doi:10.11659/jjssx.01E022083

·基础研究·

siRNA 下调 SCN9A 表达对慢性炎性痛模型大鼠疼痛的影响

姜晓阳[1],张 园[2],刘亚华[1],侯彦深[1] (1.新疆医科大学附属肿瘤医院麻醉与围术期医学中心,新疆 乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学附属肿瘤医院检验科,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘 要] **目的** 探讨 siRNA 靶向下调 SCN9A 表达对慢性炎性痛模型大鼠疼痛行为学的影响。**方法** 将 18 只雄性 SPF 级 SD 大鼠随机分成 3 组,每组 6 只。空白组不作任何处理,模型组、干预组于右后足皮下给予 0.1 mL 完全弗氏佐剂建立慢性炎性痛模型,模型组于蛛网膜下腔注射空白慢病毒载体,干预组于蛛网膜下腔注射 SCN9A siRNA 慢病毒载体(LV-SCN9A-RNAi)。于建模前及建模后 1 d、2 d、5 d、8 d、12 d 观察大鼠右后肢机械刺激缩足反射阈值(PMWT)和热刺激缩足反射潜伏期(PWTL)。于建模后第13 天处死大鼠,取 L_4 ~ L_5 背根神经节组织,采用 RT-PCR、Western blot 检测 SCN9A mRNA 及蛋白表达水平,同时 Western blot 检测 L_4 ~ L_5 脊髓 OX42、GFAP 蛋白表达水平。**结果** 各组大鼠建模前 PMWT、PWTL 比较差异均无统计学意义($P>0.05$),模型组、干预组建模后各时间点 PMWT、PWTL 均明显低/短于空白组($P<0.05$)。干预组建模后 2 d、5 d、8 d、12 d 的 PMWT、PWTL 明显高/长于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干预组 SCN9A mRNA 表达水平高于空白组,低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。干预组 SCN9A、GFAP、OX42 蛋白表达水平高于空白组,低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 蛛网膜下腔注射 LV-SCN9A-RNAi 可抑制大鼠背根神经节 SCN9A 表达,从而有效改善慢性炎性痛模型大鼠的疼痛及疼痛行为学。

[关键词] 慢性炎性痛;SCN9A;Nav1.7;机械刺激缩足反射阈值;热刺激缩足反射潜伏期;脊髓;背根神经节;疼痛行为学
[中图分类号] R363 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-01-22

Effect of down-regulation of SCN9A expression by siRNA on pain in rats with chronic inflammatory pain

JIANG Xiao-yang[1],ZHANG Yuan[2],LIU Ya-hua[1],HOU Yan-shen[1] (1.Center of Anesthesia and Perioperative Medicine,Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University,Urumqi Xinjiang 830011,China;2.Department of Laboratory Medicine,Cancer Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University,Urumqi Xinjiang 830011,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of siRNA targeting down-regulation of SCN9A expression on the pain behavior of rats with chronic inflammatory pain. **Methods** A total of 18 male SPF grade SD rats were randomly divided into three groups,each group with 6 rats. The blank group did not do any treatment,the model group and the intervention group were given 0.1 mL of complete Freund's adjuvant subcutaneously into the right hind foot to establish chronic inflammatory pain model,the model group was injected with a blank lentiviral vector into the subarachnoid space,and the intervention group was injected with the SCN9A siRNA lentiviral vector (LV-SCN9A-RNAi) into the subarachnoid space. The paw mechanical withdrawal threshold (PMWT) and paw withdrawal thermal latency (PWTL) of the right hind limb of the rats before modeling and 1 day,2 days,5 days,8 days and 12 days after modeling were observed. The rats were killed 13 days after modeling to obtain the tissues of L_4 to L_5 dorsal root ganglion. The SCN9A mRNA and protein expression levels were detected by RT-PCR and Western blot,and the protein expression levels of spinal marrow OX42 and GFAP were detected. **Results** There was no significant difference in the PMWT or PWTL before modeling among the three groups ($P>0.05$),the PMWT and PWTL in the model group and the intervention group at each time point after modeling were significantly lower/shorter than those in the blank group ($P<0.05$). The PMWT and PWTL 2 days,5 days,8 days,12 days after modeling of the intervention group were significantly higher/longer than those of the model group,with statistically significant differences ($P<0.05$). The expression level of SCN9A mRNA in the intervention group was higher than that in the blank group,and lower than that in the model group,with statistically significant differences ($P<0.05$). The protein expression levels of SCN9A,GFAP and OX42 in the intervention group were higher than those in the blank group,and lower than those in the model group,with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** Subarachnoid injection of LV-SCN9A-RNAi can inhibit the expression of SCN9A in rats dorsal root ganglion,thereby effectively improving pain and pain behavior in rats with chronic inflammatory pain.

