

· 实验研究 ·

自噬在二甲双胍缓解小鼠切口痛中的作用

耿圆 鲍红光 斯妍娜 景灵

【摘要】 目的 探讨自噬在二甲双胍缓解小鼠切口痛中的作用。方法 选择 4~6 周清洁级健康成年雄性 ICR 小鼠, 体重 18~22 g。采用随机数字表法分为 5 组: 对照组(C 组)、二甲双胍组(M 组)、切口痛组(I 组)、切口痛+二甲双胍组(IM 组)、切口痛+二甲双胍+自噬抑制剂三甲基腺嘌呤组(MA 组), 每组 8 只。C 组、M 组不造模。I 组、IM 组及 MA 组小鼠建立切口痛模型。M 组、IM 组、MA 组从造模当天开始腹腔注射二甲双胍 200 mg/kg, 每日重复给药至造模后 7 d。C 组每日同一时点腹腔注射等容量生理盐水。MA 组每日于腹腔注射二甲双胍 30 min 前预给予 30 mg/kg 三甲基腺嘌呤。分别于造模前 1 d, 造模后 1、3、5、7 d 测定机械缩足阈值(MWT); 造模后 30 d, 深麻醉下处死小鼠, 取 L₄—L₆ 脊髓膨大节段组织, 采用 Western blot 法测定促炎细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 浓度, 自噬相关蛋白 LC3 II 和 p62 蛋白含量。结果 与造模前 1 d 比较, 造模后 1、3、5 d I 组、IM 组和 MA 组 MWT 明显降低($P < 0.05$)。造模后 1、3、5 d I 组、IM 组、MA 组 MWT 明显低于 C 组($P < 0.05$); IM 组 MWT 明显高于 I 组($P < 0.05$); MA 组 MWT 明显低于 IM 组($P < 0.05$)。I 组 IL-1 β 和 TNF- α 浓度明显高于 C 组($P < 0.05$); IM 组 IL-1 β 和 TNF- α 浓度明显低于 I 组($P < 0.05$); MA 组 IL-1 β 和 TNF- α 浓度明显高于 IM 组($P < 0.05$)。M 组和 I 组 LC3 II 蛋白含量明显高于 C 组, p62 蛋白含量明显低于 C 组($P < 0.05$); IM 组 LC3 II 蛋白含量明显高于 I 组, p62 蛋白含量明显低于 I 组($P < 0.05$); MA 组 LC3 II 蛋白含量明显低于 IM 组, p62 蛋白含量明显高于 IM 组($P < 0.05$)。结论 二甲双胍可抑制脊髓的神经炎症反应, 缓解小鼠切口痛, 其作用机理可能是通过激活自噬改善神经炎症。

【关键词】 二甲双胍; 自噬; 切口痛; 神经炎症

Role of autophagy in metformin relieving incisional pain in a mouse model GENG Yuan, BAO Hongguang, SI Yanna, JING Ling. Department of Anesthesiology, the Affiliated Nanjing Hospital Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China
Corresponding author: BAO Hongguang, Email: hongguang_bao@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of autophagy on metformin relieving incisional pain in a mouse model. **Methods** SPF adult male ICR mice (aged 4 - 6 weeks, weighing 18 - 22 g) were divided into 5 groups by using random number table ($n=8$): control group (group C), metformin group (group M), plantar incision group (group I), plantar incision+metformin group (group IM), and plantar incision+metformin+autophagy inhibitor 3-methyladenine group (group MA). Group C and group M did not make models, while group I, group IM and group MA established incision pain model. Group M, group IM, and group MA were administered with metformin 200 mg/kg by intraperitoneal injection, while group C were administered with the same volume of normal saline by intraperitoneal injection. Group MA was pre-administered with 30 mg/kg 3-methyladenine 30 minutes before intraperitoneal injection of metformin. The above administration was repeated daily until the 7th day after modeling from the day of modeling. The mechanical withdraw threshold (MWT) was measured 1 day before and 1, 3, 5 and 7 d after the modeling. 3 days after modeling, the mice were executed under deep anesthesia, and the L₄-L₆ spinal cord enlarged segments were taken out. Western blot was used to detect expression quantity of IL-1 β , TNF- α , LC3II and p62. **Results** Compared with 1 d before modeling, the MWT of group I, group IM and group MA decreased significantly after modeling 1, 3, 5 d ($P < 0.05$); At 1, 3, 5 d after modeling, the MWT of group I, group IM and group MA was significantly lower than that of group C ($P < 0.05$); The MWT of group IM was significantly

