

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.06.036

# 脊髓胶质细胞参与糖尿病神经病理性疼痛的研究进展\*

郭艳娇, 刘培雯, 牛娟, 刘晓红 综述, 曾俊伟<sup>△</sup> 审校

(遵义医学院生理学教研室/贵州省麻醉与器官功能保护重点实验室, 贵州遵义 563000)

[关键词] 糖尿病神经病理性疼痛; 脊髓背角; 胶质细胞

[中图分类号] R338.8

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)06-0826-03

糖尿病是由于胰岛素分泌缺陷和(或)胰岛素作用障碍所致的以高血糖为特征的代谢性疾病。30%~50%的糖尿病患者会出现糖尿病神经病理性疼痛(diabetic neuropathic pain, DNP),表现为自发痛、痛觉过敏和异常性疼痛,这对患者的身心健康造成了很大危害<sup>[1]</sup>。以往研究认为,由于持续高血糖、长期代谢紊乱、神经营养不足、外周炎症因子以及氧化应激造成的外周 A $\delta$  神经纤维和 C 类神经纤维损伤是患者发生 DNP 的重要原因。脊髓背角含有丰富的神经递质、神经肽及其受体,是脊髓中神经结构和化学组成最复杂的区域,也是各种感觉的初级整合中枢<sup>[2-3]</sup>。近年研究表明,存在于脊髓的胶质细胞也参与了 DNP 的发生与维持。本文就目前这方面的进展综述如下。

## 1 脊髓星形胶质细胞参与 DNP

星形胶质细胞不仅为神经元提供结构、代谢和功能上的支持,也可以通过参与突触形成、释放神经活性物质调节神经元突触传递效能。以往的基础与临床研究表明,在病理性痛刺激状态下,星形胶质细胞激活后产生并释放大量的神经活性物质和前列腺素细胞因子,作用于突触前终末,增强初级传入神经末梢伤害性神经递质的释放及痛信息的传递;作用于突触后角痛觉传递神经元,增强其敏感性和反应性,使神经元兴奋性增高,促进脊髓水平的痛觉过敏。

自发的糖尿病动物模型有 db/db 小鼠、ob/ob 小鼠、KK $Y$  小鼠、肥胖 Zuckerfa/fa 大鼠、GK 大鼠以及 NSY 小鼠等。其中,db/db 小鼠是 Leptin 受体基因缺陷导致的先天性 2 型糖尿病(T2DM)小鼠,具有高血糖、高血脂、胰岛素抵抗等特性,其发病进程与人 T2DM 很相似,故常用来研究 DNP 的发生机制<sup>[4]</sup>。在 db/db T2DM 小鼠出生 6 周后出现机械痛敏,在 8 周后即可形成持久的机械痛敏;与此相对应,db/db 小鼠出生后 6 周脊髓背角星形胶质细胞中胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达上调,在第 8 周 GFAP 表达上调达顶峰。鞘内注射特异性的星形胶质细胞活性抑制剂 L- $\alpha$ -氨基己二酸(LAA)可以有效缓解 db/db 小鼠的机械痛敏行为,这表明,背角星形胶质细胞参与了 db/db 小鼠 DPN 的发病环节。进一步实验观察到,给予活性氧清除剂  $\alpha$ -苯基-N-叔丁基甲亚胺-N-氧化物(PBN)可明显抑制 db/db 小鼠脊髓背角星形胶质细胞 GFAP 表达上调,并减轻其痛敏症状,这提示氧化应激可能是诱发背角星形胶质细胞活化的重要因素<sup>[5]</sup>。在 db/db 小鼠,伴随背角星形胶质细胞活化,白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )表达和 NR1(NMDA 受体亚单位)磷酸化在第 6 周同步增强,在第 8 周达顶峰;其中,IL-1 $\beta$  高选择性表达于背角星形胶质细胞,在神经元和小胶质细胞无明显表达;而 NR1 主要表达于背角神经元。鞘内注射 LAA 抑制星形胶质细胞活化,则 IL-1 $\beta$  和 NR1 表达同步下调。由此, Li-

