

• 基础研究 •

过表达 Pdk4 对脊神经结扎小鼠线粒体及神经元电生理活性的影响

郑军凡 林爱金 桂 锋 陈述荣 陈 昕

【摘 要】 目的 考察过表达丙酮酸脱氢酶激酶 4 (Pdk4) 对脊神经结扎小鼠线粒体及神经元电生理活性的影响, 进一步揭示神经病理性疼痛的发病机制。**方法** 选用雄性 C57BL/6 小鼠构建脊神经结扎 (SNL) 模型并分为假手术组、SNL 模型组及 SNL 模型+Pdk4 过表达组。SNL 模型+Pdk4 过表达组采用脊髓背角内病毒注射法注射 Pdk4 过表达病毒。采用不同规格细丝检测足底机械性疼痛阈值; 采用 Western blot 测定小鼠脊髓背角 Pdk4、LC3-II、LC3-I 蛋白表达; 采用电子显微镜观察线粒体形态; 采用膜片钳技术测定神经元电生理指标。**结果** 过表达 Pdk4 后, 小鼠机械性疼痛阈值降低 ($P < 0.05$); 透射电镜观察显示线粒体肿胀更明显, 嵴结构进一步紊乱且部分出现空泡化; Pdk4 蛋白表达量升高 ($P < 0.05$), LC3-II/LC3-I 比值升高 ($P < 0.05$); 小鼠脊髓背角内神经元自发性兴奋性突触后电流增大, 动作电位释放个数增多, 基强度降低, 输入阻抗降低 ($P < 0.05$)。**结论** Pdk4 表达上调使小鼠疼痛阈值降低, 增加疼痛敏感性, 可能与脊髓背角线粒体形态变化、自噬相关信号通路激活及神经元兴奋性增强有关。

【关键词】 脊神经; 线粒体; 神经元; 电生理

【中图分类号】 R329.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2025)01-0073-05

Effects of Pdk4 overexpression on mitochondrial and neuronal electrophysiological activities in spinal nerve ligation mice

ZHENG Junfan, LIN Aijin, GUI Feng, CHEN Shurong, CHEN Xin

The First Department of Rehabilitation, Fuzhou Second General Hospital, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Pdk4 overexpression on mitochondrial and neuronal electrophysiological activities in spinal nerve ligation mice, and to further reveal the pathogenesis of neuropathic pain. **Methods** Male C57BL/6 mice were selected to establish the spinal nerve ligation model, and they were divided into the sham-operation group, the SNL model group, and the SNL model+Pdk4 overexpression group. The SNL model+Pdk4 overexpression group was injected with Pdk4-overexpressing virus by intraspinal dorsal horn viral injection. Filaments of different specifications were used to detect the plantar mechanical pain threshold. Western blot was used to determine the protein expressions of Pdk4, LC3-II, and LC3-I in the spinal dorsal horn of mice. Electron microscope was used to observe the mitochondrial morphology. The patch-clamp technique was used to measure the neuronal electrophysiological indexes. **Results** After Pdk4 overexpression, the mechanical pain threshold of mice decreased ($P < 0.05$). Transmission electron microscopy showed more obvious mitochondrial swelling, further disorder of the cristae structure, and partial vacuolization. The expression level of Pdk4 protein increased ($P < 0.05$), and the ratio of LC3-II/LC3-I increased ($P < 0.05$). In the spinal dorsal horn of mice, the spontaneous excitatory postsynaptic current of neurons increased, the number of action potential releases increased, the rheobase decreased, and the input impedance decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The up-regulation of Pdk4 expression reduces the pain threshold of mice and increases pain sensitivity, which may be related to the morphological changes of mitochondria in the spinal dorsal horn, the activation of autophagy-related signaling pathways, and the enhancement of neuronal excitability.

