

网络出版时间: 2024-07-03 09:59:40 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1450.020>

富含亮氨酸重复激酶 2 在神经病理性疼痛大鼠痛敏中的作用及机制研究

高雄^{1,2}, 肖胜昔³, 郝泉水², 李秀芳², 吴耀华^{1,2}

摘要 目的 研究富含亮氨酸重复激酶 2 (LRRK2) 对神经病理性疼痛 (NP) 大鼠痛觉敏感性的影响, 并探讨其可能的机制。方法 将 48 只 SD 大鼠随机分成 4 组: 假手术组 (Sham 组)、模型组 (Model 组)、LRRK2 抑制剂组 (MLi-2 组) 和 LRRK2 抑制剂 + p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 激动剂组 (MLi-2 + Anisomycin 组), 每组 12 只。采用坐骨神经慢性压迫损伤 (CCI) 诱导 NP 大鼠模型, 术后第 8 天开始鞘内注射 MLi-2 (1 mg/kg, 10 μ l) 或 Anisomycin (20 μ mol/L, 10 μ l), 每天 1 次, 连续 7 d。分别于术前 (第 0 天) 及术后第 7、14 天进行痛觉敏感性检测, 分析各组大鼠机械缩足反射阈值 (MWT) 和热缩足反射潜伏期 (PWTL) 变化; ELISA 检测大鼠脊髓背角中白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平; 尼氏染色观察大鼠脊髓组织神经元病理变化; 免疫荧光染色观察大鼠脊髓中小胶质细胞标志物离子化钙结合适配分子-1 (Iba-1) 表达水平; Western blot 检测大鼠脊髓背角中 LRRK2、p-p38 MAPK、p38 MAPK 和 Iba-1 蛋白表达水平。结果 与 Sham 组比较, Model 组大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 均明显降低 ($P < 0.01$), 脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量及 LRRK2、Iba-1 蛋白和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白比值水平均明显升高 ($P < 0.01$), 脊髓组织中 Iba-1 阳性细胞比例明显升高 ($P < 0.01$), 而尼氏小体明显减少 ($P < 0.01$)。与 Model 组比较, MLi-2 组大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 明显升高 ($P < 0.01$), 尼氏小体明显增多 ($P < 0.01$), 脊髓组织中 Iba-1 阳性细胞比例明显降低 ($P < 0.01$), 脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平及 LRRK2、Iba-1 蛋白和 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白比值水平明显降低 ($P < 0.01$)。然而, Anisomycin 干预可激活 p38 MAPK 信号通路, 并部分逆转 MLi-2 对 NP 大鼠痛敏、神经炎症的改善作用。结论 抑制 LRRK2 表达可减轻由小胶质细胞活化介导神经炎症引起的 NP 大鼠痛觉敏感性, 其作用机

制可能与调控 p38 MAPK 信号通路有关。

关键词 神经病理性疼痛; 富含亮氨酸重复激酶 2; 小胶质细胞; 神经炎症; p38 丝裂原活化蛋白激酶

中图分类号 R 741

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1231-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.019

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是指由神经系统原发性损伤或功能障碍引起的疼痛, 是许多体感神经系统疾病的常见症状, 严重影响患者的生活质量^[1]。然而, 针对 NP 的常规治疗方法缺乏长期疗效^[2]。因此, 亟需挖掘能对这种高度流行的疾病进行持续止痛的治疗方法。神经炎症在 NP 的发病机制中发挥重要作用, 而丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 信号网络参与调节神经炎症, 被认为是治疗 NP 的重要靶点^[3]。研究^[4-5]发现, 抑制 p38 MAPK 信号通路触发的神经炎症, 可降低 NP 大鼠的痛觉敏感性。因此, 阻断 p38 MAPK 信号转导成为缓解 NP 痛觉敏感性的潜在方向。富含亮氨酸重复激酶 2 (leucine rich repeat kinase 2, LRRK2) 是一种具有多个结构域的蛋白, 可调节多种信号通路, 也是多种细胞过程的关键因子^[6]。目前, 关于 LRRK2 的研究主要集中在阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统变性疾病^[7]。研究^[8-10]显示, 靶向 LRRK2 可减轻帕金森动物模型的神经炎症。Rui et al^[11]研究发现, 抑制 LRRK2 表达可改善创伤性脑损伤大鼠的神经功能障碍, 其作用机制可能与阻断 p38 MAPK 信号通路有关。然而, 关于 LRRK2 在 NP 中的作用及机制研究较少。该研究拟通过坐骨神经慢性压迫损伤 (chronic constriction injury, CCI) 诱导大鼠 NP, 探究 LRRK2 对 NP 大鼠痛觉敏感性的影响及可能机制, 旨在为 NP 治疗策略研究提供新方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物 48 只 SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 8 周龄, 220 ~ 240 g。大鼠采购于湖北省实验动物研究

2024-03-04 接收

基金项目: 湖北省卫生健康委科研资助项目 (编号: WJ2023M176); 湖南省人民医院医联体专项科研基金项目 (编号: 2022YLT006)

