DOI:10.16016/j.2097-0927.202403103

氧化应激通过 TDP-43 激活 mtDNA-cGAS/STING 通路诱发神经元损伤和小鼠痛觉敏化

李 丽,黄鹏辉,崔 剑 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院疼痛科

[摘要] **目的** 探索 TAR DNA 结合蛋白 43(transactive response DNA binding protein 43,TDP-43)在氧化应激诱导的小鼠神经元(neuro-2a,N2a)细胞损伤及小鼠痛觉敏化中的作用及机制。**方法** ①为评估最佳诱导浓度,不同浓度的 H_2O_2 处理 N2a 细胞分为 4 组:对照组、200 μmol/L H_2O_2 组、400 μmol/L H_2O_2 组和 800 μmol/L H_2O_2 组。②为评估最佳诱导时间,400 μmol/L H_2O_2 处理 N2a 细胞分为 4 组:对照组、6 h H_2O_2 组、12 h H_2O_2 组和 24 h H_2O_2 组。③为验证线粒体 DNA(mitochondria DNA,mtDNA)释放途径,使用环孢素(cyclosporin,CsA)抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,mPTP)分为 3 组:对照组、24 h H_2O_2 组和 24 h H_2O_2+CsA 组。④为验证 TDP-43 介导的细胞损伤机制,siRNA 抑制 TDP-43 后分为 3 组:对照组、24 h H_2O_2 组、24 h H_2O_2+siTDP-43 组。⑤采用 CCK-8 检测细胞活性,EdU 检测细胞增殖,Western blot 检测 TDP-43、神经元标志物(neuronal nuclei,NeuN)、环状 GMP-AMP 合酶(cylic GMP-AMP synthase,cGAS)和干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon,STING)表达,qPCR 检测 mtDNA,免疫染色观察细胞内 TDP-43 表达变化,Calcein AM 染色评估 mPTP 开放。⑥为验证 TDP-43 在神经病理性疼痛(neuropathic pain,NP)中的作用,将 24 只 6~8 周健康 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠(体质量 25~30 g)使用随机数字表法分为 3 组:对照组、慢性压迫性损伤(chronic constriction injury,CCI)组、CCI+siTDP-43 组,术前 1 d 和术后 7、14、21 d 进行鞘内注射 siTDP-43;术前 1 d 和术后 1、3、5、7、14、21 d 通过 von Frey 纤维丝和热辐射法测定小鼠机械痛阈值和热痛阈值,免疫荧光检测术后 21 d 腰段(L5-L6)脊髓背角中 TDP-43 与 NeuN 的变化。**结果** 氧化应激刺激诱导 N2a 中 TDP-43 蛋白表达增加,刺激 mtDNA 通过 mPTP 释放,上调 cGAS、STING 的表达,影响 N2a 的细胞活性($P<0.05$);CsA 抑制 mPTP 通道的开放并减少 mtDNA 释放($P<0.05$);下调 TDP-43 的表达后可显著降低 mtDNA 的释放,抑制 cGAS 和 STING 的表达,并恢复 N2a 细胞的增殖能力($P<0.05$)。CCI 术后 5 d,小鼠机械痛阈值和热痛阈值出现明显下降并持续至 21 d($P<0.05$);CCI 小鼠术后 21 d 脊髓背角神经元中 TDP-43 表达增加($P<0.05$);鞘内注射 siRNA 抑制 TDP-43 后,可提高 CCI 小鼠的机械痛阈值和热痛阈值($P<0.05$)。**结论** 氧化应激诱导神经元细胞 TDP-43 蛋白增加,刺激 mtDNA 通过 mPTP 释放到细胞质,激活 cGAS/STING 通路,导致神经元损伤并加重 CCI 小鼠痛觉敏化。

[关键词] 神经病理性疼痛;TDP-43;cGAS/STING 通路;mtDNA;氧化应激
[中图法分类号] R322.85;R363.21;R441.1 [文献标志码] A

Oxidative stress triggers neuronal injury and mouse pain sensitization by up-regulating TDP-43 to activate mtDNA-cGAS/STING pathway

LI Li, HUANG Penghui, CUI Jian Department of Pain Medicine, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and possible mechanisms of transactive response DNA binding protein 43 (TDP-43) in mediating neuronal injury induced by oxidative stress in mouse neuro-2a

[基金项目] 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MS×0683)
[通信作者] 崔 剑,E-mail:cqjian211@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(N2a) cells and mouse pain sensitization. **Methods** ①To evaluate the optimal induction concentration, N2a cells were treated with different concentrations of H_2O_2, and the cells were divided into control group, 200, 400 and 800 μmol/L H_2O_2 groups. ②To assess the optimal induction duration, N2a cells were treated with 400 μmol/L H_2O_2, and the cells were divided into control group, and the cell groups treated for 6, 12 and 24 h, respectively. ③To validate the mitochondrial DNA (mtDNA) release pathway, cyclosporin A (CsA) was used to inhibit the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), and the cells were divided into control group, 24 h H_2O_2 group and 24 h H_2O_2+CsA group. ④To validate TDP-43-mediated cellular damage, the cells were divided into control group, 24 h H_2O_2 group and 24 h H_2O_2+siTDP-43 group. ⑤ Cell viability was assessed using CCK-8 assay, while cell proliferation was determined using EdU assay. Western blot analysis was employed to examine the expression levels of TDP-43, neuronal nuclei (NeuN), cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), and stimulator of interferon genes (STING). qPCR was utilized to measure the release of mtDNA. Immunostaining was conducted to observe intracellular expression of TDP-43, and Calcein AM staining was employed to evaluate mPTP opening status. ⑥To elucidate the role of TDP-43 in neuropathic pain (NP), 24 healthy SPF male C57BL/6J mice (6~8 weeks old, 25~30 g) were randomly divided into control group, chronic constriction injury (CCI) group, and CCI+siTDP-43 group. In 1 d before and 7, 14 and 21 d after surgery, intrathecal injections of siTDP-43 were administered. Mechanical and thermal pain thresholds of the mice were assessed using von Frey filaments and radiant heat, respectively, on 1 preoperatively and 1, 3, 5, 7, 14 and 21 d postoperatively. Immunofluorescence assay was conducted on 21 d postoperatively to examine the changes in TDP-43 and NeuN in the lumbar spinal dorsal horn (L5-L6). **Results** Oxidative stress induced a significant increase in TDP-43 protein level in N2a cells, prompted mtDNA release through mPTP, markedly up-regulated the expression of cGAS and STING, and consequently impacted the viability of N2a cells ($P<0.05$). CsA treatment inhibited mPTP channel opening and thus effectively blocked mtDNA release ($P<0.05$), down-regulated TDP-43 and thus significantly reduced mtDNA release, suppressed the expression of cGAS and STING, and finally restored the proliferation ability of N2a cells ($P<0.05$). The mechanical and thermal pain thresholds exhibited a significant decrease since 5 d after CCI, which then persisted until 21 d ($P<0.05$). The expression of TDP-43 in spinal cord dorsal horn neurons was increased in the mice in 21 d after CCI ($P<0.05$), and intrathecal injection of siRNA inhibited TDP-43 expression and effectively increased the mechanical and thermal pain thresholds in the CCI mice ($P<0.05$). **Conclusion** Oxidative stress induces an up-regulation in TDP-43 protein in neurons, which stimulates the release of mtDNA into the cytoplasm through mPTP, and subsequently activates the cGAS/STING pathway, and finally, results in neuronal injury and pain sensitization in CCI mice.

