DOI:10.16016/j.2097-0927.202402020

米诺环素对脊神经结扎大鼠脊髓内 M1/M2 型小胶质细胞极化的影响

成志红[1],冯 松[2],王 霞[3],倪锐男[1],郭 洋[1],向 宇[1],杨正伟[1],彭 彬[1] 637000 四川 南充,川北医学院:基础医学与法医学研究所[1],临床医学院[3];635000 四川 达州,达州市第三人民医院神经外科[2]

[摘要] **目的** 探讨米诺环素(minocycline,Mino)对脊神经结扎(spinal nerve ligation,SNL)致神经病理性疼痛(neuropathic pain,NP)大鼠脊髓内 M1 型(促炎型)和 M2 型(抗炎型)小胶质细胞极化的影响及其机制。**方法** 36 只成年雄性 SD 大鼠按体质量分层随机抽样分为 Sham 组、SNL 组和 M+SNL 组(鞘内注射米诺环素),于术前 1 d 和术后 14 d 内测定大鼠后足机械痛阈值和冷痛敏阈值。术后 14 d 于 L5 脊髓取材,采用免疫组化技术和体视学技术检测 L5 脊髓背角内小胶质细胞的总数以及 M1/M2 型小胶质细胞的数量;利用生物信息学技术筛选出脊髓小胶质细胞内的核心靶点 *Cst*7,并采用 Western blot 检测小胶质细胞标志物 Iba-1、M1 型小胶质细胞标志物 iNOS、M2 型小胶质细胞标志物 CD206、*Cst*7 基因编码的蛋白质胱抑素 F(cystatin F,CF)及 CatS/CX3CL1/CX3CR1 通路蛋白的表达水平;采用 ELISA 检测脊髓内 TNF-α、IL-6 和 IL-10 的蛋白表达量。**结果** M+SNL 组大鼠术后 7~14 d 手术侧的机械痛和冷痛敏阈值均比 SNL 组显著升高($P<0.01$)。SNL 组大鼠手术侧脊髓背角内小胶质细胞的总数,M1 型、M2 型小胶质细胞的数量以及脊髓 CatS、CX3CL1、CX3CR1、TNF-α、IL-6 和 IL-10 蛋白表达较 Sham 组均显著增加,而 CF 含量显著降低($P<0.01$);与 SNL 组比较,M+SNL 组小胶质细胞的总数、M1 型小胶质细胞的数量以及 CatS、CX3CL1、CX3CR1、TNF-α、IL-6 蛋白表达均显著减少,而 M2 型小胶质细胞的数量以及 CF、IL-10 的蛋白表达均显著增加($P<0.05$)。**结论** 米诺环素改善 SNL 致神经病理性疼痛的机制可能是通过上调小胶质细胞内 CF 蛋白表达,进而抑制 CatS/CX3CL1/CX3CR1 信号通路,促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转化,以平衡 M1/M2 小胶质细胞极化失衡、减轻神经炎症。

[关键词] 米诺环素;胱抑素 F;小胶质细胞;脊神经结扎;神经病理性疼痛;体视学;大鼠
[中图法分类号] R322.81; R441.1; R978.14 [文献标志码] A

Effect of minocycline on polarization of types M1/M2 microglia in spinal cord in rats after spinal nerve ligation

CHENG Zhihong[1], FENG Song[2], WANG Xia[3], NI Ruinan[1], GUO Yang[1], XIANG Yu[1], YANG Zhengwei[1], PENG Bin[1]
[1]Institute of Basic Medicine and Forensic Medicine, [3]Faculty of Clinical Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan Province, 637000; [2]Department of Neurosurgery, Dazhou Third People's Hospital, Dazhou, Sichuan Province, 635000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of minocycline (Mino) on the polarization of types M1/M2 microglia (pro- and anti-inflammatory type) in the spinal dorsal horn of rats with neuropathic pain (NP) induced by spinal nerve ligation (SNL) and its underlying mechanism. **Methods** A total of 36 adult male SD rats were randomly stratified into Sham-operation (Sham) group, SNL group and Mino+SNL group by stratified random sampling based on body weight. Mechanical pain threshold and cold nociceptive thresholds of

[基金项目] 南充市科学技术局博士、硕士学位授权点和"一流学科"建设专项(20SXQT0304);四川省大学生创新创业训练计划项目(S202310634104)

[通信作者] 彭 彬,E-mail:binpeng01@sina.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

rat hind paw were measured in 1 d before and 14 d after modelling. Spinal cord tissue at the lumbar 5 (L5) segment was taken at 14 d after modelling, and the total number of microglia as well as the numbers of M1 and M2 microglia in the spinal dorsal horn were measured with immunohistochemistry and stereology. With aid of bioinformatics techniques, the core target in the spinal cord, *Cst*7, was selected. Then, the protein levels of microglia marker Iba-1, M1 microglia marker iNOS, M2 microglia marker CD206, *Cst*7 encoded protein cystatin F (CF) and pathway CatS/CX3CL1/CX3CR1 were detected with Western blotting. The expression levels of TNF-α, IL-6 and IL-10 in the spinal cord tissues were measured with ELISA. **Results** The mechanical pain and cold nociceptive thresholds were both significantly higher in the M+SNL group than the SNL group at 7~14 d after modelling ($P<0.01$). The total number of microglia and the numbers of M1/M2 microglia in the spinal dorsal horn as well as the expression levels of CatS, CX3CL1, CX3CR1, TNF-α, IL-6, and IL-10 in the spinal cord tissues were obviously increased, and the expression level of CF was notably decreased in the SNL model group than the Sham group ($P<0.01$). While, Mino treatment remarkably reversed above phenomena, with decreased total number of microglia and number of M1 microglia as well as expression levels of CatS, CX3CL1, CX3CR1, TNF-α and IL-6, and increased number of M2 microglia as well as CF and IL-10 levels when compared with the SNL group ($P<0.05$). **Conclusion** Mino alleviates SNL induced neuropathic pain, probably through up-regulating CF in the microglia, and thus inhibiting the CatS/CX3CL1/CX3CR1 signaling pathway, promoting the conversion of microglia from type M1 to M2 to balance the imbalance in the M1/M2 polarization, and thus reducing neuroinflammation.

[**Key words**] minocycline; cystatin F; microglia; spinal nerve ligation; neuropathic pain; stereology; rats

Supported by the Special Project of Doctor- and Master-Accredited Program and First-Class Discipline Construction of Nanchong Bureau of Science and Technology (20SXQT0304) and the Project of Innovative and Entrepreneurial Training Plan for University and College Students of Sichuan Province (S202310634104). Corresponding author: PENG Bin, E-mail: binpeng01@sina.com

腰椎间盘突出后刺激或压迫脊神经根会诱发严重的神经病理性疼痛(neuropathic pain,NP)[1],临床主要表现为自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏等,这极大影响了患者的生活质量[2]。脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)是一种理想的椎间盘突出症模型,其所诱发的痛觉过敏等症状与临床症状接近,因而被广泛应用于基础研究[2]。目前脊神经损伤导致 NP 的发生发展机制并不十分清楚,药物治疗的效果欠佳。深入探讨脊神经损伤后 NP 的发生发展机制,可望为诊疗脊神经损伤后 NP 提供新策略。

