

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2021.02.007

糖尿病性周围神经病理性疼痛中 circ-SCN9A 的作用与临床价值 *

刘磊 席鹏 李文举 雷舒煜 李亦梅[△]
(新疆医科大学第一附属医院疼痛科, 乌鲁木齐 830011)

摘要 目的: 研究钠电压门控通道 α 亚单位 9 (sodium voltage-gated channel alpha subunit 9, SCN9A) 基因来源的环状 RNA (circular RNA, circRNA) 与糖尿病性周围神经病理性疼痛 (diabetic peripheral neuropathic pain, DPNP) 的关系和可能的分子机制。**方法:** 首先检测 SCN9A 基因来源的 circRNA 在 DPNP 病人血清中的表达谱; 对差异 circRNA 进行细胞学定位研究; 利用荧光素酶 (luciferase, LUC) 报告基因实验检测上述 circRNA 对微小 RNA (microRNA, miRNA) 的吸附能力, ROC 曲线 (receiver operator characteristic curve) 评估 circRNA 在 DPNP 中的诊断价值; 生物信息学分析并构建 circRNA 在 DPNP 中的作用通路并进行分子机制验证。**结果:** SCN9A 基因来源的 hsa_circ_0117953 (circ-SCN9A) 在 DPNP 血清中显著高表达, 在细胞内其主要定位于细胞质中, 可调控多个 miRNA 的表达; circ-SCN9A 在 DPNP 中具有良好的诊断价值且与疼痛程度相关; 分子机制研究揭示 circ-SCN9A 调控的 miRNA 主要通过 5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse) 途径发挥作用, 其中 circ-SCN9A 可通过吸附 miR-1256 而调控钾向内整流通道亚家族 J6 (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 6, KCNJ6) 基因的蛋白表达。**结论:** SCN9A 基因来源的 circ-SCN9A 可通过 5-羟色胺能突触途径参与 DPNP 的发生并可作为该病潜在的临床诊断生物学指标和治疗靶点。

关键词 神经病理性疼痛; 糖尿病性周围神经病理性疼痛; 环状 RNA; 微小 RNA; 钠电压门控通道 α 亚单位 9

The role of circ-SCN9A in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathic pain and its clinical value *

LIU Lei, XI Peng, LI Wen-Ju, LEI Shu-Yu, LI Yi-Mei[△]

(Department of Pain Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract Objective: To investigate the relationship and possible molecular mechanism of circular RNA (circRNA) derived from the gene of sodium voltage-gated channel α subunit 9 (SCN9A) with diabetic peripheral neuropathic pain (DPNP). **Methods:** Firstly, the expression profile of SCN9A-derived circRNAs in serum of DPNP patients was detected. Then, the cytological localization of screened differential circRNAs was studied. The microRNA (miRNA) sponge capacity of the circRNAs was detected by luciferase (LUC) reporter assay, and the diagnostic value of circRNAs in DPNP was evaluated by receiver operator characteristic curve (ROC curve) model. Bioinformatics analysis was used to construct the functional pathway of circRNAs in DPNP and the molecular biological mechanism was also verified. **Results:** SCN9A derived hsa_circ_0117953 (circ-SCN9A) is significantly highly expressed in DPNP serum, and mainly located in the cytoplasm within the cell, regulating the expression of multiple miRNAs (miR-661, miR-1324, miR-877-3p, miR-1256, miR-153-3p, miR-1264) through the miRNA sponge mechanism. Circ-SCN9A had good diagnostic value in DPNP and was related to the levels of pain. Molecular mechanism study revealed multiple miRNAs that circ-SCN9A regulated mainly play a role in the serotonergic synapse pathway. Among them, circ-SCN9A can regulate the potassium inwardly rectifying

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2016D01C273)

[△] 通讯作者 李亦梅 liyimeixj@163.com

channel subfamily J member 6 (KCNJ6) gene expression by sponging the miR-1256. **Conclusion:** SCN9A derived circ-SCN9A involved in DPNP development by Serotonergic synapse pathways and can be used as potential biological indicator in clinical diagnosis of DPNP.

Key words Neuropathic pain; Diabetic peripheral neuropathic pain; Circular RNA; microRNA; Sodium voltage-gated channel alpha subunit 9

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是由躯体感觉神经系统的损伤或疾病而直接造成的疼痛, 主要分为周围神经病理性疼痛和中枢神经病理性疼痛^[1]。糖尿病性周围神经病理性疼痛 (diabetic peripheral neuropathic pain, DPNP) 是指由糖尿病或糖尿病前期病变导致的周围神经病理性疼痛^[2]。目前, DPNP 的发生率逐年升高, 已成为亟待解决的医学难题之一。本研究致力于进一步明确 DPNP 的发病机制并寻找其可靠的诊断标记物。钠电压门控通道 α 亚单位 9 (sodium voltage-gated channel alpha subunit 9, SCN9A) 基因编码的蛋白 (Nav 1.7) 参与组成神经细胞中的痛觉感受器^[3,4]。该基因的突变可以导致多种以疼痛为主的疾病^[5]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 可通过降低编码基因 mRNA 的表达来抑制其蛋白质的翻译。例如, miR-30b 可通过降低 SCN9A 基因 mRNA 的表达来抑制 Nav 1.7 蛋白翻译, 从而降低 NP 实验大鼠疼痛的严重程度^[4]。

