

褪黑素通过 SIRT1-BMAL1 通路减轻神经病理性疼痛的机制研究

王镇池^{1,2}, 李 锐^{1,2}

摘要 **目的** 评价褪黑素对神经病理性疼痛夜间加重的影响,并通过特异性沉默信息调节因子 1(SIRT1)-脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1(BMAL1)通路探讨其机制。**方法** 96 只 SPF 级雄性 C57/B6 小鼠,随机分为 3 组:假手术(S)组、神经病理性疼痛模型(NP)组和 NP 模型+褪黑素治疗(NP+M)组;术前试验小鼠置于指定光照模式环境中;采用 12 h 光照与 12 h 黑暗交替环境,持续至少两周,将自然时间转换为授时时间(ZT),光照起点定为 ZT0;S 组小鼠仅分离坐骨神经,NP 组和 NP+M 组采用坐骨神经慢性缩窄性损伤制备小鼠 NP 模型,NP+M 组术后注射 10 mg/kg 褪黑素;Western blot 法检测术后 14 d 各时点脊髓的 SIRT1、BMAL1 和谷胱甘肽过氧化酶 1(Gpx1)表达量的变化;术后通过免疫荧光技术对脊髓背角 SIRT1 和脊髓神经元标志物神经元特异性核蛋白(NeuN)、小胶质细胞激活标记物离子钙结合适配分子 1(iba-1)、星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)进行共染色,并检测各时点 iba-1 以确定小胶质细胞激活状态。**结果** 与 NP 组 ZT10 时点相比,NP 组小鼠术后 14 d ZT22 时点 SIRT1、BMAL1 和 Gpx1 降低($P<0.05$);与 NP 组 ZT14 时点相比,NP+M 组 ZT14 时点 SIRT1 与 BMAL1 升高($P<0.05$),而 Gpx1 于 ZT18 时点升高($P<0.05$)。SIRT1 在脊髓背角与小胶质细胞共表达;与 ZT10 时点相比,NP 组小鼠术后 14 d ZT22 时点小胶质细胞表达降低($P<0.05$);与 ZT10 时点相比,NP+M 组小鼠术后 14 d ZT22 时点小胶质细胞表达差异无统计学意义。**结论** 褪黑素可以减轻神经病理性疼痛夜间加重,其机制可能与激活小胶质细胞 SIRT1-BMAL1 通路蛋白表达有关。

关键词 神经病理性疼痛;昼夜节律;抗氧化;褪黑素;小胶质细胞;谷胱甘肽过氧化酶 1

中图分类号 R 441.1;R 852.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0442-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.012

2024-01-11 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:201904a07020065)

作者单位:¹ 安徽医科大学第二附属医院麻醉与围术期医学科,合肥 230601

² 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室,合肥 230601

作者简介:王镇池,男,硕士研究生;

李 锐,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: lrayd@sina.com

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是一种常见的慢性痛。临床调查及动物试验^[1]均表明,机体在一个昼夜循环内对于伤害性刺激的反应不尽相同,一些与伤害性感受相关的介质表达也并非一成不变^[2]。机体生理功能中的昼夜节律由内部自我维持的分子振荡器控制,称为生物钟,可影响多种生理过程^[3]。褪黑素有助于调节人类的昼夜节律和其他生理功能,同时也被证明可治疗疼痛相关疾病,在人类和动物模型的疼痛手术过程中应用^[4]。

沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)失活是 NP 的关键因子,因此激活 SIRT1 蛋白进而减轻氧化应激所导致疼痛值得深入研究。时钟蛋白(CLOCK protein, CLOCK)/脑和肌肉 ARNT 样蛋白 1(brain and muscle ARNT-like protein 1, BMAL1)异二聚体作为生物钟的起始关键物,被调节细胞内节律性的基因所表达^[5]。SIRT1 能够将 BMAL1 去乙酰化,抑制 CLOCK-BMAL1 介导的时钟相关基因的转录,同时也可抑制由于氧化应激所导致神经胶质激活,最终使得 NP 的疼痛症状得到缓解。大部分与氧化损伤相关的酶已被证明在一天内的特定时间会达到峰值,其中抗氧化酶 Gpx1^[6]尤为重要。该研究旨在研究褪黑素对 NP 夜间加重的影响,并通过 SIRT1-BMAL1 通路探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 96 只 SPF 级健康雄性 C57/B6 小鼠,8 周龄,体质量 20 g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,室温 22~24℃,相对湿度 40%~50%,房间昼夜周期为 12/12 h,适应性饲养 1 周,按随机数字表法分为 3 组:假手术组(S 组)、NP 组和褪黑素治疗组(melatonin, NP+M 组),每组 24 只。将所有试验小鼠饲养至指定光照模式环境中,即 12 h 光照(光照期 8:00—12:00)与 12 h 黑暗(黑暗期 20:00—8:00)交替,持续至少 3 周;将自然时间转换为授时时间(zeitgeber time, ZT),光照起点定为 ZT0, ZT12-23 为黑暗期,所有黑暗期操作均在

红光下进行。

1.1.2 主要试剂与仪器 褪黑素(货号:HY-B0075)购自美国 MCE 公司;组织裂解液(货号:P0013B)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(货号:P1046)、BSA(货号:ST023)、Triton X-100(货号:P0096)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010)和抗荧光淬灭封片液(货号:P0131)等均购自上海碧云天生物技术有限公司;Western blot 山羊抗兔二抗(货号:31460)、Western blot 山羊抗鼠二抗(货号:31430)、荧光山羊抗兔二抗(货号:A-11011)、荧光山羊抗鼠二抗(货号:A11011)购自美国 Thermo 公司;鼠抗 β -actin 抗体(货号:A2228)购自美国 Sigma 公司;鼠抗 SIRT1 抗体(货号:ab110304)、兔抗 Gpx1 抗体(货号:ab108427)、兔抗小胶质细胞激活标记物离子钙结合适配分子 1(ionized calcium-binding adaptermolecule-1,iba-1)抗体(货号:ab178846)购自英国 Abcam 公司;兔抗 BMAL1 抗体(货号:14020)购自美国 CST 公司;兔抗脊髓神经元标志物神经元特异性核蛋白(neuron-specific nuclear protein, NeuN)抗体(货号:26975-1-AP)、兔抗星形胶质细胞标记物胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acid protein,GFAP)抗体(货号:16825-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司。von Frey 触痛仪(型号:NC12775)购自美国 IITC 公司;蛋白电泳和转移设备(型号:1658033)购自美国 Bio-RAD 公司;全自动化学发光图像分析仪(型号:5200)购自上海天能科技有限公司;倒置显微镜(型号:Vert. A1)购自德国蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 NP 小鼠模型的建立 参照文献^[7]采用坐骨神经慢性缩窄性损伤(chronic constriction injury, CCI)制备 NP 模型。戊巴比妥(50 mg/kg)腹腔注射麻醉后,右侧股骨上方剃毛、消毒铺巾,股骨外侧切开 2 cm 左右的皮肤,钝性分离肌肉,暴露出右侧坐骨神经主干分离神经周围的组织后在神经主干部位,用 6-0 铬制羊肠线以腿部不出现抽搐为标准结扎 3 道,间隔 1 mm。假手术组仅进行前面的几个步骤,不结扎坐骨神经。压迫止血后,用缝针和 5-0 手术缝合线分别对切口部位的肌肉和皮肤进行缝合。NP + M 组根据文献^[8]在术后 7 d 开始于每日昼夜转换点(ZT12)给予腹腔注射 10 mg/kg 褪黑素,持续至术后 14 d,其他组腹腔注射同等体积生理盐水。术后 14 d 于不同时间点(ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18 和 ZT22)分别取 1 只小鼠脊髓备用。

1.2.2 疼痛行为检测 术前 1 d 和术后 1、3、7、10 和 14 d 不同时间点(ZT4、ZT10、ZT16 和 ZT22)测定小鼠机械缩足反应阈(paw withdrawal mechanical threshold,PMWT)^[9]。将小鼠置于带金属网底的有机玻璃笼内,待其适应环境 30 min,等小鼠各种活动基本消失后,采用 von Frey 触痛仪的刺激针缓慢接触右侧足底,记录出现缩足反应时的压力值。重复测量 3 次,间隔大于 5 min,取其平均值作为 PMWT。

