

网络出版时间: 2019-3-26 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.005.html>

ION-CCI 模型大鼠三叉神经节中 IL-17 变化

朱大卫 崔曼曼 张 越 刘 雨 王元银

摘要 目的 检测采用眶下神经压迫术(ION-CCI)制备大鼠三叉神经痛(TN)模型中三叉神经节(TG)内白细胞介素17(IL-17)蛋白及 IL-17A 的 mRNA 表达量的变化。方法 随机将成年雄性 SD 大鼠分成两组:假手术组(sham 组)和眶下神经压迫组(ION-CCI 组)。使用 Von Frey hair 测量两组大鼠机械疼痛阈值,并通过 Western blot 检测 TG 中 IL-17 蛋白表达量,RT-PCR 检测 IL-17A mRNA 表达量。结果 ION-CCI 组大鼠的机械疼痛阈值较 sham 组显著降低,并在第 14 天时达到最低值($P < 0.01$)。ION-CCI 组大鼠 TG 内的 IL-17 蛋白表达量也显著升高且高于 sham 组大鼠($P < 0.05$),第 14 天时检测的 IL-17A mRNA 表达量也高于 sham 组大鼠($P < 0.05$)。结论 IL-17 在 TN 发生和发展中具有重要作用。关键词 三叉神经痛;眶下神经压迫术;IL-17;三叉神经节中图分类号 R 745.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0524-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.005

白细胞介素 17(interleukin-17, IL-17)是由辅助性 T 细胞 17(Th-17)分泌表达的一种具有促炎作用的细胞因子,IL-17 包含 6 种不同亚型(IL-17A ~ F),均由 TH17 细胞产生,其中 IL-17A 最为常见。研究^[1]显示 Th17 细胞介导的炎症涉及许多影响神经系统结构和功能的自身免疫疾病,如类风湿性关节炎、强直性脊柱炎和克罗恩病。目前在中枢神经系统和周围神经系统中已经检测到了 IL-17 的合成和释放,并且在一些神经元和神经胶质细胞中也能检测到其受体的分泌和表达,并参与 IL-17 信号通路的传导^[2],具体作用主要取决于所处微环境背景、炎症程度和表达 IL-17 的细胞的稳定性^[3]。先前报道^[4]指出,IL-17 在慢性压迫性损伤后的退化神经中表达,并且在损伤导致的神经炎症的神经内膜中可检测到 Th-17 细胞。此外,多种神经痛动物模型显示 IL-17 在神经损伤的急性期和相关的急性疼痛中的作用有限,但可能在神经性疼痛的后期发展

2018-12-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162);安徽省科技攻关计划项目(编号:1401045013)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,合肥 230032

作者简介:朱大卫 男 硕士研究生;

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

Effect of miRNA-323 on proliferation of gastric cancer cells

Chen He¹, Lu Yang², Zhao Yan¹, et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Clinical Laboratory, The Affiliated Maternal and Child Health Hospital of Anhui Medical University/Anhui Province Maternal and Child Health Hospital, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of miRNA-323 on the proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miRNA-323 in gastric cancer tissues, and miRNA-323 inhibitor and miRNA-323 mimics were further transfected into gastric cancer SGC-7901 cells. Effect of miRNA-323 on proliferation of SGC-7901 and the expression of Cyclin D1 and oncogene C-myc was observed by qRT-PCR, Western blot and flow cytometry. **Results** The results of qRT-PCR showed that miRNA-323 was significantly higher in gastric cancer tissues than in adjacent tissues($P < 0.05$). After inhibiting the expression of miRNA-323 in gastric cancer SGC-7901 cells, the expression of Cyclin D1 and C-myc protein was significantly higher than that in the normal group($P < 0.05$), and the cells in S phase were significantly increased. After increasing the expression of miRNA-323, the expression of Cyclin D1 and C-myc protein was significantly higher than that of the normal group($P < 0.05$), and the cells in S phase were significantly increased. **Conclusion** miRNA-323 can inhibit the proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901.