作者单位: ¹ 长江大学医学部, 荆州 434023² 黄冈市中心医院麻醉科, 黄冈 438000³ 罗田县人民医院麻醉科, 黄冈 438699

作者简介: 高雄, 男, 硕士研究生;

吴耀华, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 2022710998@yangtzeu.edu.cn

中心,生产许可证号:SCXK(鄂)2020-0018。所有大鼠饲养于 SPF 环境中,自由饮水饮食,温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度(46 ± 5)%,昼夜周期为 12 h。

1.2 主要试剂 LRRK2 抑制剂 MLi-2、p38 MAPK 激动剂 Anisomycin 购自美国 Med Chem Express 公司;肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin)-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;尼氏染色液购自北京索莱宝科技有限公司;离子化钙结合适配分子-1(ionized calcium-binding adapter molecule-1, Iba-1) 抗体、LRRK2 抗体和 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司;p38 MAPK 抗体和 p-p38 MAPK 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 模型构建与分组处理 SD 大鼠经过适应性喂养 1 周后,随机分为假手术组(Sham 组)、模型组(Model 组)、LRRK2 抑制剂组(MLi-2 组)和 LRRK2 抑制剂 + p38 MAPK 激动剂组(MLi-2 + Anisomycin 组),每组 12 只。按照以下操作建立 CCI 诱导的 NP 大鼠模型^[12]:采用 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,固定大鼠并在右侧后肢备皮消毒,于股骨下方做一个平行切口,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,在坐骨神经分叉的近心端轻度结扎 4 个环,环间距为 1 mm,逐层缝合皮肤。术后第 7 天大鼠患侧热缩足反射潜伏期(paw withdraw thermal latency, PWTL)的差值超过 4 s 视为造模成功^[13]。Sham 组仅暴露坐骨神经,不结扎。术后第 8 天,MLi-2 组大鼠采用鞘内注射 1 mg/kg MLi-2,10 μl /只,每日 1 次,注射 7 d;MLi-2 + Anisomycin 组大鼠于 MLi-2 注射 1 h 后,鞘内注射 20 $\mu\text{mol/L}$ Anisomycin,10 μl /只^[14],每日 1 次,注射 7 d。分别于术前(第 0 天)及术后第 7、14 天进行痛觉敏感性检测。术后第 14 天行为学检测结束后,戊巴比妥钠麻醉大鼠并颈椎脱臼处死,迅速分离 L4 ~ L6 段脊髓及脊髓背角,每组取 6 只大鼠脊髓组织置于 4% 多聚甲醛中固定,剩余每组 6 只大鼠的脊髓背角置于 -80°C 中冻存。

1.4 大鼠痛觉敏感性检测 采用 Von Frey 纤维丝刺激大鼠右侧后肢足底,当大鼠出现缩足或舔足动作时,记录对应的刺激强度。每 5 min 测量 1 次,每只大鼠测量 3 次,取平均值记为机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)。采用足底热刺激仪的红外光对准大鼠右侧后肢足底,当大鼠出现抬腿动作时,记录对应的时间,计算热刺激开始

至出现抬腿动作的时间间隔,每 5 min 测量 1 次,每只大鼠测量 3 次,取平均值记为 PWTL。

1.5 ELISA 检测大鼠脊髓背角中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平 取大鼠脊髓背角组织,剪碎后匀浆,离心取上清液,根据 ELISA 试剂盒说明书操作,检测各组大鼠脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

1.6 免疫荧光染色观察大鼠脊髓中小胶质细胞标志物 Iba-1 表达水平 取固定 24 h 后的大鼠脊髓组织,梯度乙醇进行脱水。石蜡包埋后制备成厚度为 4 μm 的切片。将石蜡切片脱蜡至水,经热修复后将切片置于含 10% 山羊血清的封闭液中孵育 30 min,加入一抗(Iba-1:1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。漂洗后,加入二抗室温避光孵育 1 h。漂洗后,加入 DAPI 室温避光孵育 10 min。最后加入抗荧光衰减封片剂进行封片。于荧光显微镜下观察,每张切片随机取 6 个不重叠视野,计数脊髓组织中 Iba-1 阳性细胞和总细胞,计算阳性细胞率 = 阳性细胞数/总细胞数 \times 100%。

1.7 尼氏染色观察大鼠脊髓组织神经元病理变化 将大鼠脊髓组织石蜡切片脱蜡至水,加入尼氏染色液染色 3 min,加入 0.1% 冰醋酸分化。二甲苯透明 10 min,中性树脂封片,置于显微镜下观察脊髓组织染色情况。