1.2.3 Western blot 术后 14 d,在 ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18 和 ZT22 时点,取小鼠 L4-6 节段脊髓置于 -80 ℃ 冰箱中保存。Western blot 法检测 SIRT1、BMAL1 和 Gpx1 蛋白表达。将脊髓组织加入 RIPA 裂解液,研磨后,13 200 r/min 离心 15 min,取上清液测定蛋白浓度。配制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,上样后电泳、转膜、5% 脱脂牛奶封闭、TBST 洗涤后分别加入鼠抗 β -actin 抗体(1:10 000)、鼠抗 SIRT1 抗体(1:1 000)、兔抗 BMAL1 抗体(1:1 000)、兔抗 GPX1 抗体(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。滴加相应的山羊抗兔二抗或山羊抗鼠二抗(1:10 000),摇床上反应 2 h,TBST 漂洗 3 次,每次 10 min。随后在成像系统上显出蛋白条带。ImageJ 图像分析软件测定条带灰度值,以目的蛋白条带与内参条带灰度值的比值来反映目的蛋白的相对表达水平。

1.2.4 免疫荧光组织化学染色 术后 14 d 用戊巴比妥钠麻醉动物,暴露胸腔后,经左心室进针,缓慢灌注 0.9% 的生理盐水,然后迅速灌注 4% 的多聚甲醛,并切下右心耳。灌注完毕后,取出脊髓 L4-6 节段,放置 4% 多聚甲醛中固定 2 h,于 4 ℃ 下 30% 的蔗糖溶液中脱水过夜。将脊髓进行冰冻切片,厚度为 10 μ m。在含有 5% BSA 和 0.3% Triton X-100 的 PBS 中于室温下孵育 1 h,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。将脊髓切片与一抗鼠抗 SIRT1 抗体(1:100)、脊髓神经元标志物兔抗 NeuN 抗体(1:500)、小胶质细胞激活标记物兔抗 iba-1 抗体(1:1 000)、星形胶质细胞标记物兔抗 GFAP 抗体(1:500)^[10] 4 ℃ 避光孵育过夜。PBS 清洗 3 次,每次 5 min,然后与各一抗偶联的山羊二抗(1:1 000)室温避光孵育 1 h。后续步骤在避光条件下进行,使用抗荧光淬灭封片液对细胞核进行染色,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,晒干,封片。在荧光显微镜下拍片观察。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,小鼠的 PMWT 用均数 $\pm$ 标准差来表示,采用重复测量的方差分析来比较不同时间点之间的差异

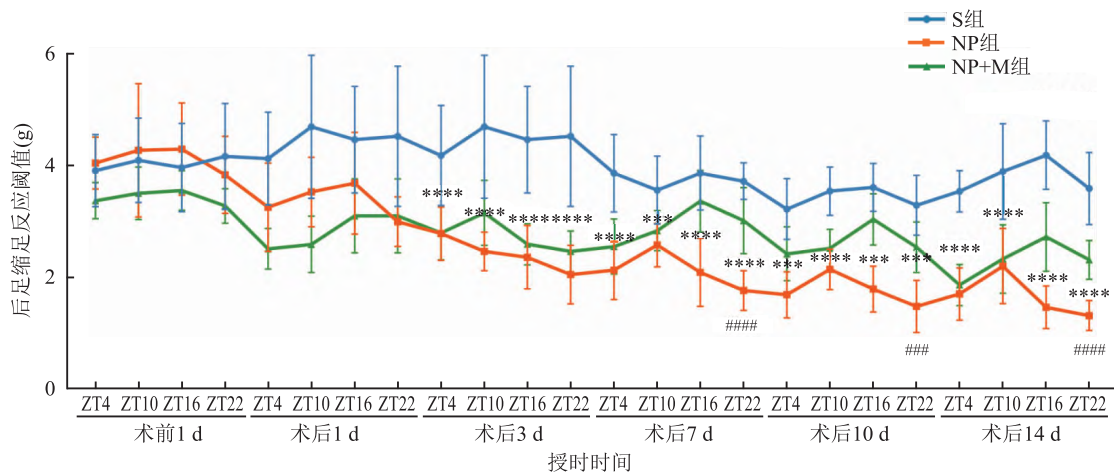


图1 S组、NP组及NP+M组各时间点小鼠的PMWT ($n=12$)

