



• 论 著 •

Bay 60-7550 对脊髓损伤大鼠机械痛阈及细胞极化的影响 *

杨文洁¹ 孙 涛¹ 韩 杰¹ 杨 磊² 王珺楠^{1△}

(¹ 山东第一医科大学附属省立医院疼痛科, 济南 250021; ² 山东大学威海市立医院疼痛科, 威海 264200)

摘 要 **目的:** 探讨选择性磷酸二酯酶-2A (phosphodiesterase-2A, PDE2A) 抑制剂 Bay 60-7550 对脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 模型大鼠机械痛阈的影响及其可能机制。**方法:** 雄性 SPF 级 SD 大鼠随机分为 4 组: 假手术组 (Sham 组)、模型组 (SCI 组)、给药组 (Bay 60-7550 组) 和溶媒组 (vehicle 组)。术前 1 天至术后 21 天采用 von Frey 纤维丝间断测试大鼠后爪机械痛阈值。免疫组化和 Western blot 检测大鼠脊髓组织中 PDE2A 表达。流式细胞术检测 M1/M2 型小胶质细胞/巨噬细胞极化比例; qRT-PCR 检测小胶质细胞/巨噬细胞及其下游生物标志物 (CD86、CD163、IL-6、IL-1 β 、IL-10、TGF- β) 的表达。**结果:** 鞘内注射 Bay 60-7550 可显著降低脊髓损伤大鼠的机械痛阈值。与 Sham 组相比, 在 SCI 组观察到大鼠脊髓背角 PDE2A 表达增加, 而 Bay 60-7550 组 PDE2A 的过表达被抑制。与 vehicle 组相比, Bay 60-7550 组脊髓促炎因子 (IL-6、IL-1 β) 表达降低、抗炎因子 (IL-10、TGF- β) mRNA 的表达增加。同时, 还观察到鞘内注射 Bay 60-7550 可使 SCI 后小胶质细胞/巨噬细胞 M2 型比例增加, 而 M1 型细胞比例降低。**结论:** 抑制 PDE2A 的过表达能有效缓解大鼠脊髓损伤后神经病理性疼痛, 其机制可能与其调节小胶质细胞/巨噬细胞的极化状态有关。

关键词 磷酸二酯酶-2A; 脊髓损伤; 巨噬细胞; 小胶质细胞; 极化; 神经病理性疼痛

Effects of Bay 60-7550 on the mechanical pain threshold and cell polarization in rats after spinal cord injury *

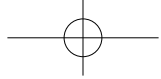
YANG Wenjie¹, SUN Tao¹, HAN Jie¹, YANG Lei², WANG Junnan^{1△}

(¹ Department of Pain Medicine, Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China; ² Department of Pain Medicine, Weihai Municipal Hospital, Shandong University, Weihai 264200, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of Bay 60-7550, a selective phosphodiesterase-2A (PDE2A) inhibitor, on mechanical pain threshold and its potential mechanism in the neuropathic pain (NP) using spinal cord injury (SCI) rat model. **Methods:** Male SD rats were randomly divided into four groups: the Sham group, SCI group, SCI + Bay 60-7550 group, and SCI + Vehicle group. The mechanical pain thresholds were evaluated by the von Frey test from the day before surgery until the 21th postoperative day. The expression level of PDE2A in the spinal cord was measured by immunohistochemistry and Western blot. The proportion of M1/M2 microglia/macrophages polarization was assessed by flow cytometry. The expression of microglia/macrophages and their downstream biomarkers (CD86, CD163, IL-6, IL-1 β , IL-10, TGF- β) were measured by qRT-PCR. **Results:** Intrathecal administration of Bay 60-7550, significantly attenuated mechanical allodynia in SCI rats. Compared with the Sham group, PDE2A expression was elevated in the spinal dorsal horn of SCI rats, while the overexpression of PDE2A was inhibited by the treatment of Bay 60-7550. Bay 60-7550 reduced pro-inflammatory factors (IL-6, IL-1 β) expression, increased anti-inflammatory factors (IL-10, TGF- β) expression in the spinal cord com-

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81972145, 81772443); 山东省自然科学基金面上项目 (ZR2020MH283); 山东省中医药科技面上项目 (M-2022210)

△ 通信作者 王珺楠 junnan_w@126.com



pared with group vehicle. Consistently, Bay 60-7550 treatment promoted the proportion of M2-type microglia/macrophages, but decreased the proportion of M1-type microglia/macrophages in SCI rats. **Conclusion:** Inhibiting the overexpression of PDE2A might attenuate the development of NP in rats with neuropathic pain, and the mechanism might be related to the polarization of microglia/macrophages polarization.

Keywords phosphodiesterase-2A; spinal cord injury; macrophages; microglia; polarization; neuropathic pain

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 后常见且难以控制的并发症之一^[1]。据统计, 全球 SCI 发病率为 30~40/(100 万·年), 我国各地综合发病率为 23.7/(100 万·年), 其中有 53%~80% 的人会出现 NP^[2]。其临床表现复杂多样, 疼痛剧烈、迁延难愈, 严重影响了病人的生活质量, 导致抑郁甚至自杀^[3]。目前脊髓损伤后神经病理性疼痛 (SCI-induced neuropathic pain, SCI-NP) 的治疗主要有药物治疗和非药物治疗两种方案, 其中药物治疗是 SCI-NP 最基础及最常用的方法, 包括一线的抗惊厥药、三环抗抑郁药, 二、三线的曲马多、阿片类镇痛药、非甾体抗炎药等, 但长期应用药物导致的耐受性、依赖性、药物滥用等不良反应仍是临床治疗的挑战^[4]。同时, 由于 SCI-NP 具体机制复杂不明, 不同病人间临床疗效个体差异较大, 目前尚缺乏更有效的治疗方案。因此, 积极探索 SCI-NP 的发病机制, 寻找有效的药物及手术治疗靶点, 是当前亟待解决的问题。

SCI-NP 发病机制复杂, 中枢敏化是 NP 发展和维持的基础。研究证明, SCI 后持续增加的炎症反应通过形成中枢敏化介导 NP, 而损伤区小胶质细胞/巨噬细胞极化失衡在形成中枢敏化过程中发挥重要作用^[5]。文献表明, 小胶质细胞/巨噬细胞表型转换是一个动态重叠的过程^[6], 改善抗炎微环境, 逆转其极化失衡, 可能是更具优势的 SCI-NP 治疗策略。

环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 和环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 是细胞内重要的第二信使, 已被证明对细胞免疫反应具有负性调节作用^[7]。磷酸二酯酶 (phosphodiesterases, PDEs) 是细胞内唯一可调节 cAMP 和/或 cGMP 水平的关键酶, 包括 11 种同工酶 (PDE1-PDE11)^[8]。其中, 磷酸二酯酶-2A (phosphodiesterase-2A, PDE2A) 是一种被 cGMP 刺激可同时降解 cAMP 和 cGMP 的双底物酶, 其广泛分布于人体的大脑等多种组织中; 近年来, PDE2A 在治疗心力衰竭、改善学习及认知功能、改善抑郁焦虑样行为等方面成为重要的研究靶点^[9]。Beshay 等^[10]通过小鼠体内及 RAW-264.7 巨噬细胞系体外实验证明 PDE 抑制剂可抑制巨噬细胞活化和一氧化氮生成, 因此

