doi:10.11659/jjssx.12E019074

·基础研究·

Notch3 信号介导小胶质细胞活化在慢性前列腺炎疼痛中的作用

张 恒[1],付 炯[1],何 鹏[1],王永权[1],杨 忠[2],周占松[1] (1.陆军军医大学第一附属医院全军泌尿中心,重庆 400038;2.陆军军医大学神经生物学教研室,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察 Notch3 介导 $L_5 \sim S_2$ 脊段背角小胶质细胞活化在慢性前列腺炎疼痛中的作用。**方法** 大鼠分为实验组(慢性前列腺炎组)和对照组,实验组通过完全弗氏佐剂(CFA)注射前列腺来制作大鼠慢性前列腺炎疼痛模型,对照组注射生理盐水,采用热辐射甩尾痛阈测定和前列腺组织病理学检查鉴定疼痛模型,分别在注射 CFA 后 0、4、12、24 d,采用 qRT-PCR 检测 $L_5 \sim S_2$ 脊段后角小胶质细胞活化标志物 IBA-1 和受体 Notch3 mRNA 的表达,采用 ELISA 检测小胶质细胞炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的分泌,并在鞘内注射小胶质细胞和 Notch3 抑制剂后检测小胶质细胞 TNF-α 和 IL-1β 蛋白的表达。**结果** 前列腺组织病理和热痛域实验证实慢性前列腺炎疼痛模型建立成功。实验组大鼠 Notch3、IBA-1、TNF-α 及 IL-1β 的表达在第 4 天开始增加,第 12 天达到最高水平,第 24 天开始下降,均显著高于对照组,差异有极显著性统计学意义($P<0.01$)。抑制小胶质细胞和 Notch3 受体后,TNF-α 和 IL-1β 的分泌明显减少($P<0.05$)。**结论** 慢性前列腺炎疼痛中 Notch3 介导 $L_5 \sim S_2$ 脊段中枢小胶质细胞活化,炎症因子分泌增加,与慢性前列腺炎呈现的持续顽固神经炎性疼痛有关。

[关键词] 前列腺炎;疼痛;脊髓中枢;Notch3;小胶质细胞;动物模型;慢性无菌性前列腺炎;慢性盆腔疼痛综合征

[中图分类号] R697+.33 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-12-13

Effect of Notch3 signal mediated microglia activation on the neuroregulation of chronic prostatitis pain

ZHANG Heng[1], FU Jiong[1], HE Peng[1], WANG Yong-quan[1], YANG Zhong[2], ZHOU Zhan-song[1] (1. Department of Urology, First Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Neurobiology, Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the role of Notch3 mediated activation of microglia in the dorsal horn of L_5-S_2 spinal cord in chronic prostatitis pain. **Methods** The rats were divided into the experimental group (the chronic prostatitis group) and the control group. The experimental group was injected with complete Freund's adjuvant (CFA) to make chronic prostatitis pain model. The control group was injected with normal saline, and the pain model was identified by heat radiation tail flick pain threshold measurement and prostate histopathology examination. The expression of the activation marker ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA-1) and the receptor Notch3 of microglia in the posterior horn were detected by qRT-PCR at 0, 4, 12, 24 days after the CFA injection. The secretion of the inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β in microglia were detected by ELISA. Furthermore, the expression of TNF-α and IL-1β of microglia were detected after intrathecal injection of microglia and Notch3 inhibitor. **Results** The chronic prostatitis pain model was confirmed by pathological examination and hot pain field experiment. The expressions of Notch3, IBA-1, TNF-α, IL-1β in the experimental group began to increase on the 4th day, and they reached the maximum level on the 12th day, and they began to decrease on the 24th day, which were all significantly higher than those in the control group ($P<0.01$). The secretion of TNF-α and IL-1β decreased significantly after inhibition of microglia and Notch3 receptor ($P<0.05$). **Conclusion** In chronic prostatitis pain, Notch3 mediates the activation of microglia in L_5-S_2 spinal cord center, and it results in the increase of inflammatory factor secretion, which is related to the persistent and refractory neuritis pain in chronic prostatitis.

