

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.03.003

• 论 著 •

大鼠周围神经损伤后前扣带回皮质 Yes 激酶
相关蛋白表达变化 *赵石祥^{1,2} 平 苹¹ 李治贵¹ 黄美金³ 刘明沅^{1,2} 孔繁一^{4△} 李 娜^{1△}⁽¹⁾ 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院麻醉科, 昆明 650032; ⁽²⁾ 昆明医科大学研究生院, 昆明 650500;⁽³⁾ 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院肿瘤科, 昆明 650032; ⁽⁴⁾ 云南大学附属医院神经内科, 昆明 650021)

摘 要 目的: 探讨前扣带回皮质 (anterior cingulate cortex, ACC) 的 Yes 激酶相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 在神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 中的表达变化。方法: 建立坐骨神经慢性压迫损伤 (chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI) 大鼠模型, 疼痛评估采用机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL), 通过蛋白质免疫印迹和免疫荧光检测 YAP 的表达变化, 并观察 YAP 与神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞共表达以及 YAP 的核定位情况。结果: 与对照组比较, CCI 组大鼠术后 MWT 和 TWL 显著降低, 对侧 ACC 区域 YAP 蛋白表达显著升高, 且 YAP 核表达量增加, YAP 与神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞存在共表达, CCI 组 YAP 与神经元、星形胶质细胞的共定位数量显著增加。结论: 外周神经损伤后大鼠 ACC 区域 YAP 核表达与蛋白表达增多, 可能在 NP 的发生与维持中发挥重要作用。

关键词 神经病理性疼痛; 前扣带回皮质; Yes 激酶相关蛋白; 坐骨神经慢性压迫损伤; 神经胶质细胞

Changes of Yes-associated protein expression in the anterior cingulate cortex after peripheral nerve injury in rats *ZHAO Shi-xiang^{1,2}, PING Ping¹, LI Zhi-gui¹, HUANG Mei-jin³, LIU Ming-yuan^{1,2}, KONG Fan-yi^{4△}, LI Na^{1△}⁽¹⁾ Department of Anesthesiology, 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, PLA, Kunming 650032, China;⁽²⁾ Graduate School of Kunming Medical University, Kunming 650500, China; ⁽³⁾ Department of Oncology, 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, PLA, Kunming 650032, China; ⁽⁴⁾ Department of Neurology, Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming 650021, China)

Abstract Objective: To investigate the changes of Yes-associated protein (YAP) in anterior cingulate cortex (ACC) in neuropathic pain (NP). **Methods:** Chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) model was established. Rats were assessed pain behavior with mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL). Changes of YAP were detected by western blotting and immunofluorescence, and the co-expression of YAP with neurons, astrocytes, and microglia, as well as the nuclear localization of YAP were observed. **Results:** Compared with the Sham group, rats in the CCI group showed significantly reduced MWT and TWL after surgery, and a significant increase in YAP protein expression in the contralateral ACC region, with an increase in nuclear YAP expression. YAP co-expressed with neurons, astrocytes, and microglia in the ACC region of rats, and the number of YAP co-localizations with neurons and astrocytes significantly increased in the CCI group. **Conclusion:** The nuclear and protein expression of YAP in ACC area of rats increased following peripheral nerve injury may be a crucial role for the pathogenic process of neuropathic pain.

Keywords neuropathic pain; anterior cingulate cortex; Yes-associated protein (YAP); chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI); neuroglia

* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81400924、81701117); 云南省昆明医科大学联合专项应用基础研究计划面上项目 (202201AY070001-284); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (202305AC160069); 昆明医科大学创新基金 (2024S394)

△ 通信作者 李娜 lina_anesth@163.com; 孔繁一 kfy9989@hotmail.com



神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是一种由神经损伤或病变引起的慢性疼痛^[1], 影响着 6.9%~10% 的普通人群^[2]。NP 导致的异常疼痛是严重影响病人的症状之一, 异常疼痛定义为由正常无害的刺激引起的疼痛^[3]。NP 病人还常常伴有焦虑和抑郁等情绪障碍, 给个人和社会带来巨大的经济负担^[4,5]。NP 对目前治疗可用的药物 (包括非甾体类和阿片类) 常发生抵抗^[6]。越来越多的证据表明, NP 不仅是一种疾病的症状, 还有神经系统病理性改变。因此, 只有深入理解 NP 的发病机制, 从应对症状治疗转变为基于发病机制的潜在靶点治疗, 才能提高疗效, 减少不良反应。

前扣带回皮质 (anterior cingulate cortex, ACC) 是慢性疼痛中整合伤害感受信号和情绪反应的关键区域^[7]。有研究表明, 神经病理性损伤会导致 ACC 的锥体神经元过度兴奋^[8,9]。此外, 在人脑影像学研究发现 ACC 是慢性疼痛病人中最常被激活的区域^[8], ACC 的激活能促进脊髓伤害性传递, 这种自上而下的调节会促进周围神经损伤后的痛觉过敏行为^[10]。在慢性疼痛的动物模型中降低这种过度活跃可以减少异常疼痛和痛觉过敏^[11-13]。尽管研究揭示了 ACC 在疼痛处理中的重要作用, 但对于 ACC 中特定分子和细胞机制如何参与 NP 的发生和发展仍知之甚少。