1.8 Western blot 检测大鼠脊髓背角中 LRRK2、p-p38 MAPK、p38 MAPK 和 Iba-1 蛋白表达水平

取大鼠脊髓背角组织,加入 RIPA 裂解液提取组织总蛋白。蛋白定量后,取 20 μg 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳。将凝胶与 PVDF 膜放置于转移槽中进行转膜,再将 PVDF 膜放于 5% 脱脂奶粉中室温封闭 2 h。洗膜,加入一抗(LRRK2、p38 MAPK、p-p38 MAPK 和 Iba-1 稀释比 1:1 000; GAPDH 稀释比 1:5 000)室温孵育 2 h。洗膜,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h。洗膜,加入化学发光试剂反应 2 min,于暗室中曝光显影,凝胶成像系统进行图像分析,根据蛋白条带灰度值计算目的蛋白相对表达水平。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间均数两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRRK2 抑制剂干预对 CCI 大鼠痛觉敏感性

的影响 术前(第0天)检测大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 在各组之间的差异无统计学意义 ($F_{MWT} = 0.828, P > 0.05; F_{PWTL} = 1.489, P > 0.05$)。术后第 7、14 天,与 Sham 组比较,Model 组大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 均明显降低 ($P < 0.01$)。术后第 14 天与 Model 组比较,MLi-2 组大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 均明显升高 ($P < 0.01$);与 MLi-2 组比较,MLi-2 + Anisomycin 组大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 均明显降低 ($P < 0.01$)。见图 1。

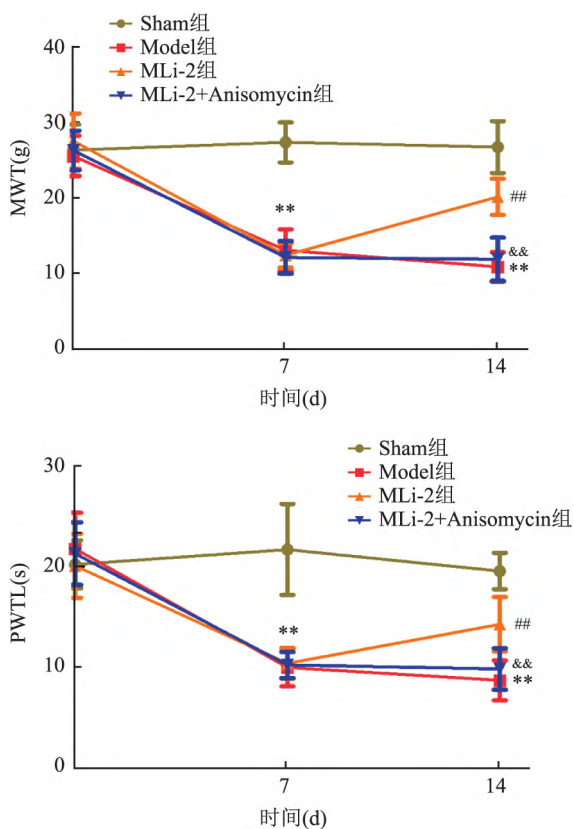


图1 各组大鼠右侧后肢 MWT 和 PWTL 水平比较

与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 MLi-2 组比较: && $P < 0.01$

2.2 LRRK2 抑制剂干预对 CCI 大鼠脊髓背角炎症水平的影响 大鼠脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平在 4 组之间的差异有统计学意义 ($F_{IL-1\beta} = 184.016, P < 0.01; F_{IL-6} = 231.883, P < 0.01; F_{TNF-\alpha} = 246.846, P < 0.01$)。与 Sham 组比较,Model 组大鼠脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均明显升高 ($P < 0.01$);与 Model 组比较,MLi-2 组大鼠脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均明显降低 ($P < 0.01$);与 MLi-2 组比较,MLi-2 + Anisomycin 组大鼠脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF-

α 水平均明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表1 各组大鼠脊髓背角组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Sham	10.76 \pm 2.59	6.16 \pm 1.05	35.67 \pm 3.63
Model	62.60 \pm 4.73 **	49.45 \pm 3.63 **	137.16 \pm 7.65 **
MLi-2	34.72 \pm 2.44 ##	26.21 \pm 2.56 ##	78.28 \pm 5.37 ##
MLi-2 + Anisomycin	54.91 \pm 5.93 &&	40.97 \pm 4.05 &&	116.79 \pm 9.72 &&

与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 MLi-2 组比较: && $P < 0.01$

2.3 LRRK2 抑制剂对 CCI 大鼠脊髓神经元损伤的影响 Sham 组大鼠脊髓神经元结构清晰,尼氏小体丰富,Model 组大鼠脊髓组织结构遭到破坏,神经纤维排列疏松,尼氏小体减少。与 Model 组比较,MLi-2 组大鼠脊髓组织结构较为紧密,尼氏小体增多。与 MLi-2 组比较,MLi-2 + Anisomycin 组大鼠脊髓组织细胞肿胀增多,细胞间隙增大,尼氏小体减少。见图 2。

