

# SiRNA 干扰慢性炎性痛大鼠患侧背根神经节 MrgC 表达及 PKC $\epsilon$ 磷酸化的研究

林小溪, 方芳, 方剑乔, 刘盈君

(浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053)

**【摘要】** 目的 观察鞘内注射小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 对完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 诱导的慢性炎性痛大鼠患侧背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中 MrgC (Mas-related G protein-coupled receptor C, MrgC) mRNA 与蛋白表达的干扰作用, 并观察该作用对大鼠患足痛阈及患侧 DRG PKC $\epsilon$  丝氨酸 729 点位磷酸化 (phosphorylation of PKC $\epsilon$  Ser729, p-PKC $\epsilon$  Ser729) 水平的影响。方法 健康雄性 SD (Sprague-Dawley, SD) 大鼠 16 只, 随机分为对照 siRNA 组, MrgC siRNA 组, 每组 8 只。大鼠脊髓鞘内插管成功后, 两组大鼠给予相应药物鞘内注射 4 d, 1 次/d, 5  $\mu$ g/d/只。给药第 4 d, 大鼠右后足底注射 CFA 0.1 mL 建立慢性炎性痛模型, 此后隔日注射药物, 直至给药第 11 d 处死。分别于鞘内置管前、给药前、给药 4 d (CFA 造模 0 h)、给药 5 d (CFA 造模 24 h)、给药 11 d (CFA 造模 7 d) 5 个时点检测大鼠患足机械缩腿阈 (Paw withdrawal thresholds, PWTs) 的变化。荧光定量 PCR 法检测患侧 DRG MrgC 的 mRNA 的表达, 免疫荧光法检测患侧 DRG MrgC 表达量及 p-PKC $\epsilon$  Ser729 的含量。结果 与给药 4 d 比较, 给药 5 d 两组大鼠的 PWTs 均有显著的下降 ( $P < 0.01$ ); 给药前后各时点, 两组大鼠之间 PWTs 没有明显差异。观察给药 11 d 时大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC mRNA 的表达, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组各神经节 MrgC mRNA 的表达均明显下降 ( $P < 0.01$ ); 观察大鼠给药 11 d 时大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC 与 p-PKC $\epsilon$  Ser729 的表达, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组患侧 DRG 的 MrgC 阳性细胞率明显减少 ( $P < 0.01$ ), 而 p-PKC $\epsilon$  Ser729 的阳性细胞率显著上升 ( $P < 0.05$ )。结论 MrgC siRNA 片段可有效干扰 CFA 慢性炎性痛大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC mRNA 与 MrgC 的表达, 对 MrgC 的干扰作用能显著上调 PKC $\epsilon$  Ser729 磷酸化的水平, 但不影响大鼠患足机械缩腿阈。

**【关键词】** 小干扰 RNA; MrgC; 蛋白激酶 C  $\epsilon$  亚基 Ser729 磷酸化; 慢性炎性痛; 背根神经节

**【中图分类号】** R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0039-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.009

## SiRNA interference on expression of MrgC and phosphorylation of PKC $\epsilon$ in ipsilateral dorsal root ganglion of rats with chronic inflammatory pain

LIN Xiao-xi, FANG Fang, FANG Jian-qiao, LIU Ying-jun

(The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the Interference effects of siRNA (small interference RNA) intrathecal injection on the expression of mRNA and protein of MrgC, on PWTs (paw withdrawal thresholds) and the phosphorylation of PKC $\epsilon$  Ser729 in ipsilateral DRG (dorsal root ganglion) of rats with chronic inflammatory pain induced by CFA (complete freund's

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (81202755); 浙江省医药卫生科技计划 (2015KYA172)。

