

miR - 30b 在三叉神经痛模型大鼠中的表达及作用

胡婷婷^{1, 2, 3}, 何帆^{1, 2, 3}, 刘明政^{1, 2, 3}, 徐文华^{1, 2, 3}, 王元银^{1, 2, 3}

摘要 目的 探讨 miR-30b 在三叉神经痛 (TN) 模型大鼠三叉神经节 (TG) 中发挥的作用。方法 采用眶下神经缩窄术 (ION-CCI) 构建大鼠 TN 模型。用 Von Frey 毛刷检测大鼠的机械痛阈。通过 qRT-PCR 及 Western blot 检测术侧 TG 内 miR-30b 和激活转录因子 3 (ATF3) 表达变化。经眶下孔分别向 ION-CCI 大鼠的 TG 内定位注射 miR-30b 的类似物 (agomir) 和 agomir 的阴性对照 (agomir NC) 检测大鼠的机械痛阈及干预后 ATF3 表达的变化。结果 ION-CCI 组大鼠在术后第 2 ~ 28 天出现机械痛阈的降低 ($P < 0.05$)。ION-CCI 组较假手术组 (Sham 组) 术后 TG 中 miR-30b 表达降低, ATF3 表达升高 ($P < 0.05$)。ION-CCI 组过表达 miR-30b 后, 大鼠机械痛阈升高, TG 中 ATF3 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 miR-30b 参与调控 TN 的发生、发展, miR-30b 可能是 TN 潜在的治疗靶点。

关键词 三叉神经痛; 眶下神经缩窄术; miR-30b; ATF3

中图分类号 R 745. 11

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2022) 07 - 1078 - 06

doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 - 1492. 2022. 07. 012

三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TN) 是颌面外科临床常见的一种神经病理性疼痛, 严重影响患者的生活质量及心理健康^[1-2]。卡马西平等药物治疗易出现疲劳、头昏等副作用^[1, 3]。注射治疗、射频温控热凝和手术等方法也仍不能达到理想的治疗效果^[1, 3]。因此进一步探索 TN 发生的机制, 寻找更精确有效的治疗方法, 已成为近年来的研究热点^[2, 4]。

miR-30b 是 miR30 家族的成员, 参与了多种疾病的发病机制, 与神经性疼痛、神经退行性疾病等有关^[5-6]。目前关于 TN 模型大鼠三叉神经节 (trigem-

inal ganglion, TG) 中 miR-30b 的研究较少。激活转录因子 3 (activating transcription factor 3, ATF3) 与周围神经损伤特异性相关, 被用作神经损伤的特定标记物^[7-8]。故本研究建立大鼠 TN 模型, 通过机械痛阈测定及 ATF3 辅助验证模型, 探索 miR-30b 是否参与调控 TN 的发生。

1 材料与方法

1.1 实验主要试剂、仪器 Von Frey 毛刷 (美国 North Coast 公司); Tissue RNA Purification Kit Plus (上海奕杉生物科技有限公司组织); PrimeScript™ RT Reagent Kit (Perfect real Time) (日本 TaKaRa 生物科技有限公司); TB Green® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (日本 TaKaRa 生物科技有限公司); Hairpin-it™ microRNA and U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation Kit (上海吉玛制药技术有限公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Scientific 公司); KZ-III-F 高速低温组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); ATF3 Antibody (江苏亲科生物研究中心有限公司, DF6660); miR-30b agomir, miR-30b agomir NC (上海吉玛制药技术有限公司)。