Hippo 通路是一条高度保守的信号通路, 在细胞增殖、凋亡、迁移和分化中发挥着重要的作用^[14]。Hippo 通路是一个由激酶组成的级联反应, 主要通过限制两个重要元件 Yes 激酶相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 和 PDZ 结合模序转录共激活因子 (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif proteins, TAZ) 的活性来发挥作用^[15]。Hippo 通路激活可触发激酶介导的一系列磷酸化反应, YAP/TAZ 磷酸化后停留于细胞质中, 不发挥生物学效应。反之, YAP/TAZ 去磷酸化后进入细胞核激活转录过程, 发挥生物学活性作用^[16]。本课题组前期研究证明, 周围神经损伤诱导了脊髓背角 YAP 和 TAZ 表达的时间依赖性和区域特异性变化^[17]。此后有学者进一步证明了 YAP/TAZ 或许作为 NP 的“开关”控制疼痛, 周围神经损伤后脊髓背角 YAP 和 TAZ 的核积累诱发和维持疼痛, 抑制其活性则可缓解疼痛^[18]。目前, YAP/TAZ 在疼痛中的研究尚局限在脊髓水平, 在 ACC 这种调控疼痛的关键脑区 YAP 是否也发挥着重要的作用, 目前尚不清楚。

本研究通过构建坐骨神经慢性压迫损伤 (chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI) 模型, 观察

ACC 区域 YAP 在大鼠 NP 发展过程中的蛋白表达变化及定位情况, 以期揭示 ACC 中的 YAP 在 NP 发生发展中的功能角色, 为开发新的治疗策略提供潜在的分子靶点。

方 法

1. 实验对象及分组

本实验使用 60 只成年雄性 SD 大鼠, 体重 180~220 g, 由斯贝福北京生物科技有限公司提供 [实验动物许可证号: SCXK (京) 2019-0010], 饲养过程中保证充足的食物和水, 昼夜 12/12 h 交替, 室温 22~25℃, 湿度 50%~60%。本研究已通过联勤保障部队第九二〇医院伦理委员会审核 [伦理批号: 2021-042 (科)-01]。采用随机数字表法分为假手术组 (Sham 组, $n=30$) 和模型组 (CCI 组, $n=30$)。大鼠适应 7 天后, Sham 组和 CCI 组分别在术后 3、7、14 天进行疼痛行为测试和 ACC 区域取材。Sham 组和 CCI 组各 10 只大鼠进行相应时间点疼痛行为学测试, 14 天疼痛行为学测试结束取 ACC 区域行 WB 和免疫荧光实验。两组另外 20 只大鼠于术后 3 天和 7 天疼痛行为学测试后, 进行脑部 ACC 区取材行 WB 和免疫荧光实验, 每组各时间点随机取材 5 只大鼠。

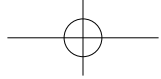
2. 坐骨神经慢性压迫损伤模型

参照既往研究方法^[19], 建立大鼠 CCI 的神经病理性疼痛模型。使用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 固定并用温毯进行保温, 右侧股骨外侧做约 0.5 cm 切口, 钝性分离肌肉组织, 暴露并分离坐骨神经, 在神经分叉前用 2 根 4-0 铬肠线对其进行结扎, 结扎松紧度以同侧腿部肌肉轻微抽搐为宜, 结间间隔 2 mm。Sham 组只暴露神经不结扎, 其余操作同 CCI 组。术毕缝合切口并监测大鼠直到全部苏醒。分别在 CCI 术前 1 天、术后 3、7、14 天进行疼痛行为学测试。

3. 行为学测试

参照既往研究方法^[17], 疼痛行为学测试包括机械痛敏测试和热痛敏测试, 测试时间均为 9:00~17:00 时, 环境温度 22~25℃, 湿度 50%~60%。测试开始前 3 天, 大鼠在测试室和仪器前每天适应 30 min。

机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测定: 将大鼠放置于铁丝网上, 罩上透明观察罩, 适应 15~30 min, 用 von Fery 细丝 (美国 Danmic 公司) 垂直刺激大鼠右侧后足掌心,



施加足够力度使纤维丝弯曲成 C 形或 S 形, 共进行 5 次, 其中至少 3 次大鼠出现突然抬足, 舔舐足底等回避动作记为阳性反应。由 2 g 开始, 若为阳性则使用低一级刺激力度, 若为阴性则继续增加力度, 最大测试力度为 15 g, 以此确定 MWT。

热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 测定: 将大鼠放置在玻璃板上, 罩上透明观察罩, 待大鼠适应安静后, 用热痛刺激仪 (上海欣软公司) 照射大鼠后足掌心, 记录从照射开始至大鼠出现抬腿、舔足等回避动作的时间。设定热源强度, 使基线潜伏期约 12 s。为避免组织损伤, 自动切断时间设为 20 s, 共测 3 次, 每次测试间隔 5 min, 平均值记为 TWL。

4. 蛋白免疫印迹分析

大鼠深度麻醉后立即处死, 冰上取出左右侧的前扣带回皮质组织, 将左侧和右侧前扣带回皮质分别装入离心管中做好标记并存放于干冰中, 并尽快转运至 -80°C 冰箱中待用。取大鼠左侧前扣带回皮质样品冰上充分研磨裂解, 4°C 离心取上清, BCA 法测定蛋白浓度。使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 并转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h 后, 加入兔源抗 YAP 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology), 鼠源抗 β -actin 抗体 (1:5000, Sigma), 置于摇床 4°C 过夜, TBST 洗膜 4 次, 室温孵育二抗 1 h, 洗膜后显影, Image J 分析条带灰度值。

5. 免疫荧光

大鼠 2% 戊巴比妥钠麻醉后, 经心脏灌注预冷 0.9% 氯化钠注射液, 肝脏变白后开始灌注 4% 多聚甲醛, 直到大鼠身体变僵硬。去除颅骨取全脑, 多聚甲醛浸泡 12~24 h, 蔗糖梯度脱水后石蜡包埋, 每个样本连续切片, 厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$, 切片脱蜡后梯度浓度酒精复水, 使用柠檬酸抗原修复液 ($\text{pH} = 6.0$) 高压修复, 5% 山羊血清配制 0.4% triton 溶液室温通透 30 min, 然后 5% 山羊血清室温封闭 30 min。加入一抗兔源抗 YAP 抗体 (1:100, Novus)、鼠源抗 NeuN 抗体 (1:200, Merck)、鼠源抗 Iba1 抗体 (1:800, Abcam)、鼠源抗 GFAP 抗体 (1:400, Cell Signaling Technology)。湿盒内 4°C 过夜孵育。复温 30 min 后 PBS 清洗, 每次 5 min, 共 4 遍。滴加相应的 Alexa Fluor 488 山羊抗鼠 (1:400, Servicebio), Cy3 山羊抗兔 (1:200, Servicebio) 二抗避光室温孵育 1 h, PBS 清洗 4 遍, 每遍 5 min。DAPI 染色后, 抗荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜 (德国蔡司公司) 下进行拍片。使用 ZEN 软件 (德国蔡司公司) 和 Image J 进行图