【Key words】 spinal nerve; mitochondria; neuron; electrophysiology

基金项目: 2023 年福州市卫健系统科技计划中青年科研项目 (2023-S-wq10); 福建省创伤骨科急救与康复临床医学研究中心项目 (2020Y2014)

作者单位: 福建省福州市第二总医院康复一科, 福州 350007

DOI: 10.20148/j.fmj.2025.01.023

随着人口老龄化及慢性疾病的增加,慢性疼痛的患病率逐年上升,给患者的生活质量和社会经济带来了沉重负担^[1-2]。慢性疼痛的发生与多种因素有关,其中脊神经损伤是导致神经病理性疼痛的重要原因之一^[3-4]。丙酮酸脱氢酶激酶 4 (pyruvate dehydrogenase kinase 4, Pdk4) 作为一种关键分子,近年来在神经病理性疼痛的研究中受到了广泛关注,本研究拟向脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 小鼠模型脊髓背角内注射 Pdk4 过表达病毒,来考察 Pdk4 对小鼠线粒体及神经元电生理活性的影响,进一步揭示神经病理性疼痛的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 C57BL/6 小鼠 60 只 [江苏艾菱菲生物科技有限公司,生产许可证号 SCXK (苏) 2021-0011,质量合格证号 003428];注射用 Pdk4 过表达病毒 [吉凯基因科技 (上海) 股份有限公司];复合麻醉剂 (宜昌人福药业有限责任公司);RIPA 裂解液 (上海博尔森生物科技有限公司);BCA 法蛋白定量试剂盒 (美国 Thermofisher 公司);5×SDS 上样缓冲液 (广州博鹭腾生物科技有限公司);Nanoprobes 银加强试剂盒, HQ Silver-Solution A、B、C (美国 Nanoprobes 公司);人工脑脊液 (ACSF)、脑脊液 (CSF) (美国 BOSTER 公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.2 SNL 模型的构建

随机取 40 只 6~8 周龄的雄性 C57BL/6 小鼠,腹腔内注射复合麻醉剂后,剪除其背部毛发,消毒并在后正中左侧外 5 mm 处予 1 cm 纵切口。再切开小鼠胸腰筋膜,显微镜下露出第 6 腰椎的横突并咬断,玻璃分针柔和分离 L₅ 脊神经并使用 6.0 号丝线结扎,最后逐层缝合。剩下的 20 只作为假手术组不结扎脊神经,其他手术方法同上。

1.3 实验分组及脊髓背角内病毒注射

按处理方式的不同,实验分为假手术组 (20 只)、SNL 模型组 (20 只) 及 SNL 模型+Pdk4 过表达组 (20 只)。SNL 模型+Pdk4 过表达组采用脊髓背角内病毒注射法注射 Pdk4 过表达病毒,具体步骤为:用 2% 异氟烷将小鼠麻醉,固定在脊髓定位注射仪上,小鼠双眼抹匀凡士林用以保护小鼠。碘伏消毒后沿着脊柱方向开 3~4 cm 长的术野,采用显微剪轻轻分离脊柱两侧肌肉和肌腱。将微量注射器固定于注射架上并进行定位,结束后按

照左侧 0.25~0.35 mm、深度 0.25 mm 的位点进行注射,留针 10 min,清理伤口并进行分层缝合。对照组、SNL 模型组不做处理。

1.4 机械性疼痛行为检测

将所有小鼠置于行为学检测室提前适应 20 min,序贯采用 0.008、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0 及 1.4 g 的 Von-frey 细丝检测小鼠足底的机械性疼痛阈值,检测方向为垂直于小鼠的足底。待小鼠明显出现抬足、缩足、舔足等行为时,表明即时的 Von-frey 细丝规格为此刻小鼠的机械性疼痛阈值。

1.5 小鼠脊髓背角 Pdk4、LC3-II、LC3-I 蛋白表达的检测

用 2% 异氟烷麻醉小鼠后,于冰上迅速断头,用 5 mL 注射器迅速吹出脊髓,用手术刀切取术侧脊髓背角,并放入干净的 1.5 mL 离心管中,放置于冰上待用。每管组织中加入 200 μ L 含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,超声粉碎后在冰上放置 30 min。将离心管置于高速离心机内,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液,移入新的 1.5 mL 离心管中。使用 Pierce BCA 法蛋白定量试剂盒,测定每个样品的总蛋白浓度。计算后,用 5×SDS 上样缓冲液按 4:1 加入到蛋白样品中进行稀释,使所有样品的蛋白浓度相同,99 $^{\circ}$ C 加热 5 min,蛋白质变性后置于一 20 $^{\circ}$ C 保存。配置 10% 的 SDS-PAGE 凝胶,加入变性后的蛋白样本和预染蛋白 Marker 后开始电泳,结束后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中室温封闭 1 h,加入 Pdk4、LC3-II、LC3-I 的一抗,孵育过夜,TBST 洗涤 3 次后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗,室温孵育 1 h,再次洗涤 3 次,加入增强型化学发光试剂 (ECL) 发光液,以 GAPDH 为内参,采用化学发光成像系统对结果进行定量分析。