ao 等<sup>[5]</sup>人推测,在 db/db T2DM 小鼠,当伤害性信息到达脊髓时,背角星形胶质细胞激活,IL-1 $\beta$  表达上调并释放,作用于感觉神经元 IL-1 $\beta$  受体后可以促进神经元 NMDA 受体激活,促进痛觉信息进一步向高级中枢传递。因此,IL-1 $\beta$  作为上游星形胶质细胞激活的被动产物,可以提高下游背角感觉神经元的激活。此外,伴随 db/db 小鼠的痛敏行为,在第 8 周,脊髓背角的大多数星形胶质细胞和少数神经元均可观察到 ERK1/2 磷酸化增强,其中 ERK1 磷酸化更为显著;鞘内注射 ERK 活性抑制剂 U0126(不影响 MAPK 和 JNK 磷酸化)缓解 db/db 小鼠的机械痛敏、热痛敏行为,同时 ERK1/2 磷酸化也明显减弱。在第 8 周,db/db 小鼠足底注射福尔马林后同侧脊髓背角 ERK1 磷酸化增强比 ERK2 磷酸化更为明显<sup>[6]</sup>。提示 ERK1 磷酸化在星形胶质细胞活化、功能增强中可能起了重要作用。因此,抑制脊髓背角星形胶质细胞激活,减轻炎症因子释放可能成为治疗 DNP 的重要策略。

近年研究发现,鞘内注射高迁移率族蛋白 1(high-mobility group box 1, HMGB1)中和抗体则可明显减轻 db/db 小鼠痛敏症状,并抑制脊髓背角 HMGB1 的表达。HMGB1 是一种存在于真核细胞核内的非组蛋白染色体结合蛋白,由于其在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中迁移速度快而得名。免疫组织化学染色结合免疫印迹实验观察到,在 db/db 小鼠,脊髓背角 HMGB1 表达水平明显上调,其上调可能与糖尿病高血糖介导的氧化应激有关<sup>[7-8]</sup>;伴随肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、白细胞介素-6(IL-6)和单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)明显上调。在生理条件下,星形胶质细胞释放的促炎性细胞因子非常的少,并不足以激活神经元;但是,当出现外周神经纤维损伤时,往往脊髓背角星形胶质细胞活化,形态发生改变,释放大量的神经活性物质,转而作用于神经元,影响神经元功能活动,调节突触传递效能,参与 DPN 的形成。对于 HMGB1 参与糖尿病神经痛的机制,目前认为, Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)2、TLR4 和糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)均高度表达于 db/db 小鼠脊髓背角星形胶质细胞, HMGB1 可以通过结合这些受体激活星形胶质细胞,诱发 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 MCP-1 这些炎症因子释放,随后转而作用于脊髓背角神经元 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体,调节突触传递效能,促进中枢痛敏。同时,星形胶质细胞的激活又可以促进 HMGB1 释放,作用于自身,促进星形胶质细胞持久激活,形成正反馈,促进中枢痛敏的长时程维持<sup>[9]</sup>。

## 2 脊髓小胶质细胞参与 DNP

小胶质细胞是中枢神经系统的一种免疫活性细胞。在正常情况下,小胶质细胞呈静止态的分支状,外周神经损伤后小

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460266);贵州省科教英才基金资助项目(黔省专合字 2012-93 号)。 作者简介:郭艳娇(1989-),在读硕士研究生,主要从事疼痛的神经化学机制研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel:(0852)8609442; E-mail:junweizeng@sohu.com。