像处理和结果分析。核定位和双标免疫荧光定位使用 Image J 计数, 最终取平均值进行定量分析。

6. 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析, Graph-Pad Prism9.5 绘制统计图表, 计量资料以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。动物行为学采用重复测量方差分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 t 检验。Western Blotting 结果分析, Sham 组标化为 1, 其他组按比例计算灰度值。免疫荧光结果, 荧光强度分析使用 20 倍镜下图片进行统计分析, 共定位分析使用 40 倍镜下的细胞数进行分析。细胞占比分析使用卡方检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. CCI 模型建立后痛觉行为学变化

大鼠 CCI 模型建立后, 与 Sham 组比较, CCI 组术后 3、7 和 14 天右侧后足的机械痛阈降低, 热敏潜伏期缩短 ($P < 0.001$, 见图 1)。MWT、TWL 均随时间推移逐渐降低, 14 天时降至最低, 说明大鼠 NP 模型建立成功。

2. ACC 区域 YAP 在大鼠 NP 发展过程中的表达变化

免疫荧光结果显示, 与 Sham 组比较, 术后 3 天 CCI 组 YAP 表达量显著增加 ($P < 0.001$, 见图 2A, 2B)。Western Blotting 结果提示, CCI 术后 YAP 蛋白表达量增加, 于术后 3 天开始显著增加, 并维持至术后 14 天 ($P < 0.05$, 见图 2C, 2D)。

3. ACC 区域 YAP 细胞核定位情况

为了明确 CCI 后 ACC 区域 YAP 核表达量变化情况, 使用免疫荧光方法进行 YAP 核定位观察。与 Sham 组比较, CCI 组大鼠左侧 ACC 区域术后第 3 天 YAP 核表达量显著增加 ($P < 0.01$), 持续至术后第 14 天, 且在第 14 天时 YAP 核表达量最高 ($P < 0.001$, 见图 3)。

4. ACC 区域 YAP 与功能细胞共定位情况

为了明确 ACC 区域 YAP 是否在神经元和胶质细胞中表达, 通过双标免疫荧光观察术后 3 天 YAP 与神经元标志物神经元核抗原 (neuronal nuclei antigen, NeuN)、小胶质细胞标志物离子钙结合适配分子 1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1, Iba1)、星形胶质细胞标志物神经胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的共定位情况。结果显示, 两组大鼠 ACC 区域 YAP 与 NeuN、GFAP 和

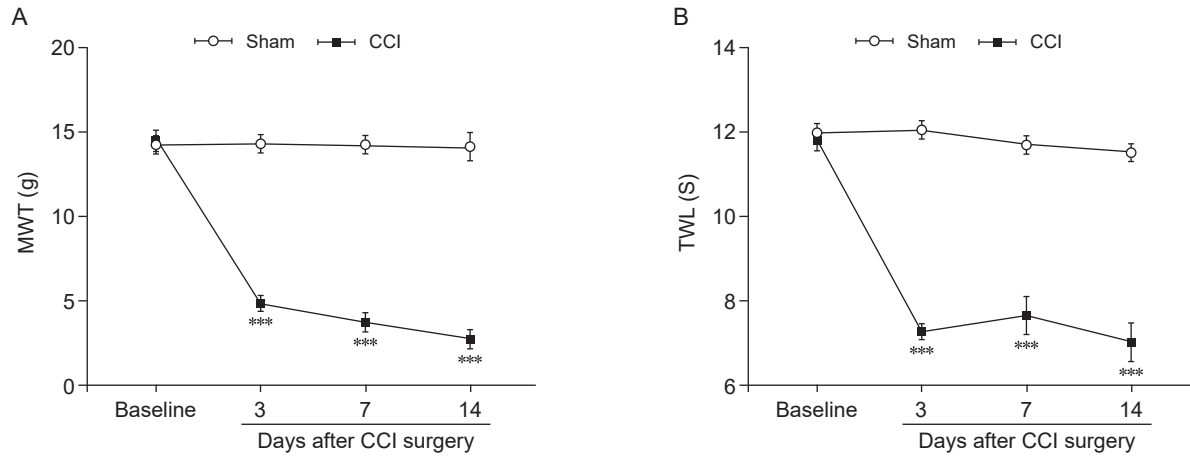


图 1 大鼠 CCI 术后痛觉行为学变化 ($n = 10$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 大鼠 CCI 术后右侧后足机械刺激缩足反射阈值显著降低; (B) 大鼠 CCI 术后右侧后足热缩足反射潜伏期显著缩短

*** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比

Fig. 1 Pain behavioral changes of rats after CCI ($n = 10$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) Mechanical withdrawal threshold was significant reduced after CCI in rats' right hindpaws; (B) Thermal withdrawal latency was significant reduced after CCI in rats' right hindpaws.

