

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2025.06.005

## 垂体腺苷酸环化酶激活肽缓解紫杉醇诱发周围神经病变小鼠模型的疼痛效应及机制研究 \*

莫汝月<sup>1,2</sup> 史舒琦<sup>2</sup> 孙武平<sup>2,△</sup> 杨 华<sup>1,3,△</sup>

(<sup>1</sup>宁夏医科大学检验学院, 银川 750004; <sup>2</sup>深圳市南山区人民医院疼痛科, 深圳 518052; <sup>3</sup>北方民族大学医学技术学院, 银川 750004)

**摘要 目的:** 探讨垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP) 缓解紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 诱发周围神经病变 (paclitaxel-induced peripheral neuropathy, PIPN) 小鼠模型的疼痛效应及机制。**方法:** 细胞实验: 收集 8 只 C57BL/6J 小鼠的背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 组织进行原代培养, 根据给药方式不同, 分为对照组 (Vehicle)、PTX 组 (PTX)、PACAP 给药组 (PTX + PACAP), 试剂盒检测各组原代 DRG 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)。动物实验: 采用随机数表法将小鼠分为四组: 对照组 (Vehicle)、PTX 组 (PTX)、低剂量 PACAP 治疗组 [PTX + PACAP (30 µg/kg)] 和高剂量 PACAP 治疗组 [PTX + PACAP (100 µg/kg)], 每组 15 只。PTX 组腹腔注射累计剂量为 32 mg/kg 的 PTX 进行造模, PACAP 治疗组在 PTX 造模基础上分别腹腔给予累计剂量为 300 µg/kg 或 1000 µg/kg 的 PACAP。Vehicle 组在相应时间点注射对应溶剂。于 PTX 注射前 1 天、第 7、14 天测量小鼠体重、50% 机械刺激缩足反射阈值 (50% mechanical withdrawal threshold, 50% MWT)、热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)、冷板反应潜伏期、试剂盒检测 DRG 组织内丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、电镜观察 DRG 组织线粒体形态、Western blot 检测 DRG 组织 PGC-1α、HO-1 蛋白表达。**结果:** 细胞实验: 与 Vehicle 组相比, PTX 组原代 DRG 细胞 ROS 含量增多 ( $P < 0.01$ ), MMP 下降 ( $P < 0.01$ ); 与 PTX 组相比, PTX + PACAP 组原代 DRG 细胞 ROS 含量减少 ( $P < 0.01$ ), MMP 上升 ( $P < 0.01$ )。动物实验: PACAP、PTX 均不能明显影响各组小鼠体重; 与 Vehicle 组相比, PTX 组小鼠出现机械、热、冷痛觉过敏 ( $P < 0.01$ ), DRG 组织 MDA 含量增多 ( $P < 0.01$ ), SOD 活性降低 ( $P < 0.01$ ), 异常形态线粒体增多、PGC-1α 表达量减少 ( $P < 0.01$ ), HO-1 表达量增加 ( $P < 0.01$ ); 与 PTX 组相比, PTX + PACAP (30 µg/kg) 组无明显效果, 而 PTX + PACAP (100 µg/kg) 组小鼠机械、热、冷痛觉过敏均有所改善 ( $P < 0.05$ ), DRG 组织中 MDA 含量减少 ( $P < 0.01$ ), SOD 活性增加 ( $P < 0.01$ ), 线粒体形态有所改善, PGC-1α 和 HO-1 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.01$ )。**结论:** PACAP 能有效缓解 PTX 诱发的小鼠 PIPN, 其机制可能与抑制氧化应激、保护线粒体功能有关。

**关键词** 垂体腺苷酸环化酶激活肽; 紫杉醇; 疼痛; 氧化应激

### Alleviation of pain and underlying mechanisms by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in a mouse model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy \*

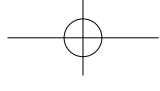
MO Ru-yue<sup>1,2</sup>, SHI Shu-qi<sup>2</sup>, SUN Wu-ping<sup>2,△</sup>, YANG Hua<sup>1,3,△</sup>

(<sup>1</sup> College of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; <sup>2</sup> Department of Pain Medicine, Shenzhen Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518052, China; <sup>3</sup> College of Medical Technology, Northern University for Nationalities, Yinchuan 750004, China)

**Abstract Objective:** To investigate the analgesic effect and mechanism of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in a mouse model of paclitaxel-induced peripheral neuropathy (PIPn). **Methods:** Cell experiment: Dorsal root ganglion (DRG) tissues were harvested from 8 C57BL/6J mice and processed for primary

\* 基金项目: 深圳市自然科学基金面上项目 (JCYJ20240813114512016); 南山区卫生健康系统科技重大项目 (NSZD2023003)

△ 通信作者 杨华 yanghua-126@163.com; 孙武平 wuping.sun@foxmail.com



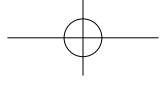
culture establishment. According to the way of administration, they were divided into Vehicle group, PTX group, and PTX + PACAP group. The intracellular reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential (MMP) of the DRG in each group were detected using test kits. Animal experiments: Mice were divided into four groups by the random number table method: Control group (Vehicle group), paclitaxel group (PTX group), low-dose PACAP treatment group [PTX + PACAP (30  $\mu\text{g/kg}$ )], and high-dose PACAP treatment group [PTX + PACAP (100  $\mu\text{g/kg}$ )], with 15 mice in each group. For the animal model establishment, the PTX group received intraperitoneal (i.p.) injections of PTX at a cumulative dose of 32 mg/kg. Based on this PTX-induced model, the PACAP treatment groups were further administered PACAP via intraperitoneal injection at cumulative doses of 300  $\mu\text{g/kg}$  or 1000  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. The Vehicle group was injected with the corresponding solvent at the corresponding time point. Body weight, 50% mechanical withdrawal threshold (50% MWT), thermal withdrawal latency (TWL), and cold plate response latency were measured at -1 day, 7 days, and 14 days after paclitaxel injection. Malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in DRG tissues were also determined using test kits. The morphology of mitochondria in DRG tissues were observed by electron microscopy. The expression of PGC-1 $\alpha$  and HO-1 protein in DRG tissue was detected by Western blot. **Results:** Cell experiment: Compared with the Vehicle group, ROS content in primary DRG cells of PTX group increased ( $P < 0.01$ ), and MMP decreased ( $P < 0.01$ ). Compared to the PTX group, the PTX + PACAP group demonstrated reduced ROS levels ( $P < 0.01$ ) and elevated MMP ( $P < 0.01$ ) in primary DRG cells. Animal experiments: PACAP and PTX did not significantly change the body weight of mice in each group. Compared with the Vehicle group, the mice in the PTX group showed mechanical, thermal, and cold pain hypersensitivity ( $P < 0.01$ ), increased MDA content ( $P < 0.01$ ), decreased SOD activity ( $P < 0.01$ ), increased abnormal mitochondria, decreased PGC-1 $\alpha$  expression ( $P < 0.01$ ), and increased HO-1 expression ( $P < 0.01$ ) in DRG tissues. Compared with PTX group, there was no significant effect in PTX + PACAP (30  $\mu\text{g/kg}$ ). PTX + PACAP (100  $\mu\text{g/kg}$ ) showed improved mechanical, thermal, and cold hyperalgesia ( $P < 0.05$ ), decreased MDA content ( $P < 0.01$ ), increased SOD activity ( $P < 0.01$ ), improved mitochondrial morphology, and increased the protein expression levels of PGC-1 $\alpha$  and HO-1 ( $P < 0.01$ ) in DRG tissues. **Conclusion:** PACAP can effectively relieve PIPN induced by paclitaxel in mice, and the mechanism may be related to the inhibition of oxidative stress and the protection of mitochondrial function.