1.6 小鼠线粒体形态的检测

不同组小鼠采用 2% 异氟烷麻醉后,采用事先预冷的 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液进行灌注冲洗,之后灌入含有 4% 多聚甲醛和 0.075% 戊二醛的混合固定液,取出脊髓腰膨大节段后浸泡于混合固定液中 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min。将样本切成小块,按照 Nanoprobes 银加强试剂盒说明书 (预先将 HQ Silver-Solution A、B、C 按 1:1:1 混合),将样本置于银加强混合液中,在室温下避光反应 8 min。颜色加深后,迅速用双蒸馏水 (DDW) 漂洗 20 s

终止反应。依次用 0.05 mol/L Tris 缓冲盐水 (TBS) 和 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (PB) 各漂洗 3 次, 每次 5 min。随后置于 1% 锇酸中固定 1 h。固定结束后使用 PB 和 DDW 各漂洗 3 次, 每次 5 min。将固定后的样本用 0.05 mol/L TBS 漂洗 2 次, 每次 5 min, 随后用 DDW 漂洗 3 次, 每次 5 min。漂洗后的样本置于 50% 乙醇中 10 min, 紧接着将其移入 1% 醋酸双氧铀复染 12 h, 再经梯度乙醇 70%、80%、90%、95%、100%、100% 各 10 min 和 2 次环氧丙烷每次 10 min 脱水。室温下将样本浸入包埋剂中, 12 h 后将样本压片, 并置于恒温干燥箱内 60 °C 聚合 48 h。待树脂聚合后, 光学显微镜下观察, 取样品表面神经节密集部位 1 mm×1 mm, 用 502 胶水将其固定于预成包埋模块顶部。使用电子显微镜, 对不同放大倍率下的样本观察并拍照、保存。

1.7 小鼠脊髓背角内神经元电生理活性的检测

首先配置高糖人工脑脊液 (ACSF) 和脑脊液 (CSF)。将小鼠快速断头取出脊髓腰膨大节段, 迅速剥离脊髓, 采用震荡切片器将脊髓节段切成 300 μ m, 待切片复苏 0.5 h 时, 将脑片移至记录槽。用蠕动泵循环灌流 ACSF, 同时持续通入 95% O_2 /5% CO_2 混合气。用微电极拉制仪拉制玻璃电极。灌注入电极内液后, 连接至膜片钳系统, 测试电极尖端阻抗。细胞封接和破膜后进行快电补偿, 记录细胞自发性兴奋性突触后电流、动作电位释放个数、基强度及输入阻抗。

1.8 统计学方法

采用 Graphpad 9.1 软件对结果进行分析, 计量资料以均数±标准差的形式表示, 多组间差异采用单因素方差分析, 两组间差异采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 Pdk4 对小鼠机械性疼痛阈值的影响

与假手术组相比, SNL 模型组小鼠的机械性疼痛阈值降低 ($P<0.05$); 在过表达 Pdk4 后, 小鼠的机械性疼痛阈值进一步降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同组小鼠的机械性疼痛阈值 ($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 机械性疼痛阈值 (g) |
|------------------|----------------|
| 假手术组 | 0.65 ± 0.08 |
| SNL 模型组 | 0.32 ± 0.05 |
| SNL 模型+Pdk4 过表达组 | 0.21 ± 0.03 |
| F 值 | 323.86 |
| P 值 | <0.001 |

2.2 过表达 Pdk4 对小鼠脊髓背角内线粒体形态结构的影响

透射电镜观察结果显示, 假手术组小鼠脊髓背角内线粒体形态正常, 嵴结构清晰。模型组小鼠脊髓背角内线粒体出现肿胀、嵴结构紊乱等现象。过表达 Pdk4 后, 线粒体肿胀更加明显, 嵴结构进一步紊乱, 部分线粒体出现空泡化。见图 1。