越来越多的证据表明,激活的小胶质细胞通过扩大炎症反应参与 NP 的发展与维持[3-5],这与我们前期采用体视学技术发现 SNL 所致 NP 大鼠结扎侧脊髓背角内小胶质细胞数量显著增加的结果一致[6]。而在多种 NP 模型中,全身或局部采用小胶质细胞抑制剂米诺环素可以通过抑制小胶质细胞的激活发挥镇痛作用[7-9]。近年来研究又发现,激活的小胶质细胞可以分为促炎的 M1 型和抗炎的 M2 型,这种表型的异质性也被称为小胶质细胞极化,两种表型之间的动态平衡是维持生物体内炎症平衡的关键[3-4]。但是 SNL 后脊髓背角增生的小胶质细胞中促炎 M1 型和抗炎 M2 型各自所占的比例尚不十分清楚,小胶质细胞极化的深入机制仍有待进一步阐明,米诺环素的治疗机制也需要进一步挖掘。

因此,本研究主要采用体视学技术定量研究 SNL 所致 NP 脊髓背角内小胶质细胞以及促炎 M1 型和抗炎 M2 型的数量变化;采用生物信息学技术挖掘出 SNL 致 NP 的潜在靶点"*Cst*7",并进一步探讨小胶质细胞抑制剂米诺环素[10-11]的镇痛作用是否与其调控 CF(*Cst*7 基因编码的蛋白)的表达,进而通过调控 CatS/CX3CL1/CX3CR1 信号通路促进小胶质细胞由 M1 型向 M2 型转换、减少炎症因子释放有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

正常成年 SPF 级雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 36 只,体质量 180~220 g[来源于川北医学院实验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(川)2023-0076],术前根据体质量分层随机抽样,将 36 只 SD 大鼠分为 3 组:假手术组(Sham 组)、模型组(SNL 组)及米诺环素给

药组(M+SNL 组),每组 12 只。SNL 组和 M+SNL 组大鼠行左侧脊神经结扎建立 SNL 模型。M+SNL 组术后第 1、7、14 天鞘内注射米诺环素 15 μL(13.5 mmol/L),Sham 组和 SNL 组对应时间鞘内注射等量的 PBS。

鞘内置管[12]手术步骤:异氟烷(3%~4%诱导,2%维持)麻醉大鼠后,找到大鼠的 L3~L4 棘突;采用 7 号针头探查 L3~L4 棘突间隙,并轻轻穿破黄韧带挑破硬脊膜,从韧带破口处缓慢地进入 PE-10 导管至蛛网膜下腔,可见有清亮脑脊液从导管内流出,固定导管后另一端经皮下隧道引出,暴露于颈背部皮肤,外露 3 cm 无菌封闭导管外口;然后逐层缝合肌肉、皮肤,最后缝合完毕后予以消毒处理。置管成功,纳入下一步实验。

SNL 模型手术步骤:大鼠麻醉后,实验动物右侧卧位固定,以左侧髋结节为中点做一长约 2.5 cm 的斜切口。逐层切开皮肤、肌肉,暴露腰方肌,在腰方肌和髂腰肌之间的间隙即可找到 L3、L4 和 L5 脊神经。采用自制钛夹(直径 6 mm,长 3~4 cm,奥硕金属材料有限公司)紧结扎 L5 脊神经;逐层缝合肌肉层及皮肤,再次消毒皮肤,造模结束;术后大鼠常规摄食、进水。Sham 组除了不结扎 L5 脊神经,其他步骤同上。

所有实验动物的饲养环境维持在 20~25 ℃,昼夜交替规律变化,自由饮水和摄食。实验过程中对动物的所有处理符合本院伦理委员会关于实验动物伦理学要求。

1.2 实验试剂和仪器

米诺环素购自美国 MedChemExpress 公司。异氟烷购自中国深圳瑞沃德公司。Von Frey 纤维丝包购自美国 North Coast 公司。ELISA 试剂盒购自中国武汉 FineTest 公司。BCA 蛋白检测试剂盒购自中国武汉 Boster 公司。本实验中使用的一抗如下:Iba-1、iNOS 和 CD206 购自中国武汉 Proteintech 公司,CF 购自中国北京 Bioss 公司,CatS 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,CX3CL1 购自中国武汉 Boster 公司,CX3CR1 购自中国武汉 Abclonal 公司。

1.3 痛阈值检测

所有大鼠在测量前至少适应测试环境 3 d。测试时间为:术前 1 d(0 d)和术后第 4 、7 、10 、14 天。阳性反应判断标准:大鼠缩足、舔足或甩足等。

1.3.1 50%缩足阈值(paw withdrawal threshold,PWT)检测[13]

用 von Frey 丝垂直刺激每只大鼠的足底外侧。测试前先将大鼠置于透明亚克力罩内,待 15 min 后大鼠处于安静状态时,才能进行测试实验。首先选用 4.0 g 的纤维丝,然后按照“up-down 法”,检测并计算出大鼠的 50% PWT 阈值。测试时 3 组大鼠轮流测试,每只大鼠同侧连续测试间隔不少于 5 min。

1.3.2 冷痛敏阈值检测

为测试大鼠足部对寒冷的敏感性,测量其足部对丙酮的缩足反应。当大鼠处于安静状态时,将预冷的丙酮(每次 100 μL)涂在其足底表面,计时 30 s, 30 s 内的阳性反应时间即为该侧的冷刺激缩足反应时间。测试时 3 组大鼠轮流测试,每只大鼠的每侧脚掌涂抹 3 次(间隔 5 min),取 3 次的平均值作为该侧的冷刺激缩足反应时间。

1.4 取材及组织处理

术后 14 d,行为学检测完成后,每组随机选取 3 只大鼠,异氟烷麻醉后打开椎板暴露脊髓,根据脊神经根的位置沿垂直于脊髓纵轴的方向切取 2 mm 厚的 L5 脊髓节段放入 4%多聚甲醛中固定 48 h,换入 70%乙醇内,再过 24 h 换入新鲜的 70%乙醇溶液内保存用于石蜡包埋切片。每组的另 9 只大鼠同上切取 L5 脊髓节段,并将其左侧放入液氮速冻,随后转入-80 ℃冰箱保存用于后续的 Western blot 和 ELISA 检测。

1.5 免疫组织化学染色切片制备

将所取的 L5 脊髓组织块用石蜡包埋机(JUNG-Histowax, Cambridge Instruments GmbH, Nussloch)包埋,用切片机(RM2145, Leica Instruments GmbH, NusslOch)从每个组织连续切取 3 张厚度为 10 μm 的脊髓横断面切片,分别用于 Iba-1(标记小胶质细胞)、iNOS(标记 M1 型小胶质细胞)和 CD206(标记 M2 型小胶质细胞)免疫组化染色。免疫组化染色步骤:脱蜡至水后,将切片用 PBS 洗涤,经破膜,抗原修复,3% H_2O_2孵育,山羊血清封闭后,分别滴加兔抗鼠 Iba-1(1∶300)、iNOS(1∶200)和 CD206(1∶500)抗体于 4 ℃孵育 12~30 h,PBS 充分洗涤后滴加多聚过氧化物酶二抗 37 ℃孵育 30 min,DAB 显色 3 min,自来水充分冲洗,苏木精复染核,常规脱水、透明、中性树脂封片。阴性对照用 PBS 替代一抗。

1.6 脊髓背角内小胶质细胞的总数以及 M1、M2 型小胶质细胞数量的体视学估计

采用丹麦 Visiopharm 公司的体视学软件和配套的日本 Olympus 的 BX53 型生物显微镜,在电脑屏幕上观测切片。

1.6.1 小胶质细胞总数的体视学估计[14]