Keywords: prostatitis; pain; spinal cord center; Notch3; microglia; animal models; chronic aseptic prostatitis; chronic pelvic pain syndrome

慢性前列腺炎疼痛是泌尿男性生殖科的顽症,常表现为持续内脏牵涉痛,且前列腺炎症消失后疼痛相关症状仍持续存在,其发生已证实与神经机制的异常有关。脊髓小胶质细胞是中枢系统的重要免疫细胞,在神经病理性疼痛中可通过分泌炎症介质因子而致痛。疼痛领域初步研究还发现,Notch3 参与胶质细胞神经病理性痛觉信息的传递,是调控痛觉传导的关键信号分子之一,但慢性前列腺炎疼痛中 Notch3 是否通过介导小胶质细胞活化引起持续的前列腺炎疼痛尚有待研究[1]。本研究通过建立慢性前列腺炎疼痛大鼠模型,观察 $L_5 \sim S_2$ 脊段 Notch3 信号是否介导小胶质细胞活化,并通过调节致痛炎症因子导致中枢的痛觉过敏,以进一步阐明慢性前列腺炎疼痛发生的神经机制。

[基金项目] 国家自然科学基金(81100537)

[通信作者] 周占松,E-mail:zzs68754186@163.com

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

CFA 购自 Sigma 公司(美国),Notch3 和 IBA-1 引物合成由基康生物公司完成(中国),RT-PCR kit 和 ELISA kit 购自上海生工(中国),SYBR green PCR core reagent kit 购自 Applied Biosystems 公司(美国),DNA Engine OPTIONTm2 购自 MJ research 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立和分组 慢性前列腺炎疼痛大鼠模型参照 Nackley 等[2]和 Butler 等[3]的方法建立,成年雄性特异性无病原体(specific pathogen free,SPF)大鼠由陆军军医大学动物实验中心提供,体质量(200 ± 25)g。实验分为两部分:一是疼痛模型的鉴定、Notch3 和小胶质细胞活化,炎症因子的检测,完全随机分为实验组和对照组(n = 6)。大鼠均采用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射,前列腺经下腹正中小切口(1 cm)暴露,实验组大鼠前列腺双侧叶各注射完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant,CFA)10 μL,对照组双侧叶注射等量生理盐水。两组大鼠均用 5-0 可吸收线缝合关闭切口,消毒包扎,术后大鼠置于安静、温暖、避光环境饲养,12 h 后按时相点进行后续相应实验;炎症组织学检查取注射后 12 d 大鼠组织,其余实验取 4 个时相点:0、4、12、24 d。第二部分为模型大鼠鞘内注射阻断 Notch3 和小胶质细胞后进行炎症因子检测,实验分为 3 组(n = 6),分别在鞘内注射:①Notch3 受体拮抗剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)4 mmol/L 为 NAC 组;②小胶质细胞抑制剂米诺环素(minocycline)5 mol/L 为 minocycline 组;③等体积人工脑脊液(ACSF,pH 5.5)为 ACSF 组。所有程序均遵守实验动物使用指南。

1.2.2 热辐射痛阈法疼痛模型鉴定 实验大鼠置于底为 3 mm 厚的有机玻璃箱(2 cm × 12 cm × 22 cm)中,大鼠适应环境 30 min 后,利用热辐射刺激仪(12 V、50 W)发出 5 mm 光斑照射大鼠足底,从照射开始至大鼠出现抬腿回避时间即为热缩腿反射潜伏期(thermal withdrawal latency,TWL),每次照射时间不超过 30 s,最长记为 30 s,二次测量最少间隔10 min,每只测量 5 次,去掉最大和最小值,计算 3 次平均值时间。

1.2.3 大鼠前列腺炎症模型组织鉴定 大鼠注射 CFA 12 d 后,经腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,经心脏灌入 200 mL 0.9% 生理盐水,然后再灌入 48 ℃、含 4% 多聚甲醛的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液约 300 mL,剖腹收集左右前列腺组织,标本固定在 4 ℃、4% 多聚甲醛中过夜、包埋、石蜡切片常规染色、切片在显微镜下检查。

1.2.4 qRT-PCR 检测 Notch3 和 IBA-1mRNA 的表达 将实验大鼠分别在注射 CFA 后 0、4、12、24 d 断头处死,游离取出 L_5 ~ S_2 脊段双侧的后角组织,称取相同量的组织使用 RT-PCR kit 提取 RNA,分光光度法测定总 RNA 的纯度,A260 和 A280 的比值为 1.8 ~ 2.0,取 2 μg 总 RNA 进行 cDNA 逆转录,反应条件为70 ℃,5 min→37 ℃,60 min→70 ℃,10 min。再取 20 ng cDNA 进行 qRT-PCR 检测目标基因。循环条件为 50 ℃,30 min→95 ℃,15 min→94 ℃,15 s→56 ℃,15 s→72 ℃,30 s。共 40 个循环。用 GAPDH 作为内参,建立扩增的标准曲线和分析计算,用与内参的相对值来检测样本的表达量。目标基因和内参引物序列为 IBA-1:TTG ATC TGA ATG GCA ATG GA(forward),CCT CCA ATT AGG GCA ACT CA(reverse);Notch3:TGG CGC CTC TTC AAC AAC A(forward),ATC CCA GCC GCA CTC CTC(reverse);GAPDH:TTT AAC TCT GGT AAA GTG GAT ATT GTT G(forward),ATT TCC ATT GAT GAC AAG CTT CC(reverse)。