**【作者简介】** 林小溪, 女 (1989-), 硕士生。方芳, 女 (1976-), 助理研究员。

**【通讯作者】** 方剑乔 (1961-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 针刺镇痛的效应基础研究。E-mail: Fangjianqiao7532@163.com。

s adjuvant). **Methods** 16 health adult male SD (Sprague-Dawley) rats were randomly divided into 2 groups: control siRNA group and MrgC siRNA group, 8 rats in each group. After success of intrathecal catheterization, corresponding siRNA was injected in rats for 4d, once a day, 5 $\mu$ g/d per rat. The model of chronic inflammatory pain was established by CFA (0.1ml per rat) subcutaneously injected into the right hind paw at 4th day post-administration, then two groups were administrated corresponding siRNA on alternate day and executed at the 11th day post-administration. The PWTs were measured at 5 time points of pre-intrathecal catheterization, pre-administration, 4th day post-administration(0h post-CFA injection), 5th day post-administration(24h post-CFA injection), 11th day post-administration(7 d post-CFA injection). The expression of MrgC mRNA in ipsilateral DRG was detected by fluorogenic quantitative PCR, and the expression of MrgC and the phosphorylation of PKC $\epsilon$  Ser729 in ipsilateral DRG was detected by immunofluorescence method. **Result** Compared with 4th day post-administration, PWTs of both two groups at 5th day post-administration decreased significantly ( $P < 0.01$ ). While there was no significant difference of PWTs between two groups at every detective time point. Compared with control siRNA group, the expression of MrgC mRNA and the rate of MrgC positive cells in MrgC siRNA group both decreased significantly ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), whereas the rate of p-PKC $\epsilon$  Ser729 positive cells increased obviously ( $P < 0.05$ ) at 11th day post-administration. **Conclusion** MrgC siRNA can effectively interfere the expression of mRNA and protein of MrgC in L4-L6 ipsilateral DRGs of rats with chronic inflammatory pain induced by CFA, and the siRNA interference on MrgC can obviously up-regulate the phosphorylation of PKC $\epsilon$  Ser729, while it has no significant effect on PWTs of rats.

**【Key words】** SiRNA; MrgC; Phosphorylation of PKC $\epsilon$  Ser729; Chronic inflammatory pain; Dorsal root ganglion

慢性炎性疼痛广泛地存在于各种疾病的进程中,目前抑制疼痛的药物阿片受体激动剂吗啡与炎性介质抑制剂的临床疗效都不佳,而慢性疼痛相关的外周细胞与分子功能研究成为镇痛研究的重要方向。

2001 年发现的 MrgC (Mas-related G protein-coupled receptor C, MrgC) 是一种新型的 G 蛋白偶联受体,其基因仅在外周神经系统中与痛觉调制有密切联系的背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 和三叉神经节的中小型感觉神经元高度表达<sup>[1-2]</sup>。研究证实 MrgC 参与慢性炎症引发的外周痛觉过敏的调制,但其机制远未阐明,且目前尚未有 MrgC 特异性抑制剂供进一步深入研究。

细胞内信号转导分子蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶<sup>[3]</sup>。其亚基 PKC $\epsilon$  在慢性疼痛外周痛觉敏化的形成中起着关键性作用<sup>[4]</sup>。PKC $\epsilon$  磷酸化是其功能被激活的重要标志<sup>[2,5]</sup>。研究表明 MrgC 的调制作用与 PKC 密切相关<sup>[6]</sup>,因此本实验拟建立完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 慢性炎性痛模型,鞘内注射 MrgC 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA), 观察该片段对大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC mRNA 和受体表达的沉默作用及其对 PKC $\epsilon$  丝氨酸 729 点位磷酸化 (phosphorylation of PKC $\epsilon$  Ser729, p-PKC $\epsilon$  Ser729) 水平和机械痛的影响,为后续 MrgC 生理药理功能的深入研究打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 16 只,体重 280 ~ 300 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK (沪)2013-0016】,由浙江中医药大学实验动物中心饲养【SYXK (浙)2013-0184】,饲养期间给予啮齿动物标准颗粒饲料及自由饮水,12 h 循环灯光,室温 23  $\pm$  2 $^{\circ}$ C。

### 1.2 主要实验试剂和仪器

MrgC 抗体 (批号:0121212030827,美国 Abnova 有限公司); CFA (批号:051M8725,美国 Sigma 公司); 山羊血清封闭液 (批次:140214; BIOS 公司); 多聚赖氨酸处理载玻片 (南通天盛实验器材有限公司); MrgC siRNA 与对照 siRNA (批号:3360; life technologies 公司); Goatanti-rabbit IgG (批号: A120101F13; 美国 Abnova 有限公司); Anti-PKC $\epsilon$  (phospho S729) antibody (批号 F1510; 美国 Abnova 有限公司); 抗荧光淬灭 PVP 封片液 (产品编号: p0128; 碧云天生物技术研究); Trizol: (批号: 28218; life technologies 公司) 逆转录试剂盒 (批号: RR047A, 大连宝生物公司); PCR 试剂盒 (批号: 1725201AP; 美国 Bio-Rad 公司)。其他试剂均为国产分析纯。