先在×4 物镜下勾出 Iba-1 染色切片脊髓背角的左侧或右侧区域,每侧叠加 20×20 个测点(A_p= 23 185.49 μm^2)(图 1A),计数落在脊髓背角内的测点总数,将其乘以 A_p 即得该侧脊髓背角的面积(A),然后换用×20 倍镜在该区域下观察,每个视野叠加 4 个面积为 14 400.00 μm^2 的长方形计数框和 9 个面积为 40 674.00 μm^2 的测点(图 1B)。首先在勾选区域的最左上角随机确定第

1 个测试视野,然后按照 0.5 mm 的间距利用电动载物台在勾选区域内等距随机抽选视野,根据禁线法则计数框内的阳性小胶质细胞核的轮廓数量。所计数的细胞总数除以用于计数的计数框总面积即得单位面积脊髓背角内细胞的轮廓数(N_A)。N_A 与 A 的乘积即为该侧 L5 脊髓背角横截面内小胶质细胞核的轮廓总数。

1.6.2　M1 和 M2 型小胶质细胞数量的体视学估计

脊髓背角内 M1 和 M2 型小胶质细胞核轮廓数量的体视学估计方法同小胶质细胞总数,区别在于×20 倍镜叠加的计数框面积调整为 30 000.00 μm^2。

1.7　生物信息学技术筛选 SNL 致 NP 的核心靶点

1.7.1　数据集获取　在美国国立生物信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)中的 GEO 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)检索并下载高通量数据集 GSE71136。该数据集来源于 SNL 模型后 7 d 小鼠脊髓小胶质细胞的高通量测序,基因表达检测平台为 GPL17021。

1.7.2　差异基因筛选　差异表达基因是通过 R.4.1.1 分析从 GEO 数据库中获得的数据,以 $P<0.01$ 作为差异基因筛选准则。

1.7.3　蛋白相互作用网络图(PPI)构建及核心基因筛选　通过 string(https://cn.string-db.org/)网站在线进行靶基因间的蛋白互作分析;采用 Cytoscape 3.9.1 软件进行差异表达蛋白互作关系网络分析筛选出调控作用网络中起关键作用的核心基因。

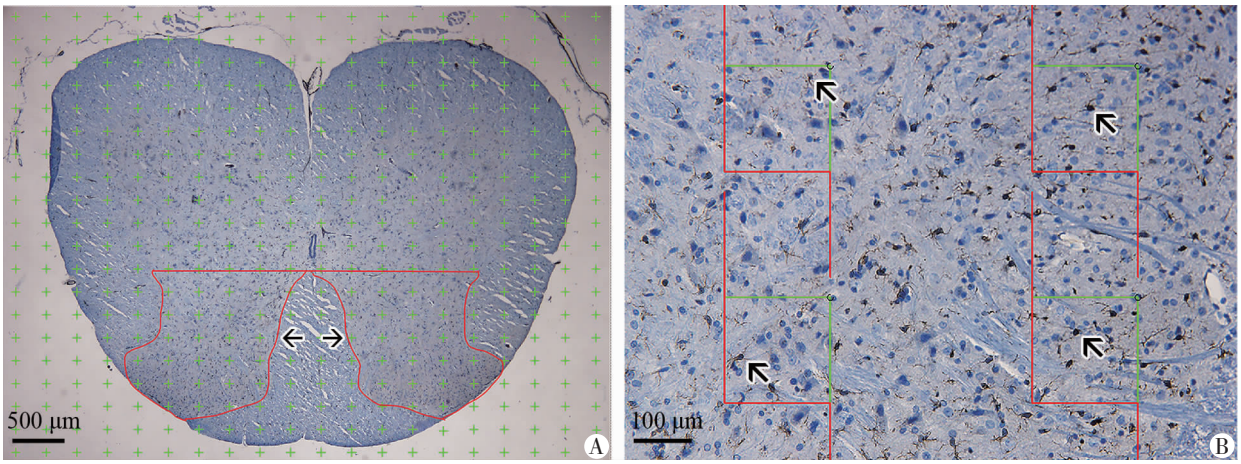
1.7.4　GO 与 KEGG 富集分析　将预测到的差异表达基因在 Metascape(https://metascape.org/)网站进行基因本体论(GO)和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。

1.8　Western blot 检测 Iba-1、iNOS、CD206、CF、CatS、CX3CL1 和 CX3CR1 表达

从-80 ℃冰箱中取出冻存的 L5 手术侧脊髓组织,冰上研磨,12 000 r/min 离心 15 min,加入 RIPA 裂解液,离心后取上清液,按照 BCA 试剂盒说明书检测蛋白浓度。蛋白浓度计算出来后,经凝胶电泳、转膜、封闭后,先后加入相应的一抗 Iba-1(1∶1 000)、iNOS(1∶1 000)、CD206(1∶750)、CF(1∶1 000)、CatS(1∶1 000)、CX3CL1(1∶1 000)以及 CX3CR1(1∶500)和对应种属的二抗,取出 PVDF 膜,用 TBST 清洗后与发光液混合,全自动化学发光成像分析系统曝光。运用 Image J 软件检测蛋白灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)灰度值比值为统计数据进行分析。

1.9　ELISA 法检测大鼠 TNF-α、IL-6 和 IL-10 水平

取出 L5 左侧脊髓 -80 ℃保存。组织在 200 μL 冰冷的 RIPA 缓冲液[0.9%NaCl、0.1%十二烷基硫酸钠(SDS)、50 mmol/L Tris,pH=7.3]中匀浆,在 5 000×g 4 ℃下离心 5 min。上清在-20 ℃或 -80 ℃保存,以备将来检测。采用 ELISA 试剂盒(ER1393、ER0042 和 ER0033)检测 TNF-α、IL-6 和 IL-10 表达。根据说明书,每孔加入待测样品和标准品后加入 50 μL 抗体工作液,于 37 ℃孵育 45 min 后,弃液;其次向每个孔中加入 100 μL SABC 工作溶液,于 37 ℃孵育 30 min 后,弃液;最后添加 90 μL TMB 底物溶液,于 37 ℃孵育 15 min 后,立即加入终止液,在 450 nm 处测量每个孔的光密度值。空白孔归零后,拟合标准曲线,代入校正后的光密度值,计算相关样品的浓度。



A:×4 物镜下估计脊髓背角横截面面积　红色勾选区域为 L5 脊髓背角,每个视野叠加 20×20 个测点(绿色"+"),←:示手术侧,→:示非手术侧;B:×20 物镜下计数脊髓背角内小胶质细胞核轮廓数量　每个视野叠加 4 个计数框,↖:示小胶质细胞核

图 1　体视学方法计数脊髓背角横截面内小胶质细胞数量

1.10 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析。计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。各组手术侧和非手术侧的对比采用配对 t 检验;3 组间比较采用单因素方差分析,其中两两对比采用 LSD 法;50% PWT 和冷痛敏数据组间比较采用重复测量的双因素方差分析,事后检验用 LSD 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

