

miRNA - 467b 在痛性糖尿病神经病变中对 TNF - α 的调节作用

夏志强 郝利军 吴 斌

摘 要 **目的** 探讨 miRNA - 467b 在痛性糖尿病神经病变中对 TNF - α 的调节作用。**方法** SD 大鼠腹腔内注射链脲佐菌素建立痛性糖尿病神经病变(模型组, $n = 20$), 空白组($n = 20$)注射生理盐水;模型组在建模完成后 1 周分为两组 - 实验组与对照组, 每组 10 只大鼠, 实验组注射人工合成的 miRNA - 467b, 对照组注射等量的生理盐水, 检测所有大鼠神经痛性状况与 miRNA - 467b、TNF - α 表达水平。**结果** 模型组大鼠的机械痛和热痛的反应潜伏期相比空白组都减少($P < 0.05$), 并且实验组的机械痛和热痛的反应潜伏期也高于对照组($P < 0.05$)。模型组大鼠的 miRNA - 467b 表达量相比空白组减少, TNF - α 表达量上升, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 并且实验组的 miRNA - 467b、TNF - α mRNA 表达水平与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验组大鼠的 TNF - α 蛋白表达量下降, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 同时模型组的 TNF - α 蛋白表达量高于空白组($P < 0.05$)。**结论** 痛性糖尿病神经病变中 miRNA - 467b 呈现下调表达状况, 可导致 TNF - α 表达上升, 从而引起机械痛和热痛的产生。

关键词 机械痛 热痛 miRNA - 467b 糖尿病神经病变 TNF - α

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.10.007

Regulation of miRNA - 467b on TNF - α in Painful Diabetic Neuropathy. Xia Zhiqiang, Hao Lijun, Wu Bin. Virus Resource Center, National Institute for Disease Control and Prevention, CDC, Beijing 102206, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of miRNA - 467b on the regulation of TNF - α in painful diabetic neuropathy. **Methods** SD rats by intraperitoneal injection of streptozotocin painful diabetic neuropathy (model group, $n = 20$), the blank group ($n = 20$) were injected of saline. Model group in 1 weeks after modeling were divided into two groups: experimental group and control group, 10 rats in each group. The experimental group were given the artificial injection the synthesis of miRNA - 467b, and the control group were injected with normal saline. All the rats were to detect neuralgic condition and miRNA - 467b, TNF - α expression level. **Results** The latency of mechanical pain and thermal pain in the model group were lower than that in the blank group ($P < 0.05$), and the latency of mechanical pain and thermal pain in the experimental group was also higher than that in the control group ($P < 0.05$). The rats in the model group the expression of miRNA - 467b compared with the blank group were lower, and the TNF - α expression were increased, there were statistically significant difference ($P < 0.05$). And the miRNA - 467b, TNF - α mRNA expression level in the experimental group were statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of TNF - α protein in the experimental group was decreased, compared with the control group were statistically significant difference ($P < 0.05$), and the expression of TNF - α protein in the model group was higher than that in the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of miRNA - 467b is down-regulated in painful diabetic neuropathy that can induces the expression of TNF - α and cause mechanical pain and thermal pain.

Key words Mechanical pain; Heat pain; miRNA - 467b; Diabetic neuropathy; TNF - α

糖尿病(diabetes mellitus, DM)并发痛性糖尿病神经病变是最常见的慢性糖尿病并发症, 有超过 50% 的 2 型糖尿病患者疾病过程中会发生不同程度的痛性神经病变^[1]。脊髓背角作为中枢神经系统

的第一个中转站, 从初级感受器传入的痛觉在脊髓背角初步整合, 并进一步传输到更高级的大脑中枢, 形成了有意识的痛觉^[2,3]。脊髓背角主要由细胞及相关分子构成, 包括感觉神经元、神经胶质细胞、离子通道及受体、酶、细胞因子等, 在神经病理痛的发病机制中发挥着重要作用^[4,5]。TNF 在神经组织中表达水平较低, 当神经组织自身受损、缺血、炎性病变, 脊髓后角、大脑蓝斑核及海马区的 TNF - α 迅速升高。microRNA 是由 20 ~ 23 个核苷酸组成, 在生物体内