Thermo 冰冻切片机 (型号: HM550, 美国 Thermo Scientific 公司); 激光共聚焦显微镜 (型号:

AIR;日本尼康公司);紫外分光光度计(型号:smartspec™ plus, BIO-RAD 公司);荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96™ Real-Time system, BIO-RAD 公司);逆转录仪(S1000™ Thermal cycler, BIO-RAD 公司);PE 导管(型号:PE-10, OD 0.5 mm, ID 0.25 mm;公司:宁波市科技园区安来软件科技有限公司)。

### 1.3 实验动物模型制备

#### 1.3.1 脊髓鞘内置管模型<sup>[7-10]</sup>

大鼠禁食 1 d 后,水合氯醛 350 mg/kg 麻醉,剃除腰背部鼠毛,酒精消毒,切开皮肤,分离肌肉,暴露 L5 棘突,用咬骨钳扳掉棘突,将 PE-10 聚乙烯管插入脊髓蛛网膜下腔,从 L5 向 L2 缓缓进管约 3.5 cm。见有脑脊液流出后,即封住外口,缝合肌肉和皮肤,并将 PE-10 管固定于浅层肌肉上。术后恢复 3 d 后,鞘内给予 10 μL 盐酸利多卡因,选取在 30 s 内双下肢瘫痪,5~10 min 内恢复正常的大鼠进行后续试验。

#### 1.3.2 CFA 慢性炎性痛模型

从大鼠右后足垫部向踝关节方向注入 CFA (0.1 mL/只),4 h 后注射关节局部出现炎症反应,并出现痛觉过敏,大鼠致炎关节肿胀疼痛可持续 4 周以上<sup>[11]</sup>。

### 1.4 实验动物分组与处理

#### 1.4.1 实验动物分组

大鼠行鞘内置管术后恢复 5 d,检测大鼠患侧足缩腿阈,随机分为两组,对照 siRNA 组和 MrgC siRNA 组,每组 8 只。

#### 1.4.2 药物配制与实验动物处理

##### 1.4.2.1 药物配制

MrgC siRNA 序列为<sup>[12]</sup> 5'-CAUGUCAGCUAUUAUAUGUt-ps-t-3' 和 3'-t-ps-t GUACAGUCGAUAAUAUACA-5'; 错位对照 siRNA 序列为 5' CAAGUUAUC UAGUAAUUAUa-ps-t-3 和 3'-t-ps-a GUU CAA UAG AUC AUU AAU A-5'。序列中的“t”代表 2-O-甲基尿嘧啶核苷;“a”代表 2'-O-甲基腺嘌呤;“ps”代表硫代磷酸键。均为 life technologies 公司制备。将 siRNA 50 μg 加入 DEPC 水 43.3 μL 配置成 100 μm siRNA 溶液,将 siRNA 加入 216.5 μL 的 I-fect™ 转染试剂中,用枪头轻轻搅拌,使之均匀,在室温放置 5 min,使 siRNA 和转染试剂充分反应成有效的转染试剂 siRNA 复合物。

##### 1.4.2.2 实验动物处理

两组大鼠 CFA 造模前分别给予 4 d 不同药物:

对照 siRNA 组给予对照 siRNA 和 MrgC siRNA 组给予 MrgC siRNA,第 4 天药后 CFA 造模,造模后隔日注射相应药物 3 次,剂量均为 5 μg/d/10 μL。

于鞘内置管前、给药前、给药 4 d (CFA 造模 0 h)、给药 5 d (CFA 造模 24 h)、给药 11 d (CFA 造模 7 d) 共计 5 个时点检测大鼠患侧足缩腿阈。