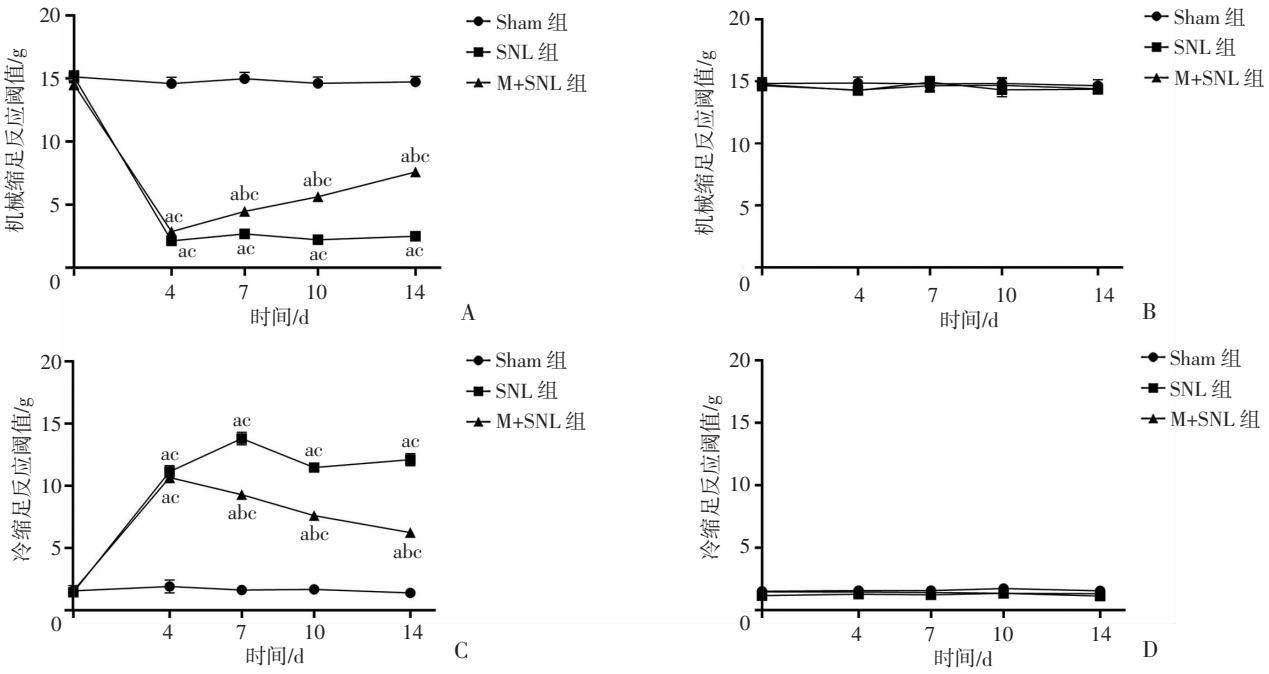
2.1 米诺环素对大鼠疼痛行为学的影响

2.1.1 米诺环素对大鼠一般行为学的影响 SNL 模型大鼠术后左侧后足足外翻,足趾聚拢,偶有自发性舔足、甩足等行为;给药后,大鼠足外翻程度减轻,足趾稍分开,自发性舔足次数降低。

2.1.2 米诺环素对大鼠痛阈值的影响 3 组大鼠的手术侧机械痛阈值($P<0.01$)和冷痛敏阈值($P<0.01$)的组间效应差异具有统计学意义。与 Sham 组比较,SNL 组和 M+SNL 组术后 4~14 d 手术侧的机械痛阈值和冷痛敏阈值显著降低($P<0.01$,图 2A、C)。与 SNL 组比较,M+SNL 组术后 7~14 d 手术侧的机械痛阈值和冷痛敏阈值显著升高($P<0.01$,图 2A、C)。与术前相比,Sham 组的手术侧机械痛阈值和冷痛敏阈值无明显变化,SNL 组的手术侧机械痛阈值、冷痛敏阈值和 M+SNL 组的手术侧机械痛阈值、冷痛敏阈值均显著降低($P<0.01$,图 2A、C)。非手术侧 3 组大鼠间的敏阈值无明显差异(图 2B、D);与非手术侧比较,Sham 组大鼠手术侧痛阈值无明显变化;SNL 组和 M+SNL 组大鼠术后 4~14 d 机械痛阈和冷痛敏阈值明显降低($P<0.01$,图 2)。

2.2 米诺环素对脊髓背角内小胶质细胞核轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核轮廓数量的影响

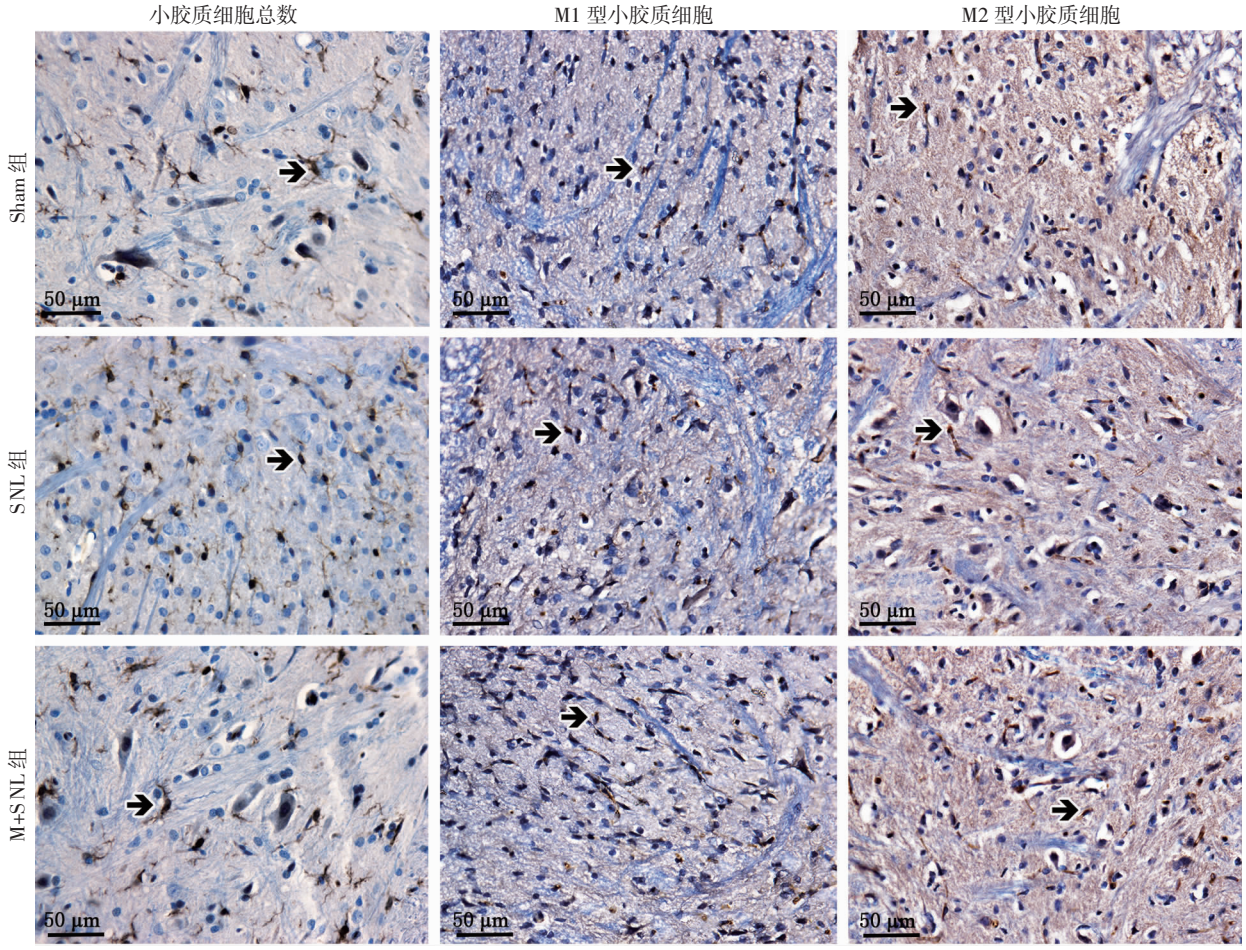
与 Sham 组比较,SNL 组术后 14 d 手术侧脊髓背角横截面内小胶质细胞核的轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核的轮廓数量分别显著增加了 99%、126% 和 55%($P<0.01$),而与 SNL 组比较,M+SNL 组手术侧小胶质细胞核的轮廓总数和 M1 型小胶质细胞核的轮廓数量分别显著减少了 18% 和 42%,M2 型小胶质细胞核的轮廓数量显著增加了 28%($P<0.01$);3 组间非手术侧的细胞数量无明显差异;与非手术侧比较,Sham 组大鼠脊髓背角手术侧小胶质细胞核的轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核的轮廓数量差异均无统计学意义,SNL 组手术侧小胶质细胞核的轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核的轮廓数量分别显著增加了 52%、59% 和 34%($P<0.05$),M+SNL 组手术侧小胶质细胞核的轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核的轮廓数量分别显著增加了 43%、21% 和 47%($P<0.05$,图 3,表 1)。