*** $P < 0.001$, compared with Sham group.

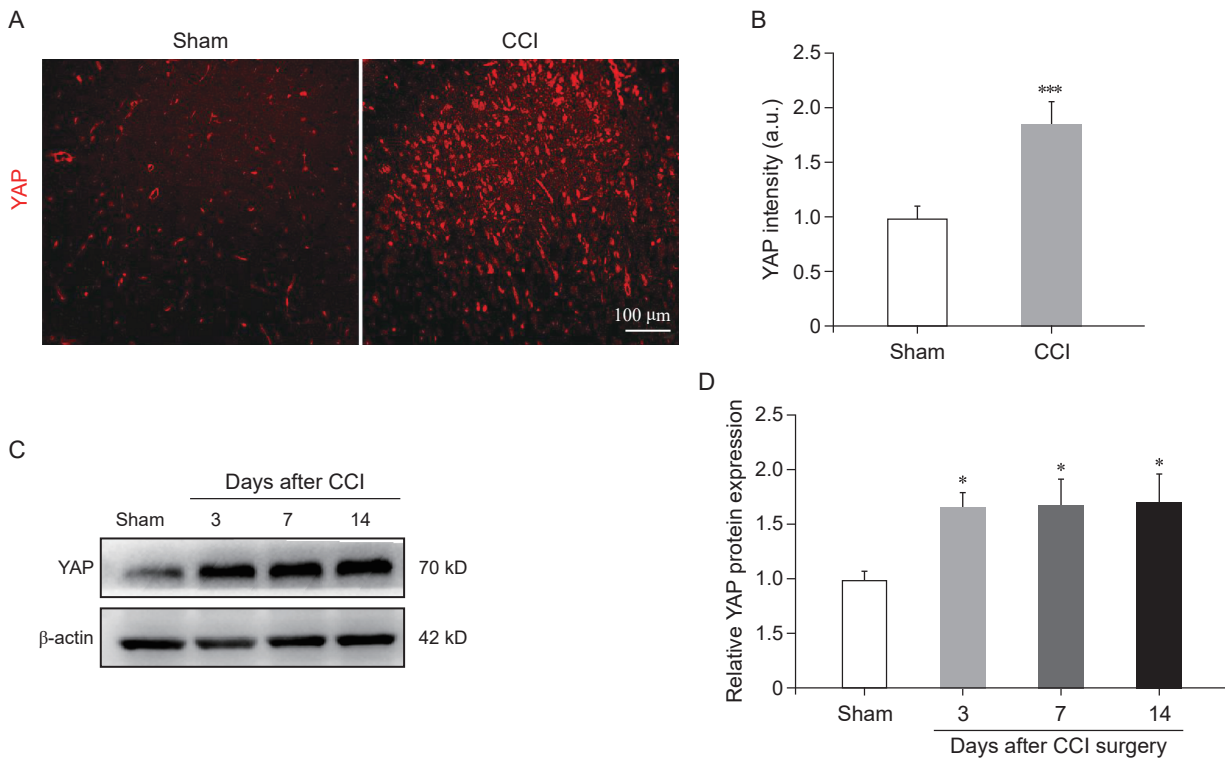


图 2 大鼠 CCI 术后左侧 ACC 区域 YAP 蛋白表达变化 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 免疫荧光显示 CCI 术后 3 天 YAP 表达变化情况; (B) YAP 的免疫荧光强度分析柱形图; (C) Western Blotting 显示不同时间点的 YAP 蛋白表达变化; (D) YAP 的蛋白定量分析柱形图

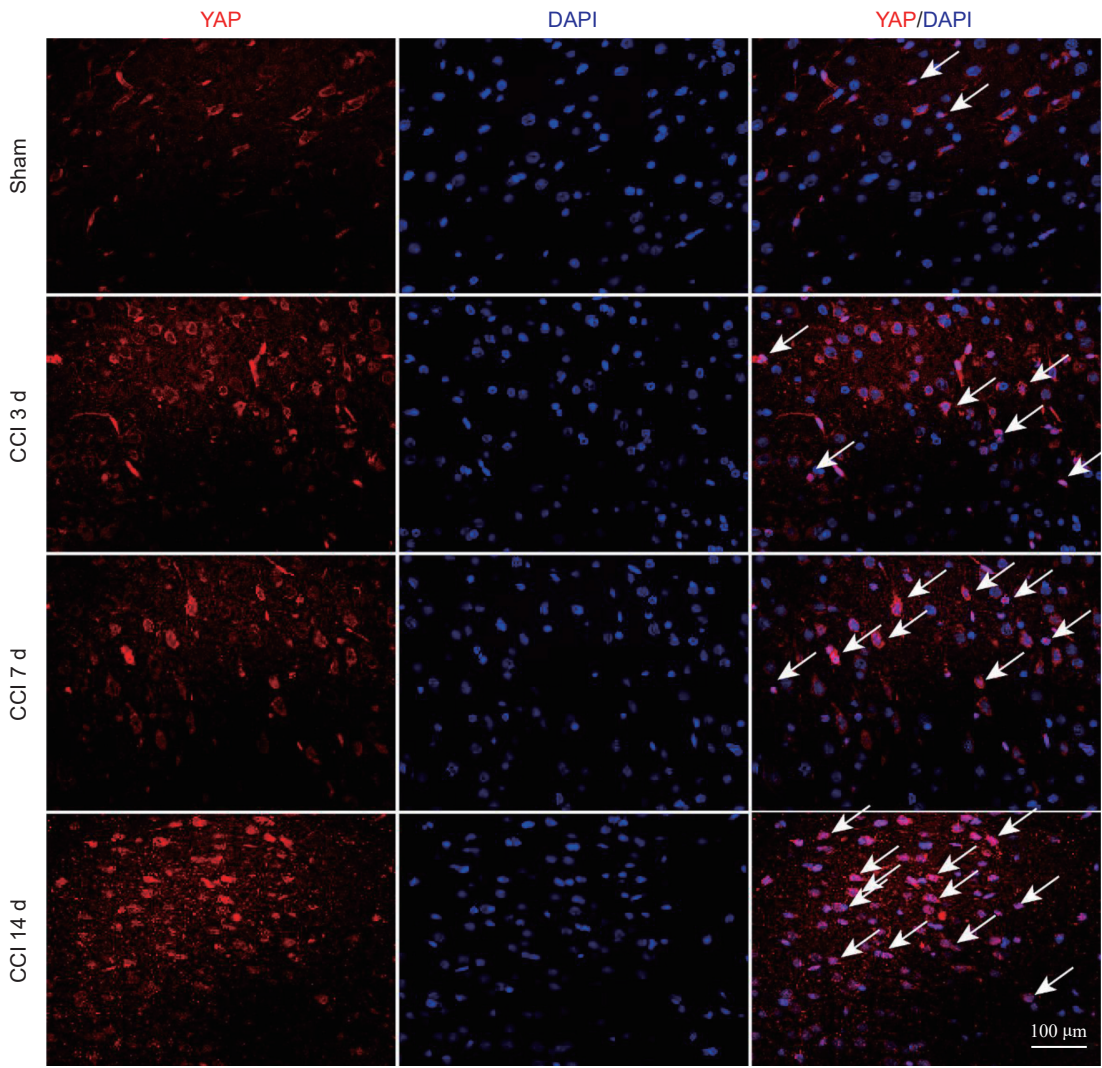
* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比