**Keywords** pituitary adenylate cyclase-activating peptide; paclitaxel; pain; oxidative stress

在全球范围内，癌症发病率和死亡率呈持续上升态势<sup>[1]</sup>。化疗作为癌症治疗的关键手段之一，在癌症治疗中占据着重要地位。而紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 作为一种应用广泛的化疗药物，常用于乳腺癌、卵巢癌以及非小细胞肺癌等多种癌症的治疗<sup>[2-4]</sup>。然而，PTX 的临床应用常伴随严重的不良反应，其中 PTX 诱导的周围神经病变 (paclitaxel-induced peripheral neuropathy, PIPN) 尤为突出，是其剂量限制性毒性之一。PIPIN 主要以感觉症状为临床表现，包括手指与足趾的麻木感、刺痛感、冷刺激诱导的感觉功能障碍以及神经病理性疼痛等。这些症状不仅会对病人的生活质量造成严重影响，还可能致使治疗过程中断或延迟<sup>[5,6]</sup>。目前，临床上虽已采用多种药物对 PIPIN 进行缓解治疗（如加巴喷丁、普瑞巴林等），但治疗效果仍难以达到理想状态。同时，这些药物在使用过程中还存在嗜睡、头晕等不良反

应<sup>[7]</sup>。鉴于此，深入剖析 PIPIN 的发病机制，并积极开发新型治疗策略，已成为当前医学领域亟待攻克的关键难题。

垂体腺苷酸环化酶激活肽 (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP) 作为一种多功能神经肽，广泛分布于中枢及外周神经系统中，深度参与神经发育、神经保护、细胞存活等在内的多种生理与病理过程<sup>[8,9]</sup>。大量研究已证实，PACAP 在抗氧化应激领域表现出卓越的效能<sup>[10]</sup>。鉴于氧化应激被公认为多种神经系统疾病的关键病理因素之一，PACAP 所具备的抗氧化应激特性使其成为极具潜力的治疗靶点。神经病理性疼痛的发病机制极为复杂，涉及众多影响因素。近年来，PACAP 在神经系统中的作用逐渐成为研究热点，然而其在化疗痛中的具体影响及作用机制仍不明确。过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome prolifer-



erator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 作为线粒体生物合成的核心调节因子, 可通过激活一系列转录因子, 促进线粒体的生成并维持其正常功能; 同时, PGC-1 $\alpha$  还可调控抗氧化酶的表达, 助力机体抵御氧化应激所导致的损伤<sup>[11,12]</sup>。PACAP 能否通过激活 PGC-1 $\alpha$  信号通路减轻氧化应激、保护线粒体, 进而缓解 PTX 诱发的 PIPN, 仍有待深入研究和验证。

本研究通过构建体外和体内 PIPN 模型, 借助行为学检测手段, 系统评估 PACAP 对 PIPN 模型的镇痛效果。同时, 对氧化应激与线粒体相关指标进行检测, 旨在深入探究 PACAP 在缓解 PTX 诱发的小鼠 PIPN 过程中的具体作用及其潜在机制。为 PTX 诱发的 PIPN 开发新的治疗策略提供理论依据和实验支持, 以改善接受化疗的癌症病人的生活质量, 并提高 PTX 的临床应用效果。

## 方 法

### 1. 实验动物和分组

选取 68 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 7 周龄, 体重 18~20 g, 购自广东省医学实验动物中心, 动物生产许可证编号: SCXK (粤) 2022-0002。饲养在温度 22~24℃、湿度 40%~60% 和 12 h 光暗循环控制的环境中, 可自由获取食物和水。适应性喂养 1 周后用于实验。本研究严格遵守动物实验伦理相关规定, 并已通过深圳灵赋拓普生物科技有限公司实验动物管理和使用委员会动物伦理审批, 伦理审批号: TOP-IACUC-2024-0107。采用随机数表法将小鼠随机分为四组: 对照组 (Vehicle)、PTX 组、低剂量 PACAP 治疗组 [PTX + PACAP (30  $\mu$ g/kg)]、高剂量 PACAP 治疗组 [PTX + PACAP (100  $\mu$ g/kg)], 每组 15 只。

### 2. 材料

(1) 药物: PTX (HY-B0015, MCE); PACAP (HY-P0221, MCE)。PTX 粉末用 DMSO (HY-Y0320, MCE)、促凝剂 PEG 300 (HY-Y0873, MCE)、Tween 80 (HY-Y1891, MCE)、生理盐水 (BL158A, Biosharp) 溶解, 溶解比例为: DMSO:PEG 300:Tween 80:生理盐水 = 2:8:1:9。PACAP 用生理盐水溶解并稀释。

(2) 主要试剂: 多聚赖氨酸 (A3890401, Thermo Fisher); 双蒸水 (PWL070, 美仑生物); DMEM 基础培养基 (SH30262.01, HyClone); 胎牛血清 (FSP500, 苏州依科赛生物科技股份有限公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS, G4202-500ML, 塞维尔生物科技有限

公司); I 型胶原酶 (Collagenase Type I, 17100017, Thermo Fisher); 胰蛋白酶 (Trypsin, 27250018, Thermo Fisher); DNA 酶 I (DNase I, D8070, 北京索莱宝科技有限公司); 青链霉素混合液 (CM0001-100ML, 山东思科捷生物技术有限公司); 异氟烷 (R510-22-16, 瑞沃德生命科技有限公司); ROS 检测试剂盒; 线粒体膜电位检测试剂盒; RIPA 裂解液; BCA 蛋白浓度测定试剂盒; MDA 检测试剂盒; SOD 检测试剂盒; 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (批号分别为 S0033S、C2003S、P0013B、P0010、S0131S、S0101S、P0018M, 碧云天生物技术公司); 电镜固定液 (G1102-100ML, 塞维尔生物技术有限公司); 无水乙醇 (100092183, 国药集团化学试剂有限公司); 丙酮 (10000418, 国药集团化学试剂有限公司); 812 包埋剂 (90529-77-4, SPI); PGC-1 $\alpha$ 、HO-1 (批号分别为 BYab-00317, CQA1803, 华安生物技术有限公司);  $\beta$ -actin、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号分别为 GB15003、GB23303, 武汉赛维尔生物技术有限公司)。

