DOI:10.16016/j.1000-5404.201603183

Rap1a 高表达对 SNL 大鼠神经病理性疼痛及星形胶质细胞自噬的影响

孙树凯,马 磊,张海红,贾 栋 (710038 西安,第四军医大学唐都医院神经外科)

[摘要] **目的** 分析 L_5脊神经结扎(SNL)大鼠脊髓组织中 Rap1a 的表达及其对神经病理性疼痛的影响,探讨其作用机制。**方法** 采用 L_5脊神经结扎法制备 SNL 大鼠模型,分为假手术($n=6$)、SNL 模型组($n=30$)、生理盐水组($n=6$)、Cont-shR 组($n=6$)、Rap1a-shR 组($n=6$)、雷帕霉素组($n=6$),经由鞘内注射法处理后,采用 Von-Frey 纤维丝法检测大鼠机械痛阈值,采用 RT-PCR 和 Western blot 法检测大鼠脊髓组织和星形胶质细胞中 Rap1a 的表达、mTOR 活性及自噬水平。**结果** SNL 大鼠脊髓组织中 Rap1a 的表达水平较生理盐水组显著上升,机械痛阈明显降低($P<0.05$)。Rap1a shRNA 腺病毒感染后,SNL 大鼠机械痛阈明显升高($P<0.05$),大鼠脊髓组织及分离培养的星形胶质细胞中细胞自噬标志分子 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值升高,p62 表达水平下降,细胞自噬水平增加,且 mTOR 活化水平降低($P<0.05$)。细胞自噬诱导剂雷帕霉素作用后,星形胶质细胞及 SNL 大鼠脊髓组织细胞自噬水平均明显增加,SNL 大鼠的机械痛阈显著升高($P<0.05$)。**结论** 神经损伤引起的 Rap1a 高表达对神经病理性疼痛的发展有促进作用,这一过程可能与 Rap1a 对 mTOR 信号通路及星形胶质细胞自噬水平的调节有关。

[关键词] Rap1a;神经病理性疼痛;星形胶质细胞自噬;mTOR;SNL 大鼠
[中图法分类号] R338.1; R363.2; R441.1 [文献标志码] A

Effect of highly expressed Rap1a on autophagy in astrocytes and neuropathic pain in rats after spinal nerve ligation

Sun Shukai, Ma Lei, Zhang Haihong, Jia Dong (Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710038, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect the expression of Rap1a in the spinal cord tissue of rats after spinal nerve ligation (SNL), determine its effect on neuropathic pain, and investigate the underlying potential mechanism. **Methods** Rat model of SNL were produced by ligating lumbar nerve L5. Then the 60 rats were divided into sham operation group ($n=6$), SNL group ($n=30$), model + normal saline group ($n=6$), model + Cont-shR group ($n=6$), model + Rap1a-shR group ($n=6$), and model + rapamycin ($n=6$). Rap1a expression was then detected. Corresponding agents, such as normal saline, adenovirus Rap1a shRNA and others were introduced into the spinal cord tissue of SNL rats by intrathecal injection. The mechanical withdrawal threshold (MWT) of rats was measured by Von-Frey assay. RT-PCR and Western blotting were employed to detect the expression of Rap1a, mTOR activity, as well as autophagy in SNL rats and cultured astrocyte. **Results** Compared to the sham operation group, Rap1a expression was significantly up-regulated in the spinal cord tissue of SNL rats, whereas the MWT of the rats was remarkably decreased ($P<0.05$). However, adenovirus Rap1a shRNA infection significantly increased the MWT of SNL rats ($P<0.05$), and also enhanced the ratio of autophagy maker LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ and reduced the level of p62 in the spinal cord tissue of SNL rats and cultured astrocytes, indicating the increase of autophagy. Besides, the mTOR activity was also decreased by Rap1a shRNA ($P<0.05$). Furthermore, rapamycin dramatically induced the autophagy in the astrocyte and spinal cord tissue as well as the MWT of SNL rats ($P<0.05$). **Conclusion** SNL-induced high expression of Rap1a contributes to the development of neuropathic pain in SNL rats, which might be through activating the mTOR signal pathway and inhibiting the autophagy of astrocyte.

