

• 学术动态 •

坐骨神经阻滞缓解新生儿手术切口致切口痛敏化的新机制

摘 要 坐骨神经阻滞或可预防新生儿损伤引起的再损伤后疼痛反应加剧,目前正在研究之中。脊髓小胶质细胞过度激活、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和含有 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (SHP2) 参与新生动物手术切口导致的切口痛敏化。然而,坐骨神经阻滞对切口痛敏化的影响及其机制尚不清楚。该研究发现,坐骨神经阻滞可减轻新生儿期切口、成年期再次切口大鼠 (nIN-IN) 的痛敏反应和脊髓小胶质细胞激活。使用化学遗传学工具激活或抑制脊髓小胶质细胞,能分别模拟或减弱坐骨神经阻滞对痛行为的影响。此外,脊髓背角 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-丙酸异恶唑 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPA) 受体 GluA1 亚基参与切口痛敏化。在 nIN-IN 大鼠抑制 BDNF 或 SHP2,阻断了下游分子的上调。在仅新生儿期切口的成年大鼠 (nIN) 敲减 SHP2,可抑制鞘内给予 BDNF 引起的 GluA1 增加。在 nIN-IN 啮齿类动物抑制小胶质细胞或敲除小胶质细胞的 BDNF,可抑制 SHP2 和 GluA1 的上调。此外,坐骨神经阻滞后可下调此三分子表达。BDNF、SHP2 或 AMPA 受体的上调,可减弱坐骨神经阻滞对下游分子、痛行为的缓解作用。小胶质细胞激活可消除坐骨神经阻滞对此三分子的下调。上述结果表明,坐骨神经阻滞通过减少脊髓小胶质细胞激活,下调 BDNF/SHP2/含有 GluA1 亚基 AMPA 受体信号通路,从而缓解新生儿期切口致切口痛敏化。因此,坐骨神经阻滞可能是切口痛敏化的一种防治策略。

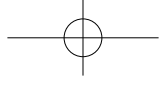
一、主要研究背景

坐骨神经阻滞或可治疗新生儿疼痛经历导致的再次损伤后疼痛反应加剧,是一种可能的预防策略。在极早产儿,新生儿手术与更差的神经发育结果、成年期躯体感觉功能改变相关。啮齿类动物研究表明,新生动物后足切口改变了中枢神经系统的功能和结构,导致成年期再次损伤后切口痛恶化。新生儿损伤对疼痛通路的长期影响,提示了预防策略研究的必要性。新生儿期手术时进行坐骨神经阻滞,可防止新生儿期切口、未经或经再次切口的幼年或成年啮齿动物脊髓兴奋性突触传递增加,并缓解成年期下行抑制和整体痛觉抑制。然而,坐骨神经阻滞对切口痛敏化的长期影响及其机制仍不清楚。

生命早期的不良生活事件会破坏小胶质细胞的成熟,引发其表型变化,并改变其对后期免疫或环境挑战的反应性。特别是,大量研究表明,新生儿期疼痛经历导致脊髓小胶质细胞的过度激活。注射小胶质细胞抑制剂或小胶质细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38) 抑制剂,可缓解新生儿切口引起的切口痛敏化。此外,坐骨神经阻滞可防止成年动物周围神经损伤后的小胶质细胞激活及 p38 磷酸化;相

反,在未经或经新生儿期切口的成年动物中,电刺激坐骨神经,会诱导或加剧脊髓小胶质细胞的激活。然而,脊髓小胶质细胞激活的减少,是否参与坐骨神经阻滞对切口痛敏化的长期作用尚不清楚。

研究者之前发表的文献已经证明,脊髓背角的脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、含有 SH2 结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶 2 (src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase 2, SHP2), 分别参与新生儿期切口导致的切口痛敏化。特别是,鞘内注射小胶质细胞抑制剂,可缓解新生儿期切口导致的 BDNF 增加。越来越多的证据表明,部分来源于小胶质细胞的脊髓 BDNF 在疼痛过程中具有重要作用。此外,在神经病理性疼痛中,BDNF 上调 SHP2。BDNF 增加 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPA) 受体 GluA1 亚基的磷酸化和膜转运。在成年动物,脊髓背角 GluA1 是切口痛的基础,并参与成年期经历引起的切口痛时程的延长。SHP2 的激活,上调了 GluA1 的磷酸化和膜转运。这些发现提示,依赖于小胶质细胞的脊髓 BDNF,可能通过 SHP2 调控