(3) 主要仪器: 激光共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯, 型号 OLYMPUS FV3000); 活细胞工作站、倒置荧光显微镜 (赛默飞世尔科技公司, 型号分别为 EVOS2.0、EVOS M5000); von Frey 纤维丝 (美国 Danmicglobal 公司, 型号 Aesthesio); 多功能酶标仪 (安捷伦科技有限公司, 型号 Bio Tek Synergy H1); 凝胶图像分析仪 (上海天能生命科学有限公司, 型号 Tanon 5200); 超薄切片机 (Leica, 型号 Leica UC7); 钻石切片刀 (Daitome, 型号 Ultra 45°); 透射电子显微镜 (HITACHI, 型号 HT7800)。

### 3. 方法

(1) PIPN 小鼠模型的建立: 如图 1 所示, 在第 0、2、4、6、8、10、12、14 天小鼠腹腔注射累计剂量为 32 mg/kg 的 PTX 进行造模<sup>[13]</sup>, 同时第 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 天腹腔注射累计剂量分别为 300  $\mu$ g/kg、1000  $\mu$ g/kg 的 PACAP 给予治疗<sup>[14]</sup>。在第-1、7、14 天进行行为学测试。第 21 天取腰椎 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 的 DRG 于液氮中速冻、-80℃冰箱中保存, 以便进行后续实验。Vehicle 组注射等体积生理盐水和助溶剂。

(2) 小鼠体重测量: 在测量前清洁天平表面。用双手轻轻捉拿小鼠, 将小鼠轻轻放置在天平的称量盘上, 确保小鼠稳定, 不四处移动, 等待天平读数稳定时读取数据。每只小鼠重复测量 3 次。

(3) 50% 机械刺激缩足反射阈值 (50% mechanical



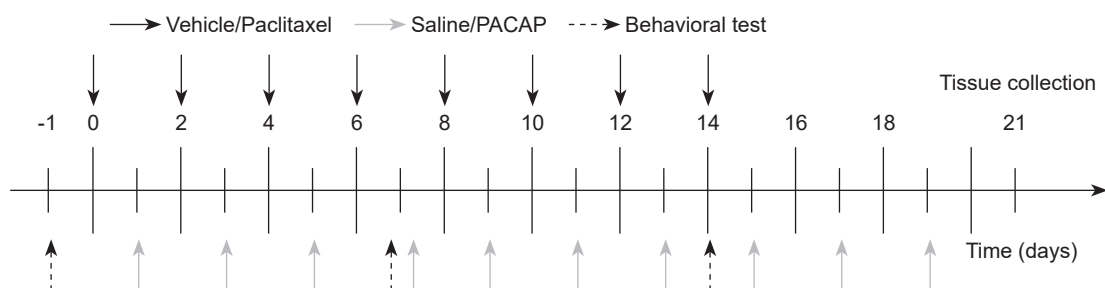


图1 实验流程图

Fig. 1 Flow chart of the experimental outline

withdrawal threshold, 50% MWT): 按照“up down”法<sup>[15]</sup>, 准备 von Frey 纤维丝, 这些纤维丝具有不同的弯曲力。将小鼠放置在金属网格上, 让其适应环境约 30 min, 使用 von Frey 纤维丝垂直刺激小鼠的足底, 缓慢用力直到纤维丝微微弯曲, 持续 5 s, 记录小鼠右后爪是否出现缩足、舔足等疼痛反应。从 0.4 g 开始给予刺激, 若无阳性反应, 则更换更大力度的纤维丝; 若出现阳性反应, 则更换小一力度的纤维丝。从出现第 1 次阳性反应开始记录, 共 6 个值, 并计算小鼠 50% MWT。

(4) 热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL): 实验前让小鼠适应实验环境 30 min, 以减少环境因素对实验结果的影响。设定温度为 52℃, 最大反应时间为 20 s。记录小鼠右后爪缩足时间, 每只小鼠进行 3 次实验, 间隔时间 5 min, 以避免疼痛敏感性的累积影响。

(5) 冷板反应潜伏期: 将小鼠放置在测试环境中, 让其适应环境和测试台, 约 30 min, 以确保小鼠在实验开始时处于较为平静的状态。将小鼠放置在冷板上适应 30 min。将冷板温度设置为 4℃, 记录小鼠从放置到首次出现跳跃、缩足或舔脚的时间, 即冷痛反应潜伏期。每只小鼠重复 3 次, 间隔时间 5 min, 最大反应温度为 20 s。

(6) 小鼠 DRG 原代培养: 将多聚赖氨酸滴加至激光共聚焦专用培养皿中, 37℃ 孵育 2 h, 用双蒸水清洗并吹干备用。取 8 只 8 周龄 C57BL/6J 小鼠腰椎 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 的 DRG 组织, 剪碎后用 DMEM 基础培养基漂洗, 再用消化液在 37℃ 水浴消化 30 min, 消化液由 I 型胶原酶、胰蛋白酶以及 DNA 酶 I 按照一定的比例溶于 DMEM 基础培养基配制而成, 使用时稀释 10 倍。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化并用 DMEM 基础培养基漂洗 3 次。最后, 将原代 DRG 细胞悬液重悬于 10% DMEM 完全培养基中, 接种至多聚赖氨酸包被的皿中培养, 次日更换培养基后继续实验。

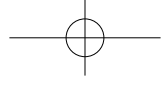
(7) 小鼠原代 DRG 细胞分组及加药处理: 将培养的小鼠原代 DRG 细胞分为 Vehicle 组、PTX 组、PTX + PACAP 组。PTX 组加入终浓度为 1 μmol/L 的 PTX 孵育 24 h, PTX + PACAP 组加入终浓度为 1 μmol/L 的 PTX 与 1 μmol/L PACAP 共孵育 24 h, Vehicle 组加入等量溶剂。

(8) 小鼠原代 DRG 细胞内 ROS 含量: 将小鼠原代 DRG 细胞按步骤 (7) 中方法分组及加药处理后, 去除细胞培养液, 每皿加入 1 ml 用基础培养基按照 1:1000 稀释, 终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光探针, 37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 最后每皿加入 1 ml DMEM 完全培养基。通过激光共聚焦显微镜观察绿色荧光强度。