[**Key words**] Rap1a; neuropathic pain; astrocyte autophagy; mTOR; spinal nerve ligation rats

Corresponding author: Jia Dong, E-mail: wenyinxian029@163.com

[通信作者] 贾 栋,E-mail:wenyinxian029@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160713.1620.001.html(2016-07-13)

神经病理性疼痛是一种由神经压迫、癌症、糖尿病等其他多种疾病引起的神经损伤,常表现为痛觉过敏、自发性疼痛等症状[1]。神经病理性疼痛的发病过程受 K^+、Ca^{2+} 离子通道及炎性细胞因子的调节,同时涉及神经元损伤、中枢敏化、胶质细胞活化等病理生理学改变[2]。其发病机制极为复杂,临床治疗效果不尽人意。细胞自噬是真核细胞中一种保守的细胞学行为,对于细胞形态结构及功能的维持具有重要调控作用[3]。研究[4]表明,细胞自噬功能的紊乱与神经病理性疼痛的发生存在关系,然而其具体机制尚不明确。Rap1a 是 Ras 肿瘤基因家族成员之一。研究表明 Rap1a 分子与神经系统功能及神经退行性变化等疾病的发生存在关系[5]。本实验以 L_5 脊神经结扎(SNL)大鼠模型及分离培养的星形胶质细胞为对象,分析 Ras 肿瘤基因家族成员 Rap1a 在神经病理性疼痛大鼠脊髓组织中的表达水平,分析 Rap1a 对星形胶质细胞自噬和 SNL 大鼠机械痛阈的影响,以期为解析神经病理性疼痛的发病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔源 Rap1a、mTOR、磷酸化 mTOR(S2481)、β-actin 一抗及羊源二抗(HRP)均购自北京博奥森生物技术有限公司,鼠源 LC3-Ⅱ、LC3-Ⅰ为英国 VIVA Bioscience 公司产品,兔源 p62 为美国 Santa Cruz 公司产品,腺病毒载体 pAd/PL-Dest 购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验动物与分组

60 只雄性成年 SD(Sprague-Dawley)大鼠,体质量(300 ±20)g,购自第四军医大学实验动物中心。分为假手术组($n=6$)、SNL 模型组($n=30$)、生理盐水组($n=6$)、Cont-shR 组($n=6$)、Rap1a-shR 组($n=6$)、雷帕霉素组($n=6$)。造模前于大鼠 L_4、L_5 脊椎间隙行鞘内注射。生理盐水组、Cont-shR 组、Rap1a-shR 组分别注射生理盐水、Cont-shR 腺病毒、Rap1a shRNA 腺病毒,注射剂量均为 25 μL/次,1 次/d,连续注射 7 d 后进行造模及后续检测。雷帕霉素组鞘内注射自噬诱导剂雷帕霉素(0.5 μg/μL),注射剂量 100 μL/次,1 次/d,连续注射 7 d,检测细胞自噬对 SNL 大鼠机械痛阈的影响。

1.3 方法

1.3.1 SNL 大鼠模型制备 参照 Shi 等[6]的方法,采用 L_5 脊神经结扎法制备神经疼痛大鼠模型。3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,沿背部右侧剪开皮肤,将肌肉分离,咬开 L_5 横突,暴露 L_5 脊神经,用丝线结扎脊神经,缝合切口。假手术组不结扎脊神经,其余操作同手术组。

1.3.2 机械痛阈检测 参照高润兴等[7]的方法于造模前 1 d 测大鼠痛阈基础值,造模后第 1、3、7、10、14 天测大鼠痛阈值。大鼠自适应环境 15 ~30 min 至安静后,将 Von-Frey 纤维丝置于大鼠右后足掌心处,从 0 × g 开始缓慢增加力度,以恒定速度刺激大鼠足部,至大鼠出现抬腿或缩足反应时,记录阈值。分别测定 5 次,取平均值记为大鼠机械痛阈值。