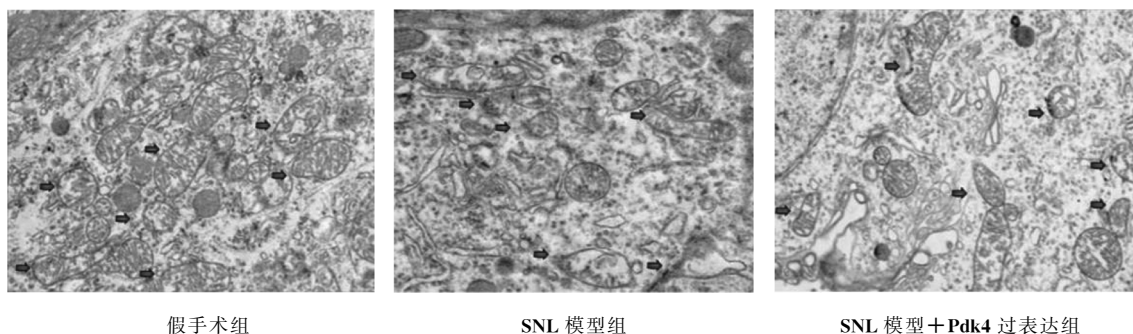


图 1 不同组小鼠脊髓背角内线粒体形态结构 (箭头所指为线粒体)

2.3 过表达 Pdk4 对小鼠脊髓背角内线粒体自噬相关信号通路的影响

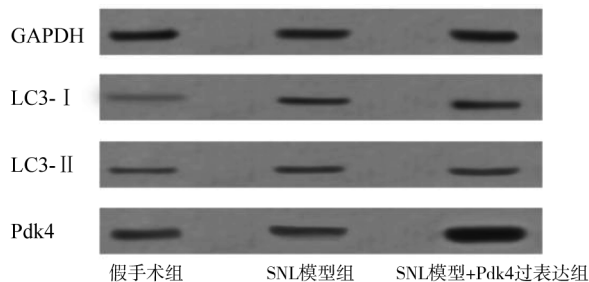
SNL 模型+Pdk4 过表达组的 Pdk4 蛋白出现过表达, 较假手术组与 SNL 模型组升高 ($P<0.05$); 与假手术组相比, SNL 模型组、SNL 模型+Pdk4 过表达组的 LC3-II 蛋白均升高 ($P<$

0.05), 且 SNL 模型+Pdk4 过表达组较 SNL 模型组升高的更加明显 ($P<0.05$); 3 组的 LC3-II/LC3-I 蛋白表达差异无统计学意义; SNL 模型组的 LC3-II/LC3-I 的比值升高 ($P<0.05$), 过表达 Pdk4 后, LC3-II/LC3-I 的比值进一步升高 ($P<0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 不同组小鼠 Pdk4、LC3-Ⅱ、LC3-Ⅰ蛋白的相对表达量及 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 的值 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | Pdk4 | LC3-Ⅱ | LC3-Ⅱ | LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ |
|--------------------|------------------------|-------------------------|-----------|-------------------------|
| 假手术组 | 0.98±0.09 | 0.18±0.04 | 0.72±0.08 | 0.25±0.06 |
| SNL 模型组 | 1.07±0.18 | 0.36±0.07 ^① | 0.70±0.09 | 0.51±0.09 ^① |
| SNL 模型 + Pdk4 过表达组 | 1.85±0.25 ^② | 0.52±0.09 ^{①②} | 0.68±0.08 | 0.76±0.11 ^{①②} |

注：与假手术组比较，^① $P < 0.05$ ；与 SNL 模型组比较，^② $P < 0.05$ 。

**图 2 不同组小鼠 Pdk4、LC3-Ⅱ、LC3-Ⅰ蛋白的相对表达**

2.4 过表达 Pdk4 对小鼠脊髓背角内神经元电生理活性的影响

与假手术组相比，SNL 模型组小鼠脊髓背角内神经元的自发性兴奋性突触后电流增大 ($P < 0.05$)，动作电位释放个数增多 ($P < 0.05$)，基强度降低 ($P < 0.05$)，输入阻抗降低 ($P < 0.05$)。过表达 Pdk4 后，神经元的这些电生理指标变化更加明显 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 不同组小鼠脊髓背角内神经元电生理活性 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 自发性兴奋性突触后电流/pA | 动作电位释放个数 | 基强度/mV | 输入阻抗/MΩ |
|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 假手术组 | 25.6±3.2 | 12.5±1.5 | -65.3±3.8 | 15.6±1.2 |
| SNL 模型组 | 42.3±4.5 ^① | 18.2±2.2 ^① | -58.2±4.2 ^① | 12.3±1.5 ^① |
| SNL 模型 + Pdk4 过表达组 | 58.7±5.8 ^{①②} | 25.6±2.8 ^{①②} | -52.3±4.5 ^{①②} | 10.2±1.8 ^{①②} |