a:$P<0.01$,与 Sham 组手术侧比较;b:$P<0.01$,与 SNL 组手术侧比较;c:$P<0.01$,与同组非手术侧比较

A、C:各组术后 4~14 d 手术侧机械痛阈值和冷痛阈值;B、D:各组术后 7~14 d 非手术侧机械痛阈值和冷痛阈值

图 2 米诺环素对大鼠机械痛阈值和冷痛敏阈值的影响($n=12$)



→:示小胶质细胞

图 3 米诺环素对 L5 脊髓背角内小胶质细胞核轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核轮廓数量的影响

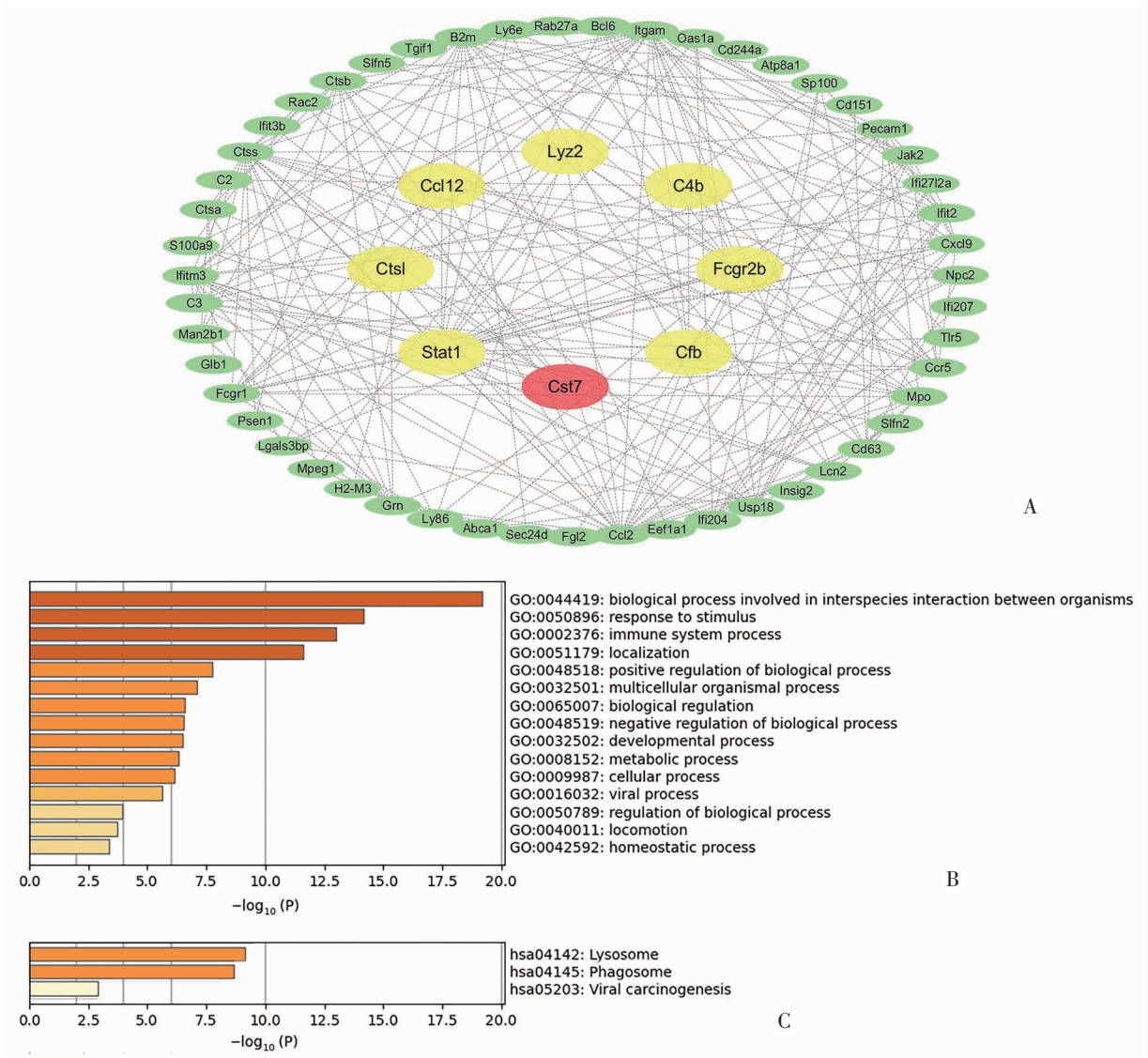
表 1 脊髓背角横截面内小胶质细胞核轮廓数量的体视学结果($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

组别	小胶质细胞总数		M1 型小胶质细胞		M2 型小胶质细胞	
	非手术侧	手术侧	非手术侧	手术侧	非手术侧	手术侧
Sham 组	135.10±3.28	144.38±2.90	67.28±2.65	68.74±2.52	57.75±4.63	64.77±2.27
SNL 组	136.57±6.72	286.98±7.31^{ac}	63.10±2.36	155.50±1.26^{ad}	66.42±1.68	100.12±2.05^{ac}
M+SNL 组	133.02±3.97	235.40±4.11^{abc}	71.30±1.12	90.61±1.62^{abc}	68.65±4.01	128.36±4.45^{abd}
F 值	0.133	198.714	3.646	580.049	2.467	104.473
P 值	0.878	<0.01	0.092	<0.01	0.165	<0.01

a:$P<0.01$,与 Sham 组手术侧比较;b:$P<0.01$,与 SNL 组手术侧比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与同组非手术侧比较

