

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.06.004

• 论 著 •

星形胶质细胞 Kir4.1 在慢性偏头痛小鼠三叉神经脊束核尾部的表达及作用

苏文婕^{1,2} 肖少波³ 张秀芬^{1,2} 袁慧洁^{1,2} 高 男^{1,4} 郭星豪^{1,2} 于生元¹ 刘若卓^{1△}⁽¹⁾ 中国人民解放军总医院第一医学中心神经内科医学部, 北京 100853; ⁽²⁾ 解放军医学院, 北京 100853; ⁽³⁾ 中国人民解放军联勤保障部队第 920 医院儿科, 昆明 650100; ⁽⁴⁾ 南开大学医学院, 天津 300071)

摘 要 目的: 观察星形胶质细胞内向整流钾通道 4.1 (inwardly rectifying potassium channel 4.1, Kir4.1) 在慢性偏头痛 (chronic migraine, CM) 模型小鼠三叉神经脊束核尾部 (trigeminal nucleus caudalis, TNC) 的表达变化, 并探讨其在 CM 中的作用。**方法:** C57BL6/J 雄性小鼠按随机数字表法分为生理盐水空白对照 (CON) 组、慢性偏头痛 (CM) 组和频发慢性偏头痛 (frequent chronic migraine, FCM) 组, 每组 15 只。通过反复注射硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 建立 CM 小鼠模型 (隔日注射 NTG) 和 FCM 小鼠模型 (每日注射 NTG); 繁育后获得的 72 只 Aldh1/1-CreERT2 雄性小鼠靶向 TNC 脑区过表达或敲低星形胶质细胞 Kir4.1 后, 反复注射 NTG 建立 CM 小鼠模型, von Frey 纤维丝评估基础痛阈, 包括 50% 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, 50% MWT) 和眶周机械痛阈 (head withdrawal threshold, HWT)。通过使用免疫荧光实验检测降钙素基因相关肽 (calcitonin gene-related peptide, CGRP)、c-Fos 蛋白和 Kir4.1 的表达。**结果:** 与 CON 组相比, FCM 组与 CM 组模型小鼠痛觉阈值显著降低, TNC 脑区 Kir4.1 表达下降, CGRP 和 c-Fos 表达增加。过表达 Kir4.1 小鼠 TNC 脑区的 CGRP 蛋白表达显著减少且 MWT 和 HWT 明显增高, 敲低 Kir4.1 组小鼠则相反。**结论:** TNC 区星形胶质细胞 Kir4.1 可能参与 CM 发生发展的病理生理过程。**关键词** 慢性偏头痛; Kir4.1; 中枢敏化; 三叉神经脊束核尾部; 星形胶质细胞

The role of astrocytic Kir4.1 in trigeminal nucleus caudalis of mice with chronic migraineSU Wen-jie^{1,2}, XIAO Shao-bo³, ZHANG Xiu-fen^{1,2}, YI Hui-jie^{1,2}, GAO Nan^{1,4}, GUO Xing-hao^{1,2}, YU Sheng-yuan¹, LIU Ruozhuo^{1△}⁽¹⁾ Department of Neurology, The First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ⁽²⁾ Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China; ⁽³⁾ Department of Pediatrics, 920th Hospital of Joint Logistics Support Force of People's Liberation Army of China, Kunming 650100, China; ⁽⁴⁾ School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Objective: To observe the expression changes of inwardly rectifying potassium channel 4.1 (Kir4.1) in the trigeminal nucleus caudalis (TNC) of chronic migraine (CM) mouse models and explored its role in CM. **Methods:** Male C57BL6/J mice were randomly assigned using a random number table to the three groups: Saline control (CON) group, CM group, and frequent chronic migraine (FCM) group ($n = 15$ per group). CM models (injection of NTG on alternate days) and FCM models (injection of NTG daily) were established via repeated nitroglycerin (NTG) injections. In Aldh1/1-CreERT2 male mice obtained after breeding with astrocytic Kir4.1 overexpression or knockdown in the TNC, repetitive NTG injections were administered to establish the CM mice model, with baseline pain thresholds assessed by 50% mechanical withdrawal threshold (50% MWT) and periorbital head withdrawal threshold (HWT). The expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP), c-Fos, and Kir4.1 was detected via immunofluorescence. **Results:** Compared to CON group, FCM and CM mice

[△] 通信作者 刘若卓 liuruozhuo301@163.com



showed lower pain thresholds and increased CGRP and c-Fos expression in the TNC, along with reduced Kir4.1 levels. Kir4.1 overexpression decreased CGRP expression in the TNC and the 50% MWT and HWT was significantly increased, while Kir4.1-knockdown group has the opposite effect. **Conclusion:** Astroglial Kir4.1 in the TNC may be involved in the pathophysiology of chronic migraine.

Keywords chronic migraine; Kir4.1; central sensitization; trigeminal nucleus caudalis; astrocytes

偏头痛是一种常见的慢性神经血管性脑部疾病，是世界上较为普遍且具有较高致残性的神经系统疾病之一^[1]，其典型特征是反复发作的严重头痛、恶心、呕吐、畏光、畏声以及其他不同的身体、精神和心理体征和症状，持续4~72小时，往往使人失能^[2]。偏头痛的经济和社会影响是巨大的，严重影响病人的生活质量并损害工作、社交活动和家庭生活^[1-4]。抗偏头痛药物的疗效和耐受性成效有限，其中最主要的原因在于偏头痛复杂的多因素发病机制^[5]。

目前慢性偏头痛 (chronic migraine, CM) 的病理生理发生机制尚不完全清楚，其中三叉神经血管系统、中枢敏化和神经源性炎症等在 CM 的演变机制中可能起着重要作用^[6-9]。中枢敏化主要表现为三叉神经血管系统二级神经元三叉神经脊束核尾部 (trigeminal nucleus caudalis, TNC) 和三级神经元 (丘脑) 的感觉神经元兴奋性和突触可塑性增加^[2]，其中星形胶质细胞参与从急性疼痛到慢性疼痛的转变以及慢性疼痛的维持^[10]。

星形胶质细胞是脑内最丰富的神经胶质细胞，对维持正常的脑功能至关重要^[11]，与脑部疾病的发病机制和治疗密切相关。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 被认为是星形胶质细胞激活的重要生物标志物^[12]。星形胶质细胞的周围突起与突触前神经末梢、神经元的突触后膜组成“三联突触”^[13]，这对于维持离子和水的稳态、分泌一系列神经活性物质调节神经元的兴奋性十分重要^[14]。关于离子通道在偏头痛发病机制中的重要性，过去几十年里引起了科研人员和相关领域学者的关注^[15]。由Kcnj10编码的内向整流钾通道4.1 (inwardly rectifying potassium channel 4.1, Kir4.1) 在脑星形胶质细胞中高度表达，介导星形胶质细胞的空间K⁺缓冲作用^[16,17]。Kir4.1的激活通过降低细胞外K⁺和谷氨酸来降低神经元的兴奋性，并减弱脑源性神经营养因子的表达^[11]。既往也有研究表明，星形胶质细胞 Kir4.1 的条件敲除抑制了星形胶质细胞关键的功能，包括细胞外K⁺缓冲和谷氨酸再摄取，导致细胞兴奋性增加和突触增强^[18]，因此，多项研究表明 Kir4.1 的功能丧失或表达降低与多种神经退行性疾病有关，包括抑郁障碍^[19,20]、癫痫^[21]、帕金森病

和神经病理性疼痛^[22]等。

本研究主要探索星形胶质细胞 Kir4.1 在 CM 小鼠 TNC 的表达及作用。在急性偏头痛向慢性偏头痛的转归过程中，可能存在 TNC 星形胶质细胞 Kir4.1 表达的减少，能够导致星形胶质细胞激活，从而导致 CM 模型小鼠出现中枢敏化。本研究将为 CM 中枢敏化机制提供新的理论基础，为 CM 的未来有效治疗寻找新的靶点。

方 法

1. 实验材料

实验动物：SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 45 只、SPF 雌性 C57BL/6J 小鼠 6 只，8~9 周龄，购自北京斯贝福生物技术有限公司；Aldh1/1-CreERT2 小鼠 (简称 cre 小鼠，品系背景：C57BL/6J，传代方案：阳性与野生型互配)，由 Cyagen 公司提供成年雄性与雌性 (均处于最佳生育期) 小鼠各 2 只，自行繁育后获得 8~9 周龄 cre 雄性小鼠 72 只。所有小鼠饲养在环境温度 22~24℃，湿度 45%~60%，12 h 光/暗循环的环境中，保证小鼠能够自由摄取食物和水，且提供 1 周的适应期后用于实验。本研究已获得中国人民解放军总医院动物保护与使用委员会的审核，并严格遵循《实验动物管理条例》的相关规定。

主要仪器及耗材：von Frey 纤毛机械刺激针套件 (Aesthesio)；冰冻切片机 (CM1950, Leica)；3DHISTECH (DX12, 斯瑞缔)；Thermal Cycler (2720, applied biosystems)；10 μl 微量注射器 (7653-01, 汉密尔顿)；水平校准调节器 (69131, 瑞沃德)；垂直层流洁净工作台 (HCB-1300V, Haier)；Gel Image System (TANON-1600, Tanon)；电泳仪 (DYY-6C 型，北京六一)。