Fig. 2 Expression changes of YAP in the left ACC area after CCI ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) YAP expression changes 3 days after CCI by immunofluorescence; (B) Immunofluorescence intensity quantitative analysis of YAP; (C) YAP expression in different time course after CCI by Western Blotting; (D) Protein quantitative analysis of YAP.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with Sham group.

A



B

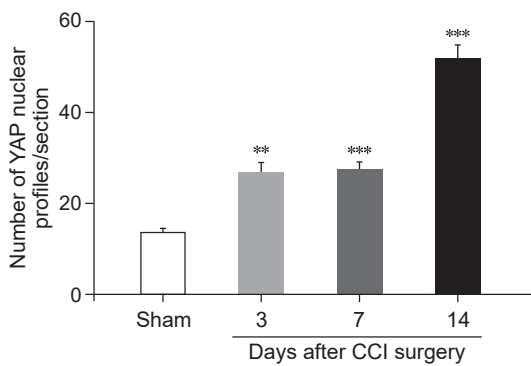


图 3 大鼠 CCI 术后左侧 ACC 区域 YAP 核表达情况 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$, 图中箭头所指)
(A) 免疫荧光显示不同时间点 YAP 核表达情况; (B) CCI 术后左侧 ACC 区域 YAP 核表达定量分析
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与 Sham 组相比

Fig. 3 Nuclear expression of YAP in the left ACC area after CCI ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$, white arrows indicate)
(A) The number of YAP-positive nuclear (DAPI) was increased in the left ACC area after CCI; (B) The quantitative analysis of YAP nuclear accumulation in the left ACC area after CCI.
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with Sham group.

Iba1 均有共定位(见图 4A, 4C, 4E)。与 Sham 组相比, CCI 组 YAP 与 NeuN、GFAP 的共定位数量显著增加 ($P < 0.001$, $P < 0.01$, 见图 4A-4D), 而 YAP 与 Iba1 的共定位数量无显著变化(见图 4F)。此外, 分别统计了两组中 YAP 与 NeuN、GFAP 和 Iba1 的共定位比例情况(共定位细胞数/视野下表达 YAP

的阳性细胞数), 见图 4G。结果发现, 与 Sham 组相比, CCI 组 YAP 与 NeuN 的共定位比例显著增加, 从 3.8% 增加至 35.7% ($P < 0.05$), CCI 组 YAP 与 GFAP 共定位比例有增加趋势, 但差异无统计学意义, CCI 组 YAP 与 Iba1 共定位比例降低, 从 23.1% 降至 11.9%, 但差异无统计学意义。