1.2.5 ELISA 检测 TNF-α、IL-1β 的表达 分别在注射 CFA 0、4、12、24 d 时将模型大鼠的 L_5 ~ S_2 全部脊髓后角取出,再将相同量的组织加入 0.5 mL 冰裂解液(50 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,1% TritonX-100,0.5% 钠脱氧胆酸盐,1 mmol/L PMSF,0.1% SDS,10 mmol/L氟化钠和 1 mmol/L 硫酸钠)。冰上匀浆,以 1 800 r/min 离心 10 min,收集上清液,采用 ELISA 试剂盒检测 IL-1β 和 TNF-α 的含量。

1.2.6 鞘内注射抑制 Notch3 和小胶质细胞 按 Yaksh 等[4]的方法鞘内置管。大鼠以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,CFA 同法注射前列腺制作疼痛模型,再暴露大鼠寰枕膜,用 PE-10 插管小心插入脊髓蛛网膜下腔,进管约 6 cm,有脑脊液溢出即封闭外口,缝合皮肤,并将 PE-10 管固定于皮肤以防止脱落,恢复期为 7 d,术后无运动障碍用于进一步的实验,按前述分组连续鞘内注射 5 d,注射量为 15 μL,均用 5 μL 的 ACSF 冲洗,注射在 5 min 内完成。5 d 后同法取脊髓组织用 ELISA 测定 TNF-α 和 IL-1β 的含量。

1.3 统计学分析

所有数据以均值 ± 标准表($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件对各组数据进行随机区组间方差分析(MANOVA),$P < 0.05$ 为差异有统计学意义,$P < 0.01$为差异有极显著性统计学意义。

2 结果

2.1 热辐射痛阈法测定模型大鼠的痛觉

实验组大鼠的 TWL 时间较对照组明显缩短($P<0.01$),说明前列腺注射 CFA 后导致了大鼠的痛觉过敏,成功建立了慢性前列腺炎疼痛的大鼠模型(表 1)。

表 1 实验组和对照组 TWL 时间比较($n=6,\bar{x}\pm s$,s)

组别	0 d	4 d	12 d	24 d
实验组	21.17±1.56	15.62±0.91*#	12.32±1.19*#	13.05±1.16*#
对照组	21.55±1.49	22.25±1.59	22.87±1.09	22.67±1.26

*:与对照组比较,$P<0.01$;#:与 0 d 比较,$P<0.01$

2.2 前列腺病理切片观察

CFA 注射的前列腺炎组的大鼠前列腺组织可见细胞变性,坏死脱落,皱缩,间质内有大量的淋巴细胞、单核细胞聚焦,部分淋巴细胞成簇状浸润;而注射生理盐水的对照组大鼠前列腺组织结构基本正常,无明显炎性细胞浸润,提示 CFA 注射可建立明显的前列腺炎模型(图 1)。

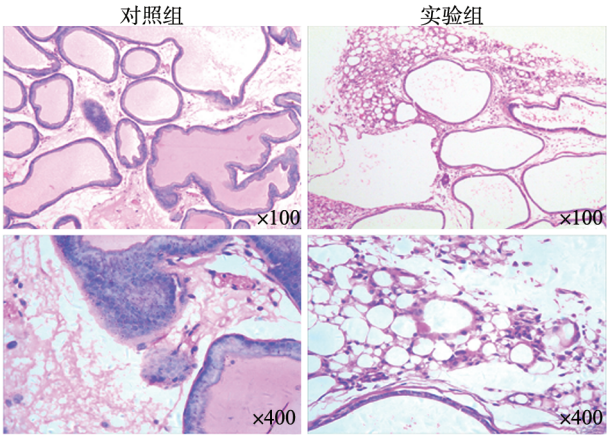


图 1 前列腺炎实验组大鼠组织学检查

2.3 $L_5\sim S_2$ 脊段 Notch3 和 IBA-1 mRNA 的表达

qRT-PCR 结果显示,疼痛模型大鼠 $L_5\sim S_2$ 脊髓小胶质细胞标志物 IBA-1 和 Notch3 mRNA 在 4 d、12 d 和 24 d 的表达均明显高于对照组($P<0.01$),峰值出现在 12 d,表明慢性炎症实验组 $L_5\sim S_2$ 脊髓中枢存在小胶质细胞活化和 Notch3 信号的激活(表 2、3)。

