

· 实验研究 ·

疼痛调控相关 miRNAs 的筛选及脊髓 miR-29c 对神经病理性痛大鼠痛阈的影响

李彩娟 夏凡 毛毛 张瑶 沈晓凤 徐世琴

【摘要】 目的 通过 microRNAs (miRNAs) 芯片技术筛选疼痛调控相关的 miRNAs, 观察 microRNA-29c (miR-29c) 对神经病理性痛大鼠痛阈的影响。**方法** 实验一: 雌性 SD 大鼠, 随机分为神经病理性痛组 (SNI 组) 及妊娠神经病理性痛组 (PSNI 组), 测定机械缩足阈值 (MWT), 观察分娩对疼痛的影响。在 SNI 组及 PSNI 组大鼠分娩后 MWT 差异显著时, 取脊髓腰膨大组织, 筛选差异表达的 miRNAs。实验二: 选取目的 miRNAs, 包被过表达或沉默慢病毒, 脊髓内注射干预后观察 SNI 组大鼠 MWT 变化。**结果** 与 SNI 组大鼠比较, PSNI 组大鼠分娩后第 3 天 MWT 明显升高, 脊髓 c-Fos 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$); miRNAs 芯片分析共发现 71 条差异表达的 miRNAs, 在 PSNI 大鼠显著上调 37 条, 显著下调 34 条; 选取并包被 miR-124a 过表达、miR-29c 沉默慢病毒注射, miR-29c 表达沉默可明显提高 SNI 组大鼠 MWT。**结论** miR-29c 是通过基因芯片筛选获得的 miRNA, 下调 SNI 大鼠脊髓 miR-29c 表达, 能够显著改善病理性痛状态。

【关键词】 神经病理性痛; microRNAs; miR-29c; 分娩

Screening of pain regulation related miRNAs and effects of spinal miR-29c on neuropathic pain in rats LI Caijuan, XIA Fan, MAO Mao, ZHANG Yao, SHEN Xiaofeng, XU Shiqin. Department of Anesthesiology, Women's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital, Nanjing 210004, China

Corresponding author: XU Shiqin, Email: xusqnj@126.com

【Abstract】 Objective To explore the pain regulation related microRNAs (miRNAs), and the effects on hyperalgesia in neuropathic pain rat model. **Methods** Step 1: adult female SD rats were randomly divided into two groups: spared nerve injury (SNI) neuropathic pain model group (group SNI) and SNI with pregnancy group (group PSNI). The paw mechanical withdrawal threshold (MWT) was measured to explore the effects of delivery on hyperalgesia. And lumbar enlargement spinal tissue of SNI and PSNI rats were obtained when there were significant differences of pain threshold between groups. Then these tissues were sent for miRNAs gene analysis, looking for differentially expressed miRNAs. Step 2: the functional miRNAs were discovered by observing the changes of pain threshold after intraspinal injection of lentiviruses in SNI rats. And the bioinformatics and target gene of pain-related miRNAs were analyzed. **Results** Compared with group SNI, MWT was significantly decreased and a pain relief was observed on day 3 after childbirth in group PSNI ($P < 0.05$). The results of miRNAs gene analysis showed 71 largely different expressional miRNAs, including 37 up-regulated miRNAs and 34 down-regulated miRNAs in group PSNI. Then the up-regulated miR-124a and down-regulated miR-29c were chosen for the functional research through spinal injection of overexpressed miR-124a lentivirus and silenced miR-29c lentiviruses in SNI rats. Increased pain threshold in silenced miR-29c SNI rats indicating a pain mediated role of miR-29c. **Conclusion** Spinal miR-29c is obtained from label-free quantification, specific down-expression of miR-29c in the spinal tissue can notably raise the pain threshold of SNI rat model, prompting the potential role of miR-29c in the pain relief process.