1.2 实验动物及 TN 模型的构建

1.2.1 实验动物 选用体质量 (180 ~ 200) g 的成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 常规饲料饲养, 自由饮水, 饲养温度控制在 22 °C ~ 25 °C, 12 h 交替照明。动物实验通过安徽医科大学实验动物伦理委员会批准 (批号: LLSC20190705)。实验动物均由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2.2 TN 模型的构建 选用眶下神经缩窄术 (infraorbital nerve-chronic constriction injury, ION-CCI) 构建 TN 动物模型。首先对大鼠进行 1 周的手术前适应性训练, 剔除对 Von Frey 毛刷过于敏感或迟钝的大鼠, 并筛选出经适应性训练后毛发和触须完整的大鼠用于 TN 模型的构建。大鼠称重后腹腔注射 10% 水合氯醛, 待大鼠全身麻醉后, 在左侧眶下颧弓和鼻骨结合处作一切口, 长约 5 mm, 切口与鼻翼平

2022 - 05 - 23 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085MH297); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划 (编号: 2020xkjT024)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

² 安徽医科大学附属口腔医院, 合肥 230032

³ 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 胡婷婷, 女, 硕士研究生;

徐文华, 男, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: xuwenhua@ahmu.edu.cn;

王元银, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wyy1970548@sohu.com

行玻璃分针分离眶下神经。ION-CCI 组大鼠用两根 5-0 丝线结扎眶下神经,结扎线间距约 2 mm。结扎力度适中,使眶下神经受到轻微压迫但未阻断其血液循环为宜。结扎完成后用 3-0 丝线缝合皮肤创口,涂抹红霉素软膏以预防创口感染^[3,9]。

1.3 实验分组

1.3.1 miR-30b 在 TN 大鼠三叉神经节中的表达 将 SD 大鼠随机分成 2 组,即 ION-CCI 组及假手术组(Sham 组),6 只/组。ION-CCI 组于大鼠左侧行眶下神经缩窄术,Sham 组除不结扎眶下神经外,其余手术步骤均与 ION-CCI 组相同。采用 Von Frey 毛刷分别测试大鼠术前 1 d 和术后 10 个时间点(术后 2、4、6、8、10、12、14、16、21、28 d)时术侧触须垫区域的机械痛阈,记录阈值并对大鼠不同时间点的机械痛阈进行统计分析。通过实时定量免疫荧光反应(qRT-PCR)及免疫印迹(Western blot)检测术侧三叉神经节(TG)内 ATF3 和 miR-30b 表达变化。

1.3.2 miR-30b 表达变化对 TN 大鼠的影响 将 SD 大鼠随机分成 3 组,即 ION-CCI 组、ION-CCI + miR-30b agomir 组及 ION-CCI + scramble 组,7 只/组。ION-CCI 造模术后第 12 天 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,经眶下孔分别将 miR-30b agomir、agomir NC(20 μ mol,10 μ l)1 次/d,连续 4 d 定位注射到 ION-CCI + miR-30b agomir 组及 ION-CCI + scramble 组大鼠 TG 内^[10]。每次给药前及最后一次注射给药后 1 d,使用 Von Frey 毛刷进行机械痛阈测定。最后一次注射给药后 1 d 处死大鼠,采集术侧 TG,通过 qRT-PCR 以及 Western blot 方法对各组大鼠 TG 中 ATF3 和 miR-30b 表达量进行检测及对比。实验所用微小 RNA(microRNA,miRNA)序列见表 1。

表 1 miRNA 序列(5'-3')

名称	序列(5'-3')
rno-miR-30b agomir	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU CUGAGUGUAGGAUGUUACAUAU
agomir NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT ACGUGACACGUUCGGAGAATT

1.4 机械痛阈测定 测试于每日 16:00~17:00 间进行,测试前将大鼠置于安静环境中适应 1 h,用 Von Frey 毛刷从最小刺激强度开始依次递增刺激大鼠术侧触须垫区域,每根毛刷重复刺激 5 次,每次间隔时间不少于 30 s,直到某一毛刷激发大鼠重复出现以下任一阳性反应 3 次:① 快速缩头、躲避毛刷的行为;② 快速抓咬毛刷的攻击行为;③ 连续搔抓

