

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2024.09.003

• 论 著 •

PGC-1 α 介导线粒体生物发生对骨癌痛伴发镜像痛的影响 *

刘佳霖 张 钰 段柯杨 王敬萱 王雪莹 孙 涛[△]
(山东第一医科大学附属省立医院疼痛科, 济南 250021)

摘 要 目的: 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 调控线粒体生物发生对骨癌痛伴发镜像痛的影响。方法: 第一部分实验: 成年雌性 SD 大鼠按照随机数字表法分成 2 组, 假手术组 (Sham 组) 与骨癌痛组 (bone cancer pain, BCP 组), 每组 10 只。第二部分实验: 大鼠按照随机数字表法分成 3 组, Sham + vehicle 组、BCP + vehicle 组、BCP + ZLN (ZLN005, PGC-1 α 激活剂组), 每组 25 只。将 MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞注入左胫骨髓腔建立 BCP 大鼠模型, Sham 组大鼠注射等体积 Hank's 平衡盐溶液。第二部分实验中, BCP + ZLN 组大鼠鞘内注射 ZLN005 (单次剂量 100 μ g/30 μ l), Sham + vehicle 组与 BCP + vehicle 组注射等体积溶剂。Western blot 用于分析大鼠脊髓中 PGC-1 α 、Nrf1 和 Tfam 蛋白表达量。qPCR 用于分析 mtDNA 相对拷贝数。免疫荧光双标染色分析 PGC-1 α 的分布与细胞定位。结果: 单侧癌细胞接种诱导 BCP 大鼠双侧后爪出现机械性痛觉过敏。ZLN005 鞘内注射可减轻 BCP 大鼠双侧后爪的机械性痛觉过敏。在 BCP 大鼠的脊髓中观察到 PGC-1 α 、Nrf1、Tfam 和 mtDNA 相对拷贝数水平下降。鞘内注射 ZLN005 后, PGC-1 α 、Nrf1、Tfam 和 mtDNA 相对拷贝数的水平升高。PGC-1 α 在同侧和对侧脊髓背角均有分布。PGC-1 α 的荧光强度在 BCP 大鼠双侧脊髓中出现下降。PGC-1 α 主要与神经元共定位。结论: 脊髓中的线粒体生物发生的损伤促进了骨癌痛伴发镜像痛的发生发展。PGC-1 α 激活介导线粒体生物发生缓解骨癌痛及其伴发的镜像痛。

关键词 骨癌痛; 镜像痛; 线粒体质量控制; 线粒体生物发生; PGC-1 α

The effect of PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis on bone cancer pain and concurrent mirror-image pain *

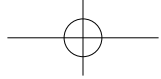
LIU Jia-lin, ZHANG Yu, DUAN Ke-yang, WANG Jing-xuan, WANG Xue-ying, SUN Tao[△]

(Department of Pain Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250021, China)

Abstract Objective: To investigate the effects and mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) regulated mitochondrial biogenesis on bone cancer pain and concurrent mirror-image pain. **Methods:** In the first part of the experiment, adult female SD rats were randomly divided into 2 groups using a table of random numbers, Sham group and BCP (bone cancer pain) group, with 10 rats in each group. In the second part of the experiment, the rats were randomly divided into 3 groups using a table of random numbers, Sham + vehicle group, BCP + vehicle group, BCP + ZLN (ZLN005, PGC-1 α activator) group, with 25 rats in each group. MRMT-1 breast cancer cells were injected into the medullary cavity of the left tibia to establish BCP rat model, and Sham group rats were injected with equal volume of Hank's balanced salt solution. In the second part of the experiment, rats in the ZLN group were injected intrathecally with ZLN005 (100 μ g/30 μ l), and the Sham group and vehicle group rats were injected with an equal volume of vehicle. The levels of PGC-1 α ,

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81972145)

[△] 通信作者 孙涛 suntaosdph@163.com



Nrf1, and Tfam in the spinal cord of the rats were analysed by western blot. The mtDNA copy number expression was analysed by qPCR. The localization of PGC-1 α was analysed by immunofluorescence. **Results:** Mechanical hyperalgesia was induced in the bilateral hind paws of rats by intra-bone marrow injection of cancer cells. Intrathecal injection of ZLN005 attenuated mechanical hyperalgesia of BCP rats. In the spinal cord of BCP rats, a decreased in levels of PGC-1 α , Nrf1, Tfam and relative mtDNA copy number were observed. The expression of PGC-1 α , Nrf1, Tfam and relative mtDNA copy number was elevated after administration with ZLN005. The distribution of PGC-1 α in the spinal dorsal horn was demonstrated on both sides. The fluorescence intensity of PGC-1 α was declined in BCP rats. PGC-1 α was mainly located in neurons. **Conclusion:** In the spinal cord, damage to mitochondrial biogenesis facilitated the development of bone cancer pain concomitant with mirror-image pain. PGC-1 α activation can alleviate bone cancer pain and concurrent mirror-image pain by promoting mitochondrial biogenesis.

Keywords bone cancer pain; mirror-image pain; mitochondrial quality control; mitochondrial biogenesis; PGC-1 α

作为癌痛最常见的表现形式之一,骨癌痛 (bone cancer pain, BCP) 是一种原发性骨肿瘤或肿瘤骨转移引起的复杂疼痛状态,可表现为持续性、突发性或自发性疼痛,兼备炎症性疼痛及神经病理性疼痛的特征。复杂且独特的发生发展机制导致骨癌痛表现形式也复杂多样^[1]。临床上,单侧部位原发肿瘤或转移癌病人的骨痛并非仅局限于肿瘤生长侧,而是常伴有躯体相应对侧部位的疼痛^[2]。这种由单侧组织损伤引发双侧疼痛的现象称为镜像痛 (mirror-image pain, MIP)^[3]。镜像痛的存在无疑大大增加了癌症病人的痛苦、影响镇痛疗效。继续探索癌痛伴发镜像痛的机制,对进一步了解和探索癌症病人晚期复杂疼痛表现形式和伴癌综合征等的发生有重要意义。

近年来,线粒体功能障碍在骨癌痛中的作用逐渐被发现。线粒体生物发生 (mitochondrial biogenesis, MB) 是产生新的功能性线粒体的过程,是实现线粒体的更新、恢复线粒体正常功能的重要机制。线粒体生物发生也是重要的镇痛靶点。已有研究证实, MOTS-c 能够通过恢复线粒体生物发生缓解 BCP 小鼠的痛觉过敏^[4]。过氧化物酶体增殖物激活受体- γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 是线粒体生物发生的关键调节因子,当 PGC-1 α 功能失调时会导致疼痛发生发展。在利用 MRMT-1 乳腺癌细胞构建的 BCP 模型大鼠脊髓中 PGC-1 α 的表达出现了下调,而激活 PGC-1 α 通过抑制 GABA 能中间神经元的凋亡促进骨癌痛缓解^[5,6]。综上所述,PGC-1 α 介导的线粒体生物发生的受损可能是骨癌痛发生发展的潜在机制之一。但多数骨癌痛的动物实验研究仅注重于观察造模侧肢体,而对于骨癌痛伴发镜像痛现象的观察和机制研究稍显薄弱。

目前常用的构建大鼠骨癌痛模型的方法是利用 Walker 256 或 MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞进行骨髓腔内注射以模拟骨转移性癌痛。并且,已有研究观察到 Walker 256 乳腺癌细胞构建的癌痛模型大鼠会伴发的镜像痛改变^[7]。但对于利用 MRMT-1 乳腺癌细胞构建的大鼠骨癌痛模型中是否也会伴发镜像痛,目前相关报道较少。且目前也鲜有关于 PGC-1 α 介导线粒体生物发生在大鼠骨癌痛伴发镜像痛现象的研究。因此本研究以此为切入点,利用 MRMT-1 乳腺癌细胞构建的大鼠骨癌痛模型以观察骨癌痛伴发镜像痛现象。另外,结合既往的研究,PGC-1 α 介导线粒体生物发生这一反应过程多定位于神经元,神经元是上行感觉传导通路的主要组成部分,疼痛信息由此上传至大脑高级中枢并介导疼痛最终的形成。因此,本研究将重点探索脊髓平面上神经元 PGC-1 α 介导的线粒体生物发生对于骨癌痛伴发镜像痛现象的影响与机制,以为癌痛伴发镜像痛的机制研究提供新思路。