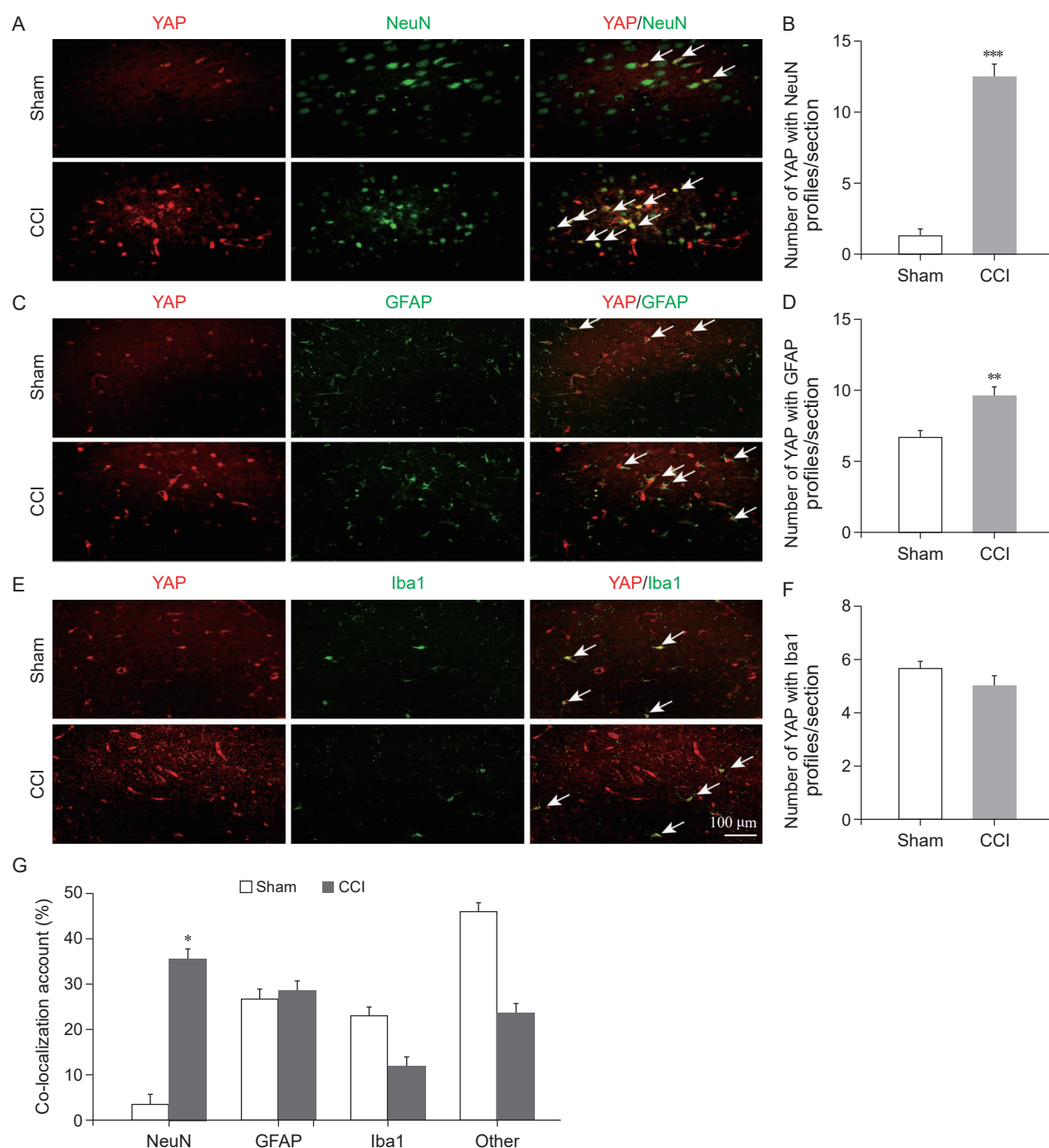


图 4 CCI 大鼠左侧 ACC 区域 YAP 与功能细胞共定位情况 ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$, 图中箭头所指)
 (A) 大鼠左侧 ACC 区域 YAP 与神经元标志物 NeuN 共定位; (B) 大鼠与 NeuN 共定位量化图; (C) 大鼠左侧 ACC 区域 YAP 与星形胶质细胞标志物 GFAP 共定位; (D) 大鼠与 GFAP 共定位量化图; (E) 大鼠左侧 ACC 区域 YAP 与小胶质细胞标志物 Iba1 共定位; (F) 大鼠与 Iba1 共定位量化图; (G) 大鼠左侧 ACC 区 YAP 与 NeuN、GFAP、Iba1 共定位占比柱形图

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组相比

Fig. 4 Co-localization of YAP with functional cells in the left ACC area after CCI ($n = 5$, $\bar{x} \pm SEM$, white arrows indicate)
 (A) Co-localization of YAP with NeuN in the left ACC area; (B) The quantitative analysis of Co-localization of YAP with NeuN; (C) Co-localization of YAP with GFAP in the left ACC area; (D) The quantitative analysis of Co-localization of YAP with GFAP; (E) Co-localization of YAP with Iba1 in the left ACC area; (F) The quantitative analysis of Co-localization of YAP with Iba1; (G) Histogram Showing the Co-localization Proportions of YAP with NeuN, GFAP, and Iba1 in the left ACC area of rats.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with Sham group.



讨 论

本研究发现大鼠右侧坐骨神经慢性压迫损伤术后, 右侧后足 MWT 和 TWL 从术后第 3 天开始显著降低, 并持续至术后 14 天, 说明慢性神经病理疼痛模型构建成功。进一步观察到 CCI 大鼠左侧 ACC 中: ① YAP 蛋白表达量于术后 3 天显著增加, 持续至 14 天; ② 术后第 3 天的 YAP 核聚集增多, 持续至术后第 14 天, 且在第 14 天时 YAP 核聚集量最高; ③ YAP 与神经元特异标志物 NeuN、星形胶质细胞特异标志物 GFAP, 以及小胶质细胞特异标志物 Iba1 均有共同表达, 且与 NeuN、GFAP 的共表达数量在 CCI 术后也明显增加。本研究结果初步说明, 周围神经损伤后 YAP 可能在大鼠对侧 ACC 区域神经元、星形胶质细胞中细胞核内转移增加, 参与了大鼠 NP 的发生与发展。为进一步研究 Hippo 信号通路下游元件 YAP 在 NP 发病过程中机制研究奠定基础。

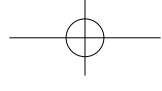
YAP 是 Hippo 信号通路下游调节蛋白, 在哺乳动物神经形成中正性调节细胞增殖, 负性调节细胞分化^[20]。当 Hippo 信号通路被激活, YAP 磷酸化, 停留于细胞质中不发挥生物学效应, 反之则进入细胞核激活转录过程^[15]。在最近研究中, YAP 被证明在促进疾病发展中发挥着重要作用, 例如通过调节 M1/M2 巨噬细胞极化和肠道微生物平衡加剧炎症性肠病^[21], 增强促炎细胞因子的产生并促进非酒精性脂肪性肝炎的发展^[22]。然而, YAP 在疼痛中的研究尚处于起步阶段, 本课题组前期的研究已经证实周围神经损伤后 YAP 存在时间和空间上的表达变化, 并且 YAP 主要在 CGRP 和 IB4 免疫反应阳性的初级传入神经末梢表达, 可能主要与脊髓背角伤害性传递的调节有关^[17]。在此基础上, 其他学者进一步的研究证明, 周围神经损伤后脊髓背角的 YAP 核聚集增多, 并通过鞘内注射抑制剂等实验证实了 YAP 核积累对于疼痛的发展是充分必要的^[18]。另一项研究表明, 脊髓 β -淀粉样蛋白 1-42 (amyloid beta 1-42, A β 1-42) 可能通过抑制 YAP/TAZ 核积累发挥内源性镇痛作用^[23]。为了证实 ACC 区域 YAP 是否也像在脊髓水平的 YAP 一样在 NP 中发挥重要作用, 本研究在周围神经损伤后通过对 CCI 术后不同时间点大鼠取材进行 WB 和免疫荧光检测, 结果发现周围神经损伤可增加大鼠对侧 ACC 区域 YAP 的蛋白表达, 说明 ACC 区域的 YAP 在疼痛发生发展过程中被激活, 这与本课题组既往在脊髓背角观察到的结果一致^[17], 表明 YAP 不同时间的变化可能在 NP 的