1.3.3 RT-PCR 检测 分离处理后的大鼠脊髓组织或细胞,Trizol 法提取总 RNA 后反转录出 cDNA,行实时定量 PCR 检测。反应程序:94 ℃,50 s;54 ℃,50 s;72 ℃,50 s;72 ℃,10 min,30 个循环。检测结果以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 相对表达量。

1.3.4 Western blot 检测 分离处理后的大鼠脊髓组织或细胞,SDS 裂解法提取组织或细胞中总蛋白,测定蛋白浓度后,各取 60 μg 蛋白经由 SDS-PAGE 电泳分离并转至 PVDF 膜。加 3% 脱脂奶粉封闭,加入 1∶1 000 稀释的一抗 4 ℃过夜,TBST 洗膜,加入 1∶5 000 稀释的二抗室温孵育 1 h,经 ECL 显色曝光,灰度分析条带密度,β-actin 为内参,计算蛋白表达水平。通过 Western blot 检测自噬标志分子 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ、p62 蛋白的水平变化,反应细胞在不同状态下的自噬水平。

1.3.5 脊髓星形胶质细胞的分离与培养 参照杨镭镭等[8]的方法进行。取 SNL 造模 7 d 后的大鼠,于无菌条件下分离出脊髓组织,置于预冷的 DMEM/F12 培养液,剪碎并用胰蛋白酶液消化,细胞悬液离心后加入含血清的正常培养液,10^5/mL 接种于培养瓶,37 ℃恒温培养箱培养。后经阿糖胞苷(Ara-C)处理及差速贴壁,获得纯化的胶质细胞。

1.3.6 腺病毒载体构建及感染 参照李钢等[9]的方法进行。以 Rap1a 基因序列为模板,设计合成 Rap1a shRNA 及阴性对照序列(Cont-shR),将 shRNA 序列亚克隆至 pAd/PL-Dest 腺病毒载体中,经测序验证后,转染至 HEK293 细胞中包装腺病毒颗粒,获得含 pAd/shRap1a 及 pAd/shCont 的腺病毒,经 $TCID_{50}$ 法测定病毒滴度后,用于 SNL 大鼠鞘内注射及胶质细胞的感染实验。

1.4 统计学分析

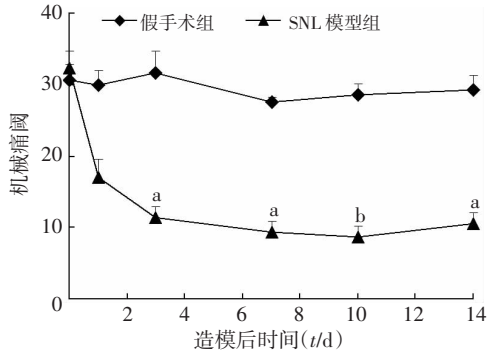
采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验或单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNL 大鼠脊髓组织中 Rap1a 表达水平的测定

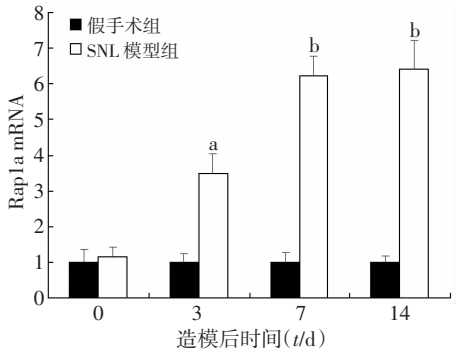
与假手术组相比,SNL 大鼠术后机械痛阈明显降

低,持续至 14 d(图 1)。而 SNL 大鼠脊髓组织中 Rap1a mRNA 和蛋白表达水平均出现上升,术后第 3 天增加显著($P<0.05$),并持续至 14 d(图 2、3)。