胶质细胞受到刺激就会发生形态上的改变,分化成活化态阿米巴状;并伴随功能上的改变,产生和分泌一系列促炎因子<sup>[10-11]</sup>,Iba-1、OX-42(小胶质细胞标记物)等也得到明显上调。这些促炎因子往往可以提高神经元的敏感性,从而影响其突触传递,导致神经病理性疼痛的发生。在链脲菌素(STZ)注射诱发的 1 型糖尿病(T1DM)大鼠、Albino-Swiss 小鼠模型中,脊髓背角小胶质细胞激活,其形态和功能发生改变,细胞数目增多,形态肥大、突起加粗回缩,C1qmRNA 上调,Iba-1/OX-42 表达增强。鞘内注射小胶质细胞活性抑制剂米诺环素可以减轻其痛敏症状,同时 Iba-1/OX-42 表达下降<sup>[12-13]</sup>。糖尿病大鼠口服加巴喷丁可抑制脊髓背角小胶质细胞的激活,与米诺环素类似,也可减轻其神经痛症状并使 Iba-1/OX-42 的表达有所下降<sup>[14]</sup>。然而,运用免疫组织化学和免疫印迹观察到,在 db/db T2DM 小鼠,背角小胶质细胞 OX-42 表达无增强,也未发生形态上的改变;鞘内注射米诺环素也不能缓解 db/db 小鼠的神经痛症状。研究造成这种差异的原因很可能在于动物物种的差异<sup>[5]</sup>。相应地,在针对 T1DM 动物的神经痛发生机制的研究并不采用 db/db 小鼠,而采用 STZ 诱发的大鼠或其他小鼠模型。

近年研究观察到,胰高血糖素样肽-1 受体、嘌呤受体、大麻素 CB2 受体以及激肽 B1 受体等均表达于脊髓背角小胶质细胞,与 DPN 的形成密切相关。首先,鞘内注射米诺环素不仅可以抑制 STZ 诱导的糖尿病大鼠背角激肽 B1 受体、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 TRPV1 表达上调;其中,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  可以通过 NF- $\kappa$ B 的核转位而诱导 B1 受体表达上调。另外,鞘内注射米诺环素还可抑制 des-Arg9-BK(激肽 B1 受体激动剂)和 P 物质(NK1 受体激动剂)诱发的糖尿病大鼠痛敏行为;鞘内应用 B1R 拮抗剂(SSR240612 或 R-715)可以逆转糖尿病大鼠时间依赖性的触觉和冷刺激痛觉超敏,同时背角 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 TRPV1 表达下调<sup>[13]</sup>。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)受体激动剂 WB4-24 可以刺激糖尿病大鼠脊髓小胶质细胞释放  $\beta$ -endorphin,从而发挥镇痛效应;WB4-24 发挥的镇痛效果可被 GLP-1 受体拮抗剂和 GLP-1 受体基因敲除完全阻断<sup>[15]</sup>。此外,鼻内和腹腔内应用 CB2 受体激动剂可以明显抑制 STZ 诱发的糖尿病 CD1 小鼠脊髓背角小胶质细胞 Iba-1 表达上调和 P38MAPK 磷酸化增强<sup>[16]</sup>。嘌呤受体参与伤害性信息传递的机制是近年疼痛研究热点之一。其中,P2X<sub>4</sub> 受体可能参与了脊髓小胶质细胞激活的过程,在 CD38 缺陷诱导的 T2DM 中起到重要作用,但机制尚不清楚,可能与 P2X<sub>4</sub> 受体激活后引起细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平上升,以及随后的 P38 MAPK 的磷酸化增强有关<sup>[17]</sup>。

文献报道,在一些糖尿病疼痛动物模型中,P38MAPK、JNK、SFK/ERK 等信号途径活化也往往发生在脊髓小胶质细胞。鞘内分别注射 MAPK 抑制剂 SD-282、JNK 抑制剂 SP600125 和 ERK 抑制剂 U0126 和 PD198306 可以有效逆转糖尿病大鼠的机械痛敏和热痛敏,并抑制其脊髓水平 MAPK、JNK、ERK1/2 磷酸化<sup>[18]</sup>。免疫组织化学染色及免疫印迹观察到糖尿病大鼠脊髓背角 NMDA 受体的激活与 P38MAPK、ERK 及 JNK 的上调有关,而且 NMDA 受体亚单位 NR1 磷酸化主要位于小胶质细胞<sup>[19]</sup>。鞘内注射 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 或者 D-CPP 可以阻滞小胶质细胞 P38MAPK、ERK 以及 JNK 的磷酸化,从而逆转 STZ 诱导的糖尿病机械痛敏<sup>[19]</sup>。此外,大鼠 DNP 模型中,脊髓背角谷氨酸转运体表达下降,造成细胞外液中谷氨酸水平增加,作用于背角神经元或小胶质细胞的 NMDA 受体,对疼痛传输和中枢敏化有着持久