含 GluA1 亚基的 AMPA 受体, 进而参与坐骨神经阻滞对切口痛敏化的持续作用。

该研究探讨了坐骨神经阻滞对新生儿期切口致切口痛敏化的长期影响和机制。该研究的结果表明, 坐骨神经阻滞减少了脊髓小胶质细胞激活, 下调了 BDNF/SHP2/含有 GluA1 亚基的 AMPA 受体信号通路, 从而对切口痛敏化发挥了有益作用。因此, 临床实践中, 新生儿手术时的坐骨神经阻滞, 可能是对术后痛敏化的一种预防策略。

二、主要研究结果

1. 新生儿期切口时坐骨神经阻滞, 可减轻新生儿期、成年期切口大鼠的痛敏和脊髓小胶质细胞激活。

为了研究坐骨神经阻滞对切口痛敏化的长期影响, 在新生儿期切口时(切口前 15 min, 之后 2 h 间隔/次 × 3 次), 用局部麻醉剂左旋布比卡因进行坐骨神经阻滞。成年大鼠进行了新生儿期和成年期 2 次切口(nIN-IN), 以模拟生命早期损伤引起的切口痛敏化, 对照组包括进行新生儿期假手术成年期切口组(nSham-IN)、成年期切口组(IN)、成年期假手术组(Sham)、新生儿期切口组(nIN)、新生儿期假手术组(nSham)、正常组。除坐骨神经阻滞和新生儿期切口外, 该研究中的所有操作均在成年期进行。行为学结果显示, 坐骨神经阻滞缓解了 nIN-IN 大鼠机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)和热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)的降低。

离子钙接头蛋白 1 (ionized calcium binding adaptor molecule-1, Iba1) 是小胶质细胞标记物, 其表达增加提示小胶质细胞激活。免疫组化染色显示, 坐骨神经阻滞抑制了 nIN-IN 大鼠脊髓背角 Iba1 阳性染色的增加、细胞形态的改变(肥大的胞体、较厚的缩短的突起)。另外, 酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)结果显示, 坐骨神经阻滞缓解了促炎细胞因子白介素-1 β 、白介素-6、肿瘤坏死因子- α 、单核细胞趋化蛋白-1 的上调。p38 磷酸化是小胶质细胞反应性的功能标记物, 且在 nIN-IN 大鼠仅表达于小胶质细胞。Western blot 结果显示, 坐骨神经阻滞缓解了 nIN-IN 大鼠脊髓背角 p38 磷酸化的增加。以上结果表明, 坐骨神经阻滞可减轻 nIN-IN 大鼠的痛敏和脊髓小胶质细胞激活。

2. 脊髓小胶质细胞的化学激活或抑制, 减弱或模拟坐骨神经阻滞对 nIN-IN 大鼠痛行为的影响。

为了进一步探讨脊髓小胶质细胞在坐骨神经阻

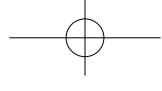
滞效应中的作用, 脊髓鞘内注射表达 CD68 启动子/增强子控制下人工设计受体(hM3Dq 或 hM4Di)的重组腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、配体氯氮平-N-氧化物(clozapine-N-oxide, CNO), 通过化学遗传学工具、在体特异性激活或抑制脊髓小胶质细胞。首先, 验证了化学遗传工具对脊髓小胶质细胞的激活作用。免疫组织化学结果显示, hM3Dq 在脊髓背角表达, 并与 Iba1 共定位。给予 CNO 后, 增加了 Iba1 阳性细胞数量, 改变了细胞形态, 升高了促炎细胞因子浓度, 增加了 p38 磷酸化。之后, 进行了行为学检测, 结果显示激活脊髓小胶质细胞, 降低了坐骨神经阻滞在 nIN-IN 大鼠中对 MWT 和 TWL 的影响。

