基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003826

探究CCI大鼠海马铁死亡与神经病理性疼痛诱发情绪紊乱的相关性分析

李亚南，薛纯纯，王开强
（上海中医药大学附属市中医医院疼痛科，上海 200071）

【摘 要】**目的：**观察坐骨神经慢性压迫损伤（chronic constriction injury，CCI）大鼠模型中海马区铁死亡现象及变化，探讨海马铁死亡与神经病理性疼痛（neuropathic pain，NP）诱发情绪紊乱的相关性。**方法：**32只SD雄性大鼠随机分为Sham组、CCI组、CCI+F组、CCI+E组，每组8只（n=8）。CCI+F组和CCI+E组于术后7 d分别腹腔注射铁抑素1（ferrostatin-1）（10 mg/kg）和铁死亡激活剂（erastin）（10 mg/kg），连续注射2 d。分别于术前，术后7 d、14 d测定机械足反射阈值（mechanical withdrawal threshold，MWT）、热缩足潜伏期（paw withdrawal threshold，PWL）、开放旷场实验（open field test，OFT）。术后14 d处死大鼠取海马组织，Western blot检测谷胱甘肽过氧化物4（glutathione peroxide 4，GPX4）、溶质载体家族成员11（solute carrier family 7 member 11，xCT）、铁蛋白重肽1（ferritin heavy polypeptide 1，FTH1），试剂盒检测丙二醛（malondialdehyde，MDA）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）表达水平，组织HE、尼氏、免疫荧光染色，透射电镜观察线粒体结构变化。**结果：**行为学结果，CCI组大鼠MWT和PWL值较Sham组术后7 d明显下降（P<0.001），术后14 d较7 d进一步下降（P<0.001）；与CCI相比，CCI+F组大鼠MWT和PWL术后14 d明显增加（P<0.001），CCI+E组MWT无明显变化，PWL明显降低（P<0.01）。CCI组大鼠术后14 d开放旷场实验测定（open field test，OFT）的总距离和中央跨格次数较Sham组明显减少（P<0.001），而静止不动时间明显增加（P<0.001）；与CCI组比，CCI+F组总距离和中央跨格次数明显增加，静止不动时间明显减少，CCI+E组OFT差异无统计学意义。生化结果，与Sham组相比，CCI组大鼠GPX4、xCT、FTH1明显下降（P<0.01），MDA明显增加，GSH明显下降。与CCI组相比，CCI+F组大鼠GPX4、xCT、FTH1明显增加（P<0.05），MDA明显下降（P<0.001），GSH明显增加（P<0.01）；CCI+E组xCT、FTH1表达明显减少，MDA、GSH差异无统计学意义。形态学结果，术后14 d CCI组较Sham组海马神经元形态损坏甚至坏死和尼氏小体减少，c-fos基因（FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog，c-fos）明显减少（P<0.05），线粒体嵴破坏明显，CCI+F组较CCI组海马神经元细胞形态完整，尼氏小体数量增加，c-Fos增加（P<0.05），线粒体相对完整；CCI+E组c-Fos、尼氏小体较CCI组差异无统计学意义。对术后14 d PWL、MWT、GPX4、OFT、c-Fos值做两两线性相关分析，结果显示呈正相关（P<0.01）。**结论：**外周神经损害诱发海马区铁死亡现象，出现情绪焦虑、抑郁，进而加剧铁死亡程度，加速中枢痛敏形成。

【关键词】神经病理性疼痛；铁死亡；海马；铁抑素1；铁死亡激活剂
【中图分类号】R741 【文献标志码】A 【收稿日期】2024-01-14

Association between hippocampal ferroptosis and emotional disorders induced by neuropathic pain in rats with chronic constriction injury

Li Yanan，*Xue Chunchun*，*Wang Kaiqiang*
（*Department of Pain Medicine*，*Shanghai Hospital of Traditional Chinese Medicine*，*Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the phenomenon of hippocampal ferroptosis and its change in a rat model of chronic constriction injury（CCI）of the sciatic nerve，as well as the association between hippocampal ferroptosis and emotional disorders induced by neuropathic pain. ***Methods***：A total of 32 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into Sham group，CCI group，CCI+F group，and CCI+E group，with 8 rats in each group. The rats in the CCI+F group and the CCI+E group were given intraperitoneal injection of Ferrostatin-1（10 mg/kg）and Erastin（10 mg/kg），respectively，since day 7 after surgery for two consecutive days. Mechanical withdrawal threshold（MWT），paw withdrawal latency（PWL），and open field test（OFT）were measured before surgery and on days 7 and 14 after surgery. On day 14 after surgery，the rats were sacrificed to collect hippocampal tissue；Western blot was used to measure the levels

作者介绍：李亚南，Email：411744625@qq.com，研究方向：疼痛与康复。
通信作者：王开强，Email：kqw67@sohu.com。
基金项目：上海市科委医学创新研究专项资助项目（编号：20Y21903100）；上海申康医院发展中心促进市级医院临床技能与临床创新三年行动计划资助项目（编号：SHDC2020CR3102B）；上海中医药大学预算内资助项目（编号：2020LK063）；上海中医药大学后备卓越中医人才资助项目[编号：上中医医管字（2020）10]；上海市中医医院未来计划科技发展资助项目（编号：WL-HBMS-2022002K）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250408.1308.012（2025-04-08）

of GPX4, xCT, and FTH1; related kits were used to measure the expression levels of MDA and GSH; HE staining, Nissl staining, and immunofluorescent staining were performed; transmission electron microscopy was used to observe the structural changes of the mitochondria. ***Results***: In terms of behavioristics, compared with the Sham group, the CCI group had significant reductions in MWT and PWL on day 7 after surgery (P<0.001), with further reductions from day 7 to day 14 after surgery (P<0.001); compared with the CCI group, the CCI+F group had significant increases in MWT and PWL on day 14 after surgery (P<0.001), and the CCI+E group had no significant change in MWT and a significant reduction in PWL (P<0.01). In terms of the OFT test, compared with the Sham group, the CCI group had significant reductions in total distance and number of central squares crossed (P<0.001) and a significant increase in immobility time (P<0.001); compared with the CCI group, the CCI+F group had significant increases in total distance and number of central squares crossed and a significant reduction in immobility time, while the CCI+E group had no significant changes in these indices. In terms of biochemical results, compared with the Sham group, the CCI group had significant reductions in GPX4, xCT, and FTH1 (P<0.01), a significant increase in MDA, and a significant reduction in GSH; compared with the CCI group, the CCI+F group had significant increases in GPX4, xCT, and FTH1 (P<0.05), a significant reduction in MDA (P<0.001), and a significant increase in GSH (P<0.01), and the CCI+E group had significant reductions in xCT and FTH1, with no significant changes in MDA and GSH. In terms of morphology, compared with the Sham group, the CCI group had damage and necrosis of hippocampal neurons, significant reductions in Nissl bodies and c-Fos level (P<0.05), and significantly damaged mitochondrial cristae on day 14 after surgery; compared with the CCI group, the CCI+F group had intact structures of hippocampal neurons, significant increases in Nissl bodies and c-Fos (P<0.05), and relatively intact mitochondria, while there were no significant differences in c-Fos and Nissl bodies between the CCI+E group and the CCI group. The pairwise linear correlation analysis of PWL, MWT, GPX4, OFT, and c-Fos on day 14 after surgery showed a significantly positive correlation between any two indicators (P<0.01). ***Conclusion***: Peripheral nerve injury triggers ferroptosis in the hippocampus and causes anxiety and depression, thereby aggravating ferroptosis and accelerating the development of central hyperalgesia.