[**Key words**] neuropathic pain; TDP-43; cGAS/STING pathway; mtDNA; oxidative stress

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSx0683). Corresponding author: CUI Jian, E-mail: cqjian211@163.com

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是临床最常见的慢性疼痛性疾病,痛觉敏化是其典型特征,因其机制不清,迁延难治,严重影响患者的生活质量[1]。越来越多的数据显示,氧化应激引起的神经元损伤与NP中的痛觉敏化密切相关。FINNERUP等[2]研究指出,氧化应激可以引起神经元兴奋性增加、突触重塑、伤害性感受器激活并促进NP的发生、发展。在慢性疼痛动物模型中,通过阻断活性氧(reactive oxygen species, ROS)的增加和增强抗氧化酶的表达,可以减少痛觉过敏[3]。目前,氧化应激促进神经元损伤的具体分子机制尚不完全清楚,因此,对其进一步深入探究可以为更好地防治NP提供新的思路。

线粒体是细胞内过量ROS主要的损伤靶点。线粒体广泛分布在神经元网络中,对于维持神经元健康至关重要[4]。线粒体自噬紊乱、线粒体动力学异常等可导致神经元损伤,进而促进NP的形成[5-6]。此外,线粒体应激后,线粒体DNA(mitochondria DNA, mtDNA)释放至细胞质,结合并激活环状GMP-AMP合酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)/干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, STING)通路,诱

发固有免疫反应,从而导致自身免疫性疾病、肺损伤、肾损伤的发生[7-8]。cGAS 是一种细胞质内的 DNA 感受器,可识别并结合细胞质内的 mtDNA,促进 cGMP 的生成,随后 cGMP 作为第二信使激活下游 STING 表达上调[9]。研究发现,褪黑素(氧自由基清除剂),通过抑制神经元 mtDNA 的释放,下调 cGAS/STING 的表达,最终缓解亨廷顿氏病小鼠衰老和神经退行病变[10]。然而,在氧化损伤的神经元中介导 mtDNA-cGAS/STING 通路激活的上游分子尚不明确。

TAR DNA 结合蛋白 43(transactive response DNA binding protein 43, TDP-43)是一种在细胞核及细胞质广泛表达的 RNA/DNA 结合蛋白,参与 RNA 的代谢、转录调控和剪接等生物学过程。TDP-43 的正常生理活动对保持神经元结构和功能的完整性至关重要;相反,TDP-43 的病理性蓄积会诱发 mtDNA 释放,激活 cGAS/STING 通路,影响神经元的结构和功能[11-12]。本研究在体外研究中通过小干扰 RNA 下调 TDP-43 表达、环孢素(cyclosporin A, CsA)抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)开放等方法探讨 TDP-43 介导的 mtDNA-cGAS/STING 通路在神经元氧化应激损伤中的作用机制,在体内研究通过鞘内注射 siRNA 进一步研究 TDP-43 对慢性压迫性损伤(chronic construction injury, CCI)小鼠模型中痛觉敏化的影响,以验证 TDP-43 是否在氧化应激导致的神经元损伤及 NP 痛觉敏化形成中发挥关键作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验小鼠购自(重庆莱彼特生物科技有限公司)。小鼠神经元细胞(neuro-2a, N2a)(武汉普诺赛科技公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 EdU-488 细胞增殖检测试剂盒(上海碧云天生物公司,# P0010S、C0071S);3%H_2O_2(武汉博士德生物公司,#AR1108);CCK-8 试剂盒(北京索莱宝生物公司,#BS350B);线粒体通道染色试剂盒(美国赛默飞公司,#mp35103);TDP-43 和 NeuN 抗体(英国 Abcam 公司,#ab109535、ab109535);cGAS 和 STING 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,#31659、13647);DNA 提取试剂盒(北京天根生化有限公司,#DP304);qPCR miMix(上海翌圣生物公司,#QP001);引物(上海生工生物公司);小干扰 RNA(吉玛基因生物公司);TDP-43 干扰序列:siTDP-43 靶序列:正义:GCGAUGGUGUGACUGUAAATT;反义:UUUACAGUCACACCAUCGCTT;Lipofectamine 3000 试剂(美国 invitrogen 公司,#L3000001);CsA(美国 MCE 公司,#HY-B0579)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与处理 N2a 细胞培养在含 10% FBS 及 1%双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 培养基中。不同浓度的 H_2O_2 处理 N2a 细胞分为 4 组:对照组、200 μmol/L H_2O_2 组、400 μmol/L H_2O_2 组和 800 μmol/L H_2O_2 组。400 μmol/L H_2O_2 处理 N2a 细胞不同时间分为 4 组($n=3$):对照组、6 h H_2O_2 组、12 h H_2O_2 组和 24 h H_2O_2 组。CsA 抑制 mPTP 分为 3 组($n=3$):对照组、24 h H_2O_2 组和 24 h H_2O_2+CsA 组。siRNA 敲低 TDP-43 后实验为 3 组($n=3$):对照组、24 h H_2O_2 组和 24 h H_2O_2+siTDP-43 组。严格按照说明书进行细胞转染,转染 48 h 后,400 μmol/L H_2O_2 继续孵育 24 h 后进行后续检测。

1.2.2 CCK-8 细胞活力检测 N2a 细胞以 5×10^4/mL 接种在 96 孔板中,每组设置 6 个复孔。待细胞贴壁后,予以处理。将 N2a 细胞与 10 μL CCK-8 溶液在细胞培养箱内孵育 1 h。酶标仪 450 nm 处测定光密度值。

1.2.3 EdU 细胞增殖检测 N2a 细胞以 20×10^4/mL 密度接种在 24 孔板内,24 h 后按上述分组予以处理,按说明书步骤进行染色。图像用荧光显微镜观察拍照,使用 Image J 软件分析荧光强度。

1.2.4 Western blot 检测 收集处理后的 N2a 细胞,制备总蛋白样品,使用 BCA 法测定蛋白浓度,30 μg 蛋白进行 SDS-PAG 凝胶电泳,恒流转膜(200 mA, 80 min),5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1.5 h。抗体使用浓度如下:NeuN(1∶2 000)、TDP-43(1∶5 000)、cGAS(1∶1 000)、STING(1∶1 000)、β-actin(1∶5 000)、β-tubulin(1∶5 000),4 ℃摇床孵育过夜。TBST 洗膜后室温摇床孵育二抗(1∶10 000)2 h。TBST 洗膜后进行 ECL 化学发光显影,凝胶成像仪曝光。Image J 软件分析灰度值,以目的蛋白与内参的灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。

1.2.5 细胞质 mtDNA 定量 如前所述[13],收集处理结束的 N2a 细胞并均匀分成 2 等份。其中一份重悬于 200 μL PBS 中,用 DNA 提取试剂盒提取为总 DNA,作为后续实验的归一化对照。另一部分重悬于含有 150 mM NaCl、50 mM HEPES(pH 7.4)和 25 mg/mL digitalin 的缓冲液中。4 ℃摇床孵育 10 min,4 ℃,2 300×*g* 离心 10 min。将上清液转移到新的 EP 管中,在 4 ℃ 980×*g* 条件下重复离心 3 次,在离心步骤之间将上清液转移到新的 EP 管中。最后,17 000×*g* 离心 10 min,得到没有细胞核、线粒体和内质网污染的细胞质部分。使用 DNA 提取试剂盒提取该部位 DNA 作为