表 2 $L_5\sim S_2$ 脊段 Notch3 mRNA 相对表达量($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	0 d	4 d	12 d	24 d
实验组	0.334±0.041	0.786±0.031*#	0.912±0.038*#△	0.698±0.038*#△
对照组	0.332±0.042	0.292±0.036	0.373±0.031	0.362±0.039

*:与对照组比较,$P<0.01$;#:与 0 d 比较,$P<0.01$;△:与4 d 比较,$P<0.05$

表 3 $L_5\sim S_2$ 脊段 IBA-1 mRNA 相对表达量($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	0 d	4 d	12 d	24 d
实验组	0.415±0.037	0.741±0.036*#	0.912±0.028*#△	0.875±0.031*#△
对照组	0.397±0.023	0.412±0.0 41	0.431±0.040	0.421±0.039

*:与对照组比较,$P<0.01$;#:与 0 d 比较,$P<0.01$;△:与4 d 比较 $P<0.05$

2.4 $L_5\sim S_2$ 脊段 TNF-α、IL-1β 的分泌

ELISA 结果显示,实验组大鼠 $L_5\sim S_2$ 脊髓组织内炎症因子 TNF-α、IL-1β 含量在 4 d 时开始升高、12 d 时最高,24 d 下降,数值均明显高于对照组($P<0.01$)(表 4、5)。

表 4 $L_5\sim S_2$ 脊段 TNF-α的表达($n=6,\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	0 d	4 d	12 d	24 d
实验组	0.352±0.038	0.571±0.036*#	0.690±0.035*#△	0.673±0.032*#
对照组	0.347±0.042	0.349±0.033	0.355±0.034	0.339±0.028

*:与对照组比较,$P<0.01$;#:与 0 d 比较,$P<0.01$;△:与 4 d 比较,$P<0.05$

表 5 $L_5\sim S_2$ 脊段 IL-1β 的表达($n=6,\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	0 d	4 d	12 d	24 d
实验组	0.249±0.028	0.390±0.038*#	0.493±0.027*#△	0.459±0.026*#
对照组	0.261±0.029	0.273±0.029	0.250±0.028	0.261±0.018

*:与对照组比较,$P<0.01$;#:与 0 d 比较,$P<0.01$;△:与 4 d 比较,$P<0.05$

2.5 Notch3 和小胶质细胞抑制后炎症因子表达

鞘内置管后持续注射 Notch3 和小胶质细胞,采用 ELISA 检测到 NAC 组、minocycline 组大鼠 $L_5\sim S_2$ 脊髓组织内炎症因子 TNF-α、IL-1β 含量明显低于 ACSF 组($P<0.01$),见表 6。

表 6 抑制 Notch3 和小胶质细胞后 $L_5\sim S_2$ 脊段 IL-1β 和 TNF-α表达($n=6,\bar{x}\pm s$,ng/mL)

组别	IL-1β	TNF-α
ACSF 组	0.482±0.029	0.672±0.029
NAC 组	0.303±0.029*	0.472±0.037*
minocycline 组	0.393±0.034*	0.501±0.029*

*:与 ACSF 组比较,$P<0.01$

3 讨论

慢性前列腺炎(chronic prostatitis,CP)是泌尿科最常见的疾病,占门诊患者的 25%~35%,最新的流行病学数据显示,50 岁以下男性具有前列腺炎症状的比例可能高达 11.5%,其中慢性无菌性前列腺炎(Ⅲa 型)/慢性盆腔疼痛综合征(Ⅲb 型)则占临床前列腺炎患者的 90% 左右[5]。慢性前列腺炎疼痛的病因和发生机制仍不明确,长期的疼痛可引起患者严重的身心障碍,目前尚缺乏有效的治疗手段,其诊治已成为国内外泌尿学科的难题[6]。因此,对慢性前列腺炎疼痛发生机制的研究极其重要,相关理论的研究可以为该病的临床诊治带来新的治疗方法。

Shoskes 等[7]于 2009 年提出了著名的前列腺炎的 UPOINT 的疾病分类体系,为慢性前列腺炎的诊治提供了一个新的思路,并得到了广泛的认可。UPOINT 将慢性前列腺炎归结为 6 大基本“临床表型”:U 即

