

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.14.004

糖尿病病理性神经痛大鼠坐骨神经中 miR-133a 的上调 对疼痛阈值的影响及机制*

邵英¹ 李洁^{1Δ} 刘晓宇¹ 毛培军¹ 刘立栋¹ 叶欣¹ 吴大方²

(1 空军军医大学西京 986 医院内分泌科 陕西 西安 710054; 2 西北大学附属西安市第一医院内分泌科 陕西 西安 710018)

摘要 目的:探究糖尿病病理性神经痛大鼠坐骨神经中 miR-133a 的上调对疼痛阈值的影响及机制。**方法:**使用 NGS 测序和定量 PCR 分析糖尿病病理性神经痛大鼠坐骨神经中的相关 miRNA 表达,预测潜在下游目标。使用 miR-133a-3p 转染的 RSC96 细胞进行体外实验。使用微蛋白质印迹和蛋白质印迹以及免疫荧光分析验证 miR-133a-3p 的作用。使用 miR-133a-3p 拮抗剂分析 miR-133a-3p 与 DNP 之间的关联。**结果:**miR-133a-3p 模拟物增加了 RSC96 细胞中 VEGFR-2、p38αMAPK、TRAF-6 和 PIAS3 的表达,并降低了 NFκB p50 和 MKP3 的表达($P<0.05$)。在正常大鼠中,AAV-miR-133a-3p 通过神经内注射到坐骨神经中可诱导机械性异常性疼痛和 p-p38 MAPK 激活($P<0.05$)。在 DM 大鼠中,miR-133a-3p 拮抗剂给药可减轻 DNP 并下调 p-p38 磷酸化($P<0.05$)。**结论:**坐骨神经中 miR-133a-3p 的过度表达会引起这种疼痛,miR-133a-3p 可能是患有神经性疼痛的患者的有用治疗靶点。**关键词:**糖尿病性神经疾病;坐骨神经;miR-133a-3p;雪旺氏细胞

中图分类号:R-33;R587.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2022)14-2620-05

The Effect of up-regulation of miR-133a in the Sciatic Nerve of Rats with Diabetic Pathological Neuralgia on Pain Threshold and Its Mechanism*

SHAO Ying¹, LI Jie^{1Δ}, LIU Xiao-yu¹, MAO Pei-jun¹, LIU Li-dong¹, YE Xin¹, WU Da-fang²

(1 Department of Endocrinology, Xijing 986 Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710054, China;

2 Department of Endocrinology, Xi'an First Hospital Affiliated to Northwestern University, Xi'an, Shaanxi, 710018, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect and mechanism of up-regulation of miR-133a in the sciatic nerve of rats with diabetic pathological neuralgia on pain threshold. **Methods:** NGS sequencing and quantitative PCR were used to analyze the expression of related miRNAs in the sciatic nerve of diabetic pathological neuralgia rats to predict potential downstream targets. RSC96 cells transfected with miR-133a-3p were used for in vitro experiments. The effects of miR-133a-3p were verified using micro-western blotting, western blotting and immunofluorescence analysis. The association between miR-133a-3p and DNP was analyzed using miR-133a-3p antagonist. **Results:** miR-133a-3p mimic increased the expression of VEGFR-2, p38αMAPK, TRAF-6 and PIAS3 in RSC96 cells, and decreased the expression of NFκB p50 and MKP3 ($P<0.05$). In normal rats, AAV-miR-133a-3p can induce mechanical allodynia and p-p38 MAPK activation by intraneural injection into the sciatic nerve ($P<0.05$). In DM rats, administration of miR-133a-3p antagonists can reduce DNP and down-regulate p-p38 phosphorylation($P<0.05$). **Conclusion:** The overexpression of miR-133a-3p in the sciatic nerve can cause this pain, and miR-133a-3p may be a useful therapeutic target for patients with neuropathic pain.