细胞质 DNA。将提取的 DNA 使用 NanoDrop 2000 微量分光光度计测定浓度。使用核 DNA（Tert）和 mtDNA（mt-ND1，mt-CO1）特异性引物对总 mtDNA 和细胞质 mtDNA 进行 qPCR 定量。按照说明书,将 qPCR Mix 试剂、DNA、引物和 DEPC 水混合,设定程序后进行 qPCR 检测。mtDNA 检测引物序列见表 1。

表 1 mtDNA qPCR 引物序列(5′→3′)

基因	上游引物	下游引物
Tert	CCGTGGTTGGATGAGTTCCA	CATGCTCCCCGTCTGCTTAT
mt-ND1	TCTGTTCTGATTCTTTGGGCA	CTACTGTGAATATGTGGTGGG
mt-CO1	TCTGTTCTGATTCTTTGGGCAC	TACTGTGAATATGTGGTGGGC

1.2.6 线粒体通透性转换孔（mPTP）染色 N2a 细胞以 30×10^4/mL 密度均匀地接种在共聚焦细胞培养皿上,待细胞贴壁后按上述分组予以处理,结束后用含有 1.0 mM 钙黄绿素、1.0 M CoCl2、200 μmol/L Mito Tracker 和 1.0 mM Hoechst 33342 的染料溶液与细胞混合在 37 ℃ 5%CO_2 培养箱中避光孵育 15 min。钙黄绿素的荧光强度代表 mPTP 的开放程度。使用共聚焦显微镜用以下激发/发射光拍照:494/517 nm（钙黄绿素),579/599 nm（Mito Tracker Red）和 350/461 nm（Hoechst 33342)。采用 Image J 软件定量分析钙黄绿素荧光强度。

1.2.7 细胞免疫荧光 N2a 细胞以 25×10^4/mL 密度均匀地接种在共聚焦细胞培养皿上,处理结束后用 4%多聚甲醛固定 15min;0.3% Triton X-100 通透 10 min;10%山羊血清室温封闭 2 h;TDP-43(1∶300)、NeuN(1∶300)4 ℃ 孵育过夜。PBS 洗 3 次后,与 CoraLite594 偶联的山羊抗兔（1∶500）和 CoraLite488 偶联的山羊抗鼠（1∶500）室温孵育 2 h。抗荧光淬灭片剂封闭液（含 DAPI)在室温下细胞核染色 10 min。使用激光共聚焦扫描显微镜拍摄图片。Image J 软件分析荧光强度。

1.2.8 实验动物、分组方案、CCI 模型制备与鞘内注射 采用 6~8 周体质量 25~30 g,SPF 级,健康雄性 C57BL/6J 小鼠进行实验。在陆军军医大学西南医院专业动物房内进行饲养。所有动物实验经过陆军军医大学动物伦理会批准(批号:AMUWEC20232187)。将 24 只小鼠按随机数字表法分为 3 组,每组 8 只:对照组、CCI 组和 CCI+siTDP-43 组。CCI+siTDP-43 组在 CCI 术前 1 d 和术后 7、14、21 d 鞘内注射 siTDP-43。最后一次鞘内注射 2 h 后,进行行为学检测,结束后进行灌注固定取材。

制备 CCI 小鼠模型步骤如下:2%异氟醚麻醉动物,剃除左后腿毛发,消毒皮肤。在股骨中点以下 3~4 mm 处,切开 1 cm 手术切口,暴露左后肢坐骨神经,4-0 羊肠线以 1 mm 间隔在左侧坐骨神经上结扎 4 个节段,消毒和缝合。手术后,监测伤口愈合和下肢活动。

鞘内注射步骤按既往方法进行[14]。麻醉小鼠后,剃掉下背部区域(L4-L6)周围的毛发并消毒。将 siRNA 溶液（10 μL）吸入胰岛素注射器中。将针垂直插入 L5 和 L6 之间的椎间孔,直至观察到鼠尾或后腿抽动,随后立即注射溶液。

1.2.9 行为学检测 统一在上午 9:00-11:00 时间段测试,动物在测试环境中适应 30 min 以减少应激反应。机械性缩足反射阈值测定:使用 von Frey 纤维丝刺激小鼠左侧足底,并采用 up-down 法计算 50%机械缩足反射阈值[15]。热缩足反射阈值测定:采用热平板实验检测热缩足反射阈值[16]。

1.2.10 免疫荧光染色 行为学检测结束后,每组按照随机数字表法选取 6 只小鼠灌注取材。5%异氟烷麻醉小鼠后,使用 50 mL 生理盐水灌注,随后用预冷的 4%多聚甲醛固定。采用吹出法取出脊髓,30%蔗糖脱水。小鼠 L5-L6 节段做脊髓冰冻切片(厚度 15 μm)进行 TDP-43 和 NeuN 免疫荧光染色:PBS 清洗;10%山羊血清室温封闭 1 h;单克隆兔来源抗体 TDP-43(1∶250)和单克隆鼠来源抗体 NeuN(1∶250),4 ℃孵育过夜。PBS 清洗后,与 CoraLite594 偶联的山羊抗兔(1∶500)和 CoraLite488 偶联的山羊抗鼠（1∶500）室温孵育 2 h。PBS 充分清洗后,用抗荧光淬灭片剂封闭液（含 DAPI）对切片封片,采集图片,Image J 分析平均荧光强度。

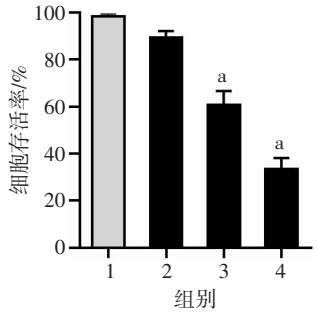
1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间的比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,数据不符合正态性检验时采用非参数检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 400 μmol/L H_2O_2 抑制 N2a 细胞活性

采用 CCK-8 检测不同浓度的 H_2O_2 处理 24 h 后 N2a 细胞活力的变化。结果显示,与对照组相比,400 μmol/L 和 800 μmol/L 能明显抑制 N2a 细胞活力($P<0.001$,图 1),其中 400 μmol/L 刺激后细胞存活率约 60%,而 800 μmol/L 处理后细胞存活率<50%,按最低有效浓度原则后续实验中选择 400 μmol/L H_2O_2 建立氧化应激神经元损伤模型。



