



• 论 著 •

转运蛋白通过激活脊髓背角星形胶质细胞自噬 缓解神经病理性疼痛 *

郝 璨 马冰洁 靳 天 高 楠 纪 运 马 柯 刘晓明[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院疼痛科, 上海 200092)

摘 要 **目的:** 探讨 18kDa 转运蛋白 (translocator protein, TSPO) 是否可以通过激活脊髓背角星形胶质细胞自噬来缓解神经病理性疼痛及其可能的机制。**方法:** 实验分为两部分, 第一部分将雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组 (Sham 组)、对照组 (SNL 组)、TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 处理组 (Ro 组); 第二部分将脊神经结扎模型 (spinal nerve ligation, SNL) 术后的雄性 SD 大鼠随机分为 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 处理组 (Ro 组) 和自噬诱导剂 Rapamycin 处理组 (Rap 组)。采用 von Frey 纤维丝测量大鼠 50% 机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT), 在术后第 7 天 (D7)、14 天 (D14) 取损伤侧脊髓样本, 采用蛋白印迹技术检测自噬相关蛋白 Beclin1、LC3、p62 及通路蛋白 PGC-1 α , 采用免疫荧光检测 LC3 在脊髓背角星形胶质细胞的表达。**结果:** 第一部分实验结果: 与 Sham 组相比, SNL 组 50% MWT 从术后第 1 天开始明显下降, 持续到观察结束, 脊髓 Beclin1、LC3、p62 表达明显升高 ($P < 0.01$), 脊髓 PGC-1 α 表达明显降低, 脊髓背角星形胶质细胞 LC3 表达信号增强; 与 SNL 组相比, Ro 组 50% MWT 在 D7、D14 明显升高, Ro 组脊髓 Beclin1、LC3 表达明显升高 ($P < 0.01$), p62 蛋白含量先升高后降低, PGC-1 α 持续升高, 显著高于同时时间 SNL 组 ($P < 0.01$)。第二部分实验结果: 与 Ro 组相比, Rap 组 50% MWT 在 D7 降低, Rap 组脊髓 D14 Beclin1 及 D7、D14 LC3 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论:** 鞘内注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 能显著缓解神经病理性疼痛, 其涉及机制之一可能为通过激活 PGC-1 α 相关途径, 而后激活脊髓背角星形胶质细胞的自噬。

关键词 转运蛋白; 神经病理性疼痛; 星形胶质细胞; 自噬; PGC-1 α

Translocator protein alleviates neuropathic pain through activating the spinal cord dorsal horn astrocytes autophagy *

HAO Can, MA Bingjie, JIN Tian, GAO Nan, JI Yun, MA Ke, LIU Xiaoming[△]

(Department of Pain Management, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

Abstract **Objective:** To study whether 18kDa translocator protein (TSPO) can alleviate neuropathic pain by activating astrocyte autophagy in the spinal dorsal horn and explore its possible mechanism. **Methods:** The experiment was divided into two parts. In the first part, male SD rats were randomly divided into 3 groups: The Sham group, the control group (SNL group), the Ro5-4864 group (Ro group). In the second part, male SD rats after spinal nerve ligation (SNL) surgery treatment were randomly divided into 2 groups: the Ro5-4864 group (Ro group) and the Rapamycin group (Rap group). von Frey hairs were used to measure the 50% mechanical withdrawal threshold (MWT). The protein expression of Beclin1, LC3, p62, and PGC-1 α in the ipsilateral spinal cord was detected by western blot. The expression of LC3 in astrocytes of spinal dorsal horn was detected by immunofluorescence. **Results:** In the first part, compared to the sham group, the 50% MWT of the SNL group was significantly decreased, and the expression of Beclin1, LC3, and p62 were significantly increased ($P < 0.01$), and

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81771184)

[△] 通信作者 刘晓明 brightxm@qq.com



the expression of PGC-1 α was significantly decreased. The expression of LC3 in astrocytes of spinal dorsal horn was increased in immunofluorescence intensity; Compared to the SNL group, the 50% MWT in the Ro group was increased significantly, and the expression of Beclin1, LC3, and PGC-1 α in the Ro group were increased significantly ($P < 0.01$). The expression of p62 in the Ro group was decreased compared to the SNL group ($P < 0.01$). In the second part, compared to the Ro group, the 50% MWT of the Rap group was significantly decreased and the expression of Beclin1 and LC3 were significantly decreased in the Rap group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Intrathecal injection of TSPO agonist Ro5-4864 can alleviate neuropathic pain. One possible mechanism is the activation of PGC-1 α relevant pathway and then activation of astrocytes autophagy in the spinal cord dorsal horn.

Keywords translocator protein (TSPO); neuropathic pain; astrocytes; autophagy; PGC-1 α

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是一种慢性疼痛, 国际疼痛学会 (IASP) 在 ICD-11 中将 NP 定义为由躯体感觉神经系统的病变或疾病引起的慢性疼痛, 其表现为自发疼痛、痛觉过敏及异常疼痛等^[1]。NP 发病机理复杂, 是一种难治性疾病, 影响许多病人的生活质量, 到目前为止, 还没有一种好的方法来有效缓解 NP^[2]。因此确定新的潜在药物靶点以开发新型药物制剂尤为重要。

细胞自噬 (autophagy) 是一种细胞内高度保守的选择性降解的过程, 主要通过溶酶体途径降解损坏的细胞器或细胞内的病原体。在正常情况下可以清除细胞内有害和过剩的细胞器及病原体, 作为一种防御机制来抵御应激刺激 (如寒冷、饥饿、缺血、缺氧等) 对细胞造成的损伤, 又称为保护性自噬。自噬的研究多数集中于肿瘤, 后来也有学者研究证实自噬在神经退行性变、神经系统疾病中扮演着重要的角色。除了神经元外, 星形胶质细胞在氧-糖缺乏的环境下也被证实存在保护性自噬^[3]。近年来研究发现, 脊神经结扎模型 (spinal nerve ligation, SNL) 可以导致星形胶质细胞自噬流受阻^[4], 此外, 利多卡因、钩吻素子等均可以通过激活星形胶质细胞自噬来缓解 NP^[5,6]。