Key words: Diabetic neuropathy; Sciatic nerve; miR-133a-3p; Schwann cell**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R587.2 **Document code:** A**Article ID:**1673-6273(2022)14-2620-05

前言

糖尿病性神经疾病(Diabetic neuropathy, DN)的发病机制复杂,涉及轴突病、神经鞘病和微血管病^[1,2]。继发于糖尿病的神经损伤是由持续性高血糖引起的,它会损伤外周神经系统中的雪旺氏细胞,损伤外周初级传入伤害性感受器,并导致中枢神经元过度兴奋^[3,4]。相关研究显示:糖尿病伴随着雪旺氏

细胞的分子改变^[5,6]。在急性神经变性期间,氧化和硝基活性应激发受损雪旺氏细胞的损伤和反应性炎症与神经性疼痛的发病机制有关^[7,8]。

miRNA 与负责神经可塑性和疼痛敏化的基因的调节有关^[9,10]。miR-146a 介导背根神经节细胞(DRG)神经元凋亡并调节炎症相关基因表达^[11,12]。miR-29b 增加细胞凋亡率并增强轴突肿胀,而 miR-29c 调节轴突生 DRG 神经元^[13,14]。神经损伤后

* 基金项目:陕西省卫生健康委科研基金项目(2018D089);陕西省自然科学基金基础研究计划一般项目(2019JM-422)

作者简介:邵英(1978-),女,学士,主治医师,研究方向:糖尿病并发症等相关方向,电话:15129029558, E-mail:shaoyxian@163.com

Δ 通讯作者:李洁(1978-),女,硕士,主治医师,研究方向:糖尿病、肠道菌群、神经病变等相关,

电话:18191852533, E-mail:lijie25331832@163.com

(收稿日期:2022-02-05 接受日期:2022-02-28)

周围神经系统中的 miRNA 表达模式表明 miRNA 在疼痛机制中发挥重要作用,miRNAs 也可能作为治疗性镇痛靶点^[15,16]。因此,在糖尿病大鼠中鉴定因持续高血糖而失调的 miRNA 可能会减轻神经性疼痛,miRNA 对糖尿病性神经病理性疼痛(DNP)的影响尚未完全阐明。因此,本研究主要探讨 miRNA 在糖尿病大鼠 DNP 中对疼痛阈值的影响和机制。

1 材料与方法

1.1 动物使用、糖尿病的诱导和细胞培养

使用 80 只体重为 250-300 g 的成年雄性 Sprague Dawley 大鼠。在 12 小时光/暗循环(光循环:07:00-19:00;黑暗周期:19:00-07:00)下,将动物关在带有柔软垫料的塑料笼中,自由获得食物和水。本研究所有实验程序均经本院动物护理和使用委员会批准。

糖尿病(DM)通过将链脲佐菌素(STZ)以 60 mg/kg 体重单次静脉注射到右股静脉中来诱导模型。大鼠施万细胞系 RSC96 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,并在含有 10% (v/v) 胎牛血清、4 mM L-谷氨酸、1.5 g/L 碳酸氢钠和 4.5 g/L 葡萄糖的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基,在 5% (v/v) CO₂ 下的湿润气氛中培养。

1.2 行为测试

评估对机械刺激(机械异常性疼痛)和有害热刺激(热痛觉过敏)的后爪缩回反应。所有行为测试均在(基线)前 1 天,在给予 STZ 和 / 或神经内注射 AAV-miR-133a-3p、SB203580、mir-133a-3p 拮抗剂后第 1 天、第 3 天、第 1 周、第 2 周、第 3 周、第 4 周和第 8 周进行。

1.3 RT-PCR

使用 miRNeasy Mini Kit 提取坐骨神经组织的总 RNA。来自 DM 和正常对照大鼠的 RNA 被送去进行 NGS 测序。使用 qRT-PCR 来测量 DM 大鼠坐骨神经组织中的 miRNA 表达,并验证 NGS 结果。从 NGS 结果中选出 miR-133a-3p、miR-133b-3p 和 miR-871-3p,使用 miRNA 特异性茎环引物、TaqMan 探针和 TaqMan MicroRNA 逆转录进行逆转录 Kit,用于测量 miRNA 表达水平。