【Key words】neuropathic pain; ferroptosis; hippocampus; ferrostatin-1; erastin

神经病理性疼痛（neuropathic pain，NP）是中枢或外周神经损伤导致的以诱发性疼痛、痛觉过敏、感觉异常等为主要症状的难治性疼痛[1]。中枢痛敏及患者长期慢性疼痛伴随焦虑抑郁等症状是NP难以治疗的主要原因之一。

铁死亡是一种铁依赖性的，非经典的细胞死亡方式[2]，神经损伤引发的细胞内铁蓄积及铁介导的活性氧（reactive oxygen species，ROS）累积，自由基的产生，胱氨酸摄取减少与脂质过氧化物增加是铁死亡的基本病理过程[3]。最新研究表明，坐骨神经慢性压迫损伤（chronic constriction injury，CCI）大鼠脊髓神经元和海马区[4]存在铁死亡现象[5]，提示铁死亡与NP密切相关，但其诱发的情绪紊乱与NP的相关性并不明确。

神经性疼痛是一种持续的应激因素，可影响包括海马在内的大脑各区域的变化[6]。海马的主要功能是参与大脑记忆编码、检索和储存，进行信息加工处理[7]。有研究表明，海马与情绪管理（焦虑、抑郁）也密切相关[8]，同时焦虑抑郁等情绪紊乱可放大并加快疼痛的感知与传导，直接参与中枢痛敏的形成[9]。是否可以通过抑制铁死亡来缓解NP诱发的焦虑、抑郁，目前未见报道。本研究拟通过观察CCI模型大鼠中海马铁死亡现象及变化趋势，探讨海马铁死亡与NP诱发焦虑、抑郁的相关性，为NP治疗获得可能的新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂 Von Frey（von-Frey，North Coast，USA），足底热点测痛仪（390，IITC，SF，USA），石蜡切片机（RM2415，Leica，FRA，GER），数码显微镜（徕卡，DFC7000T），共聚焦显微镜（SP8，LEIA，FRA，GER），Erastin（S7242，Selleck，Shanghai，China），Ferrostatin-1（S7243，Selleck，Shanghai，China）。重组Anti-Glutathione Peroxidase 4抗体（Abcam，Boston，Mass，USA），重组Anti-xCT抗体（Abcam，Boston，Mass，USA），重组Anti-Ferritin Heavy Chain抗体（Abcam，Boston，Mass，USA），GAPDH Rabbit Monoclonal Antibody（Beyotime，Shanghai，China），c-fos基因（FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog，c-fos）（9F6）Rabbit mAb（Cell Signaling Technology，Inc. 3 Trask Lane Danvers，#2250，1∶400）辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG（H+L）（Beyotime，Shanghai，China），Alexa Fluor 594 labeled goat anti-mouse IgG（ZSGB-BIO，Beijing，China）。

1.1.2 动物及分组 SPF级雄性SD大鼠共32只，体质量180~220 g，由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供，实验动物质量许可证号：SCXK（京）2019-0010，分笼饲养，正常饮水，室温（22±1）℃，湿度40%~50%，12 h/12 h昼夜节律交

替。饲养地点为上海市中医医院实验动物科学中心，实验动物许可证号：SYXK（沪）2020-0014，SPF 级。本研究通过上海中医药大学伦理委员会审核。动物保护及动物使用规范均按照国际疼痛研究学会的规定严格进行。在适应性喂养 1 周后，32 只 SD 雄性大鼠随机分为假手术（Sham）组、模型（CCI）组、铁死亡抑制剂 CCI+Ferrostatin-1（CCI+F）组、铁死亡激动剂 CCI+Erastin（CCI+E）组，每组 8 只。在 CCI 模型术后 7 d 进行药物 Ferrostatin-1 和 Erastin 干预，其他 2 组不进行干预，术后 14 d 麻醉处死所有大鼠，并检测各项指标。实验流程图见图 1A。

1.2 *方法*

1.2.1 CCI 模型制备 参照 CCI 大鼠模型制备方法[10]进行造模，选择大鼠右后肢手术。具体操作步骤：用异氟烷深度麻醉后，备皮常规消毒，于大鼠右股骨中段后方切开皮肤，用尖头弯钳钝性分离肌肉，采用大鼠撑开器分离肌肉并充分暴露出坐骨神经，玻璃分针轻轻分离坐骨神经；在坐骨神经主干部位游离约 7 mm 左右，在离坐骨神经分叉处上方约 2 mm 处起，结扎坐骨神经，每道结扎线间隔约 1 mm，共 4 道，结扎完毕后逐层缝合手术部位的肌肉及皮肤，碘伏进行消毒；术后大鼠放在保温垫进行复苏直至大鼠清醒，术后自由饮水和进食。

1.2.2 药物注射 将铁死亡激动剂 Erastin 溶于 DMSO 配制成 1.25 mg/mL 的母液，取 100 μL DMSO 母液，加入 800 μL PEG300，混匀澄清后加入 100 μL Tween 80，混匀澄清后加入 1 000 μL ddH_2O，混匀澄清，-20 ℃保存。将铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1（以下简称 Fer-1）溶于 DMSO 配制成 1.25 mg/mL 的母液，取 40 μL DMSO 母液，加入 1 000 μL PEG300，混匀澄清后加入 100 μL Tween 80，混匀澄清后加入 860 μL ddH_2O，混匀澄清，-20 ℃保存。于术后第 7 天，CCI+F 组和 CCI+E 组分别给予 Fer-1（10 mg/kg）和 Erastin（10 mg/kg），采用腹腔注射，每日 1 次，连续给药 2 d，同时 Sham 组和 CCI 组则分别注射等体积溶剂。

1.2.3 机械缩足反应阈值（mechanical withdrawal threshold，MWT）测定 参考机械痛测量方法[11]，行为学测试时间固定在 8:00～12:00，在测试人员不知道手术分组情况下，于室温（22±1）℃的安静环境中，采用 von Frey 纤毛测定机械性痛觉超敏，每组 8 只，测定前大鼠适应 20 min 后，将一系列 von Frey 细丝为 0.4、0.6、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0 g，其中从 2.0 g 力度开始参照 up and down 方法刺激大鼠术侧脚掌中部皮肤，观察大鼠缩足反应。无反应记为阴性反应“O”，有反应（缩足或舔足）记为阳性反应“X”。50%缩足反应阈值（g）=（10[Xf+kδ]）/10 000。其中 Xf=log（f）；δ 为各个毛力度取 log 后的均差，在此约等于 0.224；k 为根据测量所得“X”“O”序列查表后得到的值。为避免频繁或长时间的刺激造成动物耐受或痛敏，每根纤维丝每次刺激时间为 5 s，前后 2 次不同刺激间隔 10 min。

1.2.4 热缩足潜伏期（paw withdrawal threshold，PWL）测定 参照相关文献[12]，行为学测试时间固定在 8:00~12:00，在测试人员不知道手术分组情况下，于室温（22±1）℃的安静环境中，每组 8 只，将大鼠放入有机玻璃盒中置于玻璃板上，待其充分安静后，将玻璃板下的足底热点测痛仪（IITC，390）的辐射热光束移到大鼠后肢足底，设定热辐射强度为 20%~35%，设定自动切断时间为 20 s。按控制器进行测试，当动物因感觉疼痛将后爪抬起后，按下控制器记录显示器的时间，精确度为 0.01 s，该时间即为热刺激缩爪阈值。如果 20 s 仍无缩爪反应记为 20 s，重复测量 3 次，取平均值。前后 2 次不同刺激间隔 10 min 以上，以免引起组织热损伤。