【Key words】 Neuropathic pain; microRNAs; miR-29c; Parturition

大型前瞻性研究表明, 剖宫产术后发生持续疼

痛比预期的罕见^[1], 且与其他手术比较, 术后疼痛恢复更快^[2-3]。同样的, 在动物研究中, 神经病理性痛大鼠模型在分娩后, 痛觉敏化得到缓解^[4], 手术引起的机械性超敏反应在产后早期消散更快^[5]。上述研究提示分娩具有一定缓解病理性疼痛的作用, 揭示相关机制可能为加快术后康复提供新思

DOI: 10.12089/jca.2019.08.018

基金项目: 国家自然科学基金 (81500944, 81271242); 南京市卫生局课题 (YKK14127)

作者单位: 210004 南京医科大学附属妇产医院 南京市妇幼保健院麻醉科

通信作者: 徐世琴, Email: xusqnj@126.com

路。microRNAs (miRNAs) 的发现为疾病机制研究提供了新靶点,其主要在转录后水平,通过负性调节下游的数个靶基因,参与基因组表达调控,在生命科学领域发挥重要作用^[6]。因此,分娩保护相关的 miRNAs 疼痛调控机制,将为其临床治疗提供新的理论线索。本研究旨在筛选疼痛调控相关的 miRNAs,观察 microRNA-29c (miR-29c) 对神经病理性痛大鼠病阈的影响。

材料与方法

动物选择 SPF 级雌性 SD 大鼠 60 只,体重 300~420 g。研究经南京医科大学伦理委员会通过,严格遵守国家卫生机构发布的实验室动物指南。置于室温 24~26 °C 饲养,自由饮水和摄食,光照:黑暗交替时间 12 h:12 h。

实验一:

动物模型及行为学检测 实验动物禁食 8 h,随机分为两组:SNI 组及 PSNI 组。SNI 组选取非妊娠 SD 大鼠参照文献方法^[7]构建 SNI 模型:采用 10% 的水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉,于大鼠胫骨平台处切开皮肤,钝性分离肌肉,找出坐骨神经分支结扎并剪断腓总神经及胫神经,保留腓肠神经,缝合后用碘伏消毒;PSNI 组选取妊娠 12~13 d 的大鼠,测基础痛阈,构建 SNI 模型。术后每隔 1 天测定各组大鼠痛阈:采用 von-Frey 丝垂直刺激各组大鼠左足掌面,出现缩足反应记录为阳性,共检测 6 次,除去最大值和最小值,计算平均值即为机械缩足阈值 (mechanical withdraw threshold, MWT)。

c-Fos 蛋白检测 SNI 组及 PSNI 组大鼠各 3 只取脊髓组织,用细胞裂解液进行细胞裂解,采用 Trizol 法提取蛋白,并用 BCA 法测定 c-Fos 蛋白含量。每个蛋白样本取 50 µg,在 4% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (Bio Rad) 上进行电泳、转膜,5% BSA-TBST 室温下孵育 2 h,用 c-Fos 1:500 (abcam, ab208942) 4 °C 孵育过夜,以 β-actin (abcam, ab8226) 为内参,用辣根过氧化物酶标记的二抗 1:2 000 孵育 1 h,蛋白条带由 Western Lightning® ECL PRO 增强底物 (PrimerElmer, 马萨诸塞州,美国) 检测,并在 TANON 1600/1600 R 凝胶成像系统上成像 (UVP, 美国)。

miRNA 基因芯片分析 分娩后第 3 天立即处死两组大鼠,迅速取出脊髓组织进行基因芯片分析。采用 Trizol 法提取 RNA:脊髓组织用 PBS 冲洗三次,加入 1 ml Trizol 试剂,室温下孵育 2 min,将溶液转移至无 RNase 的 EP 管中,加入 200 µl 三氯甲