(9) 小鼠原代 DRG 细胞内 MMP 水平: 小鼠原代 DRG 细胞按步骤 (7) 中方法分组及加药处理后, 依据既定比例对 JC-1 染液进行稀释, 制备 JC-1 染色工作液。用 PBS 缓冲液对细胞进行洗涤, 向每个培养皿中先加入 1 ml 的无血清培养基, 紧接着添加 1 ml 已经按照相应比例稀释好的 JC-1 染色工作液, 混合均匀。然后将细胞置于培养箱内, 在 37℃ 的条件下孵育 20 min。孵育完成后, 用 JC-1 染色缓冲液对细胞进行 2 次洗涤, 洗涤后在每个培养皿中加入 2 ml 的完全培养基。用特定的激发与发射波长在激光共聚焦显微镜下观察红色和绿色荧光强度。

(10) 各组小鼠 DRG 组织内 MDA 含量、SOD 活性: 每组取 6 只小鼠 DRG 组织, 加入细胞裂解液进行冰浴匀浆, 离心取上清液, 按照碧云天脂质氧化检测试剂盒以及总 SOD 活性检测试剂盒说明书检测各组细胞内 MDA 含量、SOD 活性。

(11) 透射电镜: 每组各取 3 只小鼠, 腹腔注射异氟烷麻醉, 采用放血法处死后, 迅速取出腰椎 L<sub>3</sub>~L<sub>5</sub> 的 DRG 组织并放入电镜保存液中进行固定, 4℃ 固定 12 h, 使细胞形态和结构稳定。依次用 50%、70%、90%、100% 乙醇对样品进行脱水处理,



每次 15 min, 去除细胞内水分。将脱水后的样品放入包埋剂中, 在 60℃ 左右聚合固化, 使样品形成硬块。使用超薄切片机将包埋好的样品切成 100 nm 左右的薄片。将切片放入醋酸铀和柠檬酸铅染液中染色, 将染色后的切片放在透射电镜下观察。

(12) 免疫印迹实验: 每组取 6 只小鼠 DRG 组织, 加入含 1% 蛋白酶抑制剂的裂解液和适量磁珠, 研磨后按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。将蛋白样本与 Loading Buffer 混合, 100℃ 加热 10 min 变性备用。制备 SDS-PAGE 凝胶并将变性好的蛋白样本和 marker 加载到凝胶加样孔中, 以 80 V 电压过浓缩胶, 120 V 电压过分离胶分离蛋白质。用 400 mA 恒流转膜 60 min, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h。用一抗 (PGC-1 $\alpha$  1:5000, HO-1 1:2000,  $\beta$ -actin 1:5000) 4℃ 孵育过夜, 再用二抗 (山羊抗兔 IgG 1:5000) 室温孵育 2 h。最后用化学发光液显色, 于凝胶图像分析仪中曝光。Image J 软件分析条带灰度值。

#### 4. 统计学分析

所有数据通过 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行数据统计和数据分析。如果满足正态性和方差齐性, 多组数据组间比较采用单因素或双因素重复测量方差分析, 两两比较采用 Tukey's 检验, 不符合正态分布的数据采用非参数检验, 计量资料采用均数  $\pm$  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. PACAP 可缓解 PIPN 小鼠痛觉过敏

为研究 PACAP 对 PIPN 小鼠体重的影响以及镇痛效果, 采用体重称和 50% MWT、TWL 及冷板反应潜伏期等核心痛觉行为学指标检测小鼠体重以及其对机械性疼痛刺激的敏感性及热刺激和冷刺激的疼痛反应时长。结果显示, PTX、PACAP 给药对小鼠体重无显著影响 (见图 2A)。与 Vehicle 组相比, PTX 组小鼠在第 7、14 天后爪 50% MWT 显著降低 ( $P < 0.01$ , 见图 2B)、TWL ( $P < 0.01$ , 见图 2C) 和冷板反应潜伏期显著缩短 ( $P < 0.01$ , 见图 2D)。与 PTX 组相比, PTX + PACAP (30  $\mu$ g/kg) 组小鼠各指标无显著改变; 而 PTX + PACAP (100  $\mu$ g/kg) 组小鼠在第 7、14 天后爪 50% MWT ( $P < 0.05$ , 见图 2B) 显著升高、TWL ( $P < 0.01$ , 见图 2C) 和冷板反应潜伏期显著延长 ( $P < 0.01$ , 见图 2D), 提示高剂量 PACAP 对 PIPN 小鼠具有

明确的镇痛作用。

#### 2. PACAP 可减少 PTX 诱导的小鼠原代 DRG 细胞 ROS 含量并提高 MMP 水平

为探究 PACAP 对 PTX 诱导的小鼠原代 DRG 细胞中 ROS 和 MMP 的影响, 本研究采用 ROS 及 MMP 试剂盒对小鼠原代 DRG 细胞进行 ROS 含量和 MMP 水平检测。研究结果显示, 与 Vehicle 组相比, PTX 组原代 DRG 细胞 ROS 生成量显著增多 ( $P < 0.01$ , 见图 3A, 3B)。与 PTX 组相比, PTX + PACAP 组细胞内 ROS 含量显著减少 ( $P < 0.01$ , 见图 3A, 3B)。JC-1 是一种阳离子脂质荧光染料, 存在单体和多聚体两种形式。JC-1 单体发绿色荧光, 而 JC-1 多聚体发红色荧光。当 MMP 降低, JC-1 多聚体从线粒体中释放, 此时发出的红光强度减弱, 主要以 JC-1 单体形式存在于细胞质中, 并发出绿色荧光。根据这一特征检测 MMP 的变化。与 Vehicle 组相比, PTX 组 MMP 显著下降 ( $P < 0.01$ , 见图 3C, 3D); 与 PTX 组相比, PTX + PACAP 组细胞 MMP 显著上升 ( $P < 0.01$ , 见图 3C, 3D)。综上所述, PACAP 可通过减少 ROS 并改善 MMP, 保护 PTX 诱导的小鼠原代 DRG 细胞。

#### 3. PACAP 可减轻 DRG 组织氧化应激

为评估 PACAP 对小鼠 DRG 组织氧化应激水平的影响, 本研究对 DRG 组织中氧化应激相关指标 (MDA 含量和 SOD 活性) 进行检测。研究结果表明, 与 Vehicle 组相比, PTX 组小鼠 DRG 中氧化应激标志物 MDA 含量显著增加 ( $P < 0.01$ , 见图 4A)、SOD 活性显著降低 ( $P < 0.01$ , 见图 4B); 而与 PTX 组相比, PTX + PACAP (30  $\mu$ g/kg) 组 MDA 含量和 SOD 活性无显著变化。PTX + PACAP (100  $\mu$ g/kg) 组小鼠 DRG 中 MDA 含量显著减少 ( $P < 0.01$ , 见图 4A), SOD 活性显著升高 ( $P < 0.01$ , 见图 4B)。表明高剂量 PACAP 对 PIPN 小鼠 DRG 组织氧化应激具有显著的保护作用。