特异性茎环引物 miR-133a-3p 的序列为:5'-UUUGGUCC-CCUUAACCAGCUG-3')、引物 miR-133b-3p 的序列为 5'-UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA-3' 和引物 miR871-3p 的序列为 5'-UGACUGGCACCAUACUGGAUAA-3',U6 作为内源对照。

使用比较 2^{-ΔΔCt} 方法估计相对表达,并使用 U6 和正常对照进行标准化。

1.4 miR-133a-3p 模拟转染 RSC96 细胞

RSC96 细胞以 8×10⁴ 个细胞 / 孔接种到 24 孔板中,将 miR-133a-3p 模拟物 (5'-UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG-3',5 nM) 导入 TransIT-X2 动态传递系统,在 37℃、5% CO₂ 环境孵育 72 h。然后收集细胞用于 qRT-PCR、micro Western 印迹、传统蛋白质印迹和免疫荧光实验。

1.5 Micro-Western 阵列和传统的蛋白质印迹

将 MiR-133a-3p 模拟转染的 RSC96 细胞和 DM 大鼠(STZ 给药后 8 周)的坐骨神经组织在含有蛋白酶抑制剂混合物的

RIPA 裂解缓冲液(pH 7.4,50 mM Tris、150 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1%十二烷基钠、1% NP-40 和 0.5%脱氧胆酸钠)中裂解。使用 Bio-Rad 蛋白质检测试剂盒测定蛋白质浓度。进行 Micro-Western 阵列测试。在与神经性疼痛、炎症和细胞存活信号通路相关的 miR-133a-3p 靶蛋白的表达方面评估 miR-133a-3p 模拟物转染的 RSC96 细胞。然后使用传统的蛋白质印迹来确认 Micro-Western 阵列数据。测量 DM 大鼠坐骨神经组织中 miR-133a-3p 靶蛋白的表达水平。

对于传统的蛋白质印迹法,将 20 μg 总蛋白通过 10% (w/v) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶并转移到聚偏二氟乙烯膜。将滤膜与兔单克隆抗磷酸化 p38 MAPK、兔单克隆抗 p38 MAPK、兔单克隆抗 NFκB p50、兔单克隆抗 VEGFR-2、兔多克隆抗 PIAS3、兔多克隆抗 MKP-3、小鼠单克隆抗 TRAF6、或小鼠单克隆抗肌动蛋白一抗。然后与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 IgG 或山羊抗兔 IgG 二抗反应。每个条带的强度用 ECL 蛋白质印迹检测试剂可视化。使用 β-肌动蛋白作为内部对照并针对正常对照组的蛋白质水平对蛋白质表达进行标准化。

1.6 rAAV 载体构建、病毒纯化和滴度测定

为了构建 miR-133a-3p 表达载体,使用以下引物序列从大鼠基因组 DNA 中 PCR 扩增 pre-miR-133a-3p 片段,允许在基因组的两端添加 ClaI 和 EcoR I 限制性位点扩增片段(正向:5'-AAAATCGATATTTAACAATGGTACACTAG-3',反向:5'-TTTGAATTCTTTGA TTGCAGTCTGTAAGG-3')。PCR 产物克隆入重组腺相关病毒 8 型(rAAV8,含有 eGFP 元件)载体,构建 rAAV miR-133a-3p 表达质粒。将 rAAV-miR-133a-3p(或 rAAV) 质粒、pHelper 质粒和 pXX8 质粒共转染到人胚肾 293 细胞中。使用 CsCl 梯度纯化 AAV-miR-133a-3p (或 AAV) 病毒,并提取病毒 DNA。滴度以每毫升的病毒基因组(vg/mL)进行测量,使用实时 SYBR Green PCR 测定法检测 eGFP 水平。