18kDa 转运蛋白 (translocator protein, TSPO) 是一种高度保守的、包含 169 个氨基酸的疏水性蛋白, 主要定位于线粒体外膜, 在类固醇甾体合成相关的腺体组织中表达较高。我们既往的实验研究发现, 脊髓背角星形胶质细胞中的 TSPO 在 NP 发病机制中有重要意义, 在脊髓背角主要分布在星形胶质细胞, 外源性给予 TSPO 受体激动剂能产生强效的镇痛作用, 减轻痛觉超敏, 缩短机体康复时间^[7]。其中一条可能的机制是 TSPO 激动剂能增强机体内源性抗应激保护机制, 但具体情况仍不甚明了。考虑到自噬本身就是一种特殊的抗应激防御反应, 并且星形胶质细胞的自噬在 NP 中研究较少, 因此, 我们猜想 TSPO 受体激动剂可能通过激活星形胶质细胞自噬

来缓解 NP。本研究拟采用大鼠 L₅ SNL 模型观察术后脊髓背角星形胶质细胞自噬相关指标的变化, 以及鞘内注射 TSPO 受体激动剂后对其的影响。

方 法

1. 实验动物及分组

成年雄性 SD 大鼠, 体重 180~200 g, 由上海交通大学医学院附属新华医院动物房提供 (动物伦理审批号: XHEC-F-2021-009)。该实验分为两部分, 第一部分将大鼠按随机数字表法分为三组 (每组 12 只), 假手术组 (Sham 组): 暴露神经但不结扎; 对照组 (SNL 组): 结扎 L₅ 脊神经; TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 处理组 (Ro 组): 结扎 L₅ 脊神经后第 3 天 (D3) 开始鞘内注射 Ro5-4864 连续 3 天。第二部分将 SNL 术后大鼠随机分为两组 (每组 9 只), TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 处理组 (Ro 组): 结扎 L₅ 脊神经后第 3 天 (D3) 开始鞘内注射 Ro5-4864 连续 3 天; 自噬诱导剂 Rapamycin 处理组 (Rap 组): 结扎 L₅ 脊神经后第 3 天开始鞘内注射 Rapamycin 连续 3 天。

第一部分实验选取雄性 SD 大鼠共 36 只随机分为三组, 其中行为学观察总长 14 天 (每组 6 只), 分别于术后 D7 和 D14 两个时间点处死动物并取材 (其中每个时间点 3 只用于蛋白印迹检测, 3 只用于免疫荧光检测)。第二部分实验选取 SNL 术后雄性 SD 大鼠共 18 只随机分为两组, 其中行为学观察总长 14 天 (每组 6 只), 分别于术后 D7 和 D14 两个时间点处死动物并取材进行蛋白印迹检测 (每个时间点每组各 3 只, 其中 D14 为测完行为学后随机取材 3 只)。

2. 主要试剂

TSPO 受体激动剂 Ro5-4864、自噬诱导剂 Rapamycin (分子式 C₅₁H₇₉NO₁₃, 分子量 914.17, 已用 DMSO 溶解) 和二甲亚砜 (DMSO) 均购自 Sigma-Aldrich 公司。Ro5-4864 溶于 8%DMSO 中, 术后第 3 天



开始连续鞘内给药 3 天, 每日 2 μg (浓度 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 体积 10 μl); Rapamycin 溶于 8.72%DMSO 中, 术后第 3 天开始连续鞘内给药 3 天, 每日 4 μg (浓度 0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 体积 10 μl); 假手术组和 SNL 组给同等剂量的 8.72%DMSO。

3. SNL 模型的建立

2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉 (注射前应进行回抽, 无血液回流即可注入麻醉药, 角膜反射消失为麻醉满意标准), 取俯卧位, 固定四肢和头部于手术台上, 用剃毛机对手术部位进行备皮, 用碘伏消毒皮肤, 在平大鼠髂棘 (L_{5-6} 棘突间隙) 背部正中偏左切开皮肤, 大约 2~3 cm, 钝性分离腰椎左侧的椎旁肌肉, 分离肌肉后暴露 L_6 横突, 用弯剪剪掉 L_6 横突 (注意剪刀开口紧贴横突, 防止剪断神经), 继续钝性分离, 充分暴露 L_{4-5} , 用 5-0 丝线行 L_5 脊神经结扎, sham 组仅暴露神经即可, 然后逐层缝合肌肉和皮肤。手术过程均保持在无菌条件下进行, 手术时间约 20~30 min。

4. 鞘内注射

2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 取俯卧位, 为了使椎间隙尽量分开以便穿刺给药, 在大鼠腹部垫支撑物。在平大鼠髂棘 L_{5-6} 间隙用 10 μl 尖头微量进样器进行椎管穿刺, 大鼠出现突然地侧向甩尾说明穿刺成功, 注射药物后暂停几秒拔出微量进样器。Ro 组给予 Ro5-4864 2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ (DMSO 浓度 8%), Rap 组给予 RAPA 4 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ (DMSO 浓度 8.72%), 假手术组和 SNL 手术组给予相同体积相同浓度的 DMSO。

5. 行为学分析

(1) 一般行为变化: 实验过程中, 在每个时间点观察各组大鼠的精神状态、皮毛光泽程度、鼻腔是否出血、饮食情况、大小便情况。SNL 模型后观察伤口愈合情况, 有无伤口裂开、化脓、感染等情况。重点观察术前和术后大鼠姿势、步态, 走路协调情况, 左侧后爪是否畸形、外翻, 是否拖足, 是否有舔、咬、剧烈抖动左侧后爪等现象。