也是多种免疫过程的有效调节剂。最近一项研究表明, PDE2 抑制剂 Bay 60-7550 可缓解轻度睡眠不足模型小鼠的持续术后疼痛, 但 Bay 60-7550 镇痛的具体机制尚不清楚^[11]。此外, PDE2A 在大鼠脊髓背角和背根神经节的神经元细胞中含量较丰富, 并推测其在伤害性信息的处理中发挥重要作用^[12]。然而, 目前国内外尚无 PDE2A-小胶质细胞/巨噬细胞极化在 SCI-NP 模型中的研究。因此, 本研究通过建立大鼠 SCI-NP 模型, 观察选择性 PDE2A 抑制剂对 SCI-NP 的抗炎和镇痛效果, 探究 PDE2A-小胶质细胞/巨噬细胞极化在 SCI-NP 形成中的作用及其可能机制。

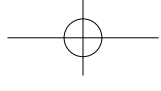
方 法

1. 实验动物

SPF 级健康 SD 大鼠, 雄性, 6~7 周龄, 体重 210~260 g, 由济南朋悦实验繁育有限公司提供 [许可证号: SCXK (鲁) 20190003]。所有实验大鼠饲养于室温 25±1℃、湿度 45%±5%、昼夜周期为 12 h 的鼠房中, 大鼠可自由地进食水。所有动物饲养和实验操作程序已通过山东大学附属省立医院实验动物伦理委员会批准 (伦理批号: NSFC: NO.2019-202)。

2. 主要实验药物及试剂

Bay 60-7550 (CAS No.:439083-90-6) 和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Med Chem Express 公司。免疫组化一抗 PDE2A 购于武汉三鹰生物技术有限公司, 山羊抗兔二抗购于山东思科捷生物技术有限公司。PCR 引物: PDE2A、CD86 (cluster of differentiation 86)、CD163 (cluster of differentiation 163)、IL-6 (interleukin 6)、IL-1β (interleukin 1β)、IL-10 (interleukin 10)、TGF-β (Transforming Growth Factor-β) 委托上海博尚生物公司合成, Trizol RNA 提取试剂盒 (AG21102)、Evo M-MLV 反转录试剂预混液 (AG1172)、Pro Taq HS SYBR Green 预混 qPCR 试剂盒 (AG11701) 均购自湖南艾科瑞生物公司。流式细胞术应用抗体 Granulocyte-FITC (clone HIS48), Major Histocompatibility Complex II-PerCP-eFluor 710 (MHCII-PerCP-eFluor 710)(clone OX17) 和 CD11b/c-eFluor 660 (clone OX42) 均购自美国 eBioscience 公



司, CD172a-PE (clone OX41) 购自美国 BioLegend 公司。

3. 实验分组

根据既往研究^[13], 通过预实验探索鞘内注射 Bay 60-7550 的有效浓度。预实验中将大鼠随机分为 3 组 (每组 3 只): 溶媒组 (vehicle 组)、给药组 (Bay 60-7550 0.1 mg/kg 组和 Bay 60-7550 1 mg/kg 组)。根据预实验结果, 正式实验大鼠随机分为 4 组 (每组共 24 只大鼠, 每组取 3~5 只分别用于分子生物学及行为学检测): 假手术组 (Sham 组)、模型组 (SCI 组)、给药组 (Bay 60-7550 组) 和溶媒组 (vehicle 组)。Sham 组: 仅切除椎板、鞘内置管而不损伤脊髓; SCI 组: 建立大鼠脊髓损伤模型并鞘内置管; vehicle 组: 脊髓损伤大鼠鞘内注射 10 μ l 10% DMSO (溶解 Bay 60-7550 粉末的溶媒组对照); Bay 60-7550 组: 脊髓损伤大鼠按照 1 mg/kg 的浓度鞘内注射 10 μ l Bay 60-7550。

4. 建立脊髓损伤模型

采用改良 Allen 法建立大鼠 SCI 模型^[14]。腹腔注射 2% 阿佛丁 (10 ml/kg) 麻醉大鼠, 待大鼠无伤害刺激反应后俯卧位固定于手术板上。分别定位大鼠髋关节和最下肋骨, 以定位点为中心向头尾两侧 5 cm 范围备皮, 消毒铺巾。首先, 于大鼠背部以 L₅ 椎体为中心沿后正中中线做约 1 cm 纵行切口, 应用聚乙烯套管 (PE-10) 经 L₅ 椎体下缘椎间隙垂直穿刺, 将导管沿头侧端置入脊髓蛛网膜下腔, 深度约 0.5 cm, 此时脑脊液可从鞘内导管流出。待大鼠麻醉恢复期, 鞘内注射 2% 利多卡因 10 μ l, 若出现双后肢拖拽行为或无力表现, 则证明鞘内给药在合适的位置。应用 3-0 缝线将导管牢牢地固定于皮下并分层缝合切口。

然后, 以 T₁₀ 椎体为中心向头、尾两侧做约 3 cm 纵行切口, 分离肌腱和周边肌肉组织充分暴露 T₉~T₁₁ 椎板棘突和椎板, 取出切除的 T₁₀ 椎板及棘突, 充分暴露相应节段的脊髓。将 10 g 铁棒沿玻璃管从 30 mm 高度垂直下落撞击脊髓, 建立 SCI 模型, 术后充分止血缝合。术后每日 1 次肌肉注射青霉素 20 \times 10⁴ U, 连续 5 天预防感染。将大鼠放回干净温暖的笼内饲养恢复。此后每日人工排尿 2 次 (6:00~8:30 和 16:30~18:00), 直至损伤大鼠可连续 3 天自行排尿。

5. 鞘内注射给药

Bay 60-7550 溶液现用现配: 给药前将 Bay 60-7550 固体粉末溶解于 10% DMSO 中, 使溶液 pH 值调整为 7.4。预实验中, 异氟醚麻醉下, Bay 60-7550 0.1 mg/kg 组经大鼠鞘内导管注射 10 μ l Bay 60-7550 (0.1 mg/kg); Bay 60-7550 1 mg/kg 组经鞘内导管注

射 10 μ l Bay 60-7550 (1.0 mg/kg); vehicle 组鞘内注射相同剂量的 DMSO (10 μ l)。正式实验中, 异氟醚麻醉下, 分别给 Bay 60-7550 组及 vehicle 组大鼠经鞘内导管注射 Bay 60-7550 (1.0 mg/kg, 10 μ l) 或 DMSO (10 μ l)。预实验和正式实验均于术后每日固定时间鞘内注射 Bay 60-7550 或 DMSO (10 μ l/d) 1 次, 持续 1 周。