术侧受刺激部位皮肤的行为。此时记录该毛刷所代表的刺激强度即为机械痛阈,并对大鼠不同时间点的机械痛阈进行统计分析。

1.5 qRT-PCR 采集大鼠术侧 TG,采用 Tissue RNA Purification Kit Plus(上海奕杉生物科技有限公司)提取 mRNA 及 miRNA;PrimeScript™ RT Reagent Kit(日本 TaKaRa 生物科技有限公司)、TB Green® Premix Ex Taq™ II(日本 TaKaRa 生物科技有限公司)、Hairpin-it™ microRNA and U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation Kit(上海吉玛制药技术有限公司)进行 cDNA 的合成和 PCR 的扩增;荧光定量 PCR 仪检测 TG 中 ATF3 及 miR-30b 的表达情况。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算其相对表达水平。实验所用荧光定量 PCR 基因引物序列见表 2。

表 2 荧光定量 PCR 基因引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')
β -actin	F: GGAGATTACTGCCCCGCTCCTA R: GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG
ATF3	F: TGGGTCACTGGTGTGTTGAGGATTTTG R: TGCTTGTCTGGATGGCGAATCTC
U6	F: CAGCACATATACTAAAATTGGAACG R: ACGAATTTGCGTGTCTATCC
miR-30b	F: CACCAGCCATGTAAACATCTCTAC R: TATGCTTGTCTCGTCTCTGTGTC

1.6 Western blot 采集大鼠术侧 TG 组织,称重后每 1 mg 组织加入含 1% PMSF 的 10 μ l RIPA 裂解液,置于 KZ-III-F 高速低温组织研磨仪中研磨。4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 10 min,吸取上清液。加入相应体积的 5X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热 10 min 使蛋白充分变性,-20 $^{\circ}$ C 下保存待用。使用 10% SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒制备凝胶,上样电泳后转膜至 PVDF 膜上,TBST 洗涤液反复洗涤 3 次,每次 10 min,置于 5% 脱脂奶粉中,室温下摇床封闭 2 h。置于一抗稀释液中(ATF3 Antibody 1:1 000,江苏亲科生物研究中心有限公司,DF6660;GAPDH Zsbio,TA-08),4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。PVDF 膜充分漂洗后置于已稀释好的二抗中室温孵育 1.2 h。PVDF 膜充分漂洗,置于显影机内设置条件曝光成像,使用 Image J 软件对曝光后的蛋白条带图灰度值进行统计分析,检测 ATF3 蛋白的相对表达水平。

1.7 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行分析,ION-CCI 组及 Sham 组两组间 qRT-PCR 实验及 Western blot 实验数据比较采用独立样本 *t* 检

验。机械痛阈测定结果采用双因素方差分析。ION-CCI 组、ION-CCI + scramble 组及 ION-CCI + miR-30b agomir 组 qRT-PCR 实验和 Western blot 实验数据采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 TN 模型构建成功 机械痛阈测定结果显示 ION-CCI 组大鼠术后第 2 ~ 28 天机械痛阈低于 Sham 组。术后第 2 天 ION-CCI 组大鼠机械痛阈即开始降低 [Sham 组: (1.33 ± 0.16) g, ION-CCI 组: (0.70 ± 0.24) g], 在术后第 12 天时疼痛阈值达到最低 [Sham 组: (1.53 ± 0.39) g, ION-CCI 组: (0.11 ± 0.06) g], 且直至术后 28 天 ION-CCI 组大鼠机械痛阈仍低于 Sham 组 [Sham 组: (1.53 ± 0.39) g, ION-CCI 组: (0.32 ± 0.12) g] $F = 3.965$, $P < 0.05$, 见图 1。qRT-PCR 结果显示术后第 12 天 ION-CCI 组大鼠 TG 中 ATF3 mRNA 表达较 Sham 组升高 $t = 5.780$, $P < 0.05$, 见图 2A。Western blot 结果显示术后第 12 天 ION-CCI 组大鼠 TG 中 ATF3 蛋白表达较 Sham 组升高 $t = 11.18$, $P < 0.05$, 见图 2B。以上结果表明 TN 模型构建成功。