Keywords: chronic inflammatory pain;SCN9A;Nav1.7;paw mechanical withdrawal threshold;paw withdrawal thermal latency;spinal marrow;dorsal root ganglia;pain behavior

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2017D01C372)
[通信作者] 侯彦深,E-mail:hermesprayer@163.com

慢性炎性痛广泛存在于各种急、慢性疾病中,是一种极其复杂的病理生理现象,严重影响患者生活质量。目前临床上以药物、神经破坏、神经阻滞等治疗为主,但存在药物耐受、副反应较多、需反复治疗等局限性,严重影响治疗效果及患者满意度[1-2],因此需寻找更安全有效、作用持久、副作用小的治疗方法。电压门控性钠通道 Nav1.7 特异性表达于脊髓背根神经节,具有缓慢失活和缓慢复活的特点,能对较小的阈下刺激去极化,产生神经冲动[3-4],临床认为这种效应很可能使 Nav1.7 成为神经元兴奋的第 1 张“多米诺骨牌”,从而传递疼痛信号。随着对疼痛机制的深入研究,已有研究发现,编码 Nav1.7 的基因 SCN9A 功能缺失性突变是导致痛觉完全消失的关键因子[5]。以往有关疼痛的基因治疗多针对急性疼痛及神经压迫疼痛进行研究,尚缺乏对慢性炎性痛的特异性研究。基于此,本研究以 SCN9A 为靶点,以慢病毒为载体,利用 RNA 干扰技术,探讨 SCN9A 对慢性炎性痛模型大鼠疼痛的影响,以期为疼痛基因靶向治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

18 只雄性 SPF 级 SD 大鼠(9 周龄,体质量 180 ~ 200 g),由新疆医科大学动物中心实验室提供,动物生产许可证号:SYXK(新)2018-0003,每笼 4 只,于温度(22 ±2)℃、湿度 40% ~60%、昼夜交替 12 h 环境中饲养。

1.2 主要仪器与试剂

仪器:热刺痛仪(PL-200)购自成都泰盟软件有限公司,机械痛测量仪(Electric Von Frey)购自上海玉研科学仪器有限公司,微量注射器(25 μL)购自上海安亭微量进样器厂,GYQ 型便携式氧气筒购自冀州市佳光医疗器械有限公司,-80 ℃冰箱购自赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,全波长酶标仪(1510)购自赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司,RT-PCR 检测仪(7500FAST)购自美国应用生物系统公司。

试剂:SCN9A siRNA 慢病毒载体(LV-SCN9A-RNAi)购自上海吉凯基因技术有限公司,七氟烷购自上海恒瑞医药有限公司,完全弗氏佐剂购自广州赛国生物科技有限责任公司,TRIzol 购自美国 Thermo Scientific,SYBRGreen PCR 试剂盒、cDNA 试剂盒购自美国 Biosystems,增强型 RIPA 裂解液购自天津博士德生物工程有限公司,辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 分组与建模

将 18 只大鼠随机分成 3 组,每组 6 只。其中空白组大鼠不作任何处理,模型组、干预组大鼠于右后足皮下给予 0.1 mL 完全弗氏佐剂建立慢性炎性痛模型,模型组建模后于蛛网膜下腔注射空白慢病毒载体,干预组建模后于蛛网膜下腔注射 LV-SCN9A-RNAi。

慢性炎性痛模型的建立:8% 七氟烷诱导约 1 min,麻醉起效后改用 4% 七氟烷维持麻醉。大鼠平放于桌面上,拉直后腿,75% 酒精消毒右后掌,于大鼠足底注射 0.1 mL 完全弗氏佐剂,拔出注射器后用无菌棉球按压注射位点。大鼠右后足肿胀,不能触及地面,表明慢性炎性痛模型建立成功。