DOI: 10.12089/jca.2019.04.019

基金项目: 国家自然科学基金(81873954); 南京市科技发展计划项目(201715033); 南京市医学科技发展资金资助(QRX17019)

作者单位: 210006 南京医科大学附属南京医院 南京市第一医院麻醉科

通信作者: 鲍红光, Email: hongguang_bao@163.com

higher than that of group I ($P < 0.05$); The MWT of MA group was significantly lower than that of group IM ($P < 0.05$). The contents of IL-1 β and TNF- α in group I were significantly higher than those in group C ($P < 0.05$); The contents of IL-1 β and TNF- α in group IM were significantly lower than those in group I ($P < 0.05$); The content of IL-1 β and TNF- α in group MA was significantly higher than that in group IM ($P < 0.05$). In group M and group I, the content of LC3II was significantly higher than that in group C, and the content of p62 was significantly lower than that in group C ($P < 0.05$). In group IM, the content of LC3II was significantly higher than that in group I, and the content of p62 was significantly lower than that in group I ($P < 0.05$); In group MA, the content of LC3II was significantly lower than that in group IM, and the content of p62 was significantly higher than that in group IM ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of metformin in relieving incisional pain may be that it reduces the neuroinflammation by activating autophagy.

【Key words】 Metformin; Autophagy; Incisional pain; Neuroinflammation

外科手术引起的术后疼痛严重影响患者的生活质量。有效控制急性术后疼痛有利于患者的术后康复以及预防急性疼痛向慢性疼痛转化^[1]。大量的研究证实,外周和中枢神经系统的炎症反应在术后疼痛的发生发展过程中发挥着重要的作用^[2]。激活自噬能抑制神经炎症^[3]。自噬在神经病理性疼痛的形成过程中发挥着重要的作用^[4],而其在术后疼痛中的作用报道较少。二甲双胍是临床上广泛运用的降糖药,其潜在的镇痛效应受到广泛关注^[5],但具体机制仍不清楚。有研究提出二甲双胍可通过激活自噬抑制神经炎症^[6]。但是否能够通过激活自噬抑制神经炎症从而缓解术后疼痛未见报道。本研究拟在小鼠切口痛模型中评价二甲双胍缓解小鼠术后疼痛的作用,探讨自噬在二甲双胍减轻小鼠切口痛中的机制。

材料与方法

实验动物与分组 4~6 周龄清洁级健康成年雄性 ICR 小鼠,体重 18~22 g,购自南京医科大学动物中心。采用随机数字表法分为五组:对照组(C 组)、二甲双胍组(M 组)、切口痛组(I 组)、切口痛+二甲双胍组(IM 组)、切口痛+二甲双胍+自噬抑制剂三甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA)组(MA 组)。C 组、M 组不造模。

实验方法 I 组、IM 组和 MA 组小鼠建立切口痛模型。M 组、IM 组、MA 组从造模当天开始腹腔注射二甲双胍 200 mg/kg,每日重复给药至造模后 7 d。C 组每日同一时点腹腔注射等容量生理盐水。MA 组每日于腹腔注射二甲双胍 30 min 前预给予三甲基腺嘌呤 30 mg/kg。

切口痛模型的建立 依照 Brennan 等^[7]介绍的方法制备切口痛模型。小鼠吸入 3%七氟醚,1%七氟醚术中维持,用 10%碘伏消毒左后足,从足底近端 0.5 cm 处向趾部做长约 1 cm 的纵行切口,深至