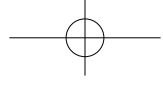
方 法

1. MRMT-1 细胞培养

MRMT-1 大鼠乳腺癌细胞 (吉妮欧生物科技, 中国广州) 在含 10% FBS (Gibco, 赛默飞世尔科技, 美国) 和 1% 抗生素 (Gibco) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco) 中培养, 于 5% CO₂, 37℃ 培养箱中培养。用 0.25% 胰蛋白酶 (Gibco) 消化后离心收集细胞, 然后重悬于 Hank's 平衡盐溶液 (Solarbio, 中国北京) 中, 用于实验大鼠的后续建模手术。

2. 实验动物

成年雌性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 6~8 周龄, 体重 180~200 g, 购自济南朋悦实验繁育有限



公司[许可证号: SCXK(鲁)20190003]。所有实验大鼠均可自由饮水和进食,环境温度控制在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$,昼夜周期为12小时。所有大鼠在各种实验操作前适应性饲养1周。所有动物饲养和实验操作程序已通过山东第一医科大学附属省立医院实验动物伦理委员会批准(伦理批号: No.2022-075)。

3. 实验分组

第一部分实验:按照随机数字表法将实验大鼠随机分成2组(每组10只),假手术组(Sham组)与骨癌痛组(BCP组)。每组取3~5只用于术前和术后1、4、7、10、14、21天50%机械刺激缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, 50% MWT)的测定,第21天最后一次行为学测试结束后进行心脏灌注、胫骨和脊髓组织的取材手术,用于Western blot、冰冻切片制备、免疫荧光染色及骨组织石蜡包埋切片与HE染色实验。

第二部分实验:按照随机数字表法将实验大鼠随机分成3组(每组25只),Sham + vehicle组、BCP + vehicle组、BCP + ZLN组。每组随机分配6~8只大鼠用于测量术前和术后1、4、7、10、14天以及给药后1、4、7、10小时50% MWT的变化。其余用于分子生物学实验的大鼠给药后1小时即进行心脏灌注与脊髓的取材手术,4~5只用于Western blot实验,4只用于总DNA抽提与qPCR实验,4只用于制备冰冻切片与免疫荧光染色实验。

4. 骨癌痛模型

通过将MRMT-1细胞接种到大鼠左胫骨骨髓腔建立BCP模型。用2%阿佛汀(10 ml/kg,腹腔注射)麻醉大鼠,剃除左腿毛发并消毒。用5 ml注射器针头在大鼠左胫骨平台上钻孔,用25 μl 微量进样器将10 μl 含有 3×10^5 个MRMT-1细胞的悬液缓慢注入BCP大鼠左胫骨骨髓腔。微量进样器停留1分钟后用碘伏消毒注射点,用医用胶水密封注射部位并缝合切口。第一部分实验中,BCP组大鼠注射MRMT-1癌细胞,Sham组大鼠注射等体积的Hank's平衡盐溶液。第二部分实验中,BCP + vehicle组和BCP + ZLN组大鼠注射MRMT-1癌细胞,Sham + vehicle组大鼠注射等体积的Hank's平衡盐溶液。

5. 机械痛阈测定

使用von Frey纤维丝(Stoelting,美国)和up-and-down法测定大鼠50% MWT,以评估机械痛阈。将大鼠放入带金属网底的单层透明塑料箱中,适应环境30分钟。用0.4、0.6、1、2、4、6、8和15 g的von Frey纤维丝刺激大鼠的左右后爪。从2 g开

始施加刺激,刺激时保持纤维丝弯曲6~8 s。当观察到大鼠出现快速缩腿、舔足、跳跃或抖动等反应时,可将其视为阳性反应,然后再施加相邻小1号的纤维丝。当观察到阴性反应时,则使用相邻的大1号的纤维丝。每次刺激间隔3分钟。当出现第1次前后反应不一致的变化时,再连续测量4次后结束测试。计算公式 $50\% \text{ MWT} = 10^{(Xf + \kappa\delta)}$,Xf:最后1个von Frey纤维丝克数的对数, κ :阴/阳性反应序列的对数值, $\delta = 0.244$ 。

6. 鞘内注射给药

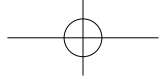
将PGC-1 α 特异性转录激活剂ZLN005(Selleckchem,美国休斯敦)溶于含10% DMSO、40% PEG300和5% Tween-80的无菌生理盐水中。在BCP模型术后第14天进行鞘内注射操作。2%阿佛汀(10 ml/kg,腹腔注射)麻醉大鼠后,将25 μl 的微量进样器插入L₅和L₆椎间隙。当观察到大鼠出现快速甩尾反应时说明穿刺成功,并缓慢将药物注射到大鼠蛛网膜下腔。BCP + ZLN组大鼠鞘内注射ZLN005(PGC-1 α 激活剂,单次单剂量100 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$),Sham + vehicle组与BCP + vehicle组大鼠注射等体积溶剂。

7. 骨组织 HE 染色分析

用2%阿佛汀(10 ml/kg,腹腔注射)麻醉大鼠后,用50 ml注射器在左心室进行无菌生理盐水灌注,待肝脏变白后灌注冷甲醛。取出左胫骨,置于4% PFA中于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱内固定过夜。经10%乙二胺四乙酸脱钙后,将骨组织脱水后包埋在石蜡中,并用石蜡切片机切成5 μm 的薄片。骨组织石蜡切片用苏木精-伊红染色。最后用荧光显微镜(奥林巴斯BX60,日本)拍摄图像。

8. 蛋白免疫印记分析(Western blot)

用2%阿佛汀(10 ml/kg,腹腔注射)麻醉大鼠,经左心室灌注无菌生理盐水后,解剖分离腰膨大部分脊髓。脊髓组织在预冷的PBS溶液中清洗,并在含蛋白酶抑制剂PMSF的RIPA溶液中匀浆。在4 $^\circ\text{C}$ 下以12,000 rpm离心25分钟后,收集上清液。用BCA法测定蛋白质浓度。通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各组大鼠的等量蛋白质样本。然后将蛋白质转膜至PVDF膜上。在室温下用5%脱脂牛奶封闭1.5小时后,用下列一抗在4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中孵育,摇床过夜:Rabbit anti-PGC-1 α (1:1000, A20995, 爱博泰克,中国武汉),Rabbit anti-Nrf1(1:1000, A5547, 爱博泰克),Rabbit anti-Tfam(1:1000, A13552, 爱博泰克),Rabbit anti- β -actin(1:3000, 20536-1-AP, Proteintech,美国芝加哥)。用TBST



洗膜3次后,用以下二抗于室温下孵育1小时:HRP-labeled Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:1000, A0208, 碧云天, 中国上海)。最后,用ECL试剂盒和化学发光成像系统(Amersham Imager 600, 美国GE公司)对蛋白条带进行显像和分析。

9. 实时荧光定量 PCR (qPCR)

使用基因组DNA提取试剂盒(碧云天)从腰膨大脊髓组织中分离基因组总DNA。所有操作均按照生产商试剂盒说明书进行。使用SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR试剂盒(AG11701, 艾科瑞生物, 中国湖南)进行qPCR,在LightCycler 480 II (Roche, 瑞士)上进行。基因表达的相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。大鼠mt-ND1基因表达与 β -actin的比值归一化用以计算mtDNA相对拷贝数。

qPCR引物序列如下:

β -actin-forward, 5'-CTCTGTGTGGATTGGTGG-CT-3'; β -actin-reverse, 5'-GGGTGTAAAACGCAGCT-CAG-3'; mt-ND1-forward, 5'-TTGCCCAAACCATCT-CTTACG-3'; mt-ND1-reverse, 5'-GGTGTA CT CGGCT-ATG-AAGAA-3'。

10. 免疫荧光双标染色分析

用2%阿佛汀(10 ml/kg, 腹腔注射)麻醉大鼠,经左心室灌注无菌生理盐水后灌注4%冷多聚甲醛。提取腰膨大脊髓组织后置于4%多聚甲醛中于4℃冰箱固定过夜。经过蔗糖梯度脱水 and OCT化合物包埋后,用冰冻切片机将脊髓组织切成20 μ m的薄片。冰冻组织切片将用于免疫荧光分析。切片经37℃复温后在95℃柠檬酸钠抗原修复液中修复30分钟,然后用0.1% TritonX-100通透30分钟。用10%驴血清在37℃下封闭1小时。然后用以下一抗在4℃冰箱中孵育过夜: Rabbit anti-PGC-1 α (1:150, NBP1-04676, Novus Biologicals, 美国科罗拉多州)、Mice anti-NeuN (1:200, AG5317, 碧云天)。用PBST清洗切片3次后,用以下二抗在室温下避光孵育1.5小时: Alexa Fluor 488 驴抗兔 IgG 二抗 (1:400, ab150077, Abcam, 英国剑桥) 和 Alexa Fluor 555 驴抗小鼠 IgG 二抗 (1:400, A0460, 碧云天)。切片用DAPI避光复染细胞核,然后用抗荧光淬灭封片剂封片。最后,使用荧光显微镜(奥林巴斯BX60)采集拍摄图像。

11. 统计学分析

所有数据在分析前进行正态性检验(Shapiro-Wilk test)。两组间比较采用独立样本 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行比较,符合方差齐性的数据进行Tukey事后分析,不符

合方差齐性的数据进行Dunnett事后分析。不符合正态分布的数据采用非参数秩和检验。所有结果均以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm SEM$)表示,并用GraphPad Prism 10.1.2及SPSS 26.0进行分析。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结 果

1. 单侧癌细胞接种引发BCP大鼠双侧后爪不同程度的机械性痛觉过敏

在进行建模手术操作前,各组大鼠间的机械痛阈差异无统计学意义。与Sham组大鼠相比,BCP组大鼠同侧后爪的50% MWT从术后第1天开始出现下降,自第4天起差异逐渐显著($P<0.05$, 见图1A),50% MWT的下调随时间推移渐进性加重,一直持续到21天(见图1A)。BCP组大鼠对侧后爪的50% MWT于第7天出现显著下调,晚于同侧后爪,且程度较轻(见图1B)。注射了Hank's缓冲液的Sham组大鼠的同侧与对侧后爪的50% MWT未观察到显著改变。组织切片HE染色结果显示,BCP组大鼠胫骨组织骨小梁连续性中断,而Sham组大鼠胫骨组织骨小梁结构相对完整(见图1C, 1D)。

2. 单侧癌细胞接种引发BCP大鼠双侧脊髓中线粒体生物发生的损害

Western blot结果显示,与Sham组相比,BCP组大鼠同侧脊髓组织中线粒体生物发生相关因子PGC-1 α 、Nrf1、Tfam出现了显著下降(见图2A),但在对侧脊髓组织中这种改变则较为轻微或不明显(见图2B)。免疫荧光结果显示,同侧与对侧脊髓中PGC-1 α 分布于脊髓背角(见图3A, 3B)。与Sham组相比,同侧与对侧脊髓中的PGC-1 α 的荧光强度均出现减弱(见图3C, 3D)。

3. PGC-1 α 的激活缓解BCP大鼠双侧机械性痛觉过敏

在进行药物鞘内注射干预前,相对于Sham + vehicle组,BCP + vehicle组与BCP + ZLN组同侧与对侧后爪出现显著机械性痛觉过敏(见图4A, 4B);并且,BCP + vehicle组与BCP + ZLN组组间机械痛阈差异无统计学意义。而在进行给药干预后1小时,ZLN005能够在一定程度上缓解同侧的痛觉过敏,并且此时50% MWT上升达最大值($P<0.01$);在给药干预后4小时,BCP + ZLN大鼠的50% MWT依旧高于BCP + vehicle组($P<0.05$),说明药效能够持续3小时左右(见图4C)。ZLN005

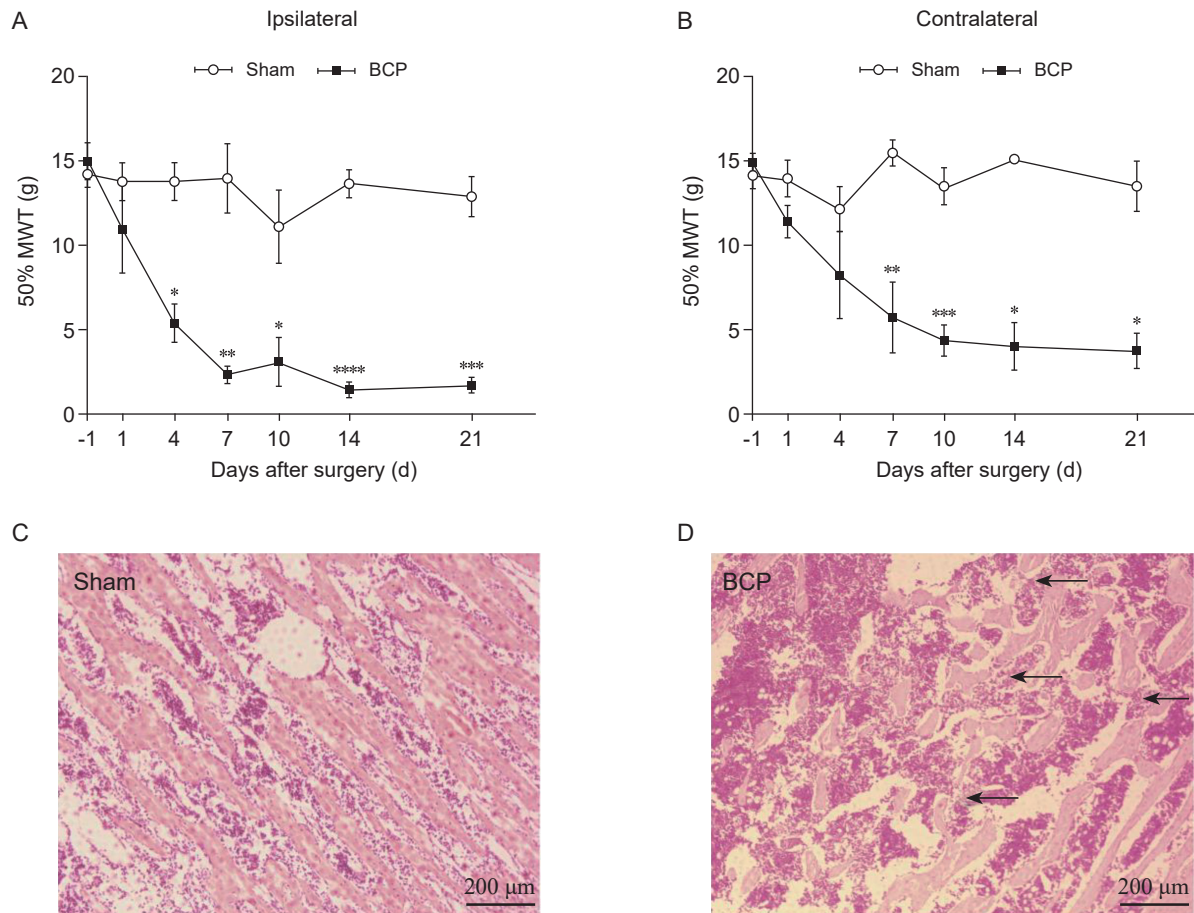


图 1 癌细胞接种引发 BCP 大鼠双侧后爪的机械性痛觉过敏 ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)
 (A) Sham 组与 BCP 组大鼠术前和术后 1、4、7、10、14 和 21 天同侧后爪 50% MWT 变化; (B) Sham 组与 BCP 组大鼠术前和术后 1、4、7、10、14 和 21 天对侧后爪 50% MWT 变化; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与 Sham 组相比; (C) Sham 组大鼠左胫骨组织切片 HE 染色; (D) BCP 组大鼠左胫骨组织切片 HE 染色, 箭头表示骨小梁结构连续性中断。比例尺 = 200 μm ($\times 100$)