6. 机械痛阈评估

采用 Chaplan 等^[15]报道的机械痛阈评估方法来测量大鼠 50% 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT), 每组随机分配 5 只大鼠。为避免主观误差, 观察者隐瞒实验大鼠的分组情况。在正常光照和均匀噪声条件下, 测量时间固定在上午 8 点至 12 点之间, 同一观察者于术前、术后第 7、10、14、17、21 天测定大鼠双后爪 50% MWT, 并取双后爪 50% MWT 平均值。

具体测量方法如下: 将大鼠放置于底部为金属网的透明玻璃箱内, 使大鼠适应测试笼环境至少 30 min, 直至其探索活动消失。应用 8 根 von Frey 纤维丝 (0.4 g、0.6 g、1.0 g、2.0 g、4.0 g、6.0 g、8.0 g、15.0 g, 美国 Stoelting 公司生产), 按 “Up-Down” 的方法依序刺激大鼠后爪底部中央。首先, 施加 2.0 g 的纤维丝, 持续刺激约 6~8 s, 观察大鼠是否出现快速缩足、舔足或摇晃反应, 若出现则认定为阳性反应。在阳性反应情况下, 标记结果为 “X”, 按顺序换用小一号的纤维丝。在阴性反应下, 结果标记为 “0”, 并换用大一号的纤维丝刺激。当出现第 1 次前后刺激反应变化后, 继续测量 4 次, 结果序列用于计算 50% MWT。50% MWT 的计算公式为: 50% MWT = 10^(Xf+ κ) (Xf 为最后一个 von Frey 纤维丝力度值的对数, κ 为阳性/阴性反应序列的对应值, δ = 0.224)。为避免大鼠出现机械性痛觉敏化, 每次刺激至少间隔 2 min。

7. 免疫组织化学染色

术后第 7 天, 用 1.2% 阿佛丁 (10 ml/kg) 麻醉大鼠, 行升主动脉插管, 依次用 0.9% 氯化钠注射液 200 ml 和 4% 多聚甲醛 250 ml 进行心脏灌注, 解剖分离 T₉~T₁₀ 脊髓组织 (每组 3 只大鼠), 置于 4% 多聚甲醛固定 24 h。免疫组化操作按照 Stephenson 等^[12]文献中描述的步骤。用距正中 (T₉~T₁₀) 尾侧 1 mm 处相对完整的脊髓组织制备石蜡切片, 厚度约为 5 μ m。切片经脱蜡、复水、抗原修复固定、洗涤和封闭后, 与抗兔 PDE2A 一抗 (1:150, Cat. No.: 55306-1-AP) 在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 经磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤后, 将组织与山羊抗兔二抗 (1:200) 在室温

下孵育 40 min, 接着用 PBS 洗涤。使用 DAB 试剂盒 (山东思科捷生物技术有限公司) 进行染色, 并用苏木精进行复染。最后, 使用奥林巴斯 BX60 显微镜 (奥林巴斯光学有限公司, 日本东京) 对染色的组织切片进行拍照。应用 Image J 图像分析软件, 根据光密度 (optical density, OD) 值计算图像中 PDE2A 的阳性表达水平。

8. Western blot 检测

术后第 7 天, 麻醉灌注后分别取各组大鼠 T₉~T₁₁ 节段的脊髓组织, 置于液氮保存。脊髓组织称重在冰上剪碎, 置于 RIPA (radio-immunoprecipitation assay) 裂解缓冲液中匀浆提取蛋白质。根据说明书通过 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白质浓度。蛋白质在 7.5% 分离胶上进行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 电泳分离, 后将其转移至 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上置于 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h。封闭结束后将洗涤好的 PVDF 膜置于一抗 PDE2A 稀释液 (1:1000, Cat. No.55306-1-AP) 中, 4℃ 孵育, 摇床过夜。TBST 洗涤后, 置于抗兔 HRP (horseradish peroxidase) 二抗 (1:1000) 室温孵育 1.5 h。经 TBST 洗涤 3 次 (每次 10 min) 后, 在膜上滴加 ECL 显影液, 于成像分析仪上显像。使用 Image J 分析各条带灰度值, PDE2A 与 β-actin 灰度值的比值作为 PDE2A 的相对表达量, 每组数据以 Sham 组作归一化处理。

9. 实时逆转录聚合酶链反应检测 (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)

术后第 7 天, 分离大鼠 T₉~T₁₁ 节段的脊髓组织, 液氮保存。应用 RNAex Pro 试剂提取脊髓组织中的 RNA。参照试剂盒说明书要求, 使用 Evo M-MLV 反转录预混型试剂盒将提取的 RNA 逆转录为 cDNA, 然后用 Pro Taq HS SYBR Green 预混 qPCR 试剂盒进行 PCR 扩增。最后, 将扩增的 PCR 应用瑞士 Roche 公司的 Light Cycler®480 II 进行实时荧光定量 PCR 检测, 分析 Real-time PCR 扩增及溶解曲线, 以内参 GAPDH

(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 为对照, 采用 2^{-ΔCT} 公式进行 mRNA 相对表达量分析。GAPDH、M1 型小胶质细胞 / 巨噬细胞表面标记物 CD86 及促炎因子: IL-6、IL-1β 和 M2 型细胞表面标记物 CD163 及抗炎因子: IL-10、TGF-β 的引物 (见表 1)。

10. 流式细胞术

术后第 7 天, 大鼠在 1.2% 阿佛丁深麻醉下, 心脏灌注 PBS 后, 分离 T₉~T₁₁ 脊髓节段置于含 5% 胎牛血清的培养基 (Gibco, 赛默飞世尔科技公司) 中, 转移至 4℃ 冰上进行后续操作; 将脊髓组织剪成小碎块, 加入与培养基等体积的 0.25% 胰蛋白酶液 (不含 EDTA, 购自南京凯基生物科技发展有限公司) 进行消化, 15 min 后加入与胰蛋白酶溶液等体积的 5% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 封闭, 经 75 μm 细胞滤器过滤制备单细胞悬液。密度梯度离心法分离单个核细胞^[16]。离心后获得的单细胞悬液使用抗大鼠流式细胞术抗体: Granulocyte-FITC (0.25 μg/100 μl)、CD172a-PE (0.25 μg/100 μl)、MHCII-PerCP-eFluor 710 (0.25 μg/100 μl) 和 CD11b/c-eFluor 660 (0.125 μg/100 μl) 染色 30 min。用 400 μl PBS 重悬细胞, 应用流式细胞仪 (LSRFortessa™, BD, Cat.No.649225) 采集单细胞并分析。通过 FlowJo™ 10.4 软件 (BD) 进行数据分析。其中小胶质细胞/巨噬细胞被标记为 CD11b/c⁺Granulocyte⁻、MHCII⁺CD172a⁻ (M1 型) 和 CD172a⁺MHCII⁻ (M2 型) 亚型^[17]。

11. 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件 (IBM) 进行数据分析。所有结果以均数 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。通过 Kolmogorov-Smirnov 检验分析数据是否符合正态分布。在行为学实验中, 多组间比较采用重复测量方差分析和 Turkey's post-hoc 分析。对于免疫组化、qRT-PCR 和流式细胞术比较, 采用单因素方差分析, 组间比较符合方差齐性时采用 Turkey's post-hoc 分析; 若不符合方差齐性, 则采用 Tamhane's T2 post-hoc 分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

