



• 论 著 •

基于液相色谱-串联质谱的坐骨神经痛模型大鼠 脊髓蛋白质组学分析 *

唐甸峰^{1,2} 范佳佳^{1,2} 白凤媛^{1,2} 蔡仁军³ 刘 涛^{1,2 Δ} 徐秋玲^{1,2 Δ}

(¹海南医科大学第一附属医院中医科, 海口 570102; ²海南医科大学中医学院, 海口 571199; ³海南省老年病
医院针灸科, 海口 570311)

摘 要 目的: 采用蛋白质组学技术观察正常组和坐骨神经痛模型大鼠脊髓蛋白标志物, 以及各差异蛋白所参与的生物学过程, 探讨坐骨神经痛的发生机制。**方法:** 将 12 只 SD 雄性大鼠按简单随机抽样法分为正常组和模型组, 每组 6 只。正常组不做任何处理, 模型组在大鼠左侧坐骨神经进行结扎造模, 每组 3 只用于定量蛋白质组学鉴定蛋白标志物并进行生物信息学分析。**结果:** 从大鼠脊髓组织中共鉴定到 5975 个蛋白, 其中正常组与模型组间有 51 个差异蛋白 (differentially expressed proteins, DEPs), 与正常组相比, 模型组中有 9 个蛋白表达增加, 42 个蛋白表达降低。其中 Cyp51a1 和 Cad 表达下降。KEGG 富集分析结果显示, 差异蛋白主要涉及丙酮酸代谢、辅助因子生物合成中的谷氨酸和谷氨酰胺代谢、胰岛素等信号通路。**结论:** 坐骨神经痛的产生机制可能与 Cyp51a1、Cad 的表达, 以及谷氨酸和谷氨酰胺的代谢存在一定的关系。

关键词 坐骨神经痛; 蛋白质组学; 液相色谱-串联质谱

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based proteomics analysis of the spinal cord of rats with sciatica model *

TANG Dian-feng^{1,2}, FAN Jia-jia^{1,2}, BAI Feng-yuan^{1,2}, CAI Ren-jun³, LIU Tao^{1,2 Δ}, XU Qiu-ling^{1,2 Δ}

(¹ Department of Traditional Chinese Medicine, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570102, China; ² Hainan Medical University of Traditional Chinese Medicine, Haikou 571199, China; ³ Department of Acupuncture and Moxibustion, Geriatric Hospital of Hainan, Haikou 570311, China)

Abstract Objective: To observe the spinal cord protein markers in normal and sciatica model rats, as well as the biological processes involved in each differential protein with proteomics technology, and explore the mechanism of sciatica. **Methods:** Twelve SD male rats were simply randomized into normal group and model group, six in each group. The rats in model group were ligated and modeled in the left sciatic nerve, and 3 rats in each group were used for quantitative proteomics to identify protein markers and for bioinformatics analysis. **Results:** A total of 5975 proteins were identified from rats spinal cord tissues, among which 51 differentially expressed proteins (DEPs) were found between the normal group and the model group, and 9 proteins with increased expression and 42 proteins with decreased expression were found in the model group compared with the normal group. Among them, Cyp51a1 and Cad expression were decreased. The KEGG enrichment analysis showed that the DEPs were mainly involved in signaling pathways such as pyruvate metabolism, glutamate and glutamine metabolism in cofactor biosynthesis, and insulin. **Conclusion:** The mechanism of sciatica may be related to the expression of Cyp51a1, Cad and the metabolism of glutamate and glutamine.

Keywords sciatica; proteomics; LC-MS/MS

* 基金项目: 国家自然科学基金委员会地区科学基金项目 (81660820); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (821RC571); 海南医学院研究生创新课题项目 (HYYB2023A10)

Δ 通信作者 徐秋玲 hy0204039@hainmc.edu.cn; 刘涛 hy0204026@hainmc.edu.cn



坐骨神经痛是坐骨神经受到压迫引起的原发性或继发性损害,临床表现为单侧下肢的放射性疼痛,且伴有神经功能受损症状,是临床常见病^[1,2]。研究发现,坐骨神经痛患病率为1.2%~43%,在发展中国家发病率较高^[3]。反复发作的坐骨神经痛给病人的情绪和生活质量带来负面影响,长期的疼痛可导致病人焦虑、抑郁、活动受限和睡眠障碍,不得不长期服用镇痛药、糖皮质激素等,虽达到一定的疼痛缓解作用,但同时也带来许多不良反应并加重医疗负担^[4]。目前,对坐骨神经痛的病理机制已有广泛的研究,文先杰等^[5]研究发现,脊髓背角一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, nNOS)阳性神经元在慢性坐骨神经痛的中枢机制中具有重要作用。但采用蛋白质组学探讨坐骨神经痛的病理机制少有研究,因此从蛋白质组学角度探索坐骨神经痛的发病机制为临床治疗提供指导具有重要的意义。本课题组前期的研究中,通过代谢组学发现有机酸、有机化合物、核酸等可能是引起坐骨神经痛的重要因素^[6]。定量蛋白质组学是在基因组之后迅速发展起来的先进组学技术,主要用于研究某一细胞、组织或生物体在某一特定阶段或生理状态下蛋白质的组成及其变化规律,作为一种重要的技术手段,在筛选疾病诊断标志物与药物治疗靶点方面发挥很大的作用^[7]。定量蛋白质组学主要反映蛋白质的功能、表达及相互作用,如今已广泛用于中药复方作用机制的研究,从而为中医药复杂体系的研究提供了新方法^[8]。因此,本研究旨在通过定量蛋白质组学技术,揭示坐骨神经痛发生的机制,进一步深化对坐骨神经痛的认识,为后续的治疗提供理论指导。