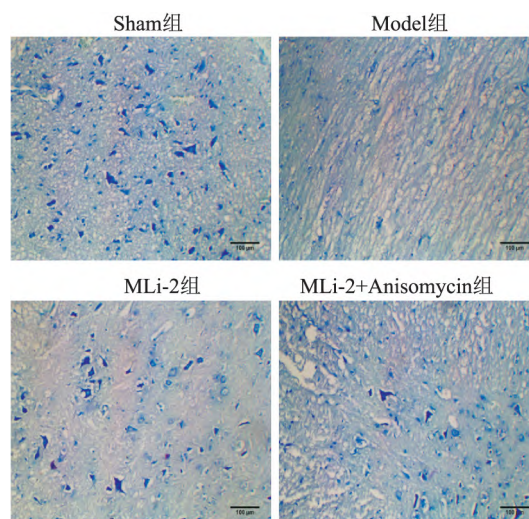


图2 尼氏染色观察大鼠脊髓神经元损伤 $\times 200$
深蓝色颗粒为尼氏小体,细胞核呈浅蓝色

2.4 LRRK2 抑制剂对 CCI 大鼠脊髓组织小胶质细胞活化的影响 4 组大鼠脊髓组织中小胶质细胞标志物 Iba-1 阳性细胞率差异有统计学意义 ($F = 29.589, P < 0.01$)。与 Sham 组比较,Model 组大鼠脊髓组织中小胶质细胞标志物 Iba-1 阳性细胞率明显升高 [(39.42 \pm 9.26) % vs (9.74 \pm 3.34) % , $P < 0.01$];与 Model 组比较,MLi-2 组大鼠脊髓组织中小胶质细胞标志物 Iba-1 阳性细胞率明显降低 [(18.38 \pm 2.02) % vs (39.42 \pm 9.26) % , $P < 0.01$];与 MLi-2 组比较,

MLi-2 + Anisomycin 组大鼠脊髓组织中 Iba-1 阳性细胞率明显升高 [(30.19 ± 6.09) % vs (18.38 ± 2.02) % $P < 0.01$]。见图 3。

2.5 LRRK2 抑制剂对 CCI 大鼠脊髓背角组织 p38 MAPK 信号通路激活的影响 与 Sham 组比较, Model 组大鼠脊髓背角组织中 LRRK2 和 Iba-1 蛋白表达水平及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白比值均明显升高 ($P < 0.01$) ; 与 Model 组比较, MLi-2 组大鼠脊髓背角组织中 LRRK2 和 Iba-1 蛋白表达水平及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白比值均明显降低

($P < 0.01$) ; 与 MLi-2 组比较, MLi-2 + Anisomycin 组大鼠脊髓背角组织中 Iba-1 蛋白表达水平及 p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白比值均明显升高 ($P < 0.01$) , 而 LRRK2 蛋白表达水平差异无统计学意义。见图 4。

3 讨论

NP 是一种复杂的慢性疼痛状态, 其主要症状为痛觉过敏、痛觉异常和自发性疼痛^[15]。CCI 是由坐骨神经周围 4 条松弛的结扎线引起的 NP 模型^[16]。