与S组比较: *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$;与NP组ZT10时点比较: ### $P<0.001$, #### $P<0.0001$

性;Western blot 结果组间比较采用单因素方差分析,当差异存在方差齐时比较采用 t 检验,否则使用 Bonferroni 法进行两两比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NP 对小鼠 PMWT 的影响及昼夜变化 本研究结果显示,小鼠 CCI 后患爪出现不堪重负、足趾并拢现象,表示小鼠 NP 模型制备成功。与 S 组比较,NP 组小鼠术后 3 d ZT4 时点 PMWT 开始下降,且至少持续至术后第 14 天 ZT22 时点(其中术后 3 d : $t=5.56/6.73/7.68/7.10$,术后 7 d : $t=7.56/5.51/7.85/15.44$,术后 10 d : $t=8.55/9.66/11.91/9.55$,术后 14 d : $t=11.00/5.47/13.84/12.60$,均 $P<0.05$)。与 NP 组相比,NP 组小鼠术后 7、10、14 d ZT22 时点 PMWT 下降($t=5.95/4.30/4.70$,均 $P<0.05$),其余各时点差异无统计学意义,表明 NP 组疼痛行为存在昼轻夜重现象;然而 NP + M 组小鼠术后 7、10、14 d ZT22 时点与 ZT10 时点相比,PMWT 差异无统计学意义(均 $P>0.05$),说明昼夜转换点给予褪黑素平衡了这种昼夜差异。见图 1。

2.2 SIRT1 相关蛋白在 NP 昼夜节律发挥作用以及褪黑素夜间镇痛效果 与 NP 组 ZT10 时点相比,NP 组小鼠术后 14 d ZT22 时点 SIRT1、BMAL1 和 Gpx1 均降低($t=8.608/5.459/4.476$,均 $P<0.05$);表明 NP 组夜间 SIRT1、BMAL1 和 Gpx1 表达低于日间。与 NP 组相比,NP + M 组 ZT14 时点 SIRT1($t=8.761$, $P<0.05$)与 BMAL1($t=4.738$, $P<0.05$)升高,而 Gpx1 于 ZT18 时点升高($t=6.95$, $P<0.05$)。

提示 NP + M 组 SIRT1、BMAL1 和 Gpx1 蛋白表达水平在夜间有所改善。见图 2。

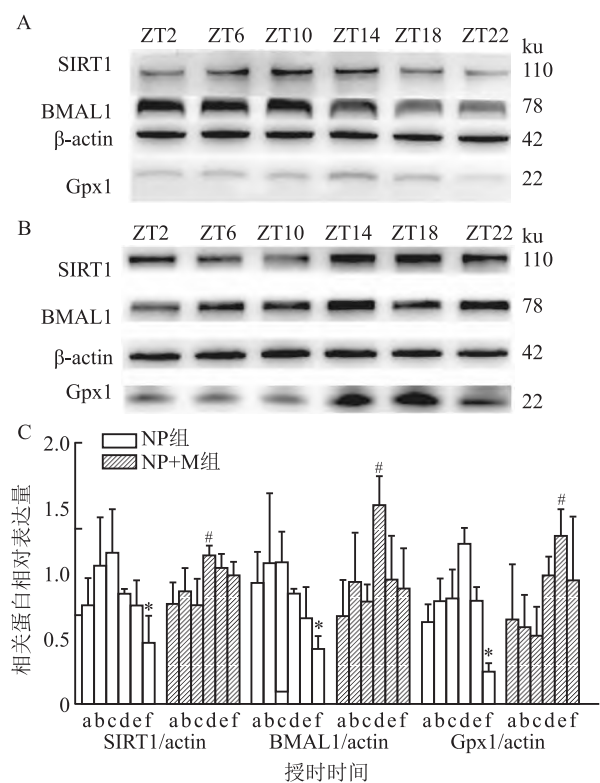


图2 Western blot 法检测小鼠腰段脊髓组织中 SIRT1、BMAL1 及 Gpx1 表达的比较

A:NP 组小鼠脊髓术后 14 d SIRT1 相关蛋白表达电泳图;B:NP + M 组小鼠脊髓术后 14 d SIRT1 相关蛋白表达电泳图;C:各组相关蛋白表达量的统计比较 ($n=3$);a:ZT2;b:ZT6;c:ZT10;d:ZT14;e:ZT18;f:ZT22;与 NP 组术后 14 d ZT10 时点比较: * $P<0.05$;与 NP 组同一时点比较: # $P<0.05$