注：与假手术组比较，^① $P < 0.05$ ；与 SNL 模型组比较，^② $P < 0.05$ 。

3 讨论

脊髓背角内疼痛信息的整合和传递是维持中枢敏化的关键过程，在疼痛的发生与发展中扮演着重要的角色，虽然关于脊髓背角在慢性疼痛中的作用研究越来越多，但相应的机制仍不明朗。Pdk4 的表达上调与疼痛敏感性的增加相关，Pdk4 可能通过多种途径影响疼痛阈值，其中一种可能是通过调节神经元的兴奋性，Pdk4 可以影响神经元细胞膜

上的离子通道，从而改变神经元的兴奋性^[5-6]。当神经元兴奋性增加时，疼痛信号的传递会更加容易，从而导致疼痛阈值降低。本研究结果显示，过表达 Pdk4 后小鼠的机械性疼痛阈值进一步降低，这与之前的一些研究结果相符。本研究还通过透射电镜观察了不同组的线粒体形态，结果表明，过表达 Pdk4 后小鼠脊髓背角内线粒体形态结构发生了明显变化，线粒体肿胀、嵴结构紊乱以及空泡化现象更加严重，这可能是由于 Pdk4 参与了线粒体的代谢调节过程。

Pdk4 是一种丙酮酸脱氢酶激酶，它可以抑制丙酮酸脱氢酶的活性，从而影响线粒体的能量代谢。当线粒体能量代谢受阻时，线粒体的形态结构可能会发生改变^[7-8]。同时本研究还考察了过表达 Pdk4 对线粒体自噬相关信号通路的影响，结果表明过表达 Pdk4 促进了小鼠脊髓背角内线粒体自噬相关信号通路的激活，表现为 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 的比值进一步升高，表明 Pdk4 在调节线粒体自噬过程中同样具有重要作用。线粒体自噬是一种重要的细胞自稳机制，它可以清除受损的线粒体，维持细胞内线粒体的质量和功能^[9-10]。当 Pdk4 过表达时，可能会过度激活线粒体自噬过程，导致线粒体的过度清除，从而影响细胞的正常功能。本研究的膜片钳技术检测结果显示，过表达 Pdk4 增强了小鼠脊髓背角内神经元的兴奋性，表现为自发性兴奋性突触后电流增大、动作电位释放个数增多、基强度降低以及输入阻抗降低，分析其可能的原因是 Pdk4 通过调节离子通道的活性，改变神经元的膜电位，从而增强神经元的兴奋性^[11-12]。此外，过表达 Pdk4 对线粒体形态结构和自噬相关信号通路的影响也可能间接影响神经元的电生理活性，如线粒体功能障碍可能会导致细胞内能量供应不足，从而影响神经元的电生理活动。

综上所述，Pdk4 表达上调会使小鼠疼痛阈值降低，增加疼痛敏感性，这可能与脊髓背角线粒体形态变化、自噬相关信号通路的激活、神经元兴奋性增强有关。

参考文献

- [1] Bouhassira D. Neuropathic pain: Definition, assessment and epidemiology [J]. Rev Neurol (Paris), 2019, 175 (1/2): 16-25.
- [2] Ahmad B. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment strategies [J]. Journal of Pain & Symptom Management, 2003, 25 (5 Suppl): 1-3.