大鼠鞘内置管:模型组和干预组大鼠腹腔注射水合氯醛,麻醉起效后取俯卧位,背部剪毛、消毒、铺巾。在 $L_3 \sim L_4$ 作一皮肤正中切口,切开皮下筋膜,紧贴 $L_3 \sim L_4$ 棘突钝性分离一侧背脊肌、筋膜和韧带,暴露 $L_3 \sim L_4$ 棘突间隙。用蚊式钳轻提 L_3 椎体棘突,以弯针轻轻挑破黄韧带及硬脊膜。经黄韧带破口置入 PE-10 导管。将导管牢固缝于韧带上,逐层缝合肌肉、筋膜。以硬膜外穿刺针在大鼠皮下穿一隧道,将导管的另一端引出于大鼠颈背部,用加热过的止血钳夹闭导管外口。缝合皮肤并消毒,单笼喂养。大鼠出现以下情况则排除:下肢出现跛行、瘫痪、行为异常等肢体运动障碍,局部感染,导管脱落等。

1.4 疼痛行为学测定

于建模前及建模后 1 d、2 d、5 d、8 d、12 d 测定大鼠右后肢机械刺激缩足反射阈值(paw mechanical withdrawal threshold,PMWT)和热刺激缩足反射潜伏期(paw withdrawal thermal latency,PWTL)。PMWT:用 Electric Von Frey 纤维丝对准大鼠足底中部垂直施加压力,记录大鼠不能耐受压力迅速撤回后足时的压力值(g),重复测量 3 次取均值。PWTL:大鼠置于热刺痛仪,光源强度为 5%,适应环境后将辐射光源集中在右后足中心,按下启动键,自动记录大鼠舔或者抬起右后足时的潜伏期(s),重复测量 3 次取均值。

1.5 RT-PCR 检测大鼠背根神经节组织 SCN9A mRNA表达

于建模后第 13 天处死大鼠,取 $L_4 \sim L_5$ 背根神经节组织,采用 TRIzol 提取总 RNA,Nanodrop 仪检测 RNA 浓度、纯度。采用 RT-PCR 检测 SCN9A mRNA 表达情况。参照逆转录试剂盒操作说明书反转录 RNA,得到模板单链 cDNA,调整浓度为 400 ng/μL,按照 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,反应条件为 95 ℃预变性 1 min,92 ℃变性 10 s,60 ℃退火 30 s,70 ℃延伸30 s,连续循环 40 次。2% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭处理 PCR 产物后检测扩增结果。以 β-actin 作为内参,根据目的 RNA 与 β-actin 的 *Ct* 值计算相对表达

量,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{\beta\text{-actin}}) - (Ct_{对照目的基因} - Ct_{对照\beta\text{-actin}})$。

1.6 Western blot 检测脊髓 GFAP、OX42 和背根神经节组织 SCN9A 蛋白表达

采用 Western blot 检测 $L_4 \sim L_5$ 脊髓 GFAP、OX42 和 $L_4 \sim L_5$ 背根神经节组织 SCN9A 蛋白表达水平。用眼科剪将组织剪成 0.1 ~ 0.2 g,置于 EP 管中,加入 1 mL RIPA 裂解液(80 μL RIPA + 10 μL 蛋白酶抑制剂 + 100 μL 磷酸酶抑制剂 + 10 μL PMSF)置于冰上,充分匀浆后 4 ℃裂解 30 min,4 ℃ 15 000 r/min 离心 10 ~ 15 min,取上清液,BCA 法测定蛋白浓度。将待测蛋白样本进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,80 V 进行浓缩胶电泳,进入分离胶电泳后将电压调整为 100 V,待条带全部跑开至分离层胶下缘后停止电泳,然后转移至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭 2 h,分别加入 GFAP(1∶1 000)、OX42(1∶2 000)、SCN9A(1∶500)一抗,4 ℃孵育过夜后,加入二抗[Nav1.7 的二抗为辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1∶5 000);β-actin 的二抗为辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(1∶5 000);GFAP 的二抗为辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1∶5 000)],温孵 1 h。底物化学发光法显影,置于全能型成像分析仪(Bio-Rad)检测蛋白条带,以 β-actin 为内参,Image J 软件分析图像灰度值,检测目的蛋白的相对表达量。