1.2.5 开放旷场实验测定（open field test，OFT） 开放旷场实验主要用于观察大鼠情绪状态，测定大鼠的精神行为和探索能力。行为学测试时间固定在 8:00～12:00，在测试人员不知道手术分组情况下，于室温（22±1）℃的安静环境中，正式实验前将大鼠放入单独的笼盒中适应 10 min。随后，将大鼠放入 1.0 m×1.0 m×0.4 m 的开场实验箱。旷场被人为的划分为 9 个相等大小的正方形格子，中间定义为中心区，周围的格子定义为四边区，四角的格子定义为四角区。将大鼠放入开放场中央，让其自由活动 10 min，期间用摄像头记录大鼠运动轨迹，并使用设备配套软件分析 10 min 内大鼠行走的总距离、不动时间、进入中央区的次数，每次测试结束后，用 75% 的乙醇擦洗旷场后晾干，然后再进行下一只动物测试，避免气味对大鼠造成实验结果偏差。

1.2.6 组织病理学分析和样本采集 在第 14 天进行完行为学测试后，用 30% 戊巴比妥钠深度麻醉，每组随机选取 4 只大鼠，经心脏灌注生理盐水后持续灌注 4% 多聚甲醛（paraformaldehyde，PFA），直至出现尾部摆动和肌肉僵硬等现象。立即解剖大鼠的大脑并放于 4% 多聚甲醛中过夜，再进行脱水和石蜡包埋（将包埋好的蜡块提前放在-20 ℃冰箱中冷却后切片 3 μm 厚度，再放入 56 ℃恒温干燥箱中过夜，之后放在载玻片收纳盒中保存，进一步进行 HE、尼氏染色、免疫荧光染色。为了进行 Western blot、脂质代谢产物分析，每组的另外 4 只，经心脏灌注生理盐水后在冰上迅速剖开大脑，分离海马，收集海马，在液氮中速冻，并保存在-80 ℃冰箱。

1.2.7 苏木精-伊红染色法（hematoxylin and eosin staining，HE） 每组挑选 3 张组织完好的切片放于 56 ℃恒温干燥箱中 7 min，将蜡块依次放入 3 个二甲苯缸中，每个缸中停留时间分别为 5 min、2 min 和 2 min，以进行充分的脱蜡处理，接着放入 100%、95% 和 85% 的乙醇中，每个浓度中停留 2 min，以完成酒精固定。自来水冲洗，苏木素 4 min，ddH_2O 冲洗，1% 盐酸乙醇分化 5 s，ddH_2O 冲洗，10% 氨水 2 min 返蓝、ddH_2O 冲洗、伊红染液 20 s，分别经过 95%、100% 乙醇各 2 min 脱水，二甲苯透明后树脂封片，数码显微镜下采集图像进行对比和分析。

1.2.8 尼氏染色 每组挑选 3 张组织完好的切片进行常规脱蜡至水，将切片置于焦油紫染色液中并将染缸放于 56 ℃恒温干燥箱 1 h，去离子水冲洗，将切片置于尼氏分化液中 2 min，无水乙醇脱水 2 min，二甲苯透明后树脂封片，数码显微镜采集图像，使用放大 400 倍的显微镜对每个海马 CA3 区的

细胞形态拍3张图片，每组共9张图片进行对比和分析。

1.2.9 脂质代谢产物 在CCI术后第14天，分别检测海马组织中脂质代谢产物丙二醛（malondialdehyde，MDA）（Solarbio，BC0025）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）（Solarbio，BC1175），根据不同代谢产物试剂说明书进行操作。

对于MDA，约0.1 g组织加入1 mL提取液进行冰浴匀浆（8 000×g，4 ℃，10 min）以取上清液（100 μL），加入300 μL MDA检测工作液和100 μL试剂三，混匀，在100 ℃下加热60 min。冷却至室温，离心（10 000×g，10 min），取上清液（200 μL）加入96孔板中。在532 nm和600 nm波长下测量吸光度（absorbance，A）值，通过标准曲线法计算MDA含量。

对于GSH，约0.1 g组织1 mL试剂一（8 000 r/min，4 ℃，10 min），取上清液。分为测定管、标准管和空白管，都加入140 μL试剂二、40 μL试剂三，测定管再分别加入20 μL样本；标准管中加入20 μL标准溶液；空白管中加入20 μL蒸馏水。混匀后静止2 min，在412 nm波长下测量A值，通过标准曲线法计算GSH含量。

1.2.10 Western blot 每组选3只不同的海马组织进行裂解，BCA定量计算样本浓度，加入Loading buffer后100 ℃煮沸10 min。每孔上样量20 μg，进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳，用湿转法将凝胶中的蛋白转到PVDF膜上，碧云天快速封闭液封闭15 min。分别孵育一抗谷胱甘肽过氧化物4（glutathione peroxide 4，GPX4）（abcam，ab125066，1∶1 000）、溶质载体家族成员11（solute carrier family member 11，xCT）（abcam，ab175186，1∶1 000）、GAPDH（Beyotime，AF1186，1∶1 000）和铁蛋白重肽1（ferritin heavy polypeptide 1，FTH1）（abcam，ab183781，1∶1 000），放4 ℃过夜。第2天回收一抗后TBST洗膜后（10 min×3次），常温下加入HRP标记的羊抗兔IgG（Beyotime，A0208，1∶1 000），室温孵育1 h，TBST洗膜（10 min×3次），取ECL发光液浸润PVDF膜，在暗室内显影曝光。采用Image J软件对蛋白条带灰度分析。

1.2.11 透射电镜 取大鼠海马新鲜组织，避免机械损伤，1~3 min内将大鼠海马CA3部位离体取下后立即投入培养皿内，用手术刀在培养皿的固定液中进行切割成3块1 mm^3大小，随后转移至装有新的电镜固定液的EP管内继续固定，4 ℃固定保存。0.1 M磷酸缓冲液PB（PH7.4）漂洗3次，每次15 min，随后1%锇酸避光室温固定2 h，室温乙醇脱水，丙酮∶812包埋剂=1∶1 37 ℃ 2～4 h，丙酮∶812包埋剂=1∶2 37 ℃渗透过夜，纯812包埋剂37 ℃ 5~8 h。将纯812包埋剂倒入包埋板，将样品插入包埋板后37 ℃干燥箱过夜。包埋板放于60 ℃干燥箱聚合48 h，取出树脂块1~2 μm超薄切片，最后铜铀染色后透射电子显微镜（hitachi，HT7700）下观察，采集图像分析。

1.2.12 免疫荧光 每组挑选3张组织完好的切片进行常规的脱蜡复水，切片稍甩干后于组织滴加胰蛋白酶覆盖组织，37 ℃温箱孵育20 min，进行修复。PBS中洗涤3次，每次5 min。滴加0.1% TritonX-100覆盖组织，常温下孵育10 min，置于PBS中洗涤3次，每次5 min。滴加5%BSA均匀覆盖组织，室温封闭1 h。移液枪吸走封闭液，滴加一抗c-Fos（9F6）（1∶400）均匀覆盖组织，切片平放于湿盒内4 ℃孵育过夜。第2天回收一抗后PBS中洗涤3次，每次5 min，荧光二抗（1∶400）避光室温孵育1 h。PBS洗涤3次，每次5 min，切片稍甩干每个组织滴加5 μL抗荧光淬灭含DAPI封片剂封片，避光保存。切片于倒置共聚焦荧光显微镜下观察并采集图像，使用Image J分析。

1.3 统计学方法

采用SPSS 27.0统计软件进行统计学处理，用GraphPad Prism 9.0软件生成统计图表。所有的计数资料都以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，行为学数据采用重复测量设计的方差分析（repeated measures ANOVA）进行组内比较，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐性时，组间比较采用LSD法，方差不齐时，组间比较采用Tamhane′s T2法。相关性分析使用皮尔逊相关性分析，相关分析中相关系数的绝对值跟相关性大小有关，相关系数绝对值在0.3以下，认为没有相关性，相关系数在0.3~0.8之间，认为有相关性，大于0.8有强相关性，用Origin 2023b制作热图。检验水准α=0.05。