### 1.5 样本制备

大鼠行腹腔水合氯醛 350 mg/kg 麻醉,用于免疫荧光检测的大鼠生理盐水经心灌注后,再用 4% 多聚甲醛滴注,快速取得患侧 L4-L6 DRG,用 4% 多聚甲醛溶液固定 4 h,蔗糖溶液梯度脱水(15% 蔗糖溶液 24 h,30% 蔗糖溶液 48 h),经液氮速冻,放入 -80℃ 冰箱中保存备用。用于 PCR 的大鼠仅灌注生理盐水,冰上取患侧 L4-L6 DRG,立即置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

### 1.6 指标检测

#### 1.6.1 足缩腿阈(paw withdrawal thresholds, PWTs)

以患侧 PWTs 作为机械痛敏的评定值:测量前,将大鼠放置于透明塑料盒(69 cm × 17 cm × 14 cm)中适应 15 min。待大鼠安静后,将类似 Von Frey 丝的金属丝(φ0.5 mm)置于大鼠足底正中(避开足垫),从 0 开始以 2.5 g/s 递增的强度刺激大鼠足底,直至引发大鼠缩足反射,记录此时刺激强度,连续测量 3 次,每次间隔 5 min,取平均值作为测定结果。设定最大刺激强度为 50 g,截止时间为 20 s,以免大鼠足爪损伤。

#### 1.6.2 大鼠患侧 L4-L6 DRG 中的 MrgC mRNA 的表达

总 RNA 的提取:取出大鼠 L4-L6 DRG,加入 1 mL Trizol,冰上超声粉碎,室温静置 5 min,加入 200 μL 氯仿,混匀后剧烈震荡,静置 15 min,4℃,11,440 r/min 离心 15 min,取上清液再加入 500 μL 异丙醇,混匀后 4℃,11,440 r/min 离心 10 min,取沉淀加入 75% 乙醇 1 mL,用移液枪进行轻轻吹打,4℃,10,444 r/min 离心 5 min,待 RNA 沉淀干燥后,加入 0.1% DEPC 水溶解。紫外分光光度法检测 OD260/OD280 的比值,并计算其浓度。取该比值在 1.8~2.0 之间的 RNA 溶液进行后续实验

逆转录:采用含 DNA 酶消化步骤的 Takara 的逆转录试剂盒,按说明书操作,合成 cDNA:吸取 2 μL 总 RNA 溶液、随机引物、RTmix (含 RNAsin 和 DTT)、dNTP 混合液、DEPC 水按照逆转录体系比例配制反应体系。

定量 PCR: 采用 PRIMER5.0 软件设计引物, MrgC 上游引物: 5'-ACTCTGGCTCTTGGGATT-3', 下游引物: 5'-GAGGGACCGATGCTTTT-3'; 采用糖酵解反应中的甘油三磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参<sup>[13]</sup>, 其上游引物: 5'-TGCTGAGTATGTCG TGGAG-3', 下游引物: 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTG AT-3', 均由上海生工生物技术有限公司合成。参照 BIORAD 试剂盒, 以 cDNA 为模板, GAPDH 为内参, 采用 SYBR Green 法在 20  $\mu$ L 反应体系中扩增 cDNA 样品。MrgC 与 GAPDH 的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 共 39 循环。设置溶解曲线检测产物反应的纯度 65 $^{\circ}$ C ~ 95 $^{\circ}$ C 5 s, 0.5 $^{\circ}$ C 步进。每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照, 每个样本设 3 个复孔。采用  $2^{-\Delta\text{CT}}$  法进行计算, 结果以对照 siRNA 组基因表达量的倍率表示。

### 1.6.3 大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 MrgC 和 p-PKC $\epsilon$ 的阳性细胞率的检测

采用贴片法, DRG 冰冻切片 (14  $\mu$ m), 贴于载玻片上, 室温晾干 1 h。用组化油笔将待染组织圈好, 1% PBS 浸洗 4 次, 每次 10 min。取出玻片, 滴加 10% 山羊血清 (1% PBS 稀释) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。弃山羊血清, 加入 MrgC 抗体 (1: 100) (p-PKC $\epsilon$  (1: 2000)), 置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日拿出湿盒, 放于 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, 弃一抗, 1% PBS 浸洗 4 次, 每次 10 min。滴加羊抗兔 IgG (1: 1000) (羊抗小鼠 IgG (1: 1000)) 进行荧光标记, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。弃二抗, 1% PBS 浸洗 4 次每次 10 min (避光)。晾干后滴加抗荧光淬灭封片液封片。设立阴性对照: 采用不含一抗的稀释液替代一抗, 其余条件不变。激光共聚焦显微镜下观察并拍片。以阴性对照为参考, 用 Ipp 6.0 软件进行细胞计数, 计算患侧 L4-L6 DRG 中总细胞数及阳性细胞数, 并计算 MrgC 与 p-PKC $\epsilon$  阳性细胞的表达率。