#### 4. PACAP 可保护 PIPN 小鼠 DRG 组织中线粒体形态

为探究 PACAP 对 PIPN 小鼠 DRG 组织线粒体形态的影响, 本研究利用透射电子显微镜观察各组小鼠 DRG 组织中的线粒体形态。电镜下可观察到: Vehicle 组线粒体呈椭圆形双层膜封闭结构、外膜光滑完整, 内膜折叠嵴部排列整齐、结构完整; 而 PTX 组小鼠 DRG 组织线粒体形态发生改变, 出现大量空泡化线粒体, 部分线粒体外膜断裂, 嵴融合消失。与 PTX 组相比, PTX + PACAP (30  $\mu$ g/kg) 组线粒体形态无变化; 而 PTX + PACAP (100  $\mu$ g/kg) 组

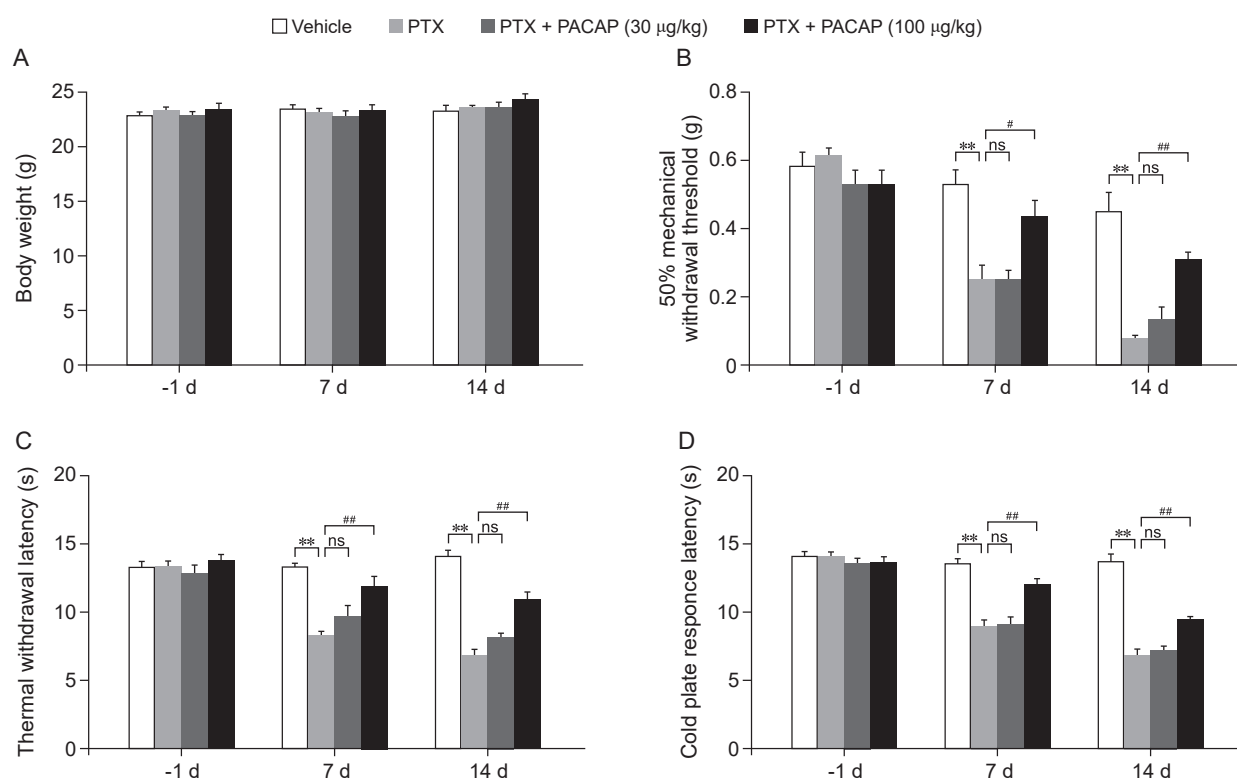


图2 PACAP对各组小鼠体重以及行为学的影响 ( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 各组小鼠在第-1、7、14天体重的变化; (B) 各组小鼠在第-1、7、14天右后足50% MWT变化; (C) 各组小鼠在第-1、7、14天TWL变化; (D) 各组小鼠在第-1、7、14天冷板反应潜伏期变化

\*\* $P < 0.01$ , 与Vehicle组相比; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与PTX组相比

Fig. 2 Effects of PACAP on body weight and behavior of mice in each group ( $n=8$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) Changes in body weight on days -1, 7, and 14 in each group of mice; (B) Changes in 50% MWT of the right hind paw on days -1, 7, and 14 in each group of mice; (C) Changes in TWL on days -1, 7, and 14 in each group of mice; (D) Changes of the cold plate response latency on days -1, 7, and 14 in each group of mice.

\*\* $P < 0.01$ , compared with Vehicle group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , compared with PTX group.

空泡线粒体数量减少、线粒体嵴数量增多 (见图5)。表明高剂量PACAP对PIP<sub>N</sub>小鼠DRG组织线粒体形态具有保护作用。

#### 5. PACAP可增加PIP<sub>N</sub>小鼠DRG组织中PGC-1 $\alpha$ 、HO-1蛋白的表达

为深入探究PACAP对PTX诱发的小鼠PIP<sub>N</sub>的潜在作用机制,本研究提取各组小鼠的DRG组织蛋白进行检测。Western blot结果显示,与Vehicle组相比,PTX组PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.01$ , 见图6A, 6B)、HO-1蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ , 见图6A, 6C)。与PTX组相比,PTX + PACAP (30 µg/kg)组中PGC-1 $\alpha$ 和HO-1蛋白表达无显著变化;而PTX + PACAP (100 µg/kg)组PGC-1 $\alpha$  ( $P < 0.01$ , 见图6A, 6B)与HO-1蛋白 ( $P < 0.01$ , 见图6A, 6C)表达显著增多。表明高剂量PACAP可能通过上调PGC-1 $\alpha$ 和HO-1蛋白表达,进而促进线粒体功能恢复和增强抗氧化能力。