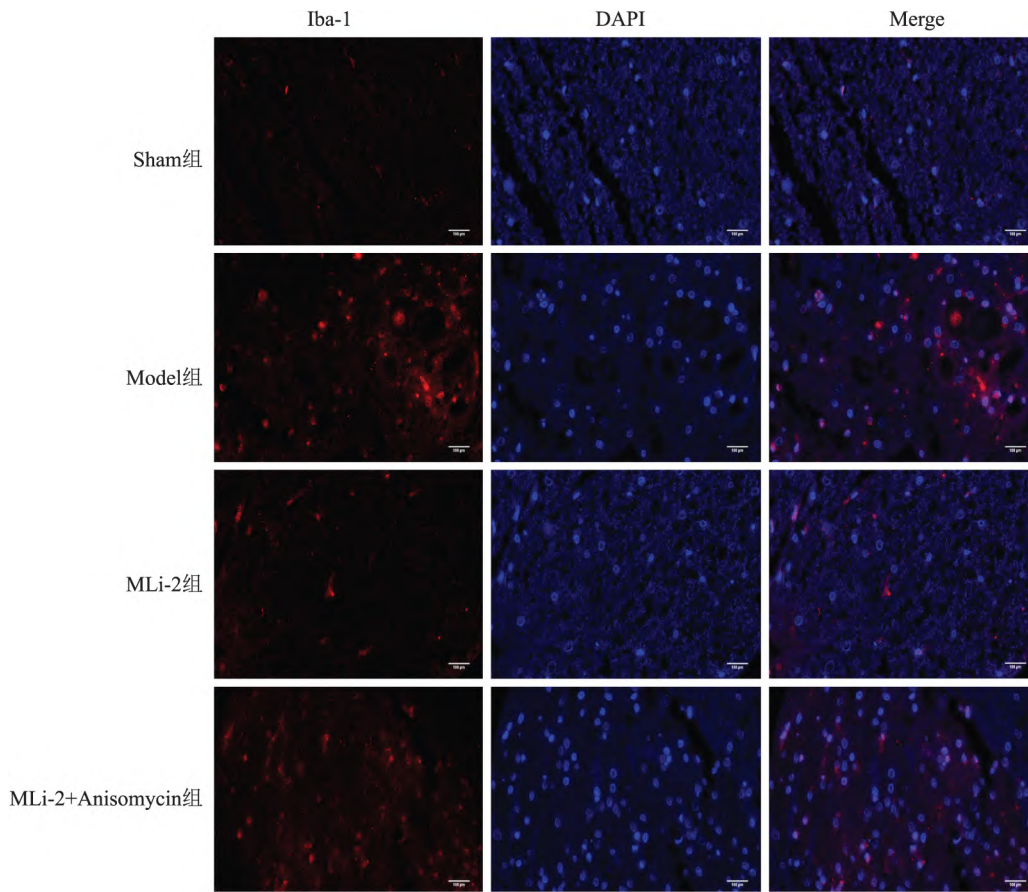


图 3 免疫荧光染色观察大鼠脊髓组织中 Iba-1 阳性表达情况 × 200

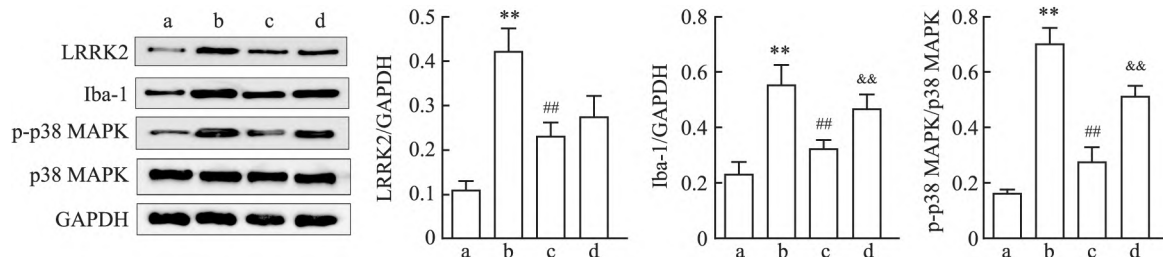


图 4 Western blot 检测大鼠脊髓背角组织中 LRRK2、Iba-1、p-p38 MAPK 和 p38 MAPK 蛋白表达水平

a: Sham 组; b: Model 组; c: MLi-2 组; d: MLi-2 + Anisomycin 组; 与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$; 与 MLi-2 组比较: && $P < 0.01$

本研究结果显示,CCI 诱导使大鼠的患侧后肢 MWT 和 PWTL 降低,说明大鼠出现 NP 痛觉敏化症状。受损组织中炎性介质的释放和受损神经的异常放电导致脊髓背角神经元过度兴奋,而神经元这种状态引起的外周和中枢神经系统敏化参与了 NP 的神经化学机制^[17]。小胶质细胞是中枢神经系统的常驻免疫细胞,小胶质细胞激活通过产生多种促炎细胞因子(如:IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)与神经元相互作用以增强神经元的过度兴奋性,从而在神经性疼痛的发生和发展中发挥重要作用^[18]。在本研究结果中,CCI 诱导的 NP 大鼠脊髓背角组织中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平升高,脊髓组织中尼氏小体减少,神经元损伤严重,且 Iba-1 标记的小胶质细胞增多,提示 CCI 诱导 NP 大鼠出现严重的神经炎症与神经元损伤,可能与脊髓小胶质细胞活化有关。小胶质细胞是神经炎症的重要介质,是神经性疼痛的基础,大量研究结果显示,抑制小胶质细胞激活介导的神经炎症,可减轻神经损伤后的 NP^[19-21]。本研究结果显示,LRRK2 在 CCI 诱导的 NP 大鼠脊髓背角组织中表达水平升高,采用 LRRK2 抑制剂 MLi-2 干预后,NP 大鼠患侧后肢 MWT 和 PWTL 升高,脊髓组织中促炎细胞因子水平降低,尼氏小体增多,而 Iba-1 标记的小胶质细胞减少,提示抑制 LRRK2 可减少脊髓小胶质细胞激活介导的神经炎症,从而减轻 NP 大鼠的痛觉敏化症状。

小胶质细胞内信号级联反应,包括 MAPK、核转录因子、Janus 激酶/信号转导与转录激活因子等信号通路,对神经性疼痛的发展和维持至关重要,因此靶向小胶质细胞这些信号通路,对 NP 的疼痛缓解具有重大意义^[22]。研究^[23]显示,激活 MAPK 信号转导触发小胶质细胞介导的炎症反应参与了 NP 的发病机制。研究^[24]表明,CCI 大鼠脊髓背角组织中 MAPK 信号通路被激活,抑制 MAPK 通路可减轻 CCI 大鼠的神经疼痛。研究^[25]提示,抑制 NP 大鼠脊髓背角组织中 p38 MAPK 通路的激活可抑制脊髓小胶质细胞活化,从而发挥镇痛作用。Dai et al^[26]研究也表明通过抑制 p38 MAPK 信号转导来抑制小胶质细胞的激活,最终可减轻 CCI 诱导的神经病变,缓解大鼠神经性疼痛。LRRK2 是家族性和特发性帕金森症的遗传病因,与神经元死亡、线粒体功能障碍和神经炎症有关,抑制 LRRK2 可减少神经元凋亡,并降低 p38 MAPK 磷酸化水平^[11-27]。与上述研究结果一致,本研究发现 LRRK2 抑制剂 MLi-2 干预可降低 NP 大鼠脊髓背角组织中 p-p38 MAPK/p38