1.7 统计学方法

数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用 F 检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LV-SCN9A-RNAi 对慢性炎性痛大鼠 PMWT 的影响

各组大鼠建模前 PMWT 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组、干预组建模后 1 d、2 d、5 d、8 d、12 d 的 PMWT 均明显低于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组建模后 2 d、5 d、8 d、12 d 的 PMWT 明显高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 LV-SCN9A-RNAi 对慢性炎性痛大鼠 PWTL 的影响

各组大鼠建模前 PWTL 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组、干预组建模后 1 d、2 d、5 d、8 d、12 d 的 PWTL 均明显短于空白组,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组建模后 2 d、5 d、8 d、12 d 的 PWTL 明显长于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 慢性炎性痛大鼠建模前后 PMWT 变化($\bar{x} \pm s$,$n = 6$,g)

组别	建模前	建模后 1 d	建模后 2 d	建模后 5 d	建模后 8 d	建模后 12 d
空白组	43.53 ± 1.71	42.82 ± 1.69	41.73 ± 2.16	40.56 ± 2.46	41.63 ± 2.75	39.58 ± 2.81
模型组	42.82 ± 1.86	24.36 ± 2.16 *	23.83 ± 2.63 *	22.78 ± 2.73 *	21.85 ± 2.66 *	20.62 ± 2.74 *
干预组	42.25 ± 2.02	23.75 ± 2.47 *	26.95 ± 2.25 *#	30.65 ± 1.87 *#	30.84 ± 1.72 *#	31.26 ± 2.06 *#
F	0.707	155.214	98.875	84.041	100.331	82.746
P	0.509	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

*:与空白组相比,$P < 0.05$;#:与模型组相比,$P < 0.05$

表 2 慢性炎性痛大鼠建模前后 PWTL 变化($\bar{x} \pm s$,$n = 6$,s)

组别	建模前	建模后 1 d	建模后 2 d	建模后 5 d	建模后 8 d	建模后 12 d
空白组	12.78 ± 1.65	13.38 ± 1.85	12.76 ± 2.06	14.26 ± 2.25	13.52 ± 2.15	13.98 ± 2.21
模型组	13.52 ± 1.56	4.26 ± 0.64 *	4.82 ± 0.73 *	4.65 ± 0.68 *	4.82 ± 0.71 *	4.72 ± 0.74 *
干预组	12.55 ± 1.72	4.46 ± 0.66 *	7.63 ± 2.03 *#	10.08 ± 2.03 *#	11.85 ± 1.69 *#	12.02 ± 2.14 *#
F	0.570	114.428	32.793	43.327	48.066	42.815
P	0.577	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

*:与空白组相比,$P < 0.05$;#:与模型组相比,$P < 0.05$

2.3 LV-SCN9A-RNAi 对大鼠背根神经节组织 SCN9A mRNA 表达的影响

干预组 SCN9A mRNA 相对表达量为(4.57 ± 1.02),高于空白组的(1.02 ± 0.15),低于模型组的(13.46 ± 3.51),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

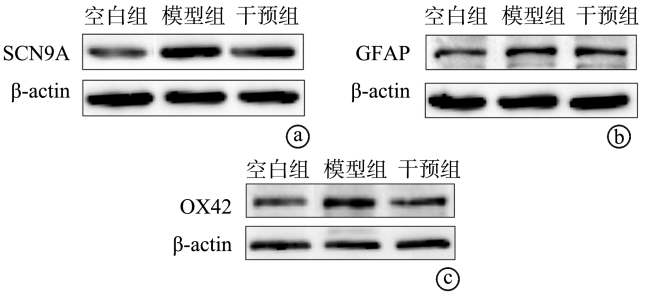
2.4 LV-SCN9A-RNAi 对大鼠背根神经节组织 SCN9A 及脊髓 GFAP、OX42 蛋白表达的影响

干预组 SCN9A、GFAP、OX42 蛋白表达水平高于空白组,低于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3、图 1。

表 3 大鼠 SCN9A、GFAP、OX42 蛋白表达($\bar{x} \pm s$,$n = 6$)