Fig. 1 Cancer cell inoculation induced mechanical hyperalgesia in the bilateral hind paws of BCP rats ($n = 4$, $\bar{x} \pm SEM$)
 (A) Changes in 50% MWT in the ipsilateral hind paws of rats in the sham group and BCP group preoperatively and on days 1st, 4th, 7th, 10th, 14th, and 21th postoperatively; (B) Changes in 50% MWT in the contralateral hind paws of rats in the sham group and BCP group preoperatively and on days 1st, 4th, 7th, 10th, 14th, and 21th postoperatively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with Sham group; (C) HE staining of left tibial tissue sections of rats in Sham group; (D) HE staining of left tibial tissue sections of rats in BCP group. The arrows indicate disruption of structural continuity of trabecular structure. Scale bar = 200 μm ($\times 100$)

对于对侧机械性痛觉过敏也有一定的缓解作用, 但缓解程度轻且持续时间更短 (见图 4D)。

4. PGC-1 α 激活后各组大鼠线粒体生物发生因子的表达与 PGC-1 α 的细胞定位

Western blot 结果显示, 与 Sham + vehicle 组大鼠相比, BCP + vehicle 组大鼠同侧脊髓组织中线粒体生物发生相关因子 PGC-1 α 、Nrf1、Tfam 的蛋白表达量及 mtDNA 相对拷贝数均出现了显著下降 (见图 5A)。而与 BCP + vehicle 组大鼠相比, BCP + ZLN 大鼠同侧脊髓中 PGC-1 α 、Nrf1、Tfam

的蛋白表达量及 mtDNA 相对拷贝数出现了升高 (见图 5A, 5C)。相对于同侧脊髓, 这些变化在各组大鼠对侧脊髓中较为轻微 (见图 5B, 5D)。免疫荧光双标染色结果显示, 在各组大鼠脊髓中, PGC-1 α 主要分布在脊髓背角, 并且主要与神经元共定位 (见图 6A, 6B)。与 Sham + vehicle 组大鼠相比, BCP + vehicle 组大鼠脊髓 PGC-1 α 的荧光强度出现下降; 而与 BCP + vehicle 组大鼠相比, BCP + ZLN 组大鼠脊髓中 PGC-1 α 的荧光强度出现升高 (见图 6C, 6D)。

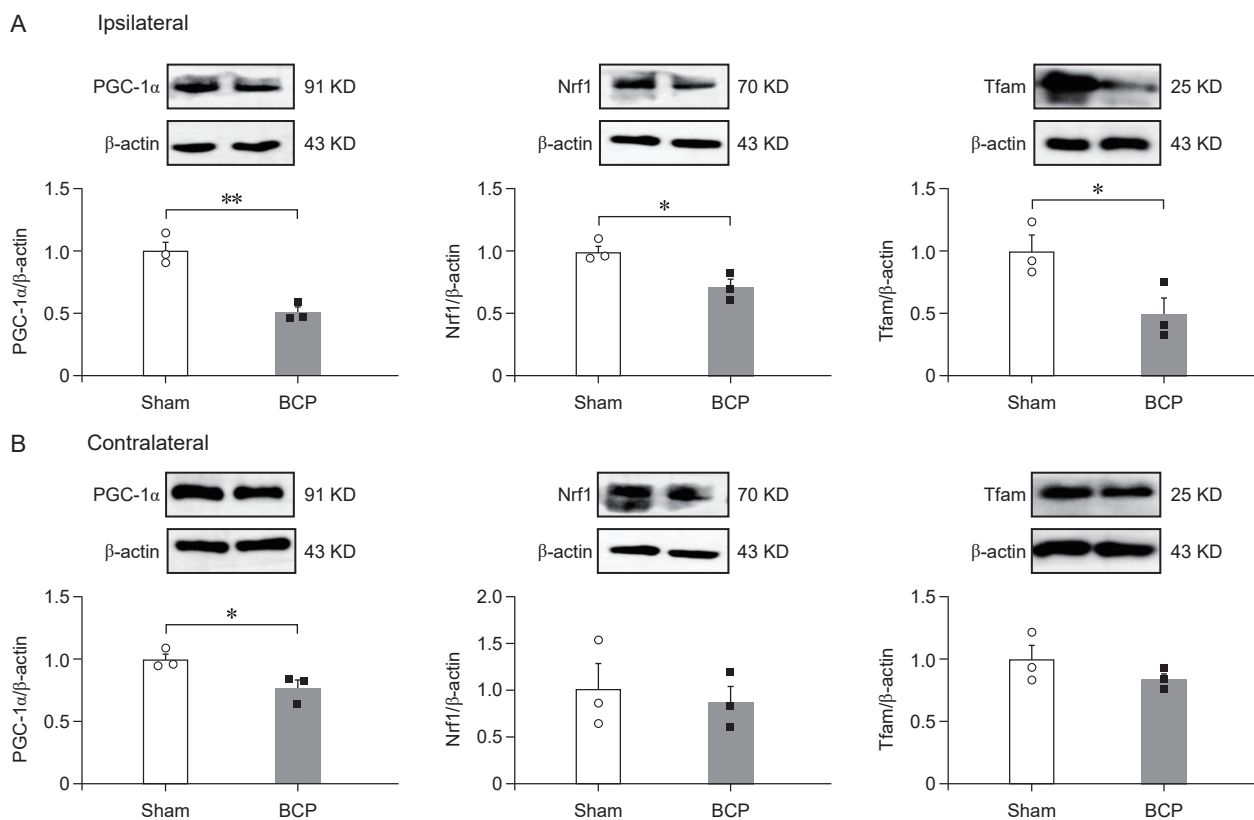


图 2 BCP 大鼠脊髓中线粒体生物发生因子的蛋白表达量 ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$) (A) Sham 组、BCP 组同侧脊髓中 PGC-1α、Nrf1、Tfam 表达水平的蛋白印迹分析及其相对定量分析; (B) Sham 组、BCP 组对侧脊髓中 PGC-1α、Nrf1、Tfam 表达水平的蛋白印迹分析及其相对定量分析; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比

Fig. 2 Expression of mitochondrial biogenesis factors in the spinal cord of BCP rats ($n = 3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Western blot analysis of PGC-1α, Nrf1, Tfam levels in the ipsilateral spinal cord of Sham group and BCP group and their relative quantification; (B) Western blot analysis of PGC-1α, Nrf1, Tfam levels in the contralateral spinal cord of Sham group and BCP group and their relative quantification. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Sham group.