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30871283)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(夏志强); 030012 太原, 山西省人民医院麻醉科(郝利军); 100730 北京协和医院外科(吴斌)

通讯作者: 夏志强, 电子信箱: 1101016904@qq.com

miRNA 能够靶向一个或者多个 mRNA,通过翻译水平的抑制或降解靶基因 mRNAs 而调节基因的表达^[6,7]。miRNA 在生物发育、细胞增殖和凋亡等生理及病理的发生和维持过程中发挥重要的调控作用。近年来已有研究通过基因芯片等高通量技术对背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)等组织内的 miRNA 表达情况进行了分析,并取得了一些成果,例如通过 miRNA array 显示在神经病理痛模型中 DRG 神经元的 miRNA 表达会发生显著的改变,通过研究发现 miRNA 进行转录后的调节来调控疼痛的过程^[8,9]。miRNA - 183 家族可以下调 DRG 中 the stress granule (SG) protein TIA - 1 和 Nav1.3 来调节神经病理性疼痛^[10]。有研究者用 miRNA array 筛选出 miRNA - 467b 在糖尿病神经病理痛大鼠脊髓中与疼痛有很高的相关性,但并未对这一实验结果进行验证^[11]。本研究分析了 miRNA - 467b 在糖尿病神经病理痛大鼠脊髓中组织内的表达变化,通过鞘内注射 miRNA - 467b 模拟物,观察大鼠疼痛行为的变化,并对其可能作用的靶标进行分析。本文具体研究了脊髓中 miRNA - 467b 调节 TNF - α 表达在痛性糖尿病神经病变中的作用,现报道如下。

材料与方法

1. 动物来源:8 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,体重 170 ~ 200g,购自笔者医院实验动物中心(实验动物许可证号为 SCXK2016 - 0001),饲养于 SPF 级动物房内。标准饲料配方:豆料 23%、骨粉 3%、鱼粉 3%、面粉 19%、玉米 20%、麸皮 24%。

2. 模型建立:腹腔注射新鲜溶于 0.1mol/L pH 值 4.5 柠檬酸缓冲溶液的链脲霉素 STZ(55mg/kg)以构建糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)大鼠动物模型(模型组,20 只),空白组(20 只)注射相同剂量的溶剂。每周检测 1 次血糖及痛觉行为学变化,DPN 神经病理性疼痛大鼠动物模型判定标准:当注射 STZ 3 天开始血糖水平持续 $\geq 20\text{mmol/L}$,并且于注射 STZ 4 周后出现持续的神经病理性疼痛(触觉痛觉阈值 $\leq 7.5\text{g}$ 且热痛觉阈值 $\leq 10\text{s}$)的。模型组在建模完成后 1 周分为两组,实验组与对照组,每组 10 只大鼠,都采用鞘内给药方式,实验组注射人工合成的 miRNA - 467b,对照组注射等量的生理盐水;打开螺帽,用注射器注入 miRNA - 467b 的人工模拟物,给药的剂量是每次 $3\mu\text{l}$ (浓度为 75nmol/L),3 天注射 1 次,持续注射 1 周。

3. 机械痛与热痛测量:在机械痛测量中,测量前大鼠在测量装置中适应 15min,待其没有探索和舔舐的动作且保持安静后开始测量。使用 1、1.4、2、4、6、8、10、15g 的 Von Fery Hair,按 Dixon 法,从 4g 开始刺大鼠术侧后肢的脚掌,持续 6 ~ 8 次,观察大鼠是否抬脚或者舔所刺的脚掌,代表有反应,记“X”,使用 6g 的针刺激脚掌;如果在时间内没有反应,记“O”,使用 2g 的针刺激脚掌。按照以上的方式增大或减少刺激的力,直到第一次出现与上一次不同的反应,那么从这次的上一次刺激记作有效刺激的开始,直到 6 次刺激完成,那么测量结束。试验中刺激间隔为 30s ~ 1min,且测量全程保持环境安静。在热痛测量中,测量前大鼠在测量装置中适应 15min,待其没有探索和舔舐的动作且保持安静后开始测量。使热辐射装置的辐射点对准术侧脚掌,按下测量按钮,同时计时开始,直到大鼠抬脚或者舔脚掌,计时结束。记录抬脚时间,每只脚测 3 次,记录平均值。防止灼伤大鼠,测量间隔为 10min,每次测量时间最长强制定位 20s,20s 内没有反应记为 20s,测量结束。