1:对照组;2:200 μmol/L H_2O_2 组;3:400 μmol/L H_2O_2 组;4:800 μmol/L H_2O_2 组

a:$P<0.001$,与对照组比较

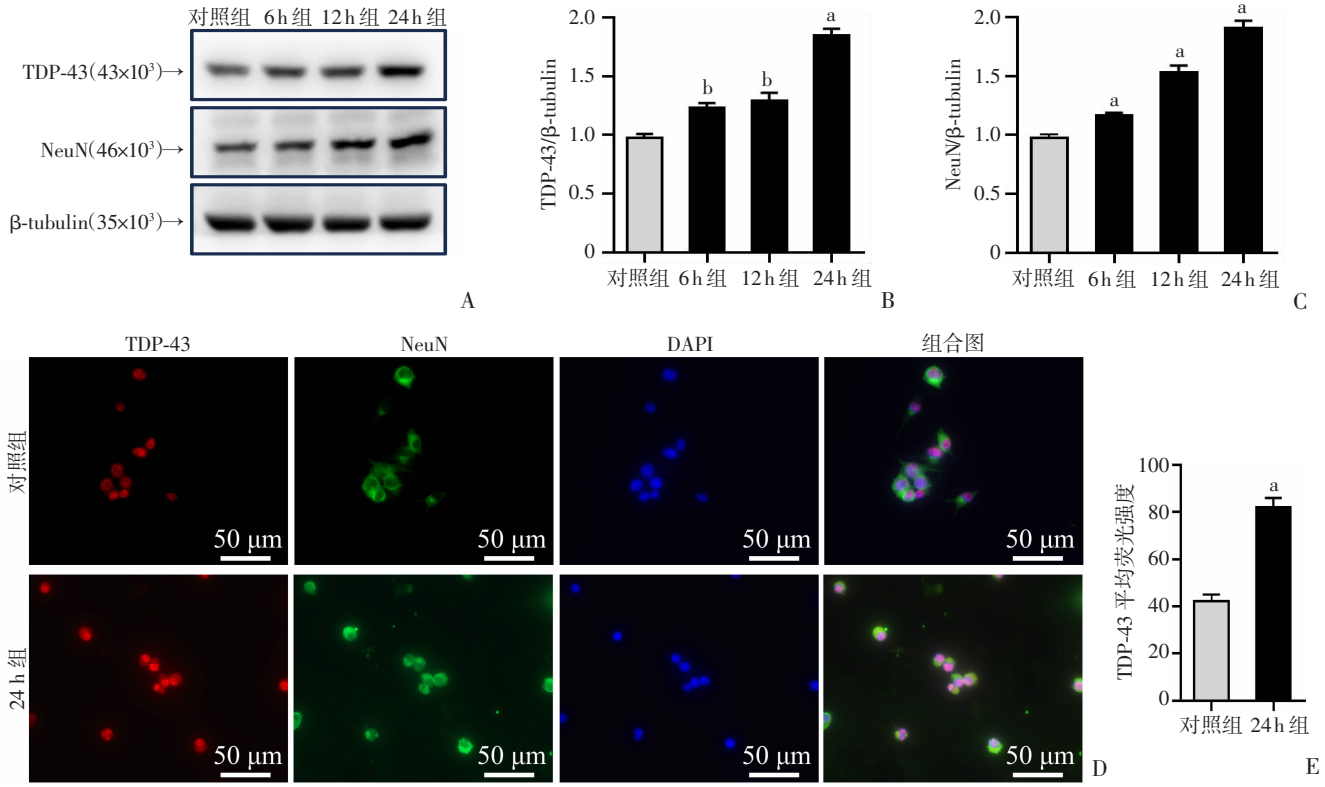
图 1 不同浓度 H_2O_2 对 N2a 细胞活力的影响($n=3$,$\bar{x}\pm s$)

2.2 氧化应激上调 TDP-43、cGAS、STING 表达并刺激 mtDNA 释放增加

为了探究氧化应激诱导神经元损伤的机制,400 μmol/L H_2O_2 处理 N2a 细胞 6、12、24 h 后,使用免疫荧光和蛋白印迹检测 TDP-43、NeuN、cGAS 和 STING 的表达变化。结果显示,与对照组相比,刺激 24 h 后,神经元激活的标志蛋白 NeuN 及 TDP-43 蛋白表达均明显增加($P<0.001$,图 2);炎症蛋白 cGAS 和 STING 的表达均显著上调($P<0.001$,图 3A~C)。使用 qPCR 检测 400 μmol/L H_2O_2 分别处理 6、12、24 h 后胞质内 mtDNA 的变化。结果显示,与对照组相比,24 h 组 mtDNA 含量增加明显($P<0.001$,图 3D、E)。因此,后续采用 400 μmol/L H_2O_2 刺激 24 h 验证 TDP-43 对 mtDNA-cGAS/STING 通路的调控。

2.3 CsA 抑制 mPTP 的开放后 mtDNA 释放减少

为探究 mtDNA 释放的机制,使用 12.5 μmol/L CsA 提前处理 2 h 后,随后使用 400 μmol/L H_2O_2 作用 N2a 细胞 24 h。通过钙黄绿素染色明确 mPTP 通道的开放情况[11]。结果显示,与对照组相比,400 μmol/L H_2O_2 刺激 N2a 细胞后,主要位于细胞质中的钙黄绿素明显降低,表明氧化应激诱导的神经元细胞 mPTP 通道开放增加($P<0.001$,图 4A、B)。CsA 抑制后,钙黄绿素则明显上升($P<0.001$,图 4A、B),并显著降低细胞质 mtDNA 的浓度($P<0.001$,图 4C、D)。进一步提示 mtDNA 通过 mPTP 通道释放。

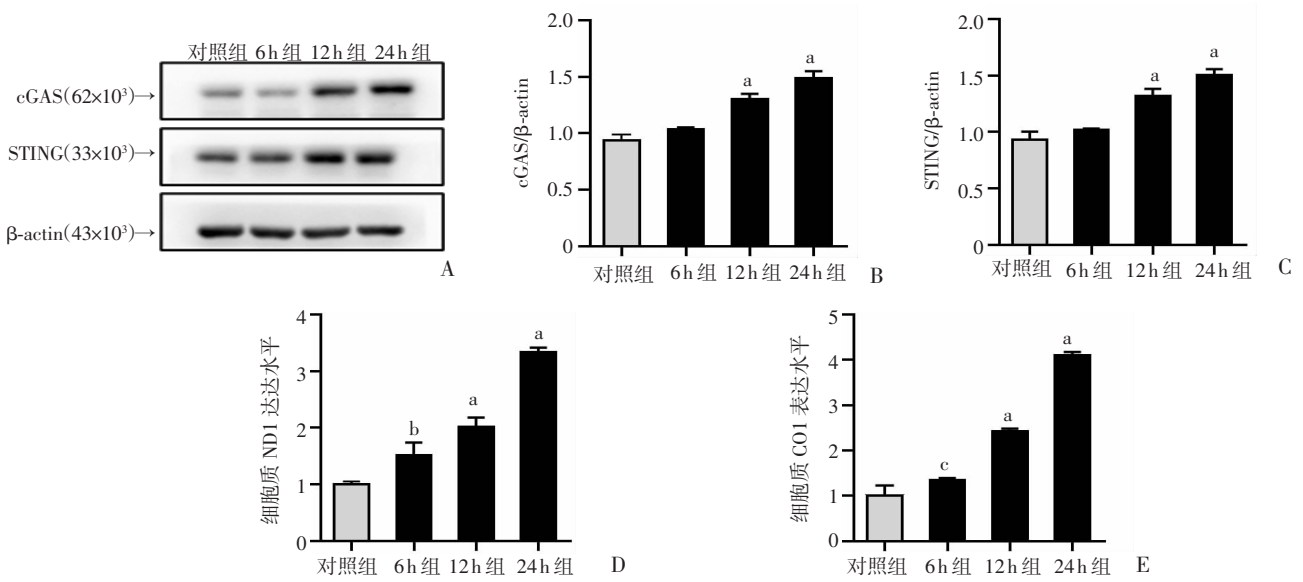


A:N2a 细胞中 TDP-43 与 NeuN 蛋白表达变化;B:TDP-43 蛋白半定量分析;C:NeuN 蛋白半定量分析;D:N2a 细胞中 TDP-43(红色)、NeuN(绿色)和 DAPI(蓝色)的表达变化;E:TDP-43 蛋白荧光强度半定量分析 a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 2 氧化应激刺激 N2a 细胞 TDP-43 与 NeuN 蛋白表达的变化