讨 论

躯体单侧组织损伤引发对侧疼痛反应称为镜像痛^[8]。其发生发展机制十分复杂、尚未完全明确。目前主流的机制可总结为神经机制、体液机制及神经胶质细胞的激活,并且各机制间相互串扰。周围神经或组织损伤产生的信号因子,会通过血液、脑脊液传递并影响对侧部分的神经或组织,或是通过激活神经元产生疼痛信息、再经神经网络传递疼痛信息至对侧神经^[9]。而现阶段也有越来越多的研究发现,星形胶质细胞的激活会促进疼痛信息向对侧传递或扩散,促进对侧神经元相互联系接触、建立相应的神经网络并将疼痛信息上传至大脑高级中枢,最终介导镜像痛的发生^[10,11]。研究显示,单侧的神经损伤后引起背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 释放 TNF-α,并通过脑脊液扩散至对侧 DRG,促进双侧卫星胶质细胞激活并释放神经生长因子

(nerve growth factor, NGF), NGF 促进对侧 DRG 神经元突触样结构的形成,并增加了 DRG 神经元兴奋性,从而介导镜像痛的产生^[12,13]。在脊髓层面上,星形胶质细胞可通过缝隙连接将疼痛信息扩散至对侧脊髓,促进新神经元联系建立,促进镜像痛的形成^[14]。在大鼠皮肤肌肉切口牵拉术致持续性疼痛 (skin/muscle incision and retraction, SMIR) 的大鼠模型中单侧神经受到牵拉后,引发神经胶质细胞的激活,导致双侧 DRG 神经元线粒体均出现肿胀或空泡化的损伤^[15],提示线粒体损伤在镜像痛发生发展中也有潜在作用。

在本研究的第一部分实验中,利用 MRMT-1 乳腺癌细胞建立大鼠骨转移性癌痛模型,通过测定两组机械性痛阈的变化发现 BCP 大鼠同侧后爪 50% MWT 随时间推移出现显著降低;结合 HE 染色结果,BCP 组大鼠左胫骨骨小梁连续性中断,提示癌细胞侵袭引发骨质破坏、骨癌痛模型建立成

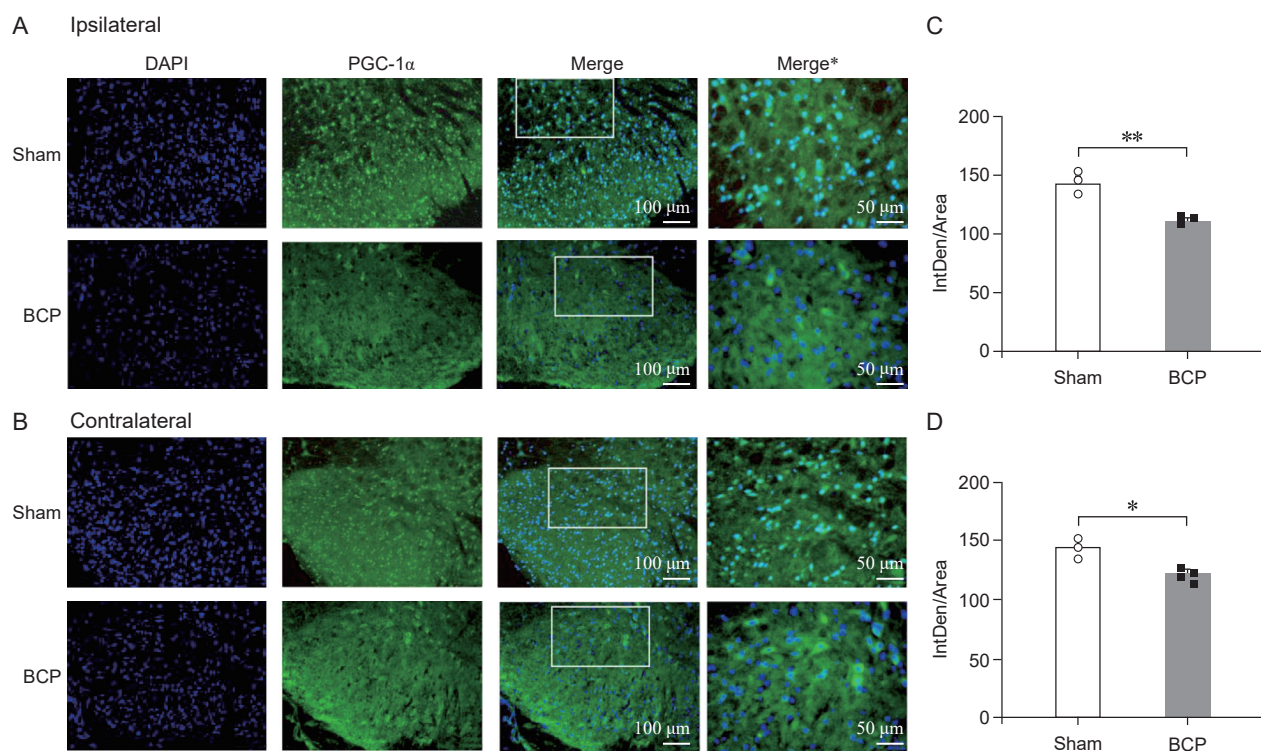


图3 PGC-1 α 在BCP大鼠双侧脊髓中的分布及其平均荧光强度变化 ($n=3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 免疫荧光染色分析, 显示 PGC-1 α (绿色) 在 Sham 组与 BCP 组大鼠同侧脊髓中的表达与分布; (B) 免疫荧光染色分析, 显示 PGC-1 α (绿色) 在 Sham 组与 BCP 组大鼠对侧脊髓中的表达与分布。DAPI (蓝色) 用于标记细胞核。比例尺 = 100 μ m ($\times 200$); 最后一列为框内较高放大倍率图像 (*), 比例尺 = 50 μ m ($\times 400$); (C) Sham 组与 BCP 组大鼠同侧脊髓 PGC-1 α 的平均荧光强度分析; (D) Sham 组与 BCP 组大鼠对侧脊髓 PGC-1 α 的平均荧光强度分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比

Fig. 3 Distribution and mean fluorescence intensity of PGC-1 α in the bilateral spinal horn of the rats ($n=3$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Immunofluorescence staining analysis showing the expression and distribution of PGC-1 α (green) in the ipsilateral spinal dorsal horn of the rats in Sham group and BCP group; (B) Immunofluorescence staining analysis showing the expression and distribution of PGC-1 α (green) in the contralateral spinal dorsal horn of the rats in Sham group and BCP group. DAPI (blue) was used to label nucleus. Scale bar = 100 μ m ($\times 200$); Low-magnification images are enlarged in the last column boxes (*), Scale bar = 50 μ m ($\times 400$); (C) Analysis of mean fluorescence intensity of PGC-1 α in the ipsilateral spinal cord of rats in Sham group and BCP group; (D) Analysis of mean fluorescence intensity of PGC-1 α in the contralateral spinal cord of rats in Sham group and BCP group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Sham group.

功。同时也观察到其对侧后爪 50% MWT 出现下降, 但出现时间晚于同侧且下降程度较轻。这说明利用 MRMT-1 乳腺癌细胞建立的骨癌痛模型也会伴发镜像痛现象。蛋白免疫印记结果显示, BCP 大鼠同侧与对侧脊髓的 PGC-1 α 、Nrf1、Tfam 的蛋白表达量下降。结合免疫荧光的结果, BCP 大鼠同侧与对侧脊髓背角的 PGC-1 α 的平均荧光强度均出现下调, 说明了 BCP 大鼠同侧与对侧脊髓背角的 PGC-1 α /Nrf1/Tfam 通路介导的线粒体生物发生受损。根据以上结果, 癌细胞骨髓腔内接种后侵袭、破坏骨质, 引发同侧与对侧脊髓 PGC-1 α 表达下调、线粒体生物发生受损, 最终导致骨癌疼痛伴发镜像痛的发生发展。

线粒体生物发生是线粒体质量控制系统 (mitochondrial quality control, MQC) 重要组成部分, 维护线粒体正常功能和稳态^[16]。已经明确 PGC-1 α 是线粒体生物发生的关键调节因子, 也是调节线粒体功能及抗氧化防御机制的重要调节剂^[17]。当 PGC-1 α 功能失调时, 会引起线粒体功能障碍、氧化应激损伤加剧、炎症反应上调等一系列损伤, 从而引发各种细胞、组织的损伤和功能障碍^[18]。当 PGC-1 α 单倍体基因型不足时, 会引起烧伤小鼠伤口延迟愈合及疼痛慢性化发展^[19]。并且在诸如 CCI、SNI、DNP 等多种引发疼痛的动物模型中, PGC-1 α 介导的线粒体生物发生出现受损, 而促进线粒体生物发生的恢复则能够缓解各种神经损伤导致的疼痛^[20-22]。例

