

甲基化修饰与神经病理性疼痛

毛元元 李治松 张卫

神经病理性疼痛是一种由躯体感觉神经系统病变或疾病造成的疼痛,其病因多变,症状复杂,治疗效果不理想,这与其机制的复杂性有关。研究表明表观遗传调控参与神经病理性疼痛发生发展的过程^[1]。甲基化修饰作为表观遗传学的重要组成部分,在神经病理性疼痛中发挥重要作用。本文就有关甲基化修饰在神经病理性疼痛中发挥作用的相关研究作一综述。

甲基化的概念

甲基化是指在底物中添加甲基基团的反应,包括 DNA 甲基化和蛋白质甲基化。哺乳动物 DNA 甲基化主要发生在 CpG 位点,使胞嘧啶转变为 5-甲基胞嘧啶。通常,甲基化修饰会干扰转录因子与基因的结合或者招募甲基 DNA 结合蛋白等形成转录抑制复合物,抑制基因启动子的活性^[2]。但在某些情况下, DNA 甲基化也能激活基因的转录^[3]。DNA 甲基化修饰由 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferases, DNMTs)催化完成,相对稳定,但并非不可逆转^[4]。哺乳动物 DNMTs 主要包括三种:DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b,其中 DNMT1 主要参与甲基化状态的维持,后两者则与新的甲基化形成相关^[5]。蛋白质的甲基化修饰发生在蛋白质的精氨酸或赖氨酸残基上,分别由蛋白精氨酸甲基转移酶和赖氨酸甲基转移酶催化完成^[6,7]。其中,研究最多的是组蛋白甲基化修饰,即将甲基由 S-腺苷甲硫氨酸转移至组蛋白上。组蛋白甲基化修饰的具体作用取决于甲基化位点。组蛋白 H3 的赖氨酸 9 或 27 位点的甲基化(H3K9 或 H3K27)和组蛋白 H4 的赖氨酸 20 位点的甲基化(H4K20)多为转录抑制调控,而组蛋白 H3 赖氨酸 4、36 和 79 位点(H3K4、H3K36 和 H3K79)的甲基化则多与转录激活相关^[8]。DNA 甲基化和组蛋白甲基化修饰均属于表观遗传学的重要组成部分,在转录和翻译水平调控基因表达。

甲基化修饰参与神经病理性疼痛的调控

DNA 甲基化与神经病理性疼痛 神经病理性疼痛研究的一大难题是机制的复杂性,神经通路中任何环节的异常均有可能导致神经病理性疼痛的发生。目前研究认为大脑、脊髓和背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)内疼痛相关分子的变化在神经病理性疼痛中发挥关键作用^[7,9]。

DRG 是联系外界环境刺激与中枢神经系统的枢纽。Pollema-Mays 等^[10]首次探讨了成年大鼠 DRG 内三种 DNMTs 在疼痛中的变化。与假手术组比较,部分坐骨神经损伤(spared nerve injury, SND)大鼠术后三种 DNMTs 表达上调,但持续时间不同;DNMT3b 术后 1 周即明显升高,持续至观察结束(术后 4 周),而 DNMT3a 和 DNMT1 的表达增加持续时间较短且程度较轻,术后 2 周消失。这提示外周神经损伤引起的神经病理性疼痛中,DRG 内不同 DNMTs 发挥的作用可能不同,但其具体机制仍待进一步研究。除外周神经损伤外,肿瘤也是引起神经病理性疼痛的重要原因。Zhou 等^[11]在癌性痛模型中发现肿瘤细胞注射不仅可使大鼠产生痛敏现象,同时腰段 DRG 内嘌呤受体(purinergic receptor, P2X3R)和核因子(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)亚基 p65 的表达明显升高,进一步研究表明 DRG 内 DNMT3a 和 3b 减少,p65 与 P2X3R 基因结合增加。因此推测 DNMT3a 和 DNMT3b 减少导致 P2X3R 基因启动子区甲基化水平降低,去甲基化的 P2X3R 基因有利于 p65 的结合,进而促进 P2X3R 高表达。类似的,Zhang 等^[12]对大鼠糖尿病神经病理性疼痛模型的研究表明,支配后爪的 DRG 内 DNMT3b 表达明显降低,P2X3R 基因启动子区 CpG 岛去甲基化,p65 与 P2X3R 基因结合活性增强,引起 DRG 内 P2X3R 的高表达,参与糖尿病神经病理性疼痛的病理过程,阻断 p65 信号通路则能够缓解大鼠的痛敏症状。由此可知 DRG 内 DNA 甲基化修饰参与神经病理性疼痛的调控,但不同模型的诱发因素不同,机制可能不同,DNMTs 的表达也有所不同。