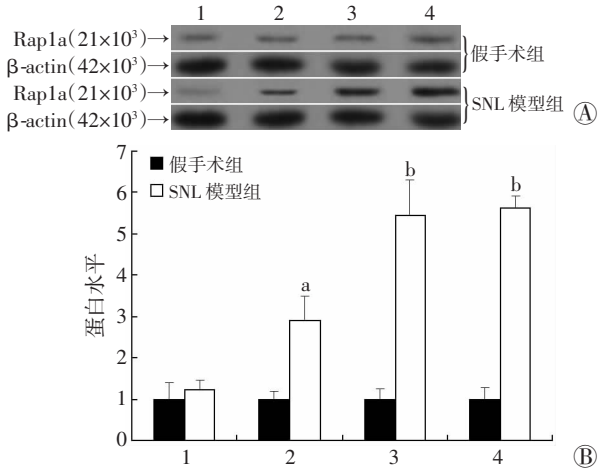
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较

图 1　Von-Frey 纤维丝法检测 2 组大鼠机械痛阈值随造模时间的变化



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较

图 2　定量 PCR 检测造模后不同时间 2 组大鼠脊髓组织中 Rap1a mRNA 表达



1~4:分别为造模后 0、3、7、14 d;A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较

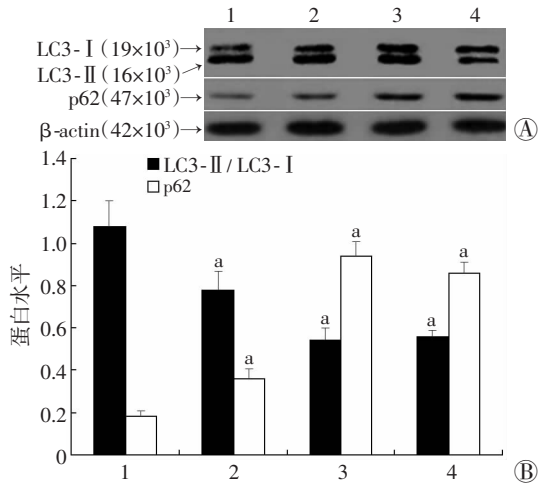
图 3　Western blot 检测造模后不同时间 2 组大鼠脊髓组织中 Rap1a 基因表达

2.2　Rap1a 对 SNL 大鼠机械痛阈的影响

Rap1a shRNA 腺病毒感染后,SNL 术后第 7 天,大鼠脊髓组织中 Rap1a 的表达水平(1.96±0.59)较生理盐水组(6.24±0.54)及 Cont-shR 组(6.02±0.67)显著降低($P<0.05$);大鼠机械痛阈(7 d)则明显升高(依次为 29.00±3.39、13.20±1.48、14.20±2.16,$P<0.05$)。

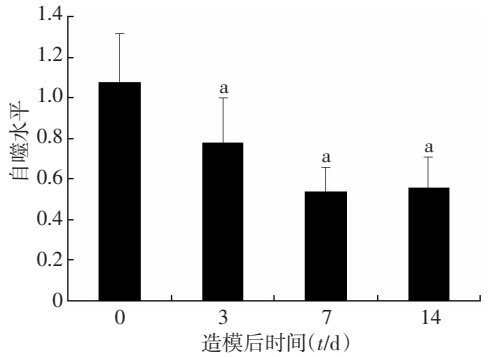
2.3　Rap1a 对 SNL 大鼠脊髓组织中细胞自噬水平的影响

SNL 术后,大鼠脊髓组织中细胞自噬标志分子 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ值逐步降低,p62 表达水平升高,表明细胞自噬水平降低($P<0.05$,图 4、5)。与生理盐水组及 Cont-shR 组相比,Rap1a shRNA 腺病毒感染后,SNL 术后第 7 天,大鼠脊髓组织细胞自噬水平增加(依次为 0.52±0.13、0.49±0.08、0.90±0.17),且 mTOR 活化水平降低($P<0.05$,图 6)。