性的放大作用。以往认为 KCC2(K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> 共转运体)主要表达在神经元,但近年观察到 KCC2 表达于脊髓小胶质细胞,参与维持细胞内 Cl<sup>-</sup> 水平稳定。鞘内注射米诺环素可以抑制糖尿病大鼠脊髓小胶质细胞 KCC2 表达的上调,有助于维持胞内 Cl<sup>-</sup> 水平稳定,避免 GABA 向兴奋性效应转变;而且,背角神经元 c-fos 表达随之下降,这也是米诺环素发挥镇痛作用的机制之一<sup>[20-21]</sup>。

与星形胶质细胞相似的是,脊髓背角小胶质细胞激活和神经活性物质的合成或释放也参与了 DPN 的发生与维持。有研究应用免疫印迹结合 RT-qPCR 技术观察到,雄性瑞士白化(Albino-Swiss)小鼠腹腔注射 STZ 后,其脊髓 IL-1 $\beta$ 、IL-3、IL-4、IL-6、IL-9、IL-12p70、IL-17 及 TNF 家族(包含 IFN $\gamma$ ,sTNFRID)等具有致痛效果的细胞因子表达上调<sup>[12,22]</sup>;如果在 STZ 注射前 16 h 和注射后 1 h 腹腔注射米诺环素,连续给药 7 d,则糖尿病小鼠 IL-1 $\alpha$ 、IL-2、IL-10,sTNFRID 等有镇痛作用的细胞因子表达上调,这可以有效减少神经病理性疼痛的发生<sup>[5]</sup>。在大鼠腹腔注射 STZ 后,其脊髓背角 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达上调,单纯疱疹病毒(HSV)治疗则抑制 TNF- $\alpha$  及其受体表达,同时小胶质细胞 P38MAPK 磷酸化减弱<sup>[23]</sup>。鞘内注射葛根素可以有效缓解糖尿病大鼠的机械痛敏和热痛敏症状,同时也有效抑制了脊髓背角小胶质细胞的激活,脊髓水平的炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  生成减少<sup>[24]</sup>。麻醉药物利多卡因可以抑制小胶质细胞激活和 P38MAPK 磷酸化,减弱 STZ 介导的大鼠触觉异常痛敏;体外实验证实,利多卡因可能抑制 IFN- $\gamma$  刺激小胶质细胞激活后对 MCP-1 的趋化反应<sup>[25]</sup>。这些研究充分表明抑制脊髓背角小胶质细胞激活和神经活性物质的释放,可能成为治疗 DPN 的重要策略。

### 3 展 望

综上所述,脊髓背角的星形胶质细胞和小胶质细胞活化,随后的神经活性物质释放可能是 DNP 发生与维持的重要机制之一。因此,抑制这两类胶质细胞活化和后续的神经营活性物质释放成为治疗 DPN,缓解患者病痛的重要思路。有关 DPN 的研究机制的进展,以及一些药物实验动物模型上体现出良好的镇痛效果都将为 DNP 的临床治疗带来新的希望。

### 参考文献

- [1] Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, et al. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(10):2285-2293.
- [2] Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(10):4017-4022.
- [3] Narita M, Yoshida T, Nakajima M, et al. Direct evidence for spinal cord microglia in the development of a neuropathic pain-like state in mice[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(5):1337-1348.
- [4] 李娜,张周,冯颖. 自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠生物学特性研究[J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30(1):33-38.
- [5] Liao YH, Zhang GH, Jia D, et al. Spinal astrocytic activation contributes to mechanical allodynia in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Brain Res*, 2011, 1368(1):324-335.