皮下筋膜,并用眼科镊挑起足底肌肉,钝性分离皮下肌腱筋膜,做纵行切割,保证肌肉起止附着点的完整,暴露肌腱筋膜在外 2 min,完成后将其复位,按压止血,并用 4-0 尼龙丝线缝合伤口,术后用碘伏消毒切口,并涂抹少量抗生素软膏以预防术后感染。

行为学测定 分别于造模前 1 d,造模后 1、3、5、7 d 测定机械缩足阈值 (mechanism withdraw threshold, MWT),在安静状态,温度 20~25 °C 的环境中,将小鼠置于透明的金属网格笼中,适应环境 30 min 后,采用 von Frey 纤维丝刺激左足底切口周围区域,垂直缓慢施加压力,直至小鼠出现缩足或舔舐左足即为阳性反应,测量 3 次,间隔 5 min,取其平均值为 MWT。

蛋白含量测定 造模后 3 d,深麻醉下处死小鼠,取 L₄-L₆ 脊髓膨大节段组织。采用 Western blot 法测定脊髓白介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 浓度、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein light chain 3, LC3 II) 和 Sequestosome 1 (SQSTM1/p62, p62) 蛋白含量。脊髓组织中加入组织蛋白裂解液,并于冰上匀浆,4 °C 下离心 (转速 12 000 r/min, 15 min),取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度后加入上样缓冲液,于沸水中煮 5 min,冷却后放入 -40 °C 冰箱中保存。根据目的蛋白分子量的大小配制不同的分离胶,电泳完毕后将胶上的蛋白转到聚偏二氟乙烯膜上,以 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,4 °C 孵育一抗过夜,取出膜并使用 Tris 缓冲盐水和吐温 20 的混合物 (TBST) 清洗 3 次,每次 10 min,然后再室温孵育二抗,2 h 后,取出膜再次使用 TBST 洗 3 次,每次 10 min,完毕后使用化学发光仪进行数据图像采集。使用 Quantity One 软件比较分析各蛋白条带的灰度,并做进一步数据统计与分析。

统计分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,

组间比较采用成组 *t* 检验, 组内比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

与造模前 1 d 比较, 造模后 1、3、5 d I 组、IM 组和 MA 组 MWT 明显降低 ($P < 0.05$)。造模后 1、3、5 d I 组、IM 组、MA 组 MWT 明显低于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组 MWT 明显高于 I 组 ($P < 0.05$); MA 组 MWT 明显低于 IM 组 ($P < 0.05$); C 组和 M 组不同时点 MWT 差异无统计学意义 (表 1)。

I 组 IL-1 β 蛋白含量明显高于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组 IL-1 β 蛋白含量明显低于 I 组 ($P < 0.05$); MA 组 IL-1 β 蛋白含量明显高于 IM 组 ($P < 0.05$) (图 1)。

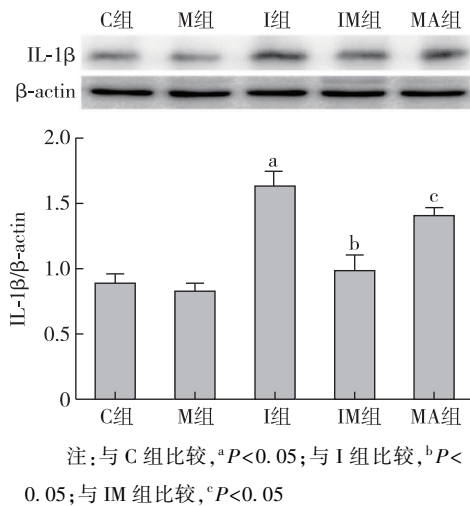
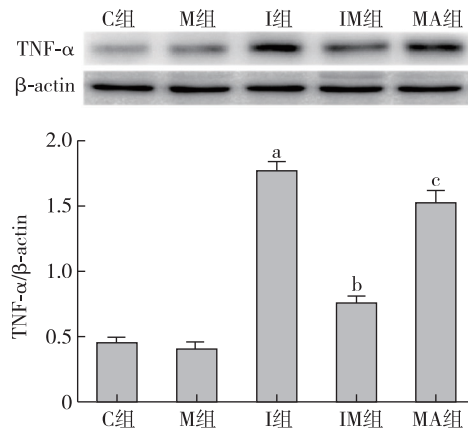