4. 表达检测分析:取每个组的 $L_3 \sim L_5$ 的脊髓,进行分子生物学检测,检测 miRNA - 467b、TNF - α 的 mRNA 和蛋白的量。提取总 RNA,反转录后,按比例加入荧光定量试剂,用荧光定量 PCR 仪检测。在 Western blot 法中取 $L_3 \sim L_5$ 脊髓组织,超声破碎,提取总蛋白质后进行检测。内参照为 GAPDH,目的蛋白与 GAPDH 吸光度比值即为目的蛋白。miRNA - 467b 引物序列:正向引物:5' - ATGGGTCCAGTCATGCCTGCCAGTAAGAAGGCCGAG - 3',反向引物:5' - AGCTCAGGAATCAGTGTGTCCAGTGGACTGAGTCAGG - 3'。TNF - α 引物序列:正向引物:5' - GGATCTCAAAGACAACCAAC - 3',反向引物:5' - ACAGACAATGACTCCAAAG - 3',GAPDH 为通用引物。

5. 统计学方法:实验结果用 SPSS 21.00 统计软件进行数据统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数间比较用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 机械痛与热痛程度对比:所有动物都成模成功,成模率为 100.0%。模型组大鼠经腹腔注射 STZ 后,机械痛和热痛的反应潜伏期相比空白组都减少($P < 0.05$),并且实验组的机械痛和热痛的反应潜伏期也高于对照组($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 不同组别的机械痛与热痛的反应潜伏期对比 ($\bar{x}, \bar{s}, \bar{x} \pm s$)

组别	只数 (<i>n</i>)	机械痛	热痛
空白组	20	4.92 ± 0.42	11.84 ± 4.22
模型组	20	1.44 ± 0.34	3.20 ± 2.49
实验组	10	2.33 ± 0.55	5.20 ± 1.55
对照组	10	0.89 ± 0.44	1.98 ± 0.82
<i>F</i>		9.114	15.251
<i>P</i>		<0.05	<0.05

2. miRNA - 467b、TNF - α mRNA 表达情况: qPCR 检测不同组别的脊髓组织 miRNA - 467b、TNF - α mRNA 表达水平,结果显示模型组大鼠的 miRNA - 467b 表达量相比空白组减少,TNF - α 表达量上升,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);并且实验组的 miRNA - 467b、TNF - α mRNA 表达水平与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),详见表 2。

表 2 不同组别的 miRNA - 467b、TNF - α mRNA 相对表达情况对比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (<i>n</i>)	miRNA - 467b	TNF - α
空白组	20	3.42 ± 0.14	0.78 ± 0.24
模型组	20	0.53 ± 0.18	5.02 ± 0.19
实验组	10	1.09 ± 0.12	3.48 ± 1.54
对照组	10	0.24 ± 0.42	10.09 ± 1.62
<i>F</i>		9.143	18.382
<i>P</i>		<0.05	<0.05

3. TNF - α 蛋白表达情况:注射人工合成的 miRNA - 467b 的大鼠造模后,实验组的 TNF - α 蛋白表达量下降,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$);同时模型组的 TNF - α 蛋白表达量高于空白组 ($P < 0.05$),详见图 1。

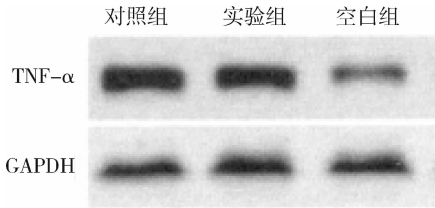


图 1 不同组别的 TNF - α 蛋白表达情况比较

讨 论

糖尿病是临床上的常见病、多发病。近年来呈现出爆炸式增长的趋势,2016 年世界卫生日,世界卫生组织发布了首份全球糖尿病报告,报告称全球年龄超过 18 岁的人群中,2014 年糖尿病患者人数增加至 4.22 亿人,占全球总人口的 8.5%。而 1980 年为 1.08 亿人,这意味着糖尿病并发症的患者也出现了