主要试剂：硝酸甘油 (规格：10 mg/支，北京益民药业有限公司，产品编号：H11020289)；2,2,2-三溴乙醇 (Sigma-Aldrich，产品编号：T48402)；2-甲基-2-丁醇 (Sigma-Aldrich，产品编号：152463)；多聚甲醛 (阳光英锐，产品编号：C200101)；兔源 CGRP (Cell Signaling Technology，产品编号：#14959)；兔源 Kir4.1 (Alomone Labs，产品编号：

APC-035)；兔源 c-Fos (Cell Signaling Technology, 产品编号: 2250T)；鼠源 GFAP 抗体 (Cell-SignalingTechnology, 产品编号: 3670S)；Alexa Fluor 594 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (Abcam, 产品编号: ab150080)；Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (Abcam, 产品编号: ab150077)；Alexa Fluor 594 标记山羊抗鼠 IgG 二抗 (Abcam, 产品编号: ab150128)；快速封闭液 (免洗) (阳光英锐, 产品编号: C200501)；蛋白质印迹检测试剂盒 (Vazyme, SuperFemto ECL Chemiluminescence Kit, E423-02)；山羊抗兔 IgG (HRP) (Abcam, 产品编号: Ab672)；一步法鼠基因型鉴定试剂盒 (诺唯赞, 产品编号: PD-101-01)；他莫昔芬 (Sigma-Aldrich, 产品编号: T5648)；rAAV-GfaABC1D-DIO-mkcj 10-P2A-EGFP (Brain Case); rAAV-GfaABC1D-DIO-EGFP (Brain Case); rAAV-GfaABCID-DIO-EGFP-5'miR-30a-shRNA(mkcj10)-3'miR-30a-WPREs (Brain Case); rAAV-GfaABCID-DIO-EGFP-5'miR-30a-shRNA (Scramble)-3'miR-30a-WPREs (Brain Case)。

2. 实验方法

(1) CM 小鼠模型的建立及实验设计

实验一：使用国际公认的 CM 动物模型，即反复隔日腹腔注射硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 建立 CM 小鼠模型^[23]，称为慢性偏头痛组 (chronic migraine group, CM)；由于注射生理盐水 (normal saline, NS) 和 NTG 溶剂 (6% 丙二醇、6% 乙醇和 NS) 的小鼠之间未观察到机械阈值的显著差异^[23]，本实验使用小鼠腹腔注射 NS 建立空白对照组 (control group, CON)；为了更加明确观察到小鼠模型的相关目的蛋白表达量的差异，本实验中增加频发慢性偏头痛组 (frequent chronic migraine group, FCM)，

即反复每日腹腔注射 NTG 建立 FCM 小鼠模型。具体操作：将 NTG (5 mg/ml) 用 NS 将其浓度稀释至 1 mg/ml，并将 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组 ($n = 9$)，所有实验药物均以 10 ml/kg 的体积给药。CM 组和 CON 组每隔 1 日接受 1 次 NTG 或等量的 NS 注射，实验共 9 天注射 5 次 (第 1、3、5、7、9 天进行 NTG 或 NS 腹腔注射)；FCM 组小鼠每日进行 NTG 腹腔注射，共 9 天；三组小鼠分别在实验第 1、3、5、7、9 天注射 NTG 或 NS 前 30 min 检测机械痛阈，于第 9 天腹腔注射药物后的 2 h 处死各组小鼠，并根据后续实验需求分别使用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffer solution, PBS) 或 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 进行灌注后分离出 TNC 组织用于下一步实验。造模流程见图 1。

实验二：CM 及 CON 小鼠模型建立方法同实验一。具体操作：向使用他莫昔芬 (tamoxifen, TAM) 腹腔注射后的 cre 小鼠 TNC 脑区注射过表达 Kir4.1 腺相关病毒及其载体 (见图 2A)，分别建立过表达 Kir4.1 组及其对照组，病毒表达 3 周后的上述两组小鼠通过反复腹腔注射 NTG 或 NS 分为 4 组 ($n = 9$)：过表达 Kir4.1 + 慢性偏头痛组 (Hkir4.1 + CM)、过表达 Kir4.1 + 空白对照组 (Hkir4.1 + CON)、过表达 Kir4.1 对照组 + 慢性偏头痛组 (Hkir4.1CON + CM)、过表达 Kir4.1 对照组 + 空白对照组 (Hkir4.1 CON + CON)，见图 2B。同样地，向使用 TAM 腹腔注射后的 cre 小鼠 TNC 脑区注射敲低 Kir4.1 腺相关病毒及其载体分别建立敲低 Kir4.1 组及其对照组，病毒表达 3 周后的上述两组小鼠通过反复腹腔注射 NTG 或 NS 分为 4 组 ($n = 9$)：敲低 Kir4.1 + 慢性偏头痛组 (Lkir4.1 + CM)、敲低 Kir4.1 + 空白对照组 (Lkir4.1 + CON)、敲低 Kir4.1 对照组 + 慢性偏头

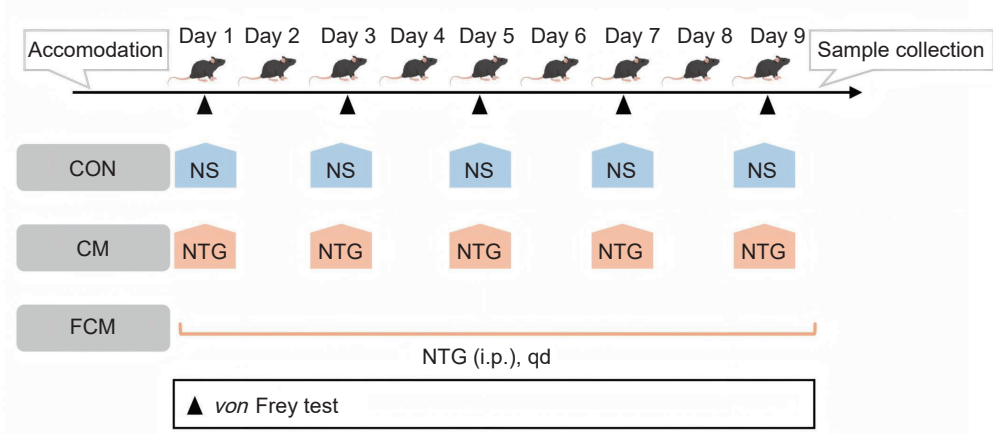


图 1 实验流程图
Fig. 1 Flow chart of the experimental outline



痛组 (Lkir4.1CON + CM)、敲低 Kir4.1 对照组 + 空白对照组 (Lkir4.1CON + CON), 见图 2C。各组小鼠分别在实验第 1、3、5、7、9 天注射 NTG 或 NS 前 30 min 检测机械痛阈, 于第 9 天腹腔注射药物后的 2 h 处死各组小鼠并使用 PFA 进行灌注后分离出 TNC 组织用于下一步实验。

(2) 痛阈检测: 使用 von Frey 纤维丝测量小鼠 50% 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, 50% MWT) 及眶周机械痛阈 (head withdrawal threshold, HWT), 具体方法为使用从 0.008 g 至 2 g 的纤维丝在每次给药之前, 使用上下法 (up-down) 评估小鼠的 50% MWT 及 HWT 阈值, 并同时记录下反应模式和最终 von Frey 纤维丝重量之后, 使用 https://bioapps.shinyapps.io/von_frey_app/ 上的算法计算机械阈值。每次检测前均需在检测装置上预适应 30 min, 且每次正式实验前均需提前连续适应痛阈检测过程 3 天。检测 MWT 时, 小鼠被放置在一个金属网格高架上的透明罩中, von Frey 纤维丝垂直于后爪底 (所有小鼠固定一侧) 表面并停留 5 s 以上, 若在刺激期间或刺激移除后表现出迅速的小鼠缩爪、颤动、抬起或舔舐, 计为 X, 否则为 O。检测 HWT 时, 小鼠被放置在一个直径为 5 cm、高 30 cm 的小圆盘上, von Frey 纤维丝垂直于小鼠同一侧下眼睑到面部中线区域并停留 5 s 以上, 若小鼠用同侧爪有力地搔抓脸部或缩头躲避刺激, 计为 X, 否则为 O。每次测试时间固定在每日同一时间点 (即 8:00 至 18:00)。

(3) 样本采集: 使用 1.25% 阿氟汀腹腔注射麻醉小鼠, 酒精消毒后暴露出心脏, 剪破右心耳后灌注 4% PFA。灌注速度先快后慢, 直到观察到流出的液体变澄清, 且肝脏完全失血, 随后将小鼠断颈, 剥离脑组织, 将其转移到含有 15% 和 30% 蔗糖溶液中进行梯度脱水。组织沉底后使用包埋剂进行包埋以备后续分析。