2.3 小胶质细胞激活在褪黑素缓解 NP 昼夜差异中发挥作用 NP 组 L4 - 6 段脊髓背角荧光免疫显

示,NeuN、GFAP 和 iba1 分别标记神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞;SIRT1 在脊髓背角与小胶质细胞共表达,与神经元、星形胶质细胞没有共表达。见

图 3。与 NP 组 ZT10 时点相比,NP 组小鼠术后 14 d ZT22 时点小胶质细胞激活数量降低($t=7.234,P<0.05$),而 NP + M 组小鼠无明显差异。与 NP 组 ZT22

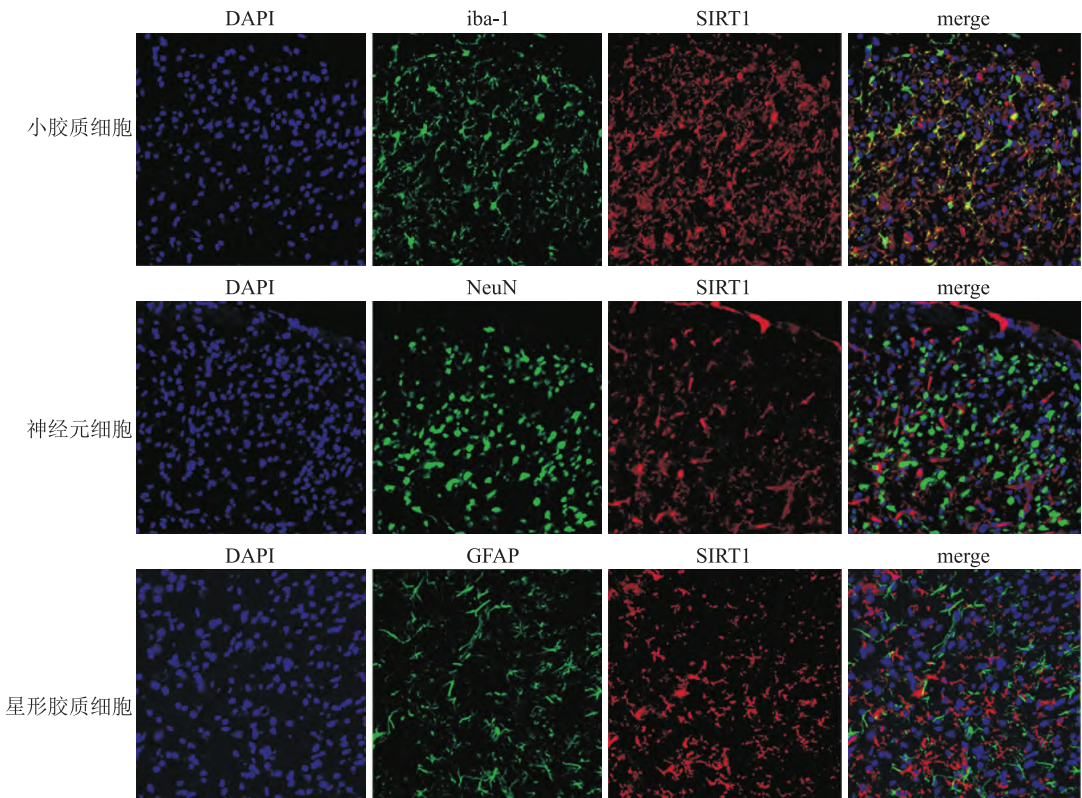


图 3 SIRT1 蛋白在脊髓背角表达荧光图 ×200

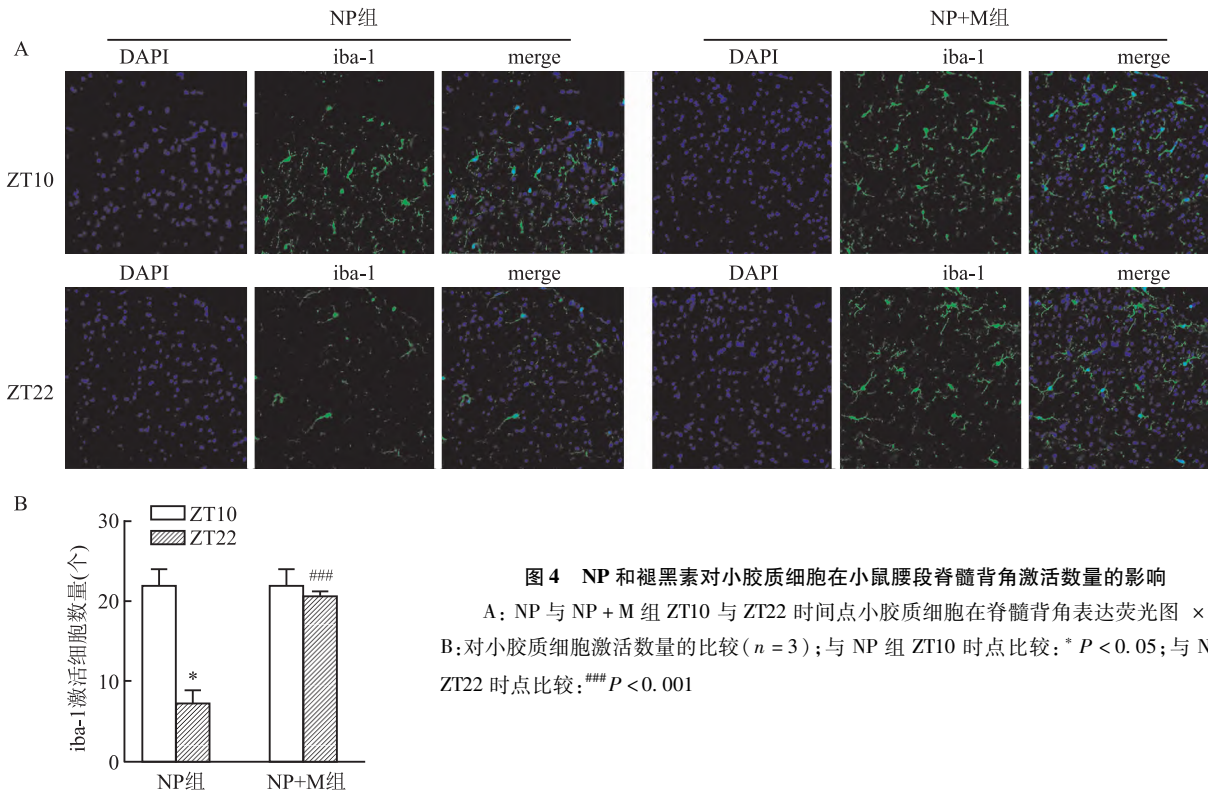


图 4 NP 和褪黑素对小胶质细胞在小鼠腰段脊髓背角激活数量的影响

A: NP 与 NP + M 组 ZT10 与 ZT22 时间点小胶质细胞在脊髓背角表达荧光图 ×200;
B:对小胶质细胞激活数量的比较 ($n=3$);与 NP 组 ZT10 时点比较: * $P<0.05$;与 NP 组 ZT22 时点比较: ### $P<0.001$

时点相比, NP + M 组小鼠术后 14 d ZT22 时点小胶质细胞激活数量升高 ($t = 14.14, P < 0.01$)。见图 4。表明小胶质细胞在褪黑素通过 SIRT1-BMAL1 通路减轻 NP 夜间加重中发挥重要作用。

3 讨论

临床发现伤害性、神经性、中枢性和混合性疼痛状态均存在昼夜节律模式^[11]。本研究在啮齿动物中建立了慢性疼痛的昼夜节律,通过机械缩爪阈值测试评估 CCI 手术后啮齿动物的疼痛状态,结果显示 NP 组小鼠休息期(啮齿动物的夜间)的疼痛阈值高于活动期(啮齿动物的日间)。