2.2 TN 大鼠的术侧 TG 中 miR-30b 表达降低 qRT-PCR 结果显示在术后第 12 天,与 Sham 组相比,ION-CCI 组大鼠 TG 中 miR-30b 的相对表达量降低 $t = 6.505$, $P < 0.05$, 见图 3。

2.3 miR-30b 类似物对 TN 大鼠 TG 内 ATF3 的表达的影响 注射 miR-30b 类似物后,与 ION-CCI 组及 ION-CCI + scramble 组相比,ION-CCI + miR-30b agomir 组机械痛阈升高 $F = 21.20$, $P < 0.05$; qRT-PCR 结果显示 ION-CCI + miR-30b agomir 组大鼠 TG 中 ATF3 mRNA 表达降低 $F = 8.562$, $P < 0.05$;

Western blot 结果显示 ION-CCI + miR-30b agomir 组大鼠 TG 中 ATF3 的蛋白表达降低 $F = 8.353$, $P < 0.05$, 见图 4。ION-CCI 组与 ION-CCI + scramble 组大鼠机械痛阈及 TG 内 ATF3 的表达差异无统计学意义。

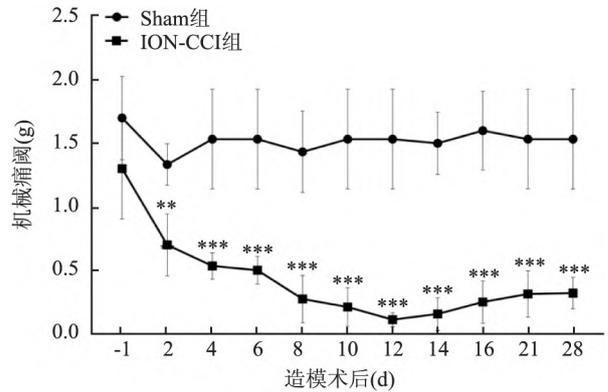


图1 ION-CCI 组及 Sham 组大鼠在造模术后不同时间点机械痛阈的变化
与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

miRNAs 是一类长度为 18 ~ 25 个核苷酸的非编码 RNA^[11]。超过 30% 的人类蛋白编码基因可能受到这些 miRNAs 的调控^[12]。成熟的单链 miRNA 可通过序列完全互补的方式与靶基因 mRNA 3' 非翻译区相结合,降解 mRNA 或抑制 mRNA 的翻译^[11]。miRNAs 在病理状态下表达异常,可能是一个潜在的治疗靶点^[11]。近年来 miRNAs 在疼痛中的作用受到越来越多的关注,逐渐成为镇痛治疗的一个新方向^[6]。CCI 慢性坐骨神经缩窄性损伤后,大约有 111 种 miRNAs 表达异常^[13]。Shao et al^[14] 研究发现在脊神经损伤模型 SNL 中,miR-30b 可通过抑制

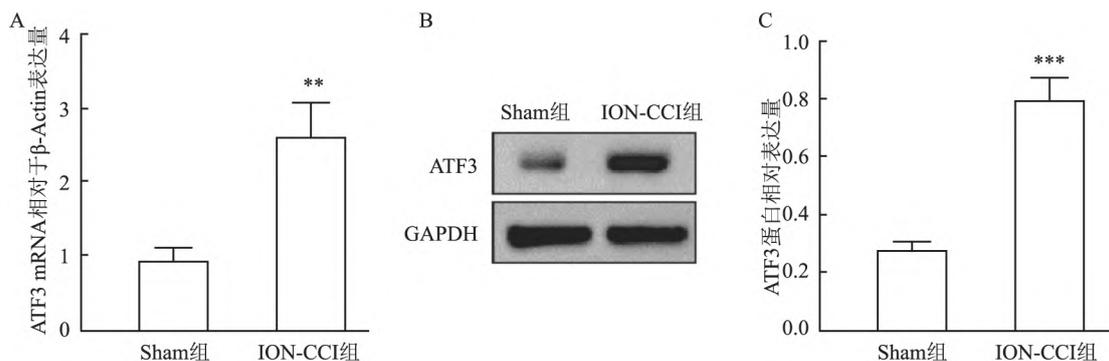


图2 ATF3 在 ION-CCI 组大鼠术侧 TG 中的表达
与 Sham 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