(4) 立体定向腺相关病毒注射: Aldh1/1-CreERT2 小鼠是利用转基因技术构建, 可以在大部分星形胶质细胞中观察到 cre 酶活性的表达, 只有在 cre 酶存在的情况下, AVV-DIO 系统才能切除 STOP 序列来发挥过表达目的基因 mkenj10 的作用从而可以调控 Kir4.1 的表达。使用立体定位仪靶向 TNC 脑区注射 rAAV-GfaABCID-DIO-mkenj10-P2A-EGFP 和其载体 rAAV-GfaABCID-DIO-EGFP, 分为过表达 Kir4.1 组及其对照组, rAAV-GfaABCID-DIO-EGFP-5'miR-30a-shRNA(mkenj10)-3'miR-30a-WPRES 和其载体 rAAV-GfaABCID-DIO-EGFP-5'miR-30a-shRNA(Scramble)-3'miR-30a-WPRES, 分为敲低

Kir4.1 组及其对照组。

首先使用 1.25% 阿氟汀腹腔注射麻醉小鼠, 之后准备异氟烷小鼠面罩维持一定浓度确保小鼠一直处于麻醉状态; 将小鼠头部固定在立体定位仪上并保证操作过程中不移位, 头部酒精消毒后切开头皮, 找到 bregma 后调零; 参照既往研究及预实验, 坐标为 AP -6.15 mm, ML $\pm$ 1.60 mm, DV 5.10 mm (向操作者倾斜 18°), 在坐标所在确定的颅骨注射点上使用微型电钻打孔, 使用 10 μ l 微量注射器, 将目标病毒或其空载病毒缓慢注入到打孔处, 注射速度为 30 nl/min, 在注射完成后, 停留 10 min, 缓慢抽出微量注射器, 将小鼠放置在 37℃ 保温及安静的环境中, 期间为小鼠提供正常生理需要的条件, 密切观察小鼠的生理状态。

(5) cre 阳性小鼠的构建与检测: Aldh1/1-CreERT2 小鼠与 C57BL/6J 小鼠合笼 (雄: 雌 = 1:2) 生下的小鼠, 在其出生后 7~12 天时按序剪掉鼠爪趾尖组织 (< 5 mm) 进行编号及鉴定。首先将裂解液、蛋白酶 K 与小鼠组织混匀, 放入 55℃ 金属浴中 25 min、95℃ 金属浴中 5 min; 之后配置 DNA 扩增体系, 将其与组织液混匀, 按程序进行 PCR 扩增, 使用 Gel Image System 显影, cre 阳性雄性小鼠留作下一步实验用, cre 阳性雌性小鼠至育龄期后可继续用于繁育。

(6) 组织免疫荧光染色 (immunofluorescence, IF): 最后一次硝酸甘油或 NS 给药后 2 h, 经 4% PFA 灌注后分离出的小鼠 TNC 脑区, 使用 OCT 包埋后放至低温切片机冠状位切片, 制成 30 μ m 厚的 TNC 组织冷冻切片。使用快速封闭液在室温下封闭 15 min, 将切片与快速封闭液稀释的一抗在 4℃ 下孵育过夜, 包括 Kir4.1 (1:400)、CGRP (1:400)、c-Fos (1:1000)。用含 Tween-20 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline with tween 20, PBST) 清洗 3 次后, 在室温下用封闭液稀释的二抗 (1:1000) 孵育 2 h, PBST 清洗后 DAPI 封片。使用全景扫描仪自动成像, ImageJ 软件计算蛋白免疫荧光平均强度。

(7) 蛋白质免疫印迹实验 (Western blot, WB): 最后一次硝酸甘油或 NS 给药后 2 h, 经 PBS 灌注后的分离出的小鼠 TNC 脑区使用 RIPA (P0013B 碧云天) + 蛋白酶抑制剂进行蛋白裂解, 采用 BCA 法及标准曲线计算样品蛋白浓度, 之后进行稀释及蛋白变性。取 30 μ g/孔蛋白样品上样, 将 FuturePAGE™ 4-20% 12 孔预制凝胶电泳分离后, 电转 (350 mA) 至 PDVF 膜, 转膜后用 5% 胎牛血清 (bovine serum

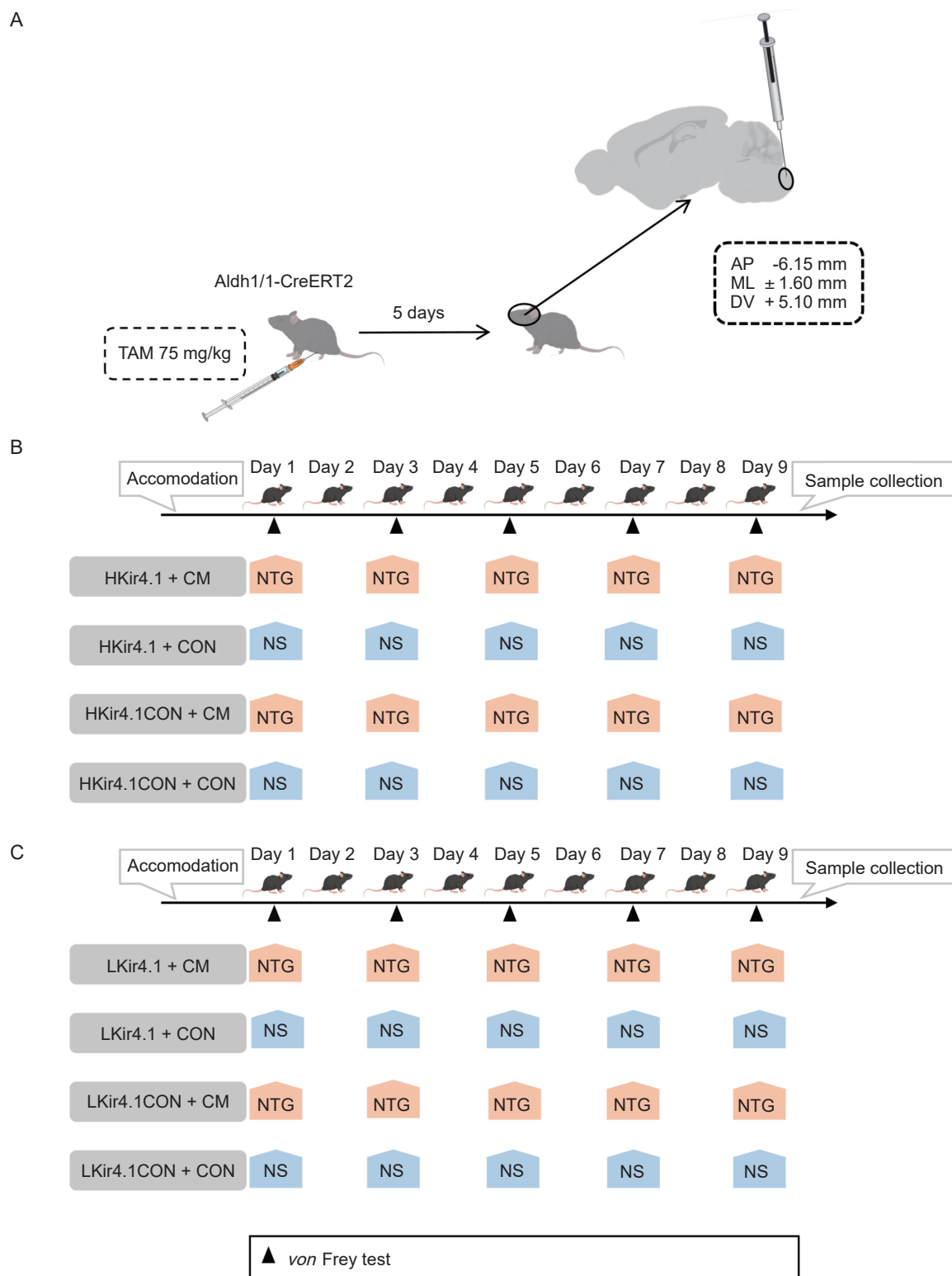


图 2 调控 Kir4.1 的表达后建立 CM 和 CON 小鼠模型流程图

(A) Aldh1/1-CreERT2 小鼠注射 TAM 表达 5 天后行立体定位注射；(B) Kir4.1 过表达及其载体对照组 CM 小鼠造模流程图；(C) Kir4.1 敲低及其载体对照组 CM 小鼠造模流程图

Fig. 2 Flow chart of establishing CM and CON model mice after regulating Kir4.1 expression

(A) After injecting TAM to induce expression for 5 days in Aldh1/1-CreERT2 mice, perform stereotactic injection; (B) Flow chart for Kir4.1 overexpression and vector control CM mice; (C) Flow chart for Kir4.1-knockdown and vector control CM mice.

albumin, BSA) 在 37℃ 封闭 2 h 后加入相应一抗兔抗 Kir4.1 1:1000 在 4℃ 下孵育过夜。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。加入相应二抗 (1:5000) 37℃ 孵育 2 h。TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min。将蛋白质印迹检测试剂盒 (Vazyme, SuperFemto ECL Chemiluminescence Kit, E423-02) 显影液 A、B 液按 1:1 的比例混合, 现用现配, 将 PVDF 膜浸泡在显影液中, 并使用成像系统 (Tanon-5200, 中国) 进行曝光拍照。将 GAPDH 条带作为参照条带, 使用 ImageJ 软件对得到的条带进行定量分析, 比较各组灰度值的相对信号密度。