urinary, P 即 psychosocial, O 即 organ-specific, I 即 infection, N 即 neurologic /systemic, T 即 tenderness。这个分类系统显示,慢性前列腺炎疼痛常表现为不同程度且不易治愈的会阴部疼痛不适,并常伴有膀胱尿道功能障碍,是患者就诊的主要原因。但循证医学研究发现,虽然随着认识的深入,治疗方法有了很大程度的改进,但主要表现为疼痛和排尿症状的前列腺炎患者的生活质量并无明显改善[8]。因此前列腺炎疼痛病因可能不局限于前列腺本身的感染,而应存在中枢神经调控机制的异常[9]。慢性前列腺炎疼痛常呈现出两个明显的临床特点:①疼痛的泛化,疼痛不仅限于前列腺所在部分,而是分布在与膀胱尿道神经支配相关的 $L_5 \sim S_2$ 骶神经支配区,在没有原发病变的其他部位可出现自发疼痛,并存在着不同程度的膀胱和尿道肌肉功能障碍,表现出内脏牵涉痛的特点;②疼痛的持续,临床上可见有些前列腺炎疼痛在前列腺炎症消失后仍存在持续疼痛。所以各种临床现象提示:慢性前列腺炎疼痛极有可能是一种持续的内脏神经牵涉痛,其疼痛的发生与支配前列腺相应脊段的神经改变有关[10]。我们前期的研究中建立了稳定的前列腺疼痛大鼠模型,发现慢性前列腺炎疼痛中 $L_5 \sim S_2$ 中枢胶质细胞活化与中枢痛敏形成密切相关,与慢性前列腺炎疼痛内脏牵涉痛的发生密切相关[11-12]。

脊髓背角是机体痛觉调制或整合的重要中枢,研究显示疼痛调制不仅由神经元网络完成,星形胶质细胞和小胶质细胞活化也参与了许多疼痛调制[13],痛觉信息可通过多种炎症因子激活胶质细胞,而星形胶质细胞活化是慢性神经病理性疼痛产生与维持的关键因素[14]。小胶质细胞广泛分布在中枢神经系统,正常生理状态下,小胶质细胞被认为是中枢神经系统的“休眠”细胞,但其并不是静止的,当中枢神经系统受外伤、缺血和感染等伤害性刺激后迅即激活,产生一些痛觉调质或增痛物质,如神经营养因子(BNDF)、白介素(IL)、肿瘤坏死因子(TNF)等炎症介质,这些因子增加局部突触可塑性和突触效率,其高表达可引起神经细胞的痛敏,并参与神经损伤后伤害性感受器的再生,在动物神经损伤和疼痛模型中可观察到炎症因子在胶质细胞中的表达升高,通过鞘内注射转录因子及炎症因子拮抗剂等手段能减弱病理性疼痛大鼠的超敏现象[15-16]。除分泌炎症因子外,小胶质细胞与神经元间存在着双向信息交流,小胶质细胞能影响神经元活动,实验研究显示抑制小胶质细胞的活化可以减少痛觉超敏的发生,如坐骨神经炎性损伤模型大鼠,鞘内注射小胶质细胞活化的抑制剂 minocycline 可抑制低阈值的机械性异常疼痛[17]。研究显示,胶质细胞活化需要特定的受体介导下的信号通路激活,近年来 Notch 信号在胶质细胞活化中的介导作用引起了疼痛学的极大关注,已证实 Notch 信号通路的抑制可降低由脊神经损伤所致的神经病理性疼痛的发生[18]。

Notch 信号是一个在进化中高度保守的反映细胞间通讯的信号通路,调控细胞的分化和增殖,在胚胎发育和细胞命运中发挥决定性作用,哺乳动物神经系统中有 4 种 Notch 受体(Notch 1 ~4)和多种配体(Jagged 1、2 和 Delta 1、3、4),都是单次跨膜蛋白,Notch 及其配体的胞外段都含有多重的表皮生长因子重复区,可通过加糖基化进行修饰。Notch 受体同样含有几种区域使得受体在缺乏配体的情况下保持其灭活状态,当受体和配体结合后,γ-分泌酶复合体即可对 Notch 的跨膜段进行裂解,释放 Notch 胞内段 NICD 到细胞液中,而胞外段 NECD 将和配体一同经过内吞作用进入“信号发送细胞”,即所表达配体的细胞。配体同样可被 γ-分泌酶切割而发挥相应的信号转导作用。目前,Notch 因为可以激活炎症细胞产生炎症介质,在痛觉调制中的作用已引起了广泛关注。