(2) 50% 机械缩足反射阈值 (50% mechanical withdrawal threshold, 50% MWT) 测定

采用的 Up-Down 方法测量并计算 50% MWT。测量时间为术前 (D0)、术后第 1 天 (D1)、术后第 3 天 (D3)、术后第 7 天 (D7)、术后第 14 天 (D14)。将确认好组别、编号的大鼠放置于金属网上的盒中, 等待 15~30 min, 直到大鼠对陌生的环境保持安静 (不对笼子进行探索, 不自我舔舐), 采用不同折力的 von Frey 作用于大鼠左侧掌跖部无毛处,

von Frey 呈 “S” 型或 “C” 型, 作用时间为 6~8 s (参考文献有的 2~3 s, 有的 6~8 s, 如果出现阳性快速抬足只需 2~3 s, 但阴性或出现舔足需要保持时间稍微长一点), 相邻间隔至少 7 s, 出现快速抬足或者舔足记为阳性反应。首先用 2.0 g 的纤维丝开始刺激, 若为阴性则选用刺激强度递增的相邻纤维丝刺激; 若为阳性则选用刺激强度递减的相邻纤维丝刺激, 反复测量, 根据预实验结果确定测量最大纤维丝为 26 g, 最小为 0.4 g, 采用的 Up-Down 方法推算阈值并计算 50% MWT。

6. Western Blot 检测

2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 放血处死大鼠, 咬骨钳分离椎板, 迅速取出 L_4 、 L_5 脊髓, 液氮速冻后放入 -80℃ 冰箱保存。各样本称取等量组织标本, 按比例加入裂解液和蛋白酶抑制剂, 然后组织碾磨, 12,000 r/min、4℃ 离心 10 min, 取上清液, BCA 法测定蛋白浓度。将 20 $\mu\text{g}/\text{well}$ 总蛋白加入 SDS 上样缓冲液, 100℃ 变性 10 min。采用 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate -poly-acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 蛋白转至 0.45 μm PVDF 膜, 转膜时恒流 300 mA, 转膜时间根据所需蛋白来定 (LC3 25 min, 其他蛋白 60 min)。快速封闭液封闭 15 min, 抗 LC3A/B 抗体 (兔源, 1:1000, Cell Signaling Technology, 美国)、抗 Beclin1 抗体 (兔源, 1:1000, Cell Signaling Technology, 美国)、抗 p62 抗体 (兔源, 1:1000, Cell Signaling Technology, 美国)、抗 actin 抗体 (兔源, 1:1000, Cell Signaling Technology, 美国)、抗 PGC-1 α 抗体 (兔源, 1:1000, abcam), 4℃ 摇床孵育过夜。TBST 冲洗 10 min $\times$ 3 次, 辣根过氧化物酶标记二抗 (1:1000, 碧云天, 中国), 室温孵育 1 h, TBST 冲洗 10 min $\times$ 3 次, ECL 显色曝光。结果用目的蛋白与内参的灰度比值代表目的蛋白的相对表达量。

7. 免疫荧光

第一部分各组动物分别在 D7、D14 取材, 麻醉之后开胸经左心室先灌注生理盐水, 再灌注 4% 多聚甲醛进行全身固定, 取出 L_4 、 L_5 脊髓放入 4% 多聚甲醛进行后固定, 石蜡包埋制作切片。石蜡切片进行脱蜡, 脱蜡后放入 pH = 6.0 的柠檬酸抗原修复液中进行抗原修复, 在圈内滴加 BSA 孵育 30 min。在切片上滴加 PBS 稀释好的一抗 (Sham、SNL、Ro 组单染 D7、D14 只加入 LC3 抗体, Sham、SNL、Ro 组双染 D14 天加入 LC3 与 GFAP 的混合抗体), 4℃ 孵育过夜。pH = 7.4 的 PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次, 加入相

应种属的二抗，避光室温孵育 50 min。pH = 7.4 的 PBS 洗涤 5 min×3 次，圈内加入荧光淬灭剂 5 min，流水冲洗 20 min。封片，使用荧光显微镜扫描拍照。

8. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行统计学分析，计量资料数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。各组 50% MWT 采用重复测量数据的方差分析进行比较，两两对比采用 LSD 法。Beclin1、LC3、p62 蛋白表达水平同一时间点组间比较采用单因素方差分析，两两对比采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般行为学变化

SNL 术后大鼠精神状态尚可，皮毛逐渐变黄及愈发无光泽，术后 1 天部分大鼠出现鼻腔出血（术后 1 天大鼠可能出现打架、舔咬伤口等情况，会出现鼻子有血的情况，但之后会恢复正常，如未恢复正常，则需要剔除）之后恢复正常，体重增长减慢，饮食饮水减少，大小便正常。术后 3 天左右大鼠自行咬掉缝线，伤口无裂开、化脓、感染等情况。术后大鼠左侧后足自发性抬起，后爪足趾并拢外翻，避免患肢着地，无拖足现象，有时出现舔、咬、剧烈抖动患肢的现象。随着时间延长，术后大鼠状态有所改善。

2. 第一部分实验结果

(1) 鞘内注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 对 SNL 大鼠机械痛阈的影响：SNL 组从术后第 1 天开始，直到本实验观察结束（即术后第 14 天）50% MWT 显著降低，术后第 7 天降到最低，与 Sham 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$ ，见图 1)。SNL 术后第 3 天开始连续鞘内注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 每日 2 μg ，共 3 天。Ro 组在术后第 7 天、术后第 14 天 50% MWT 显著升高，与 SNL 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$ ，见图 1)。

(2) 鞘内注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 对 SNL 大鼠脊髓自噬相关蛋白的影响：首先采用免疫荧光的方法对脊髓背角 LC3 荧光强度的时像变化进行了观察，结果显示：相比 Sham 组，SNL 组 D7、D14 增强；相比 SNL 组，Ro 组 D7、D14 增强（见图 2A）。为了进一步观察脊髓背角星形胶质细胞发生自噬的情况，我们采用 LC3 与星形胶质细胞标记物 GFAP 共染的方法，结果显示：与 Sham 组相比，SNL 组星形胶质细胞和 LC3 共染增多；与 SNL 组相比，Ro 组星形胶质细胞和 LC3 共染增多（见图 2B）。