图 1 五组小鼠造模后 3 d 脊髓 IL-1 β 蛋白含量的比较

I 组 TNF- α 蛋白含量明显高于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组 TNF- α 蛋白含量明显低于 I 组 ($P < 0.05$); MA 组 TNF- α 蛋白含量明显高于 IM 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

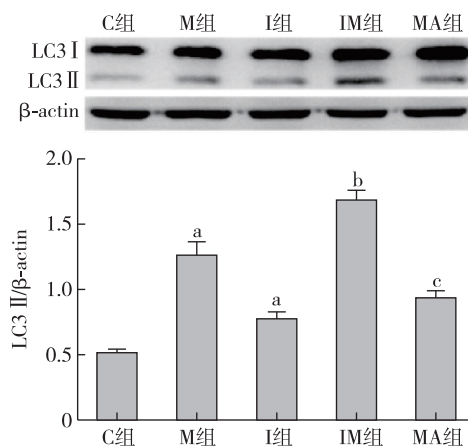
M 组和 I 组脊髓 LC3 II 蛋白含量明显高于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组 LC3 II 蛋白含量明显高于 I 组 ($P <$

0.05); MA 组 LC3 II 蛋白含量明显低于 IM 组 ($P < 0.05$) (图 3)。



注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 I 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 IM 组比较, ^c $P < 0.05$

图 2 五组小鼠造模后 3 d 脊髓 TNF- α 蛋白含量的比较



注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 I 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 IM 组比较, ^c $P < 0.05$

图 3 五组小鼠造模后 3 d 脊髓 LC3 II 蛋白含量的比较

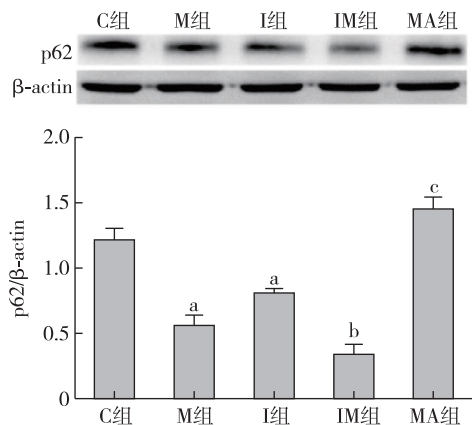
M 组和 I 组 p62 蛋白含量明显低于 C 组 ($P < 0.05$); IM 组 p62 蛋白含量明显低于 I 组 ($P <$

表 1 五组小鼠不同时点 MWT 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	造模前 1 d	造模后 1 d	造模后 3 d	造模后 5 d	造模后 7 d
C 组	8	1.54 \pm 0.17	1.51 \pm 0.17	1.52 \pm 0.19	1.60 \pm 0.12	1.54 \pm 0.12
M 组	8	1.54 \pm 0.21	1.52 \pm 0.19	1.58 \pm 0.16	1.56 \pm 0.23	1.61 \pm 0.21
I 组	8	1.56 \pm 0.20	0.23 \pm 0.03 ^{ab}	0.49 \pm 0.05 ^{ab}	0.74 \pm 0.11 ^{ab}	1.36 \pm 0.18
IM 组	8	1.54 \pm 0.17	1.04 \pm 0.10 ^{abc}	1.16 \pm 0.05 ^{abc}	1.30 \pm 0.14 ^{abc}	1.51 \pm 0.13
MA 组	8	1.52 \pm 0.24	0.21 \pm 0.04 ^{abd}	0.41 \pm 0.07 ^{abd}	0.70 \pm 0.07 ^{abd}	1.30 \pm 0.16