1.7 AAV-miR-133a-3p 病毒载体神经内感染坐骨神经

所有外科手术均在异氟醚/O₂ 麻醉下对动物进行无菌操作。在手术显微镜下进行神经内注射。将大鼠分为正常对照组(仅注射 PBS)、假手术组(仅坐骨神经内 AAV 注射)、AAV-miR-133a-3p 注射组(AAVmiR-133a-3p 给药前 1 h 腹腔内注射 1 μmol/kgSB203580)组和 miR-133a-3p 拮抗剂组(AAV-miR-133a-3p 给药前 1 小时坐骨神经内注射 400 nM miR-133a-3p 拮抗剂)。此外,包括接受或未接受坐骨神经神经内 miR-133a-3p 拮抗剂注射的两组 DM 大鼠(STZ 给药后 2 周)。在异氟醚/O₂ 麻醉下,暴露坐骨神经。在显微镜下,PBS、AAV 病毒载体(5×10⁹ vg/mL)或 AAV-miR-133a-3p 病毒载体(5×10⁹ vg/mL)被神经内注射到近端坐骨神经。行为测试在手术前 1 天、第 1 天、第 3 天以及术后第 1 周、第 2 周和第 3 周进行。

1.8 免疫荧光

miR-133a-3p 模拟物转染的 RSC96 细胞在四孔室载玻片中培养。孵育 72h 后,将载玻片在 4%多聚甲醛中固定 30 min,然后用 1×PBS 洗涤 3 次。将载玻片与用于蛋白质印迹的 NFκB、VEGFR-2、p-p38、TRAF6、PIAS3 和 MKP3 的一抗在 4℃下孵育 24 h。山羊抗小鼠 / 兔 IgG Alexa Fluor 488 偶联二抗用于观察一抗结合。注射后,采用免疫荧光法在坐骨神经中定位 AAV-miR-133a-3p (或 AAV) 病毒。取出神经内

AAV-miR-133a-3p 注射组和 AAV 假注射组大鼠的坐骨神经, 在 4%多聚甲醛中固定,并在 30 %(w/v)蔗糖中饱和。组织包埋, 10 μ m 厚切片进行免疫染色,直接测量 eGFP 荧光。

1.9 统计学分析

所有分析均使用 SPSS18.0, 结果以(平均值 $\pm$ SEM)表示, 通过方差分析进行评估, $P<0.05$ 为结果具有统计学意义。

2 结果

表 1 静脉注射 STZ 后,后爪对机械和热刺激的行为反应的时间进程

Table 1 Time course of behavioral responses of the hindpaw to mechanical and thermal stimulation after intravenous STZ

Groups	Mechanical stimulus				Thermal stimulus			
	Day 0	Week2	Week 4	Week 8	Day 0	Week2	Week 4	Week 8
Control group	39.12 $\pm$ 0.37	36.03 $\pm$ 0.14	35.00 $\pm$ 0.16	35.09 $\pm$ 0.12	15.96 $\pm$ 0.32	15.19 $\pm$ 0.30	17.78 $\pm$ 0.26	14.53 $\pm$ 0.21
DM group	38.46 $\pm$ 0.32	24.76 $\pm$ 0.58	23.17 $\pm$ 0.25	22.43 $\pm$ 0.29	16.28 $\pm$ 0.45	12.01 $\pm$ 0.43	13.57 $\pm$ 0.52	14.68 $\pm$ 0.35
<i>t</i>	0.535	1.488	1.756	1.792	-0.037	1.358	0.639	-0.125
<i>P</i>	0.768	0.023	0.004	0.002	0.572	0.036	0.084	0.533

2.2 糖尿病大鼠坐骨神经中的 miRNA 表达谱

为了研究 miRNA 表达的变化,使用 NGS 比较了 DM 大鼠 (STZ 给药后 8 周) 和正常对照大鼠的坐骨神经中的相对 miRNA 表达。在 miRNA 表达谱中,确定了 DM 大鼠坐骨神经

2.1 STZ 诱导的糖尿病大鼠的持续性机械性异常性疼痛和瞬时热痛觉过敏

从 STZ 给药后 2 周开始,STZ 诱导的糖尿病大鼠表现出对机械刺激的缩爪阈值降低,一直持续到 STZ 给药后 8 周,后爪缩回时间对热刺激的潜伏期减少,但反应在 8 周后逐渐恢复 ($P<0.05$)。(表 1)。