2.4　下调 TDP-43 抑制 mtDNA-cGAS/STING 通路

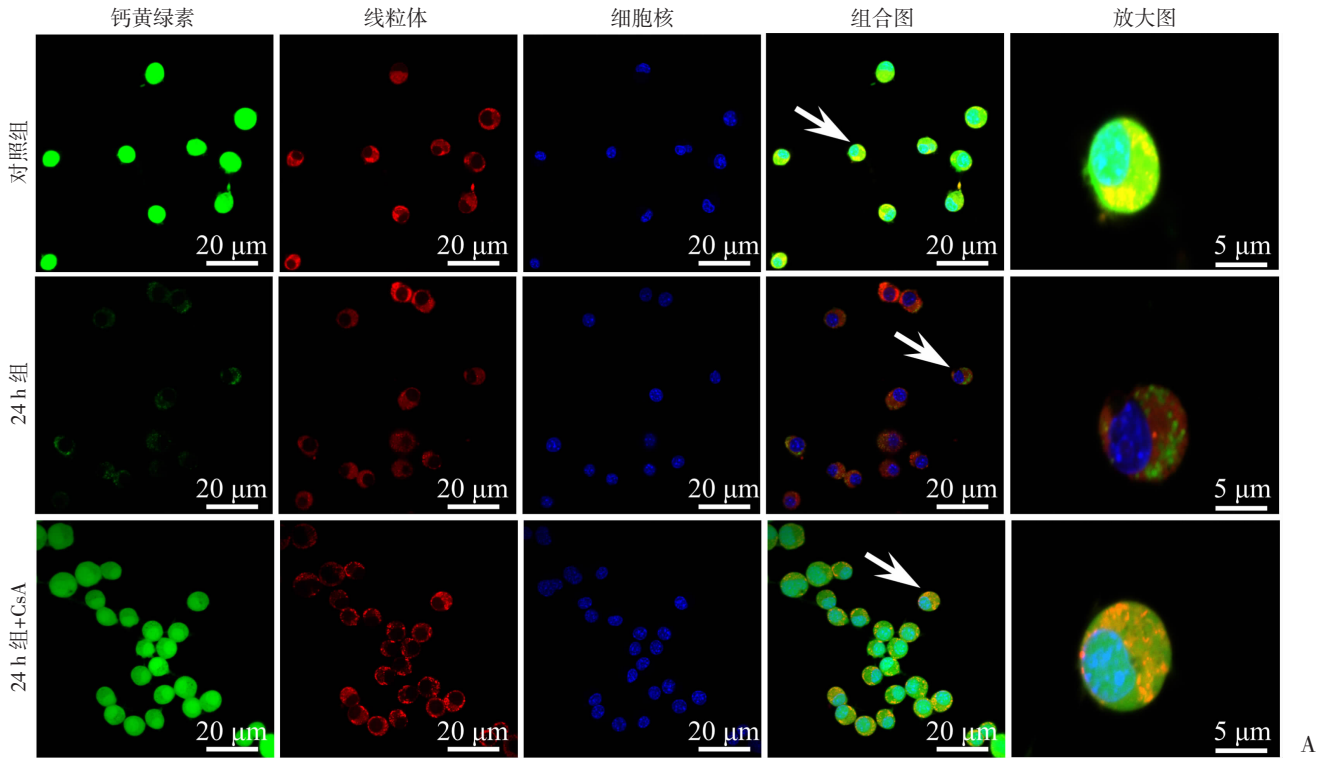
为了研究在神经元氧化应激损伤中 TDP-43 对 mtDNA-cGAS/STING 信号通路的影响。使用 siRNA 转染技术下调 N2a 细胞中 TDP-43 的表达后,随后使用 400 μmol/L H_2O_2 刺激 N2a 细胞 24 h。使用 qPCR 检测 mtDNA 的变化,蛋白印迹检测 cGAS、STING 的表达,EdU 染色显示细胞增殖的改变。结果显示,下调 TDP-43 后,显著减少 mtDNA 的释放($P<0.001$,图 5A、B),抑制 cGAS 和 STING 的表达($P<0.001$,图 5C~F),同时,神经元细胞的增殖能力有明显提升($P<0.001$,图 5G、H)。



a: $P<0.001$,b:$P<0.01$,c: $P<0.05$,与对照组比较

A:N2a 细胞中 cGAS 与 STING 蛋白表达变化;B:cGAS 蛋白半定量分析;C:STING 蛋白半定量分析;D:N2a 细胞中细胞质 mtDNA(ND1)的变化;E:N2a 细胞中细胞质 mtDNA(CO1)的变化

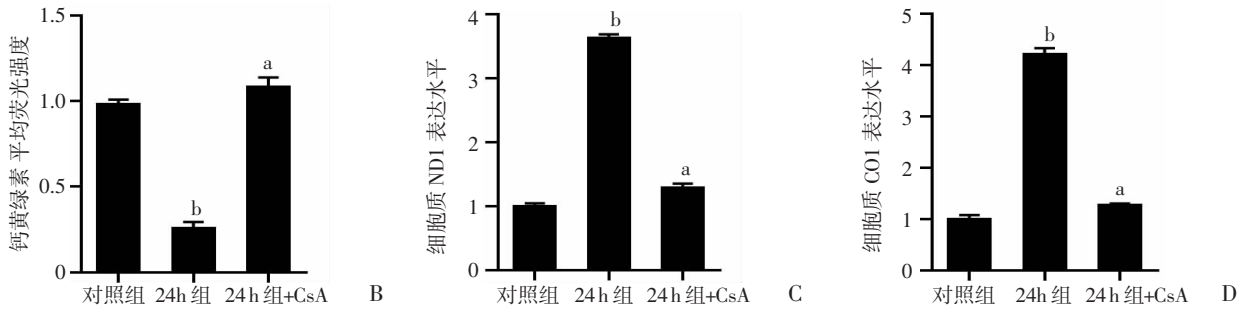
图 3　氧化应激刺激 N2a 细胞 cGAS、STING 蛋白和细胞质 mtDNA 的变化