在基因的转录成分中, 环状 RNA (circular RNA, circRNA) 缺乏线性转录本的“poly (A) 尾”, 通过首尾末端的相接形成环化结构^[6,7], 可结合各种 miRNA, 抑制其功能, 发挥 miRNA“海绵”的作用^[7]。人类神经系统中高丰度的 circRNA 可通过多种途径游离于外周循环系统^[8,9]。最新研究证实 circRNA 可通过内源性 miRNA“海绵”机制参与疼痛性疾病的发生^[10,11]。例如, circRNA_9119 可以通过吸附 miR-26a 减轻进行性的热痛觉过敏和机械性痛觉过敏^[12]。circAnks1a 对 miR-324-3p 的吸附可提高背角神经元的兴奋性和神经损伤引起的疼痛程度^[13]。DPNP 病人血清 circHIPK3 水平显著高于健康人群, 敲减 circHIPK3 则可减轻糖尿病大鼠的 NP 程度^[14]。

由于 circRNA 分子呈封闭环状结构, 不容易受 RNA 外切酶影响, 在神经系统表达丰度高且具有一定的时序和疾病特异性, 这使得 circRNAs 有巨大潜力成为疼痛类疾病的诊断标志物。本研究在前期通过生物信息学分析发现 SCN9A 基因区域可以转录生成多个 circRNA 分子, 创新性地探讨了它们在 DPNP 中的作用和临床价值。通过拟合临床样本、生物信息学分析和分子生物学实验等多种技术手段对其在 DPNP 发生中的潜在诊断价值和可能作用机

制进行了研究, 以期推动该病的临床诊断治疗。

方 法

1. 样本采集

收集 2017 年 1 月至 2019 年 12 月在我科收治的诊断为 DPNP 的病人。

纳入标准: 自愿参加本研究并同意抽取其外周静脉血样; 符合《糖尿病性周围神经病理性疼痛诊疗专家共识》的诊断标准; 《ID Pain》评分 > 2 分; 年龄 ≥ 18 岁; 疼痛数字评分法 (numerical rating scale, NRS) 评分 ≥ 4 分, 4~6 分为中度疼痛, 7 分以上为重度疼痛; 视觉模拟评分法 (visual analogue scale, VAS) 评分在 6~10 分; 意识清醒, 可以进行正确的沟通和言语表达; 无肿瘤等其他严重躯体性疾病。

排除标准: 年龄 < 18 岁; NRS < 4 分; 急慢性胰腺炎; 神经系统损害性疾病; 精神活性物质滥用史; 肝肾功能不全者。

共收集 DPNP 病人 60 例 (男女各 30 例), 其中男性平均年龄为 (70.8 ± 5.3) 岁, 平均病程 (6.1 ± 0.6) 年; 女性平均年龄为 (72.3 ± 4.2) 岁, 平均病程 (6.5 ± 0.5) 年。收集本院无 NP 症状的 2 型糖尿病病人 60 例, 男 30 例, 平均年龄 (66.3 ± 4.5) 岁; 女 30 例, 平均年龄 (69.0 ± 3.2) 岁; 收集的健康对照者为本院常规体检确认后的健康人群, 男女各 30 例, 男性平均年龄 (67.6 ± 3.4) 岁, 女性平均年龄 (70.0 ± 4.5) 岁。本研究所有内容和实施过程均获得了入组者的知情同意和本单位医学伦理委员会的批准和监督。

2. 主要试剂与仪器

体液 RNA 提取专用试剂 TRIzol LS Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Germany); EDTA 真空采血管及针头 (积水, 日本); circRNA 反向设计引物和线性内参 (GAPDH) 引物 (生工, 上海); 构建 circRNA 过表达专用试剂盒 pHB-circBasicTM circular RNA cloning kit (汉恒, 上海); 特异性 siRNA (锐博, 广州); 逆转录试剂 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Japan); 双荧光素酶 (Luciferase, LUC) 报告系统 (Promega, USA); Ribonuclease R (Epicentre, USA); 2×Power Taq PCR MasterMix (百泰克, 北

京); 胎牛血清 (Bovogen, Australian); Anti-KCNJ6 抗体 (义翘神州, 北京)、单克隆 Anti-GAPDH 抗体 (Sigma, USA); 适用于 Real-time PCR 用的 PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, USA); 微量移液器 (Eppendorf, Germany); 细胞培养板 (Corning, USA); Real-time PCR 自动化分析仪 (Bio-RAD, USA); 全自动酶标仪、细胞培养箱 (Thermo Scientific, USA); 超净工作台 (智城, 上海); 数显电热恒温水槽、生化培养箱 (精宏, 上海); 水平摇床 (其林贝尔, 江苏); 超声波细胞粉碎机 (新芝, 浙江)。

3. 血清总 RNA 提取与 Real-time qPCR 分析

在上午空腹状态下, 收集入组者外周血 3 ml, 然后置于冷冻离心机以 3000 g 的速度离心 10 min, 收集上清, 置于 -80℃ 冰箱保存。按照 TRIzol LS Reagent 的说明书对血清内的 RNA 进行提取, 采用全自动酶标仪对所提 RNA 进行浓度和纯度测定。取 1 μg RNA 进行 cDNA 合成。利用 circRNA 序列数据库 (<http://www.circbase.org/>) 获取所有来自 SCN9A 基因的已知 circRNA 分子的转录起始位点和序列信息, 设计相应的反向引物。使用 Real-time PCR 自动化分析仪对血清样本中的 circRNA 进行 qRT-PCR 表达分析。使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算 circRNA 的相对表达水平。