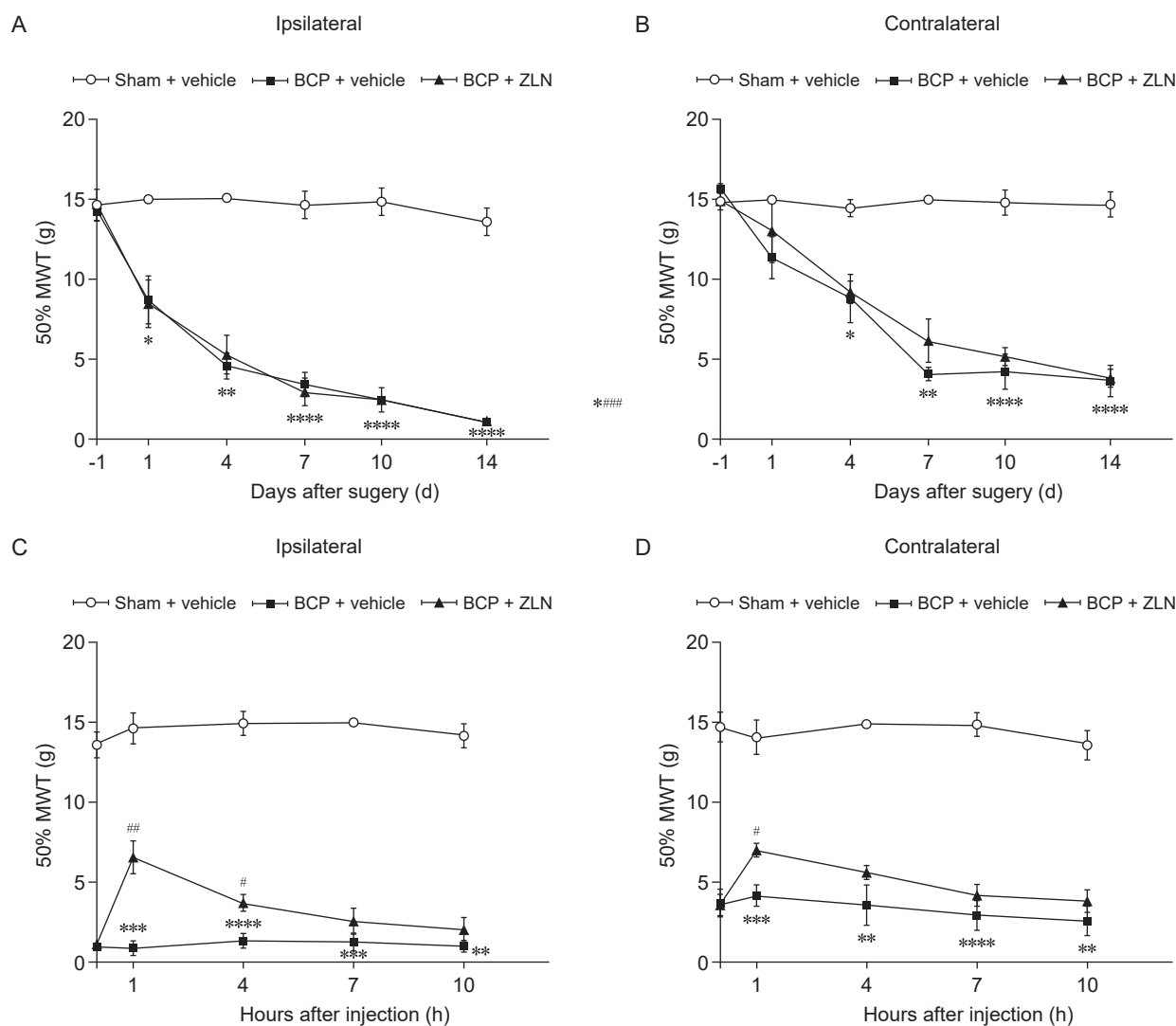


图4 PGC-1 α 的激活缓解BCP大鼠双侧机械性痛觉过敏($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠术前和术后 1、4、7、10、14 天同侧后爪 50% MWT 变化；(B) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠术前和术后 1、4、7、10、14 天对侧后爪 50% MWT 变化；(C) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠给药后 1、4、7、10 小时同侧后爪 50% MWT 变化；(D) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠给药后 1、4、7、10 小时对侧后爪 50% MWT 变化。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与 Sham + vehicle 组相比；# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 BCP + ZLN 组相比

Fig. 4 Activation of PGC-1 α alleviates bilateral mechanical hyperalgesia of BCP rats ($n=6$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Changes in 50% MWT in the ipsilateral hind paws of rats in the Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups preoperatively and on the 1st, 4th, 7th, 10th, 14th day after the BCP model surgery; (B) Changes in 50% MWT in the contralateral hind paws of rats in the Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups preoperatively before surgery and on the 1st, 4th, 7th, 10th, 14th day after the BCP model surgery; (C) Changes in 50% MWT in the ipsilateral hind paws of rats in the Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups postoperatively at the 1st, 4th, 7th, and 10th hour after administration; (D) Changes in 50% MWT in the contralateral hind paws of rats in the Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups postoperatively at the 1st, 4th, 7th, and 10th hour after administration.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, compared with Sham + vehicle group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with BCP + ZLN group.

如, 在通过坐骨神经慢性压迫损伤 (chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI) 诱导的神经病理性疼痛模型中, 鞘内注射 Nrf2 激动剂 RTA-408 可

通过激活 PGC-1 α 恢复线粒体生物发生, 从而缓解 CCI 诱导的疼痛超敏反应^[22]。在化疗药紫杉醇诱导的神经病理性疼痛 (paclitaxel-induced neuropathic pain,