Notch 信号通路可以通过兴奋或抑制神经元,从而参与中枢痛敏机制的形成,但其相关机理至今仍不清楚[19]。Woolf 等[20]发表经典慢性病理性痛机制:生理痛反应期系外周伤害性信息传入大脑皮质产生正常痛觉,在病理性痛早期,主要是受体和通道磷酸化,胞内信号转导通路被激活,是翻译后水平的变化,而在疼痛慢性期,主要是受体、通道和胞内信号转导通路发生长时程、持续性的变化,累及递质表达、突触连接方式、神经元结构和存活等多个环节,是核转录和翻译水平的变化。其中信号通路的激活,继而影响核转录和翻译水平的变化,被看作神经可塑性改变的重要环节。人体组织的 Notch 基因,不仅在胚胎期参与神经干细胞的增殖、分化以及神经元的学习和记忆;而且在成年哺乳动物神经损伤后表达会显著增高,参与胶质细胞激活和神经重塑过程,抑制 Notch 信号具有明显的镇痛的作用[21-22]。疼痛学最新的研究发现,Notch3 与神经性病理疼痛的关系密切,引起了高度的关注,Notch3 信号通路可参与成年动物的神经可塑性改变,脊髓背角 Notch3 活化水平高,神经元的兴奋性增高,而 Notch3 活化水平低,则神经元抑制[1]。相关实验结果还显示,该通路的激活可促进神经干细胞向胶质细胞的分化,参与了正常神经网络形成等过程[23]。在动物缺氧等损伤模型上的研究发现,Notch3 通路的活化还具有激活胶质细胞的功能,提示 Notch3 信号通路有可

能在成体神经系统损伤后的可塑性变化起重要作用，而且 Notch3 信号参与多种体内的炎性损伤反应，并与其他炎症通路信号之间形成交互网络[24-26]。本研究观察到了前列腺炎疼痛模型中存在小胶质细胞 Notch3 的高表达，并证实了通过抑制小胶质细胞和 Notch3 活化可以有效减少炎症因子的分泌，从而缓解慢性前列腺炎的神经炎性疼痛。

慢性前列腺炎疼痛作为一种常见的炎性内脏痛，发病率高且不易治疗，研究该疼痛的产生的神经免疫机制、外周机制以及中枢机制等之间联系以及相互作用途径非常有意义，可以为以后临床慢性前列腺炎疼痛新机制的研究、寻找药物治疗的新靶点寻找方向。本研究证实，慢性前列腺炎疼痛存在相应 $L_5 \sim S_2$ 脊段神经调控机制的异常，脊髓小胶质细胞活化在疼痛发生和维持中起了重要作用，而且小胶质细胞活化与 Notch3 信号激活有关，Notch3 在慢性前列腺炎疼痛中可能介导小胶质细胞激活，通过炎症因子分泌，参与伤害性信息传导和痛觉调制，在中枢痛敏形成中起着关键作用，除了我们发现的炎症因子分泌外，Notch3 信号还可能通过影响神经元兴奋性、胶质细胞的再生和激活，从而通过调控膜受体、离子通道、多种细胞因子和神经递质的表达以及突触可塑性的变化等途径发挥致痛作用[27]，这些机制还有待下一步的深入研究。

[参考文献]

[1] Rusanescu G, Mao J. Notch3 is necessary for neuronal differentiation and maturation in the adult spinal cord[J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(10): 2103 - 2116. doi: 10.1111/jcmm.12362.

[2] Nackley AG, Suplita RL, Hohmann AG. A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal for protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation[J]. Neuroscience, 2003, 117(3): 659 - 670. doi: 10.1016/s0306 - 4522(02)00870 - 9.

[3] Butler SH, Godefroy F, Besson JM, et al. A limited arthritic model for chronic pain studies in rat[J]. Pain, 1992, 48(10): 73 - 81. doi: 10.1016/0304 - 3959(92)90133 - v.

[4] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space[J]. Physiol Behav, 1976, 17: 1031 - 1036. doi: 10.1016/0031 - 9384(76)90029 - 9.

[5] Clemens JQ, Mullins C, Ackerman AL, et al. Urologic chronic pelvic pain syndrome: insights from the MAPP Research Network[J]. Nat Rev Urol, 2018, 16(3): 187 - 200. doi: 10.1038/s41585 - 018 - 0135 - 5.

[6] Giuseppe M, Florian WME, Magnus G, et al. Contemporary management of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. Eur Urol, 2016, 69(2): 286 - 297. doi: 10.1016/j.eururo.2015.08.061.

[7] Shoskes DA, Nickel JC, Dolinga R, et al. Clinical phenotyping of patients with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome and correlation with symptom severity[J]. Urology, 2009, 73(3): 538 - 542. doi: 10.1016/j.urology.2008.09.074.

[8] Doiron RC, Tripp DA, Tolls V, et al. The evolving clinical picture of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome (CP/CPPS): a look at 1310 patients over 16 years[J]. Can Urol Assoc J, 2018, 12(6): 196 - 202. doi: 10.5489/cuaj.4876.

[9] Park JS, Jin MH, Hong CH, et al. Neurologic mechanisms underlying voiding dysfunction due to prostatitis in a rat model of nonbacterial prostatic inflammation[J]. Int Neurourol J, 2018, 22(2): 90 - 98. doi: 10.5213/inj.1836124.062.