3. 统计学分析

本研究中所有实验操作和数据分析均由不知晓实验分组情况的研究人员执行。样本量根据既往经验确定, 所有样本均为生物学重复。统计分析使用 SPSS 27.0 软件 (IBM Analytics, Armonk, NY, USA) 和 GraphPad Prism version 6.0 软件 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)。行为学数据的分析则采用双向重复测量方差分析 (two-way repeated-measures ANOVA)。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance ANOVA) 进行统计分析, 随后采用 Dunnett's *t* 检验事后分析。结果以均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 反复注射 NTG 导致小鼠痛觉敏化及 CGRP、c-Fos 表达增加

为了评估反复 NTG 注射是否能够成功诱导 CM 模型, 使用 von Frey 纤维丝检测 FCM 组、CM 组和 CON 组小鼠在第 1、3、5、7、9 天给药前的 MWT 及 HWT 阈值的变化。FCM 组和 CM 组小鼠分别在给予 9 次、5 次等量 NTG 后, 基础机械痛阈值均呈下降趋势: CM 组在第 3、5、7、9 天的痛觉阈值均显著低于 CON 组 (后爪底: 3 d $P = 0.003$, 5 d、7 d、9 d $P < 0.001$; 眶周: 3 d $P = 0.038$, 5 d、7 d $P < 0.001$, 9 d $P = 0.002$), 说明 CM 组小鼠出现痛觉敏化 (见图 3A, 3B); FCM 组在第 3、5、7、9 天的痛觉阈值均显著低于 CON 组 (后爪底: 3 d $P = 0.004$, 5 d、7 d、9 d $P < 0.001$; 眶周: 3 d $P = 0.019$, 5 d、7 d、9 d $P < 0.001$), 说明 FCM 组小鼠也出现痛觉敏化 (见图 3A, 3B)。

为了确定反复注射 NTG 诱导的痛觉敏化是否与 CGRP 表达增加相对应, 在最后一次给药 NTG 后 2 h 检测 TNC 脑区中 CGRP 表达, IF 结果显示: 与 CON 组相比, CM 组小鼠 TNC 脑区的 CGRP 蛋白平均荧光强度相对密度显著上调 (IF: $P = 0.03$), FCM 组小鼠 TNC 脑区的 CGRP 蛋白平均荧光强度相对密度显著上调 (IF: $P < 0.001$, 见图 4A)。

对 CM 组、FCM 组与 CON 组进行 c-Fos 免疫荧光染色, 评估小鼠 TNC 脑区的神经元活动水平。结果发现, CM 组 TNC 脑区神经元激活水平与 CON 组小鼠相比激活有增加 ($P < 0.001$), FCM 组 TNC 脑区神经元激活水平与 CON 组小鼠相比激活有增加 ($P < 0.001$, 见图 4B)。

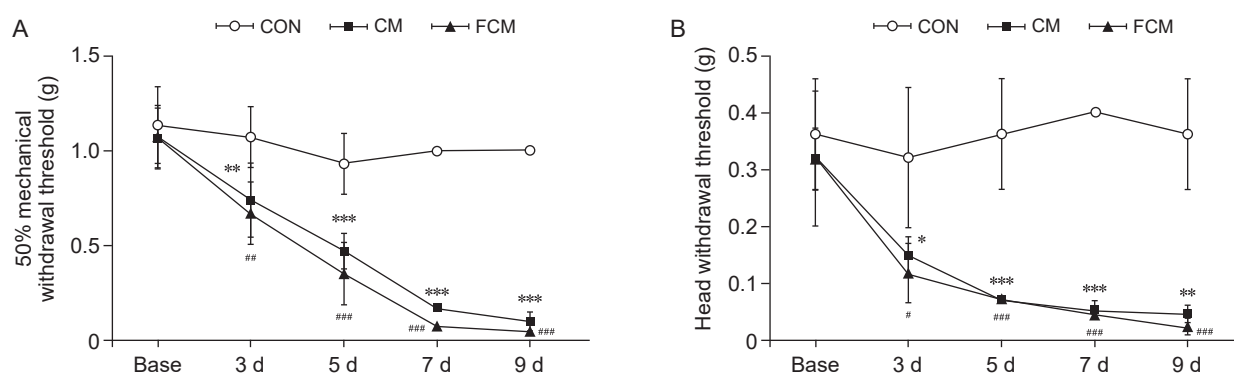


图 3 CON 组、CM 组和 FCM 组小鼠的机械痛阈 ($n = 9$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 三组小鼠 MWT 阈值比较; (B) 三组小鼠 HWT 阈值比较

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, CM 组与 CON 组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, FCM 组与 CON 组相比

Fig. 3 Mechanical threshold in mice of the CON, CM, and FCM groups ($n = 9$, $\bar{x} \pm SEM$)

(A) 50% mechanical withdrawal threshold among 3 groups; (B) Head withdrawal threshold among 3 groups

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared between CM group and CON group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, compared between FCM group and CON group.

2. 反复注射 NTG 导致 TNC 脑区 Kir4.1 蛋白表达下降

为了检测反复注射 NTG 诱导的 CM 模型小鼠 TNC 脑区中 Kir4.1 表达量, 在最后一次给药 NTG 2 h 后检测 TNC 脑区中 Kir4.1 表达。IF 结果显示: 与 CON 组小鼠相比, CM 组小鼠 TNC 脑区的 Kir4.1 蛋白平均荧光强度显著下降 ($P < 0.001$); 与 CON 组小鼠相比, FCM 组小鼠 TNC 脑区的 Kir4.1 蛋白平均荧光强度显著下降 ($P < 0.001$, 见图 5A, 5C)。WB 结果显示: 与 CON 组小鼠相比, CM 组小鼠 TNC 脑区的 Kir4.1 蛋白表达显著下降 ($P = 0.037$); 与 CON 组小鼠相比, FCM 组小鼠 TNC 脑区的 Kir4.1

蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$, 见图 5B, 5D)。

3. 局部过表达 Kir4.1 后 CM 模型小鼠 Kir4.1 和 CGRP 表达及机械阈值变化

如图 6 所示, IF 实验结果表明 Kir4.1 与星形胶质细胞标志物 GFAP 共表达。

如图 7A 所示, 与 Hkir4.1CON + CM 组相比, Hkir4.1 + CM 组小鼠的 TNC 脑区 Kir4.1 表达明显增多 ($P = 0.0017$), 验证靶向 TNC 脑区注射过表达 Kir4.1 及其载体病毒的成功。

使用免疫荧光验证各组小鼠 TNC 脑区的 CGRP 表达量。与 Hkir4.1 + CON 组相比, Hkir4.1 + CM 组模型小鼠 CGRP 表达明显增加 ($P = 0.025$); 与 Hkir4.1

