

• 论 著 •

## 外周神经损伤后脊髓 HDAC2 表达的增加对 mu 阿片受体表达的影响 \*

孙 娜<sup>1</sup> 谢 晨<sup>1</sup> 高翊博<sup>2</sup> 任晋璇<sup>2</sup> 郁丽娜<sup>2</sup> 严 敏<sup>1,2 Δ</sup>

(<sup>1</sup> 徐州医科大学江苏省麻醉学重点实验室, 徐州 221004; <sup>2</sup> 浙江大学医学院附属第二医院麻醉科, 杭州 310002)

**摘 要 目的:** 研究神经病理性疼痛时损伤侧脊髓背角去乙酰化酶 2 (histone deacetylase 2, HDAC2) 表达的增加对吗啡镇痛以及 mu 阿片受体 (opioid receptor, MOR) 表达的影响。**方法:** 清洁级 C57BL/6J 小鼠, 应用坐骨神经慢性压迫性疼痛模型 (chronic constrictive injury, CCI), 采用随机数字表法分为: (1) 假手术组、手术组; (2) 手术 + 溶剂组、手术 + 苯胺异羟肟酸 (SAHA) 组; (3) 手术 + NC-siRNA 组、手术 + HDAC2 siRNA 组; (4) AAV5-EGFP 组, AAV5-HDAC2 组。通过腹腔注射吗啡后 30 min 测量小鼠损伤侧热缩足反射潜伏期, 计算吗啡的最大可能镇痛效应 (max possible analgesia effect, MPAE) 来评估吗啡的镇痛效应的改变。术后第 7 天通过 Western blot 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测各蛋白的表达水平变化。**结果:** (1) 和假手术组相比, 术后第 7 天, 手术组吗啡的镇痛作用降低, 损伤侧脊髓背角 MOR 蛋白的表达降低, HDAC2 蛋白的表达增加, 乙酰化的组蛋白 H3 (AcH3) 表达水平降低; (2) 术前 30 min 鞘内注射去乙酰化酶抑制剂 SAHA 连续 7 天, 和溶剂组相比 SAHA 提高脊髓背角 MOR 蛋白的表达水平, 降低 HDAC2 蛋白的表达水平, 增加组蛋白 H3 的乙酰化水平, 吗啡的镇痛效能增加; (3) 术前 30 min 鞘内注射 HDAC2 siRNA 连续 3 天, 和对照组相比, HDAC2-siRNA 组在术后第 7 天脊髓背角 HDAC2 蛋白的表达降低, MOR 的蛋白表达增加, 组蛋白 H3 的乙酰化水平增加, 吗啡的镇痛效能增加; (4) 正常小鼠鞘内注射 AAV5-HDAC2 过表达脊髓背角的 HDAC2 后 28 天, 和对照组相比, 脊髓背角的 HDAC2 的蛋白表达水平明显增加, 组蛋白 H3 的乙酰化水平明显降低, MOR 的蛋白表达水平明显降低, 吗啡的镇痛效能降低。**结论:** 外周神经损伤后脊髓 HDAC2 表达的增高可以导致损伤侧脊髓背角 MOR 表达的降低, 降低吗啡的镇痛效应。

**关键词** 乙酰化酶 2; 阿片受体; 苯胺异羟肟酸; 神经病理性疼痛; 神经损伤; 脊髓

### The increased expression of HDAC2 affects expression of mu opioid receptor in the spinal cord after peripheral nerve injury \*

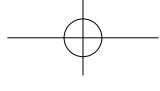
SUN Na<sup>1</sup>, XIE Chen<sup>1</sup>, GAO Yi-Bo<sup>2</sup>, REN Jin-Xuan<sup>2</sup>, YU Li-Na<sup>2</sup>, YAN Min<sup>1,2 Δ</sup>

(<sup>1</sup> Jiangsu Province Key Laboratory of Anesthesiology and Center for Pain Research and Treatment, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China; <sup>2</sup> Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310002, China)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of increased histone deacetylase 2 (HDAC2) expression in the spinal cord dorsal horn on morphine analgesia and mu opioid receptor (MOR) expression in neuropathic pain. **Methods:** In a chronic constrictive injury (CCI) pain model, clean-grade C57BL/6 mice were randomly divided into different groups: ① sham group, CCI group; ② CCI group + Vehicle group, CCI group + SAHA group; ③ CCI + NC-siRNA group, CCI + HDAC2 siRNA group; ④ AAV5-EGFP group, AAV5-HDAC2 group. Thermal withdrawal latency (TWL) of the injured side was measured 30 min after morphine injection to calcu-

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81771189; 81471128); 浙江省自然科学基金 (LZ18H090001)