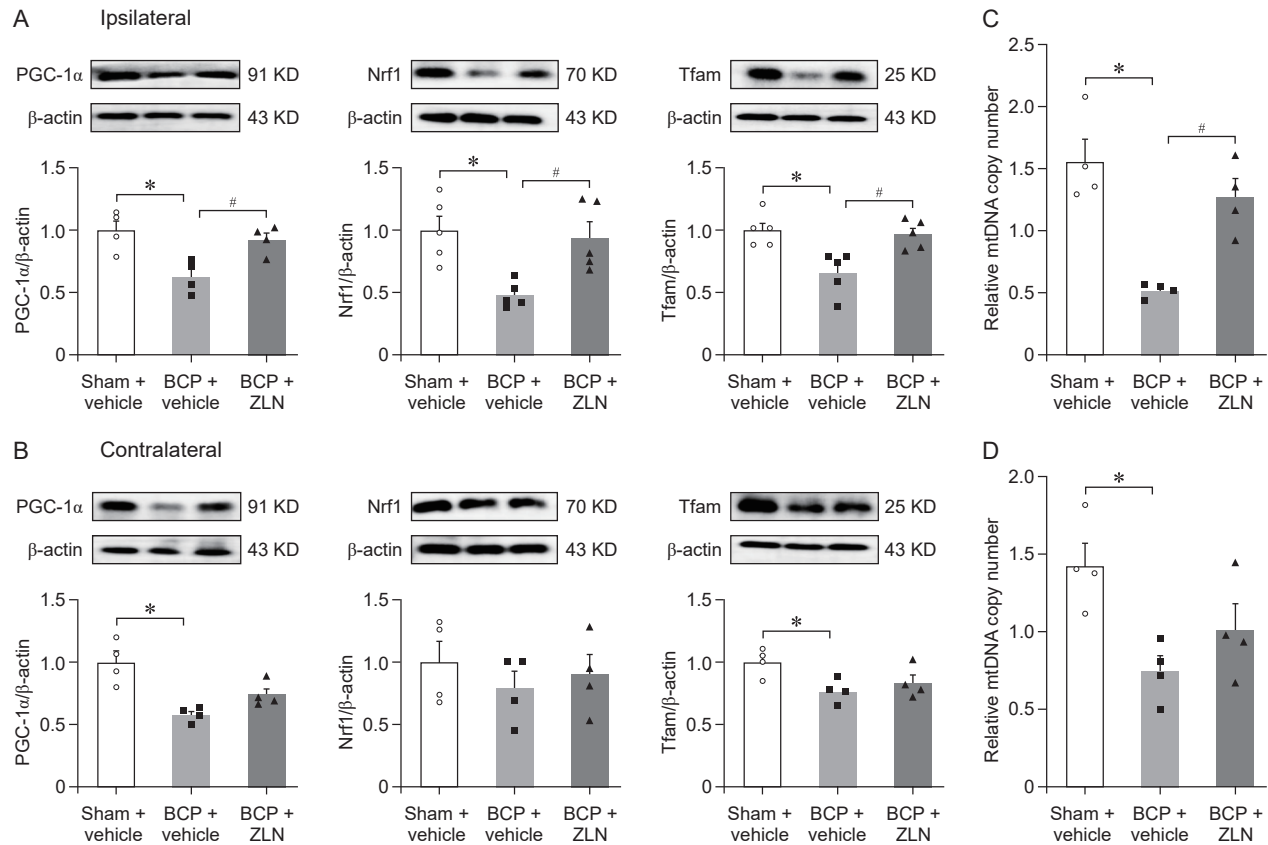


图 5 PGC-1α 激活后促进 BCP 大鼠脊髓中线粒体生物发生因子的蛋白表达量及 mtDNA 相对拷贝数水平上调 ($n = 4 \sim 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组同侧脊髓中 PGC-1α、Nrf1、Tfam 表达水平的蛋白印迹分析；(B) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组对侧脊髓中 PGC-1α、Nrf1、Tfam 表达水平的蛋白印迹分析；(C) qPCR 用于分析 Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组同侧脊髓 mtDNA 的相对拷贝数；(D) qPCR 用于分析 Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组对侧脊髓 mtDNA 的相对拷贝数。

* $P < 0.05$, 与 Sham + Vehicle 组相比；# $P < 0.05$, 与 BCP + ZLN 组相比

Fig. 5 PGC-1α activation promotes up-regulation of protein expression of mitochondrial biogenesis factors and relative level of mtDNA copy number in the spinal cord of BCP rats ($n = 4 \sim 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

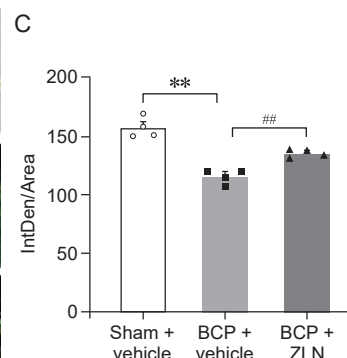
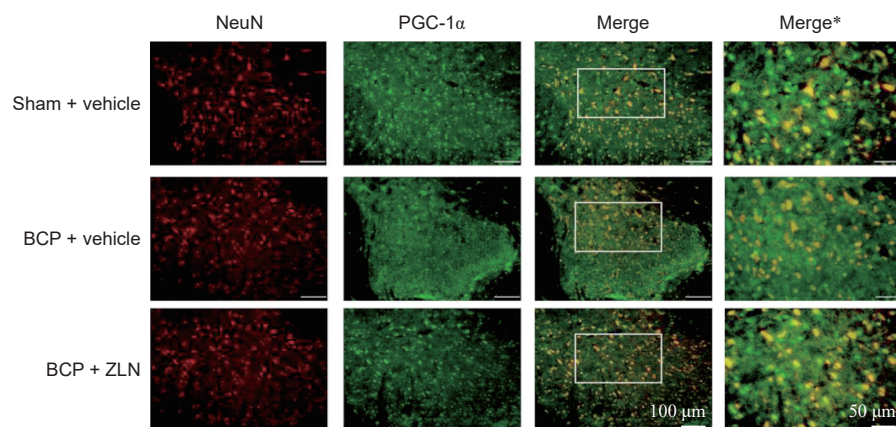
(A) Western blot analysis of PGC-1α, Nrf1, Tfam levels in the ipsilateral spinal cord of the rats in Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups and their relative quantification; (B) Western blot analysis of PGC-1α, Nrf1, Tfam levels in the contralateral spinal cord of the rats in Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups and their relative quantification; (C) The relative mtDNA copy number was analysed by qPCR in the ipsilateral spinal cord of the rats in Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups; (D) The relative mtDNA copy number was analysed by qPCR in the contralateral spinal cord of the rats in Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups.

* $P < 0.05$, compared with Sham + vehicle group; # $P < 0.05$, compared with BCP + ZLN group.

PINP) 中, 鞘内注射福莫特罗能够诱导 PGC-1α 介导的线粒体生物发生并减弱模型大鼠的机械性痛觉过敏^[23]。本研究的第二部分实验中, BCP + ZLN 组大鼠通过鞘内注射 ZLN005 后在不同程度上缓解其双侧机械性痛觉过敏, 而仅注射了溶剂的 BCP + vehicle 组大鼠的 50% MWT 则无明显改善。同时, 蛋白免疫印记的结果显示, ZLN005 促进了 BCP 大鼠同侧与对侧脊髓背角线粒体生物发生因子 PGC-1α、Nrf1、Tfam 的蛋白表达量的上调, 此外, qPCR 结

果也显示 mtDNA 相对拷贝数出现上调, 结合免疫荧光双标染色结果, BCP + ZLN 组大鼠同侧与对侧脊髓 PGC-1α 的荧光强度相对于 BCP + vehicle 组出现上调, 且均主要与神经元共定位。综上所述, ZLN005 促进了 BCP 大鼠脊髓神经元线粒体生物发生主要通路 PGC-1α/Nrf1/Tfam 的表达水平上调, 并促进了 mtDNA 的合成, 线粒体生物发生得到恢复, 对骨癌痛及其伴发的镜像痛起到镇痛作用, 这与先前的结果研究一致, 线粒体生物发生是缓解疼痛的重要靶点。

A Ipsilateral



B Contralateral

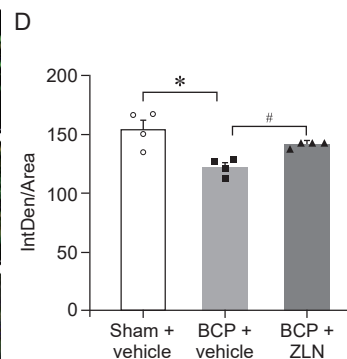
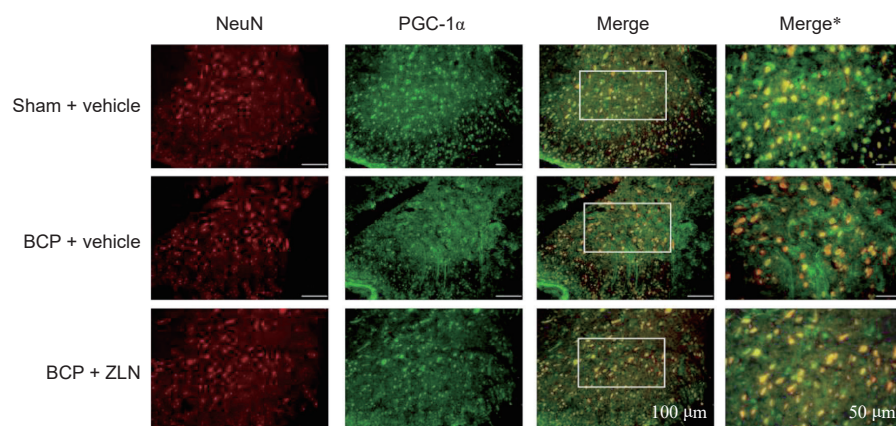