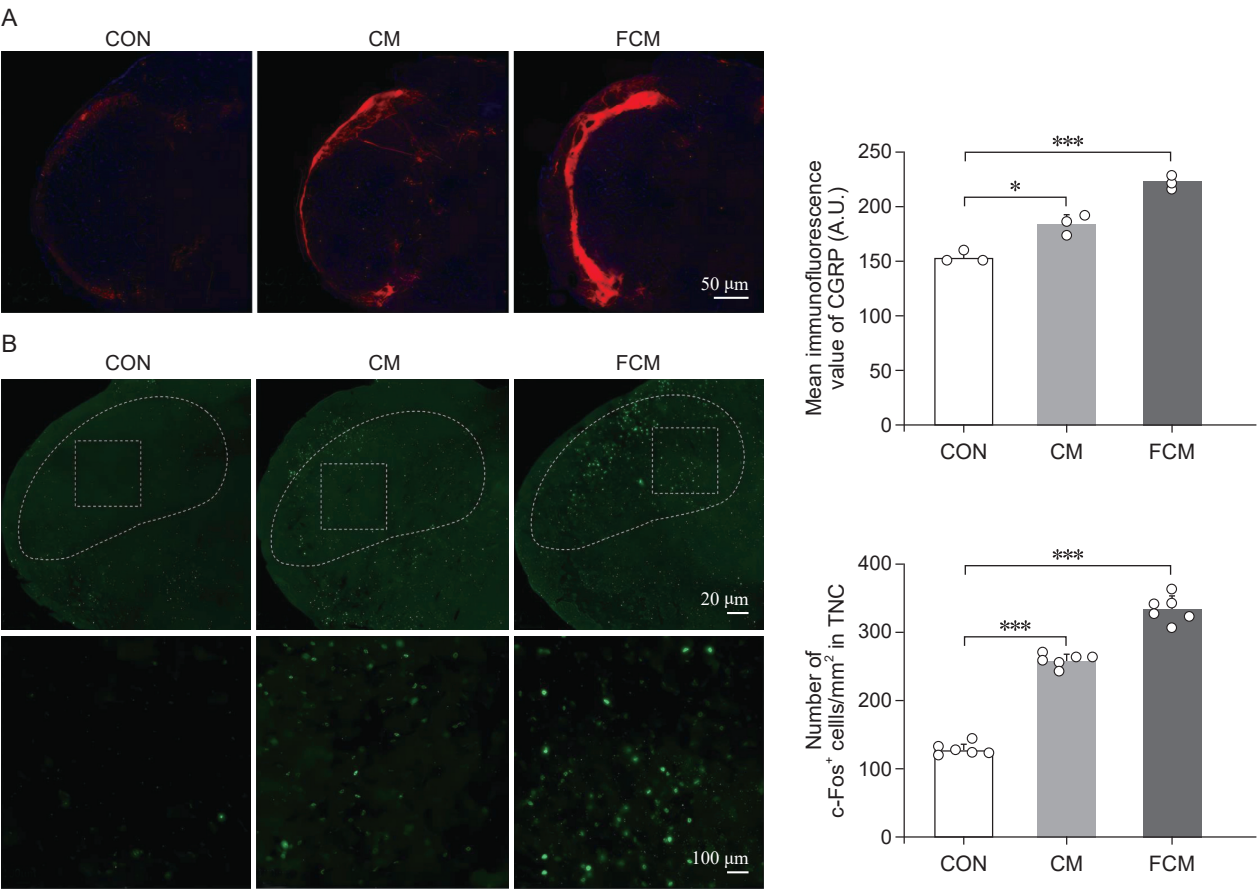


图 4 CON 组、CM 组和 FCM 组小鼠 TNC 脑区 CGRP 及 c-Fos 的表达 (A) 左侧为三组小鼠 TNC 脑区 CGRP 免疫荧光染色代表性图像 (标尺 = 50 μm), 红色荧光标记 CGRP; 右侧为三组小鼠 CGRP 荧光强度分析对比 ($n = 3$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, 与 CON 组相比); (B) 左侧为三组小鼠 TNC 脑区 c-Fos 免疫荧光染色代表性图像 (标尺 = 20 μm), 绿色荧光标记 c-Fos; 图中下方为上方放大的视野 (标尺 = 100 μm); 右侧为三组小鼠 c-Fos 荧光强度分析对比 ($n = 6$, $***P < 0.001$, 与 CON 组相比)

Fig. 4 Expression of CGRP and c-Fos in mice of the CON, CM, and FCM groups (A) On the left are representative images of CGRP immunofluorescence in the TNC of three groups of mice (scale bar = 50 μm), with red fluorescence indicating CGRP; on the right are comparison of CGRP fluorescence intensity in three groups of mice ($n = 3$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, compared with CON group); (B) On the left are representative images of c-Fos immunofluorescence in the TNC of three groups of mice (scale bar = 20 μm), with green fluorescence indicating c-Fos; the view below is a magnified field of view of the one above (scale bar = 100 μm); on the right are comparison of c-Fos fluorescence intensity in three groups of mice ($n = 6$, $***P < 0.001$, compared with CON group).

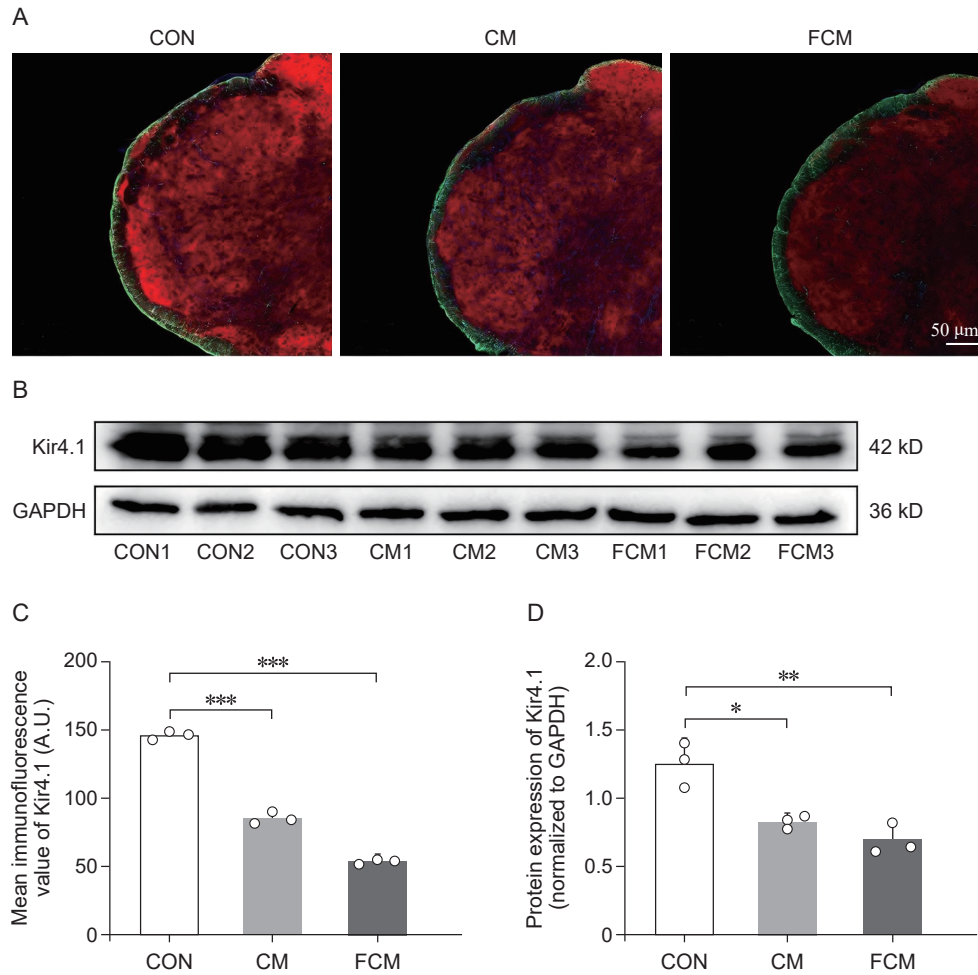


图 5 CON 组、CM 组和 FCM 组小鼠 Kir4.1 的表达

(A) 三组小鼠 TNC 脑区 Kir4.1 免疫荧光染色代表性图像 (标尺 = 50 μm), 红色荧光标记 Kir4.1; (B) 三组小鼠 TNC 脑区 Kir4.1 蛋白代表性条带表达; (C) 三组小鼠 Kir4.1 荧光强度对比; (D) 三组小鼠 TNC 脑区 Kir4.1 蛋白表达差异 ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, 与 CON 组相比)

Fig. 5 Expression of Kir4.1 in CON, CM, and FCM groups

(A) Representative images of Kir4.1 immunofluorescence in the TNC of three groups of mice (scale bar = 50 μm), with red fluorescence indicating Kir4.1; (B) Representative bands of Kir4.1 protein expression in the TNC brain region of three groups of mice; (C) Comparison of Kir4.1 fluorescence intensity in three groups of mice; (D) Differences in Kir4.1 protein expression in the TNC among three groups of mice ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, compared with CON group).

CON + CM 组相比, Hkir4.1 + CM 组模型小鼠 CGRP 表达明显减少 ($P = 0.002$, 见图 7B)。

使用 von Frey 检测 Hkir4.1 + CM 组、Hkir4.1 + CON 组、Hkir4.1CON + CM 组和 Hkir4.1CON + CON 组小鼠在第 1、3、5、7、9 天给药前 MWT 和 HWT 基础机械阈值变化。Hkir4.1 + CM 组和 Hkir4.1 + CON 组小鼠分别给予 5 次等量 NTG 或 NS 后, Hkir4.1 + CM 组在第 5、7、9 天的痛觉阈值均显著低于 Hkir4.1 + CON 组 (后爪底: 3 d、5 d $P < 0.001$, 7 d $P = 0.025$, 9 d $P < 0.001$; 眶周: 5 d $P = 0.006$, 7 d、9 d $P < 0.001$), 提示 Hkir4.1 + CM 组小鼠出

现痛觉敏化 (见图 7C, 7D)。HKir4.1 + CM 组和 Hkir4.1CON + CM 组小鼠分别给予 5 次等量 NTG 后, Hkir4.1 + CM 组在第 5、7、9 天的痛觉阈值均显著高于 Hkir4.1CON + CM 组 (后爪底: 5 d $P = 0.003$, 7 d $P = 0.006$, 9 d $P = 0.008$; 眶周: 5 d $P < 0.001$, 7 d $P = 0.008$, 9 d $P = 0.002$), 提示 HKir4.1 + CM 组小鼠的痛觉敏化程度较 Hkir4.1CON + CM 组小鼠减轻 (见图 7C, 7D)。