方 法

1. 主要试剂和仪器

二硫苏糖醇(DTT, 43819-5g)、碘乙酰胺(IAA, I1149-5G)、羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES, H3375-100G)、脱氧胆酸钠(SDC, 30970-100G)、碳酸氢铵(NH₄HCO₃, 5330050050)、氨基丁三醇(Tris, 10708-976001)、乙腈(Anhydrous acetonitrile, 271004-100 ml)、羟胺(Hydroxylamine, 8144410100)、甲酸(FA, 695076-100ML)、蛋白酶抑制剂 cocktail (Protease inhibitor cocktail, 11697498001)、三氟乙酸(TFA, T6508-100 ml)、乙腈(CAN, CAEQ-4-000308-4000)、水(H₂O, CAEQ-4-000302-4000)、丙酮(Acetone, CAEQ-4-010131-4000)、胰蛋白酶(Trypsin, V5280)、氯化钠(NaCl,

A610476-0001)、十二烷基硫酸钠(SDS, A500228-0250)、TMT 同位素标记试剂盒(TMT Isobaric Label Reagent Set, A44522)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Enhanced BCA Protein Assay Kit, P0009)、甲醇(MeOH, CAEQ-4-003302-4000)。高效液相色谱(nano-UPLC EASYnLC1200)、质谱仪(Q Exactive HFX)、高速离心机(Heraeus Fresco17 centrifuge),购自于美国 Thermo Scientific 公司;色谱柱(XBridge BEH C18 XP Column)、分析天平(ATY124)、细胞超声破碎仪(JY96-IIN)、酶标仪(Thermo Scientific, USA)。

2. 实验动物

12 只雄性 SD 大鼠,体重为 200±20 g,购自长沙天勤生物科技有限公司(许可证号:SCXK(湘)2022-0011)。饲养于海南医学院动物房,温度 24±2℃,湿度 50%±5%,每日照明/黑暗各 12 h,保持通风,自由饮水和进食。按简单随机抽样法分为正常组和模型组,每组 6 只。正常组不做任何处理,模型组用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,4-0 羊肠线于左侧坐骨神经干进行结扎 4 段,每段之间间隔为 1 mm 左右,建立坐骨神经慢性压迫性损伤(chronic constriction injury, CCI)大鼠模型。本研究通过海南医学院动物伦理委员会审核(伦理审批号 HYLL-2021-153)。

3. 热刺激伤害感受阈值的检测

使用 RB-200 智能热板仪(成都泰盟科技有限公司),将温度设置至 52℃,测量正常组和模型组大鼠从后足接触热板起到发生热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)。每隔 5 min 检测 1 次,测量 3 次,取平均值。为减少个体差异,以大鼠后足底手术侧与健侧 TWL 差值的绝对值作为痛敏分数(hyperalgesia score, HAS;单位:sec)^[9],用 HAS 分析大鼠的疼痛反应。为了避免烫伤足底,单次测量时间不超过 20 s。分别在坐骨神经结扎术前(即基础痛阈)及结扎术后第 3、7、10 和 14 天测量大鼠双侧后足的 TWL 值。

4. 取材

术后第 14 天,正常组和模型组大鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射进行麻醉。取出腰膨大脊髓 L₄~L₆ 节段,每组 6 只,装入冻存管,然后立即转入液氮罐中速冻并尽快转移至-80℃冰箱保存,每组 3 只用于定量蛋白质组学分析。

5. 样品处理和 nanoLC-MS/MS 分析

使用 RIPA 裂解缓冲液在 4℃ 下超声提取蛋白质,每个样品取 100 μg 总蛋白并用 H₂O 将样品稀释至 1 mg/ml,与丙酮混合,在-20℃下孵育过夜。

然后样品在 4℃ 下 1,3000 rpm 离心 10 min, 随后用 80% 的丙酮洗涤。将蛋白质再溶解, 加入 DTT 和 IAA, 然后用胰蛋白酶酶解蛋白质。等量的蛋白质按照 TMT 标记试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 的说明书进行标记。用 2% 三氟乙酸沉淀和去除 SDS。随后使用 C18 除盐离心管进行肽脱盐, 收集洗脱液并在 4℃ 真空干燥。

总肽经 nano-UPLC 液相系统 EASY-nLC1200 进行分离后联用配备纳升离子源的质谱仪 (Q Exactive HFX) 进行数据采集。色谱分离采用 100 μm ID $\times$ 15 cm 反相色谱柱 (ReprosilPur 120 C18-AQ, 1.9 μm Dr. Maisch) 流速 0.3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 进行。流动相采用乙腈-水-甲酸体系, 其中流动相 A 为 0.1% 甲酸 98% 水溶液 (乙腈为 B 相为 0.1% 甲酸-80% 乙腈溶液水为 20%)。色谱柱以 100% 的 A 相平衡后, 样品由自动进样器直接上样到色谱柱, 再经色谱柱梯度分离, 流速 300 nL/min, 梯度时长 90 min。流动相 B 比例: 2%~5% 持续 2 min, 5%~22% 持续 68 min, 22%~45% 持续 16 min, 45%~95% 持续 2 min, 95% 持续 2 min。

质谱分析使用数据依赖性采集 (data-dependent acquisition, DDA) 模式, 总分析时长为 90 min, 采取正离子检测模式。一级扫描 (Full scan) 范围 350~1600 m/z , 分辨率为 120 k (@ 200 m/z), AGC 为 3E6, 最大离子注入时间 (max IT) 为 30 ms; 一级扫描中强度最高的 20 个离子 (top 20) 经四极杆筛选后使用 HCD 裂解后进行碎片离子扫描。四极杆隔离窗口 (isolation window) 为 0.7 m/z , 标准化碰撞能 (NCE) 为 32%, AGC 为 1E5, max IT 为 96 ms。二级扫描固定最小 m/z 为 110 (fixed first mass), 分辨率 45 k。根据色谱峰峰宽, 动态排除时间设为 45 s; 单电荷及 > 6 价的离子不进行二级扫描。原始数据文件使用 (SpectroMine 4.1.230421.52329; Biognosys AG) 软件应用 Pulsar 检索引擎进行数据库搜索, 其中 carbamidomethyl (C)、TMT 6 plex (K) 和 TMT 6 plex (N-term) 为固定修饰, oxidation (M) 和 acetyl (protein N-term) 为可变修饰, 蛋白酶切设置为 Trypsin, 可信度筛选标准为 Peptide&PSM FDR $\leq$ 0.01; 搜索结束后进行定性分析。对两组的蛋白质差异进行筛选, 差异蛋白筛选条件为 Fold change $\geq$ 1.2 或 $\leq$ 0.83, 且 $P < 0.05$ 。将筛选出来的差异蛋白, 在生物信息学网站上绘制正常组和模型组的火山图、热力图和亚细胞定位分析图。