表 1 引物序列
Table 1 Sequences of primers

基因 Gene	前引物 Forward primer	后引物 Reverse primer
CD86	CGAACACTATTTGGGCGCAG	CAAGCCCGTGTCTTGATCT
IL-6	TTTCTCTCCGCAAGAGACTTCC	TGTGGGTGGTATCTCTGTGA
IL-1β	GGGATGATGACGACCTGCTA	ACAGCACGAGGCATTTTGT
IL-10	TAACTGCACCCACTTCCCAG	TGGCAACCCAAGTAACCCCTAA
CD163	TTGGCCGAGTTAATGCCAGT	CCCCATTCCTGGTGCTTACA
TGF-β	TGACATGAACCGACCTTCC	TGTGGAGCTGAAGCAGTAGT
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

结 果

1. Bay 60-7550 可减轻 SCI 大鼠的机械性痛觉过敏

与 Sham 组相比, SCI 组大鼠在术后 7~21 天出现机械性痛觉过敏 ($P < 0.01$)。同时, vehicle 组的 50% MWT 显著低于 Sham 组 ($P < 0.01$)。预实验结果显示, 与 vehicle 组相比, 鞘内注射 10 μ l Bay 60-7550 (0.1 mg/kg) 对脊髓损伤大鼠的机械痛敏无明显缓解作用; 而鞘内注射 10 μ l Bay 60-7550 (1 mg/kg) 后大鼠机械痛阈值较 vehicle 组明显提高 ($P < 0.01$, 见图 1A)。因此, 在正式实验中, 鞘内注射 1 mg/kg 的 Bay 60-7550 后, 脊髓损伤大鼠的机械痛觉过敏在术后 7~21 天明显减轻 ($P < 0.01$, 见图 1B)。

2. Bay 60-7550 对 SCI 大鼠脊髓 PDE2A 表达的影响

免疫组化染色和 Western blot 结果显示: 术后第 7 天, SCI 组和 vehicle 组大鼠脊髓损伤区脊髓背角 PDE2A 阳性表达强度及蛋白表达均高于 Sham 组 ($P < 0.01$, 见图 2A-K)。而 Bay 60-7550 组脊髓背角 PDE2A 表达低于 vehicle 组 ($P < 0.05$, 见图 2A-K)。

3. Bay 60-7550 对大鼠脊髓损伤后巨噬细胞/小胶质细胞表型分化的影响

流式细胞术检测小胶质细胞/巨噬细胞比例 (见图 3A, 3B); 与 Sham 组相比, SCI 组、vehicle 组大鼠脊髓组织中小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 亚型

即 MHCII⁺/CD172a⁺ 细胞的比例显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, 见图 3B)。而 Bay 60-7550 组 M1/M2 小胶质细胞/巨噬细胞比例低于 SCI 组、vehicle 组 ($P < 0.05$, 见图 3B)。

4. Bay 60-7550 对 M1、M2 型细胞相应炎症因子表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 与 Sham 组相比, SCI 组和 vehicle 组的 M1 型标志物 CD86 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$)。与 vehicle 组相比, Bay 60-7550 组 M1 型标志物 CD86 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$, 见图 4A)。而 M2 型标志物 CD163 mRNA 水平升高 ($P < 0.01$, 见图 4B)。

与 Sham 组相比, SCI 组和 vehicle 组大鼠脊髓组织中 IL-6、IL-1 β mRNA 水平均显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与 vehicle 组相比, Bay 60-7550 组鞘内给药后促炎因子 IL-6、IL-1 β mRNA 水平均显著减少 ($P < 0.01$, $P < 0.05$; 见图 4C, 4D)。然而, 与 Sham 组相比, SCI 组大鼠脊髓组织中 IL-10 mRNA 水平无明显增加 ($P > 0.05$), vehicle 组 IL-10 mRNA 水平增加 ($P < 0.01$)。与 vehicle 组相比, Bay 60-7550 组大鼠脊髓组织中 IL-10 mRNA 水平显著性增加 ($P < 0.05$)。与 Sham 组相比, SCI 组和 vehicle 组大鼠脊髓组织中 M2 型抗炎细胞因子 TGF- β mRNA 水平增加 ($P < 0.01$)。与 vehicle 组相比, Bay 60-7550 组大鼠脊髓组织中 TGF- β mRNA 水平显著性增加 ($P < 0.05$, 见图 4E, 4F)。

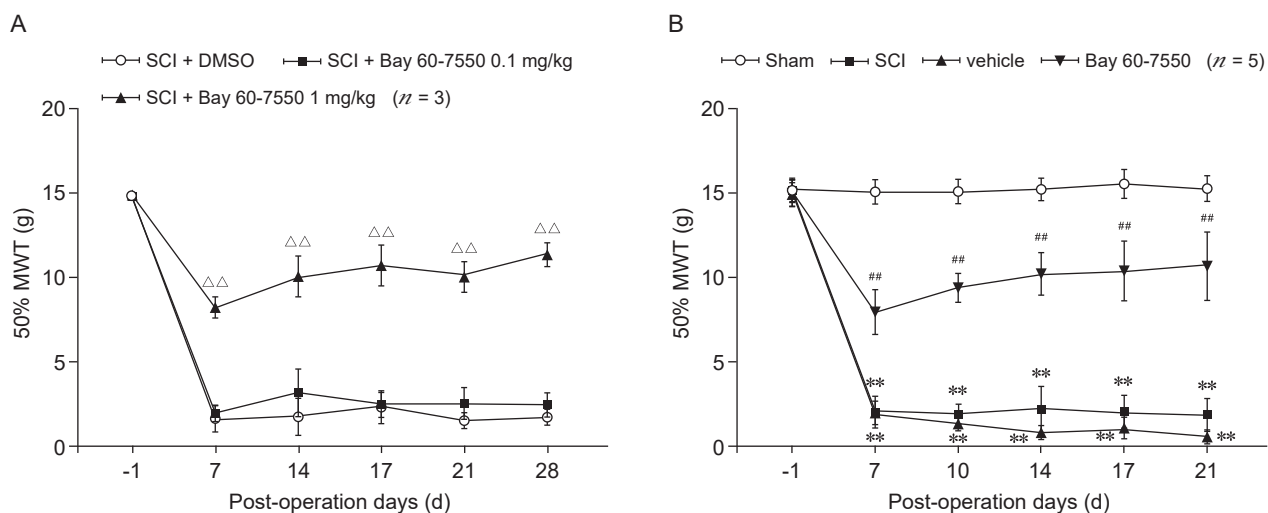


图 1 Bay 60-7550 对 SCI 大鼠机械痛阈的影响 ($\bar{x} \pm SEM$)

$\Delta\Delta P < 0.01$, 与 SCI + DMSO 组相比; $**P < 0.01$, 与 Sham 组相比; $^{##}P < 0.01$, 与 vehicle 组相比

Fig. 1 Effects of Bay 60-7550 on mechanical pain threshold in SCI rats ($\bar{x} \pm SEM$)

$\Delta\Delta P < 0.01$, compared with group SCI + DMSO; $**P < 0.01$, compared with group Sham; $^{##}P < 0.01$, compared with group vehicle.