2 结 果

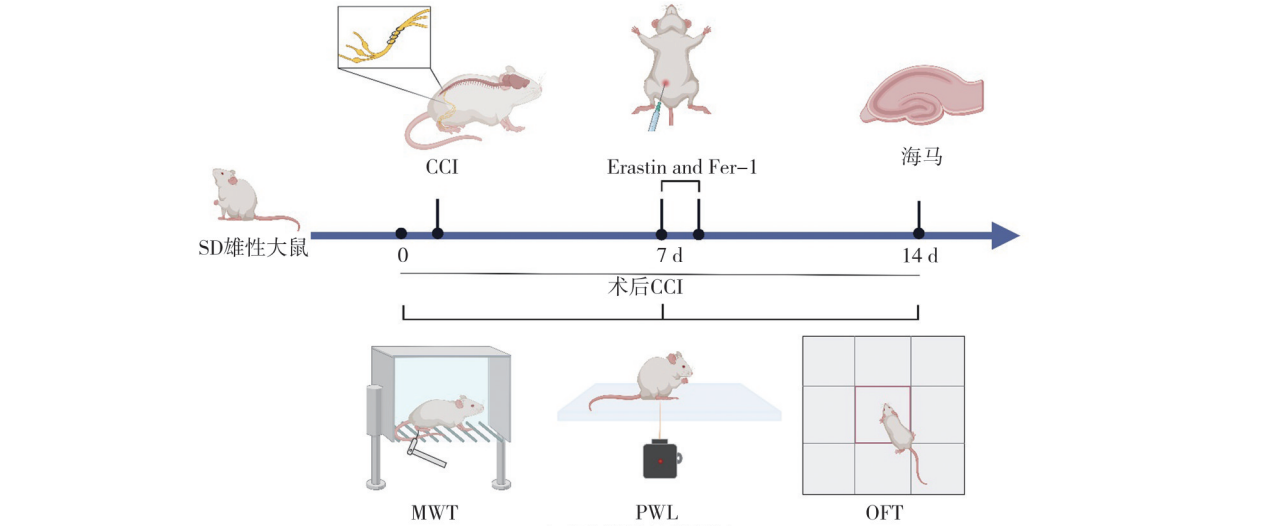
2.1 CCI大鼠出现痛觉敏化和抑郁样行为

使用MWT和PWL对大鼠进行了痛觉测定，结果显示，与Sham组相比，CCI组大鼠在术后7 d MWT和PWL明显下降（F=105.613，P<0.001；F=220.948，P<0.001；图1B），且随着时间增加，在术后14 d时MWT和PWL进一步降低（F=105.613，P<0.001；F=220.948，P<0.001；图1B），且呈时间依赖性下降。CCI术后第7天分别注射铁死亡抑制剂Fer-1和铁死亡激动剂Erastin。结果显示CCI术后14 d时，与CCI组相比，CCI+F组大鼠MWT和PWL明显升高（F=26.161，P<0.001；F=29.692，P<0.001；图1B），而CCI+E组仍然维持在较低水平，尤其是PWL较CCI大鼠进一步下降低（F=24.040，P<0.001；图1B），差异有统计学意义。

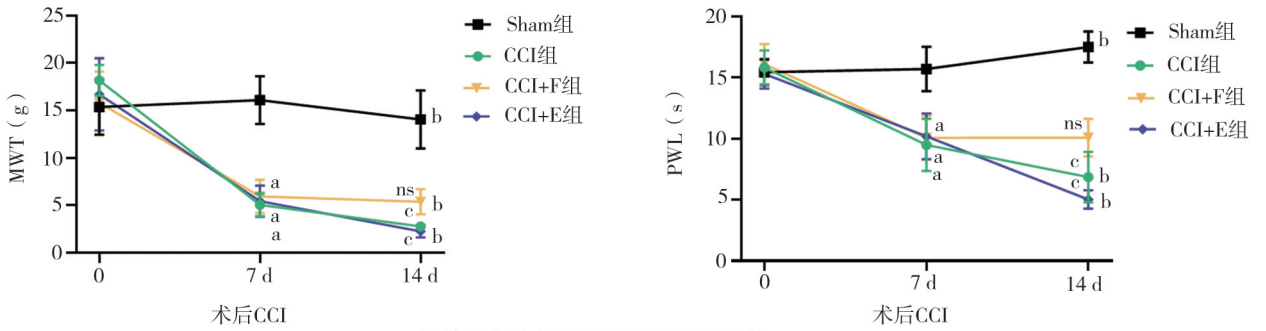
利用开放旷场实验检测了大鼠的情绪认知能力和运动能力，大鼠活动轨迹图（图1C），结果显示，与Sham组相比，CCI大鼠的静止不动时间明显增加（F=205.570，P<0.001；图1D），而总距离和中央跨格次数明显减少（F=238.304，P<0.001；F=374.500，P<0.001；图1E和F）；与CCI组比，CCI+F组总距离（F=238.304，P<0.05；图1F）和中央跨格次数明显增加（F=374.500，P<0.01；图1E），静止不动时间明显减少（F=205.570，P<0.05；图1D），CCI+E组无明显差异（F=7.369，P>0.05；F=1.151，P=0.302；F=4.311，P=0.58；图1D~F）。表明抑制铁死亡的发生可以减轻痛敏的症状、改善情绪抑郁的状态。

2.2 CCI大鼠海马区神经元减少

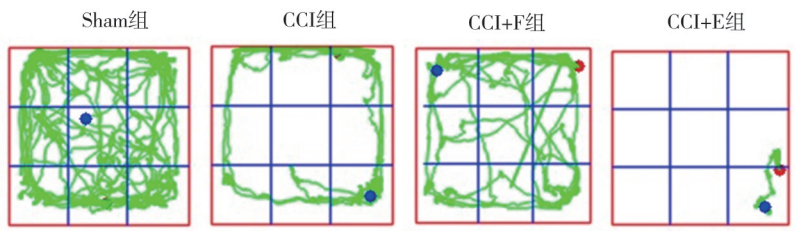
为了探讨CCI对大鼠海马的影响，使用HE染色和尼氏染色检测海马组织形态学变化。结果显示，Sham组神经元细胞圆润、排列整齐、核仁清晰可见、分布均匀，未见明显炎



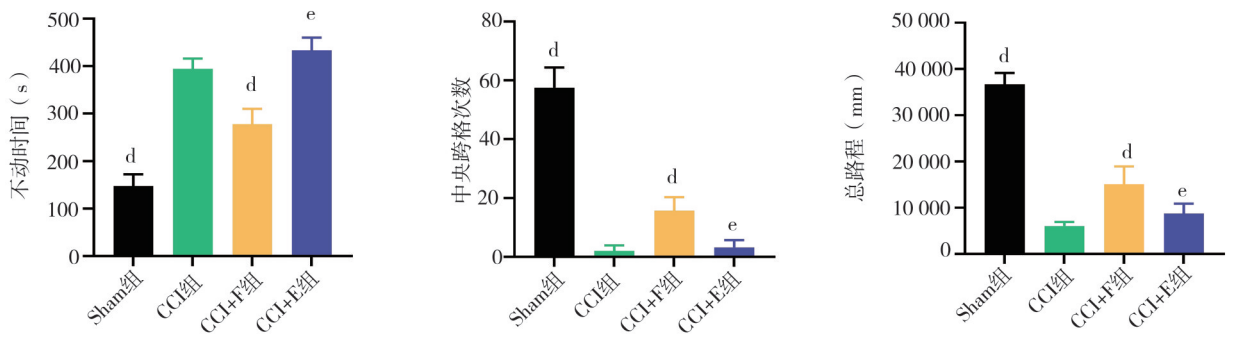
A. 本实验设计的流程图



B. 检测大鼠右后只的MWT和PWL比较



C. 开放矿场实验大鼠的活动轨迹图



D. 静止不动时间　　E. 跨越中心网格次数　　F. 总距离

注：a，与 Sham 组相比，$P<0.001$；b，与术后 14 dCCI 组相比，$P<0.05$；c，与同组术后 14 d 相比，$P<0.05$；d，与 CCI 组相比，$P<0.05$；e，与 CCI+F 组相比，$P<0.05$