MAPK 蛋白比值,即 MLi-2 干预可抑制 p38MAPK 信号通路激活,而 p38 MAPK 激动剂逆转了 MLi-2 对 NP 大鼠脊髓小胶质细胞活化及神经炎症的抑制作用,恢复了 NP 大鼠的神经疼痛敏感性。

综上所述,LRRK2 在 CCI 诱导大鼠的脊髓组织中呈高表达水平,抑制 LRRK2 的表达可减轻小胶质细胞活化介导神经炎症引起的 NP,其作用机制可能与抑制 p38 MAPK 信号通路激活有关。因此,本研究结果提示 LRRK2 可能是治疗 NP 的潜在靶点。由于小胶质细胞内信号级联反应及信号转导复杂,后续将从其他信号转导途径着手进一步研究 LRRK2 对 NP 小胶质细胞活化的作用机制,为 NP 治疗研究提供更多的理论依据。

参考文献

- [1] Luo D Z, Li X H, Tang S M, et al. Epigenetic modifications in neuropathic pain [J]. *Mol Pain* 2021, 17: 17448069211056767.
- [2] Varshney V, Osborn J, Chaturvedi R, et al. Advances in the interventional management of neuropathic pain [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(2): 187.
- [3] Ramesh G. Novel therapeutic targets in neuroinflammation and neuropathic pain [J]. *Inflamm Cell Signal* 2014, 1(3): e111.
- [4] Yu C, Li P, Wang Y X, et al. Sanguinarine attenuates neuropathic pain by inhibiting p38 MAPK activated neuroinflammation in rat model [J]. *Drug Des Devel Ther* 2020, 14: 4725-33.
- [5] Oh S H, Kim S W, Kim D J, et al. Sec-O-glucosylhamaudol mitigates inflammatory processes and autophagy via p38/JNK MAPK signaling in a rat neuropathic pain model [J]. *Korean J Pain*, 2021, 34(4): 405-16.
- [6] Zhu C, Herbst S, Lewis P A. Leucine-rich repeat kinase 2 at a glance [J]. *J Cell S* 2023, 136(17): jcs259724.
- [7] Wit T D, Baekelandt V, Lobbstaël E. Inhibition of LRRK2 or casein kinase 1 results in LRRK2 protein destabilization [J]. *Mol Neurobiol* 2019, 56(8): 5273-86.
- [8] Oliveira S R, Dionísio P A, Gaspar M M, et al. miR-335 targets LRRK2 and mitigates inflammation in parkinson's disease [J]. *Front Cell Dev Biol* 2021, 9: 661461.
- [9] Mutti V, Carini G, Filippini A, et al. LRRK2 kinase inhibition attenuates neuroinflammation and cytotoxicity in animal models of alzheimer's and parkinson's disease-related neuroinflammation [J]. *Cells* 2023, 12(13): 1799.
- [10] Ho D H, Nam D, Seo M, et al. LRRK2 inhibition mitigates the neuroinflammation caused by TLR2-specific α -Synuclein and alleviates neuroinflammation-derived dopaminergic neuronal loss [J]. *Cells*, 2022, 11(5): 861.
- [11] Rui Q, Ni H B, Gao F, et al. LRRK2 contributes to secondary brain injury through a p38/Drosha signaling pathway after traumatic brain injury in rats [J]. *Front Cell Neurosci* 2018, 12: 51.
- [12] 苟小红, 贺学农, 蒋世双, 等. 糖皮质激素受体激动剂对神经病