#### 讨论

本研究首次系统地探讨了PACAP对PTX诱发的小鼠PIP<sub>N</sub>作用及其潜在机制。研究结果表明,PACAP能够显著缓解PTX诱发的小鼠PIP<sub>N</sub>症状,其作用机制可能与抑制氧化应激反应和调节线粒体功能密切相关。这一发现不仅为PACAP在神经保护和镇痛领域的应用提供了新的证据,还为改善癌症病人的生活质量提供了潜在的新策略。

PTX是一种常用的抗癌药物,但其诱发的小鼠PIP<sub>N</sub>严重影响病人的生活质量。PIP<sub>N</sub>的主要症状包括机械性、热性和冷性痛觉过敏。其发病机制复杂,涉及氧化应激、线粒体功能障碍以及神经炎症等多个方面<sup>[5,16]</sup>。本研究采用动物实验系统地评估了PACAP对PIP<sub>N</sub>小鼠的镇痛效果。结果显示,PIP<sub>N</sub>组小鼠表现出明显的机械性、热性和冷性痛觉过敏,而PACAP (100 µg/kg)处理能够显著改善



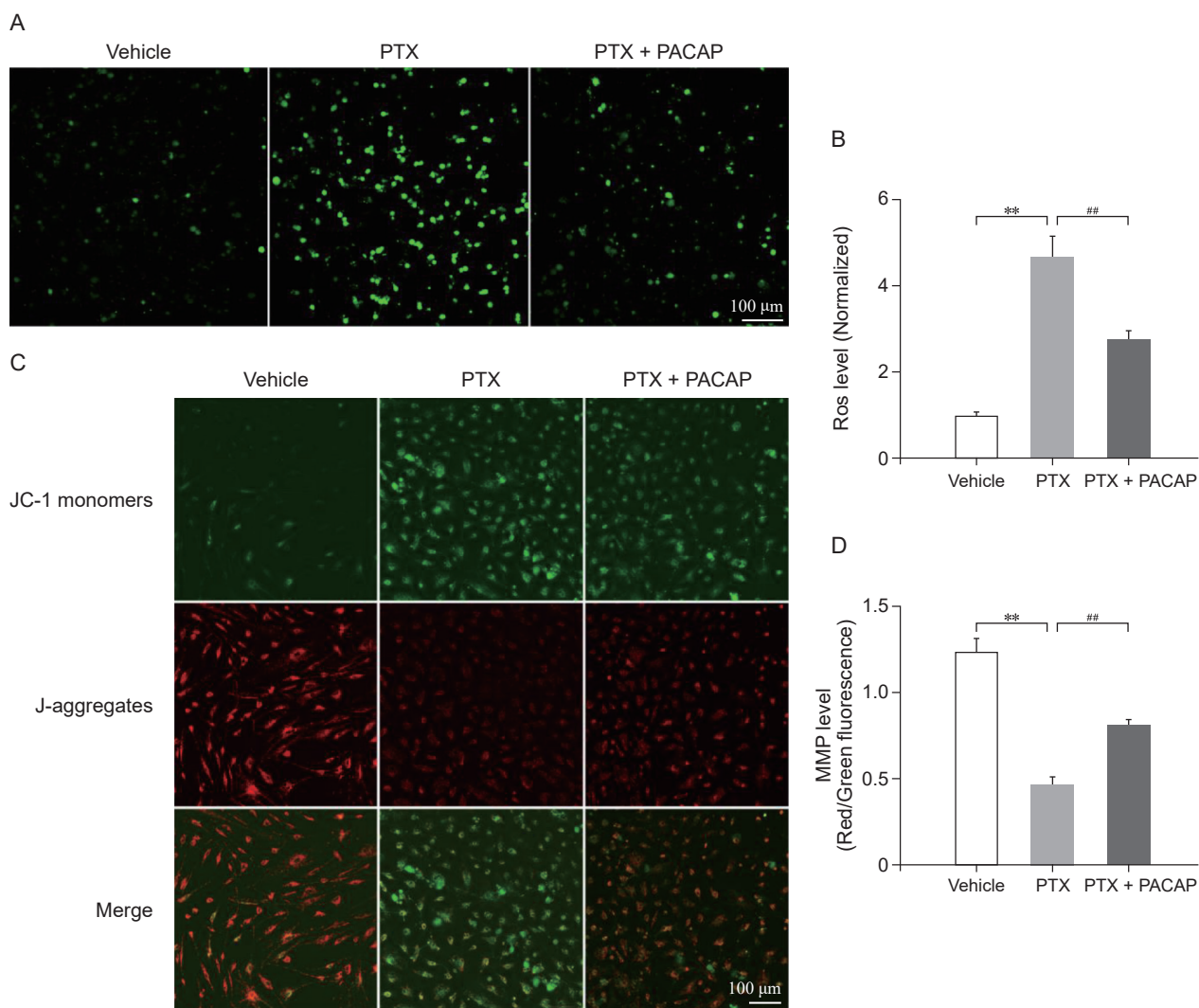


图3 各组小鼠原代 DRG 细胞 ROS 含量与 MMP 水平 ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 小鼠原代 DRG 细胞中 ROS 生成量 ( $20\times$ ), 标尺 =  $100\ \mu\text{m}$ ; (B) 经对照组归一化的 ROS 生成量统计图; (C) 小鼠原代 DRG 细胞 MMP 水平 ( $20\times$ ), 标尺 =  $100\ \mu\text{m}$ , 红色荧光表示 JC-1 聚集体, 绿色荧光表示 JC-1 单体, MMP = 红色荧光/绿色荧光; (D) MMP 水平统计图

\*\* $P < 0.01$ , 与 Vehicle 组相比; ## $P < 0.01$ , 与 PTX 组相比

Fig. 3 ROS content and MMP level in primary DRG cells of mice in each group ( $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) ROS production in mouse primary DRG cells ( $20\times$ ), Scale bar =  $100\ \mu\text{m}$ ; (B) Statistical diagram of ROS production normalized by vehicle group; (C) MMP level of primary dorsal root ganglion neurons in various groups of mice ( $20\times$ ), Scale bar =  $100\ \mu\text{m}$ ; Red fluorescence indicates JC-1 aggregates, Green fluorescence indicates JC-1 monomers, MMP level = red fluorescence/green fluorescence; (D) Statistical graph of MMP level.

\*\* $P < 0.01$ , compared with Vehicle group; ## $P < 0.01$ , compared with PTX group.