中最可能表达变化的四种 miRNA。

基于对 DM 大鼠坐骨神经的 qRT-PCR 分析,miR-133a-3p 和 miR-133b-3p 表达增加,miR-871-3p 表达降低,与 NGS 结果一致,根据结果选择 miR-133a-3p 进行进一步分析。(表 2)

表 2 通过 NGS 检测 DNP 大鼠坐骨神经中 miRNA 的差异倍数

Table 2 Multiples of miRNA differences in the sciatic nerves of DNP rats were determined by NGS

miRNA	Differential multiple	<i>P</i>
miR-133b-3p	10.50 $\pm$ 3.39	0.003
miR-208b-3p	8.92 $\pm$ 0.49	0.008
miR-133a-3p	5.33 $\pm$ 1.34	0.002
miR-871-3p	0.02 $\pm$ 0.00	0.000

2.3 miR-133a-3p 在 RSC96 细胞中调控的预测靶基因

在体内,与正常对照相比,DM 大鼠坐骨神经中 p38

MAPK 和 VEGFR-2 表达显著上调,而 MKP3 显著下调 ($P<0.05$)。(表 3)。

表 3 STZ 诱导 DM 大鼠坐骨神经中的靶蛋白表达水平

Table 3 STZ induced expression levels of target proteins in the sciatic nerves in DM rats

Groups	MKP3	p-p38	PIAS	NF- κ B	VEGFR-2	TRAF-6
Control group	0.74 $\pm$ 0.09	1.53 $\pm$ 0.10	1.23 $\pm$ 0.11	0.62 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.15	0.62 $\pm$ 0.18
DM group	0.35 $\pm$ 0.02	3.87 $\pm$ 0.24	1.40 $\pm$ 0.13	0.91 $\pm$ 0.05	3.87 $\pm$ 0.28	0.64 $\pm$ 0.15
<i>t</i>	2.357	2.308	1.153	1.580	2.318	1.112
<i>P</i>	0.009	0.006	0.071	0.035	0.001	0.926

2.4 坐骨神经注射 AAV-miR-133a-3p 诱导正常大鼠机械性异常性疼痛

AAV-miR-133a-3p 病毒给药三天后,机械刺激的缩爪阈值显著降低并持续三周($P<0.05$)。然而,AAV-miR-133a-3p 病毒给药组和对照组之间对热刺激的反应无显著差异 ($P>0.05$)。(表 4)。

2.5 miR-133a-3p 的上调增加了坐骨神经中 p-p38 MAPK 水平并促进了神经性疼痛的发展

在第 3 天,预先施用 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 和 miR-133a-3p 的拮抗剂显著减轻了 AAV-miR-133a-3p 病毒诱导的机械性异常性疼痛($P<0.05$)。(表 5)。

当 miR-133a-3p 拮抗剂(400 nM)通过坐骨神经内注射给药一次时,机械超敏反应显著减弱,并且疼痛缓解至少持续第十二天($P<0.05$)。(表 6)。

3 讨论

表 4 坐骨神经注射 AAV-miR-133a-3p 诱导正常大鼠机械性异常性疼痛

Table 4 Administration of AAV-miR-133a-3p into the sciatic nerve induced an abnormal mechanical pain in normal rats

Groups	Day 0	Day 1	Day 3	Week 1	Week 2	Week 3
Control group	13.92±0.26	12.85±0.24	12.87±0.28	12.84±0.27	14.39±0.24	13.18±0.34
The sham surgery group	13.65±0.25	11.53±0.26	11.08±0.31	11.16±0.33	11.52±0.30	11.34±0.28
AAV133a-3p group	13.84±0.30	12.08±0.29	11.06±0.21*	10.99±0.28*	13.86±0.34*	12.95±0.33*

Note: The difference was statistically compared with D 0 was significant, * $P < 0.01$.