井喷式增长,其中最常见的并发症是周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) [12,13]。DPN 是慢性高血糖引起的对称性的,时间依赖性的感觉运动多发神经病变,同时合并心血管危险和微血管病变。表现为神经损伤后慢性的“手套,长筒袜”的感觉缺失,其中大约 50% 的 DPN 患者有神经病理性痛 (painful diabetic peripheral neuropathy, painfulDNP) [14~16]。患有 painfulDNP 的患者非常痛苦,患者往往描述双足烧灼痛,电击痛样痛,针刺痛,刀割痛以及和衣物接触痛 [6],随着病情的进展双腿和双上肢也同时受累,而且这种痛往往在夜间发作,严重干扰睡眠,最终发展抑郁和焦虑,降低了患者的生活质量 [7]。在过去的十多年中研究人员试图通过对这种疼痛机制的研究来寻求有效的治疗方法,目前 painfulDPN 的发生机制包括中枢和外周敏化的假说 [17]。外周敏化是源于痛觉感受器的上调和传入神经元的异常兴奋。这可能发生在受损的轴突或背根神经节的神经元。中枢敏化发生于脊髓背角痛觉的敏化和脊髓抑制网络的去抑制以及中枢的重建 [18]。到目前为止,有些药物已经应用于临床治疗,例如三环类的抗抑郁药阿米替林;五羟色胺、去甲肾上腺素再摄取的抑制剂杜洛希丁;抗惊厥药普瑞巴林,但是对疼痛的作用有限,而且有很大的不良反应 [19]。而近年来的研究发现,miRNA 可以在转录后水平对靶基因进行调控使靶基因降解或沉默从而起到痛觉的调制 [20]。

miRNAs 作为一种新的非编码 RNA 已经被证实 在体内所有组织中存在表达。有学者用 miRNA array 筛选出 miR - 467b 在糖尿病神经病理痛大鼠脊髓中 与疼痛有很高的相关性,而且经过生物信息学分析显示 miRNA - 467b 可能调节 TNF - α ,这提示在糖尿病 神经病理痛 miRNA - 467b 有可能作为调节 TNF - α 的调节物质 [8,9]。还有研究在大鼠坐骨神经慢性压 迫损伤模型中发现坐骨神经挤压后,挤压局部、脊髓 后角、大脑蓝斑核及海马区的神经胶质细胞、成纤维 细胞、施万细胞、内皮细胞及巨噬细胞内 TNF 的 mR- NA 含量迅速升高,TNF - α 浓度增加 [21]。本研究显 示模型组大鼠经腹腔注射 STZ 后,机械痛和热痛的 反应潜伏期相比空白组都减少,脊髓中检测的 miR- NA - 467b 的量相比空白组减少,而 Western blot 法检 测 TNF - α 的量增加。注射人工合成的 miRNA - 467b 的大鼠造模后,实验组检测机械痛和热痛的反应潜伏 期高于空白组,脊髓中检测的 miRNA - 467b 的量相

比空白组增加, TNF- α 的 mRNA 和蛋白的量减少。由此推测 TNF- α 在神经病理痛形成与维持中具有重要作用。此外研究表明在糖尿病神经病理痛的患者中患者疼痛的程度与血浆中 TNF- α 浓度呈正相关^[22]。同时 STZ 诱导的糖尿病疼痛大鼠模型中沙利度胺可以通过降低 TNF- α 的水平发生镇痛作用^[23-25]。