- [6] Xu X, Chen H, Ling BY, et al. Extracellular signal-regulated protein kinase activation in spinal cord contributes to pain hypersensitivity in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(1): 53-66.
- [7] Singh DK, Winocour P, Farrington K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire [J]. *Nature Rev Endocrinol*, 2011, 7(3): 176-184.
- [8] Tang D, Kang R, Zeh HJ, et al. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(7): 1315-1335.
- [9] Ren PC, Zhang Y, Zhang XD, et al. High-mobility group box 1 contributes to mechanical allodynia and spinal astrocytic activation in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Brain Res Bull*, 2012, 88(4): 332-337.
- [10] Marchand F, Perretti MS. Role of the immune system in chronic pain [J]. *Nature Rev Neurosci*, 2005, 6(7): 521-532.
- [11] Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia [J]. *Trends Neurosci*, 2005, 28(2): 101-107.
- [12] Zychowska M, Rojewska E, Kreiner G, et al. Minocycline influences the anti-inflammatory interleukins and enhances the effectiveness of morphine under mice diabetic neuropathy [J]. *J Neuroimmunol*, 2013, 262(1/2): 35-45.
- [13] Talbot S, Chahmi E, Dias JP, et al. Key role for spinal dorsal Horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy [J]. *J Neuroinflammation*, 2010, 7(1): 36-51.
- [14] Wodarski R, Clark AK, Grist J, et al. Gabapentin reverses microglial activation in the spinal cord of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pain (London, England)*, 2009, 13(8): 807-811.
- [15] Fan H, Gong N, Li TF, et al. The non-peptide GLP-1 receptor agonist WB4-24 blocks inflammatory nociception by stimulating  $\beta$ -endorphin release from spinal microglia [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(1): 64-79.
- [16] Toth CC, Jedrzejewski NM, Ellis CL, et al. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2010, 6(11): 4171-4183.
- [17] Shi L, Zhang HH, Hu J, et al. Purinergic P2X receptors and diabetic neuropathic pain [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2012, 64(5): 531-542.
- [18] Crown ED. The role of mitogen activated protein kinase signaling in microglia and neurons in the initiation and maintenance of chronic pain [J]. *Exp Neurol*, 2012, 234(2): 330-339.
- [19] Daulhac L, Maffre V, Mallet C, et al. Phosphorylation of spinal N-methyl-d-aspartate receptor NR1 subunits by extracellular signal-regulated kinase in dorsal horn neurons and microglia contributes to diabetes-induced painful neuropathy [J]. *Eur J Pain*, 2011, 15(2): e1-169.
- [20] Wang D, Couture R, Hong Y. Activated microglia in the spinal cord underlies diabetic neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 728(1): 59-66.
- [21] Morgado C, Pereira-Terra P, Cruz CD, et al. Minocycline completely reverses mechanical hyperalgesia in diabetic rats through microglia-induced changes in the expression of the Potassium chloride co-transporter 2 (KCC2) at the spinal cord [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13(2): 150-159.
- [22] Bishnoi M, Bosgraaf CA, Abooj M, et al. Streptozotocin-induced early thermal hyperalgesia is Independent of glycemic state of rats: role of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and inflammatory mediators [J]. *Mol Pain*, 2011, 7(2): 52-62.
- [23] Pabreja K, Dua K, Sharma S, et al. Minocycline attenuates the development of diabetic neuropathic pain: possible anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 661(1/2/3): 15-21.
- [24] Ming L, Kaijun L, Changxi Y, et al. Puerarin alleviates neuropathic pain by inhibiting neuroinflammation in spinal cord [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014(7): 485927-485935.
- [25] Suzuki N, Hasegawa-Moriyama M, Takahashi Y, et al. Lidocaine attenuates the development of diabetic-induced tactile allodynia by inhibiting microglial activation [J]. *Anesth Analg*, 2011, 113(4): 941-946.

(收稿日期: 2015-06-23 修回日期: 2015-10-14)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2016.06.037

## 昼夜节律与肺部疾病关系的研究进展\*

陈 骋 综述, 洪志鹏<sup>△</sup> 审校

(昆明医科大学第一附属医院胸外科, 云南昆明 650032)

[关键词] 昼夜节律; 肺纤维化; 肺肿瘤; 发病机制

[中图分类号] R602

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)06-0828-04

昼夜节律普遍存在于各种生物体, 参与许多生命活动。生活节奏的加快使人体昼夜节律的破坏日趋严重, 随之产生各种

\* 基金项目: 云南省科技计划项目(2010CD160)。 作者简介: 陈骋(1980—), 在读博士研究生, 主要从事肺癌基础研究。 <sup>△</sup> 通讯作者,