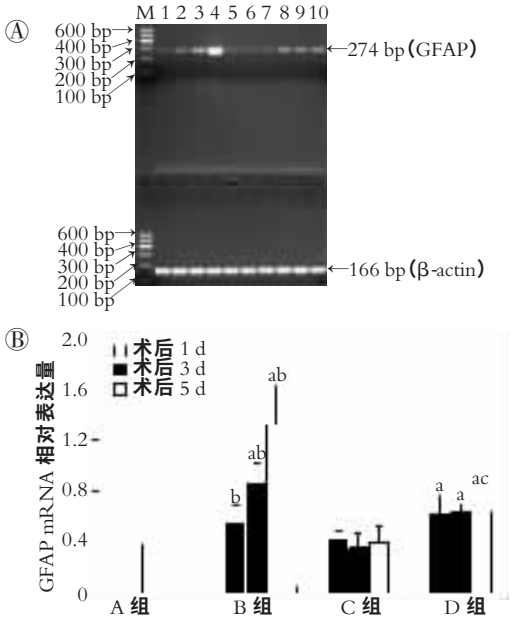



a:$P < 0.05$,与 A 组比较;b:$P < 0.05$,与 B 组术后 5 d 比较

**图 1 大鼠坐骨神经分支选择结扎后机械痛阈值改变**

### 2.2 GFAP mRNA 表达改变

电泳鉴定 RNA 无明显降解。半定量 RT-PCR 结果显示,B 组大鼠术后 1、3、5 d 脊髓 GFAP mRNA 表达逐渐增高(0.55 ± 0.14、0.86 ± 0.16、1.32 ± 0.32),而且术后 3、5 d mRNA 表达与 A 组有显著差异($P < 0.05$);C 组大鼠给药后脊髓 GFAP mRNA 表达与 A 组相比无明显差异;D 组大鼠术后 1、3、5 d 脊髓 GFAP mRNA 较 A 组表达显著增高[(0.61 ± 0.16)、(0.63 ± 0.06)、(0.64 ± 0.17),$P < 0.05$)],但不随时间变化,术后 5 d mRNA 表达低于 B 组($P < 0.01$)。见图 2。



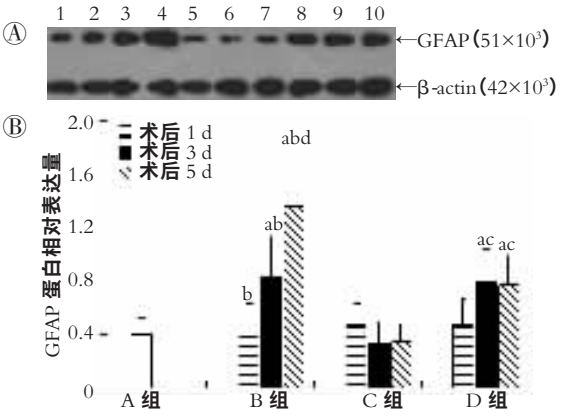

Ⓐ：RT-PCR 电泳图　M：标准；1：A 组；2～4：B 组术后 1、3、5 d；5～7：C 组给药 1、3、5 d；8～10：D 组术后 1、3、5 d

Ⓑ：定量分析结果　a：$P<0.05$，与 A 组比较；b：$P<0.01$，B 组术后 1、3、5 d 相互比较；c：$P<0.01$，与 B 组术后 5 d 比较

**图 2　各组大鼠术后脊髓 GFAP mRNA 表达改变**

## 2.3　GFAP 蛋白表达改变

Western blot 检测显示，B 组大鼠术后 1、3、5 d 脊髓 GFAP 蛋白表达随时间逐渐增多（0.38 ± 0.24、0.84 ± 0.31、1.36 ± 0.43），C 组大鼠给药后脊髓 GFAP 表达则无明显变化，D 组大鼠术后 3 d 起脊髓 GFAP 蛋白表达增高（0.79 ± 0.25，$P<0.05$），但第 5 天不再增高（0.77 ± 0.23），而且明显低于 B 组（$P<0.01$）。见图 3。