6. 生物信息学分析

筛选出正常组和模型组大鼠脊髓组织的 DEPs,

并对其 DEPs 在微生信网站上进行生物信息学分析, 包括基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。

7. 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, HAS 采用重复测量方差分析, 组间比较采用 Bonferroni 法校正, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 两组大鼠痛敏分数

两组大鼠在造模前后不同时间点的痛敏分数 (HAS) 变化如图 1 所示。结果表明, 在建立 CCI 模型前, 两组大鼠的 HAS 比较差异无统计学意义, 即基础痛阈无明显差异。坐骨神经结扎术后 3 天, 与正常组相比, 模型组的 HAS 显著增加 ($P < 0.001$), 表明坐骨神经结扎术后大鼠的 TWL 显著降低。

2. 两组大鼠脊髓组织中差异蛋白 (DEPs) 分析

依据“质谱数据分析”的筛选条件: Fold-change $\geq$ 1.2 或 $\leq$ 0.83, 且 $P < 0.05$, 对 DEPs 进行筛选, 正常组和模型组共筛选出 51 个 DEPs; 与正常组相比, 模型组中 9 个蛋白表达增加 (见表 1), 42 个蛋白表达降低 (见表 2), 51 个 DEPs 在不同组的表达见图 2 和图 3, 以及在细胞的分布见图 4。

两组样本间蛋白表达水平差异的分布状况见图 2。每个点代表一个检测蛋白, 横坐标代表该组

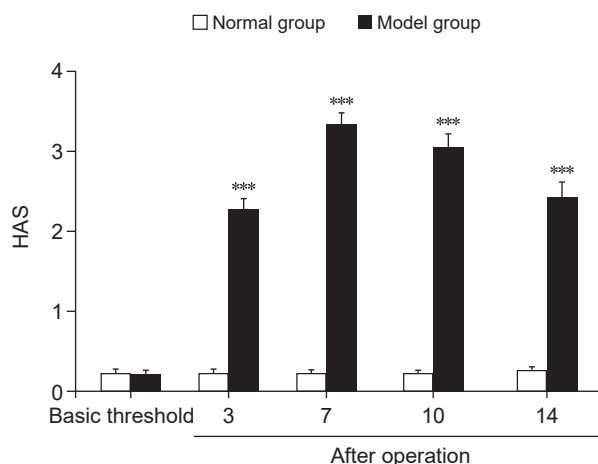


图 1 坐骨神经结扎前后两组大鼠痛敏分数 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$) *** $P < 0.001$, 与正常组相比

Fig. 1 Hyperalgesia score (HAS) of rats in each group before and after sciatic nerve ligation ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$) *** $P < 0.001$, compared with normal group.



表 1 模型组和正常组表达增加的蛋白

Table 1 Proteins with increased expression in the model group vs. normal group

基因名称 Gene name	蛋白编号 Accession	P 值 P value	基因名称 Gene name	蛋白编号 Accession	P 值 P value
Ephb6	P0C0K7	0.003127446	Cd47	A0A8I6AR93	0.020667338
Gpnmb	A0A8I6AAJ2	0.005107129	Cstf2t	A0A8I5ZW25	0.027608851
Tmem263	A0A8I6AQR3	0.005353903	Phrf1	A0A8L2QQ15	0.036588356
Tprkb	G3V805	0.00737562	Cbr1l2	A0A8I5XVU2	0.044746892
Nr3c1	A0A8I6A088	0.019510393			

表 2 模型组和正常组表达降低的蛋白

Table 2 Proteins with reduced expression in the model group vs. normal group

基因名称 Gene name	蛋白编号 Accession	P 值 P value	基因名称 GeneName	蛋白编号 Accession	P 值 P value
Bicc1	A0A0G2K0Y0	0.000977695	Rabgap1	A0A8I5Y2G5	0.029230852
Apod	M0R4S2	0.001575683	Cyp51a1	Q64654	0.03347223
Dst	A0A8I5ZUE5	0.006329795	Snx30	A0A0G2JUF2	0.033507524
Cdh5	A0A0G2K0I6	0.007565649	Ankrd28	A0A8I5Y6T8	0.033699549
Dhrs1	A0A8I5ZRF1	0.009161298	Larp7	M0R7D1	0.034693553
Ddx42	A0A8I5ZLP6	0.010118888	Erlin1	A0A8I6B6J2	0.034975385
Cad	A0A8I5Y665	0.010350167	Fcgrt	A0A8I6AFJ8	0.035416448
Lonpl	Q924S5	0.010712952	Dhodh	A0A8I5ZW02	0.035971658
Pklr	A0A0H2UI07	0.010915862	Fbxo22	F7EM85	0.036616991
Zw10	Q4V8C2	0.011868631	Gtf2a2	A0A0G2K1B8	0.040051414
Hdgfl2	A0A0G2JYC7	0.013085447	Dcakd	Q6AY55	0.042032844
Cog8	B5DF86	0.01520053	Pnn	A0A8I6AKS0	0.04569218
H1-4	P15865	0.017743811	Sccpdh	Q6AY30	0.046061756
Ugt8	Q09426	0.018983326	Spg21	A0A8I6AIT6	0.046690282
Tuba1b	A0A8I6ALV8	0.019093892	Il1rap	A0A8I6ACY6	0.047502267
Wnk1	A0A0G2K3A0	0.019150363	Retreg2	A0A0G2K1U5	0.047520457
Abcb1a	A0A8I5ZY39	0.022215406	Sart3	D3ZAS8	0.047699109
Ndufs6l1	A0A8I6GLD7	0.023477833	Acaca	A0A8I6A239	0.047847435
Arhgef1	A0A0G2JU01	0.027104274	Rpl5	A0A8I6ARH8	0.049842254
H1f2	A0A0G2K654	0.027422656	Mrpl18	A0A8I5Y0J7	0.049952187
Tmx3	A0A8I6ARW7	0.028929857	Pick1	Q6GQQ2	0.049973763