为进一步观察自噬蛋白含量变化，进行了

Western Blot 检测，结果显示：与 Sham 组相比，SNL 组 Beclin1、LC3II 及 LC3-II/LC3-I 在 D7、D14 显著升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$ ，见图 3A, B)，SNL 组 p62 在 D7、D14 升高 ($P < 0.01$ ，见图 3C)。与 SNL 组相比，Ro 组 Beclin1、LC3-II、LC3-II/LC3-I 在 D7 显著升高 ($P < 0.01$ ，见图 3A, B)，Ro 组 Beclin1 在 D14 升高 ($P < 0.05$ ，见图 3A)，Ro 组 LC3-II 在 D14 升高 ($P < 0.01$ ，见图 3B)；Ro 组 p62 在 D14 显著降低 ($P < 0.01$ ，见图 3C)。

(3) 鞘内注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 对 SNL 大鼠脊髓 PGC-1 α 蛋白的影响：PGC-1 α 及其下游的多种转录因子被证实是线粒体动态调节的关键要素，并在细胞自噬和线粒体自噬中都起着重要作用。结果显示，与 Sham 组相比，SNL 组 D7、D14 PGC-1 α 蛋白降低，Ro 组 D7、D14 PGC-1 α 蛋白升高，差异有统计学意义 ($P < 0.01$ ，见图 4)；与 SNL 组相比，Ro 组在 D7、D14 PGC-1 α 蛋白升高 ($P < 0.01$ ，见图 4)。

3. 第二部分实验结果

为了进一步观察 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 的作用，采用了经典的自噬诱导剂 Rapamycin 与 Ro5-4864 进行对比，试图比较两者在镇痛和对自噬蛋白表达影响上是否作用相当。SNL 术后第 3 天对大鼠连续鞘内注射 TSPO 受体激动剂（每日 2 μg ，连续 3 天）或 Rapamycin（每日 4 μg ，连续 3 天）。与 Ro 组相比，Rap 组 50% MWT 在 D7 低于 Ro 组，

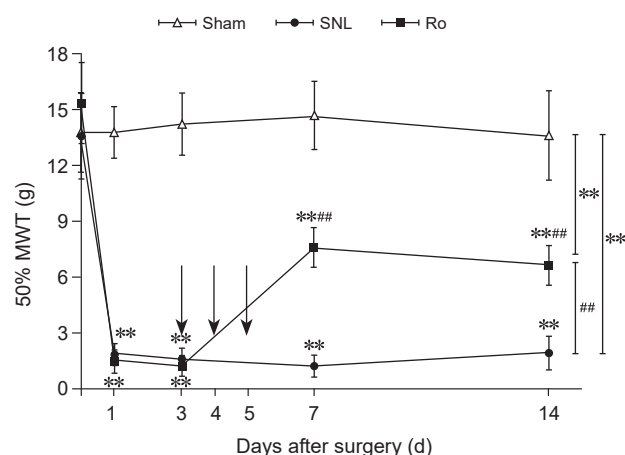


图 1 鞘内注射 Ro5-4864 对 SNL 大鼠 50% MWT 的影响
箭头表示给药时间 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, 与 SNL 组相比

Fig. 1 Effect of intrathecal injection of Ro5-4864 on 50% MWT

These arrows indicate the time of intrathecal injection * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with group Sham; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, compared with group SNL.