2.3 SNL 致 NP 的核心靶点生物信息学分析

利用 Cytoscape 对 SNL 致神经病理性疼痛芯片数据集 GSE71136 得到的差异表达蛋白构建蛋白相互作用图(PPI 图),筛选出 *Cst7*、*Lyz2*、*Cc1l2*、*Stst1* 和 *Ctsl* 等 71 个核心靶点(图 4A)。通过 GO 和 KEGG 富集分析发现这些核心靶点与免疫反应、刺激反应、生物发育过程以及溶酶体相关功能有关(图 4B、C)。



A:差异基因 PPI 网络图;B:核心差异基因 GO 富集分析;C:核心差异基因 KEGG 富集分析

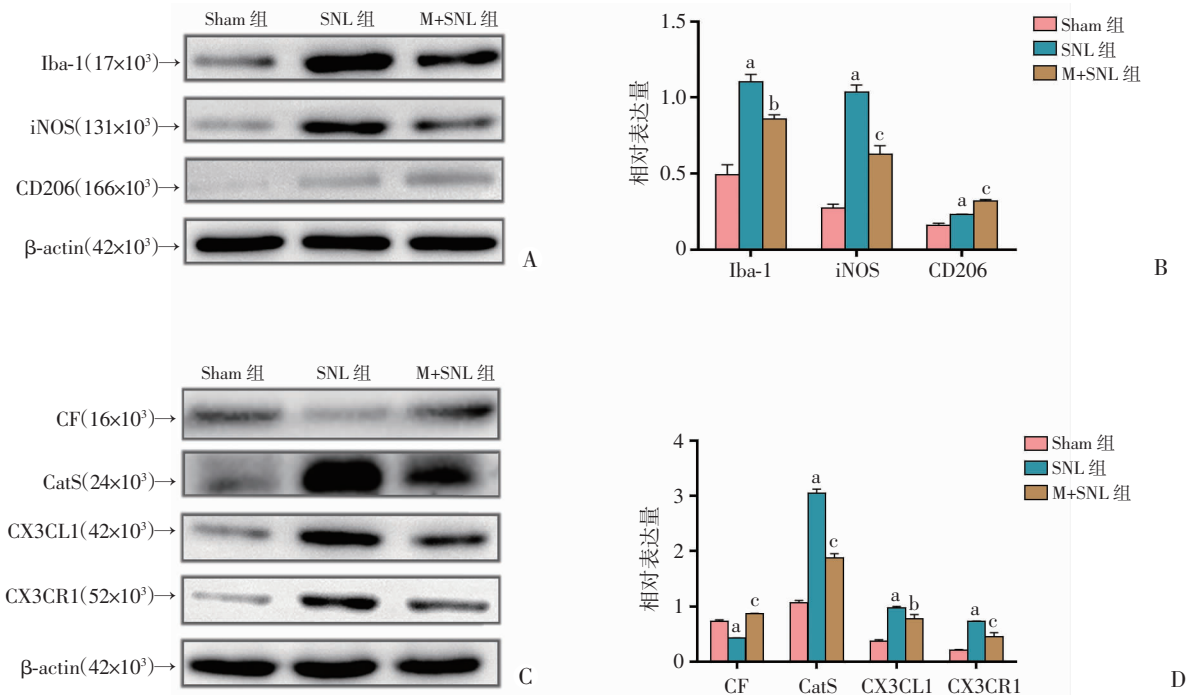
图 4 蛋白互作网络分析(PPI Network)、GO 和 KEGG 富集分析

2.4 米诺环素对手术侧 L5 脊髓 Iba-1、iNOS、CD206、CatS、CF、CX3CL1 和 CX3CR1 蛋白表达量的影响

Western blot 检测发现,与 Sham 组比较,术后 SNL 组大鼠 Iba-1、iNOS、CD206、CatS、CX3CL1 和 CX3CR1 蛋白表达水平明显增加,而 CF 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与 SNL 组比较,M+SNL 组大鼠 Iba-1、iNOS、CatS、CX3CL1 和 CX3CR1 蛋白表达量显著降低($P<0.05$),而 CD206 和 CF 蛋白表达量显著增加($P<0.01$,图 5)。

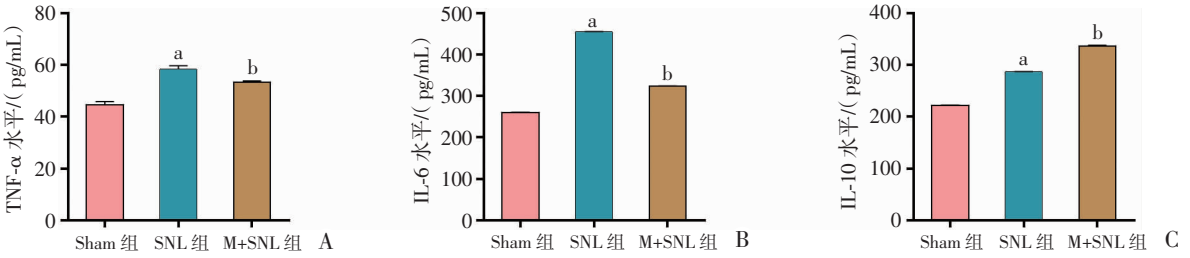
2.5 米诺环素对手术侧 L5 脊髓内 TNF-α、IL-6 和 IL-10 蛋白表达量的影响

ELISA 检测发现,与 Sham 组比较,SNL 组和 M+SNL 组大鼠术后脊髓内的促炎性因子 TNF-α、IL-6 以及抗炎性因子 IL-10 蛋白表达量均显著增加($P<0.01$);与 SNL 组比较,M+SNL 组大鼠术后脊髓内的促炎性因子 TNF-α、IL-6 显著减少($P<0.05$),而抗炎性因子 IL-10 显著增加($P<0.01$,图 6)。



A、C:Western blot 检测;B、D:蛋白半定量分析 a:$P<0.01$,与 Sham 组手术侧比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与 SNL 组手术侧比较

图 5 米诺环素对 L5 脊髓手术侧 L5 脊髓内相关蛋白表达量的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与 Sham 组手术侧比较; b:$P<0.05$,与 SNL 组手术侧比较

图 6 米诺环素对手术侧 L5 脊髓内 TNF-α(A)、IL-6(B)和 IL-10(C)蛋白表达量的影响($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

本研究首先运用无偏体视学技术发现神经病理性疼痛(SNL 大鼠模型)主要导致的是 L5 脊髓背角内 M1 型(促炎型)小胶质细胞增多,米诺环素(小胶质细胞激活抑制剂)鞘内注射可以抑制 M1 型小胶质细胞的增多、促进 M2 型(抗炎型)小胶质细胞的增多。本研究的 Western blot 结果和 ELISA 结果也进一步证实,米诺环素可以减少 L5 脊髓内 M1 型小胶质细胞标记物 iNOS 和提高 M2 型小胶质细胞标记物 CD206 的蛋白表达,还可以减少促炎因子 IL-6、TNF-α和增加抗炎因子 IL-10 的表达。以上结果均提示,米诺环素可以通过调节脊髓背角内小胶质细胞极化的平衡,减轻神经炎症,缓解神经病理性疼痛。此外,为了探讨米诺环素调控小胶质细胞极化的机制,本研究还通过生信分析发现 *Cst7* 基因在 SNL 致 NP 小鼠脊髓小胶质细胞中高表达,推测其编码的蛋白质 CF 可能是调控小胶质细胞激活的重要靶点之一。因此,本研究进一步对 L5 脊髓 CF 及其下游 CatS/CX3CL1/CX3CR1 通路的蛋白表达水平进行检测。结果提示,米诺环素调节小胶质细胞极化平衡可能与其上调 CF 蛋白表达,进而抑制 CatS/CX3CL1/CX3CR1 通路有关。