对比各蛋白的倍数变化（取以 2 为底的负对数），差异越大的蛋白分布于 X 轴的两端，根据 LOG_FOLDCHANGE 值的正负可判断蛋白上下调情况，纵坐标表示 Student's *t*-test 的 *P* 值（取以 10 为底的负对数），*P* 值越小，取对数后值越大，在纵轴方向越往上走，表示差异越显著，散点颜色代表最终的筛选结果，显著上调的差异表达蛋白以红色表示，显著下调的差异表达蛋白以蓝色表示，非显著差异的蛋白以灰色表示。

3. GO 与 KEGG 富集分析

在微信平台上对 51 个 DEPs 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。GO 分析由三部分组成，包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC)。

GO 富集分析结果显示生物过程 (biological process, BP) 有 240 项，主要涉及了新尿嘧啶核苷酸 (uridylic acid, UMP) 生物合成过程、尿苷二磷酸 (uridine diphosphate, UDP) 生物合成过程、嘧啶核糖核苷二磷酸生物合成过程、蛋白质定位到双细胞紧密连接处等；分子功能 (molecular function, MF) 有 49 项，主要涉及二氢烟酸酶活性、酶结合、有机环化合物结合、U6 snRNA 结合、5S rRNA 结合等；细胞组成 (cellular component, CC) 有 26 项，主要涉及了胞内、胞浆、膜结合细胞器、细胞质部分等，表明坐骨神经痛的发生可能与这 51 个 DEPs 所参与多个生物学途径有关。分别根据 BP、CC、MF 中 *P* 值的大小绘制出条目排名前 10 的条形图（见图 5）。此外，对正常组和模型组的 51 个 DEPs 进行 KEGG

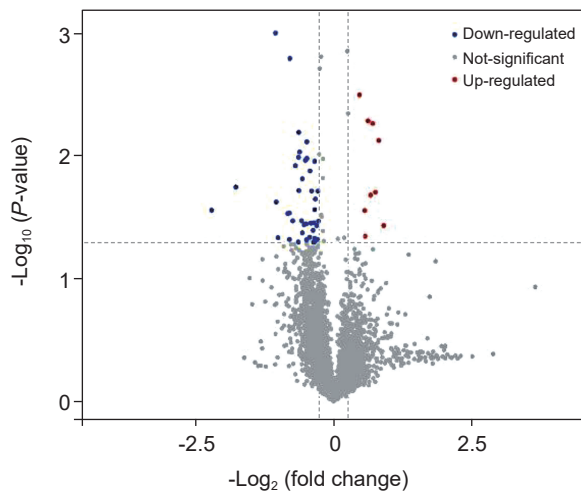


图2 模型组对正常组的火山图

Fig. 2 Volcano plot of model group vs. normal group

Up-regulated: 与正常组相比表达上调; Down-regulated: 与正常组相比表达下调

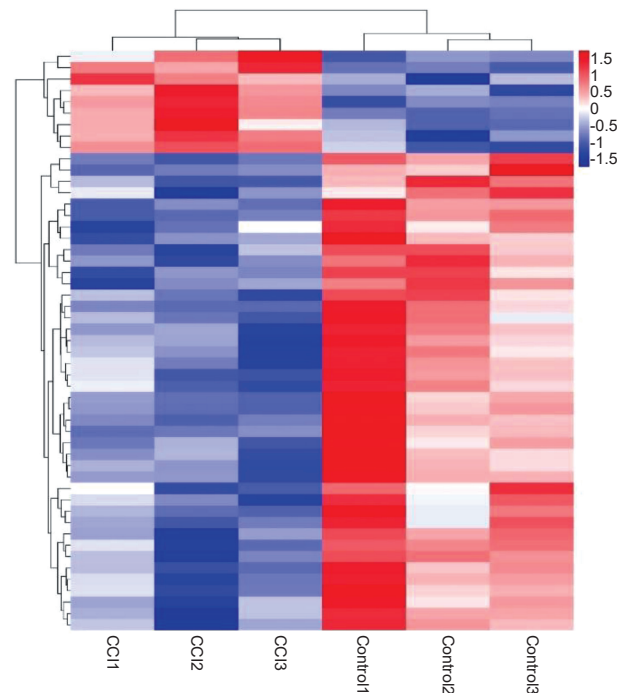


图3 模型组对正常组的层次聚类分析热力图

不同位置的色块代表对应位置蛋白的相对表达量, 红色代表高表达量, 蓝色代表低表达量, 可见图中出现了明显的差异表达蛋白分组模式。

Fig. 3 Heat map of hierarchical clustering analysis of model group and normal group

The color blocks at different positions represent the relative expression of proteins at the corresponding positions, with red representing high expression and blue representing low expression. A clear pattern of grouping of differentially expressed proteins can be seen in Fig.