Key words miRNA-323; human gastric cancer SGC7901 cells; proliferation

中起作用^[5]。相比于正常小鼠, IL-17 基因敲除 (IL17^{-/-}) 小鼠的炎症反应低, 机械性疼痛阈值增高, 伤害性热敏感阈值较高, 这些数据表明 IL-17 有助于周围神经损伤后的神经炎症和神经性疼痛的发生^[6]。该研究通过建立大鼠三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TN) 模型, 使用 Western blot 和 RT-PCR 法检测 IL-17 在 TN 大鼠模型中的改变, 为 TN 提供新的治疗方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠, 体质量 180 ~ 200 g, 常规饲料饲养, 自由进食和饮水, 环境温度维持在 22 ~ 25 °C, 12 h 交替照明。造模前对所有大鼠进行刺激训练练习, 用 Von Frey hair 定时每日交替刺激大鼠双侧触须垫 6 次, 刺激间隔 1 min, 剔除对刺激异常敏感的大鼠, 最后选出对一定量刺激反应平静且健康的正常大鼠用于实验建模。实验所用大鼠均来自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 实验模型建立 将 20 只 SD 大鼠随机分成 2 组, 即假手术组 (sham 组) 10 只, 眶下神经压迫组 (ION-CCI 组) 10 只。称重后, 按 0.35 ml/100 g 对大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛使其麻醉。待麻醉生效后, 碘伏对术区擦拭消毒, 沿大鼠左侧颧骨下缘做 10 mm 切口, 血管钳钝性分离组织, 视野下显露眶下神经, 用 5-0 号线结扎眶下神经使其轻微压迫, 缝合创口, 局部涂抹抗菌软膏预防感染; sham 组只暴露出眶下神经, 不结扎。分笼常规饲养。

1.3 实验模型验证 使两组大鼠在安静环境稳定 30 min 后, 用 Von Frey hair 每次间隔 30 s 刺激大鼠术侧触须垫, 强度从小到大逐渐增加, 不同强度分别刺激 8 次。大鼠对刺激的阳性反应分为躲避、攻击以及搔抓面部。若出现以上反应中 1 种或 1 种以上被认为阳性反应。出现阳性反应的最小刺激值即为测量的大鼠疼痛阈值。分别在术前 1 d 和术后 1、2、3、5、7、10、14、21 d 测定两组大鼠的触须垫机械疼痛阈值, 记录并统计分析。

1.4 Western blot 法检测 IL-17 蛋白含量 将术前 1 d 和建模后 7 d、14 d、21 d 的大鼠采用过量 10% 水合氯醛行大鼠腹腔注射麻醉致死, 于冰块上分离取出术侧三叉神经节 (trigeminal ganglion, TG) 放入液氮内冷冻。使用时取出 TG 称重后置于匀浆器内加入 1% 的 RIPA 研磨, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min; 加入蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min 使蛋白变性, 于 -80 °C 冰箱内储存备用。SDS-聚丙烯酰

胺凝胶电泳, 然后转移到 PVDF 膜, 将于 TBST 缓冲液中洗涤干净的 PVDF 膜放置于 5% BSA 中, 室温下封闭 1 h。用含 1% BSA 的 TBST 稀释一抗 (IL-17: 1 : 800, 美国 Abcam 公司, ab79056; GAPDH: 1 : 10 000, 美国 Bioworld 公司, AP0063) 将 PVDF 膜放入一抗稀释液 4 °C 过夜。稀释二抗, 将 PVDF 膜放置于二抗中洗涤。ECL 曝光成像, 采用凝胶图像处理系统分析并计算出目的蛋白相对表达水平。