图 1　CCI 大鼠出现痛觉敏化和抑郁样行为（n=8）

性细胞浸润、坏死、水肿。然而，CCI 大鼠海马中的神经元形态被破坏，发生明显的核固缩甚至坏死（图 2A）和尼氏小体减少（$P<0.05$，图 2B）。与 CCI 组相比，Fer-1 可以明显改善神经元细胞的坏死，形态较为规整，尼氏小体数量明显增加（$P<0.05$，图 2C）；而 Erastin 进一步加重了神经细胞的损伤，尼氏小体数量减少，但差异无统计学意义。这些结果表明

CCI导致大鼠海马神经元损失，CCI会对大鼠海马神经造成潜在的损害，同时抑制铁死亡可以改善这种情况的发生。

2.3 CCI大鼠海马区发生铁死亡

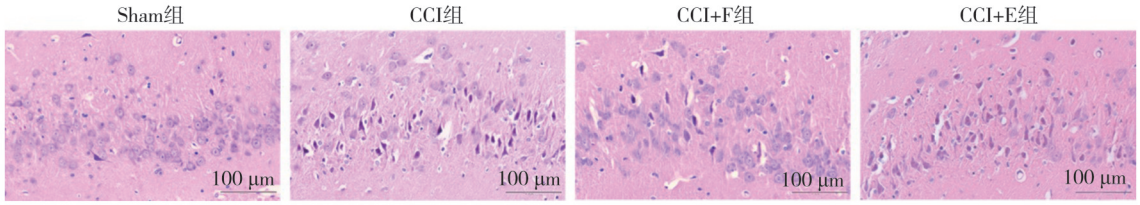
有研究表明NP与铁死亡有关，所以为了探究NP与海马中铁死亡的关系，本课题组检测了CCI术后14 d海马区的脂质代谢产物。结果显示，与Sham组比较，CCI组海马区MDA明显上升（$P<0.05$，图3A），GSH明显下降（$P<0.001$，图3B）；而CCI+F组较Sham组海马区MDA、GSH均无统计学差异（$P>0.05$）；与CCI组相比，CCI+F组海马区MDA明显减少（$P<0.001$），GSH明显升高（$P<0.001$）；CCI+E组较CCI组MDA和GSH并无明显的趋势，且差异均无统计学意义；与CCI+F组相比，CCI+E组海马区MDA明显增加（$P<0.01$），GSH明显降低（$P<0.001$）。

此外，在CCI大鼠海马区蛋白层面也发现了铁死亡现象。与Sham组比较，CCI组海马区xCT、GPX4、FTH1表达明显下降（$P<0.01$，表1和图3C-E）；与CCI组相比，CCI+F组海马区xCT、GPX4、FTH1表达明显增加（$P<0.05$），CCI+E组海马区xCT、FTH1表达进一步下降（$P<0.05$），GPX4表达有下降的趋势，但差异无统计学意义；与CCI+F组相比，CCI+E组海马区xCT、GPX4、TH1表达明显下降（$P<0.01$）。

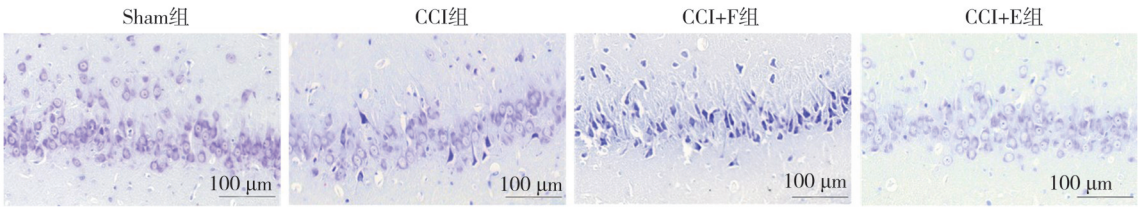
为了进一步探究海马铁死亡是否与NP有关，本课题组检测了海马区线粒体结构（红色箭头所指）。结果显示，Sham组海马区线粒体形态结构完整（图3F）。与Sham组相比，CCI组海马区线粒体体积变小，双层膜密度增高，线粒体外膜破裂，嵴减少、结构错乱并消失。与CCI组相比，CCI+F组海马区线粒体体积有所恢复，形态相对完整；CCI+E组海马区线粒体体积缩小，双层膜密度增厚，线粒体外膜破损，嵴减少、结构错乱并消失。线粒体结构改变为铁死亡发生的标准之一，提示NP会出现海马区铁死亡的现象。

2.4 CCI大鼠海马区c-Fos低表达

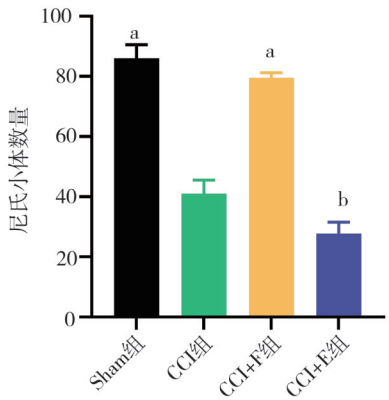
有报道c-Fos表达与神经元活动、情绪改变有关[13]。免疫荧光结果（图4A）显示，CCI组大鼠海马区的c-Fos数量比Sham组明显地减少（$P<0.05$，图4B），而与CCI组相比CCI+F组数量增加（$P<0.05$），CCI+E组比CCI+F组数量更少（$P<0.05$）。结果表明，CCI组大鼠海马抑制了c-Fos表达，出现明显情绪抑郁样改变，而抑制铁死亡的发生可以增加c-Fos的表达。