Δ 通讯作者 zryanmin@zju.edu.cn



late the max possible analgesia effect (MAPE) 3 days after surgery, and the expression level of MOR, HDAC2 and AcH3 were detected by Western blot and real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) on the 7<sup>th</sup> day after surgery. **Results:** ① Compared with the sham group, the analgesic effect of morphine was reduced in the CCI group, the expression of MOR in the injured side of the spinal cord dorsal horn was decreased, the expression of deacetylase 2 (HDAC2) was increased, and acetylated histone H3 (AcH3) of the injured side was decreased on the 7 days after surgery. ② After intrathecal injection of deacetylase inhibitor SAHA before surgery for 7 consecutive days in the CCI group, compared with vehicle group, SAHA improved the expression of MOR, the expression of AcH3 expression while decreased HDAC2 expression level, resulting in enhanced morphine analgesia. ③ After intrathecal infusion of HDAC2 siRNA for 3 consecutive days in CCI group, the expression of HDAC2 in the injured side spinal dorsal horn was decreased, while the MOR expression level and acetylation of H3 were increased, resulting in enhanced morphine analgesia. ④ By over-expression of HDAC2 in the spinal cord dorsal horn via intrathecal injection of AAV5-HDAC2 into normal mice, HDAC2 had an obvious augmentation in the injured side spinal cord dorsal horn 28 days after the injection, the expression of acetylated histone H3 was significantly decreased and the expression of MOR was decreased either, resulting in lower analgesic efficacy of morphine. **Conclusion:** The increased expression of HDAC2 after peripheral nerve injury leads to a decrease of MOR expression in the injured ipsilateral spinal cord dorsal horn and lower analgesia efficacy of morphine.

**Key words** HDAC2; MOR; SAHA; Neuropathic pain; Nerve injury; Spinal cord

神经病理性疼痛是由躯体感觉系统的损伤或疾病所引起的疼痛<sup>[1]</sup>, 大约影响到世界人口的 7%<sup>[2,3]</sup>, 多表现为自发性疼痛、痛觉过敏或感觉异常为特征的严重疼痛, 病人常常难以忍受。截至 2017 年世界上约有 4.25 亿的糖尿病病人<sup>[4]</sup>, 其中约有一半伴有糖尿病性周围神经病理性疼痛<sup>[5]</sup>。在一项大规模的国人调查中, 2.6% 的后背痛是由神经病变导致的<sup>[6]</sup>。目前对于神经病理性疼痛的治疗以抗惊厥药、抗抑郁药作为一线药物, 阿片类药物对神经病理性疼痛效果较差, 已经作为临床治疗疼痛的二线或三线用药<sup>[7-10]</sup>。这种现象的出现和疼痛传导通路上尤其是外周初级感觉神经元和中枢神经系统神经元在神经病理性疼痛状况下阿片受体表达降低有很大关系<sup>[11]</sup>。因此理解阿片受体表达降低的机制对增强吗啡对神经病理性疼痛镇痛效应的改善很有必要。

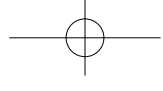
表观遗传学包括 DNA 的甲基化、组蛋白的乙酰化、组蛋白的甲基化、LncRNA 等<sup>[12]</sup>, 不涉及 DNA 序列改变的基因表达和调控的可逆、可遗传修饰, 在疼痛的产生和维持, 以及疼痛由急性期向慢性期转化的过程中扮演着重要的作用<sup>[13-16]</sup>。作为染色体的基本结构, 组蛋白的乙酰化会使整条染色体的结构松散, 有利于转录因子的接近而有利于转录, 然而去乙酰化则会使其结构致密从而不利于转录<sup>[17,18]</sup>。最近 Liang 等<sup>[19]</sup>发现大鼠在炎性痛或神经病理性疼痛模型下背根神经节或脊髓背角组蛋白的乙酰化明显降低。Hou 等<sup>[20]</sup>发现在骨

癌痛模型下抑制乙酰化酶 2 (histone deacetylase 2, HDAC2) 的表达增加, 会降低痛觉高敏并且能增加 KCC2 的表达。因此, 在神经病理性疼痛情况下, 脊髓背角阿片受体 (opioid receptor, MOR) 的减少是否也与 HDACs 导致的组蛋白乙酰化降低有关有待进一步探讨。本研究首次提出在神经病理性疼痛情况下, 损伤节段脊髓 HDAC2 存在一个稳定且明显的增加, MOR 表达明显降低。通过应用 HDAC2 的抑制剂或应用一些干扰 RNA 技术降低脊髓背角 HDAC2 在神经病理性疼痛情况下的增高可以逆转 MOR 表达的降低, 提高吗啡的镇痛效应, 为临床吗啡应用于神经病理性疼痛的治疗提供一个参考。