1.5 RT-PCR 检测 IL-17A mRNA 含量 选择建模后 14 d 的 ION-CCI 组大鼠和 sham 组大鼠, 大鼠腹腔注射过量 10% 水合氯醛, 麻醉死后迅速分离并取出术侧 TG, 取 TG 称重, 放入加入 1% TRIzol 预冷的 1 ml 匀浆器内研磨。加入氯仿并于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min; 弃上清液加入等体积异丙醇沉淀, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min; 弃上清液, 加入 1 ml 75% DEPC-乙醇 4 °C、7 500 r/min 离心 5 min; 弃上清液、干燥 5 ~ 10 min; 加入 20 µl DEPC 水, 使用 NanoDropND-3000 检测样本浓度和纯度。各组 mRNA 调整至相同浓度; 按表 1 加入 PrimeScript™ RT 混匀, 37 °C 孵育 15 min, 85 °C 孵育 15 s。使用 sybrgreen TaKaRa PCR 试剂盒对逆转录的 cDNA 进行 PCR 的扩增, 用于各基因扩增的引物序列见表 2, 设定循环次数, 扩增反应结束后分析所得的溶解曲线体系, 比较目的基因相对表达量。

表 1 逆转录反应体系

试剂	加入量(µl)
5 × PrimeScript Buffer(for Real Time)	2
PrimeScriptRT Tnzyme Mix 1	0.5
Oligo dT Primer(50 µmol/L)	0.5
Random 6 mers(100 µmol/L)	0.5

表 2 RT-PCR 基因引物序列

基因	引物序列(5'-3')
IL-17A	F: CTGATCAGGACGAGCGACCA
	R: ACTGTAGCTCCAGGTTCACTAGCA
β-actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	R: GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 行为学实验结果和 Western blot 结果采用重复测量设计的方差分析, RT-PCR 结果使用独立样本 *t* 检验对两组数据进行比较, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学实验结果 测量结果显示 ION-CCI 组

大鼠的机械疼痛阈值明显低于 sham 组大鼠。术后第 1 天 ION-CCI 组大鼠机械疼痛阈值开始降低 [sham 组: (1.85 ± 0.30) g, ION-CCI 组: (0.54 ± 0.35) g], 在第 14 天时疼痛阈值达到最低 [sham 组: (1.45 ± 0.41) g, ION-CCI 组: (0.13 ± 0.04) g] 21 d 后可见大鼠的疼痛阈值有所升高但仍低于 sham 组 [sham 组: (2.35 ± 1.13) g, ION-CCI 组: (0.75 ± 0.55) g $n=5$, $F=13.89$, $P<0.05$] (图 1)。

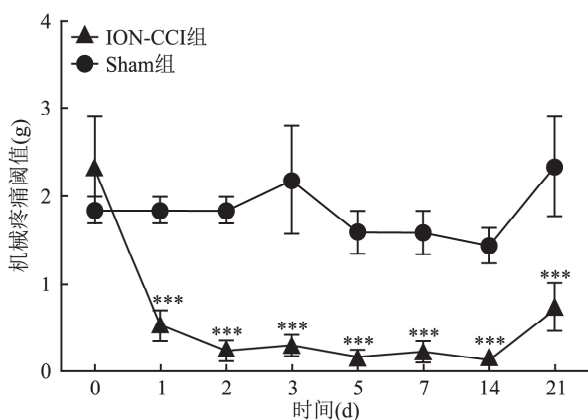


图 1 ION-CCI 组与 sham 组大鼠触须垫在造模后不同时间点疼痛阈值的变化与 sham 组比较: *** $P<0.001$

2.2 IL-17 蛋白在 TG 中的表达量变化 Western blot 结果显示, ION-CCI 组大鼠 TG 中 IL-17 蛋白量在术后 7 d 明显高于 sham 组大鼠, 并在第 14 天时达到最大值 ($n=3$, $F=7.05$, $P<0.05$)。建模 21 d 后开始有所下降, 与 sham 组的大鼠无明显差异 (图 2)。

2.3 IL-17A 的 mRNA 在 TG 中的表达量 在术后第 14 天时, ION-CCI 组大鼠的机械疼痛阈值达到最低 (图 1), 且 TG 中 IL-17 蛋白表达量为最高 (图 2), 为了进一步验证 IL-17 与 TN 的关系, 测量了第 14 天时 TG 中 IL-17A 的 mRNA 相对表达量。RT-PCR 结果显示, ION-CCI 组大鼠的 TG 中 IL-17A 的 mRNA 表达量显著高于 sham 组 ($n=3$, $t=3.25$, $P<0.05$) (见图 3)。