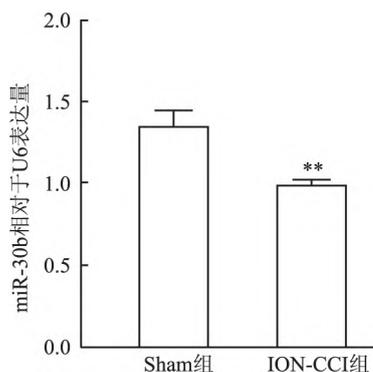


图3 miR-30b在ION-CCI组大鼠术侧TG中的表达与Sham组比较: ** $P < 0.01$

Nav1.7的表达缓解大鼠的神经性疼痛。Su et al^[15]研究发现在脊神经损伤模型SNL中,miR-30b可通过抑制大鼠背根神经节神经元和脊髓中Nav1.3的表达来减轻神经性疼痛。目前miRNAs对痛觉调控机制的研究主要集中在背根神经节、脊髓组织和坐骨神经痛等,对其在TN中的作用研究较少。故本研究重点关注miR-30b在TN模型大鼠TG内的表达及作用。

采用眶下神经缩窄模型建立TN是由Vos et al^[16]于1994年首次提出的一种经典的造模方法,改编自Bennett和Xie^[17]的坐骨神经慢性结扎模型,能再现TN的重要方面,模拟出TN的自发性疼痛及异常性疼痛(痛觉过敏),通过对大鼠术侧触须垫区域进行机械痛阈测定来判断造模是否成功^[3,9]。ATF3是一种转录因子,也是损伤的初级传入神经元的敏感标记物,与周围神经损伤特异性相关。ATF3在许

多不同组织中被应激信号诱导。在疾病和损伤的动物研究中,包括神经结扎、HIV、糖尿病和神经毒素等诱导的神经病变,ATF3被用作神经损伤的特定标记物,可以很好地标记那些组织损伤后长期致敏的神经元^[8]。故在测定大鼠机械痛阈之外,本研究通过检测TG中ATF3的表达变化辅助验证SD大鼠ION-CCI所构建的TN动物模型。

实验结果表明,与Sham组相比,ION-CCI组术后第2~28天机械痛阈降低,术后第12天达到最低值;术后第12天ION-CCI组TG中ATF3 mRNA及蛋白表达升高,提示TN模型建立成功。ION-CCI组术后第12天TG中miR-30b表达降低,提示miR-30b参与了TN的发生。为进一步了解miR-30b表达变化对TN大鼠的影响,在ION-CCI术后第12天,当大鼠TN模型稳定构建时,经眶下孔分别将miR-30b agomir、agomir NC 1次/d,连续4d定位注射到ION-CCI + miR-30b agomir组及ION-CCI + scramble组大鼠TG内。实验结果显示miR-30b类似物干预后,TN大鼠机械痛阈升高,TG内ATF3表达降低。提示过表达miR-30b,不仅可以有效抑制TN引起的ATF3的上调,还能使大鼠的机械痛阈升高,缓解ION-CCI诱导的TN,从而确定了miR-30b可能是TN潜在的治疗靶点。

目前认为TN的实质可能是一种过度兴奋,表现为血管受压后脱髓鞘的三叉神经出现异常放电或异位动作电位^[18]。电压门控钠离子通道(Voltage-gated sodium channels, VGSC)在神经元动作电位的启动和产生中起着至关重要的作用^[2]。研究^[14-15]