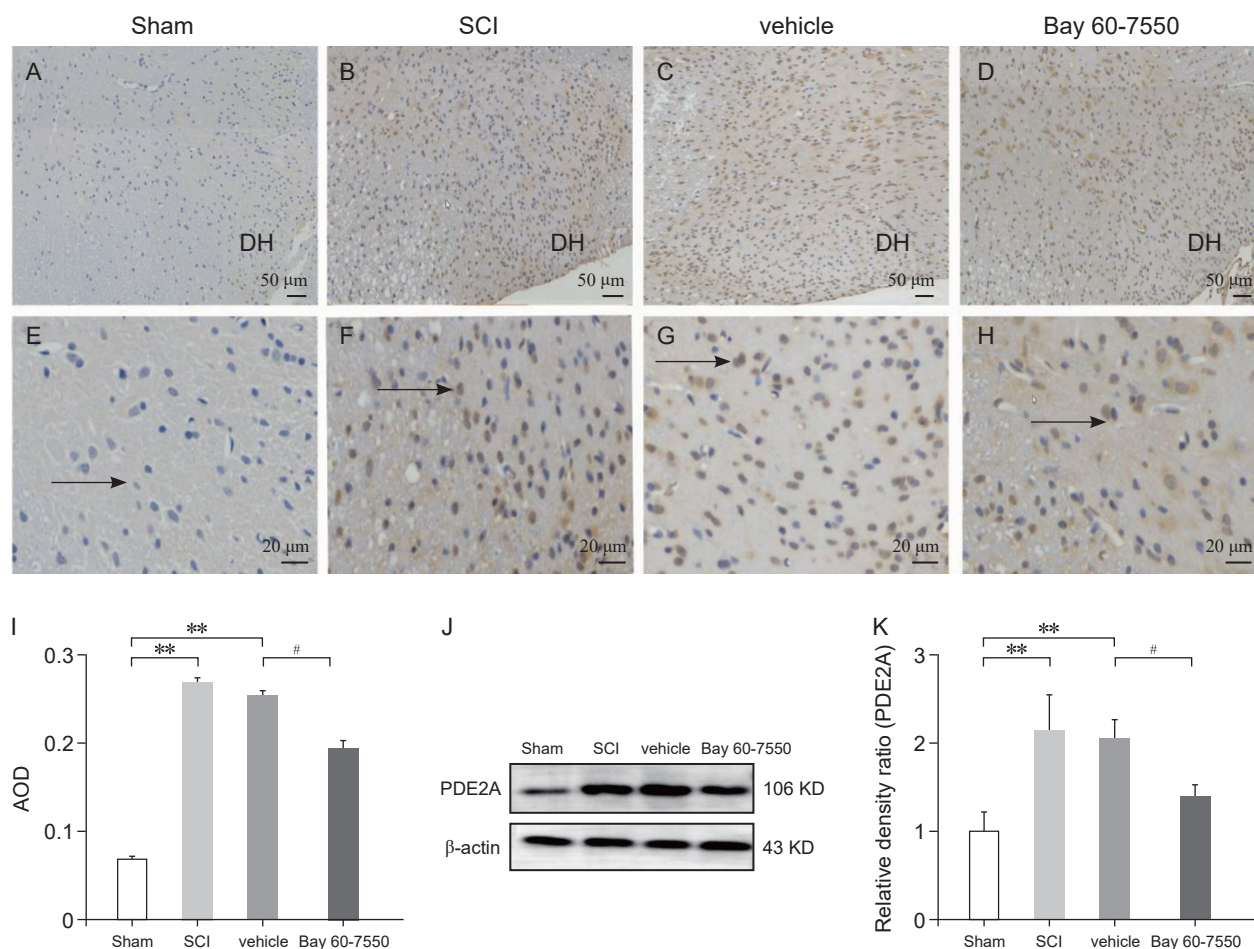


图 2 Bay 60-7550 抑制 SCI 大鼠 PDE2A 的过表达 (A-I: $n=3$; J-K: $n=4$, $\bar{x} \pm SEM$) (A-H) 各组大鼠脊髓背角 PDE2A 表达的免疫组化染色图; (I) 各组大鼠脊髓背角免疫组化染色 PDE2A 的平均光密度值; (J) 免疫印迹法检测各组大鼠脊髓背角 PDE2A 蛋白表达的代表性图像; (K) 各组大鼠经 β-肌动蛋白标准化后的蛋白表达变化统计图

白色箭头标记为 PDE2A 阳性表达; DH: 脊髓背角; AOD: 平均光密度值; Relative density ratio: 相对密度比

** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, 与 vehicle 组相比

Fig. 2 Inhibition of PDE2A overexpression in SCI rats by Bay 60-7550 (A-I: $n=3$; J-K: $n=4$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A-H) Immunohistochemical staining images of PDE2A expression in the dorsal horn of the spinal cord in various groups of rats; (I) Average optical density values of immunohistochemical staining of PDE2A in the dorsal horn of the spinal cord of each group of rats; (J) Representative images of PDE2A protein expression in the dorsal horn of rat spinal cord in each group detected by Western blot; (K) The analyzed data normalized by β-actin in each group.

White arrows show PDE2A positive expression; DH: spinal dorsal horn; AOD: average optical density

** $P < 0.01$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, compared with group vehicle.

讨 论

脊髓损伤后神经病理性疼痛 (SCI-NP) 严重影响病人的日常生活, 也给社会带来了沉重的经济和医疗负担。SCI-NP 涉及复杂的病理生理过程, 包括神经炎症的级联反应、脊髓去抑制、下行疼痛调控通路中断、中枢敏化及神经元兴奋性增强^[18]。因此, SCI-NP 的治疗十分困难, 临床中仍缺乏有效的治疗方案。

PDE2A 是细胞内重要的信号调节因子, 其广泛分布于外周和中枢神经系统^[9]。Lakics 等^[19]发现在多种哺乳动物的大脑和脊髓灰质中 PDE2A 含量丰富, 其中 PDE2A 免疫染色密度最高的部位是脊髓背角神经元 (尤其是 I-II 层) 的细胞核。随后, Kallenborn-Gerhardt 等^[20]进一步发现, 在酵母多糖诱导的小鼠足底炎性疼痛模型中, 脊髓背角 PDE2A 表达上调, 且 PDE2A 免疫荧光标记与脊髓背角浅层神经元的标记重叠。PDEs 被证明可参与慢性炎