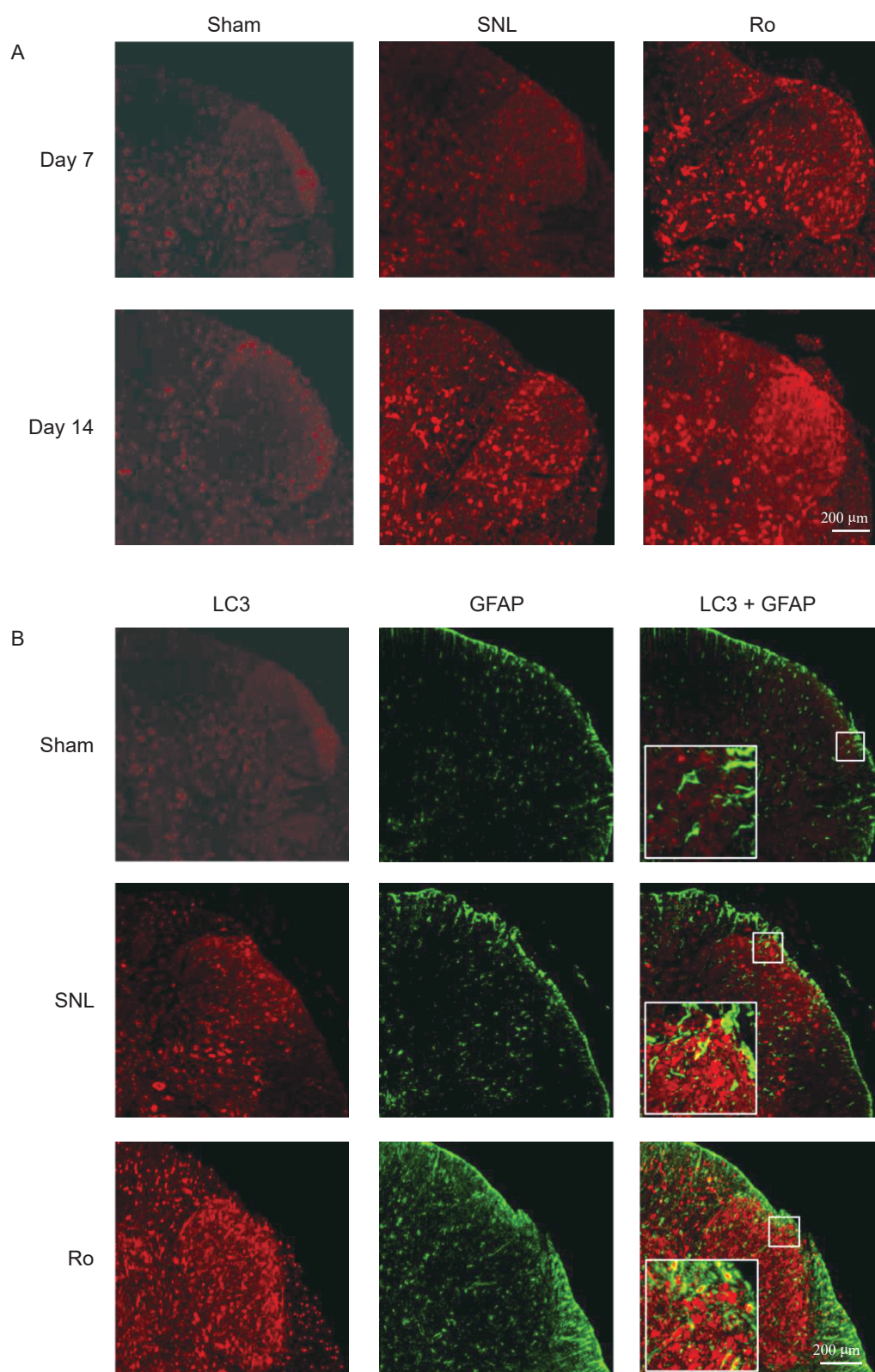


图 2 鞘内注射 Ro5-4864 后 SNL 大鼠脊髓背角星形胶质细胞 LC3 分布
(A) 脊髓背角 LC3 分布; (B) 脊髓背角星形胶质细胞 LC3 分布

Fig. 2 The distribution of LC3 of astrocytes in the spinal cord dorsal horn of the SNL rats after intrathecal injection of Ro5-4864
(A) The distribution of LC3 in the spinal cord dorsal horn; (B) The distribution of astrocytes LC3 in the spinal cord dorsal horn.

差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 见图 5A)。Western Blot 检测自噬蛋白显示, 与 Ro 组相比, Rap 组 Beclin1 在 D7 差异无统计学意义 ($P = 0.338$), D14 降低差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 见图 5B); Rap 组 LC3-II 及 LC3-II/LC3-I 在 D7、D14 均降低 ($P < 0.01$, 见图 5C)。

讨 论

本研究发现 SNL 可以引起大鼠发生神经病理性疼痛的同时诱发脊髓背角星形胶质细胞自噬激活, 鞘内注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 可以降低大鼠痛觉超敏, 脊髓背角星形胶质细胞的保护性

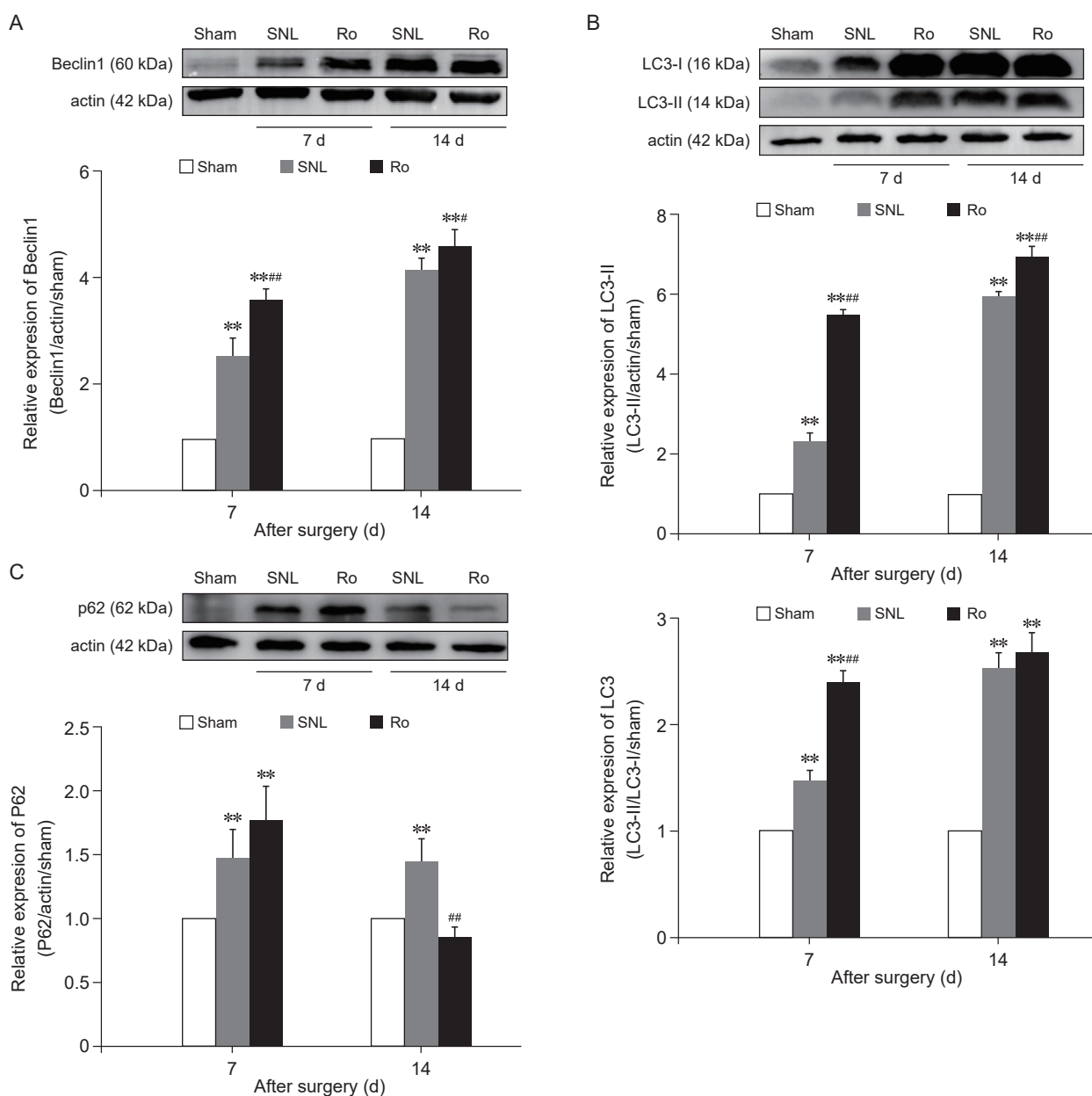


图 3 鞘内注射 Ro5-4864 调节 SNL 大鼠脊髓自噬相关蛋白的表达
(A) 鞘内注射 Ro5-4864 后 Beclin1 的变化; (B) 鞘内注射 Ro5-4864 后 LC3 的变化; (C) 鞘内注射 Ro5-4864 后 p62 的变化