展过程中发挥着重要作用。为了探究 ACC 区域的 YAP 是否同样存在空间特异性变化, 使用免疫荧光对大鼠对侧 ACC 区域在疾病发展不同阶段进行检测, 结果也证实了周围神经损伤后 YAP 的核积累增加, 于 CCI 术后 14 天核表达量最高, 说明该区域的 YAP 也可能通过空间变化参与了 NP 的发展过程, 并且可能在其中发挥着重要作用。

在 ACC 这种调节疼痛的关键脑区, 神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞都已被证明参与了 NP 的发生与发展, 并且胶质细胞与神经元之间可通过互相调节参与疼痛^[24-28]。ACC 区兴奋性神经元与抑制性神经元之间的不平衡是诱发疼痛的重要原因^[29,30]。为阐明 YAP 在 ACC 区域不同细胞中发挥作用的具体机制打下基础, 本研究进一步观察了 YAP 与神经元和胶质细胞的共定位情况。双标免疫荧光结果提示周围神经损伤后 ACC 区域 YAP 与 NeuN 存在共定位, 并且与 Sham 组相比, CCI 术后与 NeuN 共定位数量和占比显著增加, 说明 CCI 术后 YAP 核表达增多, 且 YAP 核表达增多主要发生在神经元细胞中, 从而表现出共定位数量与占比均显著增加, 提示周围神经损伤后 ACC 区域 YAP 激活发挥生物学效应的关键细胞可能是神经元。但 YAP 是如何调节神经元在 NP 发病过程中的功能? 以及究竟是通过兴奋性还是抑制性神经元发挥生物学功能? 还需进一步深入研究。

YAP 还被证实与星形胶质细胞之间存在密切联系, YAP 可以促进星形胶质细胞的分化与成熟^[31], 可通过影响星形胶质细胞驱动的小胶质细胞激活, 进而调控神经炎症^[32], 并且脊髓损伤后也可通过调节 YAP 缓解星形胶质细胞介导的神经炎症反应, 如降低白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 的表达^[33]。本研究双标免疫荧光的结果提示, 与 Sham 组相比, CCI 后 YAP 与 GFAP 共定位数量显著增加, 但占比差异无统计学意义, 说明周围神经损伤后, ACC 区域 YAP 核表达量增加与其在星形胶质细胞中核表达量增加成正比, 因此表现出共定位数量增加而比例无变化的情况。这说明 YAP 同样可能在星形胶质细胞中发挥生物学活性, 从而参与疼痛的调控。

周围神经损伤后 ACC 区域 YAP 与 Iba1 共表达, 但 CCI 后并未观察到它们共定位数量发生显著变化, 反而共定位比例降低了, 尽管差异无统计学意义。说明周围神经损伤后 YAP 在 ACC 区域小胶质细胞中核表达量无显著增加, 但并不能说明 YAP 在小胶质细胞中不发挥作用。因为本研究仅应用了



双标免疫荧光半定量方法检测 YAP 在 ACC 区域不同细胞中表达量的情况, 并未观察这些细胞的形态变化, 尚不能依据现有结果下定论。仍需要进一步研究阐明 YAP 是否通过影响小胶质细胞形态变化, 从而参与疼痛的发生与发展。

本研究观察到周围神经损伤后 YAP 在 ACC 区域核表达量显著增加, 且主要在神经元和星形胶质细胞中增加, 以神经元增加更为显著, 这为 YAP 在神经元和星形胶质细胞中发挥作用奠定基础。总之, ACC 区域 YAP 与神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞共定位, 且在神经元和星形胶质细胞中核表达量显著增加, 说明 YAP 可能是一种参与调控 NP 的关键元件, 为其具体发挥作用的机制研究奠定了基础。

本研究存在的局限性: 仅观察到周围神经损伤后 ACC 区域 YAP 的时间和空间变化情况, 以及 YAP 与功能细胞的共定位情况, 未进一步探求其参与 NP 的具体机制。此外, 虽然观察到了 YAP 的核表达增多以及与 NeuN、GFAP 的共定位数目和比例增加, 但均仅限于免疫荧光的半定量分析, 未观察细胞形态变化情况, 并不能准确说明问题。将来可以使用更准确方法进行探索, 例如通过单细胞测序来明确 ACC 区域不同细胞类型基因表达差异。后续将基于这些发现, 进一步深入研究 YAP 在大鼠 ACC 区域参与 NP 调控的具体机制。