4. 环状 RNA 鉴定与细胞亚定位分析

用含 1% 双抗 (青霉素、链霉素) 和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y, 细胞培养箱设为 5% CO₂、37℃。Ribonuclease R (RNase R) 是一种核糖核酸外切酶, 可以从 3'-5' 方向切割降解 RNA, 能够消化几乎所有的线性 RNA 分子, 但不易消化呈环形的 RNA。本研究以 3 U RNase R/μg RNA 的比例对细胞总 RNA 进行 RNase R 消化处理 (37℃, 10 min), 然后以处理过的 RNA 作为模板合成 cDNA, 与常规的 cDNA 分别进行线性 SCN9A 基因和 SCN9A 来源的 circRNA 进行表达测定比较。细胞的亚定位往往决定 circRNA 行使生物学功能的类型, 按照核质分离试剂盒说明书标准流程对筛选出的 circRNA 进行了细胞亚定位分析。

5. 筛选 SCN9A 来源 circRNA 的互作 miRNA

在转染前 24 h, 以 5×10^3 /孔的细胞密度接种于 96 孔板中。利用 circRNA 生物信息学分析工具 (<http://www.circbase.org/> 和 <https://circinteractome.nih.gov/index.html>) 预测可能与上述筛选出的 circRNA 结合的 miRNA, 合成它们的类似物。将

含有备选 circRNA 结合位点片段的报告质粒和这些 miRNA 类似物共转染入细胞内。在 48 h 后按照说明书操作步骤测定 LUC 活性。最后, 与阴性对照进行比较, 计算每个 miRNA 类似物所致 LUC 活性的改变倍数。针对上述 LUC 实验筛选出的 miRNA 分子, 在细胞中分别转染上述 circRNA 的过表达载体和 siRNA 化合物, 继而检测这些 miRNA 表达水平受到 circRNA 调控的影响程度。

6. SCN9A 来源 circRNA 在 DPNP 中的潜在诊断价值和分子作用机制分析

接受者操作特性曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC 曲线) 是评估临床指标敏感性和特异性的常用逻辑回归模型。在本研究中 SCN9A 来源 circRNA 的表达分为健康对照组、无 NP 症状的 2 型糖尿病病人组和 DPNP 病人组, 其中 DPNP 病人组又分为中度疼痛病人亚组与重度疼痛病人亚组。整合 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、DIANA-mirPath 和 TargetScan 等多个数据分析工具对 SCN9A 来源 circRNA 结合的 miRNA 生物学作用通路进行挖掘和分析, 揭示从 circRNA 表达达到靶向功能基因改变等复杂调控的分子机制。采用分子互作图形化展示工具 Cytoscape 3.4.0 构建 DPNP 相关 SCN9A 来源 circRNA 的最相关调控网络。基于上述基础, 利用免疫印迹技术 (Western blotting, WB) 检测 SCN9A 来源 circRNA 分子对靶向蛋白的调控作用, 验证 circRNA 影响 DPNP 发生的分子生物学机制。

7. 统计学分析

本研究所有数据使用 Excel 进行录入和整理, 采用统计产品与服务解决方案软件 (Statistical Product and Service Solutions, SPSS) 17.0 版本对数据进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结 果

1. SCN9A 来源的 circRNA 在 DPNP 病人血清中存在显著的差异表达

通过生物信息学数据检索, 在人体内 SCN9A 基因共发现 14 条 circRNA 分子, 本研究发现其中 hsa_circ_0117953 (circ-SCN9A) 在 DPNP 病人血清中的水平显著高于健康对照组 ($P < 0.001$, 见图 1A), hsa_circ_0117948 则在病人血清中较健康对照组降低 ($P < 0.05$, 见图 1A)。示意图显示了 circ-SCN9A 的生物信息学序列分析结果, 其是由母基因线性转录本的第二至第七外显子剪切后首尾相接形成。进

一步实验显示了 circ-SCN9A 具有抵抗 RNase R 切割的 circRNA 生物学特性, 主要分布于细胞结构的细胞质中 (见图 1C, D)。

2. 多个 miRNA 受到 circ-SCN9A 的吸附

针对 circ-SCN9A 的序列结构进行 miRNA 结合能力预测, 发现了 37 个可能结合 circ-SCN9A 的 miRNA 分子。本研究采用 LUC 报告分析系统与 37 个 miRNA 类似物的文库进行实验验证后发现其中 6 个 miRNA (miR-661、miR-1324、miR-877-3p、miR-1256、miR-153-3p、miR-1264) 对 LUC 的活性抑制率超过了 30% (见图 2A)。将 circ-SCN9A 过表达后发现这 6 个 miRNA 的表达均不同程度地受

到抑制 (见图 2B)。敲减 circ-SCN9A 后, 这 6 个 miRNA 的表达均明显上调 (见图 2C), 这说明 circ-SCN9A 可以调控这 6 个 miRNA 的表达水平从而影响它们生物学功能的发挥, 其中 hsa-miR-1256 与 circ-SCN9A 之间的相互作用关系最为显著 (见图 2)。

3. 血清 circ-SCN9A 水平在 DPNP 中的临床诊断价值

本研究发现血清中 circ-SCN9A 的水平在 DPNP 病人和健康对照者之间存在显著性差异 (见图 1A)。ROC 曲线模型是分析连续变量特异性和敏感性的指标, 曲线下的面积越大, 则变量的诊断价