相反, 使用表达 hM4Di 的重组 AAV 抑制小胶质细胞。验证实验显示, hM4Di 表达于多数小胶质细胞。给予 CNO, 降低了 Iba1 阳性染色、形态改变、促炎细胞因子上调、p38 磷酸化。成年期切口后 1~14 天, 抑制脊髓小胶质细胞, 缓解了 MWT 和 TWL 的下降。抑制小胶质细胞在 nSham-IN 大鼠也于 1~3 天减轻疼痛, 但其在 nIN-IN 大鼠具有更长的作用时间(14 天, 3 天), 这与之前的报道一致, 即小胶质细胞激活参与成年期切口痛, 而新生儿期疼痛经历加剧了脊髓小胶质细胞在切口痛中的作用。这些结果表明, 操纵脊髓小胶质细胞, 可减弱或模拟坐骨神经阻滞对痛敏反应的有益影响。综上所述, 证明了脊髓小胶质细胞参与坐骨神经阻滞对切口痛敏化的缓解作用。

3. 脊髓背角 AMPA 受体 GluA1 亚基参与新生儿期切口致切口痛敏化。

在成年期切口或假手术后 1 天, 尽管未观察到总 GluA1 表达的改变, nIN-IN 大鼠脊髓背角 GluA1 丝氨酸 845 位点(S845)的磷酸化增强。此外, GluA1 的膜转运在 IN 大鼠中增加, 在 nIN-IN 大鼠中进一步增加。而丝氨酸 831 位点(S831)的磷酸化在 IN 大鼠中升高, 在 nIN-IN 大鼠中未见进一步改变。在成年期切口或假手术后 7 天, IN 大鼠中 S831 磷酸化、膜转运, 均已恢复。而 nIN-IN 大鼠中 S845 磷酸化、膜转运, 仍处于上调状态。上述结果提示, GluA1 S845 磷酸化、膜转运可能参与切口痛敏化。

IEM-1460 是缺乏 GluA2 亚基 AMPA 受体的拮抗剂, 鞘内注射 IEM-1460 挽救了 nIN-IN 大鼠中 MWT 和 TWL 的降低。与 nSham-IN 大鼠相比, IEM-1460 在 nIN-IN 大鼠的有效时间更长。AMPA 是 AMPA 受体的激动剂, 与 nSham 大鼠相比, nIN



大鼠中 AMPA 导致的痛阈降低的持续时间更长。上述结果证明, 含有 GluA1 亚基的 AMPA 受体参与切口痛敏化。

4. 脊髓背角 BDNF 通过 SHP2 增加 GluA1, 进而参与切口痛敏化。

鞘内注射 TrkB-Fc 清除内源性 BDNF, 抑制了 nIN-IN 大鼠成年期切口后 1~7 天 SHP2 磷酸化的增加。同时, 注射 TrkB-Fc, 可抑制 GluA1 S845 磷酸化和膜转运的上调。相反, 在 nIN 大鼠鞘内给予外源性 BDNF, 可提高 SHP2 磷酸化, 并增强 GluA1 磷酸化和膜转运。通过免疫荧光和 ELISA 实验, 验证了重组慢病毒对 SHP2 的敲减作用。nIN-IN 大鼠中, 敲减 SHP2 改善了 GluA1 磷酸化和膜转运的增加。相反, 鞘内注射重组慢病毒以过表达 SHP2, 增强了 GluA1 的磷酸化和膜转运。之后, 研究了 BDNF 诱导的 nIN 大鼠 GluA1 上调, 是否依赖于 SHP2。nIN 大鼠敲减 SHP2, 减弱了注射 BDNF 上调的 GluA1, 并缓解了痛阈降低。综上所述, BDNF 通过 SHP2 上调 GluA1, 进而导致切口痛敏化。

5. 抑制脊髓小胶质细胞, 缓解了 nIN-IN 大鼠 BDNF、SHP2 和 GluA1 的上调。

在 nIN-IN 大鼠抑制小胶质细胞, 缓解了 BDNF 表达、SHP2 磷酸化、GluA1 磷酸化和膜转运的上调; 相反, nIN 大鼠中激活小胶质细胞, 导致了 BDNF、SHP2 和 GluA1 的上调, 及痛阈的降低。然后, 使用 Cx3cr1^{CreER/+}; Bdnf^{flax/flax} 小鼠, 检测了小胶质细胞 BDNF 的作用。在该小鼠中, 通过注射他莫昔芬, 可选择性地从小胶质细胞中删除 BDNF。结果表明, 与表型正常的小鼠相比, 小胶质细胞 BDNF 缺失小鼠中的 BDNF、SHP2、GluA1 减少。这些结果表明, BDNF/SHP2/含有 GluA1 的 AMPA 受体通路在切口痛敏化过程中的作用, 部分依赖于脊髓小胶质细胞。