[10] Antolak SJ, Antolak CM. Chronic pelvic pain: neurogenic or non-neurogenic? Warm detection threshold testing supports a diagnosis of pudendal neuropathy[J]. Pain Physician, 2018, 21(2): E125 - E135.

[11] Zhang H, Liu L, Yang Z, et al. P2X7 receptor mediates activation of microglial cells in prostate of chemically irritated rats[J]. Int Braz J Urol, 2013, 39: 276 - 285. doi: 10.1590/S1677 - 5538.IBJU.2013.02.17.

[12] Zhang H, Liu L, Lu GS, et al. Chemical irritation of the prostate sensitizes P2X3 receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons[J]. Neurourol Urodyn, 2011(30): 612 - 618. doi: 10.1002/nau.21060.

[13] Robinson RR, Dietz AK, Maroof AM, et al. The role of glial-neuronal metabolic cooperation in modulating progression of multiple sclerosis and neuropathic pain[J]. Immunotherapy, 2019, 11(2): 129 - 147. doi: 10.2217/imt - 2018 - 0153.

[14] Morales-Soto W, Gulbransen BD. Enteric glia: a new player in abdominal pain[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2018, 7(2): 433 - 445. doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.11.005.

[15] Eto K, Kim SK, Takeda I, et al. The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies[J]. Neurosci Res, 2018, 126: 3 - 8. doi: 10.1016/j.neures.2017.08.009.

[16] Marcos JL, Galleguillos D, Pelissier T, et al. Role of the spinal TrkB-NMDA receptor link in the BDNF-induced long-lasting mechanical hyperalgesia in the rat: a behavioural study[J]. Eur J Pain, 2017, 21(10): 1688 - 1696. doi: 10.1002/ejp.1075.

[17] Chen G, Luo X, Qadri MY, et al. Sex-dependent glial signaling in pathological pain: distinct roles of spinal microglia and astrocytes[J]. Neurosci Bull, 2018, 34(1): 98 - 108. doi: 10.1007/s12264 - 017 - 0145 - y.

[18] Wu L, Li Y, Yu M, et al. Notch signaling regulates microglial activation and inflammatory reactions in a rat model of temporal lobe epilepsy[J]. Neurochem Res, 2018, 43(6): 1269 - 1282. doi: 10.1007/s11064 - 018 - 2544 - 5.

[19] Mizuguchi R, Kriks S, Cordes R, et al. Ascl1 and Gsh1/2 control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(6): 770 - 778. doi: 10.1038/nn1706.

[20] Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain[J]. Science, 2000, 288: 1765 - 1768. doi: 10.1126/science.288.5472.1765.

[21] Al-Massri KF, Ahmed LA, El-Abhar HS. Pregabalin and lacosamide ameliorate paclitaxel-induced peripheral neuropathy via inhibition of JAK/STAT signaling pathway and Notch-1 receptor[J]. Neurochem Int, 2018, 120: 164 - 171. doi: 10.1016/j.neuint.2018.08.007.

[22] Miller SR, Benito C, Mirsky R, et al. Neural crest Notch/Rbpj signaling regulates olfactory gliogenesis and neuronal migration[J]. Genesis, 2018, 56(6 - 7): e23215. doi: 10.1002/dvg.23215.

[23] Matsumoto A, Onoyama I, Sunabori T, et al. Fbxw7-dependent degradation of notch is required for control of "stemness" and neuronal-glial differentiation in neural stem cells[J]. J Biol Chem, 2011, 286(15): 13754 - 13764. doi: 10.1074/jbc.M110.194936.

doi:10.11659/jjssx.08E019001

·基础研究·

miR-138-5p 靶向 HIF-1α 影响人白血病 K562 细胞增殖和侵袭转移

郭 涛,纪冬梅,李艳平,卢 阳,弋 莉,王晓红 (朝阳市中心医院血液内科,辽宁 朝阳 122000)