组别	SCN9A	GFAP	OX42
空白组	0.382 ± 0.125	0.316 ± 0.113	0.284 ± 0.095
模型组	0.946 ± 0.251 *	0.653 ± 0.184 *	0.563 ± 0.175 *
干预组	0.597 ± 0.182 *#	0.484 ± 0.212 *#	0.387 ± 0.132 *#
F	13.050	5.581	6.277
P	0.001	0.015	0.010

*:与空白组相比,$P < 0.05$;#:与模型组相比,$P < 0.05$



a:SCN9A 蛋白表达电泳图;b:GFAP 蛋白表达电泳图;c:OX42 蛋白表达电泳图

图1 蛋白表达电泳图

3 讨论

背根神经节是痛觉传入第一级神经元,在痛觉的产生机制中起着关键作用。研究发现,在神经系统受损后,初级感觉神经元的自发性活动、高兴奋性以及异常高频放电参与疼痛的发生,该过程由感觉神经元的电压门控性钠通道介导或者调控[6-7]。SCN9A 为电压门控性钠通道,该基因主要表达于背根神经节,且集中于与伤害性感受器有关的小直径 c 类神经纤维[8]。研究发现,在原发性红斑肢痛症、阵发性剧痛症等患者中,SCN9A 基因序列出现功能增强型突变[9-10],而单文琪等[10]认为人类先天无痛症电压门控性钠通道 Nav1.7 的 SCN9A 基因功能缺失性突变是痛觉完全消失的关键原因。基于以上研究推断,敲除或下调 SCN9A 基因表达可抑制疼痛产生,获得良好的镇痛效果。因此,本研究采用慢病毒介导的 RNA 抑制大鼠 SCN9A 基因表达,探讨疼痛基因治疗的安全性和可行性,为疼痛基因治疗提供一定的依据。

本研究发现,于大鼠右后足皮下给予 0.1 mL 完全弗氏佐剂建立慢性炎性痛模型后,大鼠足底出现红肿热痛、自我保护和缩足行为,右后足不能触及地面,且干预组和模型组的 PMWT、PWTL 明显低/短于空白组;进一步分析发现,干预组建模后 2 d、5 d、8 d、12 d 的 PMWT、PWTL 明显高/长于模型组,表明蛛网膜下腔注射 LV-SCN9A-RNAi 可有效减轻慢性炎性痛模型大鼠疼痛程度,改善疼痛行为学表现。有研究发现,Nav1.7 与机械痛和炎性痛密切相关[11-12]。在炎性痛觉过敏的发展过程中,伤害性神经元中 Nav1.7 的表达增加,而抑制 Nav1.7 可以减轻炎性痛和痛觉过敏[13],本研究结果与以上研究结果一致。本研究中干预组 SCN9A mRNA 及蛋白表达水平高于空白组,低于模型组,说明下调 SCN9A 的表达可缓解大鼠疼痛症状。

脊髓星形胶质细胞激活标记物 GFAP 及小胶质细胞激活标记物 OX42 表达水平与炎性痛有关,出现炎性痛时,脊髓星形胶质细胞、小胶质细胞被激活,诱导 GFAP、OX42 蛋白表达,促进胶质细胞释放神经递质,进而刺激神经元,导致疼痛信号放大;相反,抑制胶质细胞的激活可缓解疼痛[14-15]。脊髓胶质细胞激活后可释放兴奋性氨基酸、P 物质、IL-1β、TNF-α、诱导型一氧化氮合酶等多种前疼痛物质,同时神经元和胶质细胞之间具有正反馈调节作用,从而导致疼痛反应加重[16-17]。本研究中,干预组的 GFAP、OX42 蛋白表达水平高于空白组,低于模型组,表明下调 SCN9A 表达可抑制脊髓小胶质细胞、星形胶质细胞的激活,进而抑制慢性炎性痛的中枢敏化过程。

综上所述,蛛网膜下腔注射 LV-SCN9A-RNAi 可抑制大鼠背根神经节的 SCN9A 表达,从而有效减轻慢性炎性痛模型大鼠的疼痛程度,改善疼痛行为学。

[参考文献]

[1] 赵庆祥,吴小娟,高 勇,等. NLRP3 炎性小体与慢性疼痛[J]. 临床麻醉学杂志,2021,37(7):773-776. doi:10.12089/jca.2021.07.023.