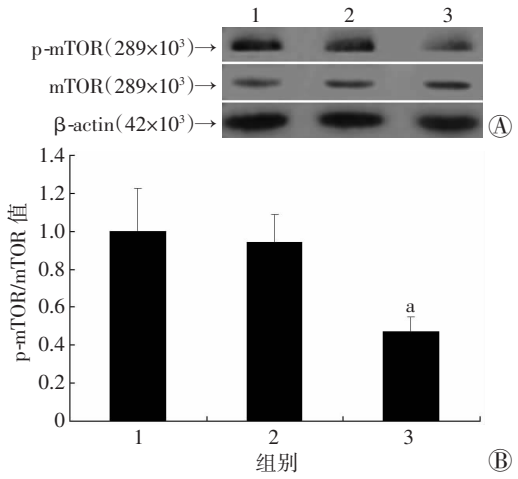
1~4:分别为造模后 0、3、7、14 d;A:Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与 0 d 比较

图 4　Western blot 检测造模后不同时间大鼠脊髓组织中 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ与 p62 蛋白表达



a:$P<0.05$,与 0 d 比较

图 5　Western blot 检测造模后不同时间大鼠脊髓组织自噬水平

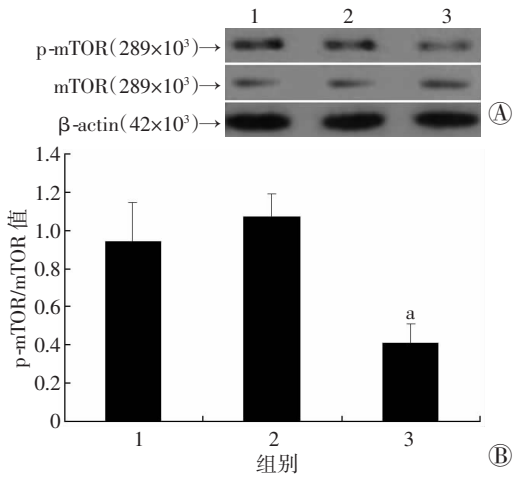


1:生理盐水组;2:Cont-shR 组;3:Rap1a-shR 组 A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与生理盐水组及 Cont-shR 组比较

图 6 Western blot 检测造模后 7 d 各组大鼠脊髓组织中 p-mTOR/mTOR 表达

2.4 Rap1a 对星形胶质细胞自噬的影响

与生理盐水组及 Cont-shR 组相比,Rap1a shRNA 腺病毒感染后,大鼠分离获得的星形胶质细胞中细胞自噬水平增加(分别为 0.32±0.14、0.35±0.10、0.80±0.12),且 mTOR 活化水平降低($P<0.05$,图 7)。

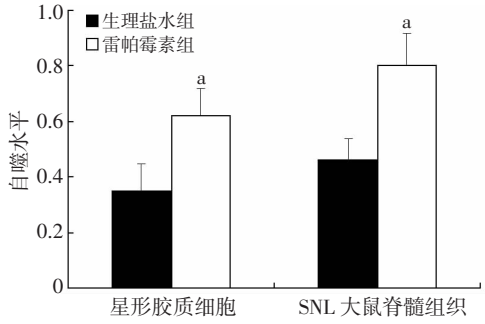


1:生理盐水组;2:Cont-shR 组;3:Rap1a-shR 组 A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与生理盐水组及 Cont-shR 组比较