表 5 p38 MAPK 抑制剂和 miR-133a-3p 的拮抗剂显著减轻机械性异常性疼痛

Table 5 The antagonists of the p38 MAPK inhibitors and of miR-133a-3p significantly reduced mechanical abnormal pain

Groups	Day 0	Day 1	Day 3
Control group	30.95±0.40	31.08±0.34	30.16±0.26
Sham surgery group	31.27±0.33	30.43±0.29	27.18±0.43
AAV-miR-133a-3p group	30.74±0.30	30.18±0.35	19.12±0.48**
Inhibitors+AAV-miR-133a-3p group	31.04±0.39	28.42±0.34	26.55±0.29
Antagonist+AAV-miR-133a-3p group	30.46±0.32	30.73±0.23	28.95±0.32

Note: The difference was statistically compared with D 0 was significant, * $P < 0.01$.

表 6 miR-133a-3p 拮抗剂对 STZ 给药大鼠机械刺激后爪缩回反应的影响

Table 6 Effects of miR-133a-3p antagonists on the paw retraction response following mechanical stimulation of STZ administration in rats

Groups	After administration of STZ				After the miR-133a-3p antagonist				
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 15	Day 1	Day 2	Day 3	Day 6	Day 12
DM group	38.69±0.15	26.64±0.18	22.74±0.13	18.83±0.09	17.63±0.21	17.18±0.13	14.92±0.21	15.87±0.31	20.51±0.33
M+antagonist group	38.72±0.17	19.92±0.12	18.76±0.12	18.82±0.11	20.85±0.20	27.14±0.19	28.64±0.25	34.19±0.37	33.25±0.35
<i>t</i>	0.286	-0.780	-0.942	-0.014	1.569	1.796	1.932	2.112	1.811
<i>P</i>	0.843	0.537	0.429	0.903	0.009	0.007	0.004	0.001	0.018

研究显示:高血糖显著诱导血管内皮中的 miR-133a 表达,引发了内皮功能障碍,并降低了 DM 大鼠的三磷酸鸟苷环化水解酶 I 基因表达和四氢生物蝶呤水平^[17,18]。然而,miR-133b 过表达抑制了细胞增殖并促进了高血糖诱导的糖尿病视网膜病变动物的细胞凋亡^[19,20]。尽管 miR-133a/miR-133b 与糖尿病之间的联系很明显,但缺乏关于糖尿病神经病变(DN)的数据。因此,本研究探究了 miR-133a-3p 与神经性疼痛的可能关联。

已有炎症和神经性疼痛相关研究报道了 miRNA 失调与几种糖尿病并发症相关^[21-23]。持续的高血糖症会加剧神经损伤相关的 DN^[24]。miRNA 与负责神经可塑性和疼痛敏化的基因的调节有关^[12,25]。在替代周围神经性疼痛的动物模型中,神经损伤使 DRG 和脊髓背角细胞(SDH)中的 miRNA 表达失调,如:相关研究显示:外伤性周围神经损伤也诱导了背根神经节和受损神经中 miR-21 的上调,上调的 miR-21 与巨噬细胞和淋巴细胞侵袭密切相关^[25,26]。但 SNL 诱导的神经炎症会上调 miR-195 以抑制小胶质细胞自噬激活并增加促炎细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 和 iNOS 的表达^[27]。本研究发现:p38 MAPK 表达不仅在 DM 大鼠的坐骨神经中显著上调,而且在体外转染 miR-133a-3p 的 RSC96 细胞中也显著上调,分析其原因在于:在坐骨神经挤压

伤模型中,TNF- α 增加了退行性神经中的 p38 MAPK 信号传导,但抑制了 p38 MAPK 增强的轴突再生,另外,炎症性 T 细胞、巨噬细胞和浸润受累坐骨神经的雪旺氏细胞中 p-p38 MAPK 水平升高^[28]。因此,抑制 miR-133a-3p 上调或抑制 p-p38 MAPK 产生可减少与雪旺氏细胞相关的慢性炎症诱导的神经性疼痛,结合本研究内容可知:将 AAV-miR-133a-3p 病毒注射到坐骨神经的神经外膜中会引起疼痛,并且施用 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 或 miR-133a-3p 的拮抗剂可以减轻这种疼痛。