- [3] Attal N, Bouhassira D. Advances in the treatment of neuropathic pain [J]. Curr Opin Neural, 2021, 34 (5): 631-637.
- [4] Petzke F, Tölle T, Fitzcharles M A, et al. Cannabis-based medicines and medical cannabis for chronic neuropathic pain [J]. CNS Drugs, 2022, 36 (1): 31-44.
- [5] Tan B, Wu X, Yu J, et al. The role of saponins in the treatment of neuropathic pain [J]. Molecules, 2022, 27 (12): 3956.
- [6] Windhorst U. Muscle proprioceptive feedback and spinal networks [J]. Brain Res Bull, 2007, 73 (4/5): 155-202.
- [7] Ran C, Kamalani G N A, Chen X. Modality-specific modulation of temperature representations in the spinal cord after injury [J]. J Neurosci, 2021, 41 (39): 8210-8219.
- [8] Choi S, Hachisuka J, Brett M A, et al. Parallel ascending spinal pathways for affective touch and pain [J]. Nature, 2020, 587 (7833): 258-263.
- [9] Koch S C, Acton D, Goulding M. Spinal circuits for touch, pain, and itch [J]. Annu Rev Physiol, 2018 (80): 189-217.
- [10] François A, Low S A, Sypek E I, et al. A Brainstem - spinal cord Inhibitory circuit for mechanical pain modulation by GABA and enkephalins [J]. Neuron, 2017, 93 (4): 822-839.
- [11] Ross S, Lowell B B, Wang Y, et al. Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain [J]. Cell, 2014, 159 (6): 1417-1432.
- [12] Huang Y, Chen S R, Pan H L. Calcineurin regulates synaptic plasticity and nociceptive transmission at the spinal cord level [J]. Neuroscientist, 2022, 28 (6): 628-638.

• 基础研究 •

丙泊酚对抑郁症模型小鼠抑郁样行为及学习记忆的影响研究

陈 峰

【摘要】 目的 探究丙泊酚对抑郁症模型小鼠抑郁样行为及学习记忆功能的影响。**方法** 取 40 只抑郁症模型小鼠，按照干预方法不同分为抑郁模型组和丙泊酚低剂量组（50 mg/kg）、中剂量组（75 mg/kg）、高剂量组（100 mg/kg），每组 10 只；另取 10 只正常小鼠，设为正常对照组。丙泊酚低、中、高剂量组小鼠腹腔注射丙泊酚，抑郁模型组、正常对照组小鼠给予等容量生理盐水腹腔注射。丙泊酚注射 24 h 后进行悬尾实验、强迫游泳实验和糖水偏好测试，间隔 7 d 后各组重新进行相应的药物（丙泊酚或生理盐水）处理，24 h 后进行 Morris 水迷宫测试。**结果** 抑郁模型组小鼠在悬尾状态和强迫游泳实验下静止时间均高于正常对照组，丙泊酚低、中、高剂量组小鼠在悬尾状态和强迫游泳实验下静止时间均低于抑郁模型组；抑郁模型组小鼠糖水消耗百分比低于对照组，丙泊酚低、中、高剂量组小鼠糖水消耗百分比均高于抑郁模型组；抑郁模型组小鼠逃避潜伏时间高于对照组，丙泊酚低、中、高剂量组小鼠逃避潜伏时间均低于抑郁模型组；抑郁模型组小鼠空间探索时间低于对照组，丙泊酚低、中、高剂量组小鼠空间探索时间均高于抑郁模型组。以上组间差异均有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。**结论** 丙泊酚可以缓解抑郁症小鼠的抑郁样行为，且会改善抑郁症小鼠的学习记忆功能。

【关键词】 丙泊酚；抑郁症模型；抑郁样行为；学习记忆

【中图分类号】 R74 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2025)01-0077-05

Study on effects of propofol on depressive-like behaviors and learning-memory in depressive model mice

CHEN Feng

Department of Anesthesiology, Changle District People's Hospital, Fuzhou, Fujian 350200, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of propofol on depressive-like behaviors and learning-memory functions in depressive model mice. **Methods** Forty depressive model mice were divided into a depressive model group and low-dose (50 mg/kg), medium-dose (75 mg/kg), high-dose (100 mg/kg) propofol groups according to different intervention methods, with 10 mice in each group. Another 10 normal mice were set as the normal control group. Mice in the low-dose, medium-dose, and high-dose propofol groups were intraperitoneally injected with propofol, while mice in the depressive model group and the normal

作者单位：福建省福州市长乐区人民医院麻醉科，福州 350200

DOI: 10.20148/j.fmj.2025.01.024