这些症状。表明 PACAP 对 PTX 诱发的 PIPN 具有显著的缓解作用, 这与 PACAP 在多种神经损伤动物模型 (如糖尿病周围神经病理性疼痛模型) 中镇痛效果一致<sup>[17]</sup>。而低剂量的 PACAP [PTX + PACAP ( $30\ \mu\text{g/kg}$ )] 对 PTX 诱导的小鼠痛觉过敏无明显改善作用。因此, 本研究推测 PACAP 对 PIPN 的治疗效果具有剂量依赖性。

PTX 诱发的外周神经损伤与氧化应激密切相

关<sup>[18]</sup>。氧化应激是指体内 ROS 与抗氧化剂之间的平衡被打破, 导致 ROS 在细胞和组织中过度积累, 进而损伤细胞结构和功能<sup>[19]</sup>。首先, 本研究在细胞实验中发现 PTX 可导致原代 DRG 细胞内 ROS 含量明显增多, 提示氧化应激在 PTX 诱发的神经损伤中可能起到了关键作用。而 PACAP 给药可减少原代 DRG 细胞 ROS 含量, 表明 PACAP 可减轻 PTX 引起的原代 DRG 细胞氧化应激损伤。这一结果与既

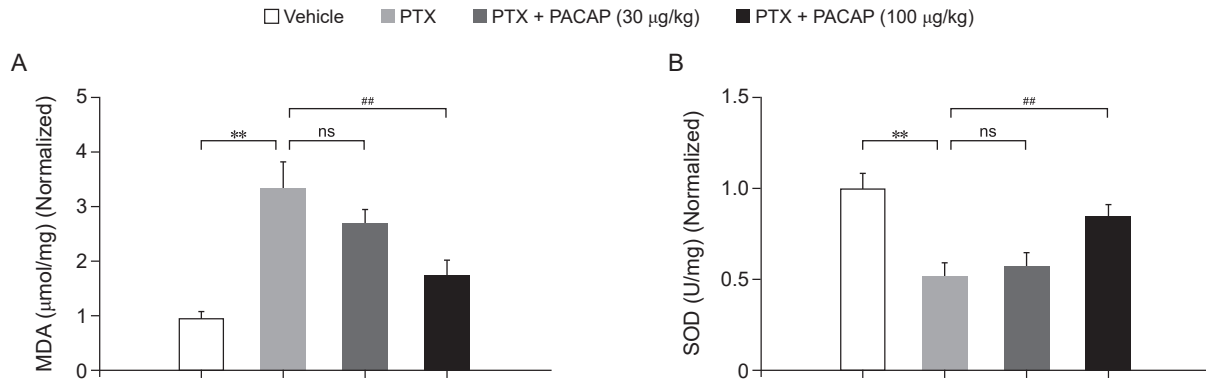


图4 小鼠 DRG 组织中氧化应激指标 ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 经对照组归一化的 DRG 组织中 MDA 的含量统计图; (B) 经对照组归一化的 DRG 组织中 SOD 的活性统计图  
 $**P < 0.01$ , 与 Vehicle 组相比;  $^{##}P < 0.01$ , 与 PTX 组相比

Fig. 4 Oxidative stress indexes in DRG tissues of mice ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) Statistical diagram of MDA content in DRG tissues normalized by Vehicle group; (B) Statistical diagram of SOD activity in DRG tissues normalized by Vehicle group.

$**P < 0.01$ , compared with Vehicle group;  $^{##}P < 0.01$ , compared with PTX group.

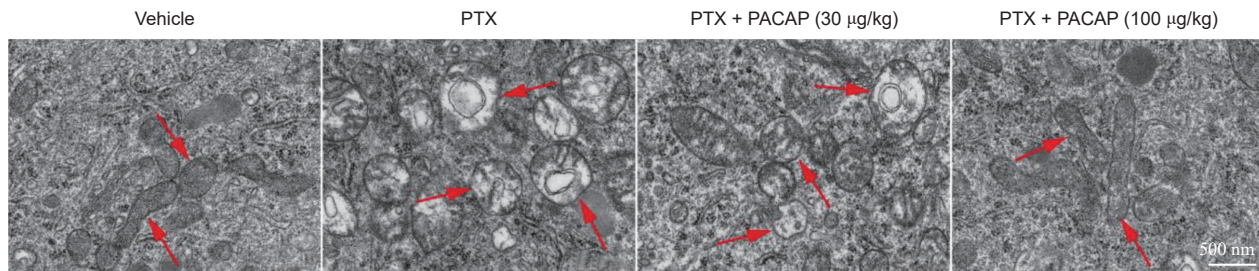


图5 透射电镜观察各组小鼠 DRG 组织中中线粒体形态

各组 DRG 组织中中线粒体形态 (12,000 $\times$ ), 标尺 = 500 nm, 红色箭头所指为线粒体

Fig. 5 The morphology of mitochondria in DRG tissues was observed by transmission electron microscopy

Mitochondrial morphology in DRG tissues (12,000 $\times$ ), Scale bar = 500 nm, the red arrows point to the mitochondria.

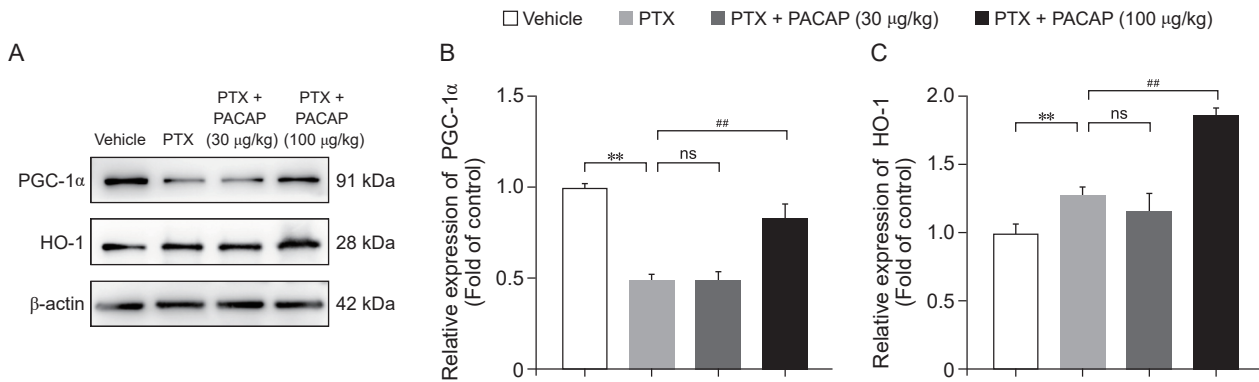


图6 各组小鼠 DRG 组织中 PGC-1 $\alpha$  和 HO-1 蛋白表达水平 ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 各组小鼠 DRG 组织 PGC-1 $\alpha$ 、HO-1 蛋白印记图; (B) PGC-1 $\alpha$  蛋白经对照组归一化后的统计图; (C) HO-1 蛋白经对照组归一化后的统计图

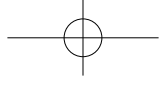
$**P < 0.01$ , 与 Vehicle 组相比;  $^{##}P < 0.01$ , 与 PTX 组相比

Fig. 6 Protein expression levels of PGC-1 $\alpha$  and HO-1 in DRG tissues of mice ( $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) Representative Western blot images showing the expression of PGC-1 $\alpha$  and HO-1 proteins in DRG tissues of each group; (B) Statistical diagram of PGC-1 $\alpha$  protein normalized by vehicle group; (C) Statistical diagram of HO-1 protein normalized by vehicle group.