烷,剧烈摇动 15 s;室温离心 15 min,将溶液分为三层,取上层无色液体,加入等体积异丙醇,室温震动 5 min,4 °C 离心 12 000 g,10 min,去除上清,加入 1 ml 75% 乙醇沉淀,摇匀 15 s,离心分离;去除上清,沉淀干燥 3~5 min,用无菌 DEPC 水溶解 RNA。经 NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific) 定量并使用 Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) 检测 RNA 完整性。RNA 质检合格后,参照芯片标准流程进行样本的标记、芯片的杂交及洗脱。总 RNA 经过去磷酸化、变性,再进一步用 Cy3 标记,经纯化后与芯片杂交,杂交结束洗脱后通过 Agilent Scanner G2505C (Agilent Technologies) 扫描得到原始图像。

实验二:

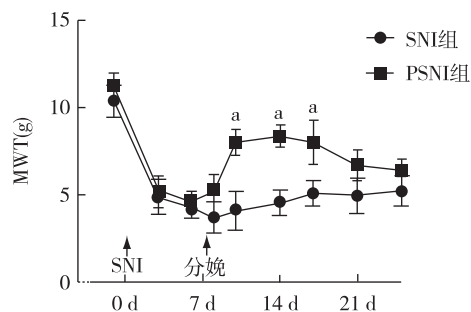
大鼠脊髓病毒注射 SNI 大鼠模型构建成功后,参照文献^[8],于脊髓内分别注射对照慢病毒、miR-124a 过表达慢病毒和 miR-29c 沉默慢病毒 (滴度 1×10^9 tU/ml)。10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔麻醉,固定并切开背部皮肤,分离肌肉、暴露 T₁₃ 水平的胸椎、棘突和椎板,于 T₁₃ 中线偏右 0.5 mm 处,开放 2 个 1 mm 直径的小孔,利用显微操作器和 10 µl 微量进样器 (头端直径 40~60 mm),进针 0.8 mm,每孔注射 2 µl 病毒,共 4 µl 病毒悬液,注射速度 0.5 µl/min,逐层缝合皮肤。通过绿色荧光蛋白 (GFP) 鉴定病毒转染情况。

统计分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。数据采用 Kolmogorov-Smirnov 法进行正态性检验,正态分布计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,痛阈比较采用双因素方差分析,其他结果采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。芯片基因分析部分,采用 T 检验的 P 值和倍数变化值进行差异 miRNA 筛选,筛选的标准为上调或者下调倍数变化值 ≥ 2.0 且 $P \leq 0.05$ 。采用 GraphPad Prism 5.0 软件生成统计图表。

结 果

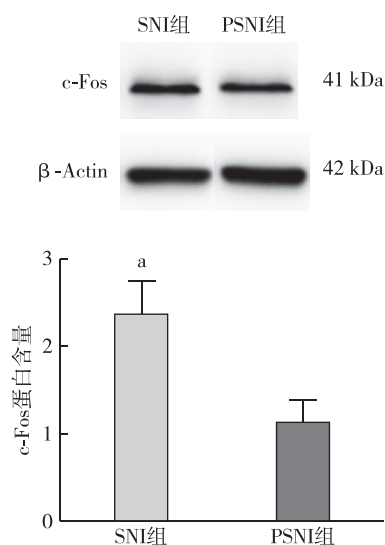
MWT 及 c-Fos 蛋白含量 与 SNI 组大鼠比较,PSNI 组大鼠分娩后第 3 天 MWT 明显升高 ($P < 0.05$) (图 1);脊髓组织 c-Fos 蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$) (图 2)。

疼痛调控相关 miRNAs 筛选 共筛选得到 71 条差异表达的 miRNAs (差异倍数变化值 ≥ 2.0 , $P \leq 0.05$)。其中 PSNI 组大鼠中表达明显上调的 miRNAs 37 条,明显下调的 miRNAs 34 条 (图 3)。PSNI 组大鼠 miR-124a 显著高表达,miR-29c 显著低