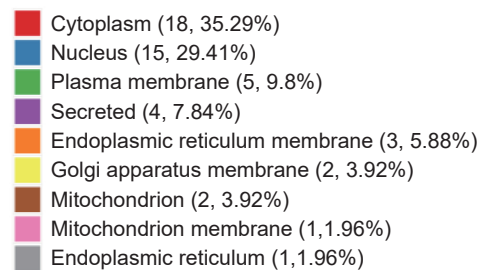
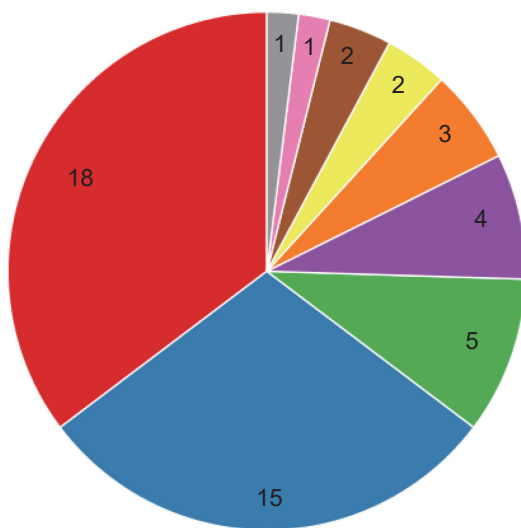


图4 模型组对正常组的差异表达蛋白亚细胞定位分析饼状图

亚细胞定位是指某种蛋白或某个基因表达产物在细胞内的具体存在部位, 包括细胞核、细胞质和细胞膜等, 基因的表达调控体现在蛋白的结构和功能方面, 为准确了解某种蛋白功能, 需要清楚其亚细胞定位, 以此判断其发挥功能的可能场所。该图可以直观地反映在各亚细胞中映射的差异表达蛋白的个数和占比。

Fig. 4 Pie chart of subcellular localization analysis of differentially expressed proteins in the model group versus the normal group

Subcellular localization refers to the specific location of a protein or a gene expression product in the cell, including the nucleus, cytoplasm and cell membrane, etc. The regulation of gene expression is reflected in the structure and function of proteins, in order to accurately understand the function of a certain protein. It is usually necessary to be clear about its subcellular localization, in order to determine the possible places where it can perform its function. The graph visualizes the number and percentage of differentially expressed proteins mapped in each subcell.

通路富集分析,共富集到5条KEGG通路(见图6),其中涉及了丙酮酸代谢、嘧啶代谢、mRNA 监控途径、胰岛素信号通路、辅助因子的生物合成。具体的代谢通路以辅助因子的生物合成为例(见图7)。

讨 论

蛋白质组学的目的是对生物系统中的所有蛋白质进行全面鉴定和量化,以揭示蛋白质在生物、生理和病理过程中的作用^[10]。伴随质谱技术的不断

发展,其液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrum, LC-MS)可用于测定复杂生物样本中蛋白质和肽的丰度,进一步使蛋白质组学的数据质量在准确性和精密度方面显著提高^[11]。通过筛选模型组和正常组之间的差异蛋白,可以研究与差异蛋白相关的生物过程,其差异蛋白所涉及的信号通路,从而揭示坐骨神经痛产生的机制。Qiu 等^[12]通过转录组学和蛋白质组学分析,发现前扣带回皮质(anterior cingulate cortex, ACC)中的突触和线粒体相关靶标可能与神经病理性疼痛有关。同样,Di 等^[13]