SIRT1 是一种 NAD⁺ 依赖的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶,具有脱乙酰基特性,可以调节抗氧化酶活性^[12],也可以通过去乙酰化来控制生物钟基因(如 *BMAL1*)的表达,从而调控生物钟的分子转录。昼夜节律的转录-翻译反馈机制中,CLOCK 在其 Lys537 残基处乙酰化 *BMAL1*,从而允许隐花色素 1(cryptochromes 1, *CRY1*)的募集^[6]。有研究^[13]表明 SIRT1 是昼夜节律基因表达的调节因子,在小鼠肝细胞和成纤维细胞中以昼夜节律的方式积累,并且是几个核心时钟基因(包括 *Bmal1*、*Rory*、*Per2* 和 *Cry1*)的高强度昼夜节律转录所必需的,即 SIRT1 表达水平的变化可以影响昼夜节律相关蛋白表达进而参与诸多病理反应。在小鼠脊髓中 SIRT1 可能通过对 *BMAL1* 的去乙酰化来干扰核心时钟基因来实现 NP 的昼夜调节。本研究结果表明 CCI 引起的疼痛存在昼轻夜重的节律性变化,同时,Western blot 分析结果表明,SIRT1 和 *BMAL1* 在脊髓背角中的表达在昼夜之间也存在差异,说明 SIRT1-BMAL1 通路很可能在 NP 中的昼夜节律相关调节发挥着重要作用。

NP 中氧化应激也发挥着一定效应。脊髓小胶质细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 诱导产生,进而诱发疼痛超敏。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是一种强大的抗氧化剂,可在硒依赖性蛋白 Gpx1 催化的过程中中和 ROS,从而将 GSH 转化为谷胱甘肽二硫化物(oxidized glutathione, GSSG)的氧化态,通过谷胱甘肽还原酶催化 GSSG 还原为 GSH 的反应,从而中和 ROS。Gpx1 受到 *BMAL1* 激活后,表达水平上升,可通过抗氧化发挥缓解 NP 作用。然而对于这一系列反应定位仍需进一步研究。

此外,本研究通过对脊髓背角进行 SIRT1 双荧光免疫标记,结果表明,在雄性 CCI 组小鼠的脊髓背

角中,SIRT1 免疫荧光的细胞没有被 NeuN 或 GFAP 双标记,相反,大多数 SIRT1 阳性细胞被 iba-1 双标记,并且 NP 组小鼠脊髓被激活的小胶质细胞数量在昼夜之间存在差异,提示影响 NP 昼夜节律紊乱的 SIRT1 主要定位于脊髓小胶质细胞内。

褪黑素是一种众所周知的强抗氧化剂,参与多种细胞过程,如转移、增殖和凋亡。同时有研究^[14]表明,褪黑素能够通过恢复基因表达的节律模式来改变各种昼夜节律基因的水平以调节昼夜节律紊乱。因此提示褪黑素有可能通过 SIRT1 作用于生物钟来改善 NP 的昼夜紊乱。本研究在 CCI 小鼠疼痛的昼夜转换点使用褪黑素进行干预,观察到用药后小鼠痛敏昼夜紊乱行为改善以及小胶质细胞受激活状态昼夜差异性改变。

综上所述,褪黑素减轻神经病理性疼痛夜间加重,其机制可能与激活小胶质细胞进而促进 SIRT1-BMAL1 通路蛋白表达有关。然而,本实验仍然有很多不足,如尚未研究 NP 后各蛋白间相互作用情况,尚未对 SIRT1 干预后的疼痛影响加以分析;尚未完善褪黑素给药时间点并加以比较以及尚未在细胞层面上对于疼痛发生部位的细胞加以鉴别。

参考文献

- [1] Chassard D, Bruguerolle B. Chronobiology and anesthesia[J]. Anesthesiology, 2004, 100(2): 413-27.
- [2] Koyanagi S, Kusunose N, Taniguchi M, et al. Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia[J]. Nat Commun, 2016, 7: 13102.
- [3] Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 517-49.
- [4] Kaur T, Shyu B C. Melatonin: A new-generation therapy for reducing chronic pain and improving sleep disorder-related pain[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1099: 229-51.
- [5] Patke A, Young M W, Axelrod S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 67-84.
- [6] O'Neill J S, Reddy A B. Circadian clocks in human red blood cells[J]. Nature, 2011, 469(7331): 498-503.
- [7] Jensen T S, Baron R, Haanpää M, et al. A new definition of neuropathic pain[J]. Pain, 2011, 152(10): 2204-5.
- [8] Shen M, Cao Y, Jiang Y, et al. Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FOXO1-mediated autophagy: implication of an antioxidation-independent mechanism[J]. Redox Biol, 2018, 18: 138-57.
- [9] 谢雨杉, 刘海帆, 孙 颢, 等. 内吗啡肽 2 对神经病理性痛大鼠背根神经节内 μ -阿片受体表达的影响[J]. 安徽医科大学学