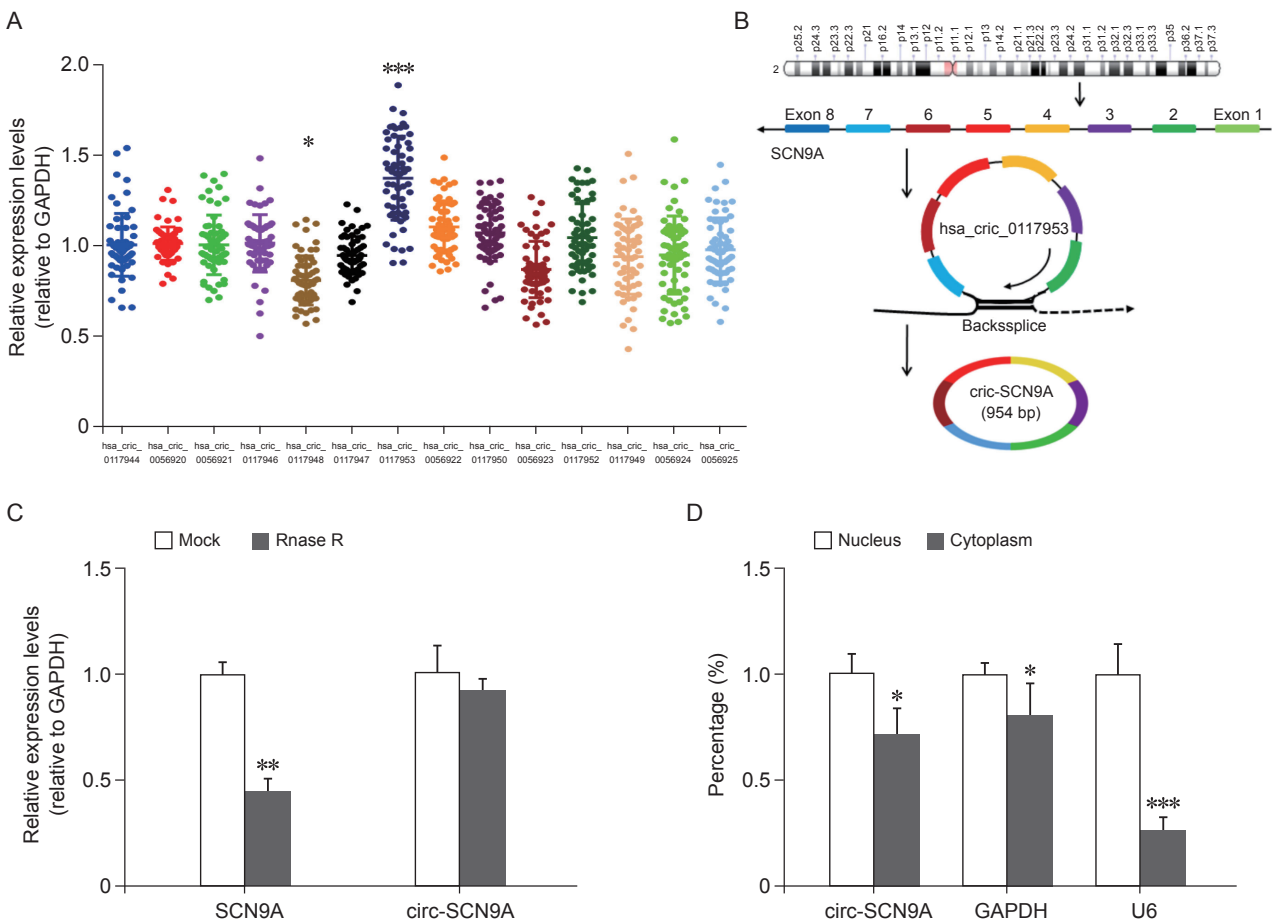


图 1 SCN9A 来源的 circRNA 在 DPNP 中的表达及细胞内定位

(A) 在 SCN9A 来源的 14 条 circRNA 分子中, hsa_circ_0117953 (circ-SCN9A) 在 DPNP 血清中呈现出显著的高表达 ($n = 60$), $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, 与健康对照组相比; (B) circ-SCN9A 在染色体的位置和转录剪切模式; (C) 与线性 SCN9A 转录本相比, circ-SCN9A 具有抵抗 RNA 外切酶的生物学特性, $**P < 0.01$; (D) 核质分离实验证实 circ-SCN9A 主要是分布于细胞质内, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$

Fig. 1 Expression and intracellular localization of SCN9A-derived circRNA in DPNP

(A) Among 14 circRNA molecules from SCN9A, hsa_circ_0117953 (circ-SCN9A) showed significantly high expression in DPNP serum ($n = 60$), $*P < 0.05$, $***P < 0.001$, compared with healthy control group; (B) circ-SCN9A in chromosome position and its transcriptional and cleaved pattern; (C) Compared with linear SCN9A transcript, circ-SCN9A has biological characteristics of resistance to RNA exonuclease, $**P < 0.01$; (D) Nucleocytoplasmic separation experiments confirmed that circ-SCN9A was mainly distributed in the cytoplasm, $*P < 0.05$, $***P < 0.001$.

值越大。本研究采用该模型来分析 circ-SCN9A 在 DPNP 中的诊断价值, 结果显示 ROC 曲线的线下面积达到了 0.89, 敏感性为 0.81, 特异性为 0.83 (见图 2D)。为排除糖尿病本身导致 circ-SCN9A 变化的影响, 本研究比较了 circ-SCN9A 在无 NP 症状的 2 型糖尿病患者组和健康对照组之间变化, 未发现统计学差异 (见图 3A)。DPNP 伴有中度疼痛病人的血清 circ-SCN9A 水平显著低于重度疼痛病人组 ($P < 0.01$, 见图 3B)。这些结果说明 circ-SCN9A 的表达变化并不受糖尿病状态的影响, 而是与其导致的 DPNP 症状相关, 暗示血清中 circ-SCN9A 的水平有望作为该病具有诊断价值的潜在外周生物学