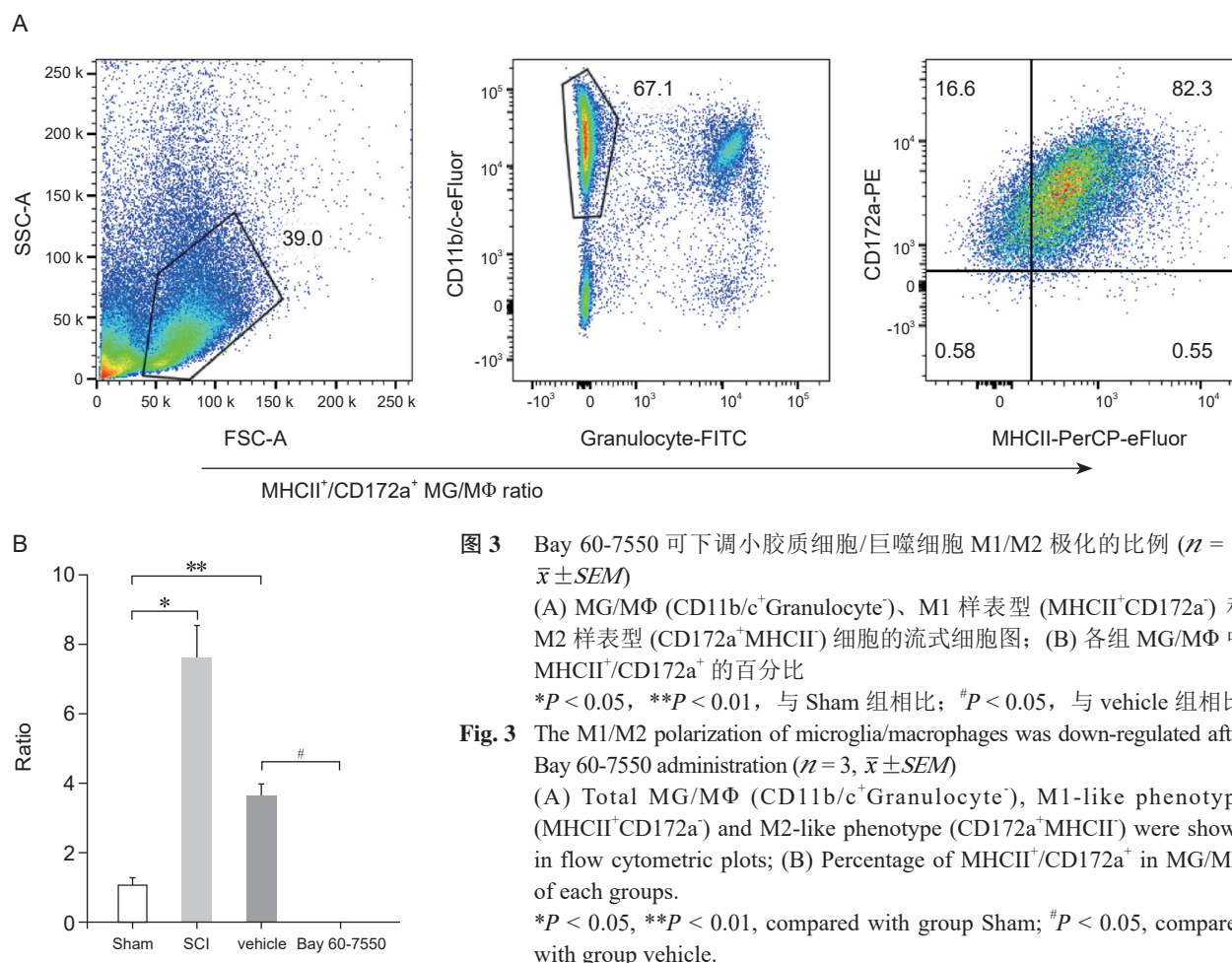


图 3 Bay 60-7550 可下调小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 极化的比例 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) MG/MΦ (CD11b/c⁺Granulocyte⁻)、M1 样表型 (MHCII⁺CD172a⁻) 和 M2 样表型 (CD172a⁺MHCII⁻) 细胞的流式细胞图; (B) 各组 MG/MΦ 中 MHCII⁺/CD172a⁺ 的百分比

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, 与 vehicle 组相比

Fig. 3 The M1/M2 polarization of microglia/macrophages was down-regulated after Bay 60-7550 administration ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Total MG/MΦ (CD11b/c⁺Granulocyte⁻), M1-like phenotype (MHCII⁺CD172a⁻) and M2-like phenotype (CD172a⁺MHCII⁻) were shown in flow cytometric plots; (B) Percentage of MHCII⁺/CD172a⁺ in MG/MΦ of each groups.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, compared with group vehicle.

症的产生, Rentsendorj 等^[21]发现在小鼠急性肺损伤模型中抑制 PDE2A 可增加上皮细胞 cAMP、减少 iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) 来降低早期上皮细胞活化和渗漏, 同时促进巨噬细胞 iNOS 的增加, 起到缓解炎性损伤的作用。Plummer 等^[22]的研究显示, 选择性 PDE2A 抑制剂通过抑制 cGMP 水解可降低大鼠膝关节炎疼痛。我们既往的研究发现, PDE2A 在非压迫性腰椎间盘突出大鼠模型的脊髓背角中表达上调, 而鞘内注射 Bay 60-7550 (0.1 mg/kg 或 1 mg/kg) 可减轻大鼠机械性痛觉过敏, 降低脊髓后角中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平, 产生抗炎和镇痛的效果, 且具有剂量依赖效应^[13]。本研究采用脊髓损伤大鼠模型, 发现术后 7~21 天模型大鼠产生明显的机械性痛觉过敏; 且对术后 7 天大鼠损伤区尾侧脊髓背角进行免疫组化染色和 Western blot 蛋白定量检测, 发现 SCI 大鼠脊髓背角 PDE2A 免疫阳性水平和蛋白表达升高。我们推测 SCI 大鼠脊髓背角 PDE2A 的过表达可能与 SCI-NP 的产生有关。鞘内注射 Bay 60-7550 (1 mg/kg) 1 周后,

脊髓损伤大鼠机械性痛觉超敏明显减轻, 脊髓背角 PDE2A 表达显著减少, 脊髓组织中促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6) 明显减少, 且抗炎细胞因子 (IL-10、TGF- β) 明显升高。因此, 推测鞘内注射 PDE2A 选择性抑制剂 Bay 60-7550 具有抑制 SCI 大鼠脊髓背角中 PDE2A 的表达, 减轻脊髓背角神经炎症反应, 缓解 SCI 大鼠机械性痛觉超敏的作用。

众多研究表明, SCI 后脊髓背角神经元细胞内可发生许多分子信号变化, 包括神经递质和生长因子的表达或释放, 细胞内第二信使、细胞核转录因子的表达及蛋白激酶 (protein kinase A, PKA; protein kinase C, PKC)、细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 激活的细胞内信号通路等, 对中枢敏化的产生具有重要作用^[23]。PDE2A 是调节细胞内第二信使的关键酶, 这些证据表明 PDE2A 在脊髓背角的分布及参与神经炎症反应的作用可能与中枢敏化的产生和调节有关。但 PDE2A 参与调节中枢敏化的具体机制尚不清楚。神经炎症在神经病理性疼痛的发病机制中起重要作用。Ji 等^[24]