神经病理性疼痛的另一个难题是阿片类药物的镇痛效果减弱。目前阿片类药物仍是应用最广的治疗神经病理性疼痛的药物,但长期应用不仅效果减弱,甚至可能产生严重的不良反应^[13]。Zhou 等^[14]研究表明这可能与神经损伤引起的 DRG 内 μ 阿片受体(mu opioid receptor, MOR)下调有关,神经损伤可引起 MOR 基因近端启动子区甲基化水平升高,而给予 DNA 甲基化抑制剂后,DRG 内 MOR 的表达升高,吗啡的镇痛效果也明显改善。这提示 DNA 甲基化抑制剂有望成为治疗神经病理性疼痛的辅助药物。

DRG 接受外界环境刺激后,将信号转换并上传至脊髓或高级中枢进行信息整合。因此,脊髓也是神经病理性疼痛的重要调控位点。研究表明慢性坐骨神经压迫性损伤(chronic constriction injury, CCI)后大鼠腰段脊髓背角谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase 67, GAD67)的表达明显减少^[15]。GAD67 作为抑制性递质 GABA 合成的关键酶,其

基金项目:国家自然科学基金(81571082)
作者单位:450052 郑州大学第一附属医院麻醉科
通信作者:张卫,Email:zhangw571012@126.com

减少引起 GABA 抑制性作用减弱,参与神经病理性疼痛的形成。进一步研究表明 GAD67 基因启动子区甲基化水平升高,同时脊髓内 DNMT3a、DNMT3b、甲基 CpG 结合蛋白 2(methyl-CpG binding protein 2, MeCP2)表达升高,而甲基 DNA 结合域蛋白 2(methylated DNA binding domain, MBD2)含量下降^[15]。这提示外周神经损伤引起脊髓内 GAD67 的下调可能与 DNMT3a、DNMT3b、MeCP2 以及 MBD2 介导的 GAD67 基因启动子区 DNA 甲基化水平升高有关。近年来,研究表明 Wnt/ β -catenin 信号通路也参与神经病理性疼痛的发生过程^[16]。Feng 等^[17]研究表明 CCI 术后同侧脊髓背角内 Wnt3a 表达升高,同时 Wnt3a 基因启动子区组蛋白 H3 乙酰化水平升高,胞嘧啶甲基化水平降低,提示组蛋白修饰和 DNA 甲基化共同调控基因表达。类似的,Wang 等^[18]研究表明外周神经损伤后动物脊髓内总 DNA 甲基化水平以及 MeCP2 的表达明显升高,应用 DNA 甲基转移酶抑制剂后,脊髓内总的 DNA 甲基化水平和 MeCP2 的表达下降,同时神经损伤引起的动物痛觉敏感等症状也得到缓解。由此可知,脊髓内 DNA 甲基化修饰参与神经病理性疼痛的调控。