[2] Muley MM, Krustev E, McDougall JJ. Preclinical assessment of inflammatory pain[J]. CNS Neurosci Ther, 2016, 22(2): 88-101. doi: 10.1111/cns.12486.

[3] Chen L, Wimalasena NK, Shim J, et al. Two independent mouse lines carrying the Nav1.7 I228M gain-of-function variant display dorsal root ganglion neuron hyperexcitability but a minimal pain phenotype[J]. Pain, 2021, 162(6): 1758-1770. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002171.

[4] Chang W, Berta T, Kim YH, et al. Expression and role of voltage-gated sodium channels in human dorsal root ganglion neurons with special focus on Nav1.7, species differences, and regulation by paclitaxel[J]. Neurosci Bull, 2018, 34(1): 4-12. doi: 10.1007/s12264-017-0132-3.

[5] Yang Y, Huang J, Mis MA, et al. Nav1.7-A1632G mutation from a family with inherited erythromelalgia: enhanced firing of dorsal root ganglia neurons evoked by thermal stimuli[J]. Neurosci, 2016, 36(28): 7511-7522. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0462-16.2016.

[6] North RY, Li Y, Ray P, et al. Electrophysiological and transcriptomic correlates of neuropathic pain in human dorsal root ganglion neurons[J]. Brain, 2019, 142(5): 1215-1226. doi: 10.1093/brain/awz063.

[7] Nagpal A, Clements N, Duszynski B, et al. The Effectiveness of dorsal root ganglion neurostimulation for the treatment of chronic pelvic pain and chronic neuropathic pain of the lower extremity: a comprehensive review of the published data[J]. Pain Med, 2021, 22(1): 49-59. doi: 10.1093/pm/pnab146.

[8] Baker MD, Nassar MA. Painful and painless mutations of SCN9A and SCN11A voltage-gated sodium channels[J]. Pflugers Arch, 2020, 472(7): 865-880. doi: 10.1007/s00424-020-02419-9.

[9] 李妍涵,金 颖,刘 怡,等. 经基因分析确诊的儿童原发性红斑肢痛症一例报告[J]. 天津医药,2019,47(5):529-532. doi:10.11958/20190183.

[10] 单文琪,张江涛. 揭秘人类先天无痛症的病理基础-电压门控钠通道 Nav1.7 在人类痛觉中的功能作用[J]. 中国疼痛医学杂志,2020,26(3):161-168. doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2020.03.001.

doi:10.11659/jjssx.02E022089

·基础研究·

具核梭杆菌激活 Wnt/β-catenin 信号通路促进结直肠癌细胞化疗耐药

魏攀凤[1],邹智勇[2],庄伊凡[3] (1.泉州医学高等专科学校基础医学部,福建 泉州 362000;2.厦门市思明区梧村街道社区卫生服务中心全科医学,福建 厦门 361000;3.厦门大学附属中山医院胃肠外科/厦门大学医学院胃肠肿瘤研究所,福建 厦门 361000)

[摘 要] **目的** 探讨具核梭杆菌(Fn)对人结直肠癌细胞株化疗耐药性的影响及相关的调控机制。**方法** 本研究建立 4 个实验组,常规培养 HCT-116 细胞设为对照组;采用 Fn 标准株与 HCT-116 细胞共培养建立细菌—细胞共培养组(BCC 组);分别在对照组和 BBC 组基础上通过 5-氟尿嘧啶(5-FU)干预,建立 5-FU 组和 BCC + 5-FU 组。MTT 试验检测各组细胞活力,细胞集落形成实验检测各组细胞增殖能力;流式细胞术检测各组细胞凋亡水平。Western blot 检测各组细胞化疗耐药相关蛋白 MDR1、P-gp 表达及 Wnt2/β-catenin 信号通路蛋白表达。**结果** 5-FU 干预能有效降低结直肠癌细胞活力,抑制集落形成,并促进细胞凋亡,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 Fn 共培养可以增强细胞活力,促进集落形成,减少细胞凋亡,差异均有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,BBC 组结直肠癌细胞中 MDR1、P-gp、Wnt2、β-catenin 蛋白表达均明显增高($P<0.05$);5-FU 干预处理后,BCC + 5-FU 组和 5-FU 组上述蛋白表达呈不同程度降低,但 BCC + 5-FU 组上述蛋白表达明显高于 5-FU 组($P<0.05$)。**结论** 与 Fn 共培养可以促进结直肠癌细胞增殖,减少凋亡,并诱导 5-FU 化疗耐药,其潜在分子机制可能与 Wnt/β-catenin 信号通路过度激活有关。