6. 在 nIN-IN 大鼠, 坐骨神经阻滞可使 BDNF、SHP2 和 GluA1 的表达正常化。

该研究的结果表明, 坐骨神经阻滞减弱了 nIN-IN 大鼠脊髓背角 BDNF、SHP2 的上调。在时间轴上, 坐骨神经阻滞缓解了 nIN-IN 大鼠成年切口后 1~14 天 BDNF 的上调。坐骨神经阻滞还减弱了 nIN-IN 大鼠中 1~7 天磷酸化 SHP2、总 SHP2 的表达增加以及二者的比值。此外, 坐骨神经阻滞缓解了新生儿期、成年期切口导致的 GluA1 增加。这些结果表

明, 坐骨神经阻滞抑制了 nIN-IN 大鼠脊髓背角 BDNF 表达的增加、SHP2 磷酸化和表达的增加, 以及 GluA1 磷酸化和膜转运的增加。

7. 在 nIN-IN 大鼠, 给予 BDNF、过表达 SHP2 或激活 AMPA 受体, 可下调坐骨神经阻滞对下游分子、痛行为的影响。

nIN 大鼠鞘内注射 BDNF, 下调了坐骨神经阻滞对 SHP2、GluA1、痛阈的作用。在进行了坐骨神经阻滞的 nIN-IN 大鼠中过表达 SHP2, 增加了 GluA1 的磷酸化和膜转运, 降低了 MWT 和 TWL。此外, 进行了坐骨神经阻滞的 nIN-IN 大鼠鞘内注射 AMPA, 可降低 MWT 和 TWL。上述结果提示, 坐骨神经阻滞通过抑制 BDNF/SHP2/含 GluA1 亚基的 AMPA 受体信号通路, 对切口痛敏化发挥有益作用。

8. 在 nIN-IN 大鼠, 激活小胶质细胞抑制了坐骨神经阻滞对三分子上调的缓解作用。

成年期切口后 7 天, 激活脊髓小胶质细胞, 抑制了坐骨神经阻滞对 nIN-IN 大鼠背角 BDNF、SHP2 的影响。在时间轴上, 成年期切口后 1~14 天, 小胶质细胞激活降低了坐骨神经阻滞对 BDNF 增加的缓解作用。小胶质细胞激活, 抑制了坐骨神经阻滞对成年切口后 1~7 天 SHP2 磷酸化增加的影响。此外, 小胶质细胞激活, 减弱了坐骨神经阻滞对 nIN-IN 大鼠中 GluA1 增加的影响。这些结果表明, 脊髓小胶质细胞激活, 减弱了坐骨神经阻滞对 BDNF、SHP2 和 GluA1 上调的缓解作用。

综上所述, 该研究证明, 脊髓小胶质细胞激活的减少、参与坐骨神经阻滞对新生儿期切口致切口痛敏化的长期作用。此外, 脊髓背角 BDNF 部分依赖于小胶质细胞, 增加 SHP2 的磷酸化, 上调 AMPA 受体 GluA1 亚基的磷酸化和膜转运, 从而恶化切口痛。相反, 坐骨神经阻滞下调 BDNF/SHP2/含有 GluA1 亚基的 AMPA 受体信号通路, 进而对切口痛敏化产生持续的有益影响。因此, 临床实践中, 新生儿手术期间坐骨神经阻滞, 是术后疼痛敏化的一种可能的预防策略。

(Ding X, Liao FF, Su L, *et al.* Sciatic nerve block downregulates the BDNF pathway to alleviate the neonatal incision-induced exaggeration of incisional pain via decreasing microglial activation. *Brain Behav Immun*, 2022, 105:204-224. 首都医科大学附属北京儿童医院 国家儿童医学中心, 丁绪译, 杨溪校)