4. Kir4.1 局部敲低及其载体对照组 CM 模型小鼠的 Kir4.1 和 CGRP 表达及机械阈值变化

如图 8A 所示, 与 Lkir4.1CON + CM 组相比,

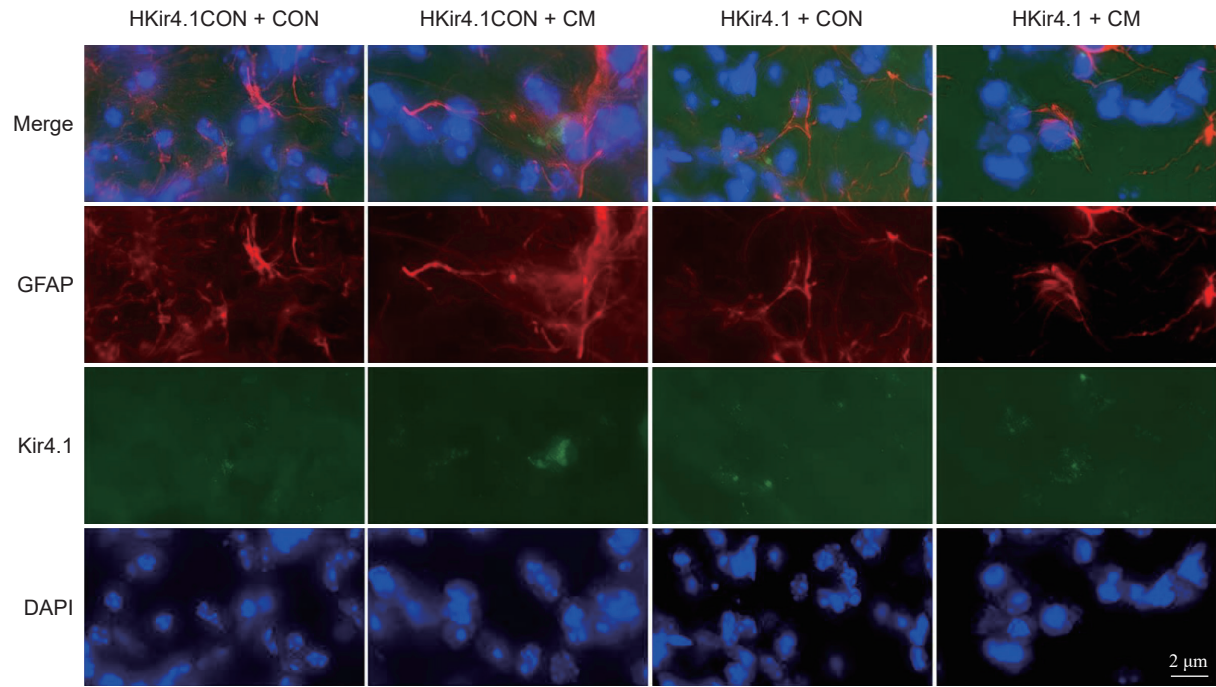


图6 Kir4.1 过表达及其载体对照组 CM 模型小鼠 GFAP 与 Kir4.1 共定位
各组小鼠 TNC 区 GFAP (红色)、Kir4.1 (自带绿色荧光) 和 DAPI (蓝色) 免疫荧光共定位染色的代表性图像 (标尺 = 2 μm)

Fig. 6 Co-localization of GFAP and Kir4.1 in CM Model mice with Kir4.1 overexpression and vector control
Immunofluorescence staining shows GFAP (red), Kir4.1 (green), and DAPI (blue). Scale bar = 2 μm

Lkir4.1 + CM 组小鼠的 TNC 脑区 Kir4.1 表达减少 ($P = 0.03$), 验证靶向 TNC 脑区注射敲低 Kir4.1 及载体病毒的成功。

使用免疫荧光验证各组小鼠 TNC 脑区的 CGRP 表达量。与 Lkir4.1 + CON 组相比, Lkir4.1 + CM 组模型小鼠 CGRP 表达明显增加 ($P < 0.001$); 与 Lkir4.1CON + CM 组相比, Lkir4.1 + CM 组模型小鼠 CGRP 表达明显增加 ($P = 0.03$, 见图 8B)。

使用 von Frey 检测 Lkir4.1 + CM 组、Lkir4.1 + CON 组、Lkir4.1CON + CM 组和 Lkir4.1CON + CON 组小鼠在第 1、3、5、7、9 天给药前 MWT 和 HWT 基础机械阈值变化。Lkir4.1 + CM 组和 Lkir4.1 + CON 组小鼠分别给予 5 次等量 NTG 或 NS 后, Lkir4.1 + CM 组在第 3、5、7、9 天的痛觉阈值均显著低于 Lkir4.1 + CON 组 (后爪底: 3 d、5 d、7 d、9 d $P < 0.001$; 眶周: 3 d $P = 0.001$, 5 d、7 d、9 d $P < 0.001$), 提示 Lkir4.1 + CM 组小鼠出现痛觉敏化 (见图 8C, 8D)。Lkir4.1 + CM 组和 Lkir4.1CON + CM 组小鼠分别给予 5 次等量 NTG 后, Lkir4.1 + CM 组在第 3、7 天的痛觉阈值均显著低于 Lkir4.1CON + CM 组 (后爪底: 3 d $P = 0.009$, 5 d $P < 0.001$, 7 d $P = 0.013$, 9 d $P < 0.001$; 眶周: 3 d $P = 0.015$, 7 d $P = 0.019$),

提示 Lkir4.1 + CM 组小鼠痛觉敏化程度较 Lkir4.1CON + CM 组小鼠加重 (见图 8C, 8D)。

讨论

在本研究中, 通过建立反复腹腔注射 NTG 的 CM 小鼠模型, 发现 CM 模型小鼠中 TNC 脑区星形胶质细胞的 Kir4.1 蛋白明显减少, 并且通过局部过表达或敲除 Kir4.1 的表达验证其可能参与 CM 中枢敏化的过程; 这一结果证实了在 CM 慢性发生发展过程中, 星形胶质细胞 Kir4.1 可能参与 CM 模型小鼠的中枢敏化机制。

在神经胶质细胞中, Kir4.1 与多种功能有关, 包括细胞外 K^+ 稳态、维持星形胶质细胞静息膜电位、细胞体积调节和促进谷氨酸再摄取等^[24]。Kir4.1 功能障碍打破细胞外 K^+ 稳态, 这一功能障碍与一系列神经系统疾病有关, 如抑郁症、癫痫、神经病理性疼痛等^[18,25]; 其中 Kir4.1 参与疼痛期间的中枢敏化引起了研究者的兴趣, 特别是关于其在星形胶质细胞中的作用^[26]。在 CM 中, 谷氨酸持续释放会导致神经元去极化, 从而参与中枢敏化^[27]。星形胶质细胞特异性的 Kir4.1 功能障碍使星形胶质

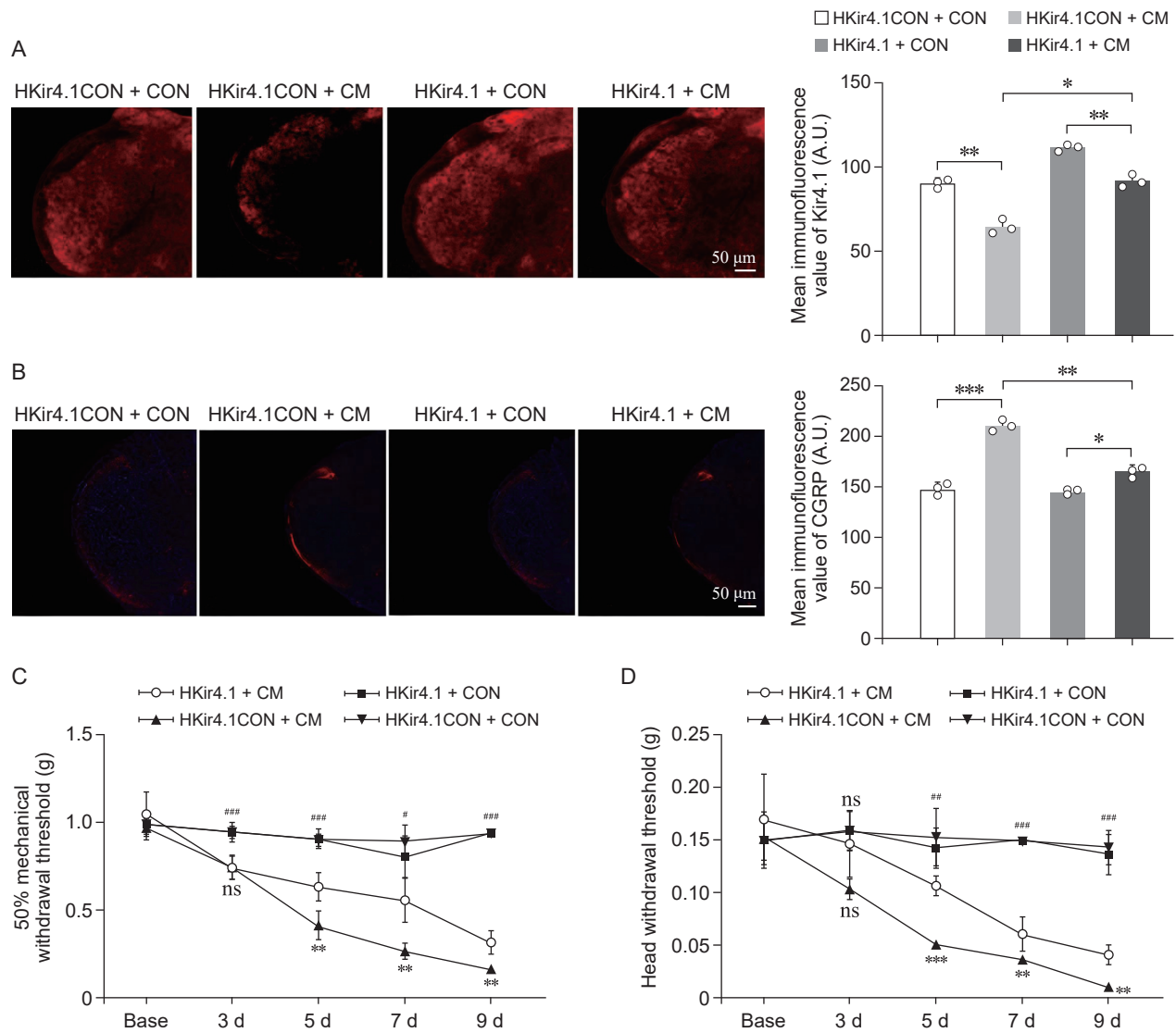


图7 Kir4.1 过表达及其载体对照组 CM 模型小鼠的 Kir4.1、CGRP 表达及痛阈检测

(A) 左侧为四组小鼠 TNC 脑区 Kir4.1 免疫荧光代表性图像 (标尺 = 50 μ m), 红色荧光标记 Kir4.1; 右侧为四组模型小鼠 Kir4.1 荧光强度对比; (B) 左侧为四组小鼠 TNC 脑区 CGRP 免疫荧光代表性图像 (标尺 = 50 μ m), 红色荧光标记 CGRP; 右侧为四组模型小鼠 CGRP 荧光强度对比 ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$); (C) 四组小鼠 MWT 阈值检测; (D) 四组小鼠 HWT 阈值检测 ($n = 9$, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, HKir4.1 + CM 组与 HKir4.1 + CON 组相比; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, HKir4.1 + CM 组与 HKir4.1CON + CM 组相比)