疼痛相关行为测试是评估疼痛严重程度和进展的间接证据。大量研究表明 SNL 后大鼠会出现明显的自发性痛和痛觉过敏[2, 6, 15-16]。本研究 SNL 组大鼠手术侧后足出现足外翻、足趾聚拢、自发性舔足和甩足等

行为学改变,且机械痛阈值和冷痛敏阈值均显著降低。这些结果表明本研究构建的 SNL 模型成功诱导大鼠表现出 NP 相关行为学,模型构建成功。米诺环素是一种四环素类广谱抗生素,具有较强的组织穿透力及抗炎作用,能通过血脑屏障[10-11]。鞘内给药米诺环素后,大鼠的自发性舔足次数明显降低,从术后第 7 天开始机械痛阈值和冷痛敏阈值均明显升高,提示米诺环素可以缓解 SNL 所致 NP。

大量研究表明,小胶质细胞可以以极化的方式激活为两种表型:M1 型和 M2 型[4, 17-18]。M1 型小胶质细胞可以通过释放促炎因子,如 IL-6 以及活性氧等,加重炎症反应,因而又被称为促炎型小胶质细胞;M2 型通过释放抗炎因子(如 IL-10)以及各种生长因子(如神经生长因子)等,抑制过度的炎症反应,因而又被称为抗炎型小胶质细胞。XU 等[3]和 ZHANG 等[19]研究发现,周围神经损伤后,脊髓内两种表型的小胶质细胞数量失衡是诱发 NP 的重要原因。本课题组前期研究发现 SNL 致 NP 大鼠脊髓背角内小胶质细胞数量显著增加,但目前关于这些激活的小胶质细胞中各分型的数量尚缺乏形态定量证据。体视学技术通过结合几何学与统计学理论,最大限度地降低了系统误差,基于体视学获得的形态学定量证据也成为疾病诊断的金标准[20-22]。本研究运用体视学技术发现 SNL 模型术后 14 d,脊髓背角内小胶质细胞核的轮廓总数以及 M1、M2 型小胶质细胞核的轮廓数量均明显增加,其中 M1 型数量增加明显多于 M2 型(M1/M2 = 1.55),并为其提供了可靠的形态学定量证据。进一步的 Western blot 和 ELISA 技术结果也表明 L5 脊髓内 Iba-1、iNOS、CD206 以及炎性因子 IL-6、TNF-α 和 IL-10 的蛋白表达量也都显著增加。这些结果提示 SNL 致 NP 的发生与脊髓背角小胶质细胞极化失衡及其介导的炎症反应有关。LI 等[23]研究发现,米诺环素可通过抑制脊髓内 M1 型小胶质细胞的激活,缓减 SNI 致 NP。本研究经鞘内给药米诺环素后,脊髓内小胶质细胞核的轮廓总数和 M1 型小胶质细胞核的轮廓数量及其标记物的蛋白表达量均显著减少,M2 型小胶质细胞核的轮廓数量及其标记物的蛋白表达量显著增加,促炎因子 IL-6、TNF-α 的蛋白表达量明显减少,抗炎因子 IL-10 的蛋白表达量明显增加。本研究结果表明米诺环素可以促进 SNL 致 NP 脊髓背角内两种表型的小胶质细胞数量相对平衡,减轻神经炎症。本研究中小胶质细胞的总数是由 Iba-1 进行标识,Iba-1 标记的小胶质细胞既有激活状态也有静息状态,同时 M1 型和 M2 型也有多种特异性标记物[18],所以结果中 M1 型小胶质细胞和 M2 型小胶质细胞数量的总和少于小胶质细胞的总数。

为了找到调控小胶质细胞激活或极化的靶点,为临床 NP 治疗提供新的策略,本研究对 SNL 致 NP 小鼠脊髓小胶质细胞高通量数据集 GSE71136 进行了生物信息学分析[24],筛选出上调的核心基因 *Cst*7,其编码的蛋白质 CF 是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,在中枢神经系统中主要存在于小胶质细胞中[25]。MA 等[26]发现小胶质细胞内 CF mRNA 表达上调可以促进实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠大脑白质的髓鞘再生。而 CF 在 NP 的发生发展中的作用尚未见报道。MAGISTER 等[27]研究发现在培养的树突状细胞中,CF 可以与组织蛋白酶 S(Cathepsin S,CatS)共定位。而 CatS 是一种半胱氨酸蛋白酶,主要存在于小胶质细胞溶酶体中[28]。多项研究表明 CatS 通过下游的 CX3CL1/CX3CR1 通路促进了 NP 的发生[28-29]。因此,本研究选择 SNL 作为 NP 动物模型,并采用 Western blot 检测脊髓内 CF 及其下游 CatS/CX3CL1/CX3CR1 通路的蛋白表达水平,结果表明 SNL 后脊髓 CF 蛋白含量明显下降,CatS/CX3CL1/CX3CR1 通路的蛋白表达水平明显上升,经米诺环素治疗后,CF 蛋白的含量上升,而 CatS/CX3CL1/CX3CR1 通路蛋白含量显著下降,提示 CF 蛋白功能可能与抗炎相关。这与 DUAN 等[30]发现通过使用腺苷 A_2A 受体激动剂,可以升高低糖缺氧处理后 12 h 的 BV2 小胶质细胞内 CF 的蛋白表达水平,降低促炎因子 IL-6 和 IL-1β 蛋白表达水平的结果一致。本研究结果显示 SNL 大鼠脊髓 CF 蛋白表达是降低的,这与数据集 GSE71136 通过对 4 只小鼠的脊髓测序得到的 *Cst*7 基因表达上调结果不一致,其原因可能与样本量不足、动物种类不同或蛋白质翻译异常有关。对此,本研究将在后续的实验中对其进行验证。

综上所述,本研究结果表明采用米诺环素治疗可缓减 SNL 所致的机械性痛敏和冷痛敏,其具体机制可能是米诺环素通过提高脊髓中的 CF 蛋白含量来抑制 CatS/CX3CL1/CX3CR1 信号通路,促使小胶质细胞由促炎 M1 型向抗炎 M2 型转化,平衡 M1/M2 极化以减少炎症因子的释放。这些数据进一步证明通过调控小胶质细胞的表型影响神经病理性疼痛的可能性,也为临床上治疗椎间盘突出症后 NP 提供了新的策略。

参考文献:

[1] LORIO M, KIM C, ARAGHI A, *et al*. International Society for the Advancement of Spine Surgery Policy 2019—surgical treatment of lumbar disc herniation with radiculopathy[J]. Int

J Spine Surg, 2020, 14(1): 1-17. DOI: 10.14444/7001.

[2] 殷利军, 陈辉, 熊利泽. 神经病理性疼痛动物模型的选择与建立[J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(10): 725-730. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2023.10.002.
YIN L J, CHEN H, XIONG L Z. Selection and establishment of animal models of neuropathic pain[J]. Chin J Pain Med, 2023, 29(10): 725-730. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2023.10.002.

[3] XU F T, HUANG J, HE Z H, *et al*. Microglial polarization dynamics in dorsal spinal cord in the early stages following chronic sciatic nerve damage[J]. Neurosci Lett, 2016, 617: 6-13. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.038.