[摘 要] **目的** 探索 miR-138-5p 与缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)对人白血病 K562 细胞增殖和侵袭转移的影响。**方法** 以体外培养的人白血病 K562 细胞为研究对象,将其分为 K562 组、miR-138 mimic 组、pc-HIF-1α 组和 mimic + pc-HIF-1α 组。荧光素酶报告实验确认 miR-138-5p 与 HIF-1α 的靶向关系;qRT-PCR 法检测 miR-138-5p 和 HIF-1α 的 mRNA 水平;Western blot 检测 HIF-1α 的蛋白水平;CCK-8 检测细胞存活率;Transwell 检测细胞侵袭能力;划痕实验检测细胞迁移能力;Western blot 检测增殖和上皮间质转化(EMT)相关蛋白表达水平。**结果** miR-138-5p 能靶向 HIF-1α,与 K562 组相比,miR-138 mimic 组 HIF-1α 的 mRNA 和蛋白水平均显著较低($P<0.01$),而 pc-HIF-1α 组 HIF-1α 的蛋白水平则显著较高($P<0.01$);同时,与 pc-HIF-1α 组相比,mimic + pc-HIF-1α 组 HIF-1α 的蛋白表达显著较低($P<0.01$)。与 K562 组相比,miR-138 mimic 组细胞增殖倍数、细胞迁移和侵袭能力均显著较低($P<0.01$),pc-HIF-1α 组则显著较高($P<0.01$);与 pc-HIF-1α 组相比,mimic + pc-HIF-1α 组细胞增殖倍数、细胞迁移和侵袭能力均显著较低($P<0.01$)。同时,mimic + pc-HIF-1α 能部分逆转 pc-HIF-1α 对肿瘤细胞增殖和 EMT 能力的上调作用($P<0.01$)。**结论** miR-138-5p可通过靶向 HIF-1α,进而降低人白血病 K652 细胞增殖和侵袭转移能力。

[关键词] 白血病;慢性粒细胞白血病;miR-138-5p;HIF-1α;增殖;上皮间质化

[中图分类号] R733.72 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-08-01

Effect of miR-138-5p targeting HIF-1α on proliferation and invasion and metastasis of human leukemia K562 cells

GUO Tao, JI Dong-mei, LI Yan-ping, LU Yang, YI Li, WANG Xiao-hong (Department of Hematology, Chaoyang Central Hospital, Chaoyang Liaoning 122000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of miR-138-5p and hypoxia-inducible factor-1-alpha (HIF-1α) on the proliferation, invasion and metastasis of human leukemia K562 cells. **Methods** K562 cells cultured in vitro were randomly divided into the K562 group, the miR-138 mimic group, the pc-HIF-1α group, and the mimic + pc-HIF-1α group. The targeted relationship of miR-138-5p and HIF-1α was affirmed by luciferase assay. The expression of miR-138-5p and mRNA levels of HIF-1α were measured by qRT-PCR. The protein levels of HIF-1α were detected by Western blot. Cell proliferation was tested by CCK-8. Cell invasion was detected by Transwell. Cell migration was tested by scratch assay. And Western blot was used to detect the expression levels of proliferative related proteins and epithelial mesenchymal transformation (EMT) related proteins. **Results** miR-138-5p could target HIF-1α. The mRNA and protein levels of HIF-1α in the miR-138 mimic group were lower than those in the K562 group ($P<0.01$). The protein levels of HIF-1α in the pc-HIF-1α group were higher than those in the K562 group ($P<0.01$). Compared with the pc-HIF-1α group, the protein levels of HIF-1α in the mimic + pc-HIF-1α group were significantly lower ($P<0.01$). Compared with the K562 group, the proliferation, migration and invasion of the cells in the miR-138 mimic group were significantly lower ($P<0.01$), while those in the pc-HIF-1α group were significantly higher ($P<0.01$). Compared with the pc-HIF-1α group, the proliferation, migration and invasion of the cells in the mimic + pc-HIF-1α group were lower ($P<0.01$). At the same time, mimic + pc-HIF-1α could partially reverse the up-regulation of pc-HIF-1α on proliferation and EMT ability of K562 cells ($P<0.01$). **Conclusion** miR-138-5p can reduce the proliferation and invasion and metastasis of human leukemia K652 cells by targeting HIF-1α.

Keywords: leukemia; chronic granulocytic leukemia; miR-138-5p; HIF-1α; proliferation; epithelial mesenchymal transformation

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(2015020372)

[24] Du M, Tan Y, Liu G, et al. Effects of the Notch signalling pathway on hyperoxia-induced immature brain damage in newborn mice[J]. Neurosci Lett, 2017, 653: 220 – 227. doi: 10.1016/j.neulet.2017.05.065.

[25] Rusanescu G, Mao J. Peripheral nerve injury induces adult brain neurogenesis and remodelling[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(2): 299 – 314. doi: 10.1111/jcmm.12965.

[26] Kavvadas P, Keuylian Z, Prakoura N, et al. Notch3 orchestrates epithelial and inflammatory responses to promote acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2018, 94(1): 126 – 138. doi: 10.1016/j.kint.2018.01.031.

[27] Mazzitelli M, Palazzo E, Maione S, et al. Group II metabotropic glutamate receptors: role in pain mechanisms and pain modulation[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 383. doi: 10.3389/fnmol.2018.00383.

(编辑:杨 颖)