Fig. 7 Detection of Kir4.1 expression, CGRP expression, and mechanical threshold in CM model mice with Kir4.1 overexpression and vector control

(A) On the left are the representative images of Kir4.1 immunofluorescence in the TNC region of four groups of mice (scale bar = 50 μ m), with Kir4.1 labeled in red; on the right is the comparison of Kir4.1 fluorescence intensity among the four groups; (B) On the left are the representative images of CGRP immunofluorescence in the TNC region of four groups of mice (scale bar = 50 μ m), with CGRP labeled in red; on the right is the comparison of CGRP fluorescence intensity among the four groups ($n = 3$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$); (C) 50% mechanical withdrawal threshold in four groups of mice; (D) Head withdrawal threshold in four groups of mice ($n = 9$, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, compared between HKir4.1 + CM group and HKir4.1 + CON group; $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, compared between HKir4.1 + CM group and HKir4.1CON + CM group).

细胞膜电位去极化, 并减少谷氨酸再摄取^[22,28]; 这表明星形胶质细胞 Kir4.1 可能参与神经病理性疼痛的发生机制^[22]。最近一项关于 Kir4.1 与疼痛的报

道描述星形胶质细胞 Kir4.1 功能障碍驱动雄性大鼠持续炎症性面部疼痛^[29], 但目前关于星形胶质细胞 Kir4.1 是否参与 CM 的发生发展还未见描述。

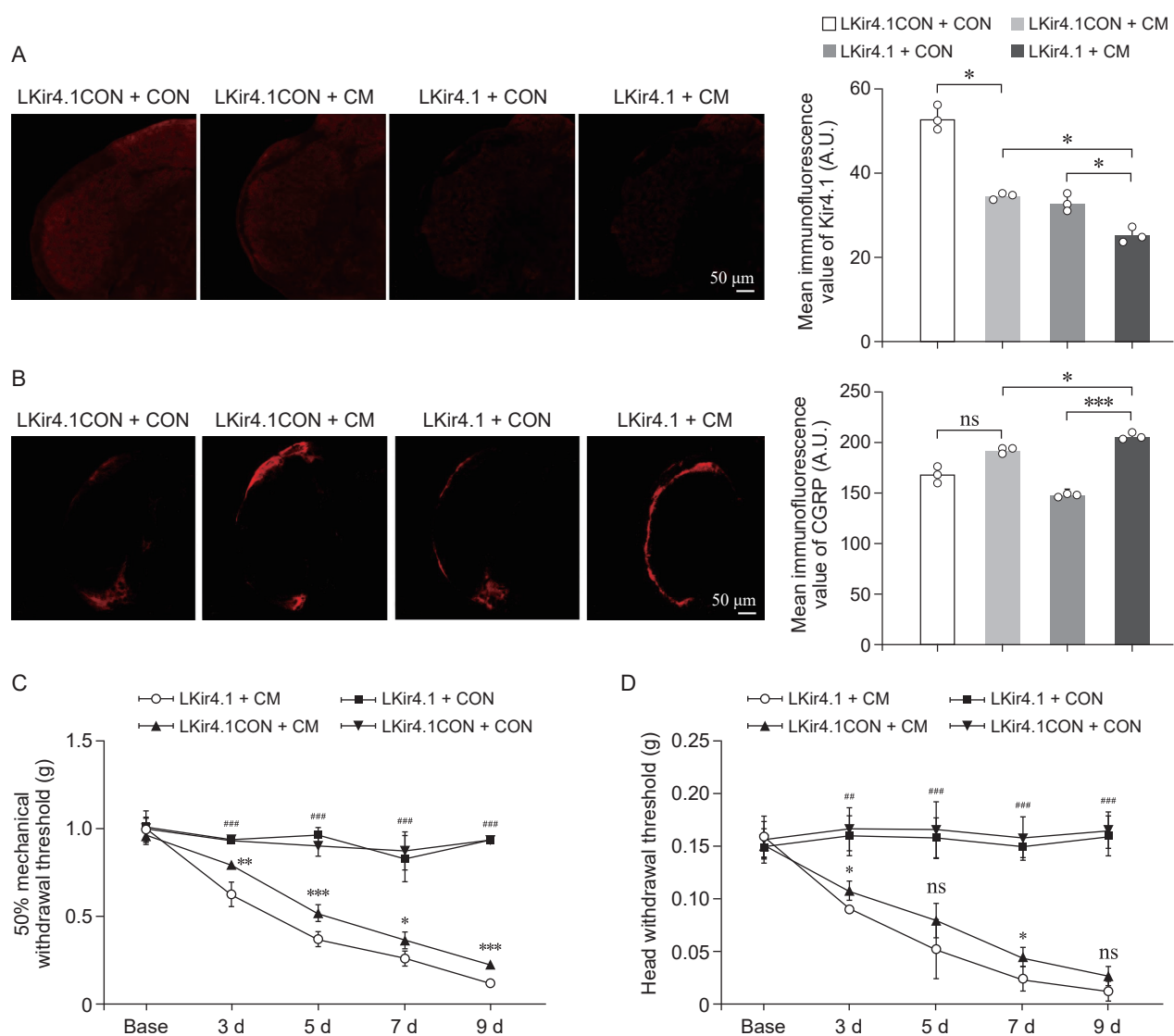


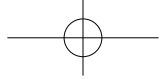
图 8 Kir4.1 局部敲低及其载体对照组 CM 模型小鼠的 Kir4.1 表达、CGRP 表达及痛阈检测 (A) 左侧为四组小鼠 TNC 脑区 Kir4.1 免疫荧光代表性图像 (标尺 = 50 μ m), 红色荧光标记 Kir4.1, 右侧为四组模型小鼠 Kir4.1 荧光强度对比; (B) 左侧为四组小鼠 TNC 脑区 CGRP 免疫荧光代表性图像 (标尺 = 50 μ m), 红色荧光标记 CGRP, 右侧为四组模型小鼠 CGRP 荧光强度对比 ($n = 3$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$); (C) 四组小鼠 MWT 阈值检测; (D) 四组小鼠 HWT 阈值检测 ($n = 9$, $^{###}P < 0.01$, $^{####}P < 0.001$, LKir4.1 + CM 组与 LKir4.1 + CON 组相比; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, LKir4.1 + CM 组与 LKir4.1CON + CM 组相比)

Fig. 8 Detection of Kir4.1 expression, CGRP expression, and mechanical threshold in CM model mice with Kir4.1-knockdown and vector control

(A) On the left are the representative images of Kir4.1 immunofluorescence in the TNC region of four groups of mice (scale bar = 50 μ m), with Kir4.1 labeled in red; on the right is the comparison of Kir4.1 fluorescence intensity among the four groups of model mice; (B) On the left are the representative images of CGRP immunofluorescence in the TNC region of four groups of mice (scale bar = 50 μ m), with CGRP labeled in red; on the right is the comparison of CGRP fluorescence intensity among the four groups of model mice ($n = 3$, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$); (C) 50% mechanical withdrawal threshold in four groups of mice; (D) Head withdrawal threshold in four groups of mice ($n = 9$, $^{###}P < 0.01$, $^{####}P < 0.001$, compared between LKir4.1 + CM group and LKir4.1 + CON group; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, compared between LKir4.1 + CM group and LKir4.1CON + CM group).