- 报,2023,58(11):1833–40.
- [10] Yu T, Zhang X, Shi H, et al. P2Y12 regulates microglia activation and excitatory synaptic transmission in spinal lamina II neurons during neuropathic pain in rodents[J]. *Cell Death Dis*,2019, 10(3):165.
- [11] Knezevic N N, Nader A, Pirvulescu I, et al. Circadian pain patterns in human pain conditions – A systematic review[J]. *Pain Pract*,2023,23(1):94–109.
- [12] Mendes K L, Lelis D d F, Santos S H S. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017,38:98–105.
- [13] Asher G, Gatfield D, Stratmann M, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation[J]. *Cell*, 2008,134(2):317–28.
- [14] Jung-Hynes B, Huang W, Reiter R J, et al. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells[J]. *J Pineal Res*,2010,49(1):60–8.

Mechanism of melatonin attenuating neuropathic pain through the SIRT1-BMAL1 pathway

Wang Zhenchi^{1,2}, Li Rui^{1,2}

(¹*Dept of Anesthesiology and Perioperative Medicine, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601*; ²*Key Laboratory of Anesthesia and Perioperative Medicine in Anhui General Universities, Hefei 230601*)

Abstract Objective To evaluate the effect of melatonin on nocturnal exacerbation of neuropathic pain and to explore its mechanism through the specific silencing information regulator 1 (SIRT1)-brain and muscle ARNT-like protein 1 (BMAL1) pathway. **Methods** 96 SPF-grade male C57/B6 mice were randomly divided into three groups: the sham operation (S) group, the neuropathic pain model (NP) group and the NP model + melatonin treatment (10 mg/kg) (NP + M) group; preoperative experimental mice were placed in the environment of the specified light pattern; the environment of alternating 12 h light and 12 h darkness was used for at least two weeks, and natural time was converted into the time of the award (ZT), and the starting point of the light was ZT0; only the sciatic nerve was isolated in the S group, and the mouse NP model was prepared using chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve in the NP group and the NP + M group, and the NP + M group was injected with melatonin after the operation; the expression levels of SIRT1, BMAL1, and glutathione peroxidase 1 (Gpx1) were detected in the spinal cord at each time point at 14 d postoperatively by Western blot. Postoperative co-staining of SIRT1 in the dorsal horn of the spinal cord with the spinal cord neuronal marker neuron-specific nuclear protein (NeuN), the microglial cell activation marker ion-calcium-binding adapter molecule 1 (iba-1), and the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) was carried out by immunofluorescence and iba-1 was detected at each time point to determine the activation status of microglia. **Results** SIRT1, BMAL1 and Gpx1 decreased in NP group mice at 14 d ZT22 postoperatively compared to ZT10 time point in NP group ($P < 0.05$); SIRT1 and BMAL1 were elevated in NP + M group at ZT14 time point compared to ZT14 time point in NP group ($P < 0.05$), whereas Gpx1 was elevated at ZT18 time point ($P < 0.05$). SIRT1 was co-expressed in the dorsal horn of the spinal cord and in microglia. Compared with ZT10 time point, microglia expression decreased in NP group mice at ZT22 time point 14 d after surgery ($P < 0.05$); compared with ZT10 time point, there was no statistically significant difference in microglia expression in NP + M group mice at ZT22 time point 14 d after surgery. **Conclusion** Melatonin attenuates nocturnal exacerbation of neuropathic pain by a mechanism that may be related to activation of microglia SIRT1-BMAL1 pathway protein expression.

Key words neuropathic pain; circadian rhythm; antioxidant; melatonin; microglia; glutathione peroxidase 1