注: 与造模前 1d 比较, ^a $P < 0.05$; 与 C 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 I 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 IM 组比较, ^d $P < 0.05$

0.05); MA 组 p62 蛋白含量明显高于 IM 组 ($P < 0.05$) (图 4)。



注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 I 组比较,^b $P < 0.05$;与 IM 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 五组小鼠造模后 3 d 脊髓 p62 蛋白含量的比较

讨论

术后疼痛是临床上常见的急性疼痛形式,术后急性疼痛增加了心脏病发作,肺炎,深静脉血栓形成,免疫功能障碍,焦虑和术后慢性疼痛的风险,严重者可影响术后康复与生活质量^[2]。外周和中枢神经系统过度的炎症反应和多种炎症细胞因子的释放在术后疼痛的发生和维持中发挥着关键的作用^[8]。神经炎症的主要特征是脊髓和脑中胶质细胞(如小胶质细胞和星形胶质细胞)的激活,导致促炎细胞因子和趋化因子的释放^[9]。在手术导致的组织和神经损伤的早期阶段,损伤或功能失调的蛋白质,脂质和细胞器积聚在病变部位,引起神经毒性,产生局部应激,加重神经炎症。而自噬与神经炎症密切相关,有文献提出自噬可以降解失去功能的蛋白质和细胞器、保护受损的神经元、改善微环境、促进神经再生从而抑制神经炎症。自噬的激活不仅可以去除引起炎症的毒素还可为细胞代谢提供能量和蛋白,保护背根神经节中受损的神经元^[10-12]。因此,自噬可能在术后疼痛的形成过程中发挥着重要的作用。

二甲双胍,一种经典且广泛使用的降糖药,不影响正常小鼠的空腹血糖水平及糖耐量^[13]。最近有研究发现二甲双胍能够缓解糖尿病诱发的神经病理性疼痛,其具体机制尚不清楚,可能与二甲双胍能够逆转大鼠脊髓背角突触数量的增加以及抗氧化应激有关^[14-15]。上述发现表明了二甲双胍对

感觉神经保护及其镇痛作用。与此同时,二甲双胍又能够增强自噬缓解神经炎症^[6]。为了验证二甲双胍是否通过激活自噬抑制神经系统过度的炎症反应从而发挥对急性术后疼痛的镇痛效应,本研究在小鼠切口痛模型中观察二甲双胍的镇痛作用与自噬及神经炎症之间的关系。

LC3 是常用的自噬标记物之一,有 LC3 I、LC3 II 两种形式,在自噬小体形成和延伸过程中起关键的作用。自噬小体形成过程中,胞浆中的 LC3 I 经泛素化样加工与自噬小体表面的磷脂酰乙醇胺偶联生成 LC3 II,参与自噬小体膜的形成,LC3 II 的上升通常提示自噬增强。p62 是一种长寿命蛋白,在自噬的过程中可与 LC3 选择性结合进入自噬小体中被自噬溶酶体降解,p62 的蓄积常提示自噬受到抑制^[16]。本实验结果显示,二甲双胍处理的小鼠足底切口疼痛明显好转,脊髓组织中促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 蛋白含量明显降低,脊髓的炎症反应受到抑制;LC3 II 蛋白含量升高,p62 蛋白含量降低,脊髓的自噬增强。结果提示腹腔注射二甲双胍增强了脊髓中自噬的水平,同时减轻了脊髓的炎症反应。为了探讨二甲双胍是否是通过激活自噬抑制神经炎症缓解小鼠的切口痛,本实验运用了自噬的抑制剂 3-MA,3-MA 通过抑制 III 型磷脂酰肌醇 3-激酶(PI-3K)阻断自噬体形成来抑制自噬。结果显示,与二甲双胍治疗组比较,3-MA 处理的小鼠造模后 1、3、5 d 时 MWT 明显降低,脊髓中促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 明显上升,LC3 I 向 LC3 II 转化减少,p62 蓄积,提示应用自噬抑制剂时,二甲双胍对切口痛的镇痛效应消失,脊髓组织自噬被抑制,脊髓炎症反应加剧。有研究证实自噬缺陷可导致受损的线粒体清除障碍,从而 ROS 大量产生,激活炎性小体并加重神经炎症^[6]。自噬的缺陷可以加重小鼠的神经病理性疼痛^[4]。上述研究表明自噬、神经炎症、疼痛三者密切相关。本实验仅在动物水平验证了二甲双胍对急性术后疼痛的镇痛作用,其具体机制还有待进一步研究。