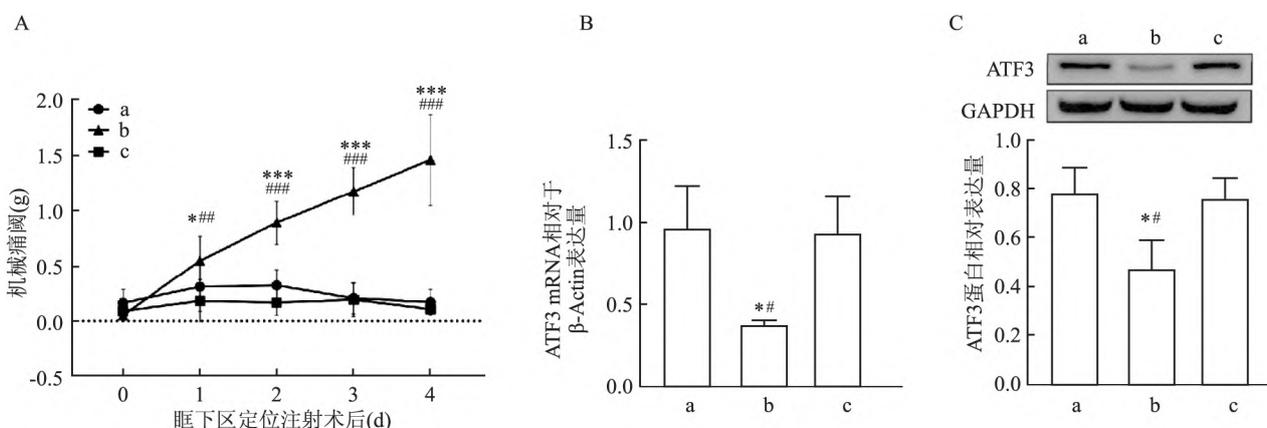


图4 各组大鼠眶下区定位注射不同时间点机械痛阈及术侧TG中ATF3的表达变化

A: 各组大鼠眶下区定位注射不同时间点机械阈值变化; B: 各组大鼠术侧TG内ATF3 mRNA表达; C: 各组大鼠术侧TG内ATF3蛋白表达; a: ION-CCI组; b: ION-CCI + miR-30b agomir组; c: ION-CCI + scramble组; 与ION-CCI组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与ION-CCI + scramble组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

证实,某些 miRNA 可通过调节 VGSC 表达和神经元兴奋性,参与神经性疼痛的发展。通过生物信息学预测发现 miR-30b 与 VGSC 亚型 Nav1.3 高度相关。由此推测在正常生理状态下,miR-30b 能够抑制 SCN3A(Nav1.3 编码基因)由 mRNA 到 Nav1.3 蛋白的翻译。在外周神经受到损伤时,miR-30b 表达下调从而减少对 Nav1.3 mRNA 的抑制,Nav1.3 表达增加,引起神经元兴奋性增强,从而诱发 TN。后续实验将进一步深入探究 miR-30b 调控 TN 的潜在机制,为 TN 的治疗研究提供新的方向。