[关键词] 具核梭杆菌;结直肠癌;5-氟尿嘧啶;化疗;耐药;Wnt/β-catenin 信号通路

[中图分类号] R735.3 + 5 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-02-23

Fusobacterium nucleatum activates Wnt/β-catenin signaling pathway to promote chemoresistance of colorectal cancer cells

WEI Pan-feng[1], ZOU Zhi-yong[2], ZHUANG Yi-fan[3] (1. Department of Basic Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou Fujian 362000, China; 2. Department of General Practice, Community Health Service Center, Wucun Street, Siming District, Xiamen Fujian 361000, China; 3. Department of Gastrointestinal Surgery, Zhongshan Hospital of Xiamen University/Institute of Gastrointestinal Oncology, Medical College of Xiamen University, Xiamen Fujian 361000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of fusobacterium nucleatum (Fn) on the chemoresistance of human colorectal cancer cell lines and its related regulatory mechanisms. **Methods** Four experimental groups were established in this study, the conventionally cultured HCT-116 cells were set as the control group, the co-culture of Fn standard strain and HCT-116 cells was set as the bacteria-cell co-culture group (the BCC group), and the 5-FU group and the BCC + 5-FU group were established based on the intervention of the control group and the BCC group by 5-fluorouracil (5-FU), respectively. MTT assay was used to detect the cell viability in each group, colony formation assay was used to detect the cell proliferation in each group, and flow cytometry was used to detect the level of apoptosis in each group. Western blot was used to detect the expression of chemotherapy-resistant related proteins MDR1, P-gp and Wnt2/β-catenin signaling pathway proteins. **Results** The 5-FU intervention could effectively down-regulate the viability of colorectal cancer cells, inhibit the colony formation and promote the apoptosis, with statistically significant differences ($P<0.05$). Co-culture with Fn could enhance the cell viability, promote

[基金项目] 福建省泉州市科技局项目(2018Z174)

[通信作者] 庄伊凡,E-mail:624672993@qq.com

[11] Shields SD, Cheng X, Uçeyler N, et al. Sodium channel Na(v)1.7 is essential for lowering heat pain threshold after burn injury[J]. Neurosci, 2012, 32(32): 10819 - 10832. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0304 - 12.2012.

[12] Ahn HS, Black JA, Zhao P, et al. Nav1.7 is the predominant sodium channel in rodent olfactory sensory neurons[J]. Mol Pain, 2011, 7: 32. doi: 10.1186/1744 - 8069 - 7 - 32.

[13] Minett MS, Nassar MA, Clark AK, et al. Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons[J]. Nat Commun, 2012, 3: 791. doi: 10.1038/ncomms1795.

[14] 肖 凡,罗振中,卢 俊,等.右美托咪定预给药对切口痛大鼠脊髓胶质细胞的影响[J].实用医学杂志,2018,34(7):1111 - 1114. doi:10.3969/j.issn.1006 - 5725.2018.07.016.

[15] Xun S, Zheng R. Dexmedetomidine alleviates neuropathic pain by regulating JAK/STAT pathway in rats[J]. Cell Biochem, 2020, 121(3): 2277 - 2283. doi: 10.1002/jcb.29450.

[16] 李盼盼,王冬梅.脊髓小胶质细胞在糖尿病神经病理性疼痛中的研究进展[J].神经解剖学杂志,2019,35(1):99 - 103. doi:10.16557/j.cnki.1000 - 7547.2019.01.018.

[17] 李 立,姚文龙,张传汉.A1 型星形胶质细胞在神经病理性疼痛大鼠脊髓的表达特点[J].中国疼痛医学杂志,2020,26(8):579 - 583. doi:10.3969/j.issn.1006 - 9852.2020.08.004.

(编辑:龙小芬)