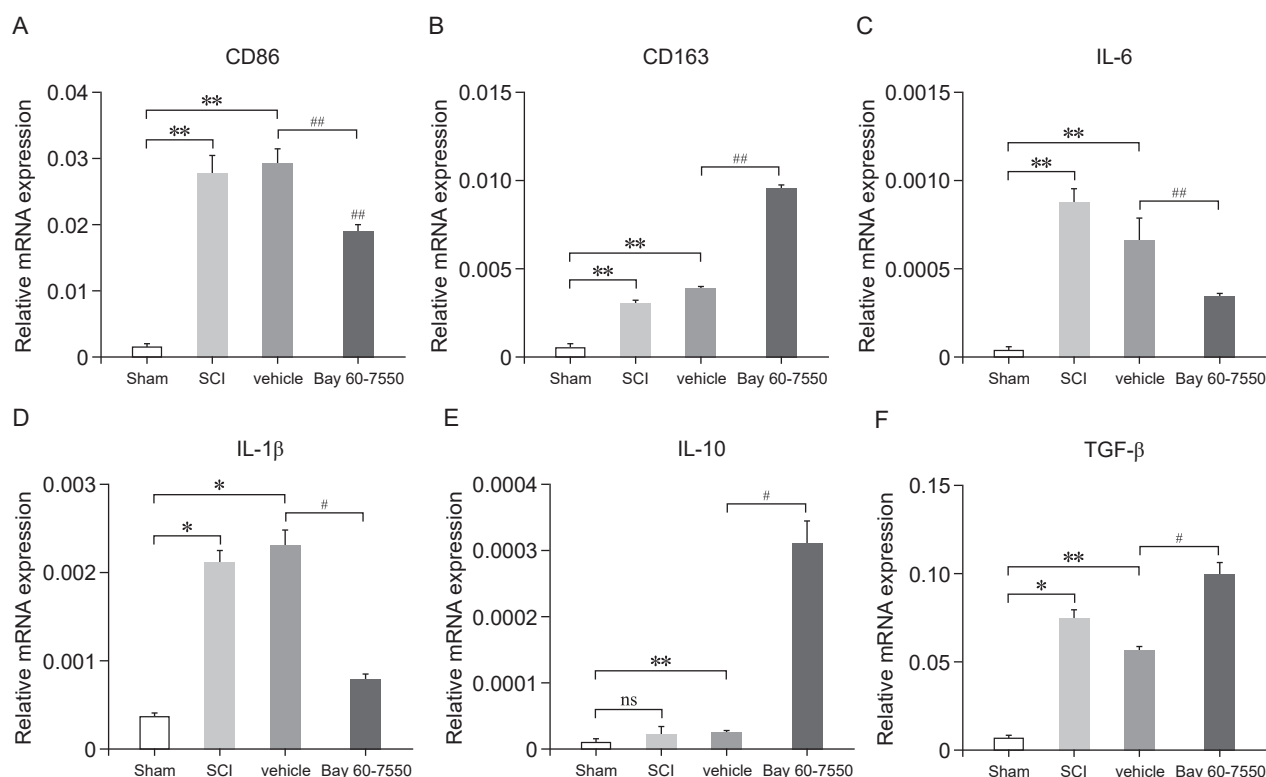


图4 Bay 60-7550 对 M1、M2 型细胞相应炎症因子表达的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) qRT-PCR 检测各组大鼠脊髓组织中 CD86 mRNA 表达的比较; (B) qRT-PCR 检测各组大鼠脊髓组织中 CD163 mRNA 表达的比较; (C) qRT-PCR 检测各组大鼠脊髓组织中 IL-6 mRNA 表达的比较; (D) qRT-PCR 检测各组大鼠脊髓组织中 IL-1 β mRNA 表达的比较; (E) qRT-PCR 检测各组大鼠脊髓组织中 IL-10 mRNA 表达的比较; (F) qRT-PCR 检测各组大鼠脊髓组织中 TGF- β mRNA 表达的比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 vehicle 组相比

Fig. 4 Effect of Bay 60-7550 on the expression of corresponding inflammatory factors of M1 and M2 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Comparison of CD86 mRNA expression in spinal cord tissue of rats in each group detected by qRT-PCR; (B) Comparison of CD163 mRNA expression in spinal cord tissue of rats in each group detected by qRT-PCR; (C) Comparison of IL-6 mRNA expression in spinal cord tissue of rats in each group detected by qRT-PCR; (D) Comparison of IL-1 β mRNA expression in spinal cord tissue of rats in each group detected by qRT-PCR; (E) Comparison of IL-10 mRNA expression in spinal cord tissue of rats in each group detected by qRT-PCR; (F) Comparison of TGF- β mRNA expression in spinal cord tissue of rats in each group detected by qRT-PCR.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with group vehicle.

提出脊髓神经炎症通过神经元-胶质细胞的相互作用可导致疼痛。脊髓损伤后单核细胞、胶质细胞等激活释放大炎症物质, 其中组织内驻留的小胶质细胞和血源性浸润的巨噬细胞大量聚集于损伤区域^[25]。生理条件下, 小胶质细胞处于 M0 静止表型; 脊髓损伤后由于局部微环境的改变, 刺激小胶质细胞/巨噬细胞发生促炎 (M1 型) 或抗炎 (M2 型) 表型的极化, 并以 M1 型占优势, 此时促炎与抗炎之间的平衡被打破^[26]。M1 型小胶质细胞/巨噬细胞可释放促炎细胞因子和趋化因子加重神经炎症, 并进一步激活小胶质细胞/巨噬细胞, 从而形成炎症反应与小胶质细胞/巨噬细胞之间的正反馈级联环路, 导致神

经元过度兴奋^[27]。因此, 持续的神经炎症级联反应与小胶质细胞/巨噬细胞极化之间的反馈调节可能参与脊髓损伤后中枢敏化的形成。本研究发现, 大鼠 SCI 术后 7 天流式细胞仪结果显示脊髓小胶质细胞/巨噬细胞大量激活, 且以 M1 表型为主, 这一研究结果与报道一致^[28]。

有研究表明, M1 型小胶质细胞的促炎作用介导了 NP 的形成, 而 M2 型小胶质细胞的抗炎作用对 NP 起到一定缓解作用, 且 NP 与 M1/M2 小胶质细胞比例增加有关^[29]。本研究结果发现 SCI 大鼠鞘内注射 Bay 60-7550 后 7 天, 流式细胞仪中小胶质细胞/巨噬细胞 M1/M2 表型极化状态显著改变,



M1 型细胞明显减少, M2 型细胞显著升高。同时本研究结果还显示, M2 表型标志物 (CD163) 的表达显著升高, 抗炎细胞因子 (IL-10、TGF- β) 水平明显升高, 机械性痛觉超敏缓解; 相反, M1 型表面标记物 (CD86) 和促炎细胞因子 (IL-1 β 、IL-6) 生成减少。此外, Detloff 等^[30] 证明 TNF- α 和 IL-1 β 参与了 SCI 后机械性痛觉超敏的发展, 而 IL-6 参与了机械性痛觉超敏的维持。根据这些结果, 可推测 Bay 60-7550 可能参与驱动小胶质细胞/巨噬细胞从 M1 表型向 M2 表型的转化, 且具有抗炎和镇痛作用。