图 7 Western blot 检测处理 2 d 后各组大鼠星形胶质细胞中 p-mTOR/mTOR 的表达

2.5 星形胶质细胞自噬对 SNL 大鼠机械痛阈的影响

细胞自噬诱导剂雷帕霉素(0.5 μg/μL)作用后,星形胶质细胞(2 d)及 SNL 大鼠脊髓组织(7 d)细胞自噬水平均明显增加($P<0.05$,图 8);SNL 大鼠的机械痛阈(7 d)(33.20±4.43)较生理盐水对照组(13.20±1.48)显著升高($P<0.05$)。



a:$P<0.05$,与生理盐水组比较

图 8 Western blot 检测 2 组星形胶质细胞(2 d)及 SNL 大鼠脊髓组织(7 d)自噬水平

3 讨论

本研究以 SNL 大鼠模型及分离培养的星形胶质细胞为对象,分析 Ras 肿瘤基因家族成员 Rap1a 在神经病理性疼痛大鼠脊髓组织中的表达及作用。Rap1a 是 Ras 家族成员之一,可作为分子开关调节下游 MAPKs 相关信号通路,进而调控不同靶分子表达及细胞功能的变化,参与肿瘤等疾病的发生过程。已有研究表明,Rap1a 分子也与神经系统功能及神经退行性变化等疾病的发生有关[5]。Li 等[10]报道 Rap1a 作为 miR-203 的下游直接靶基因,受 miR-203 的抑制作用;在慢性神经压迫损伤模型大鼠的脊髓背角神经节中,miR-203 的表达水平下调,而 Rap1a 则被过量表达。Rap1a 还可通过对 MEK/ERK 通路产生调控而参与外周神经敏感化过程。本实验发现在 SNL 模型大鼠脊髓组织中,Rap1a 的表达水平显著上调,且 Rap1a 的高表达与 SNL 大鼠机械痛阈的变化存在联系,而抑制 Rap1a 表达可有效改善模型大鼠的疼痛症状。证实 Rap1a 分子表达的失调还与神经病理性疼痛的发病机制密切相关。

细胞自噬是真核细胞中一种依赖溶酶体的清除途径,可降解胞内的蛋白质聚集体及受损的细胞器,对于细胞形态结构及功能的维持具有重要调控作用[11-12]。细胞自噬与神经退行性疾病的关系已多有报道。神经类疾病的发生多伴有神经元及其他神经细胞中蛋白质的异常聚集,细胞自噬过程可有效清除这些异常的蛋白质聚集体,使受损的神经细胞继续行使正常功能,防止疾病的发生[13-14]。研究发现,在神经病理性疼痛发病过程中,细胞自噬功能的紊乱对于神经疼痛的加剧具有促进作用,而特异性的激活细胞自噬功能则可缓

解神经疼痛症状[6,15]。本研究发现,SNL 大鼠脊髓组织中 Rap1a 高表达与自噬水平呈反向关系,高表达的 Rap1a 能激活 mTOR 通路,引起细胞自噬水平发生下降;而抑制 Rap1a 后,mTOR 通路活性降低,细胞自噬水平增加,相应的大鼠神经疼痛症状也得到明显改善。我们推测,Rap1a 分子对大鼠神经病理性疼痛的影响可能与其对脊髓组织细胞自噬的抑制作用有关。

神经胶质细胞是神经系统中一类提供营养和支撑作用的重要细胞。近年来,胶质细胞在神经病理性疼痛中的作用也逐渐被人们认识。周围神经、腰脊神经的结扎、横断等创伤均能刺激胶质细胞激活,激活的胶质细胞可分泌 ROS、NO、前列腺素、神经生长因子等一系列神经活性物质以及 TNF 和白介素等多种炎性因子,促使神经元处于敏化状态[16]。而通过米诺环素、氟柠檬酸等药物阻断神经胶质细胞的活化,可有效抑制神经活性物质的释放,缓解神经病理性疼痛症状[17]。本研究通过 SNL 大鼠体内外实验证实,Rap1a 可激活星形胶质细胞内 mTOR 信号通路,抑制星形胶质细胞自噬的发生。推测其对星形胶质细胞自噬的影响可能参与了大鼠神经病理性疼痛的发病过程。