标志物。

4. DPNP 相关 circ-SCN9A 可通过调控 miR-1256 影响下游靶基因的表达

KEGG 是一个基因组破译方面的数据库, 用于从分子水平来了解细胞和生物系统的高级功能, 为更高层次和更复杂各种细胞活动和生物体行为作出可靠的计算推测。为探究 DPNP 相关 circ-SCN9A 的神经生物学病理机制, 本研究联合多个生物信息学分析工具对 circ-SCN9A 互相作用的多个 miRNA 进行 KEGG 生物学作用通路分析显示, 与 circ-SCN9A 存在调控作用关系的 6 个 miRNA 均共同参与了 5-羟色胺能突触 (Serotonergic synapse) 作用通路

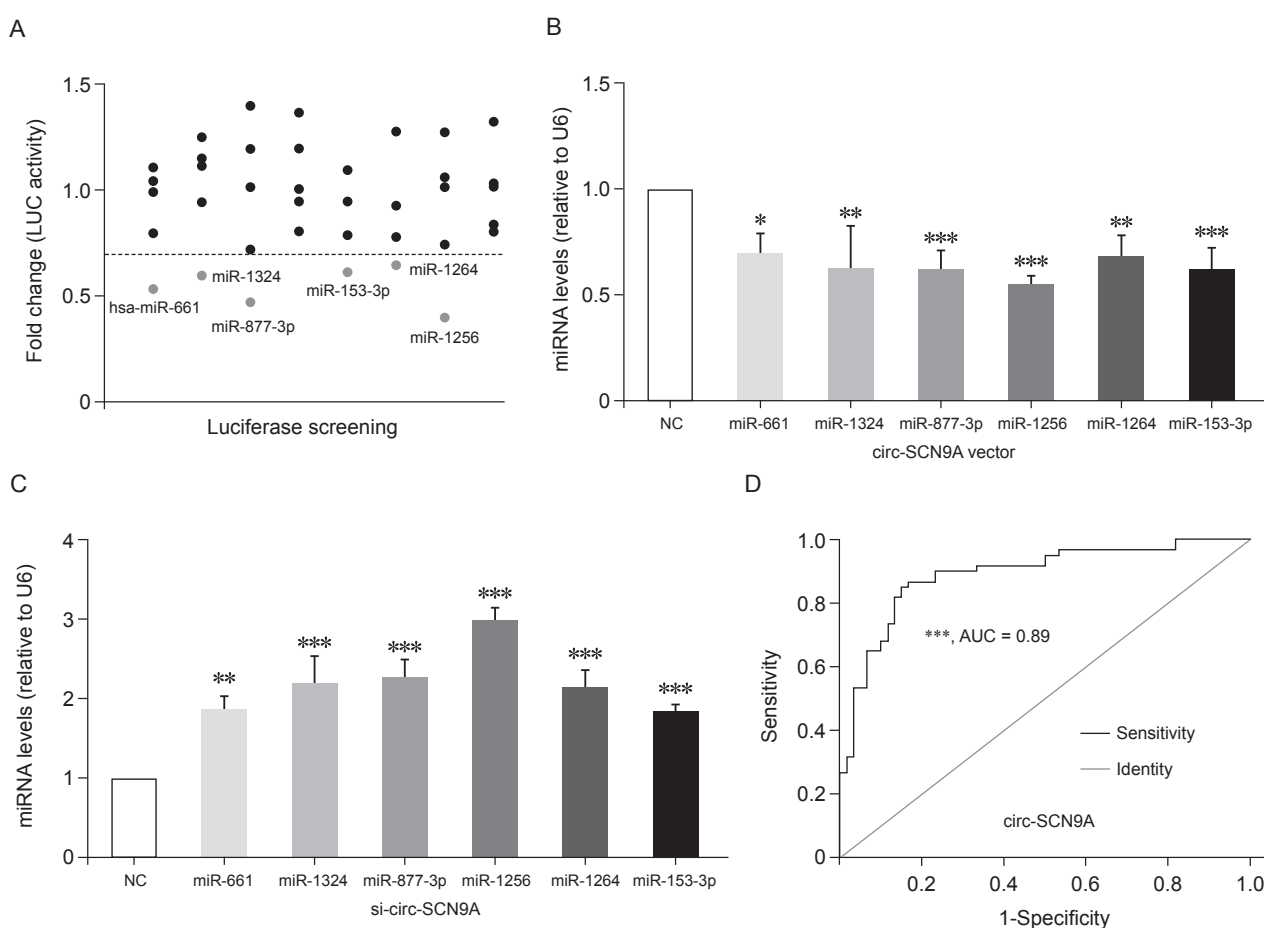


图2 DPNP 相关的 circ-SCN9A 对 miRNA 的调控作用和临床价值分析

(A) LUC 报告基因实验筛选出多个与 circ-SCN9A 具有结合能力的 miRNAs; (B) 与阴性对照组相比, 细胞中过表达 circ-SCN9A 可显著抑制上述 miRNAs 的表达, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; (C) 与阴性对照组相比, 敲减 circ-SCN9A 的表达水平可显著提高上述 miRNAs 的水平, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; (D) ROC 曲线分析显示血清中 circ-SCN9A 水平在 DPNP 中具有较好的潜在诊断价值

Fig. 2 The regulatory role of DPNP-related circ-SCN9A on miRNA and its clinical value analysis

(A) A number of miRNAs with binding ability to circ-SCN9A were screened by LUC reporter gene assay; (B) Compared with negative control, upregulated circ-SCN9A in cells significantly inhibited the expression of the above miRNAs, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; (C) Compared with negative control, downregulated circ-SCN9A expression can significantly improve the levels of the above miRNAs, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; (D) ROC curve analysis showed that the serum level of circ-SCN9A had good potential diagnostic value in DPNP.