雪旺氏细胞功能障碍直接影响神经元功能,引发髓鞘破坏、脱髓鞘、轴突传导改变和再生受损^[29]。持续的高血糖会导致慢性雪旺氏细胞功能障碍、糖酵解增加、活性氧的形成、细胞 NADH 耗竭和 DNA 甲基化的变化,从而导致 DN^[30]。心脏 miR-133a 过表达抑制细胞外信号调节激酶(ERK)磷酸化。然而,本研究发现雪旺氏细胞中 miR-133a 的过表达下调了主要调节因子 MKP 并增加了 p-p38 MAPK 激酶的水平;这些变化在糖尿病坐骨神经中也很明显。MKP 家族包含九个成员,它们对 ERK1/2、p38 和 JNK 信号通路负调节/失活(去磷酸化)。MKP 失调会显著影响 MAPK 活性。在 miR-133a-3p 转染的雪旺氏细胞中,本研究发现 p-p38 MAPK 表达显著上调,MKP-3 显著下调。

需要进一步的工作来确定 miR-133a-3p 是否通过调节 p-38 MAPK 的活性或通过调节 MKP 表达来控制糖尿病性神经性疼痛(DNP)。

SDH 和 DRG 中 p-p38 MAPK 表达的增加会导致神经性疼痛。在人类雪旺氏细胞培养物中,高葡萄糖水平会增加 p-p38 MAPK 的表达^[9]。本研究发现将 miR-133a-3p 模拟物转染到雪旺细胞中会诱导 p-p38 MAPK 表达。外周神经中 p-p38 MAPK 水平升高,有助于诱发神经性疼痛,反映了 MAPK 介导的磷酸化和 DRG 中 Nav-1.7 的调节,通过抑制 p-p38 调节的 Nav-1.6 降低了神经传导电流,并增加后爪足垫中肽能表皮内神经纤维的数量。因此,施用 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 或 miR-133a-3p 抑制剂可以减轻神经性疼痛。然而,miR-133a-3p 抑制剂是否降低了雪旺细胞 p38 MAPK 的表达,或者更确切地说是影响了神经分布,需要澄清。