### 1.7 统计结果

本实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用独立样本 T 检验; 均以  $P < 0.05$  为差异显著的标准。

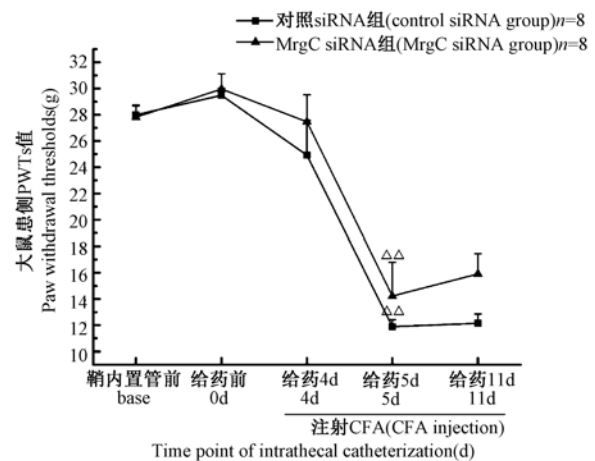
## 2 结果

### 2.1 鞘内注射 siRNA 对 CFA 大鼠 PWTs 的影响

笔者分别检测了鞘内置管前、给药前、给药 4 d

(CFA 造模 0 h)、给药 5 d (CFA 造模 24 h)、给药 11 d (CFA 造模 7 d) 共计 5 个时点的大鼠患侧 PWTs, 来评价大鼠机械痛阈, 将给药前的痛阈作为基础痛阈。

如图 1 所示, 鞘内置管术前、给药前两组大鼠之间患侧后足 PWTs 没有明显差异 ( $P > 0.05$ )。给药 4 d 后于大鼠 CFA 造模前 (CFA 造模 0 h) 检测两组 PWTs, MrgC siRNA 组的足缩腿阈较对照 siRNA 组有所上升, 但其差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。给药 5 d (CFA 造模后 24 h) 时, 可见两组 PWTs 较给药 4 d (CFA 造模 0 h) 均明显下降 ( $P < 0.01$ ), MrgC siRNA 组的 PWTs 高于对照 siRNA 组, 两组间差异仍无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。此趋势一直持续到给药第 11 天, 两组的 PWTs 均低于给药 4 d (CFA 造模 0 h) 的 PWTs, 但两组之间并无明显差异 ( $P > 0.05$ )。



注: 两组同时点比较,  $P > 0.05$ ;

与 CFA 造模 0 h 比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 两组大鼠在各时点 PWTs 变化情况

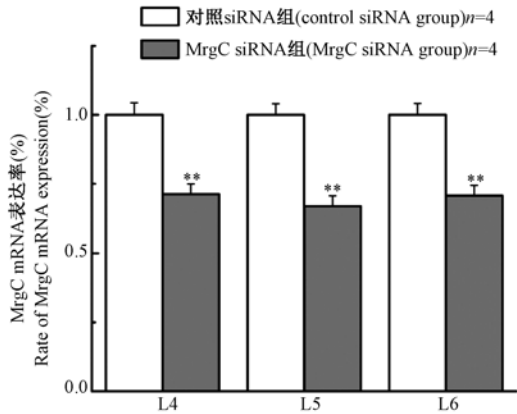
Note: Compared with control siRNA group,

\*\* $P > 0.05$ ; 4d VS 5d,  $\Delta\Delta P < 0.01$ .