- 理性疼痛大鼠痛敏反应的干预作用及其机制[J]. 中国应用生理学杂志 2022 38(5): 470-479.
- [13] 高永辉, 王俊英, 韩焱晶, 等. 脊髓 Toll 样受体 4 和热休克蛋白 90 参与电针缓解大鼠慢性神经病理性疼痛机制研究[J]. 针刺研究 2021 46(9): 735-41.
- [14] Jin Y, Zhou J, Xu F, et al. Electroacupuncture alleviates the transition from acute to chronic pain through the p38 MAPK/TNF- α signalling pathway in the spinal dorsal horn [J]. *Acupunct Med*, 2021 39(6): 708-15.
- [15] Piao Y B, Gwon D H, Kang D W, et al. TLR4-mediated autophagic impairment contributes to neuropathic pain in chronic constriction injury mice [J]. *Mol Brain* 2018 11: 11.
- [16] Medeiros P, Dos Santos I R, Júnior I M, et al. An adapted chronic constriction injury of the sciatic nerve produces sensory, affective, and cognitive impairments: A peripheral mononeuropathy model for the study of comorbid neuropsychiatric disorders associated with neuropathic pain in rats [J]. *Pain Med* 2021 22(2): 338-51.
- [17] Medeiros P, Dos Santos I R, Medeiros A C, et al. Indomethacin attenuates mechanical allodynia during the organization but not the maintenance of the peripheral neuropathic pain induced by nervus ischiadicus chronic constriction injury [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020 53(5): e9255.
- [18] Tan L X, Hu Y X, Zhang X Y, et al. Corydecumine G inhibits microglia activation via MAPK pathway in a rat model of neuropathic pain [J]. *J Chem Neuroanat* 2022 124: 102124.
- [19] Li X Y, Wu G Z, Li M Y, et al. Oleonic acid administration alleviates neuropathic pain after a peripheral nerve injury by regulating microglia polarization-mediated neuroinflammation [J]. *RSC Adv*, 2020 10(22): 12920-8.
- [20] Borgonetti V, Meacci E, Pierucci F, et al. Dual HDAC/BRD4 inhibitors relieves neuropathic pain by attenuating inflammatory response in microglia after spared nerve injury [J]. *Neurotherapeutics* 2022 19(5): 1634-48.
- [21] Li J, Wei Y Y, Zhou J L, et al. Activation of locus coeruleus-spinal cord noradrenergic neurons alleviates neuropathic pain in mice via reducing neuroinflammation from astrocytes and microglia in spinal dorsal horn [J]. *J Neuroinflammation* 2022 19: 123.
- [22] Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the microglial signaling pathways: New insights in the modulation of neuropathic pain [J]. *Curr Med Chem* 2016 23(26): 2908-28.
- [23] Wang L J, Yin C, Liu T Y, et al. Pellino1 regulates neuropathic pain as well as microglial activation through the regulation of MAPK/NF- κ B signaling in the spinal cord [J]. *J Neuroinflammation* 2020 17: 83.
- [24] Ye G Y, Lin C Y, Zhang Y, et al. Quercetin alleviates neuropathic pain in the rat CCI model by mediating AMPK/MAPK pathway [J]. *J Pain Res* 2021 14: 1289-301.
- [25] 连一闻, 卜慧莲, 许继田, 等. 利塞膦酸钠对神经病理性疼痛大鼠脊髓胶质细胞活化的影响及镇痛作用 [J]. *实用疼痛学杂志* 2018 14(3): 173-9.
- [26] Dai W L, Bao Y N, Fan J F, et al. Levo-corydalmine attenuates microglia activation and neuropathic pain by suppressing ASK1-p38 MAPK/NF- κ B signaling pathways in rat spinal cord [J]. *Reg Anesth Pain Med* 2020 45(3): 219-29.
- [27] Cao J, Zhuang Y, Zhang J Y, et al. Leucine-rich repeat kinase 2 aggravates secondary brain injury induced by intracerebral hemorrhage in rats by regulating the P38 MAPK/Drosha pathway [J]. *Neurobiol Dis* 2018 119: 53-64.

The role and mechanism of leucine rich repeat kinase 2 in pain sensitivity in neuropathic pain rats

Gao Xiong^{1,2}, Xiao Shengxi³, Hao Quanshui², Li Xiufang², Wu Yaohua^{1,2}

(¹Health Science Center, Yangtze University, Jingzhou 434023; ²Dept of Anesthesiology, Huanggang Central Hospital, Huanggang 438000; ³Dept of Anesthesiology, People's Hospital of Luotian County, Huanggang 438699)

Abstract Objective To study the effect of leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) on pain sensitivity in neuropathic pain (NP) rats and explore its possible mechanism. **Methods** 48 SD rats were randomly divided into four groups: sham surgery (Sham) model, LRRK2 inhibitor (MLi-2) and LRRK2 inhibitor + p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) agonist (MLi-2 + Anisomycin), with 12 rats in each group. The NP rat model was induced by chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve. Intrathecal injection of MLi-2 (1 mg/kg, 10 μ l) or Anisomycin (20 μ mol/L, 10 μ l) was started from the 8th day after surgery, once a day for 7 consecutive days. Pain sensitivity tests were conducted before surgery (day 0) and on postoperative days 7 and 14, respectively. The changes in mechanical withdrawal threshold (MWT) and paw withdraw thermal latency (PWTL) were analyzed in each group of rats. ELISA was used to detect the levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the dorsal horn of the rat spinal cord. Nissl staining was used to observe the pathological changes of neurons in rat spinal cord tissue. Immunofluorescence staining was used to observe the expression levels of ionized calcium-binding adapter molecule-1 (Iba-1), a marker of microglia in the spinal cord of rats. Western blot was used to detect the

网络出版时间: 2024-07-03 09:49:11 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240702.1450.019>

SOX7 通过靶向调控 SHP-2/Wnt/ β -catenin/ROS 通路抑制结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移