脑内前额叶皮质(prefrontal cortex, PFC)是调控疼痛的重要区域^[19]。Tajerian 等^[20]研究表明坐骨神经分支损伤术后 6 个月,小鼠出现感觉异常和焦虑情绪,PFC 和杏仁核内总 DNA 甲基化水平明显下降。而且,PFC 内总 DNA 甲基化水平与动物痛敏症状的严重程度显著相关。通过环境富集化运动(environmental enrichment)缓解神经损伤引起的动物痛敏症状后,PFC 内总甲基化水平也有所回升。这提示 DNA 的甲基化可能是神经病理性疼痛与焦虑情绪的共同作用机制。实际上,大脑作为复杂的高级中枢,相关区域 DNA 甲基化参与多种生理过程^[21]。Zhong 等^[22]进一步探讨了神经病理性疼痛的亲代是否会对子代产生影响,研究显示神经病理性疼痛的母鼠普遍出现亲代照护缺陷,其喂养的子代表现出明显的焦虑情绪和行为,子代室上核后叶催产素表达下降,杏仁核内 DNMT1 高表达且总甲基化水平也明显升高。这提示脑内 DNA 甲基化不仅参与神经病理性疼痛的调控,也会对子代产生不良影响,但其具体机制尚未明确。

组蛋白的甲基化修饰与神经病理性疼痛 组蛋白的甲基化修饰在神经病理性疼痛中同样发挥重要作用。Laumet 等^[23]研究表明神经损伤后受损 DRG 内组蛋白赖氨酸 N 甲基转移酶 2(G9a)的表达明显升高,同时多种膜电位相关钾离子通道基因启动子区 H3K9me2 水平升高,选择性基因敲除 DRG 内 G9a 的表达,不仅恢复了神经损伤引起的钾通道下调,也阻止了神经病理性疼痛的产生。进一步研究显示抑制 DRG 内 G9a 的表达也可影响神经损伤引起的许多其他基因的表达,MOR 就是其中之一。研究显示神经损伤后受损 DRG 内 MOR 表达下调,其基因启动子区 H3K9me2 的含量增多,阿片类药物镇痛效果减弱;抑制或者敲除 DRG 内 G9a 的表达能够逆转 MOR 的下调并增强吗啡的镇痛效果;

基因敲除 DRG 内 G9a 编码基因则能够阻止神经损伤所造成的上述改变^[24]。这提示 DRG 内 G9a 通过组蛋白甲基化修饰在神经病理性疼痛的形成和治疗中均发挥关键作用。

除 G9a 外,SUV39H1 也是一种重要的组蛋白甲基转移酶,主要催化 H3K9me3 的形成。Zhang 等^[25]研究表明脊神经结扎(spinal nerve ligation, SNL)后受损 DRG 和同侧 L₅ 脊髓背角内 SUV39H1 的表达明显升高,阻断或敲除 SUV39H1 的表达能够缓解 SNL 引起的痛敏症状,这提示 SUV39H1 参与神经病理性疼痛的调控。但 DRG 和脊髓内 SUV39H1 的表达和作用机制不完全相同。DRG 内 SUV39H1 的蛋白和 mRNA 均升高,提示转录和翻译水平均被激活,其参与调控神经病理性疼痛的机制与神经损伤引起的 MOR 的下调和脊髓中枢敏化有关;而脊髓内 SUV39H1 仅在翻译水平被激活,mRNA 含量无明显变化,具体作用机制尚未明确。由此可知,组蛋白甲基化修饰可以在不同水平参与神经病理性疼痛,同一种受体也可由多种甲基化修饰酶来调控,而不同的调控通路似乎并不能相互补偿,阻断其中任一途径均可缓解神经病理性疼痛的症状。

此外,组蛋白甲基化修饰也可通过 DRG 和脊髓内其他信号通路参与神经病理性疼痛的调控,但目前脑内相关研究仍较少,这可能与大脑的复杂性有关^[26]。也有研究提示甲基化修饰可以通过调控免疫细胞和胶质细胞内的信号分子参与神经病理性疼痛的过程^[27]。

甲基化修饰在临床上的应用

尽管多项动物研究提示甲基化修饰参与神经病理性疼痛的调控,但目前临床研究仍集中在疼痛现象与甲基化修饰的相关性方面,这可能与临床研究的复杂性有关。

Tajerian 等^[28]研究显示慢性腰痛患者体内细胞外基质蛋白 SPARC (secreted protein, acidic, rich in cysteine)表达下降,而 SPARC 基因启动子区的甲基化水平则增高,提示 DNA 的甲基化下调 SPARC 的表达。与同年龄段健康者比较,女性纤维肌痛症患者总甲基化水平明显升高^[29]。最近一项同卵双生子研究认为热痛域的下降与 TRPA1 基因启动子区 DNA 甲基化水平升高有关^[30]。Sukenaga 等^[31]研究表明慢性疼痛患者的疼痛症状与全血细胞中 TRPA1 的 DNA 甲基化状态相关。这些研究提示 DNA 甲基化可能成为某些疼痛疾病的生物标志物,我们可能通过检测甲基化水平评估疼痛症状及严重程度。