Fig. 1 The PWTs of two groups at different time points

### 2.2 鞘内注射 MrgC siRNA 对大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 MrgC mRNA 表达的影响

分别检测给药 11 d 后两组大鼠患侧腰神经节 L4、L5、L6 的 MrgC mRNA 的表达量, 以对照 siRNA 组表达量的倍数作图, 结果见下图 2。如图中所示, MrgC siRNA 组患侧 L4、L5、L6 的 MrgC mRNA 表达量均低于对照 siRNA 组对应神经节的表达量 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), 分别为对照 siRNA 组表达量的 0.71、0.67、0.71 倍。



注:对照 siRNA 组和 MrgC siRNA 组相比, \*\* $P < 0.01$ 。

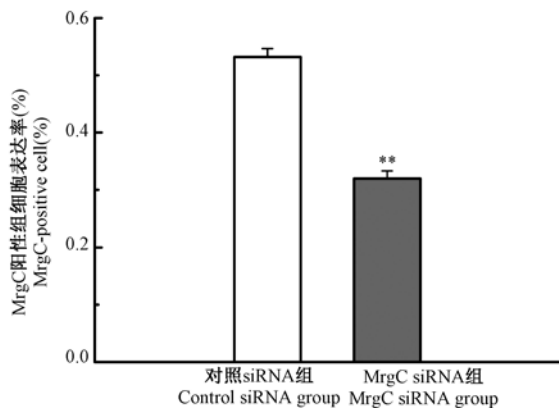
图 2 两组大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC 的 mRNA 表达量的变化

Note: compared with control siRNA group, \*\* $P < 0.01$ .

Fig. 2 Comparison of the expression of MrgC mRNA in ipsilateral DRG L4-L6 between two groups

### 2.3 鞘内注射 MrgC siRNA 对大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 MrgC 受体表达的影响

如图 3 中所示, MrgC 主要表达在 DRG 的中小神经元中。分别检测给药 11d 后两组的 MrgC 表达变化, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组的 MrgC 阳性细胞率明显降低 ( $P < 0.01$ ), 约为对照 siRNA 组的 60%。荧光结果见彩插 7 图 5。



注:与组对照 siRNA 组相比, \*\* $P < 0.01$ 。

图 3 两组大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC 阳性细胞率的比较

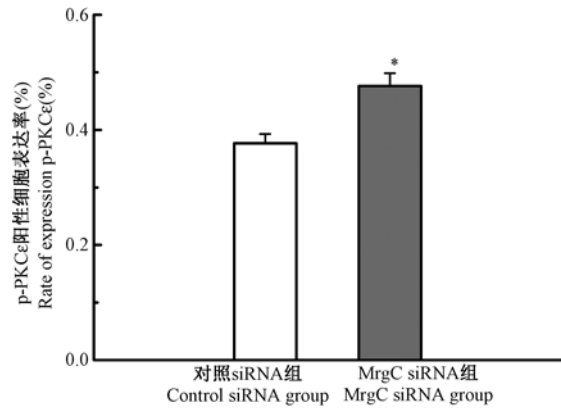
Note: compared with control siRNA group, \*\* $P < 0.01$ .

Fig. 3 Rate of the expression of MrgC cells in L4-L6 ipsilateral DRG in each group

### 2.4 鞘内注射 MrgC siRNA 对大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 p-PKCε 阳性细胞率的影响

检测给药 11 d 后 L4-L6 DRG PKCε Ser729 点位磷酸化的变化, 以 p-PKCε 的阳性细胞率来评价。

结果如图 4, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组的 p-PKCε 阳性细胞率明显升高 ( $P < 0.05$ ), 约为对照 siRNA 组的 126%。荧光结果见彩插 7 图 6。



注:于对照 siRNA 组相比, \* $P < 0.05$ 。

图 4 两组大鼠患侧 DRG p-PKCε 阳性细胞率的比较

Note: compared with control siRNA group, \* $P < 0.05$ .