值得注意的是,胶质细胞包含星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞等多种类型,而不同类型的胶质细胞在神经疼痛病理过程中发挥的作用不尽相同。其中,小胶质细胞的活化多出现在疼痛起始阶段,而激活的星形胶质细胞则主要参与疼痛的发展和维持阶段。本研究仅在体外条件下分析了 Rap1a 对星形胶质细胞自噬的影响,而对于星形胶质细胞及其他类型胶质细胞自噬活性在神经病理性疼痛中的作用还需要进一步的综合分析验证。

综上所述,本研究证实了神经损伤引起的 Rap1a 高表达对于神经病理性疼痛的发展具有促进作用,而这一过程可能与 Rap1a 对 mTOR 信号通路及星形胶质细胞自噬水平的调节有关。

参考文献:

[1] Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 429(1-3): 23-37. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)01303-6

[2] 伍磊, 林洪, 沙漠, 等. 神经病理性疼痛的发病机制研究进展[J]. 中国临床神经外科杂志, 2014, 19(3): 186-188.

[3] Dunlop E A, Tee A R. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy[J]. Semin Cell Dev Biol, 2014, 36: 121-129. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.08.006

[4] 杨湘怡, 陶润知, 聂亚雄. mTOR 依赖的自噬通路与神经变性疾病[J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(2): 191-195.

[5] Jacqueline S, Alena B, Nekeisha N, *et al*. The Ras-related protein, Rap1A, mediates thrombin-stimulated, integrin-dependent glioblastoma cell proliferation and tumor growth[J]. J Biol Chem, 2014, 289(25): 17689-17698. DOI: 10.1074/jbc.M113.536227

[6] Shi G, Shi J, Liu K, *et al*. Increased miR-195 aggravates neuropathic pain by inhibiting autophagy following peripheral nerve injury[J]. Glia, 2013, 61(4): 504-512. DOI: 10.1002/glia.22451

[7] 高润兴, 王汉兵, 仲吉英, 等. 鞘内注射 TRESK 基因重组腺病毒对坐骨神经分支选择性损伤大鼠的镇痛作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(23): 1929-1932.

[8] 杨镭镭, 王清秀, 彭成为, 等. 大鼠脊髓星形胶质细胞的分离与纯化[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(2): 207-209.

[9] 李钢, 冯彪, 邓彦超, 等. HPV18 E6、E7 基因-shRNA 重组腺病毒表达载体的构建及鉴定[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(24): 3608-3612.

[10] Li H, Huang Y, Ma C, *et al*. MiR-203 involves in neuropathic pain development and represses Rap1a expression in nerve growth factor differentiated neuronal PC12 cells[J]. Clin J Pain, 2015, 31(1): 36-43. DOI: 10.1097/AJP.0000000000000070

[11] Maiese K. Targeting molecules to medicine with mTOR, autophagy, and neurodegenerative disorders[J]. Br J Clin Pharmacol, 2016, 82(5): 1245-1266. DOI: 10.1111/bcp.12804

[12] 许梦雪, 秦新月, 冯金洲, 等. 自噬在实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠中的抗炎作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(16): 1624-1628. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411248

[13] Jung K T, Lim K J. Autophagy: Can It be a New Experimental Research Method of Neuropathic Pain?[J]. Korean J Pain, 2015, 28(4): 229-230.

[14] 秦利燕, 戴旭芳. 雷帕霉素对自闭症大鼠病症行为的改善作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(5): 420-424. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201409094

[15] Guo J S, Jing P B, Wang J A, *et al*. Increased autophagic activity in dorsal root ganglion attenuates neuropathic pain following peripheral nerve injury[J]. Neurosci Lett, 2015, 599: 158-163. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.05.046

[16] 赵喆, 何文娟, 温惠中, 等. 脊髓背角 P2X7 受体激活引起神经病理性疼痛的发生[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(9): 897-901.

[17] 邹晓琴, 黄诚. 胶质细胞在神经病理性痛中的作用[J]. 赣南医学院学报, 2013, 33(1): 144-146.

(**收稿**:2016-04-05;**修回**:2016-05-16)

(编辑 龙 亮)