本研究首先通过反复腹腔注射 NTG 建立 CM 小鼠模型, 与 CON 组小鼠相比, CM 组、FCM 组小鼠 TNC 区 CGRP 及 c-Fos 表达增加, 这验证了

CM 模型建立成功, TNC 参与了 CM 的中枢敏化; 更重要的是, 进一步验证星形胶质细胞 Kir4.1 在 CM 模型 TNC 脑区中表达下降。进一步的研究中使



用立体定位技术及腺相关病毒调控 Kir4.1 的表达, Kir4.1 过表达可以缓解 CM 模型小鼠的痛觉过敏, 小鼠眼眶及后足机械疼痛缓解; 同时使用免疫荧光技术观察到过表达 Kir4.1 后 CM 模型小鼠的 CGRP 免疫荧光强度较对照组明显减弱; 与此相反地, TNC 脑区局部敲低 Kir4.1 后增加了 CM 模型小鼠的痛觉过敏, 小鼠眼眶及后足机械疼痛增加; 免疫荧光可以观察到敲低 Kir4.1 后 CM 模型小鼠的 CGRP 免疫荧光强度较对照组明显增加。这些结果提示在 CM 的发生发展过程中, Kir4.1 可能参与其中。

本研究首次在动物模型中发现了星形胶质细胞 Kir4.1 可能参与 CM 中枢敏化。但本研究仍存在以下不足之处: ①局部敲低 Kir4.1 的实验小鼠, 免疫荧光染色中未呈现 Kir4.1 与星形胶质细胞标志物 GFAP 共染的现象; ②靶向调控后 CM 模型小鼠未用 WB 进行半定量验证, 在接下来的研究中将完成; ③在验证 Kir4.1 在 CM 中的作用时, 只停留在靶向调控 Kir4.1 的表达, 未进一步探索星形胶质细胞 Kir4.1 在 CM 中具体的发生发展机制。

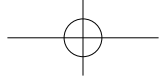
综上所述, 本研究为 Kir4.1 成为 CM 潜在的发生发展机制提供了理论依据, 验证 Kir4.1 可能成为 CM 中的潜在治疗靶点价值。但星形胶质细胞如何调节 Kir4.1 参与 CM 的发生发展机制还需更深入的研究来验证。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Dodick DW. Migraine[J]. Lancet (London, England), 2018, 391(10127):1315-1330.
- [2] Ferrari MD, Goadsby PJ, Burstein R, *et al.* Migraine[J]. Nat Rev Dis Primers, 2022, 8(1):2.
- [3] Hovaguimian A, Roth J. Management of chronic migraine[J]. BMJ (Clinical research ed), 2022, 379: e067670.
- [4] Negro A, Sciattella P, Rossi D, *et al.* Cost of chronic and episodic migraine patients in continuous treatment for two years in a tertiary level headache centre[J]. J Headache Pain, 2019, 20(1):120.
- [5] Spekker E, Tanaka M, Szabó Á, *et al.* Neurogenic inflammation: the participant in migraine and recent advancements in translational research[J]. Biomedicines, 2021, 10(1):76.
- [6] Andreou AP, Edvinsson L. Mechanisms of migraine as a chronic evolutive condition[J]. J Headache Pain, 2019, 20(1):117.
- [7] May A, Schulte LH. Chronic migraine: risk factors, mechanisms and treatment[J]. Nat Rev Neurol, 2016, 12(8):455-464.
- [8] Ji RR, Nackley A, Huh Y, *et al.* Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain[J]. Anesthesiology, 2018, 129(2):343-366.
- [9] 王皓缘, 孙莹茹, 王贺波. 偏头痛慢性化机制研究进展, 中国疼痛医学杂志 [J]. 2020, 26(6):403-406.
- [10] Vila-Pueyo M, Gliga O, Gallardo VJ, *et al.* The role of glial cells in different phases of migraine: lessons from preclinical studies[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16):12553.
- [11] Ohno Y, Kinboshi M, Shimizu S. Inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 as a novel modulator of BDNF expression in astrocytes[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3313.
- [12] Carter SF, Herholz K, Rosa-Neto P, *et al.* Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease[J]. Trends Mol Med, 2019, 25(2):77-95.
- [13] Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions[J]. Physiol Rev, 2008, 88(3): 983-1008.
- [14] Ohno Y, Kunisawa N, Shimizu S. Emerging roles of astrocyte Kir4.1 channels in the pathogenesis and treatment of brain diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(19): 10236.
- [15] Al-Karaghali MA. Involvement of potassium channel signalling in migraine pathophysiology[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(3):438.
- [16] Hibino H, Fujita A, Iwai K, *et al.* Differential assembly of inwardly rectifying K⁺ channel subunits, Kir4.1 and Kir5.1, in brain astrocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(42):44065-44073.
- [17] Butt AM, Kalsi A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions[J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(1):33-44.
- [18] Tyurikova O, Kopach O, Zheng K, *et al.* Astrocyte Kir4.1 expression level territorially controls excitatory transmission in the brain[J]. Cell Rep, 2025, 44(2): 115299.
- [19] Cui Y, Yang Y, Ni Z, *et al.* Astroglial Kir4.1 in the lateral habenula drives neuronal bursts in depression[J]. Nature, 2018, 554(7692):323-327.
- [20] Zhou X, Zhao C, Xu H, *et al.* Pharmacological inhibition of Kir4.1 evokes rapid-onset antidepressant responses[J]. Nat Chem Biol, 2024, 20(7):857-866.
- [21] Setkowicz Z, Kosonowska E, Janeczko K. Inflammation in the developing rat modulates astroglial reactivity to seizures in the mature brain[J]. J Anat, 2017, 231(3): 366-379.
- [22] Ou M, Chen Y, Liu J, *et al.* Spinal astrocytic MeCP2 regulates Kir4.1 for the maintenance of chronic hyperalgesia in neuropathic pain[J]. Prog Neurobiol,

(下转第 435 页)



- [11] Tian L, Cao W, Yue R, *et al.* Pretreatment with Tiliainin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway[J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4):352-360.
- [12] Guo Z, Fan D, Liu FY, *et al.* NEU1 regulates mitochondrial energy metabolism and oxidative stress post-myocardial infarction in mice via the SIRT1/PGC-1 α axis[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9:821317.
- [13] Ortiz YT, Bilbrey JA, Felix JS, *et al.* Cannabidiol and mitragynine exhibit differential interactive effects in the attenuation of paclitaxel-induced mechanical allodynia, acute antinociception, and schedule-controlled responding in mice[J]. *Pharmacol Rep*, 2023, 75(4):937-950.
- [14] Ladjimi MH, Barbouche R, Ben Barka Z, *et al.* Comparison of the effects of PACAP-38 and its analog, acetyl-[Ala(15), Ala(20)] PACAP-38-propylamide, on spatial memory, post-learning BDNF expression and oxidative stress in rat[J]. *Behav Brain Res*, 2019, 359: 247-257.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1):55-63.
- [16] 韩聪, 徐力, 曾文玉, 等. miR-99b-5p 靶向 FGFR3 对紫杉醇诱导慢性神经病理性疼痛形成的影响 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(10):737-743.
- [17] Kiss P, Banki E, Gaszner B, *et al.* Protective effects of PACAP in a rat model of diabetic neuropathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19):10691.
- [18] Lv Z, Shen J, Gao X, *et al.* Herbal formula Huangqi Guizhi Wuwu decoction attenuates paclitaxel-related neurotoxicity via inhibition of inflammation and oxidative stress[J]. *Chin Med*, 2021, 16(1):76.
- [19] Yoshikawa T, You F. Oxidative stress and bio-regulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6):3360.
- [20] Fang Y, Shi H, Huang L, *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide attenuates mitochondria-mediated oxidative stress and neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 174:236-248.
- [21] Li W, Wang Y, Zhang Y, *et al.* Lizhong decoction ameliorates ulcerative colitis by inhibiting ferroptosis of enterocytes via the Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326:117966.
- [22] Zeng Y, Fang Q, Chen J, *et al.* Melatonin improves mitochondrial dysfunction and attenuates neuropathic pain by regulating SIRT1 in dorsal root ganglions[J]. *Neuroscience*, 2023, 534:29-40.
- [23] Qian L, Zhu Y, Deng C, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1):50.
- [24] Zhang L, Liu L, Li D, *et al.* Heat shock protein 22 attenuates nerve injury-induced neuropathic pain via improving mitochondrial biogenesis and reducing oxidative stress mediated by spinal AMPK/PGC-1 α pathway in male rats[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2024, 19(1):5.
- [25] Zhu XZ, Wang JQ, Wu YH. MG53 ameliorates nerve injury induced neuropathic pain through the regulation of Nrf2/HO-1 signaling in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2023, 449:114489.

(上接第 425 页)

- 2023, 224:102436.
- [23] Tipton AF, Tarash I, McGuire B, *et al.* The effects of acute and preventive migraine therapies in a mouse model of chronic migraine[J]. *Cephalalgia*, 2016, 36(11): 1048-1056.
- [24] Nwaobi SE, Cuddapah VA, Patterson KC, *et al.* The role of glial-specific Kir4.1 in normal and pathological states of the CNS[J]. *Acta Neuropathol*, 2016, 132(1):1-21.
- [25] Seifert G, Hüttmann K, Binder DK, *et al.* Analysis of astroglial K⁺ channel expression in the developing hippocampus reveals a predominant role of the Kir4.1 subunit[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(23):7474-7488.
- [26] Sicca F, Imbrici P, D'Adamo MC, *et al.* Autism with seizures and intellectual disability: possible causative role of gain-of-function of the inwardly-rectifying K⁺ channel Kir4.1[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(1):239-247.
- [27] Latremoliere A, Woolf CJ. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity[J]. *J Pain*, 2009, 10(9):895-926.
- [28] Djukic B, Casper KB, Philpot BD, *et al.* Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation[J]. *J Neurosci*, 2007, 27(42):11354-11365.
- [29] Mountadem S, Herault K, Peirs C, *et al.* Astrocytic Kir4.1 ion channel deficit drives persistent inflammatory facial pain in males[J]. *Brain*, 2025. doi: 10.1093/brain/awaf122.