## 方 法

### 1. 主要试剂和仪器

辛二酰苯胺异羟肟酸 (SAHA, S1047, Selleck 公司), 盐酸吗啡 (沈阳制药有限公司), 戊巴比妥钠 (上海制药厂), Anti-MOR 抗体 (ab10275, Abcam 公司), Anti-GAPDH 抗体 (AF0006, Beyotime 公司), Anti-HDAC1 抗体 (ab19845, Abcam 公司), Anti-HDAC2 抗体 (#2540, Cell Signaling Technology 公司), Anti-HDAC4 抗体 (#2072, Cell Signaling Technology 公司), Anti-HDAC5 抗体 (#20458, Cell Signaling Technology 公司), Anti-acetyl-histone H3 抗体 (#9649, Cell Signaling Technology 公司); Anti-His-



tone H3 抗体 (#9715, Cell Signal Technology 公司), Anti-NeuN 抗体 (ab104224, Abcam 公司), 蛋白印迹膜再生液 (Meilunbio), 热痛刺激仪 (中国医学科学院生物医学研究所)。

## 2. 实验动物

C57BL/6J 小鼠, 雄性, 体重 20~25 g, 由浙江大学医学院动物实验中心提供。动物置于 24±2℃ 室温下, 12 h/12 h 昼夜节律, 自由摄食饮水。所有实验动物适应环境 2 天后进入实验。

## 3. 神经病理性疼痛模型

参照文献<sup>[21]</sup>坐骨神经慢性压迫性 (chronic constrictive injury, CCI) 神经病理性疼痛模型, 腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉, 于右侧股骨中部做纵向切口, 分离股二头肌, 暴露坐骨神经及其三个分支: 腓肠神经、腓总神经和腓神经, 用 6-0 丝线自坐骨神经三叉分支处单向结扎 4 道, 松紧适度, 以引起腿部肌肉刚出现肌颤触为佳, 间距 1 mm。假手术组和 CCI 组相比, 只暴露不结扎, 其余步骤均相同。逐层缝合手术切口。

## 4. 热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)

采用热辐射刺激仪, 测定小鼠损伤侧热辐射刺激, 测定小鼠损伤侧足底 TWL。将有机玻璃箱置于 3 mm 厚的玻璃板上, 按 Hargreaves 法<sup>[22]</sup>用热辐射刺激仪照射小鼠足底, 照射开始至小鼠出现抬腿回避时间为 TWL。热刺激强度调整为基础值 8~12 s, 在整个实验过程中保持一致, 自动切断时间为 20 s, 以免造成热辐射损伤。为避免或减少前一次刺激对随后刺激效应造成的影响, 同一部位刺激的间隔时间为 2 min, 连续测定 3 次, 取 3 次平均值为小鼠 TWL 值。

## 5. 吗啡的镇痛效应

如 Mao 等<sup>[16]</sup>所述, 术后 7 天腹腔注射吗啡 1.5 mg/kg。在手术前 (基线潜伏期) 和吗啡注射后 30 min (反应潜伏期) 进行 TWL 测量。截止时间定为 20, 最大可能镇痛效应的百分比 (%MPAE) = [(反应潜伏期-基线潜伏期)/(截止时间-基线潜伏期)]×100%。

## 6. 免疫荧光

小鼠在深麻醉下, 经升主动脉依次灌注生理盐水 (20 ml) 和 4% 多聚甲醛溶液 (20 ml)。取 L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> 节段脊髓, 在 4% 多聚甲醛溶液中固定过夜后, 转入 15% 蔗糖溶液, 4℃ 过夜, 脱水至组织沉底, 再转入 30% 蔗糖溶液, 4℃ 过夜, 脱水至组织沉底。横切冰冻切片, 厚 10 μm, 贴于防脱阳离子玻片上,

免疫组化笔画圈, 加入含有 0.3% TritonX-100 的 5% 牛血清室温封闭 1 h。1 h 后加入含有一抗抗 NeuN (1:200), 一抗抗 μ 阿片受体 (1:200), 一抗抗乙酰化的组蛋白 H3 抗体 (1:200); 一抗抗 HDAC1 抗体 (1:200), 一抗抗 HDAC2 (1:200), 一抗抗 HDAC4 抗体 (1:200), 以及一抗抗 HDAC5 抗体 (1:200), 4℃ 孵育过夜, PBS 冲洗, 3×5 min, 滴加二抗 Alexa Fluor™ 594 d 驴抗兔 (H+L) (1:500), Alexa Fluor™ 488 驴抗鼠 (H+L) (1:500), DAPI 染色液, 甘油封片, 置于激光共聚焦显微镜下观察。