但本研究仅观察了鞘内注射 Bay 60-7550 对 SCI 大鼠机械性疼痛和小胶质细胞/巨噬细胞极化状态的影响, 未阐明 PDE2A 与中枢敏化的具体机制及 Bay 60-7550 对细胞极化作用的可能机制。Bay 60-7550 对大鼠 SCI 的恢复及运动改善情况仍需进一步实验设计进行探究。

综上所述, 本研究证明了选择性 PDE2A 抑制剂 Bay 60-7550 在大鼠 SCI-NP 模型中具有镇痛作用, 并可调节小胶质细胞/巨噬细胞的极化, 减轻神经炎症反应。因此, PDE2A 可能是减轻 SCI 后神经病理性疼痛的潜在治疗靶点。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Bryce TN, Budh CN, Cardenas DD, *et al.* Pain after spinal cord injury: an evidence-based review for clinical practice and research. Report of the national institute on disability and rehabilitation research spinal cord injury measures meeting[J]. J Spinal Cord Med, 2007, 30(5): 421-440.
- [2] 王金明, 米元元, 周文娟. 国内外脊髓损伤病人疼痛管理研究的文献计量学分析 [J]. 护士进修杂志, 2022, 37(12):1100-1104.
- [3] Shiao R, Lee-Kubli CA. Neuropathic pain after spinal cord injury: challenges and research perspectives[J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(3):635-653.
- [4] 陈莉, 雷静, 尤浩军. 脊髓损伤后病理性疼痛发生机制及治疗研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(11):843-848.
- [5] 刘俊, 高峰, 李迪, 等. 脊髓损伤后神经病理性疼痛机制的研究进展 [J]. 中国康复, 2020, 35(9):488-491.
- [6] 马绥斌, 曹成慧, 刘霞, 等. 小胶质细胞极化态的功能可塑性调控 [J]. 生命的化学, 2017, 37(5):859-866.
- [7] Newton AC, Bootman MD, Scott JD. Second messengers[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2016, 8(8): a005926.
- [8] Ahmad F, Murata T, Shimizu K, *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets[J]. Oral Dis, 2015, 21(1):e25-50.
- [9] Trabanco AA, Buijnsters P, Rombouts FJ. Towards selective phosphodiesterase 2A (PDE2A) inhibitors: a patent review (2010-present)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2016, 26(8):933-946.
- [10] Beshay E, Croze F, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo[J]. Clin Immunol, 2001, 98(2):272-279.
- [11] 陈玲, 楼江, 许丹华, 等. 磷酸二酯酶 2 抑制剂 Bay 60-7550 对轻度睡眠不足抑郁模型小鼠持续术后疼痛的作用 [J]. 中国现代应用药理学, 2020, 37(23):2845-2851.
- [12] Stephenson DT, Coskran TM, Wilhelms MB, *et al.* Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species[J]. J Histochem Cytochem, 2009, 57(10):933-949.
- [13] Wang JN, Zhao XJ, Liu ZH, *et al.* Selective phosphodiesterase-2A inhibitor alleviates radicular inflammation and mechanical allodynia in non-compressive lumbar disc herniation rats[J]. Eur Spine J, 2017, 26(7):1961-1968.
- [14] Khan T, Havey RM, Sayers ST, *et al.* Animal models of spinal cord contusion injuries[J]. Lab Anim Sci, 1999, 49(2):161-172.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1):55-63.
- [16] Martin E, El-Behi M, Fontaine B, *et al.* Analysis of microglia and monocyte-derived macrophages from the central nervous system by flow cytometry[J]. J Vis Exp, 2017, (124):55781.
- [17] Li Z, 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.
- [18] Viswanath O, Urits I, Burns J, *et al.* Central neuropathic mechanisms in pain signaling pathways: current evidence and recommendations[J]. Adv Ther, 2020, 37(5): 1946-1959.
- [19] Lakics V, Karran EH, Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues[J]. Neuropharmacology, 2010, 59(6):367-374.
- [20] Kallenborn-Gerhardt W, Lu R, Bothe A, *et al.* Phosphodiesterase 2A localized in the spinal cord contributes to inflammatory pain processing[J]. Anesthesiology, 2014, 121(2):372-382.
- [21] Rentsendorj O, D'alessio FR, Pearse DB. Phosphodiesterase 2A is a major negative regulator of iNOS expression in lipopolysaccharide-treated mouse alveolar



- macrophages[J]. J Leukoc Biol, 2014, 96(5):907-915.
- [22] Plummer MS, Cornicelli J, Roark H, *et al.* Discovery of potent selective bioavailable phosphodiesterase 2 (PDE2) inhibitors active in an osteoarthritis pain model. Part II: optimization studies and demonstration of in vivo efficacy[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(11): 3443-3447.
- [23] Ji RR, Nackley A, Huh Y, *et al.* Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain[J]. Anesthesiology, 2018, 129(2):343-366.
- [24] Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(7):533-548.
- [25] Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms[J]. Front Neurol, 2019, 10:282.
- [26] Akhmetzyanova E, Kletenkov K, Mukhamedshina Y, *et al.* Different approaches to modulation of microglia phenotypes after spinal cord injury[J]. Front Syst Neurosci, 2019, 13:37.
- [27] Pfyffer D, Wyss P O, Huber E, *et al.* Metabolites of neuroinflammation relate to neuropathic pain after spinal cord injury[J]. Neurology, 2020, 95(7):e805-e814.
- [28] Nakajima H, Honjoh K, Watanabe S, *et al.* Distribution and polarization of microglia and macrophages at injured sites and the lumbar enlargement after spinal cord injury[J]. Neurosci Lett, 2020, 737: 135152.
- [29] 高龙飞, 曹贵君, 孟纯阳. 小胶质细胞极化在神经病理性疼痛中的作用研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(2):130-134.
- [30] Detloff MR, Fisher LC, Mcgaughy V, *et al.* Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats[J]. Exp Neurol, 2008, 212(2):337-347.

• 消 息 •

2023 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管，北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现已被中文核心期刊（北京大学图书馆）、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 来源期刊、世界期刊影响力指数 (WJCI) 报告 (2022 科技版) 等国内权威的文献检索系统收录。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

投稿：来稿可在杂志官网在线投稿 <http://casp.ijournals.cn>，请署真实姓名、工作单位、职称，附单位介绍信（信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容）。投稿时请注明通信作者、提供伦理审查批号及证明、基金资助信息，以及详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

订购：邮发代号：82-832，本刊为月刊，大 16 开本，80 页，每册定价 32.00 元，全年 12 期，共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接联系编辑部订阅。

编辑部地址：北京市海淀区学院路 38 号，北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部

杂志官网：<http://casp.ijournals.cn>

联系电话：010-82801712；010-82801705

电子邮箱：pain1712@126.com

联系人：赵磊