图6 PGC-1α在各组大鼠双侧脊髓背角中的细胞定位及其平均荧光强度的变化 ($n = 4 \sim 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 免疫荧光双标染色分析, 显示 Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠 PGC-1α (绿色) 在同侧脊髓背角中与 NeuN (神经元, 红色) 的共定位情况; (B) 免疫荧光双标染色分析, 显示 Sham + Vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠 PGC-1α (绿色) 在对侧脊髓背角中与 NeuN (神经元, 红色) 的共定位情况。比例尺 = 100 μm ($\times 200$); 最后一列为框内较高放大倍率图像 (*), 比例尺 = 50 μm ($\times 400$); (C) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠同侧脊髓 PGC-1α 平均荧光强度分析; (D) Sham + vehicle、BCP + vehicle 与 BCP + ZLN 组大鼠对侧脊髓 PGC-1α 平均荧光强度分析。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 Sham + Vehicle 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 BCP + ZLN 组相比

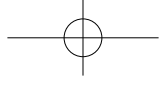
Fig. 6 Cellular localization and mean fluorescence intensity of PGC-1α in the bilateral spinal dorsal horn of the rats ($n = 4-5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Double immunofluorescence staining analysis showing the co-localization of PGC-1α (green) with NeuN (neuronal marker, red) in the ipsilateral spinal dorsal horn of rats in the Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups; (B) Double immunofluorescence staining analysis showing co-localization of PGC-1α (green) with NeuN (neuronal marker, red) in the contralateral spinal dorsal horn of rats in the Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN group. Scale bar = 100 μm ($\times 200$); Low-magnification images are enlarged in the last column boxes (*), Scale bar = 50 μm ($\times 400$); (C) Analysis of mean fluorescence intensity of PGC-1α in the ipsilateral spinal cord of rats in Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups; (D) Analysis of mean fluorescence intensity of PGC-1α in the contralateral spinal cord of rats in Sham + vehicle, BCP + vehicle and BCP + ZLN groups.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with Sham + vehicle group. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with BCP + ZLN group.

本研究仅初步证实了单侧癌细胞注射可以引发双侧脊髓背角神经元线粒体生物发生的损害, 这导致了骨癌痛伴镜像痛现象的产生。对于疼痛信息如何从同侧传递至对侧引发双侧神经元线粒体功能

障碍, 何种细胞参与这种信息传递的过程, 具体机制是什么, 仍需进一步研究探索。本实验未能进一步设置浓度梯度的给药剂量, 仅根据既往的文献^[23]做了单次单剂量给药研究, 除此剂量外可能还存在



更合理有效的给药剂量。此外, 由于实验条件与技术的受限, 大鼠脊髓的取材未能完全精确至每侧脊髓背角, 除痛觉外脊髓上也存在负责其他感觉与运动功能的分区, 这对于最终结果会存在一定的影响。对于存在的未解决的问题及实验设计与操作上的不足, 我们将会在后续实验中进一步探索并做出相应改进。

综上所述, 本研究表明了利用 MRMT-1 乳腺癌细胞构建的大鼠骨癌痛模型会伴发镜像痛现象。单侧癌细胞注射会导致双侧脊髓神经元线粒体生物发生的损伤, 这参与了骨癌痛伴发镜像痛的产生过程; PGC-1 α 激活能够通过促进线粒体生物发生的恢复从而缓解骨癌疼痛伴发的镜像痛。这为深入了解骨癌痛伴发镜像痛的机制提供了新的理论依据, 也为进一步了解和探索癌症病人晚期复杂疼痛表现形式提供了新思路。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Wang M, Xia F, Wei Y, *et al.* Molecular mechanisms and clinical management of cancer bone metastasis[J]. Bone Res, 2020, 8(1):30.
- [2] 孙丹丹. CQ 复方对癌侵袭镜像痛模型小鼠的镇痛作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2016.
- [3] 杨盼, 闫成祥, 朱利香, 等. 激活 $\alpha 2A$ 肾上腺素受体抑制背根神经节卫星胶质细胞活性缓解镜像痛敏 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(8):572-582.
- [4] Yang L, Li M, Liu Y, *et al.* MOTS-c is an effective target for treating cancer-induced bone pain through the induction of AMPK-mediated mitochondrial biogenesis[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2024 May 8. doi:10.3724/abbs.2024048.
- [5] Li MY, Ding JQ, Tang Q, *et al.* SIRT1 activation by SRT1720 attenuates bone cancer pain via preventing Drp1-mediated mitochondrial fission[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(3):587-598.
- [6] Chen N, Zhan RN, Liu DQ, *et al.* PGC-1 α activation ameliorates cancer-induced bone pain via inhibiting apoptosis of GABAergic interneurons[J]. Biochem Pharmacol, 2024, 222:116053.
- [7] Mao-Ying QL, Zhao J, Dong ZQ, *et al.* A rat model of bone cancer pain induced by intra-tibia inoculation of Walker 256 mammary gland carcinoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(4):1292-1298.
- [8] 刘培雯, 牛娟, 黄杜鹃, 等. 镜像痛的外周和中枢神经机制研究进展 [J]. 重庆医学, 2018, 47(12):1664-1666.
- [9] Jancalek R. Signaling mechanisms in mirror image pain pathogenesis[J]. Ann Neurosci, 2011, 18(3):123-127.
- [10] Hansson E. Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation?[J]. Acta Physiol (Oxf), 2006, 187(1-2):321-327.
- [11] 黄普超. 星形胶质细胞缝隙连接参与调节镜像痛作用机制的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [12] Cheng CF, Cheng JK, Chen CY, *et al.* Nerve growth factor-induced synapse-like structures in contralateral sensory ganglia contribute to chronic mirror-image pain[J]. Pain, 2015, 156(11):2295-2309.
- [13] Cheng CF, Cheng JK, Chen CY, *et al.* Mirror-image pain is mediated by nerve growth factor produced from tumor necrosis factor α -activated satellite glia after peripheral nerve injury[J]. Pain, 2014, 155(5):906-920.
- [14] 侯永恒, 杨建平, 张慧娟, 等. 缝隙连接蛋白 Cx43 在炎性镜像痛大鼠脊髓背角的表达 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2009, 15(5):287-291.
- [15] Huang XZ, Tu WF, Peng J, *et al.* Effect of preemptive local injection of ropivocaine with dexmedetomidine on mirror pain in rats and its mechanism[J]. Asian Pac J Trop Med, 2015, 8(10):836-840.
- [16] Liu D, Cai ZJ, Yang YT, *et al.* Mitochondrial quality control in cartilage damage and osteoarthritis: new insights and potential therapeutic targets[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(3):395-405.
- [17] Popov LD. Mitochondrial biogenesis: an update[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(9):4892-4899.
- [18] Rius-Pérez S, Torres-Cuevas I, Millán I, *et al.* PGC-1 α , inflammation, and oxidative stress: an integrative view in metabolism[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 1452696.
- [19] Miao J, Zhou X, Ding W, *et al.* Proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α haploinsufficiency promotes pain chronification after burn injury[J]. Anesth Analg, 2020, 130(1):240-247.
- [20] 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.
- [21] Zhang LQ, Zhou YQ, Li JY, *et al.* 5-HT_{1F} receptor agonist ameliorates mechanical allodynia in neuropathic pain via induction of mitochondrial biogenesis and suppression of neuroinflammation[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:834570.
- [22] Sun J, Li JY, Zhang LQ, *et al.* Nrf2 activation attenuates chronic constriction injury-induced neuropathic pain via induction of PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis in the spinal cord[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:9577874.
- [23] Chen N, Ge MM, Li DY, *et al.* $\beta 2$ -adrenoreceptor agonist ameliorates mechanical allodynia in paclitaxel-induced neuropathic pain via induction of mitochondrial biogenesis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 144:112331.