A:N2a 细胞 mPTP 开放情况　放大图:示白色箭头处细胞

图 4　CsA 抑制 mPTP 的开放后 mtDNA 释放减少

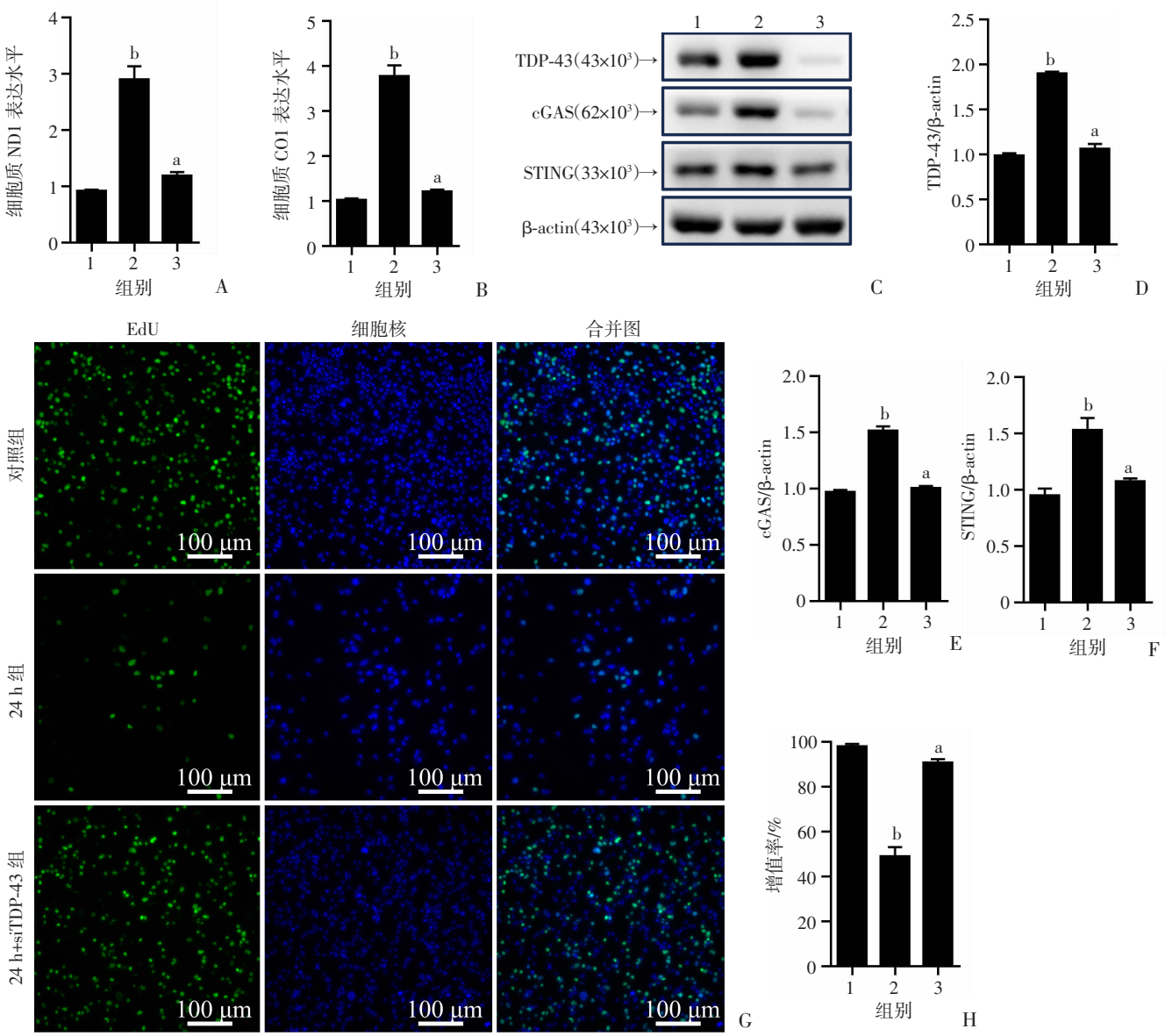
(图 4B~D 续下页)



a: $P<0.001$, 与 24 h 组比较;b: $P<0.001$,与对照组比较

B:钙黄绿素平均荧光强度半定量分析;C:N2a 细胞中细胞质 mtDNA(ND1)的变化;D:N2a 细胞中细胞质 mtDNA(CO1)的变化

续图 4 CsA 抑制 mPTP 的开放后 mtDNA 释放减少



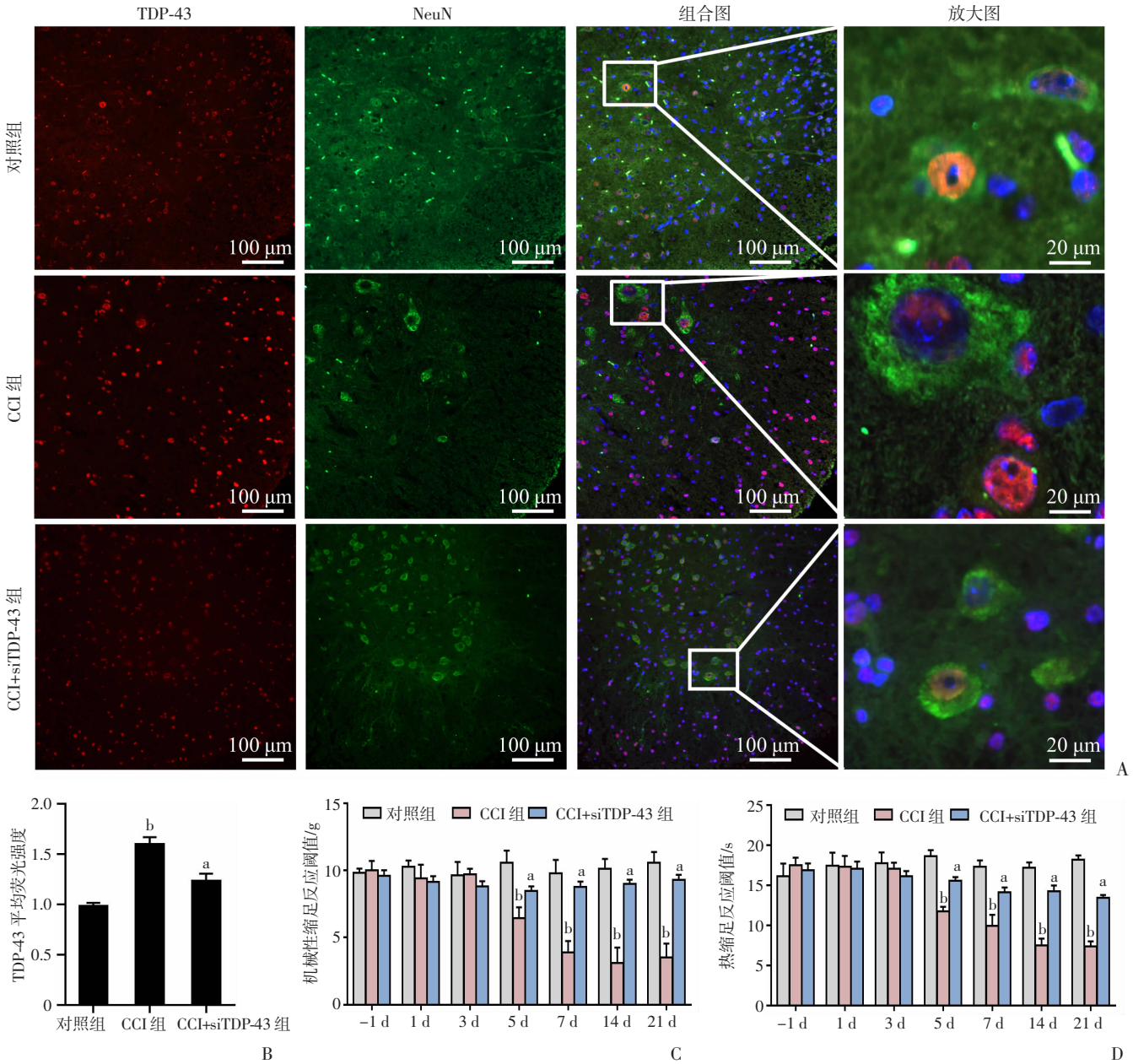
1:对照组;2:24 h 组;3:24 h+siTDP-43 组; a: $P<0.001$,与 24 h 组比较;b: $P<0.001$,与对照组比较