综上所述, 大鼠周围神经损伤可使对侧 ACC 的 YAP 核蛋白表达量升高, 核聚集数量增多。提示 ACC 区域 YAP 可能在神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞中被激活, 转移入细胞核中发挥生物学活性, 从而参与 NP 的发病过程, 为下一步研究具体机制奠定基础。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment[J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(1):259-301.
- [2] Van Hecke O, Austin SK, Khan RA, *et al*. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies[J]. *Pain*, 2014, 155(4):654-662.
- [3] Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management[J]. *Lancet*, 1999, 353(9168):1959-1964.
- [4] Attal N, Lanteri-Minet M, Laurent B, *et al*. The specific disease burden of neuropathic pain: results of a French nationwide survey[J]. *Pain*, 2011, 152(12):2836-2843.
- [5] Doth AH, Hansson PT, Jensen MP, *et al*. The burden of neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis of health utilities[J]. *Pain*, 2010, 149(2):338-344.
- [6] Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms[J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(9):924-935.
- [7] 王锦琰, 罗非, 韩济生. 前扣带回在痛感知中的作用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2004, 10(2):113-116.
- [8] Jensen KB, Regenbogen C, Ohse MC, *et al*. Brain activations during pain: a neuroimaging meta-analysis of patients with pain and healthy controls[J]. *Pain*, 2016, 157(6):1279-1286.
- [9] Tan LL, Kuner R. Neocortical circuits in pain and pain relief[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2021, 22(8):458-471.
- [10] Chen T, Taniguchi W, Chen QY, *et al*. Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):1886-1903.
- [11] Kang SJ, Kwak C, Lee J, *et al*. Bidirectional modulation of hyperalgesia via the specific control of excitatory and inhibitory neuronal activity in the ACC[J]. *Mol Brain*, 2015, 8(1):81-92.
- [12] Sellmeijer J, Mathis V, Hugel S, *et al*. Hyperactivity of anterior cingulate cortex areas 24a/24b drives chronic pain-induced anxiodepressive-like consequences[J]. *J Neurosci*, 2018, 38(12):3102-3115.
- [13] Juarez-Salinas DL, Braz JM, Etlin A, *et al*. GABAergic cell transplants in the anterior cingulate cortex reduce neuropathic pain aversiveness[J]. *Brain*, 2019, 142(9):2655-2669.
- [14] Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(1):63-79.
- [15] Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(1):1-17.
- [16] Huang J, Wu S, Barrera J, *et al*. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP[J]. *Cell*, 2005, 122(3):421-434.
- [17] Li N, Lim G, Chen L, *et al*. Spinal expression of Hippo signaling components YAP and TAZ following peripheral nerve injury in rats[J]. *Brain Res*, 2013, 1535:137-147.
- [18] Xu N, Wu MZ, Deng XT, *et al*. Inhibition of YAP/TAZ activity in spinal cord suppresses neuropathic pain[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(39):10128-10140.
- [19] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. *Pain*, 1988, 33(1):87-107.
- [20] Zhang H, Deo M, Thompson RC, *et al*. Negative regulation of YAP during neuronal differentiation[J]. *Dev Biol*, 2012, 361(1):103-115.
- [21] Zhou X, Li WY, Wang S, *et al*. YAP aggravates inflam-



- matory bowel disease by regulating M1/M2 macrophage polarization and gut microbial homeostasis[J]. *Cell Rep*, 2019, 27(4):1176-1189.e5.
- [22] Song K, Kwon H, Han C, *et al*. Yes-associated protein in kupffer cells enhances the production of proinflammatory cytokines and promotes the development of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology*, 2020, 72(1):72-87.
- [23] Cui D, Li ZH, Li C, *et al*. Spinal beta-amyloid1-42 acts as an endogenous analgesic peptide in CCI-induced neuropathic pain[J]. *Eur J Pain*, 2022, 26(1):133-142.
- [24] Lee J A, Chen Q, Zhuo M. Synaptic plasticity in the pain-related cingulate and insular cortex[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(11):1-19.
- [25] Iqbal Z, Lei Z, Ramkrishnan AS, *et al*. Adrenergic signalling to astrocytes in anterior cingulate cortex contributes to pain-related aversive memory in rats[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1):10-29.
- [26] Long DD, Zhang YZ, Liu A, *et al*. Microglia sustain anterior cingulate cortex neuronal hyperactivity in nicotine-induced pain[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1):81-97.
- [27] 岳亮, 熊源长. 神经胶质细胞在神经病理性疼痛和抑郁共病中的作用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30(6):407-412.
- [28] 王雨岩, 孙铭声, 刘路, 等. 从“神经胶质细胞-神经元”互动角度探讨慢性疼痛的发生与维持机制 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30(7):522-528.
- [29] Blom SM, Pfister JP, Santello M, *et al*. Nerve injury-induced neuropathic pain causes disinhibition of the anterior cingulate cortex[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(17):5754-5764.
- [30] Duan Y, Li Q, Zhou Y, *et al*. Activation of the TNF- α -necroptosis pathway in parvalbumin-expressing interneurons of the anterior cingulate cortex contributes to neuropathic pain[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20):1-19.
- [31] Ai LQ, Zhu JY, Chen X, *et al*. Endothelial yes-associated protein 1 promotes astrocyte proliferation and maturation via cytoplasmic leukemia inhibitory factor secretion in oxygen-induced retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2020, 61(4):1-11.
- [32] Huang Z, Wang Y, Hu G, *et al*. YAP is a critical inducer of SOCS3, preventing reactive Astroglia[J]. *Cereb Cortex*, 2016, 26(5):2299-2310.
- [33] Zhang W, Jia M, Lian J, *et al*. Inhibition of TANK-binding kinase1 attenuates the astrocyte-mediated neuroinflammatory response through YAP signaling after spinal cord injury[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(8):2206-2222.

• 消 息 •

2025 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管，北京大学和中华医学会疼痛学会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛学科领域基础研究和临床诊疗具有原创性和前沿性重要研究成果的综合性学术刊物。现收录于中文核心期刊（北京大学图书馆）、中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库 (CSCD) 来源期刊、世界期刊影响力指数 (WJCI) 报告、中国科协“高质量科技期刊分级目录”等数据库。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

投稿：来稿可在杂志官网在线投稿 <http://casp.ijournals.cn>，请署真实姓名、工作单位、职称，附单位介绍信（信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容）。投稿时请注明通信作者、提供伦理审查批号及证明、基金资助信息，以及详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

订购：邮发代号：82-832，本刊为月刊，大 16 开本，80 页，每册定价 32.00 元，全年 12 期，共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或联系编辑部订阅。

编辑部地址：北京市海淀区学院路 38 号，《中国疼痛医学杂志》编辑部

杂志官网：<http://casp.ijournals.cn>

联系电话：010-82801712；010-82801705

电子邮箱：pain1712@126.com

联系人：赵磊