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

Fig. 3 Intrathecal injection of Ro5-4864 regulates autophagy related protein expression in the spinal cord of SNL rats

(A) Beclin1 expression after intrathecal injection of Ro5-4864; (B) LC3 expression after intrathecal injection of Ro5-4864; (C) p62 expression after intrathecal injection of Ro5-4864

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

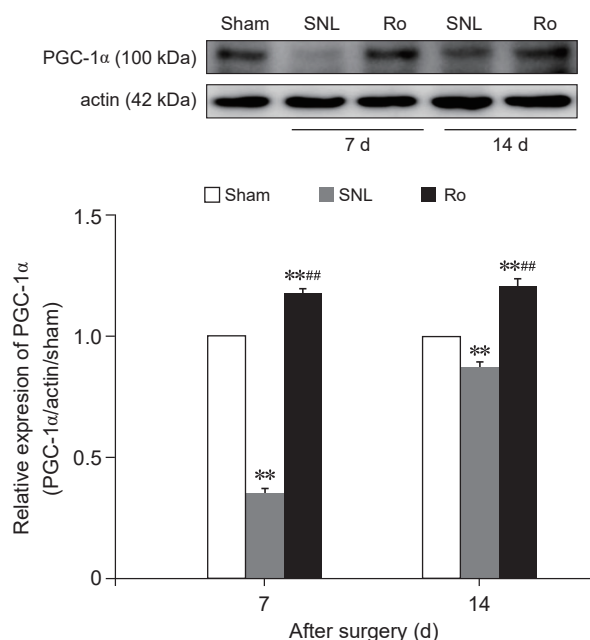


图4 鞘内注射 Ro5-4864 调节 SNL 大鼠脊髓 PGC-1α 的表达

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

Fig. 4 Intrathecal injection of Ro5-4864 regulates PGC-1α expression in the spinal cord

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

自噬增加强化, 其中机制可能与激活线粒体 PGC-1α 相关通路有关。

TSPO 广泛存在于体内各种组织中, 在与类固醇合成相关的腺体分泌组织中表达水平较高 (如肾上腺, 性腺, 脑细胞), 并介导胆固醇从线粒体外转运到线粒体内, 这是类固醇及神经甾体合成的限速步骤^[8]。在中枢神经系统中, 正常生理状态下 TSPO 的含量很少, 主要分布在神经胶质细胞 (星形胶质细胞与小胶质细胞) 和少量神经元中。我们既往的实验也证明 TSPO 参与了神经病理性疼痛的调控, 在脊髓背角主要分布于星形胶质细胞, 鞘内单次注射 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 即可明显减轻痛觉超敏, 可能的机制包括增加类固醇激素的合成^[9,10]、减轻损伤信号从星形胶质细胞到神经元的传导以及激活机体的内源性保护机制^[7]等, 但具体机制还有待继续研究。有研究证实神经甾体类激素可以激活星形胶质细胞的自噬^[11]。此外, 有研究表明 TSPO 结构中包含了与自噬相关的基因 ATG8 (即 LC3) 的结构域^[12]。因此, 我们猜测 TSPO 可能通过激活自噬来缓解神经病理性疼痛。因此在本实验中, 我们选取了 LC3、Beclin1 和 p62 作为检测自噬

的主要指标, LC3 又分为 LC3I 和 LC3II, LC3II 在自噬的发生中发挥着至关重要的作用, 被认为是检测自噬的最重要指标。本实验结果显示, SNL 造模后 D7、D14 两个时间点, SNL 组在 D7、D14 脊髓 Beclin1、LC3 II 表达增加, p62 表达增加, 表明 SNL 本身作为一种损伤刺激会激发自噬现象, 但 p62 的增加提示自噬降解过程抑制, 自噬流受阻。这与先前的许多实验结果类似, Chen 等^[13]发现 CCI 模型会导致自噬流受阻; Liu 等^[14]在综述中总结了不同模型导致的 NP 中发生的自噬障碍。而鞘内注射 Ro5-4864 后 SNL 大鼠在 D14 脊髓 Beclin1、LC3II 增加并大于 D7, p62 明显降低, 提示脊髓自噬明显增加, 自噬流过程顺畅。LC3 在脊髓背角的免疫荧光强度与蛋白印迹结果一致。此外, LC3 与星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 共染显示, SNL 模型脊髓背角星形胶质细胞自噬增强, 鞘内给药 Ro5-4864 后脊髓背角星形胶质细胞自噬更强, 以上结果与我们猜测一致, TSPO 可能通过激活脊髓背角星形胶质细胞自噬来缓解神经病理性疼痛。

过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1α (α subunit of peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1, PGC-1α) 是 PGC-1 家族的成员之一, 是与能量代谢关系密切的转录辅助活化因子。PGC-1α 及其下游的多种转录因子被证实是线粒体动态调节的关键要素, 并在细胞自噬和线粒体自噬中都有重要作用^[15]。既往的研究表明, 激活 PGC-1α 对亨廷顿舞蹈症小鼠和糖尿病外周神经病变大鼠有神经保护作用^[16,17]。本研究发现, SNL 会降低大鼠脊髓背角 PGC-1α 的表达, 这与神经病理性疼痛可以导致 PGC-1α 蛋白降低一致^[17]。相比 SNL 组同一时间点, Ro 组 PGC-1α 在 D7 和 D14 活化, 提示鞘内注射 Ro5-4864 可能通过激活 PGC-1α 相关通路来激活自噬和缓解 NP。TSPO 激动剂是否可以通过激活 PGC-1α 来上调多种下游的核转录因子来调控自噬的发生, 需要我们后期进一步研究证实。