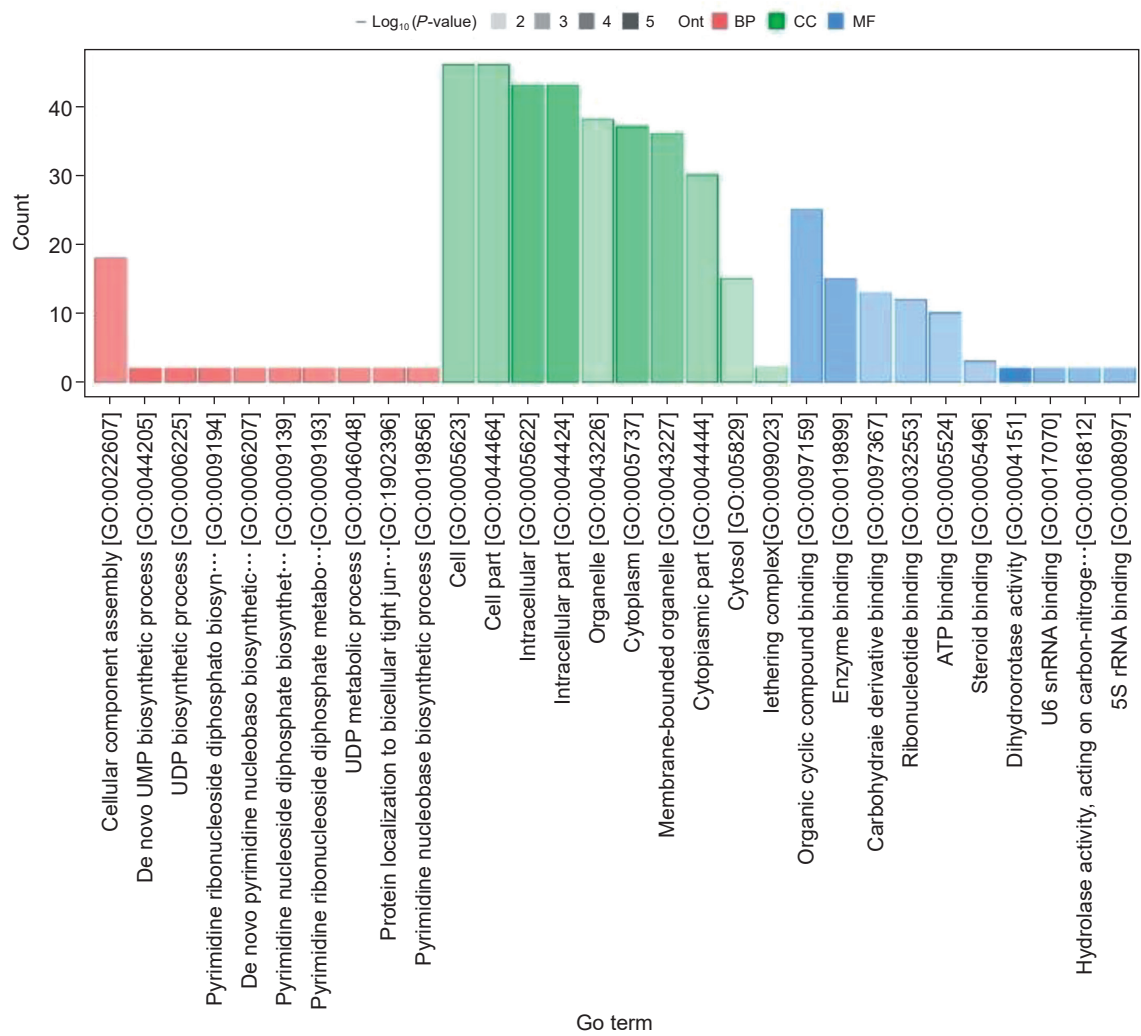


图 5 模型组对正常组的差异表达蛋白 GO 富集分析分类直方图
横坐标为 GO Term, 纵坐标为映射的差异表达蛋白个数, 红色表示生物过程 (biological process, BP), 绿色表示细胞组成 (cellular component, CC), 蓝色表示分子功能 (molecular function, MF), 透明度表示 P 值大小, 颜色越深, P 值越小。

Fig. 5 Classification histogram of GO enrichment analysis of differentially expressed proteins in the model group versus the normal group
The horizontal coordinate is GO Term, the vertical coordinate is the number of mapped differentially expressed proteins, red color indicates biological process (BP), green color indicates cellular component (CC), blue color indicates molecular function (MF), and transparency indicates P value, the darker the color, the smaller the P value.

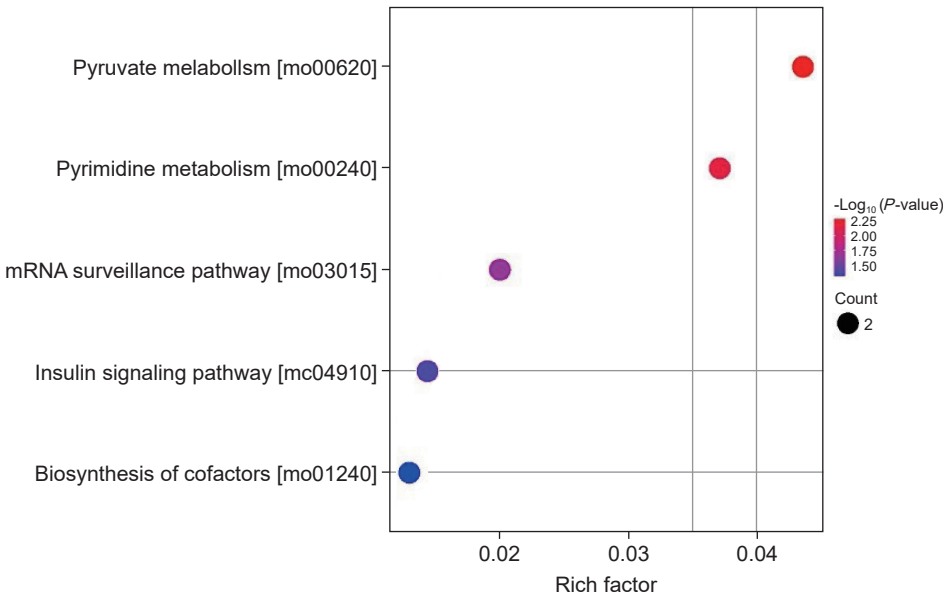


图 6 模型组对正常组的差异表达蛋白的 KEGG 代谢通路富集分析气泡图
横坐标为富集程度 Rich factor 值，纵坐标为 KEGG Pathway 信息。其中，圆圈的大小表示映射通路的差异表达蛋白个数，圆圈越大，数量越多；圆圈的颜色表示 P 值大小，颜色越红， P 值越小。

Fig. 6 Bubble plot of KEGG metabolic pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins in the model group versus the normal group
The horizontal coordinate is the enrichment degree Rich factor value, and the vertical coordinate is KEGG Pathway information. The size of the circle indicates the number of differentially expressed proteins in the mapped pathway, the larger the circle, the higher the number; the color of the circle indicates the size of the P value, the redder the color, the smaller the P value.

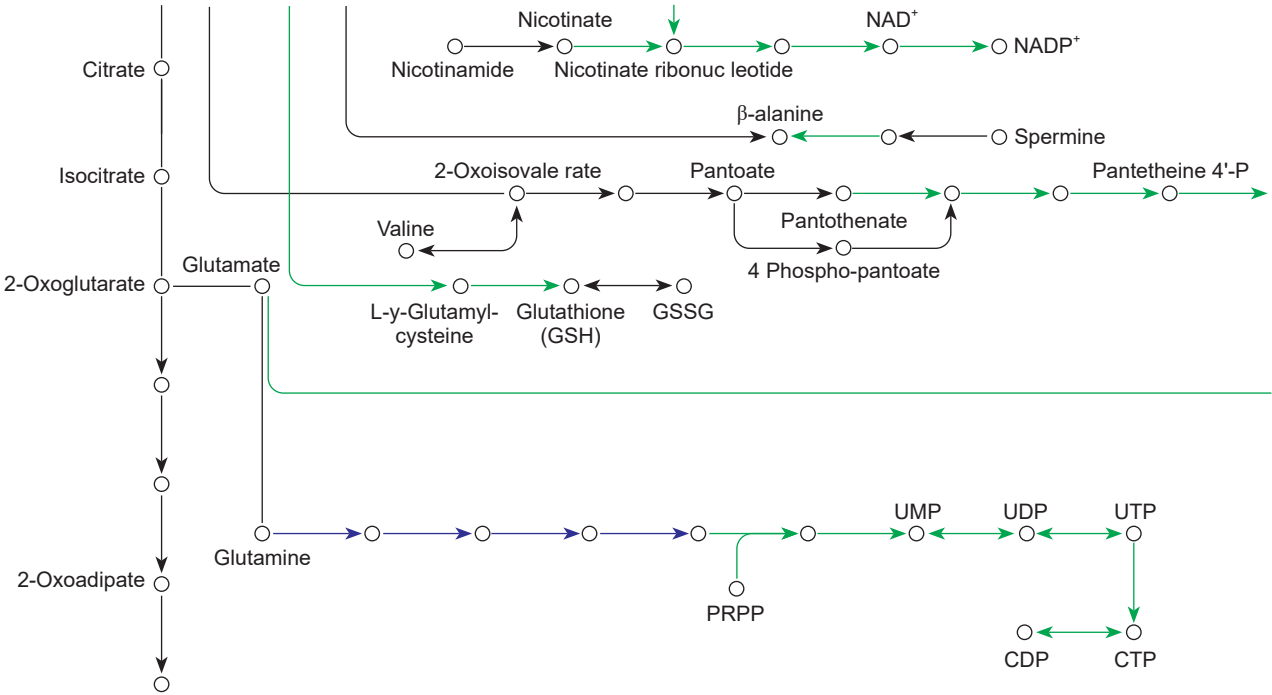
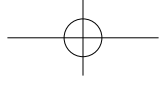