Fig. 4 Rate of the expression of p-PKC in ipsilateral DRG of each group

## 3 讨论

MrgC 是 2001 年发现的一类新型的 G 蛋白偶联受体, 其基因仅仅高度表达于外周神经系统的 DRG 和三叉神经节的中小型感觉神经元中。研究发现 MrgC 参与慢性炎症引发的外周痛觉过敏的调制<sup>[14]</sup>。但由于目前尚未发现 MrgC 特异性抑制剂, 未有直接的证据证实 MrgC 在慢性炎症痛发展过程中对疼痛的调制作用, 进一步的功能研究只能通过 siRNA 干扰 mRNA 表达或基因敲除。siRNA 干扰是指内源性或外源性小片段双链 RNA 与靶基因的 mRNA 同源互补, 在细胞内特异降解靶 mRNA, 从而特异性封闭靶基因的过程<sup>[15]</sup>。研究报道, 脊髓鞘内给予 siRNA 能够通过转染脊髓背角浅层的初级传入神经纤维逆行至 DRG 发挥其干扰作用<sup>[16]</sup>。本研究通过鞘内给予 siRNA, 观察到给药 11 d 时即 CFA 造模后第 7 天, MrgC siRNA 组别 DRG L4-L6 的 MrgC mRNA 的表达量均明显低于对照 siRNA 组相应神经节的表达量, 进一步观察发现 MrgC siRNA 组的表达明显降低, 约为对照 siRNA 组的 60%, 与 MrgC mRNA 变化相一致。这说明鞘内注射该 siRNA 片段有效的抑制 MrgC 基因及其蛋白的表达, 从而在 CFA 慢性炎症痛的基础上成功建立了 MrgC 基因沉默模型。

CFA 致炎性痛模型为一种经典的研究慢性炎

性痛的模型,单侧注射 CFA 诱导产生的痛觉过敏一般在 4 h 内发展,为炎性痛的急性期,24 h ~ 48 h 为慢性炎性痛早期,随后在 7 d 左右痛觉过敏有个小高峰,之后慢慢恢复。文献报道患侧的痛觉过敏可持续 4 ~ 6 周,而在健侧产生的炎性镜像痛一般在 18 d 以上<sup>[11]</sup>。以往的研究多集中在 CFA 慢性炎性痛早期,Jiang<sup>[14]</sup>等人发现在椎管内注射 MrgC 特异性激动剂牛肾上腺髓质 8-22 肽 (bovine adrenal medulla 8-22, BAM8-22) 不能够影响正常大鼠的基础痛阈和削弱 CFA 引发的早期机械痛觉过敏 (24 h),但能够削弱 CFA 引发的早期热痛觉过敏 (24 h)。与该研究的结果相一致的是,本研究 CFA 造模前鞘内给与 4 次 MrgC siRNA 干扰 (文献报道以 2  $\mu\text{g}$ /次剂量,4 次注射该 siRNA 片段能够使正常大鼠的 MrgC mRNA 表达量下降 50%<sup>[12]</sup>),与对照 siRNA 组比较,没有显著的改变大鼠的机械痛阈。CFA 造模后 24 h,可见两组的 PWTs 较造模前均显著下降,提示 CFA 模型的成功建立。但继续给与 siRNA 干扰直至 CFA 第 7 天,两组间机械痛阈仍未见明显差异。这结果表明抑制 MrgC 的表达未能影响 CFA 引发的机械痛觉过敏。另有 Guan Y 等<sup>[17]</sup>敲除 Mrg 基因家族 (含 MrgC 基因) 后鞘内注射 BAM8-22 能同时延缓 CFA 引起的早期机械痛觉过敏与热痛觉过敏 (24 h),该现象可能是由于同时沉默了除 MrgC 基因之外的 Mrg 基因家族成员而引发的。因为本研究没有观察干扰 MrgC 基因对于 CFA 引起的热痛觉过敏的影响,这将是我们的进一步研究的目标。

PKC 是一种重要的细胞内信号转导分子<sup>[3]</sup>,在损伤或炎症引起的慢性痛觉过敏启动与维持中起着重要的作用<sup>[18]</sup>,它的膜移位和磷酸化是 PKC 被激活的重要标志<sup>[19]</sup>。Honan 等人基于正常大鼠的原痛研究发现,鞘内给予 MrgC 特异性激动剂 BAM8-22,应用全细胞膜片钳技术发现与热痛密切相关的辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1) 敏化的神经元大约占 13% 的 DRG 神经元,这一效应被 PKC 特异性抑制剂 Ro-31-8220 所抑制<sup>[6]</sup>;有研究表明鞘内注射 BAM8-22 抑制了 CFA 诱发的脊髓背角膜上 PKC $\gamma$  的上升<sup>[20]</sup>。以上研究提示 PKC 在 MrgC 对疼痛的调控中起着重要的作用。但是目前尚无 DRG 中 PKC 在 MrgC 对 CFA 诱发的慢性炎性痛调制过程功能性改变的研究。PKC 的亚基  $\epsilon$  在 90% 以上的 DRG 中小直径神经元中表达,其 Ser729 点位磷酸化是 PKC $\epsilon$  引发痛