总之,本研究发现 miR-133a-3p 在坐骨神经中发挥重要作用,通过激活 p-p38 MAPK 信号通路促进神经性疼痛的发展。值得注意的是,miR-133a-3p 可能是患有神经性疼痛的患者的有用治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] onçalves NP, Vægter CB, Andersen H, et al. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy [J]. *Nat Rev Neurol*, 2017, 13(3): 135-147
- [2] 时立新. 糖尿病神经病变的机制与药物治疗 [J]. *中华糖尿病杂志*, 2021, 13(4): 446-448
- [3] Lee CC, Perkins BA, Kayaniyl S, et al. Peripheral Neuropathy and Nerve Dysfunction in Individuals at High Risk for Type 2 Diabetes: The PROMISE Cohort[J]. *Diabetes Care*. 2015, 38(5): 793-800
- [4] 周芳,夏中元,刘康,等.NRG1 对糖尿病大鼠神经病理疼痛的影响 [J].*现代生物医学进展*, 2019, 19(14): 2642-2645
- [5] Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, et al. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain [J]. *Neuron*, 2017, 93(6): 1296-1313
- [6] Wang L, Chopp M, Szalad A, et al. Exosomes Derived From Schwann Cells Ameliorate Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetic Mice[J]. *Diabetes*, 2020, 69(4): 749-759
- [7] Stavniichuk R, Obrosova AA, Drel VR, et al. 12/15-Lipoxygenase inhibition counteracts MAPK phosphorylation in mouse and cell culture models of diabetic peripheral neuropathy [J]. *J Diabetes Mellitus*, 2013, 3(3): 10
- [8] Ma Y, Sun H, An S, et al. Effect of Interleukin-1 β on Gene Expression Signatures in Schwann Cells Associated with Neuropathic Pain[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(11): 2958-2968
- [9] Zhang L, Wu R, Xu MJ, et al. MiRNA-107 contributes to inflammatory pain by down-regulating GLT-1 expression in rat spinal dorsal horn[J]. *Eur J Pain*, 2021, 25(6): 1254-1263
- [10] 郑鹏远. 雪旺细胞诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元中靶向 miRNA 的变化研究[D]. 天津医科大学, 2020
- [11] Feng Y, Chen L, Luo Q, et al. Involvement of microRNA-146a in diabetic peripheral neuropathy through the regulation of inflammation [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 171-177
- [12] Liu XS, Fan B, Szalad A, et al. MicroRNA-146a Mimics Reduce the Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetic Mice[J]. *Diabetes*, 2017, 66(12): 3111-3121
- [13] Wang L, Chopp M, Lu X, et al. miR-146a mediates thymosin β 4 induced neurovascular remodeling of diabetic peripheral neuropathy in type-II diabetic mice[J]. *Brain Res*, 2019, 1707: 198-207
- [14] Jia L, Wang L, Chopp M, et al. MiR-29c/PRKCI Regulates Axonal Growth of Dorsal Root Ganglia Neurons Under Hyperglycemia [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(1): 851-858
- [15] Peng Y, Lin H. Regulatory role of long non-coding RNA in peripheral nerve injury and neural regeneration[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2021, 35(8): 1051-1056
- [16] Mead B, Kerr A, Nakaya N, et al. miRNA Changes in Retinal Ganglion Cells after Optic Nerve Crush and Glaucomatous Damage [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1564
- [17] Jin ZQ. MicroRNA targets and biomarker validation for diabetes-associated cardiac fibrosis[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 174: 105941
- [18] Yin S, Bai W, Li P, et al. Berberine suppresses the ectopic expression of miR-133a in endothelial cells to improve vascular dementia in diabetic rats[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(8): 708-716
- [19] Zhong H, Qian J, Xiao Z, et al. MicroRNA-133b Inhibition Restores EGFR Expression and Accelerates Diabetes-Impaired Wound Healing [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 9306760
- [20] 刘磊,董海,何仲春,等. mir-133b 对新生大鼠脑神经元细胞凋亡的影响和机制研究[J]. *医学分子生物学杂志*, 2020, 17(3): 200-206
- [21] Jiangpan P, Qingsheng M, Zhiwen Y, et al. Emerging Role of microRNA in Neuropathic Pain [J]. *Curr Drug Metab*, 2016, 17(4): 336-344
- [22] Sun Y, Zhou Y, Shi Y, et al. Expression of miRNA-29 in Pancreatic β Cells Promotes Inflammation and Diabetes via TRAF3 [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(1): 108576
- [23] Chang LL, Wang HC, Tseng KY, et al. Upregulation of miR-133a-3p in the Sciatic Nerve Contributes to Neuropathic Pain Development[J]. *Mol Neurobiol*, 2020, 57(9): 3931-3942
- [24] Şahin JO. How curcumin affects hyperglycemia-induced optic nerve damage: A short review[J]. *J Chem Neuroanat*, 2021, 113: 101932
- [25] Chang HL, Wang HC, Chunag YT, et al. miRNA Expression Change in Dorsal Root Ganglia After Peripheral Nerve Injury [J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(2): 169-177
- [26] Wang Y, Wang S, He JH. Transcriptomic analysis reveals essential microRNAs after peripheral nerve injury[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(9): 1865-1870
- [27] Li H, Du W, Yuan Y, et al. The Protective Effect of Picroside II on Isoflurane-Induced Neuronal Injury in Rats via Downregulating miR-195[J]. *Neuroimmunomodulation*, 2021, 9: 1-9
- [28] Ma J, Shi M, Zhang X, et al. GLP-1R agonists ameliorate peripheral nerve dysfunction and inflammation via p38 MAPK/NF- κ B signaling pathways in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2977-2985
- [29] Zhang SH, Shurin GV, Khosravi H, et al. Immunomodulation by Schwann cells in disease [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(2): 245-253
- [30] 潘玉琴,陆红英,周可轶,等.应激性高血糖与急性自发性脑出血患者术后并发症和早期预后的相关性研究 [J]. *代生物医学进展*, 2019, 19(03): 461-464