综上所述, 痛性糖尿病神经病变中 miRNA-467b 呈现下调表达状况, 可导致 TNF- α 表达上升, 从而引起机械痛和热痛的产生。

参考文献

- Jia L, Wang L, Chopp M, *et al.* MicroRNA 146a locally mediates distal axonal growth of dorsal root ganglia neurons under high glucose and sildenafil conditions[J]. *Neuroscience*, 2016, 4(329): 43-53
- Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG. Deregulation of NF- κ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy[J]. *J Physiol Biochem*, 2015, 71(1): 51-58
- 刘宇, 王秋月. microRNA-124 与糖尿病肾脏疾病[J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2017, 37(4): 246-249
- Li YB, Wu Q, Liu J, *et al.* miR-199a-3p is involved in the pathogenesis and progression of diabetic neuropathy through downregulation of Serpin E2[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2417-2424
- 何凤, 周姗姗, 关昌杰, 等. 微小 RNA-135b 调控 Smad5 在糖尿病肾病发病中的作用研究[J]. *新医学*, 2017, 48(5): 317-322
- Pichu S, Patel BM, Apparsundaram S, *et al.* Role of biomarkers in predicting diabetes complications with special reference to diabetic foot ulcers[J]. *Biomark Med*, 2017, 11(4): 377-388
- Li Y, Ma W, Xie C, *et al.* Identification of genes and signaling pathways associated with diabetic neuropathy using a weighted correlation network analysis: a consort study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(47): e5443
- 宋健, 陈晓会, 胡庆鹰, 等. miRNAs 在冠心病合并糖尿病患者发病过程中的关联性[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(13): 3371-3373
- El-Lithy GM, El-Bakly WM, Matboli M, *et al.* Prophylactic L-arginine and ibuprofen delay the development of tactile allodynia and suppress spinal miR-155 in a rat model of diabetic neuropathy[J]. *Transl Res*, 2016, 11(177): 85-97
- Jhamb S, Vangaveti VN, Malabu UH. Genetic and molecular basis of diabetic foot ulcers: clinical review[J]. *J Tissue Viability*, 2016, 25(4): 229-236
- 王彤彤, 庄天微. MiRNA-146a 的单核苷酸多态性 rs2910164 与 2 型糖尿病相关性的系统分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2017, 24(7): 749-753
- Liu J, Xu Y, Shu B, *et al.* Quantification of the differential expression levels of microRNA-203 in different degrees of diabetic foot[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13416-13420
- 江琼, 吴佳易, 郭永喆, 等. 冠心病合并糖尿病患者循环血微小 RNA 指标及血管内皮功能指标的检测[J]. *福建医科大学学报*, 2017, 51(3): 170-174
- Ramirez HA, Liang L, Pastar I, *et al.* Comparative genomic, microRNA, and tissue analyses reveal subtle differences between non-diabetic and diabetic foot skin[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0137133
- Cheng C, Kobayashi M, Martinez JA, *et al.* Evidence for epigenetic regulation of gene expression and function in chronic experimental diabetic neuropathy[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2015, 74(8): 804-817
- 洪陈亮, 秦旭平. 糖尿病发病的表观遗传学机制[J]. *中南医学科学杂志*, 2017, 45(1): 12-17
- Yousefzadeh N, Alipour MR, Soufi FG. Deregulation of NF- κ B-miR-146a negative feedback loop may be involved in the pathogenesis of diabetic neuropathy[J]. *J Physiol Biochem*, 2015, 71(1): 51-58
- Gong Q, Lu Z, Huang Q, *et al.* Altered microRNAs expression profiling in mice with diabetic neuropathic pain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(2): 615-620
- Moura J, Børstheim E, Carvalho E. The role of microRNAs in diabetic complications - special emphasis on wound healing[J]. *Genes (Basel)*, 2014, 5(4): 926-956
- 刺梅, 李江, 孙继红, 等. 血清 miRNA-146、miRNA-195 检测在糖尿病视网膜病变中的临床应用[J]. *临床和实验医学杂志*, 2017, 16(5): 466-468
- Zhang X, Gong X, Han S, Zhang Y. MiR-29b protects dorsal root ganglia neurons from diabetic rat[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(2): 1105-1111
- 黄俊. 微小 RNA 在糖尿病视网膜病变新生血管生成中的研究进展[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(5): 478-480
- 邓仁生, 朱小琴, 刘长召, 等. 血浆循环 miRNA-126、miRNA-28-3p 的表达与糖尿病的关系研究[J]. *局解手术学杂志*, 2017, 26(6): 400-405
- 徐丹丹, 罗飞宏. 微 RNA 在糖尿病中的应用进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(6): 1187-1191
- Madhyastha R, Madhyastha H, Pengjam Y, *et al.* NF- κ B activation is essential for miR-21 induction by TGF β 1 in high glucose conditions[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 451(4): 615-621

(收稿日期: 2017-12-06)

(修回日期: 2017-12-25)

欢迎订阅

欢迎赐稿