觉过敏的一个必要调节因素,本研究观察到在有效沉默 MrgC 基因后,PKC $\epsilon$  的 Ser729 点位磷酸化水平明显上升,该结果提示抑制 DRG 中 PKC $\epsilon$  的 Ser729 点位磷酸化从而抑制 PKC $\epsilon$  功能性激活是 MrgC 调制 CFA 慢性炎性痛的重要细胞学机制。

综上所述,本研究在 CFA 慢性炎性痛的基础上成功地建立了 MrgC 基因沉默模型,该模型中对 MrgC 的抑制作用显著上调 PKC $\epsilon$  Ser729 磷酸化的水平,基于 PKC 是一个蛋白激酶,它激活了多种与疼痛密切相关的伤害性感受器,如 TRPV1,下一步的研究将围绕着 MrgC/PKC 深入展开。

#### 参考文献:

- [1] Dong X, Han S, Zylka M J, *et al.* A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons[J]. *Cell*, 2001, 106(5):619-632.
- [2] Lembo P M, Grazzini E, Groblewski T, *et al.* Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(3):201-209.
- [3] 刘峰,田玉科. PKC $\gamma$  的功能概述[J]. *医学综述*, 2010(5):656-658.
- [4] 王远胜,胡兴国. 蛋白激酶 C 与疼痛的中枢敏感化[J]. *国外医学. 麻醉学与复苏分册*, 2002(2):108-111.
- [5] Liao G Y, Wagner D A, Hsu M H, *et al.* Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(5):960-964.
- [6] Honan S A, Mcnaughton P A. Sensitisation of TRPV1 in rat sensory neurones by activation of SNSRs [J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 422(1):1-6.
- [7] 章沿锋,张小洛,姚尚龙. 大鼠三种鞘内置管术的效果比较[J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(2):252-254.
- [8] 邓亚南,刘艳芳,陈建平,等. 经大鼠腰骶部鞘内置管给药技术的研究[J]. *中国医学创新*, 2014(18):33-35.
- [9] Yaksh T L, Rudy T A. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space[J]. *Physiol Behav*, 1976, 17(6):1031-1036.
- [10] Poon Y Y, Chang A Y, Ko S F, *et al.* An improved procedure for catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in the rat[J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(1):155-160.
- [11] De Castro C M, De Sutter P, Gybels J, *et al.* Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain[J]. *Pain*, 1981, 10(2):173-185.
- [12] He S Q, Li Z, Chu Y X, *et al.* MrgC agonism at central terminals of primary sensory neurons inhibits neuropathic pain[J]. *Pain*, 2014, 155(3):534-544.
- [13] Du J, Fang J, Liang Y, *et al.* Electroacupuncture attenuates mechanical allodynia by suppressing the spinal JNK1/2 pathway in a rat model of inflammatory pain[J]. *Brain Res Bull*, 2014, 108:27-36.

- [14] Jiang J, Wang D, Zhou X, *et al.* Effect of Mas-related gene (Mrg) receptors on hyperalgesia in rats with CFA-induced inflammation via direct and indirect mechanisms [J]. *Br. J. Pharmacol*, 2013, 170 (5): 1027 – 1040.
- [15] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391(6669):806 – 811.
- [16] Luo M C, Zhang D Q, Ma S W, *et al.* An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons[J]. *Mol Pain*, 2005, 1:29.
- [17] Guan Y, Liu Q, Tang Z, *et al.* Mas-related G-protein-coupled receptors inhibit pathological pain in mice [J]. *PNAS*, 2010, 107(36):15933 – 15938.
- [18] Mochly-Rosen D, Das K, Grimes K V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? [J]. *Nat rev drug discov*, 2012, 11 (12):937 – 957.
- [19] Kang J, Toita R, Kim C W, *et al.* Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design [J]. *Biotechnol. Adv*, 2012, 30(6):1662 – 1672.
- [20] 吕庆琴. 大鼠 MrgC 受体抑制 CFA 诱发炎性疼痛的细胞学机制[D]. 福建师范大学, 2013.

[修回日期]2015-07-02