武雪亮^{1,2}, 王立坤³, 马洪庆⁴, 李少东¹, 梁艳¹, 惠志龙¹, 韩磊¹, 薛军¹

摘要 目的 研究 SOX7 调控 SHP-2/Wnt/ β -catenin/ROS 通路从而影响结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的分子机制。方法 将 20 只裸鼠皮下移植瘤模型随机分为 SOX7 NC 组 ($n=5$)、SOX7 mimic 组 ($n=5$)、SOX7 NC + PHPS1 组 ($n=5$) 和 SOX7 mimic + PHPS1 组 ($n=5$), 观察肿瘤生长情况。通过脂质体法将人结直肠癌细胞系 SW480 细胞转染后, 将细胞分为 6 组, 分别为 SOX7 NC 组、SOX7 mimic 组、SOX7 NC + H₂O₂ 组、SOX7 mimic + H₂O₂ 组、SOX7 NC + PHPS1 组、SOX7 mimic + PHPS1 组。通过 Western blot 实验检测各组 SW480 细胞 SHP-2/Wnt/ β -catenin/ROS 通路相关蛋白的表达。通过细胞划痕实验和 Transwell 侵袭迁移实验检测 SW480 细胞的侵袭迁移能力, 通过 CCK-8 检测 SW480 细胞的增殖。结果 小鼠体内实验显示: SOX7 mimic 组肿瘤体

积明显小于 SOX7 NC 组 ($P < 0.01$), 经过 PHPS1 干预的肿瘤体积明显增大, SOX7 mimic + PHPS1 组肿瘤体积和 SOX7 NC + PHPS1 组的差异无统计学意义。体外实验发现: SOX7 mimic 抑制了 SW480 细胞 Wnt、 β -catenin、NOX2、NOX4、PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT 蛋白表达 ($P < 0.01$), 促进了 p-SHP-2 蛋白表达 ($P < 0.01$); 加入 H₂O₂ 和 SHP-2 抑制剂后 SOX7 mimic 组和 SOX7 NC 组的 Wnt、 β -catenin、NOX2、NOX4、PI3K、P-PI3K、AKT、P-AKT 的蛋白表达水平升高, 但差异无统计学意义, SHP-2、p-SHP-2 蛋白的表达水平降低, 但差异无统计学意义; 细胞划痕、Transwell 侵袭迁移实验和 CCK-8 实验结果表明 SOX7 通过氧化应激和 SHP-2 通路抑制了 SW480 细胞的迁移、侵袭和增殖 ($P < 0.01$)。结论 SOX7 可通过靶向 SHP-2/Wnt/ β -catenin/ROS 通路抑制结直肠癌增殖、侵袭和迁移。

关键词 结直肠癌; SOX7; ROS; SHP-2; Wnt/ β -catenin; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 737.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)07-1237-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.07.020

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种常见的消化道恶性肿瘤, 在 2020 年在全球范围内引发了

2024-02-20 接收

基金项目: 河北省自然科学基金精准医学联合基金项目 (编号: H2022405033); 河北省卫计委医学科学重点课题计划项目 (编号: 20231402)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院¹ 普通外科、² 肿瘤研究所、³ 超声医学科 张家口 075000⁴ 河北医科大学第四医院外二科 石家庄 050000

作者简介: 武雪亮, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wxlwk@163.com

protein expression levels of LRRK2, p-p38 mitogen activated protein kinase (MAPK), p38 MAPK and Iba-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. **Results** Compared with the sham group, the model group showed a significant decrease in MWT and PWTL in the right hind limb of rats ($P < 0.01$). The levels of IL-1, IL-6, and TNF in the spinal dorsal horn tissue, as well as the expression levels of LRRK2, Iba-1 proteins and p-p38 MAPK/p38 MAPK protein ratio significantly increased ($P < 0.01$). The proportion of Iba-1 positive cells in the spinal cord tissue significantly increased ($P < 0.01$), while Nissl bodies were significantly reduced ($P < 0.01$). Compared with the model group, the MLI-2 group showed a significant increase in MWT and PWTL in the right hind limb of rats ($P < 0.01$), a significant increase in Nissl bodies ($P < 0.01$), a significant decrease in the proportion of Iba-1 positive cells in the spinal cord tissue ($P < 0.01$), and a significant decrease in the levels of IL-1, IL-6, and TNF and the expression levels of LRRK2, Iba-1 proteins and p-p38 MAPK/p38 MAPK protein ratio ($P < 0.01$). However, Anisomychin intervention could activate the p38 MAPK signaling pathway and partially reverse the beneficial effects of MLI-2 on pain sensitivity and neuroinflammation in rats with neuropathic pain. **Conclusion** Inhibiting the expression of LRRK2 can alleviate pain sensitivity in NP rats induced by microglia activation mediated neuroinflammation, and its mechanism of action may be related to regulating the p38 MAPK signaling pathway.

Key words neuropathic pain; leucine rich repeat kinase 2; microglia; neuroinflammation; p38 mitogen activated protein kinase