A:N2a 细胞中细胞质 mtDNA(ND1)的变化;B:N2a 细胞中细胞质 mtDNA(CO1)的变化;C:N2a 细胞 TDP-43、cGAS、STING 蛋白的表达变化;D:TDP-43 蛋白半定量分析;E:cGAS 蛋白半定量分析;F:STING 蛋白半定量分析;G:N2a 细胞增殖的变化;H:N2a 细胞增殖的定量分析

图 5 下调 TDP-43 抑制 mtDNA-cGAS/STING 通路

2.5　下调 TDP-43 缓解 CCI 小鼠的痛觉敏化

为验证 TDP-43 是否参与 NP 的形成。鞘内注射 siRNA 抑制 TDP-43 的表达后,进行免疫荧光和疼痛行为学检测。免疫荧光结果显示,与对照组相比,CCI 术后 21 d 时,TDP-43 在腰段(L5-L6)脊髓背角神经元中表达上调,术前联合术后鞘内注射 siRNA 能有效抑制 TDP-43 的表达($P<0.001$,图 6A、B)。行为学结果显示,CCI 术后第 5 天开始,小鼠机械性缩足反应阈值和热缩足反应阈值明显降低,并持续到第 21 天($P<0.001$,图 6C、D),提示成功建立慢性 NP 小鼠模型。进一步分析发现,与 CCI 组相比,鞘内注射 siRNA 抑制 TDP-43 后,小鼠机械性缩足反应阈值和热缩足反应阈值均上升,提示痛觉敏化改善($P<0.001$,图 6C、D)。



A:鞘内注射 siTDP-43 后,CCI 术后 21 d TDP-43 与 NeuN 在各组的表达　红色:示 TDP-43;绿色:示 NeuN;蓝色:示 DAPI;B:TDP-43 平均荧光强度分析;C:小鼠在不同时间点时机械性缩足反应阈值的变化;D:小鼠在不同时间点时热缩足反应阈值的变化　a:$P<0.001$,与 CCI 组比较;b:$P<0.001$,与对照组比较

图 6　下调 TDP-43 缓解 CCI 小鼠的痛觉敏化

3 讨论

氧化应激是诱发神经元结构损伤和功能衰退的重要原因,也是促进 NP 形成的重要机制之一。既往在 NP 的研究中指出神经系统(外周神经、脊髓和脑区)中可出现氧化应激水平的改变。KROTH 等[3]发现,CCI 小鼠模型坐骨神经和脊髓中脂质过氧化氢、氧自由基和 H_2O_2 含量明显增加,并且与小鼠痛觉敏化程度相关。SHI 等[17]发现,在中枢性脑卒中后疼痛(central post-stroke pain,CPSP)大鼠模型中,病变丘脑区中出现氧化损伤指标丙二醛(malondialdehyde,MDA)上调和抗氧化能力指标超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)下调。因此,氧化与抗氧化的失衡导致神经系统出现不同程度的氧化应激损伤。通过抑制 ROS 生成或者增强抗氧化能力能有效减轻神经元损伤,进而缓解疼痛[3,17],然而其发生机制未能完全阐明。作为线粒体机能的重要调控蛋白,TDP-43 的异常表达与额颞叶痴呆、肌萎缩侧索硬化、衰老等神经系统疾病中神经元氧化应激失调密切相关[11,18]。因此,本研究采用 H_2O_2 诱导神经元细胞损伤后进一步探讨 TDP-43 在神经元氧化应激损伤中的作用[19]。本研究发现 H_2O_2 刺激后 N2a 细胞活力明显下降,同时观察到 H_2O_2 诱导后 N2a 细胞中 TDP-43 表达水平明显上调。后续研究证实,使用 siRNA 下调 TDP-43 后可以改善神经元细胞的活性。这与先前关于 TDP-43 在氧化应激条件下促进神经元损伤的研究相吻合,提示 TDP-43 是介导神经元氧化损伤的关键分子[20]。同时,本研究首次发现在 CCI 小鼠模型腰段脊髓中 TDP-43 表达增加。免疫荧光双染实验进一步明确 TDP-43 主要与脊髓背角神经元共定位。通过鞘内注射 siRNA 抑制 TDP-43 后,可以提高 CCI 小鼠机械痛阈值和热痛阈值,从而缓解 CCI 小鼠痛觉敏化的程度。这为理解 NP 的发生、发展提供了新方向。然而,本研究的局限性在于只观察了体外神经元细胞在 H_2O_2 作用下 TDP-43 及其下游炎症信号通路的变化,未能深入研究缺氧、炎症等条件下 TDP-43 在神经元中的调控作用,后续也将进一步开展更深入的研究以探讨 TDP-43 参与 NP 形成的机制。

既往研究发现,线粒体生物能量失衡、线粒体动力学异常以及线粒体损伤的相关分子与 NP 密切相关[15,21]。与此同时,线粒体中异常释放的 mtDNA 作为一种新型“伤害性信号”已被证实参与了多种疾病的发生。报道指出,在神经退行性疾病、自身免疫性疾病、糖尿病眼病等疾病中,氧化应激、线粒体损伤、病毒感染等可刺激 mtDNA 通过 mPTP、电压依赖性阴离子通道(voltage dependent anion channel,VDAC)以及 BAK/BAX 途径释放[11,22]。研究显示,在保留神经损伤(spared nerve injury,SNI)大鼠模型中,损伤侧坐骨神经和腰段脊髓均出现 mtDNA 拷贝数异常,并且与氧化应激程度呈正相关[23]。另外,在部分坐骨神经结扎(partial sciatic nerve ligation,PSNL)小鼠模型中,海马区 mtDNA 含量也明显上升,且激活 I 型干扰素产生神经炎症从而加重疼痛感知[24]。最新研究指出,在慢性术后疼痛大鼠模型中脊髓 mtDNA 释放增加以及 cGAS/STING 通路激活;鞘内注射 CsA 能显著减少 mtDNA 的释放,并进一步抑制 cGAS/STING 的表达,减轻疼痛的发生[25]。因此,内源性 mtDNA 的潜在释放可能激活 cGAS/STING 通路,从而促进 NP 的发生和发展。本研究发现 H_2O_2 诱导神经元细胞后细胞质 mtDNA 释放增加,cGAS 和 STING 蛋白表达上调。同时,通过 CsA 抑制 mPTP 的开放证实了在氧化损伤神经元细胞中 mtDNA 的释放途径。本研究进一步使用 siRNA 抑制 TDP-43 后发现,可以有效减轻 mtDNA 的泄漏与 cGAS/STING 信号通路的激活,提示 TDP-43 诱导的 mtDNA-cGAS/STING 信号通路的激活是介导神经元氧化应激损伤的重要机制之一。研究结果为通过干预 TDP-43 或者抑制 mtDNA 释放寻找防治 NP 的新措施提供了重要理论依据。

综上所述,本研究初步证明了通过抑制 TDP-43 介导的 mtDNA-cGAS/STING 通路激活能有效缓解 H_2O_2 诱导的神经元损伤,靶向 TDP-43 有望为抑制氧化应激性神经元损伤及参与 NP 形成提供新思路。

参考文献:

[1] ALLES S R A, SMITH P A. Etiology and pharmacology of neuropathic pain [J]. Pharmacol Rev, 2018, 70(2): 315-347. DOI: 10.1124/pr.117.014399.