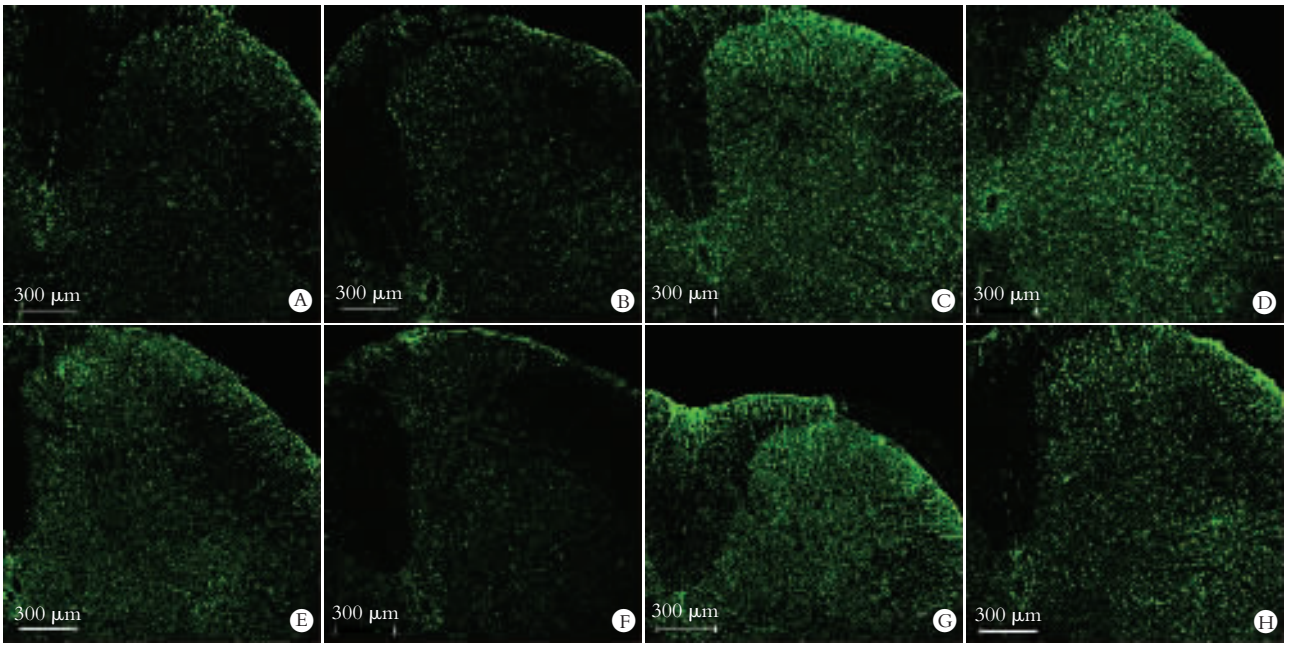

Ⓐ：Western blot 检测　1：A 组；2～4：B 组术后 1、3、5 d；5～7：C 组给药 1、3、5 d；8～10：D 组术后 1、3、5 d

Ⓑ：定量分析结果　a：$P<0.05$，与 A 组比较；b：$P<0.01$，B 组术后 1、3、5 d 相互比较；c：$P<0.05$，与 D 组术后 1 d 比较；d：$P<0.01$，与 D 组术后 5 d 比较

**图 3　各组大鼠术后脊髓 GFAP 蛋白表达改变**

## 2.4　脊髓背角星形胶质细胞形态学改变

免疫荧光结果显示，A、C 组大鼠双侧脊髓和 B、D 组大鼠健侧脊髓内 GFAP 均正常表达，细胞胞体不明显，染色较轻。B 组大鼠 SNI 术后 1 d 右侧脊髓 GFAP 染色增强不明显，术后 3 d 起右侧脊髓背角Ⅰ～Ⅲ层星形胶质细胞胞体增大，亮度增强，数量增加，与左侧和 A 组脊髓有显著差异，术后 5 d，右侧脊髓内 GFAP 阳性细胞数量继续增加（$P<0.01$），说明 SNI 术后 B 组大鼠手术侧脊髓内星形胶质细胞被激活，并逐渐增强。D 组大鼠术后 3 d 右侧脊髓背角星形胶质细胞也被激活（$P<0.05$），但术后 5 d 细胞激活程度与 B 组比较没有显著增加（$P<0.05$）。C 组给药后 1、3、5 d 脊髓内星形胶质细胞无明显改变。见图 4、表 1。




A：A 组右侧脊髓；B～D：B 组大鼠术后 1、3、5 d 右侧脊髓；E：C 组给药 1 d 右侧脊髓；F～H：D 组大鼠术后 1、3、5 d 右侧脊髓

**图 4　各组大鼠脊髓 GFAP 免疫荧光染色结果**

**表1 大鼠脊髓 GFAP 阳性细胞数**(个/$mm^2$,$n=5$, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 侧别 | SNI 术后 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1 d | 3 d | 5 d |
| 对照组(A) | 右 | 80 ± 8 | 85 ± 22 | 78 ± 23 |
| SNI 组(B) | 左 | 93 ± 22 | 101 ± 30 | 86 ± 22 |
| | 右 | 86 ± 20[d] | 187 ± 22[abd] | 382 ± 56[abd] |
| 阿米替林组(C) | 右 | 70 ± 19 | 78 ± 17 | 82 ± 19 |
| SNI + 阿米替林组(D) | 左 | 87 ± 17 | 82 ± 18 | 84 ± 23 |
| | 右 | 78 ± 23 | 197 ± 39[ace] | 216 ± 45[acef] |

a:$P<0.05$,与 A 组比较;b:$P<0.05$,与 B 组左侧比较;c:$P<0.05$,与 D 组左侧比较;d:$P<0.01$,B 组大鼠术后 1、3、5 d 右侧脊髓细胞计数比较;e:$P<0.05$,与 D 组右侧术后 1 d 比较;f:$P<0.05$,与 B 组右侧术后 5 d 比较