A. 海马组织CA3区域的HE染色



B. 海马组织CA3区域的尼氏染色



C. 尼氏小体的数量统计

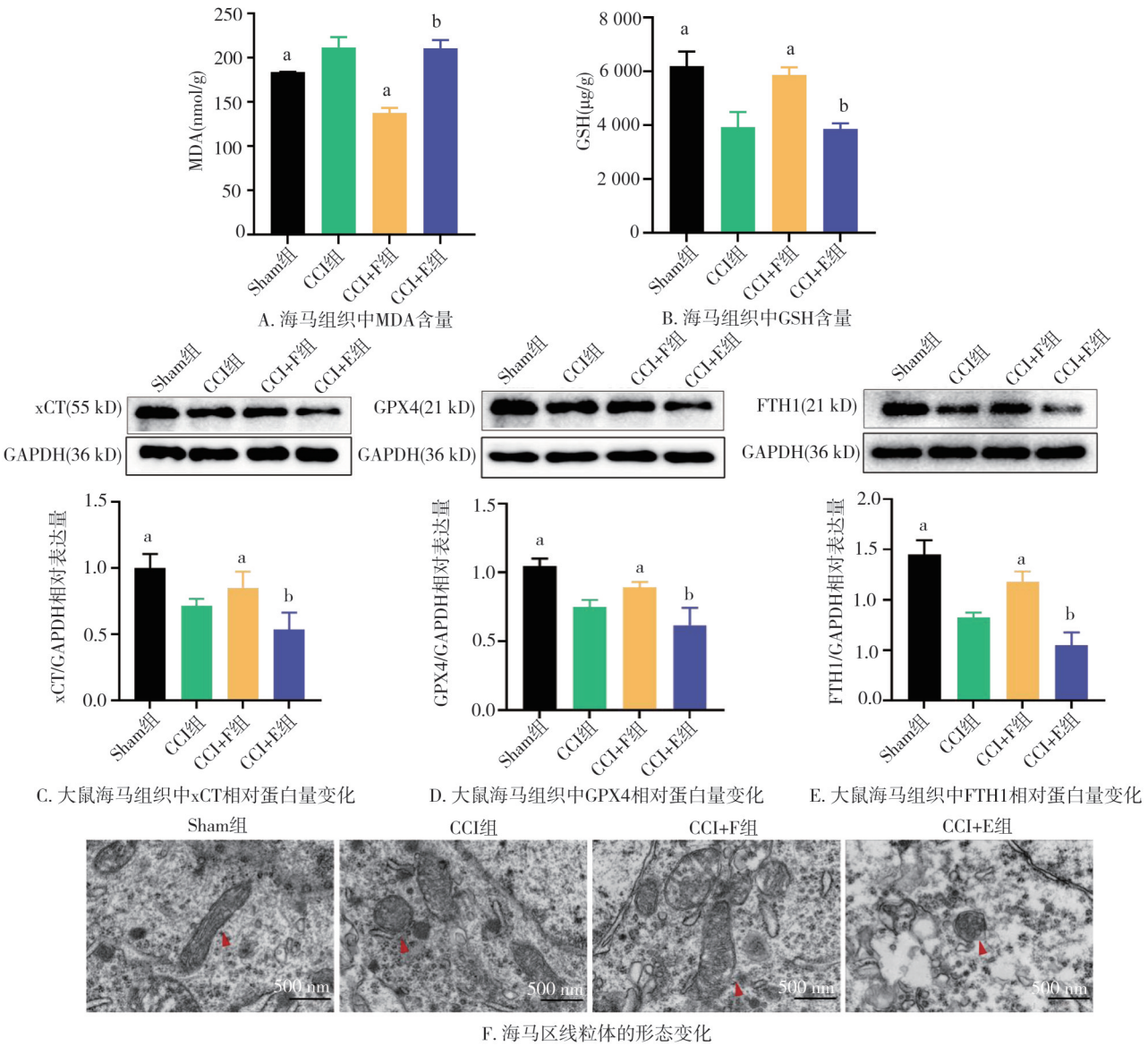
注：a，与CCI组相比，$P<0.05$；b，与CCI+F组相比，$P<0.05$

图2 CCI大鼠海马区神经元减少（$n=3$）

表 1　各组大鼠海马组织中 xCT、GPX4、FTH1 相对蛋白量比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	xCT	GPX4	FTH1
Sham 组	1.0000 ± 0.10645[a]	1.0471 ± 0.05496[a]	1.4499 ± 0.14228[a]
CCI 组	0.7155 ± 0.05267	0.7489 ± 0.05198	0.8247 ± 0.04765
CCI+F 组	0.8520 ± 0.12154[a]	0.8909 ± 0.04096[a]	1.1803 ± 0.10067[a]
CCI+E 组	0.5387 ± 0.12529[ab]	0.6165 ± 0.12641[b]	0.5451 ± 0.13025[ab]
F 值	13.866	17.610	38.098
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a，与 CCI 组相比，*P*<0.05；b，与 CCI+F 组相比，*P*<0.05