注:与 SNI 组比较, $^aP < 0.05$

图 1 两组大鼠机械缩足阈值的比较



注:与 PSNI 组比较, $^aP < 0.05$

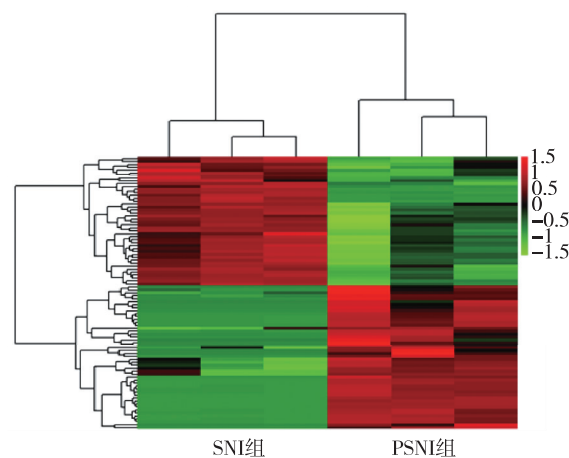
图 2 两组大鼠脊髓组织 c-Fos 蛋白含量的比较

表达(图 4)。

GFP 荧光显示病毒感染成功(图 5)。与 SNI 组比较,仅 miR-29c 表达沉默大鼠痛阈明显上调($P < 0.05$)(图 6-7)。

讨论

近年来,研究表明妊娠合并病理性疼痛的动物模型,在分娩后表现出了痛觉过敏的显著改善^[4-5],提示分娩在疼痛调控中发挥镇痛作用。进一步的机制研究初步揭示了,分娩相关的疼痛调控作用可能与产后机体自身合成释放的激素在中枢发挥的镇痛作用密切相关^[9],如在产后及哺乳阶段,产妇外周、中枢催产素浓度均升高^[10],而催产素可通过与瞬时受体电位(transient receptor potential, TRP)超家族成员 TRPV-1 通道结合,致通道脱敏,发挥内源性镇痛作用^[11]。目前,关于分娩相关的疼痛调控



注:红色表达上调;绿色表达下调

图 3 SNI 组大鼠脊髓组织 miRNAs 表达分析

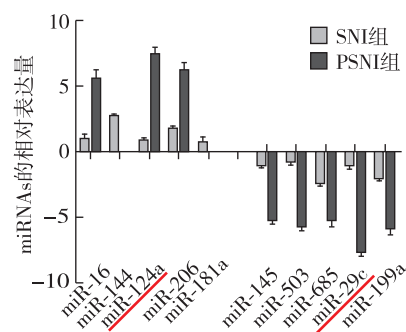
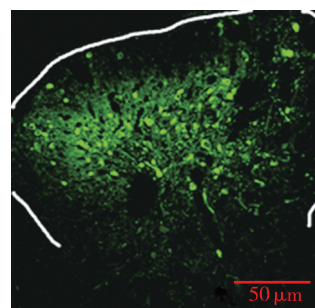


图 4 部分 miRNAs 相对表达量的比较



注:绿色为含 GFP 的病毒

图 5 脊髓转染病毒荧光图

具体机制尚不清楚,因此,通过 label-free 分析获得分娩相关的疼痛调控的 miRNAs,有望为疼痛机制研究及治疗提供新思路。

首先,采用 Gutierrez 等^[4]的方法建立妊娠 SNI 模型,结果提示,与 SNI 组比较,PSNI 组大鼠在分娩后第 3 天机械缩足阈值显著升高,且 Western blot 结果提示 PSNI 组大鼠脊髓中 c-Fos 蛋白表达也显著降低,疼痛得到缓解。c-Fos 是一种经典的神经元标