为了再次验证 TSPO 受体激动剂的作用, 在第二部分实验中采用了经典的自噬诱导剂 Rapamycin 与之进行了比较。结果发现 Rapamycin 也有类似的镇痛作用但是效果不如 Ro5-4864, Beclin1 和 LC3 的变化趋势与 Ro5-4864 接近, 但效果也比 Ro 略差。导致两者差异的其中原因尚不完全明确, 推测可能的一个原因在于 TSPO 受体激动剂的治疗效果是多重机制的, 因此激活星形胶质细胞保护性自噬只是众多机制之一。近年来, 许多研究都关注于 TSPO 在 NP 中是如何发挥作用的。有研究认为, TSPO 配

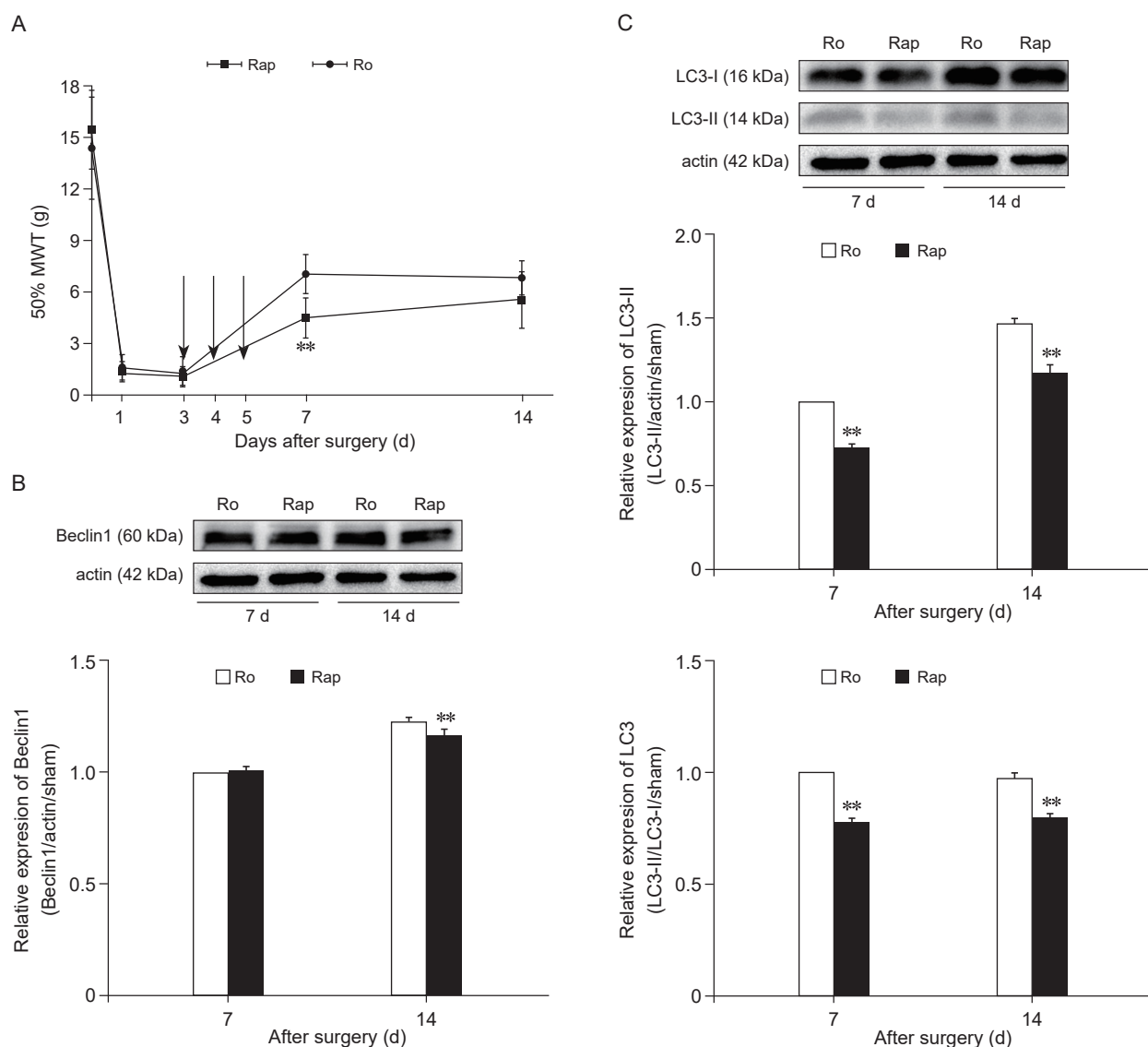


图 5 鞘内注射 Ro5-4864 与 Rapamycin 减轻 SNL 大鼠痛敏并调节脊髓自噬蛋白的表达
(A) 50% MWT 的变化, 箭头表示给药时间; (B) 脊髓 Beclin1 的变化; (C) 脊髓 LC3 的变化
** $P < 0.01$, 与 Ro 组相比

Fig. 5 Intrathecal injection of Ro5-4864 and Rapamycin alleviates mechanical allodynia and regulates autophagy related protein expression in the spinal cord
(A) 50% MWT; (B) Beclin1 expression in spinal cord; (C) LC3 expression in spinal cord
** $P < 0.01$, compared with group Ro.