[4] 方茜, 吴文, 唐丹喆. 脊髓小胶质细胞的极化对神经病理性疼痛的影响[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(4): 285-289. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2022.04.008.
FANG Q, WU W, TANG D Z. Effect of polarization of spinal microglia on neuropathic pain[J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(4): 285-289. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2022.04.008.

[5] KARAVIS M Y, SIAFAKA I, VADALOUCA A, *et al*. Role of microglia in neuropathic pain[J]. Cureus, 2023, 15(8): e43555. DOI: 10.7759/cureus.43555.

[6] 黄小丽, 谭川, 林菁艳, 等. 体视学研究 SNL 模型大鼠脊髓背角胶质细胞数量的动态变化[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(5): 629-634. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2016.05.0014.
HUANG X L, TAN C, LIN J Y, *et al*. Stereological study on the dynamic changes in the number of glial cells in the spinal dorsal horn of rats with spinal nerve ligation[J]. Chin J Neuroanat, 2016, 32(5): 629-634. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2016.05.0014.

[7] ZHOU X X, TAO L, ZHAO M R, *et al*. Wnt/β-catenin signaling regulates brain-derived neurotrophic factor release from spinal microglia to mediate HIV_1 gp120-induced neuropathic pain[J]. Mol Pain, 2020, 16: 1744806920922100. DOI: 10.1177/1744806920922100.

[8] SHINODA M, FUJITA S, SUGAWARA S, *et al*. Suppression of superficial microglial activation by spinal cord stimulation attenuates neuropathic pain following sciatic nerve injury in rats[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2390. DOI: 10.3390/ijms21072390.

[9] ASANO S, HAYASHI Y, IWATA K, *et al*. Microglia-astrocyte communication *via* C1q contributes to orofacial neuropathic pain associated with infraorbital nerve injury[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(18): 6834. DOI: 10.3390/ijms21186834.

[10] BURKE N N, KERR D M, MORIARTY O, *et al*. Minocycline modulates neuropathic pain behaviour and cortical M1-M2 microglial gene expression in a rat model of depression[J]. Brain Behav Immun, 2014, 42: 147-156. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.06.015.

[11] SHIN D A, KIM T U, CHANG M C. Minocycline for controlling neuropathic pain: a systematic narrative review of studies in humans[J]. J Pain Res, 2021, 14: 139-145. DOI: 10.2147/JPR.S292824.

[12] KONG G G, HUANG Z P, ZHU Q G, *et al*. Comparison of two modified methods of intrathecal catheterization in rats[J]. Exp Anim, 2020, 69(2): 219-223. DOI: 10.1538/expanim.19-0108.

[13] 杨林凤, 黄静, 杨雁琪, 等. 神经生长因子对坐骨神经损伤大鼠脊髓内神经纤维的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2022, 38(6): 677-682. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2022.06.011.
YANG L F, HUANG J, YANG Y Q, *et al*. The effects of nerve growth factor on nerve fibers within spinal cord in rats with sciatic nerve injury[J]. Chin J Neuroanat, 2022, 38(6): 677-682. DOI: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2022.06.011.

[14] LIN J Y, HE Y N, ZHU N, *et al*. Metformin attenuates increase of synaptic number in the rat spinal dorsal horn with painful diabetic neuropathy induced by type 2 diabetes: a stereological study[J]. Neurochem Res, 2018, 43(12): 2232-2239. DOI: 10.1007/s11064-018-2642-4.

[15] KIM S H, CHUNG J M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat[J]. Pain, 1992, 50(3): 355-363. DOI: 10.1016/0304-3959(92)90041-9.

[16] MARTIN P Y, DOLY S, HAMIEH A M, *et al*. mTOR activation by constitutively active serotonin6 receptors as new paradigm in neuropathic pain and its treatment[J]. Prog Neurobiol, 2020, 193: 101846. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101846.

[17] 薛松, 孙涛. 小胶质细胞介导脊髓损伤后神经病理性疼痛机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(3): 165-172. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2022.03.002.
XUE S, SUN T. Research progress on the mechanism of microglia in neuropathic pain after spinal cord injury[J]. Chin J Pain Med, 2022, 28(3): 165-172. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9852.2022.03.002.

[18] ATTA A A, IBRAHIM W W, MOHAMED A F, *et al*. Microglia polarization in nociplastic pain: mechanisms and perspectives[J]. Inflammopharmacology, 2023, 31(3): 1053-1067. DOI: 10.1007/s10787-023-01216-x.

[19] ZHANG L Q, GAO S J, SUN J, *et al*. DKK3 ameliorates neuropathic pain *via* inhibiting ASK-1/JNK/p-38-mediated microglia polarization and neuroinflammation[J]. J

Neuroinflammation, 2022, 19(1): 129. DOI: 10.1186/s12974-022-02495-x.

[20] ANDERSEN A M, KAALUND S S, MARNER L, *et al*. Quantitative cellular changes in multiple system atrophy brains[J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2023, 49(6): e12941. DOI: 10.1111/nan.12941.

[21] MÜHLFELD C, SCHIPKE J. Methodological progress of stereology in cardiac research and its application to normal and pathological heart development[J]. Cells, 2022, 11(13): 2032. DOI: 10.3390/cells11132032.

[22] LIN J Y, ZHU N, HE Y N, *et al*. Stereological study on the numerical plasticity of myelinated fibers and oligodendrocytes in the rat spinal cord with painful diabetic neuropathy[J]. Neuroreport, 2020, 31(4): 319-324. DOI: 10.1097/WNR.0000000000001407.

[23] LI Z L, WEI H, PIIRAINEN S, *et al*. Spinal versus brain microglial and macrophage activation traits determine the differential neuroinflammatory responses and analgesic effect of minocycline in chronic neuropathic pain[J]. Brain Behav Immun, 2016, 58: 107-117. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.05.021.

[24] DENK F, CROW M, DIDANGELOS A, *et al*. Persistent alterations in microglial enhancers in a model of chronic pain[J]. Cell Rep, 2016, 15(8): 1771-1781. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.063.

[25] WATTS C. Lysosomes and lysosome-related organelles in immune responses[J]. FEBS Open Bio, 2022, 12(4): 678-693. DOI: 10.1002/2211-5463.13388.

[26] MA J M, TANAKA K F, SHIMIZU T, *et al*. Microglial cystatin F expression is a sensitive indicator for ongoing demyelination with concurrent remyelination[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(5): 639-649. DOI: 10.1002/jnr.22567.

[27] MAGISTER S, OBERMAJER N, MIRKOVIC B, *et al*. Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells[J]. Eur J Cell Biol, 2012, 91(5): 391-401. DOI: 10.1016/j.ejcb.2012.01.001.

[28] CLARK A K, MALCANGIO M. Microglial signalling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine[J]. Exp Neurol, 2012, 234(2): 283-292. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.09.012.

[29] SILVA R, MALCANGIO M. Fractalkine/CX_3CR_1 pathway in neuropathic pain: an update[J]. Front Pain Res, 2021, 2: 684684. DOI: 10.3389/fpain.2021.684684.

[30] DUAN W, WANG H X, FAN Q L, *et al*. Cystatin F involvement in adenosine A_{2A} receptor-mediated neuroinflammation in BV2 microglial cells[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6820. DOI: 10.1038/s41598-018-25031-5.00000000000000000

(**收稿**:2024-02-04;**修回**:2024-03-24)

(编辑 吴培红)