许多癌症患者可并发神经病理性疼痛。Viet 等^[32]研究表明口腔癌患者 MOR 基因启动子区甲基化水平升高,对口腔癌模型动物应用去甲基化药物可产生镇痛作用,这可能由于癌细胞内 MOR 的再表达导致 β -内啡肽分泌增多、神经元激活受抑制所致。最近一项 I 期临床研究评估了 RRx-001 在进展期癌症患者应用的安全性和耐受性^[33]。RRx-001 在缺氧环境下可被激活,诱导产生活性氧和氮类物质,参与 DNA 甲基化、组蛋白乙酰化和赖氨酸去甲基化等表观遗传调控。该研究虽未直接探讨 RRx-001 的镇痛作用,但其在

癌性神经病理性疼痛中的作用值得进一步探讨,同时也为表观遗传调控措施在临床上的应用提供了借鉴。

结合前文可知,甲基化干预措施通过阻断相关信号通路的传导,有可能作为镇痛药物或者辅助药物参与神经病理性疼痛的治疗。然而目前针对甲基化修饰的干预药物如 DNMT 抑制剂大多作为抗癌药物应用,对于非癌性痛患者的治疗仍待进一步研究。

由于神经病理性疼痛的机制非常复杂,加之临床标本收集相对困难,特别是组蛋白甲基化修饰特异性标本的取得更加困难,目前研究仍集中在动物模型中,要将动物实验结论转化为临床研究和应用,仍然任重道远。

小 结

甲基化修饰在神经病理性疼痛的发生发展中发挥重要作用。但目前研究中依然存在许多未解之谜:(1)甲基化修饰究竟是神经病理性疼痛产生的原因还是结果?(2)甲基化修饰具体通过何种途径调控神经病理性疼痛?(3)甲基化修饰作为治疗神经病理性疼痛的干预措施时,如何才能保证特异性?总之,针对 DNA 和组蛋白甲基化修饰的研究使研究者对于神经病理性疼痛发病机制有了更深入的理解,也为新的诊疗方案提出提供了思路。