A. 海马组织中MDA含量　B. 海马组织中GSH含量

C. 大鼠海马组织中xCT相对蛋白量变化　D. 大鼠海马组织中GPX4相对蛋白量变化　E. 大鼠海马组织中FTH1相对蛋白量变化

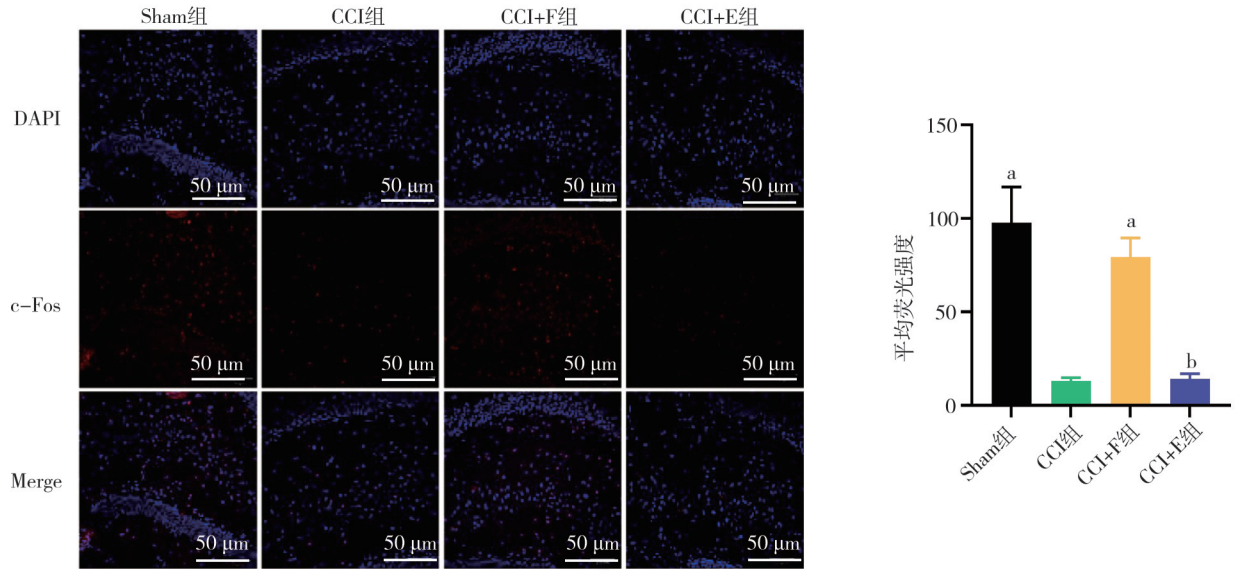
F. 海马区线粒体的形态变化

注：a，与 CCI 组相比，*P*<0.05；b，与 CCI+F 组相比，*P*<0.05

图 3　CCI 大鼠海马发生铁死亡

2.5　CCI 大鼠 PWL、MWT、OFT、GPX4、c-Fos 相关性分析

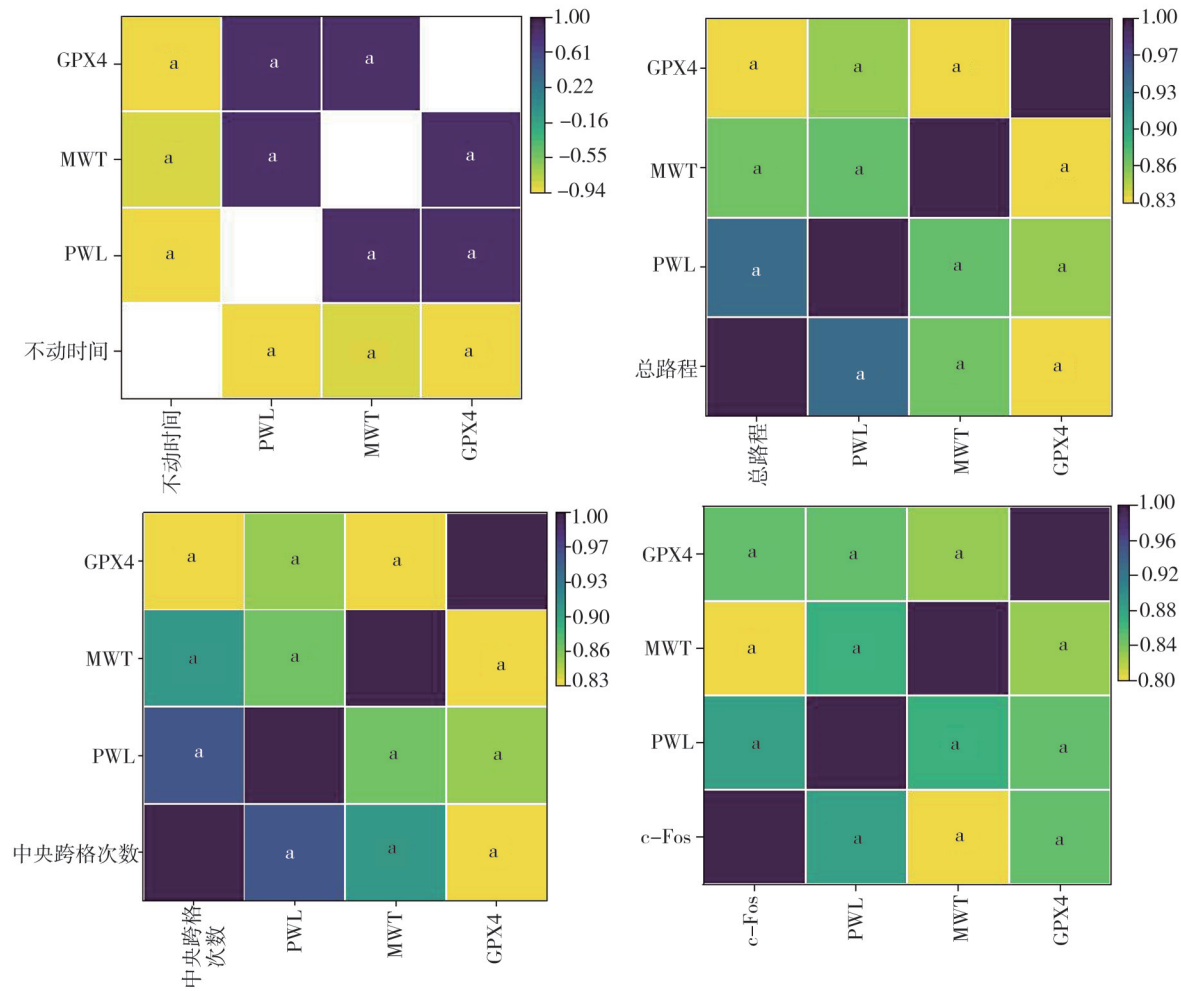
为了验证造成 CCI 大鼠痛敏与海马铁死亡的相关性，本研究选用术后 14 d 的 PWL、MWT、GPX4、OFT 实验中活动总距离、静止不动时间、中央跨格次数和 c-Fos 做两两线性相关性分析，结果显示 GPX4 与 PWL、MWT 相关系数分别为 0.852 和 0.829，且呈现出 0.001 水平的明显性；GPX4 与总距离、中央跨格次数、不动时间、c-Fos 相关系数分别为 0.826、0.834、−0.915、0.849，呈现出 0.001 水平的明显性（图 5）。



A. 免疫荧光检测海马区c-Fos的表达　　B. c-Fos平均荧光强度

注：a，与CCI组相比，$P<0.05$；b，与CCI+F组相比，$P<0.05$

图4　CCI大鼠海马区c-Fos低表达（$n=3$）



注：a，两两比较，$P<0.05$

图5　CCI大鼠PWL、MWT、OFT、GPX4、c-Fos相关性分析

3 讨 论

当外周神经损伤或病变后，痛觉信号由外周经背根神经节传至脊髓背角，信号在此整合后沿着脊髓-丘脑侧束传至丘脑[1]，进而通过丘脑皮质束到达大脑皮层，内嗅皮层（entorhinal cortex，EC）投射到齿状回（dentate gyrus，DG），DG 又驱动海马的子区域 CA3，然后驱动 CA2，CA1 和亚区域，再投影回 EC[14]，沿着大脑皮层到丘脑-脊髓侧束下行至脊髓，传至外周感觉系统，调节疼痛[15]。中枢敏化是指疼痛信息传递与整合过程中，兴奋性信息和抑制性信息失衡导致的一种状态，在其形成过程中，疼痛伴随的焦虑抑郁等情绪紊乱具有重要作用[16]。本研究大鼠坐骨神经结扎后，机械痛敏和热痛敏阈值明显低于术前，发生痛觉敏化，这个结果与以往的报道相一致[17]，证明本研究成功地建立了大鼠 CCI 模型。

生理状态下，海马具有脑记忆、编码、信息处理及情绪管理等功能，同时海马还通过 DG/CA3 区域在情绪处理中发挥重要作用[7]。病理状态下，当伤害信息传入时，海马区炎症增加[18]，细胞功能如记忆、定向、情绪管理等出现异常。情绪紊乱和中枢兴奋性传递增加导致疼痛时间延长，疼痛感知增加[19]。

铁死亡是一种新型的细胞死亡方式，与神经系统疾病密切相关[20]。铁在细胞内的出入平衡主要依赖于转铁蛋白（transferrin，Tf）/转铁蛋白受体 1（transferrin receptor protein 1，TfR1）/FPN1/FTH1 等共同作用完成，其中 FTH1 主要功能是储存、调节细胞内铁离子的浓度。当 FTH1 功能紊乱，细胞内游离铁浓度异常升高[21]，与脂质氢过氧化物通过芬顿反应生成有毒的脂质自由基与细胞膜上相邻的不饱和脂肪酸转移质子，产生如丙二醛（malondialdehyde，MDA）等脂质过氧化[22]，进而损害线粒体[23]，诱发细胞降解死亡（铁死亡）。在 FTH1 调节铁离子浓度的同时，胱氨酸/谷氨酸反转运体（Xc-）系统也可以有效地调控铁蓄积诱发的毒性反应即铁死亡。Xc- 系统由重链 SLC3A2 和轻链 SLC7A11（又称 xCT）组成，介导细胞外胱氨酸和细胞内谷氨酸以 1∶1 的比例在质膜上交换[24]。生理状态下，半胱氨酸经 xCT 调控进入细胞，与谷氨酸、甘氨酸经肽键缩合而成 GSH，GSH 作为配体与 GPX4 结合，清除活性氧产生的脂质过氧化产物毒性反应，有效阻止细胞铁死亡的发生。因此，GPX4 与 FTH1 被认为是调控铁死亡的关键蛋白[25]。GPX4 与 FTH1 表达上调时抑制铁死亡反应，表达下调时铁死亡反应加剧。

已经明确 NP 发生时海马铁死亡相关蛋白发生异常现象[4]。本研究通过完善 CCI 大鼠海马铁死亡上下游相关指标检测，结果显示：与 Sham 组比，CCI 大鼠 PWL 和 MWT 值明显下降，OFT 实验中静止不动时间明显增加，总距离和中央跨格次数明显减少，海马区 xCT、GPX4、FTH1 表达均明显降低，MDA 含量明显上升，GSH 的明显下降。细胞形态学 HE、尼氏染色、免疫荧光染色及电镜结果显示：CCI 大鼠海马区细胞形态改变、核固缩、细胞裂解，尼氏小体数量减少，c-Fos 数量明显减少，线粒体体积减小皱缩、外膜破裂、嵴减少、结构错乱消失。揭示 CCI 大鼠明确存在铁死亡，且伴发焦虑抑郁，其可能原因是：①外周疼痛伤害性刺激的上传，致海马细胞膜铁离子过度累积诱发芬顿反应，在二价铁或酯氧合酶的作用下，催化细胞膜上高表达的不饱和脂肪酸，发生脂质过氧化，从而诱导细胞死亡[26]。②伤害性信息传入抑制 FTH1 对铁离子调节功能，细胞内二价铁离子蓄积，加剧铁死亡发生[27]。③二价铁离子大量蓄积，三价铁减少，神经传递功能异常，诱发情绪焦虑、抑郁[28]。④情绪焦虑抑郁状态下，GPX4 的表达和活性受到抑制[29]。导致细胞内过氧化物水平上升，氧化应激反应加剧，细胞的抗氧化失衡，细胞铁死亡。