图 7 模型组对正常组的差异表达蛋白的 KEGG 代谢通路图
图中为辅助因子的生物合成代谢通路，图中涉及的代谢物和通路复杂，其中蓝色箭头的 Glutamate 和 Glutamine 代表谷氨酸和谷氨酰胺代谢过程。

Fig. 7 KEGG metabolic pathway of differentially expressed proteins in the model group versus the normal group
The biosynthetic metabolic pathways of cofactors are shown in the figure, which involves complex metabolites and pathways, including Glutamate and Glutamine with blue arrows, which represent glutamate and glutamine metabolic processes.



通过蛋白质组学分析发现, 子宫腺肌病和外阴痛的发病机制与膜联蛋白家族功能障碍所参与的细胞骨架通路相关。

本研究对两组大鼠脊髓组织分析得到的 51 个差异蛋白中发现, Cyp51a1 是编码羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶 (lanosterol 14 α -demethylase) 的基因, 该酶是参与胆固醇合成的关键步骤。Ershov 等^[14]研究发现, 当这些酶因分子机制失调, 会导致胆固醇病理性积累, 而胆固醇驱动的神经理理性疼痛调节机制又是通过控制小胶质细胞中的 TLR4 inflammarasts 和基因表达程序以及阻断神经炎症的延续来实现的^[15]。Fang 等^[16]研究表明, 存在于大鼠脊髓星形胶质细胞中的抗癌基因 PTEN 表达水平增加可能会加速胆固醇的生物合成, 减少星形胶质细胞的激活, 从而减轻神经病理性疼痛, 因此恢复 PTEN 或胆固醇可能是治疗神经病理性疼痛的有效方法。Cad 是编码钙黏附蛋白的基因, 在细胞黏附和细胞架构中起到重要的作用。Pan 等^[17]研究结果表明, 在慢性疼痛模型中, N-钙粘蛋白以及膜相关 β -连环蛋白的表达在脊髓背角中降低。因此, 坐骨神经痛的发生可能与 Cyp51a1 和 Cad 存在一定的关系。

本研究通过差异蛋白进行的 KEGG 富集分析表明, 在坐骨神经痛条件下, 丙酮酸代谢、胰岛素信号通路和辅助因子的生物合成信号通路在大鼠脊髓中起重要作用。丙酮酸代谢、胰岛素信号通路和辅助因子的生物合成与坐骨神经痛关系密切。丙酮酸代谢是糖酵解和氧化磷酸化的主要途径, 对能量稳态和线粒体质量控制至关重要, 包括融合/裂变动力学和线粒体自噬, 丙酮酸代谢在免疫细胞活化和功能中起着重要作用, 丙酮酸代谢失调会导致炎症性疾病^[18]。丙酮酸脱氢酶激酶 (pyruvate dehydrogenase kinase, PDK1-4) 是线粒体代谢调节剂, 通过调节丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 活性, 将丙酮酸有氧转化为乙酰辅酶 A 或厌氧转化为乳酸。乳酸的增加与炎症性疼痛有关, 研究发现, 在局部炎症部位, PDK2/4 的表达和活性增强介导了炎症细胞的激活和募集, 使浸润的巨噬细胞趋向促炎表型, 同时增加乳酸和其他促炎介质的产生, 进一步放大局部炎症^[19]。当前, 胰岛素和慢性疼痛的关系主要集中在糖尿病病人中, 因为糖尿病病人常常伴随着疼痛症状。研究发现, 由神经功能障碍引起的糖尿病神经病变, 与葡萄糖稳态受损、线粒体功能障碍、神经化学合成的改变和胰岛素神经维持能力降低导致的中枢和外周感觉神经元胰岛素信号通路减少有关^[20]。辅助因子的生物合成信号

通路, 涉及了谷氨酸和谷氨酰胺的代谢过程。谷氨酸和疼痛存在一定的关系, 徐卉红等^[21]研究发现, 谷氨酸能通过调控脊髓背角 GABA_BR2 的表达参与慢性胰腺炎疼痛的发生。慢性偏头痛的发生与谷氨酸有关, Park 等^[22]研究发现, 与对照组相比, 发作性偏头痛组和慢性偏头痛组的血浆谷氨酸水平显著增加。因此减少谷氨酸释放或降低与受体结合能力则会导致痛觉过敏的丧失, 从而减轻疼痛^[23]。而约 80% 的谷氨酸能通过谷氨酰胺合成酶 (glutamine synthetase, GS) 催化谷氨酸和氨的反应形成谷氨酰胺。因此, 坐骨神经痛的发生可能与谷氨酸和谷氨酰胺的代谢存在一定关系^[24]。