(见图 4A)。对它们在该通路中的调控关系进行图形化展示发现了多个与之有关的靶向作用蛋白基因(见图 4B)。鉴于其中 miR-1256 与 circ-SCN9A 的作用关系最为密切(见图 2), 本研究采用 WB 实验对 miR-1256 在该调控网络中的靶基因钾向内整流通道亚家族 J6 (potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 6, KCNJ6) 进行蛋白表达水平检测, 结果发现 circ-SCN9A 的表达可以显著影响下游基因 KCNJ6 的蛋白水平(见图 4C)。

讨 论

神经病变是糖尿病病人常见的并发症, 20% 左右病人有 DPNP 的症状, 严重影响病人日常生活工作及心理健康, 相应医疗支出也迅速增加^[2,15,16]。高血糖可以使神经元处于显著的氧化应激状态, 激活细胞内信号转导分子引起炎症反应, 进而释放组胺、前列腺素、细胞因子等多种细胞介质^[2]。这些介质可以作用于神经细胞外膜上的痛觉感受器使其敏化, 进而导致神经细胞膜上离子通道异常开放, 增加兴奋性神经递质的释放, 从而使得神经细胞过度兴奋, 最终使机体产生痛觉过敏或超敏状态^[2]。在痛觉传输的过程中, 编码离子通道蛋白的基因发挥着重要的作用。SCN9A 基因编码的离子通道蛋白 Nav 1.7 是维持神经元兴奋性的关键调节因子, 其在

周围神经系统的伤害感受器神经元和大脑皮层下的结构中高度富集表达^[17]。Nav 1.7 的功能获得性突变与 DPNP 等获得性疼痛病有密切联系^[17,18]。然而, 对于 SCN9A 基因的环状转录本在疼痛相关的疾病中的作用尚未见报道, 亟待明确。

本研究对来源于 SCN9A 基因的 circRNA 在 DPNP 中的表达谱进行了检测, 发现部分 circRNA 存在显著的差异表达, 尤以 circ-SCN9A 的差异最为显著(见图 1A)。通过细胞生物学功能分析发现 circ-SCN9A 可以在神经细胞质内吸附多个 miRNA, 进而调节这些 miRNA 的生物学功能(见图 2、3)。在 circRNA 与疼痛疾病的研究中发现 circHIPK3 不仅在 DPNP 病人的血清内高表达, 而且上调程度与神经病理性疼痛分级呈正相关^[14]。这提示 circRNA 具有作为 DPNP 临床生物学标志的潜力。本研究利用 ROC 模型发现 circ-SCN9A 在外周血血清中的水平具有较好的鉴别 DPNP 和健康者的价值(见图 2D), 且不受糖尿病本身状态的影响并与 DPNP 伴发的疼痛程度相关(见图 3), 有望成为 DPNP 新的客观生物学指标。为探究其中的分子病理学基础, 本研究对 circ-SCN9A 所调控的多个 miRNA 的功能进行了生物信息学集合分析, 发现它们可共同地作用于 Serotonergic synapse (5-羟色胺能突触) 通路(见图 3A), 调节多个重要功能蛋白(见图 3B)。这其中 KCNJ6 基因编码一种由 G 蛋白控制

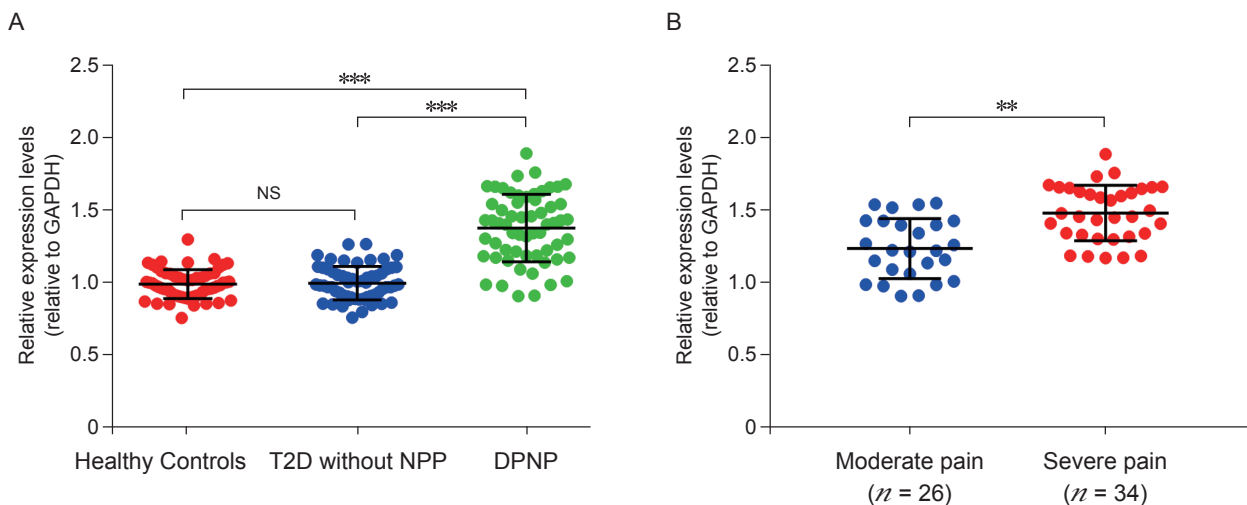


图 3 血清 circ-SCN9A 水平与疾病临床特点之间的相关性比较

(A) 血清 circ-SCN9A 水平在 DPNP 病人组、无 NP 症状的 2 型糖尿病病人组和健康对照组之间比较, *** $P < 0.001$; (B) 伴有重度疼痛的 DPNP 病人血清 circ-SCN9A 水平显著高于中度疼痛病人组, ** $P < 0.01$

Fig. 3 The correlation between serum circ-SCN9A level and clinical characteristics of the disease

(A) Serum circ-SCN9A level among DPNP group, type 2 diabetic patients without NP symptoms and healthy controls, *** $P < 0.001$; (B) The serum circ-SCN9A level of DPNP patients with severe pain was significantly higher than that of patients with moderate pain, ** $P < 0.01$.