参考文献

- [1] Jones M R, Urits I, Ehrhardt K P, et al. A comprehensive review of trigeminal neuralgia [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2019, 23(10): 74.
- [2] Gambeta E, Chichorro J G, Zamponi G W. Trigeminal neuralgia: an overview from pathophysiology to pharmacological treatments [J]. *Mol Pain*, 2020, 16: 1744806920901890.
- [3] 张瑶,刘亚军,李芳等.三叉神经痛模型大鼠的三叉神经节中 JAK/STAT3 通路的活化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(10): 1487-90.
- [4] Apra C, Lefaucheur J P, Le Guérinel C. Microvascular decompression is an effective therapy for trigeminal neuralgia due to dolichoectatic basilar artery compression: case reports and literature review [J]. *Neurosurg Rev*, 2017, 40(4): 577-82.
- [5] Zhang Q, Liu S, Zhang J, et al. Roles and regulatory mechanisms of miR-30b in cancer, cardiovascular disease, and metabolic disorders (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(1): 44.
- [6] Li L, Shao J, Wang J, et al. MiR-30b-5p attenuates oxaliplatin-induced peripheral neuropathic pain through the voltage-gated sodium channel Nav1.6 in rats [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 153: 111-20.
- [7] Ding S, Yu Q, Wang J, et al. Activation of ATF3/AP-1 signaling pathway is required for P2X3-induced endometriosis pain [J]. *Hum Reprod*, 2020, 35(5): 1130-44.
- [8] Lee C, Ramsey A, De Brito-Gariepy H, et al. Molecular, cellular and behavioral changes associated with pathological pain signaling occur after dental pulp injury [J]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1744806917715173.
- [9] Xu W, Zhang J, Wang Y, et al. Changes in the expression of voltage-gated sodium channels Nav1.3, Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9 in rat trigeminal ganglia following chronic constriction injury [J]. *Neuroreport*, 2016, 27(12): 929-34.
- [10] Neubert J K, Mannes A J, Keller J, et al. Peripheral targeting of the trigeminal ganglion via the infraorbital foramen as a therapeutic strategy [J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2005, 15(3): 119-26.
- [11] Van Meter E N, Onyango J A, Teske K A. A review of currently identified small molecule modulators of microRNA function [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 188: 112008.
- [12] Shi D N, Yuan Y T, Ye D, et al. MiR-183-5p alleviates chronic constriction injury-induced neuropathic pain through inhibition of TREK-1 [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(6): 1143-49.
- [13] Arai M, Genda Y, Ishikawa M, et al. The miRNA and mRNA changes in rat hippocampi after chronic constriction injury [J]. *Pain Med*, 2013, 14(5): 720-9.
- [14] Shao J, Cao J, Wang J, et al. MicroRNA-30b regulates expression of the sodium channel Nav1.7 in nerve injury-induced neuropathic pain in the rat [J]. *Mol Pain*, 2016, 12: 1744806916671523.
- [15] Su S, Shao J, Zhao Q, et al. MiR-30b attenuates neuropathic pain by regulating voltage-gated sodium channel nav1.3 in rats [J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 126.
- [16] Vos B P, Strassman A M, Maciewicz R J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve [J]. *J Neurosci*, 1994, 14(5 Pt 1): 2708-23.
- [17] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107.
- [18] Liu M X, Zhong J, Xia L, et al. IL-6 contributes to Nav1.3 up-regulation in trigeminal nerve following chronic constriction injury [J]. *Neurol Res*, 2020, 42(6): 504-14.

Expression and effect of miR-30b in the trigeminal neuralgia model rats

Hu Tingting, He Fan, Liu Mingzheng, Xu Wenhua, Wang Yuanying

(¹Stomatologic College Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the role of miR-30b in the trigeminal ganglion (TG) of trigeminal neuralgia (TN) model rats. **Methods** An infraorbital nerve-chronic constriction injury (ION-CCI) model of TN was produced in the rat. Von Frey hair was used to determine the time-course of changes in mechanical pain threshold. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of miR-30b and activating transcription factor 3 (ATF3) in the TG. In addition, miR-30b agomir and agomir NC were injected into ION-CCI rats by the infraorbital foramen injection. The mechanical pain threshold and the expression changes of ATF3 were determined after