综上所述, 本研究采用 nanoLC-MS/MS 蛋白质组学技术对坐骨神经损伤模型大鼠的蛋白标志物进行研究, 共筛选出 51 个差异蛋白, 其中 Cyp51a1 和 Cad 与坐骨神经痛相关。KEGG 富集分析显示, 丙酮酸代谢、胰岛素信号通路、辅助因子的生物合成与坐骨神经痛关系密切。而辅助因子的生物合成信号通路中, 其代谢过程主要涉及谷氨酸和谷氨酰胺的代谢, 并且与坐骨神经痛相关。除此之外, 尚未发现其他代谢途径与坐骨神经痛的发展过程有关。因此, 这些蛋白标志物所参与的代谢途径在坐骨神经痛的作用机制需要进一步研究。本研究虽取得一定的成果, 但未进一步的实验验证, 未来将致力于对所研究的蛋白进行实验验证^[9]。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Foster NE, Konstantinou K, Lewis M, *et al.* Stratified versus usual care for the management of primary care patients with sciatica: the SCOPiC RCT[J]. Health Technol Assess, 2020, 24(49):1-130.
- [2] 张浩琳, 和岚, 郭佳, 等. 早期针刺治疗腰椎间盘突出坐骨神经痛的临床疗效研究 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(2):146-149.
- [3] Jensen RK, Kongsted A, Kjaer P, *et al.* Diagnosis and treatment of sciatica[J]. BMJ, 2019, 367:16273.
- [4] 李培雯, 杨俊涛, 焦召华, 等. 浅议承扶穴定位及在治疗坐骨神经痛中的应用 [J]. 中国针灸, 2020, 40(2):215-216.
- [5] 文先杰, 杨承祥, 李恒, 等. 慢性坐骨神经结扎神经痛大鼠脊髓 nNOS 阳性神经元的表达 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2008, 14(1):28-31.
- [6] 白凤媛, 赵冬梅, 蔡仁军, 等. 基于 UHPLC-QE-MS 的 CCI 模型大鼠的血清代谢组学研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2022, 42(8):2528-2531.

- [7] Aslam B, Basit M, Nisar MA, *et al.* Proteomics: technologies and their applications[J]. J Chromatogr Sci, 2017, 55(2):182-196.
- [8] 戴国梁, 孙冰婷, 陈泽瑀, 等. 基于定量蛋白质组学技术探讨交泰丸抗抑郁的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(23):6500-6508.
- [9] 徐秋玲, 陈淑萍, 高永辉, 等. 重复电针对坐骨神经痛大鼠下丘脑 CaMKII 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2):482-485.
- [10] Tian X, Permentier HP, Bischoff R. Chemical isotope labeling for quantitative proteomics[J]. Mass Spectrom Rev, 2023, 42(2):546-576.
- [11] Sivanich MK, Gu TJ, Tabang DN, *et al.* Recent advances in isobaric labeling and applications in quantitative proteomics[J]. Proteomics, 2022, 22(19-20):e2100256.
- [12] Qiu XT, Guo C, Ma LT, *et al.* Transcriptomic and proteomic profiling of the anterior cingulate cortex in neuropathic pain model rats[J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16:1164426.
- [13] Di Tucci C, Muzii L. Chronic pelvic pain, vulvar pain disorders, and proteomics profiles: new discoveries, new hopes[J]. Biomedicines, 2023, 12(1):1.
- [14] Ershov P, Kaluzhskiy L, Mezentsev Y, *et al.* Enzymes in the cholesterol synthesis pathway: interactomics in the cancer context[J]. Biomedicines, 2021, 9(8):895.
- [15] Navia-Pelaez JM, Choi SH, Dos Santos Aggum Capetini L, *et al.* Normalization of cholesterol metabolism in spinal microglia alleviates neuropathic pain[J]. J Exp Med, 2021, 218(7):e20202059.
- [16] Fang Y, Cui H, Liu F, *et al.* Astrocytic phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 regulates neuropathic pain by facilitating 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase-dependent cholesterol biosynthesis[J]. Pain, 2022, 163(12):e1192-e1206.
- [17] Pan Y, Jiang L, Wang C. The impact of N-cadherin- β -catenin signaling on the analgesic effects of glial cell-derived neurotrophic factor in neuropathic pain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 522(2):463-470.
- [18] Kim MJ, Lee H, Chanda D, *et al.* The role of pyruvate metabolism in mitochondrial quality control and inflammation[J]. Mol Cells, 2023, 46(5):259-267.
- [19] Jha MK, Song GJ, Lee MG, *et al.* Metabolic connection of inflammatory pain: pivotal role of a pyruvate dehydrogenase kinase-pyruvate dehydrogenase-lactic acid axis[J]. J Neurosci, 2015, 35(42):14353-14369.
- [20] Akintoye OO, Owoyele BV, Fabunmi OA, *et al.* Diabetic neuropathy is associated with increased pain perception, low serum beta-endorphin and increase insulin resistance among Nigerian cohorts in Ekiti State[J]. Heliyon, 2020, 6(7):e04377.
- [21] 徐卉红, 邱海波, 王莉琴, 等. 谷氨酸通过调控脊髓背角 GABA_{BR2} 参与慢性胰腺炎痛的机制研究 [J]. 南昌大学学报 (医学版), 2022, 62(4):10-15.
- [22] Park CG, Chu MK. Interictal plasma glutamate levels are elevated in individuals with episodic and chronic migraine[J]. Sci Rep, 2022, 12(1):6921.
- [23] 郭梦霞, 王俊丽, 牛争平. 谷氨酸与慢性偏头痛关系的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(2):264-267.
- [24] Zhang D, Hua Z, Li Z. The role of glutamate and glutamine metabolism and related transporters in nerve cells[J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(2):e14617.

《中国疼痛医学杂志》编辑部

地址: 北京市海淀区学院路 38 号, 北京大学医学部

联系电话: 010-82801712; 010-82801705

电子邮箱: pain1712@126.com

杂志官网: <http://casp.ijournals.cn> 在线投稿

微信公众平台号: 中国疼痛医学杂志 (cjpm1712)