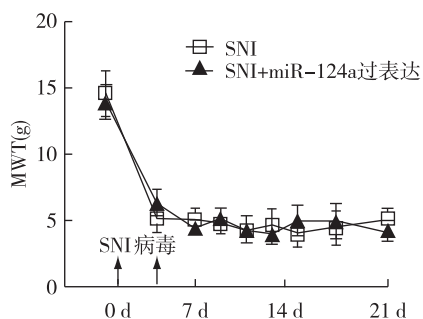


图 6 过表达 miR-124a 对 SNI 大鼠 MWT 的影响

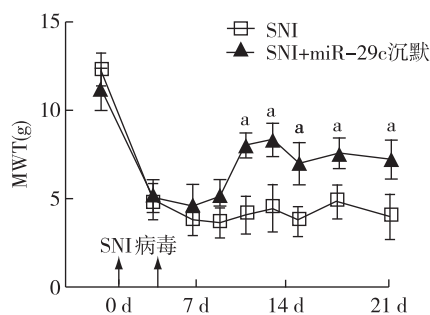
注:与 SNI 组比较, ^a $P < 0.05$

图 7 沉默 miR-29c 表达对 SNI 大鼠 MWT 的影响

记物,在疼痛大鼠的初级感觉神经元中被激活,并调节编码脑啡肽等疼痛介质,是疼痛伤害性反应的重要反应蛋白^[12]。以上结果,与前期研究的结论基本一致,初步证实了分娩具有缓解部分病理性疼痛的作用。

miRNA 是一类非编码调控 RNA,在疼痛领域的研究近年来备受关注。上调中枢 miR-7a 的表达,能够降低神经丝光多肽的表达,通过阻断信号转导子和转录信号通路激活子,有效缓解神经病理性疼痛^[13];使用抑制剂阻断 miR-21 的表达,能够有效缓解神经损伤引起的痛觉过敏和触诱发痛^[14]。因此,本研究将分娩后第 3 天,两组疼痛阈值出现显著差异时,分别取 SNI 及 PSNI 组大鼠脊髓组织进行 Label-free 蛋白质组定量分析,以寻找分娩相关疼痛调控的 miRNAs。结果共发现 71 条差异表达的 miRNAs,其中在 PSNI 大鼠中高表达的 miR-124a 和低表达的 miR-29c,组间差异最大。为了进一步验证两者在疼痛调控中的作用,我们构建 miR-124a 过表达、miR-29c 表达沉默慢病毒载体,包装成高滴度病毒颗粒,分别在 SNI 大鼠中进行脊髓内注射,以评估其对大鼠病理性痛的影响。荧光显微镜下观察脊髓组织切片,发现病毒携带的 GFP 蛋白分布于脊

髓背角,提示病毒转染成功。行为学结果发现,与对照 SNI 大鼠比较,miR-124a 过表达大鼠痛阈未发生显著改变,miR-29c 表达沉默大鼠痛阈显著上调,与妊娠大鼠分娩后痛阈改变相似。

进一步对 miR-29c 进行生物信息学分析发现,miR-29c 普遍存在于各物种间(软体、鱼类、爬行、哺乳),提示其功能的重要性。miR-29c 进化上高度保守,在哺乳动物中(人、鼠、狗、马等)同源性为 100%,提示虽以动物模型为研究对象,但依然可为临床研究提供有价值的参考。文献复习关于 miR-29c 在疼痛领域的功能研究发现,miR-29c 在脊髓小胶质细胞活化及神经病理性疼痛的形成、维持中神经系统调控中发挥作用^[15]。为探索 miR-29c 参与相关疼痛调控的可能作用机制,寻找深入研究的有用线索,我们借助生物信息学分析并结合文献报道,预测其可能参与调控的下游靶基因。结果发现 N 型电压门控钙离子通道 Cav2、蛋白激酶 B(又名 AKT3)及催产素受体,由于功能上参与疼痛调控,且其 3'非编码区中的“UGGUGCU”碱基序列,均与不同物种 miR-29c 的保守序列“ACCACGA”完全匹配,提示其可能为 miR-29c 参与疼痛调节的功能靶基因。