维生素 D 对慢性肾脏病小鼠认知功能的影响

李梦雨¹ 张 森¹ 张 丽² 王德光¹

摘要 目的 探讨维生素 D 对腺嘌呤诱导的慢性肾脏病 (CKD) 小鼠认知功能的影响。方法 将 56 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 5 组: 对照 (CON) 组、模型 (CKD) 组、模型 + 低剂量干预 (LVD) 组、模型 + 中剂量干预 (MVD) 组、模型 + 高剂量干预 (HVD) 组, 采用腺嘌呤饲料喂养法诱导 CKD 动物模型, 通过腹腔注射骨化三醇 (20、100、500 ng/kg) 处理 3 个干预组, 每周 3 次, 总计 6 周。眼眶取血测定血清肌酐、尿素氮含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, HE 染色、Masson 染色观察肾脏病理变化, 采用 Morris 水迷宫实验评估小鼠学习和记忆能力。结果 与 CON 组相比, CKD 组小鼠血清肌酐及尿素氮水平升高 ($P < 0.05$), 肾脏病理可见肾小球萎缩、管型、间质纤维化等改变。在 Morris 水迷宫定位航行实验中, 与 CON 组相比, CKD 组小鼠逃避潜伏期延长 ($P < 0.05$), 而 MVD、HVD 组小鼠逃避潜伏期较 CKD 组缩短 ($P < 0.05$); 在空间探索试验中, CKD 组小鼠在原平台象限游泳时间及路程较 CON 组减少 ($P < 0.05$), 而 MVD、HVD 组时间和路程较 CKD 组增多 ($P < 0.05$)。CKD 组小鼠血清 SOD 活性较 CON 组降低 ($P < 0.05$), LVD 及 MVD 组小鼠血清 SOD 活性较 CKD 组升高 ($P < 0.05$)。结论 慢性肾脏病小鼠存在认知功能减退, 维生素 D 可能通过发挥抗氧化作用改善其认知。

关键词 慢性肾脏病; 维生素 D; 认知障碍

中图分类号 R 692.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1083-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.013

近年来, 慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 患者发生认知功能障碍倍受重视, 据统计, 约 48% 的 CKD 患者在进入透析前已出现认知功能障碍^[1], 且随着肾衰竭进展, CKD 患者的认知障碍发生率逐渐增加^[2]。当出现认知功能障碍时, CKD 患者生活质量降低、依从性下降, 从而影响其临床治疗效果、增加死亡风险。研究^[3-4]表明, CKD 患者血中维生素 D 水平明显低于健康人群, 且随着疾病进展, 维生素 D 缺乏率逐渐增加, 维生素 D 水平降低与 CKD 患者认知功能减退存在关联。由于缺乏有关维生素 D 对 CKD 动物认知功能影响的报道, 因此, 该实验拟研究维生素 D 对腺嘌呤诱导的 CKD 小鼠学习与记忆能力的影响, 以期为临床工作中改善 CKD 患者认知功能提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 56 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠购自安徽医科大学实验动物中心, 体质量 (17 ± 1) g, 动物许可证号为: SCXK(皖)2017-001, 伦理审批号: LLSC20210354。小鼠采用分笼饲养的方式, 统一饲养于安徽医科大学第二附属医院科研实验中心, 定期更换垫料, 给予充足的饲料和饮用水, 动物实验室内温度 (22.0 ± 2.0) °C、湿度 50% ~ 60%, 环境自然采光和通风, 12 h 光照 + 12 h 黑暗。

2022-05-12 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2008085MH244、2008085QH426); 安徽医科大学校科研基金 (编号: 2019xkj140、2017xkj028); 安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵育计划项目 (编号: 2020GMFY04、2019GQFY05)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院¹ 肾脏内科、² 麻醉与围术期医学安徽普通高校重点实验室, 合肥 230601

作者简介: 李梦雨, 女, 硕士研究生;

王德光, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangdeguang@ahmu.edu.cn

intervention. **Results** Compared with the sham-operated group, the ION-CCI group had a decreased mechanical pain threshold 2 days after surgery, reached the lowest observed level by day 12, and this threshold reduction lasted more than 28 days ($P < 0.05$). Compared with the sham-operated group, the ION-CCI group had a lower miR-30b expression and a higher ATF3 expression in postoperative TG ($P < 0.05$). After the overexpression of miR-30b in ION-CCI group, the mechanical pain threshold increased, and the expression of ATF3 decreased in TG ($P < 0.05$). **Conclusion** These results suggest that miR-30b may participate in the regulation of TN. miR-30b may be a potential therapeutic target for TN.

Key words Trigeminal neuralgia; infraorbital nerve-chronic constriction injury; miR-30b; ATF3