综上所述,小鼠切口痛造模后,脊髓促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 蛋白含量明显升高,用二甲双胍处理后可抑制脊髓的神经炎症反应,因此推测二甲双胍缓解小鼠切口痛的作用机理可能是通过激活自噬改善神经炎症。

参考文献

- [1] Martinez V, Baudic S, Fletcher D. Chronic postsurgical pain.

- Ann Fr Anesth Reanim, 2013, 32(6): 422-435.
- [2] Fan YX, Hu L, Zhu SH, et al. Paeoniflorin attenuates postoperative pain by suppressing Matrix Metalloproteinase-9/2 in mice. *Eur J Pain*, 2018, 22(2): 272-281.
- [3] Zhou X, Zhou J, Li X, et al. GSK-3beta inhibitors suppressed neuroinflammation in rat cortex by activating autophagy in ischemic brain injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 411(2): 271-275.
- [4] Berliocchi L, Russo R, Maiarù M, et al. Autophagy impairment in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain*, 2011, 7: 83.
- [5] Kialka M, Doroszewska K, Janeczko M, et al. Metformin-new potential medicine in pain treatment? *Przegl Lek*, 2017, 74(2): 81-83.
- [6] Lu M, Su C, Qiao C, et al. Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2016, 19(9): 1-11.
- [7] Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*, 1996, 64(3): 493-501.
- [8] Ji RR, Xu ZZ, Gao YJ. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(7): 533-548.
- [9] Ji RR, Nackley A, Huh Y, et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology*, 2018, 129(2): 343-366.
- [10] Qu L, Liang X, Gu B, et al. Quercetin alleviates high glucose-induced Schwann cell damage by autophagy. *Neural Regen Res*, 2014, 9(12): 1195-1203.
- [11] Huang HC, Chen L, Zhang HX, et al. Autophagy promotes peripheral nerve regeneration and motor recovery following sciatic nerve crush injury in rats. *J Mol Neurosci*, 2016, 58(4): 416-423.
- [12] Marinelli S, Nazio F, Tinari A, et al. Schwann cell autophagy counteracts the onset and chronification of neuropathic pain. *Pain*, 2014, 155(1): 93-107.
- [13] Shin NR, Lee JC, Lee HY, et al. An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 2014, 63(5): 727-735.
- [14] Ma J, Yu H, Liu J, et al. Metformin attenuates hyperalgesia and allodynia in rats with painful diabetic neuropathy induced by streptozotocin. *Eur J Pharmacol*, 2015, 764: 599-606.
- [15] Lin JY, He YN, 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. *Neurochem Res*, 2018, 43(12): 2232-2239.
- [16] Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 2011, 469(7330): 323-335.

(收稿日期:2018-10-20)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》对来稿署名的要求

作者姓名在文题下方按序排列,一般不宜超过6位。排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作更换,如欲更换第一作者,需出具单位证明和由全体作者签名的申请。作者单位的邮编、所在城市、单位名称的全称和科室在首页脚注中说明。若其他作者不属同一单位,需写出各自单位,并在单位后用括号列出作者的姓名。作者应具备的条件:(1)参与选题和设计,或参与资料的分析 and 解释;(2)起草或修改论文中关键性理论或其他主要内容;(3)能对编辑部的修改意见进行核修,在学术上进行答辩,并最终同意该文发表者。以上3条均需具备。“通信作者”系指研究生课题论文的导师或直接指导者、相关科研项目课题负责人及该文的主要责任者和联系者。“通信作者”对论文应具有与第一作者同等的权利和义务。