通过应用铁死亡抑制剂 Fer-1 和铁死亡激动剂 Erastin 进一步研究结果显示，术后 14 d CCI+F 组较 CCI 组大鼠 PWL 和 MWT 明显增加，海马区 xCT、GPX4、FTH1 表达明显上调，MDA 明显下调，GSH 明显上升，海马区细胞形态完整、排列整齐，尼氏小体数量增加，线粒体体积增加，结构相对完整；术后 14 d CCI+E 组较 CCI+F 组 PWL 和 MWT 明显减少，xCT、GPX4、FTH1 表达明显下降，海马区细胞形态破损，尼氏小体数量减少，线粒体体积更加缩小，双层膜密度增厚，线粒体外膜破损，嵴结构错乱伴消失。提示海马铁死亡与 NP 的病理进展有着密切的联系，且铁死亡程度与痛敏变化程度相一致。这可能与疼痛信息致海马细胞免疫与氧化反应[30]，FTH1 与 GPX4 功能被抑制，细胞铁死亡发生，出现情绪抑郁，加剧中枢痛敏形成相关。术后 14 d，与 CCI 组相比 CCI+F 组 c-Fos 表达明显增加，总距离和跨越中央区次数明显增加，静止不动的时间明显减少；而 CCI+E 组结果无明显性差异。这可能与抑制海马铁死亡可以改善细胞炎症，恢复海马细胞功能相关。

CCI+E 组较 CCI 组比，PWL、MWT、OFT、c-Fos 结果无明显性差异表明外周伤害信息传入可以诱发海马铁死亡达到一定峰值。

进一步对术后 14 d PWL、MWT、GPX4、OFT、c-Fos 值做两两线性相关分析，结果显示 GPX4 与 PWL、MWT 之间呈现明显正相关，提示海马铁死亡与痛敏密切相关；GPX4 与 OFT 及 c-Fos 实验结果提示海马铁死亡与疼痛诱发的情绪紊乱密切相关；OFT、c-Fos 与 PWL、MWT 实验结果提示情绪紊乱与痛敏密切相关。

综上所述，CCI 大鼠海马区铁死亡导致情绪焦虑、抑郁，可加速中枢痛敏形成。通过抑制铁死亡可以改善焦虑、抑郁及痛敏现象。因此，本研究为治疗 NP 诱发情绪紊乱提供新的可能的干预靶点。

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] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1): 3-11.

[3] Han C, Liu YY, Dai RJ, et al. Ferroptosis and its potential role in human diseases[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 239.

[4] Tang YD, Liu CL, Zhu T, et al. Transcriptome profiles of lncRNA and mRNA highlight the role of ferroptosis in chronic neuropathic pain with memory impairment[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 843297.

[5] Wang HX, Huo XD, Han CY, et al. Ferroptosis is involved in the development of neuropathic pain and allodynia[J]. Mol Cell Biochem, 2021, 476(8): 3149-3161.

[6] Tracey I, Mantyh PW. The cerebral signature for pain perception and its modulation[J]. Neuron, 2007, 55(3): 377-391.

[7] Rebola N, Carta M, Mulle C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(4): 208-220.

[8] Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood[J]. Nat Rev Neurosci, 2017, 18(6): 335-346.

[9] Guerreiro SR, Guimarães MR, Silva JM, et al. Chronic pain causes Tau-mediated hippocampal pathology and memory deficits[J]. Mol Psychiatry, 2022, 27(11): 4385-4393.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 王立群，宁 宁，陈佳丽，等. 中国护士群体足部重度疼痛风险预测的列线图模型构建[J]. 四川大学学报（医学版），2023，54(3)：596-601.

Wang LQ, Ning N, Chen JL, et al. Nomographic Model for Predicting Severe Foot Pain in Nurses from Tertiary Hospitals in China[J]. Journal of Sichuan University (Medical Sciences), 2023, 54(3): 596-601.

[13] Eagle AL, Gajewski PA, Yang M, et al. Experience-dependent induction of hippocampal ΔFosB controls learning[J]. J Neurosci, 2015, 35(40): 13773-13783.

[14] Yassa MA, Stark CEL. Pattern separation in the hippocampus[J]. Trends Neurosci, 2011, 34(10): 515-525.

[15] Sun LT, Peng CG, Joosten E, et al. Spinal cord stimulation and treatment of peripheral or central neuropathic pain: mechanisms and clinical application[J]. Neural Plast, 2021, 2021: 5607898.

[16] 黄睿臻，徐 劲，魏绪红. 弥可保预防长春新碱诱导的病理性疼痛的机制[J]. 中山大学学报（医学科学版），2022，43(2)：212-220.
Huang RZ, Xu J, Weii XH. The Mechanism of Methylcobalamin in Preventing Pain Hypersensitivity Induced by Vincristine[J]. Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences), 2022, 43(2): 212-220.

[17] Huang AR, Ji L, Huang YL, et al. miR-185-5p alleviates CCI-induced neuropathic pain by repressing NLRP3 inflammasome through dual targeting MyD88 and CXCR4[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 104: 108508.

[18] Duan YW, Chen SX, Li QY, et al. Neuroimmune mechanisms underlying neuropathic pain: the potential role of TNF-α-necroptosis pathway[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7191.

[19] Liu MG, Chen J. Roles of the hippocampal formation in pain information processing[J]. Neurosci Bull, 2009, 25(5): 237-266.

[20] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 88.

[21] Nai A, Lidonnici MR, Federico G, et al. NCOA4-mediated ferritinophagy in macrophages is crucial to sustain erythropoiesis in mice[J]. Haematologica, 2021, 106(3): 795-805.

[22] Tang DL, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications[J]. Cell Res, 2021, 31(2): 107-125.

[23] Bock FJ, Tait SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(2): 85-100.

[24] Hassannia B, Van Coillie S, Vanden Berghe T. Ferroptosis: biological rust of lipid membranes[J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 35(6): 487-509.

[25] Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 144-152.

[26] Deng LY, He SS, Guo NQ, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and relevance to inflammation[J]. Inflamm Res, 2023, 72(2): 281-299.

[27] Tian Y, Lu J, Hao XQ, et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6-OHDA model of Parkinson's disease[J]. Neurotherapeutics, 2020, 17(4): 1796-1812.

[28] Berthou C, Iliou JP, Barba D. Iron, neuro-bioavailability and depression[J]. EJHaem, 2022, 3(1): 263-275.

[29] Dang RZ, Wang MY, Li XH, et al. Edaravone ameliorates depressive and anxiety-like behaviors via Sirt1/Nrf2/HO-1/Gpx4 pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 41.

[30] Fiore NT, Austin PJ. Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? [J]. Brain Behav Immun, 2016, 56: 397-411.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：
李亚南，薛纯纯，王开强. 探究 CCI 大鼠海马铁死亡与神经病理性疼痛诱发情绪紊乱的相关性分析[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(5)：630-639.