## 3 讨论

近年来研究发现,中枢神经系统内胶质细胞激活,在神经性疼痛的发病过程中起重要作用。有研究表明,导致神经性疼痛的神经损伤各种病因都能激活胶质细胞,并且主要集中于患侧脊髓背角即损伤神经的投射区[6-8]。胶质细胞可以被 Aδ 纤维和 C 纤维释放的 P 物质、兴奋性氨基酸(EAAs)、ATP 以及次级感觉神经元释放的 NO、前列腺素(PGs)、趋化因子等激活。激活的胶质细胞可以释放 ATP、促炎因子、诱导型活性氧簇(iROS)、NO、PGs、花生四烯酸、EAAs 等物质。这些物质可促进神经性疼痛的发生,同时进一步激活胶质细胞和神经元,释放更多的激活物质,循环往复促进神经性疼痛的发生。阻断胶质细胞激活则可以阻断神经性疼痛的发生[9]。抗抑郁药被广泛用于治疗神经性疼痛,其镇痛作用独立于抗抑郁作用。传统认为,抗抑郁药物通过阻滞 5-HT 和去甲肾上腺素重吸收,影响内啡肽介导的疼痛调节通路产生镇痛作用。研究表明抗抑郁药可以调节促炎因子、NO、P 物质以及 EAAs 的释放,这些物质均可激活星形胶质细胞[1]。因此提示星形胶质细胞可能是抗抑郁药镇痛作用的一个靶点。

本实验观察了三环类抗抑郁药阿米替林对 SNI 模型大鼠的镇痛效应以及对脊髓背角星形胶质细胞激活程度的影响。行为学评估发现 SNI 模型大鼠(B 组)术后 24 h 出现机械痛觉超敏(allodynia)改变,机械痛阈值随时间逐渐降低,符合 SNI 模型病理性疼痛改变[4]。星形胶质细胞激活标志物 GFAP 的免疫荧光染色发现大鼠患侧脊髓背角星形胶质细胞激活程度随时间逐渐增强,与其他研究一致[10]。持续给予阿米替林的 SNI 模型大鼠(D 组),从术后第 3 天起机械性痛觉超敏症状明显缓解。免疫荧光染色发现 D 组大鼠患侧脊髓背角星形胶质细胞激活程度较 B 组明显减弱。GFAP 蛋白 Western blot 和 RT-PCR 检测进一步证实了 GFAP 的表达增强可以被阿米替林阻断。单纯给予阿米替林的 C 组大鼠,行为学和免疫荧光染色没有明显改变,提示阿米替林本身不能抑制星形胶质细胞激活,可能是通过阻断细胞激活通路而发挥作用。

本研究结果表明抑制星形胶质细胞激活,阻断胶质细胞与神经元之间的恶性循环可能是阿米替林治疗神经性疼痛的机制之一。阿米替林的抑制作用可能是来自于对星形胶质细胞激活因子的释放调节。究竟哪几种因子参与这一过程,星形胶质细胞的功能发生了哪些变化,目前仍不甚清楚,有待于进一步研究。

**参考文献:**


[1] Mico J A, Ardid D, Berrocoso E, *et al*. Antidepressants and pain[J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27(7): 348-354.

[2] Watkins L R, Hutchinson M R, Ledeboer A, *et al*. Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids[J]. Brain Behav Immun, 2007, 21(2):131-146.

[3] 张水文, 周占松, 宋 波. 胶质细胞活化在慢性前列腺炎大鼠脊髓兴奋性氨基酸变化的作用[J]. 第三军医大学学报,2007,29(5):432-434.

[4] Decosterd I, Woolf C J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. Pain, 2000, 87(2): 149-158.

[5] Chaplan S R, Bach F W, Pogrel J W, *et al*. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55-63.

[6] Campbell J N, Meyer R A. Mechanisms of neuropathic Pain[J]. Neuron, 2006, 52(1): 77-92.

[7] 毛庆祥, 杨天德. 神经病理性疼痛机制研究进展[J]. 国际麻醉与复苏学杂志,2008, 29(3): 232-235.

[8] 李 彤,袁 彬,邹 飞. 转化生长因子-β1 对新生大鼠星形胶质细胞结缔组织生长因子表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2007,43(1):47-50.

[9] Raghavendra V, Tanga F, DeLeo J A. 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.

[10] 金小高, 罗爱林, 王金韬,等. 脊髓神经元和胶质细胞激活在三种神经病理性疼痛大鼠模型脊髓水平致痛机制中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(1): 71-74.


(编辑 吴培红)