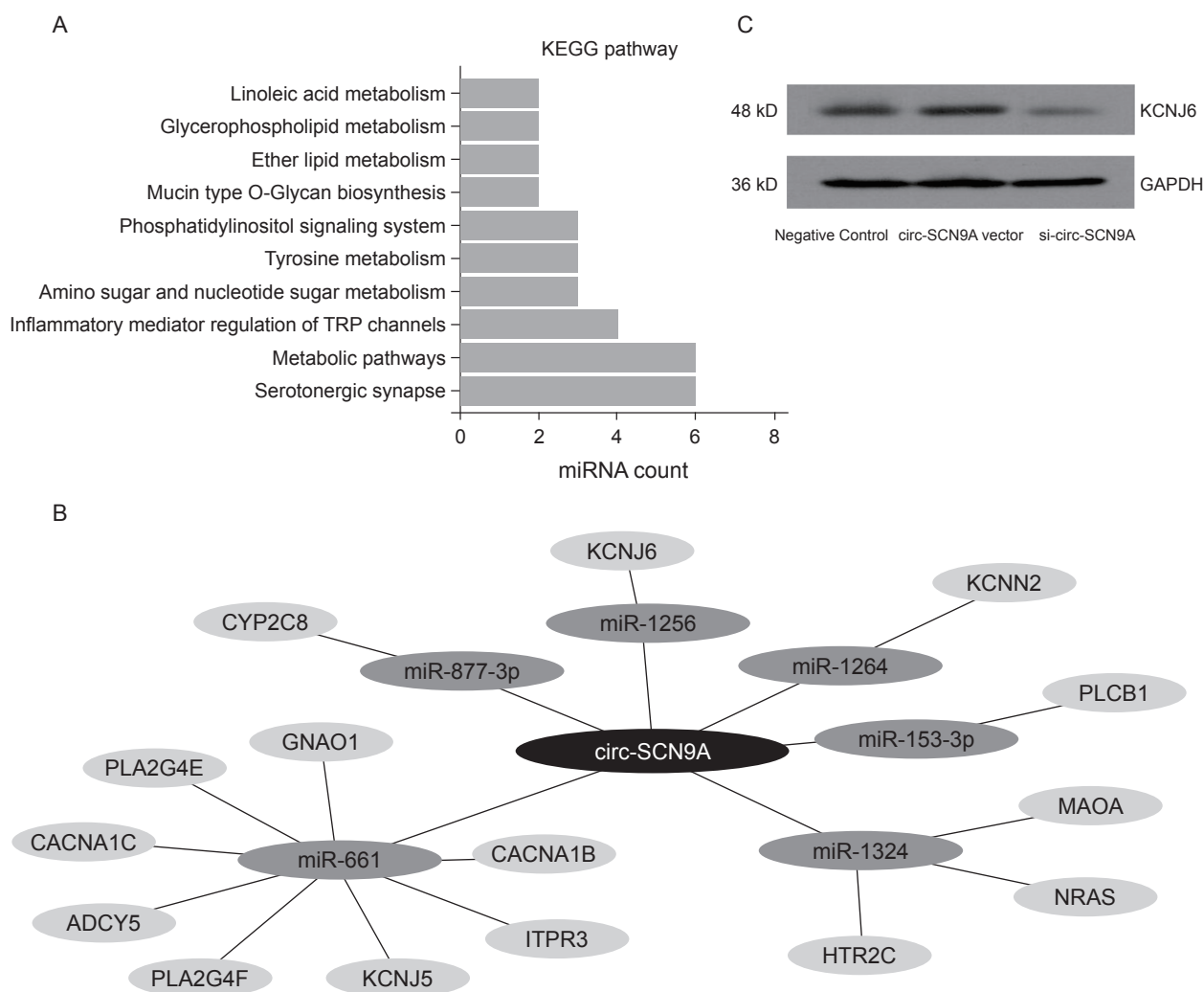


图 4 DPNP 相关的 circ-SCN9A-miRNAs 调控网络的作用通路筛选和分子机制

(A) KEGG 分析显示 circ-SCN9A 所调控的 6 个 miRNAs 均作用于 5-羟色胺能突触 (serotonergic synapse) 通路; (B) 构建 circ-SCN9A-miRNAs-mRNA 调控网络展示 circ-SCN9A 在该通路中的基因调控关系; (C) circ-SCN9A 的表达可以显著影响上述调控网络中下游基因 KCNJ6 的蛋白水平

Fig. 4 The pathway screening of DPNP-related circ-SCN9A-miRNAs regulatory network and their molecular mechanism (A) KEGG analysis showed that the 6 miRNAs regulated by circ-SCN9A all acted on the Serotonergic synapse pathway; (B) The regulatory network of circ-SCN9A-miRNAs-mRNA was constructed to demonstrate the gene regulatory relationship in this pathway; (C) Expression of circ-SCN9A can significantly affect the protein level of the downstream gene KCNJ6 in the above regulatory network.