综上所述,miR-29c 是通过芯片筛选获得的、人鼠高度同源、显著低表达于 PSNI 大鼠脊髓组织中的 miRNA,下调 SNI 大鼠脊髓组织 miR-29c 表达,能够显著改善病理性疼痛状态,可能是通过参与调控疼痛相关的靶基因表达,其具体机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Eisenach JM, Pan P, Smiley RM, et al. Resolution of pain after childbirth. *Anesthesiology*, 2013, 118(1): 143-151.
- [2] Houle TT, Miller S, Lang JE, et al. Day-to-day experience in resolution of pain after surgery. *Pain*, 2017, 158(11): 2147-2154.
- [3] Booth JL, Sharpe EE, Houle TT, et al. Patterns of recovery from pain after Cesarean delivery. *Pain*, 2018, 159(10): 2088-2096.
- [4] Gutierrez S, Liu B, Hayashida K, et al. Reversal of peripheral nerve injury-induced hypersensitivity in the postpartum period: role of spinal oxytocin. *Anesthesiology*, 2013, 118(1): 152-159.
- [5] Aschenbrenner CA, Houle TT, Gutierrez S, et al. Modeling individual recovery after peripheral nerve injury in rats and the effects of parturition. *Anesthesiology*, 2014, 121(5): 1056-1067.
- [6] Braicu C, Cojocneanu PR, Chira S, et al. Clinical and pathological implications of miRNA in bladder cancer. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 791-800.
- [7] Pertin M, Gosselin RD, Decosterd I. The spared nerve injury

- model of neuropathic pain. *Methods Mol Biol*, 2012, 851: 205-212.
- [8] Meunier A, Latremliere A, Dominguez E, et al. Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury induced neuropathic pain in the rat. *Mol Ther*, 2007, 15(4): 687-697.
- [9] Melchior M, Juif PE, Gazzo G, et al. Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, 2018, 159(12): 2630-2640.
- [10] Grewen KM, Davenport RE, Light KC. An investigation of plasma and salivary oxytocin responses in breast- and formula-feeding mothers of infants. *Psychophysiology*, 2010, 47(4): 625-632.
- [11] Nersesyan Y, Demirkhanyan L, Cabezas-Bratesco D, et al. Oxytocin modulates nociception as an agonist of pain-sensing TRPV1. *Cell Rep*, 2017, 21(6): 1681-1691.
- [12] Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 1987, 328(6131): 632-634.
- [13] Yang FR, Chen J, Yi H, et al. MicroRNA-7a ameliorates neuropathic pain in a rat model of spinal nerve ligation via the neurofilament light polypeptide-dependent signal transducer and activator of transcription signaling pathway. *Mol Pain*, 2019, 15:1744806919842464.
- [14] Sakai A, Suzuki H. Nerve injury-induced up-regulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 435(2): 176-181.
- [15] Jeong H, Na YJ, Lee K, et al. High-resolution transcriptome analysis reveals neuropathic pain gene-expression signatures in spinal microglia after nerve injury. *Pain*, 2016, 157(4): 964-976.
- (收稿日期:2018-12-10)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床麻醉学杂志》关于一稿两投问题的声明

为维护学术刊物的严肃性和科学性,也为了维护作者的名誉和向广大读者负责,本刊编辑部重申坚决反对一稿两投并采取以下措施:(1)作者和单位对来稿的真实性和科学性均应自行负责。刊出前需第一作者在校样首页亲笔签名,临床研究和实验研究来稿的通信作者也需亲笔签名。(2)来稿需附单位推荐信,应注明稿件无一稿两投,署名无争议,并加盖公章。(3)凡接到编辑部收稿回执后3个月内未接到退稿通知,系稿件仍在审阅中,作者欲投他刊,或将在他刊上发表,请先与编辑部联系撤稿,切勿一稿两投。(4)编辑部认为来稿有一稿两投嫌疑时,在认真收集有关资料和仔细核对后通知作者,并由作者就此问题作出解释。(5)一稿两用一经证实,将择期在杂志上刊出其作者单位和姓名以及撤销该文的通知;向作者所在单位和同类杂志通报;2年内拒绝发表该作者为第一作者所撰写的任何来稿。