3 讨论

国际疼痛研究协会 (IASP) 认为神经性疼痛是由原发性病变或神经系统功能障碍引发的。神经性疼痛是一种慢性疾病, 通常以疼痛的自发性烧灼感, 痛觉过敏和异常性疼痛为特征^[7]。神经性疼痛的发生和发展通常涉及中枢和外周神经系统的损伤。

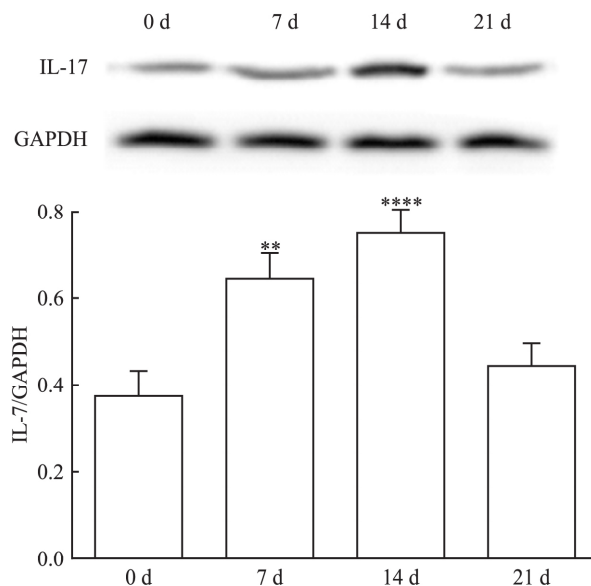


图 2 IL-17 蛋白在 ION-CCI 组大鼠 TG 中不同时间段的表达量与 sham 组比较: ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$

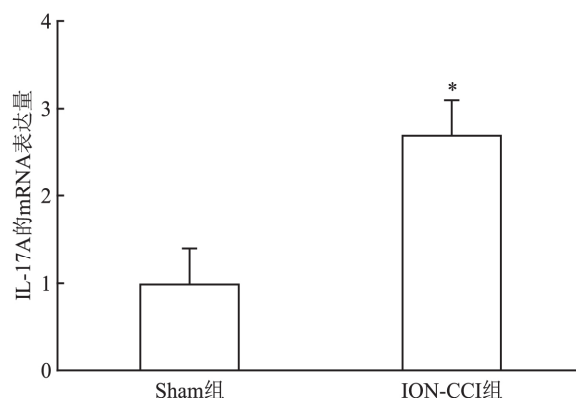


图 3 术后 14 d 时 IL-17A mRNA 在两组大鼠 TG 中的表达量与 sham 组比较: * $P<0.05$

神经损伤后, 各种炎症细胞会被募集到损伤部位, 因此神经炎症和免疫反应将有助于神经性疼痛的发生、发展和维持^[7]。

在坐骨神经或视神经损伤诱导的神经性疼痛动物模型中发现大量 IL-17 和 Th17 细胞^[4]。在小鼠 L4 段脊神经结扎导致的周围神经损伤的炎症模型中, IL-17 基因敲除小鼠的疼痛降低, 用重组 IL-17A (rIL-17A) 处理正常小鼠, 结果显示脊髓中 IL-17A 水平在 1、3、7 和 14 d 显著升高且小鼠的机械异常性疼痛和热痛觉过敏也明显增加, 证明 IL-17 在炎症导致的神经性疼痛中发挥重要作用^[8]。此外与 IL-17 和 Th17 细胞相关的一些炎症性疾病, 如多发性硬化症或过敏性脑脊髓炎常常导致神经性疼痛的产生^[9]。研究^[10]表明, IL-17 有助于损伤诱导的周