的 ATP 敏感的内向整流钾通道^[18,19]。已发现 KCNJ6 基因的突变可以降低个体对痛觉的敏感性^[19], 提示该基因对于人类痛觉阈值的维持具有重要的调节作用。本研究发现 circ-SCN9A 的表达对于 KCNJ6 基因的蛋白水平具有显著的调节作用 (见图 3C)。这一重要发现从分子神经病理学机制层面证明了 DPNP 相关的高表达 circ-SCN9A 可抑制 miR-1256 的基因沉默作用, 从而促进 KCNJ6 基因的蛋白表达, 进而使得 DPNP 病人痛觉阈值降低, 导致疼痛性临床症状的发生。这一发现对于进一步深入理解

DPNP 发生的分子神经病理学机制具有重要的推动作用。

DPNP 的临床诊断主要依靠于病人的糖尿病病史和临床表现, 一直缺乏有临床价值的生物标记物, 对于 DPNP 病情的客观评估造成一定的困难。目前多项研究已证实 circRNA 在外周血中具有较高的稳定性和表达丰度, 有望作为神经疾病诊断和治疗的潜在生物标记^[20]。外周血血清 circRNA 的检测具有无创、快速和低成本的优点, 本研究中 DPNP 血清高表达的 circ-SCN9A 不仅参与了 DPNP 的发生

发展并有望具备作为该病潜在的生物学诊断标志的临床价值。目前,虽然部分具有5-羟色胺再摄取抑制作用的药物(如度洛西汀)对于DPNP的治疗显示出较为肯定的疗效,但其详细作用机制却未能完全阐明^[2,15]。本研究揭示DPNP中高表达的circ-SCN9A可作用于5-羟色胺能突触通路,这强烈提示在DPNP发生过程中该通路被阻滞或许是此类药物发挥DPNP治疗效果的分子药理学基础之一。然而,此类药物对于5-羟色胺能突触通路的下游基因靶点的阻断不具有选择性,因此常存在诸多不良反应和治疗风险。

本研究的不足之处在于缺乏活体动物模型来验证上述临床发现和细胞学机理,然而本研究为后续开发针对DPNP中5-羟色胺能通路的上游和下游靶点更加特异性的靶向药物提供了前期基础,具有重要的转化医学价值。

综上所述,本研究首次阐述了人类疼痛相关基因SCN9A来源的circRNA与神经病理性疼痛的关系,发现血清中circ-SCN9A有望作为DPNP的潜在临床生物学标记,为更深入理解DPNP发生的分子病理学机制提出了新的思路,对后续该病特异性靶向治疗策略的提出具有重要的推动意义。

参 考 文 献

- [1] 神经病理性疼痛诊疗专家组. 神经病理性疼痛诊疗专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(12):705-710.
- [2] 中国医师协会神经内科医师分会疼痛和感觉障碍专委会. 糖尿病性周围神经病理性疼痛诊疗专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(8):561-567.
- [3] Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, *et al.* An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain[J]. *Nature*, 2006, 444(7121):894-898.
- [4] Shao J, Cao J, Wang J, *et al.* MicroRNA-30b regulates expression of the sodium channel Nav 1.7 in nerve injury-induced neuropathic pain in the rat[J]. *Mol pain*, 2016, 12:1-13.
- [5] Rajasekharan S, Martens L, Domingues L, *et al.* SCN9A channelopathy associated autosomal recessive congenital indifference to pain: A case report[J]. *Eur J Paediatr Dent*, 2017, 18(1):66-68.
- [6] Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency[J]. *Nature*, 2013, 495(7441):333-338.
- [7] Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges[J]. *Nature* 2013, 495(7441):384-388.
- [8] Rybak-Wolf A, Stottmeister C, Glažar P, *et al.* Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed[J]. *Mol cell*, 2015, 58(5):870-885.
- [9] You X, Vlatkovic I, Babic A, *et al.* Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(4):603-610.
- [10] Hanan M, Soreq H, Kadener S. CircRNAs in the brain[J]. *RNA biol*, 2017, 14(8):1028-1034.
- [11] Patop IL, Wüst S, Kadener S. Past, present, and future of circRNAs[J]. *EMBO J*, 2019, 38(16):e100836.
- [12] Zhang Z, Zhang X, Zhang Y, *et al.* Spinal circRNA-9119 Suppresses Nociception by Mediating the miR-26a-TLR3 Axis in a Bone Cancer Pain Mouse Model[J]. *J Mol Neurosci*, 2020, 70(1):9-18.
- [13] Zhang SB, Lin SY, Liu M, *et al.* CircAnks1a in the spinal cord regulates hypersensitivity in a rodent model of neuropathic pain[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4119.
- [14] Wang L, Luo T, Bao Z, *et al.* Intrathecal circHIPK3 shRNA alleviates neuropathic pain in diabetic rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3):644-650.
- [15] 王焕玲, 赵美一, 刘金锋. 抗抑郁药在治疗神经病理性疼痛的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(7):537-540.
- [16] 李骏驰, 舒伟. 糖尿病性周围神经病理性疼痛的外科治疗研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(10):725-729.
- [17] McDermott LA, Weir GA, Themistocleous AC, *et al.* Defining the functional role of Nav 1.7 in human nociception[J]. *Neuron*, 2019, 101(5):905-919.e8.
- [18] Li J, Wei Z, Zhang J, *et al.* Candidate gene analyses for acute pain and morphine analgesia after pediatric day surgery: African American versus European Caucasian ancestry and dose prediction limits[J]. *Pharmacogenomics J*, 2019, 19(6):570-581.
- [19] Mayfield J, Blednov YA, Harris RA. Behavioral and genetic evidence for girk channels in the CNS: role in physiology, pathophysiology, and drug addiction[J]. *Inter Rev Neurobiol*, 2015, 123:279-313.
- [20] Cui X, Niu W, Kong L, *et al.* hsa_circRNA_103636: Potential novel diagnostic and therapeutic biomarker in Major depressive disorder[J]. *Biomark Med*, 2016, 10(9):943-952.