参 考 文 献

- [1] Ueda H, Uchida H. Epigenetic modification in neuropathic pain. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(7): 849-867.
- [2] Géranton SM, Tochiki KK. Regulation of gene expression and pain states by epigenetic mechanisms. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2015, 131: 147-183.
- [3] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3): 204-220.
- [4] Chen ZX, Riggs AD. DNA methylation and demethylation in mammals. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 18347-18353.
- [5] Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(3): 204-220.
- [6] Zhang P, Torres K, Liu X, et al. An overview of chromatin-regulating proteins in cells. *Curr Protein Pept Sci*, 2016, 17(5): 401-410.
- [7] Liang L, Lutz BM, Bekker A, et al. Epigenetic regulation of chronic pain. *Epigenomics*, 2015, 7(2): 235-245.
- [8] Ng SS, Yue WW, Oppermann U, et al. Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(3): 407-422.
- [9] Taylor AM, Murphy NP, Evans CJ, et al. Correlation between ventral striatal catecholamine content and nociceptive thresholds in neuropathic mice. *J Pain*, 2014, 15(8): 878-885.
- [10] Pollema-Mays SL, Centeno MV, Apkarian AV, et al. Expression of DNA methyltransferases in adult dorsal root ganglia is cell-type specific and up regulated in a rodent model of neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8:217.
- [11] Zhou YL, Jiang GQ, Wei J, et al. Enhanced binding capability of nuclear factor- κ B with demethylated P2X3 receptor gene contributes to cancer pain in rats. *Pain*, 2015, 156(10):1892-1905.
- [12] Zhang HH, Hu J, Zhou YL, et al. Promoted interaction of Nuclear Factor- κ B with demethylated purinergic P2X3 receptor gene contributes to neuropathic pain in rats with Diabetes. *Diabetes*, 2015, 64(12): 4272-4284.
- [13] Marcus DJ, Zee M, Hughes A, et al. Tolerance to the antinociceptive effects of chronic morphine requires c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pain*, 2015, 11: 34.
- [14] Zhou XL, Yu LN, Wang Y, et al. Increased methylation of the MOR gene proximal promoter in primary sensory neurons plays a crucial role in the decreased analgesic effect of opioids in neuropathic pain. *Mol Pain*, 2014, 10: 51.
- [15] Wang Y, Lin ZP, Zheng HZ, et al. Abnormal DNA methylation in the lumbar spinal cord following chronic constriction injury in rats. *Neurosci Lett*, 2016, 610: 1-5.
- [16] Zhang YK, Huang ZJ, Liu S, et al. WNT signaling underlies the pathogenesis of neuropathic pain in rodents. *J Clin Invest*, 2013, 123(5): 2268-2286.
- [17] Feng W, Teng R, Zhao Y, et al. Epigenetic modulation of Wnt signaling contributes to neuropathic pain in rats. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4727-4733.
- [18] Wang Y, Liu C, Guo QL, et al. Intrathecal 5-azacytidine inhibits global DNA methylation and methyl-CpG-binding protein 2 expression and alleviates neuropathic pain in rats following chronic constriction injury. *Brain Res*, 2011, 1418: 64-69.
- [19] Mitsi V, Zachariou V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. *Neuroscience*, 2016, 338: 81-92.
- [20] Tajerian M, Alvarado S, Millicamps M, et al. Peripheral nerve injury is associated with chronic, reversible changes in global DNA methylation in the mouse prefrontal cortex. *PLoS One*, 2013, 8(1): e55259.
- [21] 居玲莎, 李仁奇, 杨建军, 等. DNA 甲基化修饰在学习记忆中的作用. *临床麻醉学杂志*. 2015, 31(8): 814-816.
- [22] Zhong T, Zhang Y, Guo Q, et al. Parental neuropathic pain influences emotion-related behavior in offspring through maternal feeding associated with DNA methylation of amygdale in rats. *Neurochem Res*, 2015, 40(6):1179-1187.
- [23] Laumet G, Garriga J, Chen SR, et al. G9a is essential for epigenetic silencing of K^+ channel genes in acute-to-chronic pain transition. *Nat Neurosci*, 2015, 18(12): 1746-1755.
- [24] Zhang Y, Chen SR, Laumet G, et al. Nerve injury diminishes opioid analgesia through lysine methyltransferase-mediated transcriptional repression of μ -Opioid receptors in primary sensory neurons. *J Biol Chem*, 2016, 291(16): 8475-8485.
- [25] Zhang J, Liang L, Miao X, et al. Contribution of the suppressor of variegation 3-9 homolog 1 in dorsal root ganglia

- and spinal cord dorsal horn to nerve injury-induced nociceptive hypersensitivity. *Anesthesiology*, 2016, 125 (4): 765-778.
- [26] Zhang Y, Laumet G, Chen SR, et al. Pannexin-1 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to neuropathic pain development. *J Biol Chem*, 2015, 290 (23): 14647-14655.
- [27] Imai S, Ikegami D, Yamashita A, et al. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. *Brain*, 2013, 136(Pt 3): 828-843.
- [28] Tajerian M, Alvarado S, Millicamps M, et al. DNA methylation of SPARC and chronic low back pain. *Mol Pain*, 2011, 7: 65.
- [29] Menzies V, Lyon DE, Archer KJ, et al. Epigenetic alterations and an increased frequency of micronuclei in women with fibromyalgia. *Nurs Res Pract*, 2013; 795784.
- [30] Bell JT, Loomis AK, Butcher LM, et al. Differential methylation of the TRPA1 promoter in pain sensitivity. *Nat Commun*, 2014, 5: 2978.
- [31] Sukenaga N, Ikeda-Miyagawa Y, Tanada D, et al. Correlation between DNA methylation of TRPA1 and chronic pain states in human whole blood cells. *Pain Med*, 2016, 17 (10): 1906-1910.
- [32] Viet CT, Dang D, Ye Y, et al. Demethylating drugs as novel analgesics for cancer pain. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(18): 4882-4893.
- [33] Reid T, Oronsky B, Scicinski J, et al. Safety and activity of RRx-001 in patients with advanced cancer: a first-in-human, open-label, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol*, 2015, 16(9):1133-1142.