[2] FINNERUP N B, KUNER R, JENSEN T S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment [J]. Physiol Rev, 2021, 101(1): 259-301. DOI: 10.1152/physrev.00045.2019.

[3] KROTH A, SANTOS M DC Q, BORELLA DA SILVA T C, *et al*. Aqueous leaf extract from Luehea divaricata Mart. modulates oxidative stress markers in the spinal cord of rats with neuropathic pain [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113674. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113674.

[4] ATEN S, KIYOSHI C M, ARZOLA E P, *et al*. Ultrastructural view of astrocyte arborization, astrocyte-astrocyte and astrocyte-synapse contacts, intracellular vesicle-like structures, and mitochondrial network [J]. Prog Neurobiol, 2022, 213: 102264. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2022.102264.

[5] ZHANG K L, LI S J, PU X Y, *et al*. Targeted up-regulation

of Drp1 in dorsal horn attenuates neuropathic pain hypersensitivity by increasing mitochondrial fission [J]. Redox Biol, 2022, 49: 102216. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102216.

[6] YE D, FAIRCHILD T J, VO L, *et al*. Painful diabetic peripheral neuropathy: role of oxidative stress and central sensitization [J]. Diabet Med, 2022, 39(1): e14729. DOI: 10.1111/dme.14729.

[7] DECOUT A, KATZ J D, VENKATRAMAN S, *et al*. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases [J]. Nat Rev Immunol, 2021, 21(9): 548-569. DOI: 10.1038/s41577-021-00524-z.

[8] MAEKAWA H, INOUE T, OUCHI H, *et al*. Mitochondrial damage causes inflammation via cGAS-STING signaling in acute kidney injury [J]. Cell Rep, 2019, 29(5): 1261-1273.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.09.050.

[9] HOPFNER K P, HORNUNG V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(9): 501-521. DOI: 10.1038/s41580-020-0244-x.

[10] JAUHARI A, BARANOV S V, SUOFU Y, *et al*. Melatonin inhibits cytosolic mitochondrial DNA-induced neuroinflammatory signaling in accelerated aging and neurodegeneration [J]. J Clin Invest, 2021, 131(9): e150328. DOI: 10.1172/JCI150328.

[11] YU C H, DAVIDSON S, HARAPAS C R, *et al*. TDP-43 triggers mitochondrial DNA release via mPTP to activate cGAS/STING in ALS [J]. Cell, 2020, 183(3): 636-649.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.020.

[12] YONG H, WANG S, SONG F Y. Activation of cGAS/STING pathway upon TDP-43-mediated mitochondrial injury may be involved in the pathogenesis of liver fibrosis [J]. Liver Int, 2021, 41(8): 1969-1971. DOI: 10.1111/liv.14895.

[13] WEST A P, KHOURY-HANOLD W, STARON M, *et al*. Mitochondrial DNA stress primes the antiviral innate immune response [J]. Nature, 2015, 520(7548): 553-557. DOI: 10.1038/nature14156.

[14] LU Y, CAO D L, MA L J, *et al*. TRAF6 contributes to CFA-induced spinal microglial activation and chronic inflammatory pain in mice [J]. Cell Mol Neurobiol, 2022, 42(5): 1543-1555. DOI: 10.1007/s10571-021-01045-y.

[15] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, *et al*. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Methods, 1994, 53(1): 55-63. DOI: 10.1016/0165-0270(94)90144-9.

[16] MU Y, MEI Y, CHEN Y H, *et al*. Perisciatic nerve dexmedetomidine alleviates spinal oxidative stress and improves peripheral mitochondrial dynamic equilibrium in a neuropathic pain mouse model in an AMPK-dependent manner [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 6889676. DOI: 10.1155/2022/6889676.

[17] SHI Z M, JING J J, XUE Z J, *et al*. Stellate ganglion block ameliorated central post-stroke pain with comorbid anxiety and depression through inhibiting HIF-1α/NLRP3 signaling following thalamic hemorrhagic stroke [J]. J Neuroinflammation, 2023, 20(1): 82. DOI: 10.1186/s12974-023-02765-2.

[18] SHAO W, TODD T W, WU Y W, *et al*. Two FTD-ALS genes converge on the endosomal pathway to induce TDP-43 pathology and degeneration [J]. Science, 2022, 378(6615): 94-99. DOI: 10.1126/science.abq7860.

[19] TSAI Y R, CHANG C F, LAI J H, *et al*. Pomalidomide ameliorates H_2O_2-induced oxidative stress injury and cell death in rat primary cortical neuronal cultures by inducing anti-oxidative and anti-apoptosis effects [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3252. DOI: 10.3390/ijms19103252.

[20] ONDA-OHTO A, HASEGAWA-OGAWA M, MATSUNO H, *et al*. Specific vulnerability of iPSC-derived motor neurons with TDP-43 gene mutation to oxidative stress [J]. Mol Brain, 2023, 16(1): 62. DOI: 10.1186/s13041-023-01050-w.

[21] GUO B L, SUI B D, WANG X Y, *et al*. Significant changes in mitochondrial distribution in different pain models of mice [J]. Mitochondrion, 2013, 13(4): 292-297. DOI: 10.1016/j.mito.2013.03.007.

[22] MCARTHUR K, WHITEHEAD L W, HEDDLESTON J M, *et al*. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis [J]. Science, 2018, 359(6378): eaao6047. DOI: 10.1126/science.aao6047.

[23] ZHANG L Q, ZHOU Y Q, LI J Y, *et al*. 5-HT1F receptor agonist ameliorates mechanical allodynia in neuropathic pain via induction of mitochondrial biogenesis and suppression of neuroinflammation [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 834570. DOI: 10.3389/fphar.2022.834570.

[24] YOSHIMOTO N, NAKAMURA Y, HISAOKA-NAKASHIMA K, *et al*. Mitochondrial dysfunction and type I interferon signaling induce anxiodepressive-like behaviors in mice with neuropathic pain [J]. Exp Neurol, 2023, 367: 114470. DOI: 10.1016/j.expneurol.2023.114470.

[25] CHEN Y Y, HU Y J, HE X, *et al*. Activation of mitochondrial DNA-mediated cGAS-STING pathway contributes to chronic postsurgical pain by inducing type I interferons and A1 reactive astrocytes in the spinal cord [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 127: 111348. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.111348.

(收稿:2024-03-27;修回:2024-04-05)

(编辑 李 玥)