$**P < 0.01$ , compared with Vehicle group;  $^{##}P < 0.01$ , compared with PTX group.





往研究中发现的 PACAP 具有抗氧化作用相吻合<sup>[20]</sup>, 该结果进一步证实 PACAP 对神经细胞的保护效应。MDA 是脂质过氧化的终产物之一, 常被用作评估细胞氧化损伤的指标。而 SOD 是一类重要的抗氧化酶, 能够催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢和氧气, 从而减少自由基对细胞的损伤。两者常用于评估机体氧化应激状态<sup>[21]</sup>。本研究发现, PTX 组小鼠 DRG 组织中 MDA 含量升高, 而 SOD 活性降低, 表明 PTX 诱导了显著的氧化应激反应。高剂量 PACAP 处理后, 小鼠 DRG 组织中 MDA 水平降低, SOD 活性增强。以上结果表明, PACAP 通过减少 ROS 积累和调节抗氧化酶活性, 显著降低了氧化应激水平, 从而减轻了 PTX 诱导的神经细胞损伤。

线粒体是细胞能量代谢和氧化应激反应的核心细胞器, 其功能障碍与神经病理性疼痛密切相关<sup>[22]</sup>。据报道, PACAP 可维持线粒体功能, 减少氧化应激和细胞凋亡, 此外, 还能提高线粒体的呼吸链效率并且增加 ATP 合成<sup>[20]</sup>。本研究发现, PTX 处理的原代 DRG 细胞 MMP 水平明显下降, 而 PACAP 可部分恢复 MMP。此外, 通过电镜观察发现, PTX 组小鼠 DRG 组织中异常形态线粒体显著增多, 而高剂量 PACAP 处理能够改善线粒体形态。表明 PACAP 可减轻 PTX 诱导的 DRG 线粒体损伤。

PACAP 调控 PGC-1 $\alpha$  鲜见报道。本研究发现, 高剂量 PACAP 能通过增加 PGC-1 $\alpha$  的表达来调节线粒体功能。PGC-1 $\alpha$  是一种关键的线粒体生物合成调节因子, 其表达增加能够促进线粒体的生物合成和功能恢复, 从而减轻氧化应激损伤<sup>[23]</sup>。且在神经病理性疼痛的背景下, PGC-1 $\alpha$  的表达下调通常与线粒体功能障碍、氧化应激增加, 以及神经细胞损伤密切相关<sup>[24]</sup>。本研究还发现, 高剂量 PACAP 显著提高了 HO-1 蛋白的表达。HO-1 是一种应激反应蛋白, 具有抗氧化和抗炎作用, 其表达增加已被证实可以显著缓解神经病理性疼痛模型中的疼痛超敏现象。HO-1 的上调可能是机体对氧化应激的一种代偿反应, 而 PACAP 通过增加 HO-1 蛋白表达, 进一步增强了机体的抗氧化能力, 减轻了神经细胞的损伤。这些发现为 PACAP 的神经保护机制提供了新的视角<sup>[25]</sup>。

本研究存在以下不足之处: ①本研究虽揭示了 PACAP 对化疗痛有保护作用, 仅浅尝辄止探究部分信号通路。未来需深入研究, 如借助基因编辑技术, 构建特定基因敲除或过表达动物模型, 明确 PACAP 作用关键靶点与上下游调控机制, 全面解析其镇痛分子机制。②给药方式单一: 仅采用腹腔注射, 未

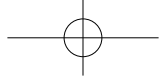
考量其他给药途径。后续应探索鞘内注射、局部给药等, 评估不同方式对化疗痛的保护效果, 确定最佳给药途径, 提升治疗精准性与安全性。

综上所述, PACAP 通过抑制氧化应激反应、调节线粒体功能, 显著减轻了 PTX 诱发的小鼠 PIPN 症状。本研究首次系统地揭示了 PACAP 在 PIPN 中的作用机制, 为开发减少化疗不良反应的新策略提供了理论基础。未来研究将进一步深入探索 PACAP 的作用机制, 并优化其临床应用潜力, 为改善癌症病人的生活质量提供新的方向。

利益冲突声明: 作者声明本文无利益冲突。

### 参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024[J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1):12-49.
- [2] Abu Samaan TM, Samec M, Liskova A, *et al.* Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer[J]. Biomolecules, 2019, 9(12):789.
- [3] Powell MA, Filiaci VL, Hensley ML, *et al.* Randomized phase III trial of paclitaxel and carboplatin versus paclitaxel and ifosfamide in patients with carcinosarcoma of the uterus or ovary: an nrg oncology trial[J]. J Clin Oncol, 2022, 40(9):968-977.
- [4] Ren S, Chen J, Xu X, *et al.* Camrelizumab plus carboplatin and paclitaxel as first-line treatment for advanced squamous NSCLC (CameL-Sq): a phase 3 trial[J]. J Thorac Oncol, 2022, 17(4):544-557.
- [5] Wu S, Xiong T, Guo S, *et al.* An up-to-date view of paclitaxel-induced peripheral neuropathy[J]. J Cancer Res Ther, 2023, 19(6):1501-1508.
- [6] 张玲, 朱静. 紫杉醇所致周围神经病变的机制研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(3):204-209.
- [7] Chang TW, Yang FY, Liu YC, *et al.* Gabapentinoids for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: systematic review and meta-analysis[J]. BMJ Support Palliat Care, 2024, 14(3):269-278.
- [8] Bernard K, Dickson D, Anglin BL, *et al.* PACAP glycosides promote cell outgrowth in vitro and reduce infarct size after stroke in a preclinical model[J]. Neurosci Lett, 2024, 836:137883.
- [9] Yamashita M, Shibato J, Rakwal R, *et al.* Molecular and physiological functions of PACAP in sweat secretion[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5):4572.
- [10] Douiri S, Bahdoudi S, Hamdi Y, *et al.* Involvement of endogenous antioxidant systems in the protective activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide against hydrogen peroxide-induced oxidative damages in cultured rat astrocytes[J]. J Neurochem, 2016, 137(6):913-930.



- [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  $\alpha$  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  $\alpha$  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 $\alpha$  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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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.