(收稿日期:2016-03-19)

床旁超声快速评估胃内容物及容量的研究进展

蒋卫清 陈利海 谢欣怡 鲍红光

近年来,超声的应用提高了麻醉实践中常用技术的安全和质量,如超声引导中心静脉穿刺,超声指导椎管内麻醉,超声引导下外周神经阻滞等。此外,床旁超声即时诊断各种临床状况,对围术期决策过程也具有重要的影响^[1]。国内外许多研究报道了床旁超声快速评估胃内容物及容量以及围术期误吸风险的技术,本文将着重对床旁快速胃超声予以全面综述以期提高围术期临床安全性。

新型床旁超声评估围术期误吸风险

肺误吸是常见而严重的麻醉相关并发症,近几十年来,围术期胃内容物的误吸在外科人群中的总发生率在 0.1%~19%^[2],肺误吸导致了高达 9% 的麻醉相关死亡率^[3]。镇静和全身麻醉会抑制防止误吸的生理机制如食管下括约肌的张力和上呼吸道的保护反射^[4]。因此,麻醉前禁食对于患者的安全十分重要。目前美国麻醉医师协会(ASA)建议术前禁饮禁食:清亮液体 2 h,清淡饮食 6 h,高热量和脂肪类饮食 8 h^[5]。但是这些指南仅仅是针对择期手术的健康患者,没有针对一些胃排空有影响的合并症患者以及困难气道和急诊的情况^[5]。围术期误吸风险的评估完全依靠临床经验,尚缺乏实用无创的床边测试。用于快速评估胃内容物及容量的新型床旁超声技术应运而生。

胃超声扫描技术

成人胃超声扫描采用低频曲阵探头(2~5 MHz)、标准腹部模式。它提供必要的穿透力来分辨相关解剖标志。而高频的线阵探头可用于扫描瘦削患者及儿童或获取胃壁的详细图像。胃壁厚度为 4~6 mm,在禁食状态下应用高频探头(如 5~12 MHz)可以清楚获得五层超声影像^[6~8],这种解剖特点用于区分胃和其他空腔脏器。从胃的内表面开始,第一层薄的强回声区域对应粘膜-空气界面,第二层低回声区域对应黏膜肌层,第三层高回声对应粘膜下层,第四层最明显的低回声层对应固有肌层,第五层强回声区域对应浆膜层^[6~8]。

胃超声扫描患者常用体位包括仰卧位、坐位、半坐位和右侧卧位,最佳体位的选择取决于胃截面的成像以及超声显像。研究表明半坐位或右侧卧位为胃窦和胃体(胃的远端)评估的最佳体位^[6,7,9]。由于重力作用,大部分的胃内容物在半坐位或右侧卧位时积聚于胃的低位区域。因此低容量的胃内液有时只能在坐位或者右侧卧位时才能被超声检测到^[6,9]。

胃窦超声 有研究者提出胃窦部位是胃区最适合超声扫描的部位^[6~9]。探头置于上腹部矢状位或旁矢状位扫描可发现胃窦位于左肝叶前面、胰腺后面较浅的位置^[6~9],标准的胃窦截面的重要标志血管包括腹主动脉(Aorta),下腔静脉(IVC)和肠系膜上动静脉(SMA、SMV)^[6,7,9](图 1,2)。胃窦部位不仅最容易获取超声图像,还可以准确评估反映整个胃内容物。

作者单位:210006 南京医科大学附属南京医院 南京市第一医院麻醉科

通信作者:鲍红光,Email:hongguang_bao@hotmail.com