体可以促进类固醇的合成^[18], 此外, 苏颖等^[19] 研究结果显示, 孕酮通过调节 DRG、SDH 与生殖内分泌靶器官睾丸和疼痛相关区域腺苷信号通路的上游信号和下游信号来缓解大鼠 NP, 初步认为 TSPO 可能通过增加类固醇的合成来缓解 NP。NP 发生与线粒体有一定的关系, 有研究认为 TSPO 可以调节线粒体功能^[20,21], 那么 TSPO 可能通过调节线粒体功能来缓解 NP。NP 的发生也可能与神经炎症反应有关, TSPO 被广泛用于 PET/SPECT 成像作为神经发炎的标志^[22], TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 可以降

低 TNF- α 水平, 一定程度缓解炎症因子的升高^[23]。近年来 TSPO 配体作为示踪剂可以通过 PET-CT 来检测神经系统中 TSPO 的表达, 并且已经进入临床试验阶段, 为神经系统疾病的诊断、治疗提供依据^[24,25]。其他更为详细的机制还需要后期进一步的研究去发现和证实。

综上所述, 本研究证实在 SNL 大鼠急性期给予 TSPO 受体激动剂 Ro5-4864 可能通过上调 PGC-1 α 相关通路来激活脊髓背角星形胶质细胞的保护性自噬, 从而缓解 NP。TSPO 在 NP 中发挥着重要作用,

作为 NP 诊断和治疗的潜在靶蛋白, 为 NP 的诊断和治疗提供了新的思路。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Treede RD, Rief W, Barke A, *et al.* Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP classification of chronic pain for the international classification of diseases (ICD-11)[J]. *Pain*, 2019, 160(1):19-27.
- [2] Cavalli E, Mammana S, Nicoletti F, *et al.* The neuropathic pain: an overview of the current treatment and future therapeutic approaches[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019, 33: 2058738419838383.
- [3] Gabryel B, Kost A, Kasprowska D, *et al.* AMP-activated protein kinase is involved in induction of protective autophagy in astrocytes exposed to oxygen-glucose deprivation[J]. *Cell Biol Int*, 2017, 41(8):928-931.
- [4] 李建. 星形胶质细胞自噬在神经病理性疼痛中的作用及机制研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2017.
- [5] 金桂林, 何赛娣, 洪丽绵, 等. 钩吻素子抗大鼠神经病理性疼痛及对星形胶质细胞活化和自噬的作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2018, 32(9):719.
- [6] Yuan J, Fei Y. Lidocaine activates autophagy of astrocytes and ameliorates chronic constriction injury induced neuropathic pain[J]. *J Biochem*, 2021, 170(1):25-31.
- [7] Liu X, Liu H, Xu S, *et al.* Spinal translocator protein alleviates chronic neuropathic pain behavior and modulates spinal astrocyte-neuronal function in rats with L₅ spinal nerve ligation model[J]. *Pain*, 2016, 157(1):103-116.
- [8] Pspodopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, *et al.* Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, 27(8): 402-409.
- [9] Pozzo ED, Tremolanti C, Costa B, *et al.* Microglial pro-inflammatory and anti-inflammatory phenotypes are modulated by translocator protein activation[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18):4467.
- [10] Zhang M, Liu J, Zhou MM, *et al.* Elevated neurosteroids in the lateral thalamus relieve neuropathic pain in rats with spared nerve injury[J]. *Neurosci Bull*, 2016, 32(4): 311-322.
- [11] Hong Y, Liu Y, Zhang G, *et al.* Progesterone suppresses A β (42)-induced neuroinflammation by enhancing autophagy in astrocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54:336-343.
- [12] Shoshan-barmatz V, Pittala S, Mizrachi D. VDAC1 and the TSPO: expression, Interactions, and associated functions in health and disease states[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3348.
- [13] Chen JY, Huang Z, Xiao PY, *et al.* Local uncoordinated gene 5H2 contributes to nerve injury-induced mechanical allodynia associated to its role in autophagy[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2021, 48(3):361-369.
- [14] Liu X, Zhu M, Ju Y, *et al.* Autophagy dysfunction in neuropathic pain[J]. *Neuropeptides*, 2019, 75: 41-48.
- [15] Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(9): 459-466.
- [16] Jin J, Albertz J, Guo Z, *et al.* Neuroprotective effects of PPAR- γ agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease[J]. *J Neurochem*, 2013, 125(3): 410-419.
- [17] Zhang Q, Song W, Zhao B, *et al.* Quercetin attenuates diabetic peripheral neuropathy by correcting mitochondrial abnormality via activation of AMPK/PGC-1 α pathway in vivo and in vitro[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15:636172.
- [18] Chung JY, Chen H, Papadopoulos V, *et al.* Cholesterol accumulation, lipid droplet formation, and steroid production in Leydig cells: role of translocator protein (18-kDa)[J]. *Andrology*, 2020, 8(3): 719-730.
- [19] 苏颖, 胡志妍, 贾改丽, 等. 孕酮调节腺苷信号通路缓解大鼠神经病理性疼痛 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2020, 26(4):256-264.
- [20] Fu Y, Wang D, Wang H, *et al.* TSPO deficiency induces mitochondrial dysfunction, leading to hypoxia, angiogenesis, and a growth-promoting metabolic shift toward glycolysis in glioblastoma[J]. *Neuro Oncol*, 2020, 22(2): 240-252.
- [21] Betlazar C, Middleton RJ, Banati R, *et al.* The translocator protein (TSPO) in mitochondrial bioenergetics and immune processes[J]. *Cells*, 2020, 9(2):512.
- [22] Tournier BB, Tsartsalis S, Ceyzeriat K, *et al.* In vivo TSPO signal and neuroinflammation in alzheimer's disease[J]. *Cells*, 2020, 9(9):1941.
- [23] 周攀. 转运蛋白配体 Ro5-4864 对蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中炎症反应的影响 [D]. 四川: 西南医科大学, 2019.
- [24] Dimitrova-shumkovska J, Krstanoski L, Veenman L. Diagnostic and therapeutic potential of TSPO studies regarding neurodegenerative diseases, Psychiatric disorders, Alcohol use disorders, Traumatic brain injury, and Stroke: an update[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 870.
- [25] Sridharan S, Raffel J, Nandoskar A, *et al.* Confirmation of specific binding of the 18-kDa translocator protein (TSPO) radioligand [(18F) GE-180: a blocking study using XBD173 in multiple sclerosis normal appearing white and grey matter[J]. *Mol Imaging Biol*, 2019, 21(5):935-944.