围神经性疾病和神经性疼痛的发展,并起到至关重要的作用。

本实验结果显示,大鼠疼痛模型建立成功后,CCI组大鼠疼痛阈值远低于 sham 组;应用 Western blot 检测 TG 组织中 IL-17 表达量,在 14 d 时,CCI 组大鼠 TG 中的 IL-17 蛋白量明显高于 sham 组大鼠。为了进一步验证 IL-17 与 TN 关系,提取 14 d 时 ION-CCI 组和 sham 组大鼠 TG 中 IL-17A mRNA, RT-PCR 结果显示 sham 组大鼠的 IL-17A mRNA 高于对照组,再次提示了 IL-17 在 TN 中发挥着重要的作用。在后期的研究中,将深入探讨 IL-17 所涉及的信号通路在 TN 中的调控机制,为 TN 的治疗提供更多的新途径。

参考文献

- [1] Baeten D, Baraliakos X, Braun J, et al. Anti-interleukin-17A monoclonal antibody secukinumab in treatment of ankylosing spondylitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet* 2013, 382(9906): 1705–13.
- [2] Moynes D M, Vanner S J, Lomax A E. Participation of interleukin 17A in neuroimmune interactions[J]. *Brain Behav Immun* 2014, 41: 1–9.
- [3] Shurin M R. Dual role of immunomodulation by anticancer chemotherapy[J]. *Nat Med* 2013, 19(1): 20–2.
- [4] Day Y J, Liou J T, Lee C M, et al. Lack of interleukin-17 leads to a modulated micro-environment and amelioration of mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice[J]. *Pain*, 2014, 155(7): 1293–302.
- [5] Noma N, Khan J, Chen I F, et al. Interleukin-17 levels in rat models of nerve damage and neuropathic pain[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 493(3): 86–91.
- [6] Kim C F, Moalem-Taylor G. Interleukin-17 contributes to neuroinflammation and neuropathic pain following peripheral nerve injury in mice[J]. *J Pain* 2011, 12(3): 370–83.
- [7] Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, et al. Pharmacological regulation of neuropathic pain driven by inflammatory macrophages[J]. *Int J Mol Sci* 2017, 18(11): pii: E2296.
- [8] Yao C Y, Weng Z L, Zhang J C, et al. Interleukin-17A acts to maintain neuropathic pain through activation of CaMKII/CREB signaling in spinal neurons[J]. *Mol Neurobiol* 2016, 53(6): 3914–26.
- [9] Olechowski C J, Truong J J, Kerr B J. Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis(EAE) [J]. *Pain* 2009, 141(1): 156–64.
- [10] Sun C, Zhang J, Chen L, et al. IL-17 contributed to the neuropathic pain following peripheral nerve injury by promoting astrocyte proliferation and secretion of proinflammatory cytokines[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 89–96.

Changes of IL-17 in trigeminal ganglion of rat with ION-CCI trigeminal neuralgia model

Zhu Dawei, Cui Manman, Zhang Yue, et al

(Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the change of the expression of IL-17 protein and IL-17A mRNA in rat trigeminal ganglion(TG) of rat trigeminal neuralgia(TN) model prepared by infraorbital nerve compression method (ION-CCI). **Methods** Adult male SD rats were randomly divided into two groups: sham operation group and infraorbital nerve compression group. The mechanical pain threshold was measured by Von Frey hair, and the expression of IL-17 protein in TG was detected by Western blot, and the expression of IL-17A mRNA was detected by RT-PCR. **Results** The mechanical pain threshold in ION-CCI group was significantly lower than that in sham group, and reached the lowest level on the 14th day($P < 0.01$). The expression of IL-17 protein in TG of rats in ION-CCI group was also significantly higher than that in sham group($P < 0.05$), and on the 14th day the expression of IL-17A mRNA was also higher than that in sham group($P < 0.05$). **Conclusion** The IL-17 plays an important role in the occurrence and development of trigeminal neuralgia.

Key words trigeminal neuralgia; operation of infraorbital nerve compression; IL-17; trigeminal ganglion