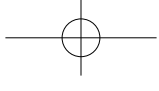
## 7. Western blot 法

将小鼠断头处死, 快速取出 L<sub>3-4</sub> 节段脊髓并放入液氮中, 冷冻 -80℃ 保存备用。蛋白提取: 冰上预冷研钵, 将少量组织块置于研钵中, 400 μl 裂解液 (RIPA:PMSF = 100:1) 加入研钵中, 倒入适量液氮, 研磨均匀, 用移液器收集研磨液于 1.5 ml EP 管中, 冰上静置 30 min 后, 4℃ 13 000 rpm 10 min, 取上清于新的 1.5 ml EP 管中。按 BCA 法测定样本蛋白浓度后加入 5× 上样缓冲液及裂解液调整到每一份样本浓度相同, 100℃ 金属浴高温变性 5 min。取 50 μg 蛋白样本在 10% 的 SDS 预制胶上电泳, 电压分别为浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V, 湿法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后分别与一抗抗 μ 阿片受体 (1:1000), 一抗抗乙酰化的组蛋白 H3 抗体 (1:1000); 一抗抗组蛋白 H3 抗体 (1:1000); 一抗抗 HDAC1 抗体 (1:1000), 一抗抗 HDAC2 (1:1000), 一抗抗 HDAC4 抗体 (1:1000), 以及一抗抗 HDAC5 抗体 (1:1000), 4℃ 孵育过夜; TBST 振荡清洗, 3×5 min, 加入辣根过氧化物酶酶标记二抗 (1:5000), 室温振荡孵育 1 h; TBST 振荡冲洗, 3×5 min, 使用 ECL western blot 检测仪器检测。曝光之后条带采用蛋白印迹膜再生液振荡冲洗 30 min, 之后重复孵育其他抗体, 进行 PVDF 蛋白印迹膜的重复利用。所得条带经 Bio-Rad 公司 Quantity One 4.6.2 软件半定量分析处理。

## 8. 荧光定量实时 PCR

将小鼠断头处死, 快速取出 L<sub>3-4</sub> 节段脊髓并放入液氮中冷冻, -80℃ 保存备用。总 RNA 提取: 冰上预冷研钵, 将少量约 50~100 mg 组织块置于研钵, 加 1 ml Trizol 于研钵中, 加入适量液氮, 进行研磨。用移液器收集研磨液于 1.5 ml EP 管中, 加入 0.2 ml 氯仿, 盖紧离心管, 剧烈震荡离心管, 静置 2~3 min。4℃ 下, 12 000 g 离心 15 min。取上层水相约 400 μl 于新的离心管, 加入 0.5 ml 异丙醇, 颠倒混匀, 15~30℃ 放置 10 min, 4℃ 下 12 000 g 离心 10 min。





弃上清, 加入 1 ml 75% 的无水乙醇, 漩涡混匀, 4℃ 7500 g 离心 5 min。弃上清, 室温或真空干燥 5~10 min, 将 RNA 溶于 20~30  $\mu$ l 水中。测浓度和 RNA 质量: 取 2  $\mu$ l 的 RNA 于 98  $\mu$ l 的水中, 测浓度和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> (> 1.8)。用 1% 琼脂糖凝胶鉴定 RNA 有无降解。逆转录 cDNA: 取一新的离心管, 依次加入下列溶液: 总 RNA (0.1~5  $\mu$ g)、随机引物 3  $\mu$ l、ddH<sub>2</sub>O 加至 12  $\mu$ l。70℃ 孵育 5 min 后, 冰上震荡 2 min。在冰上依次加入下列试剂: 5xReaction Buffer 5  $\mu$ l、10mM dNTP 混合物 2  $\mu$ l、逆转录酶 1  $\mu$ l, 42℃ 处理 60~90 min, 70℃ 处理 10 min, 停止反应, 放置冰上。逆转录后的 cDNA 可继续作为 PCR 反应或保存于 -20℃。PCR 反应: 在冰上按下列顺序依次加入: ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ l、2xSYBR Premix Ex Taq™ II Reaction Buffer 10  $\mu$ l、各蛋白引物 0.8  $\mu$ l、或 GAPDH 引物 0.8  $\mu$ l、cDNA 2  $\mu$ l、50×ROX Reference Dye 0.4  $\mu$ l。最终反应体系总体积为 20  $\mu$ l。温度循环: 95℃ 30 s、95℃ 5 s、60℃ 30 s。重复步骤 2~3, 共 40 循环、95℃ 15 s。经 ABI 公司 StepOnePlus V 2.1 软件分析处理。各引物见表 1。

#### 9. 鞘内给药

采用 Hylden 等<sup>[23]</sup>的方法, 鞘内注射在 L<sub>5</sub> 和 L<sub>6</sub> 脊柱节段之间徒手进行。在针头进入蛛网膜下腔时, 可以注意到小鼠尾巴快速轻弹动作。推药后针头停留 5~10 s, 然后拔出。

#### 10. HDAC2 siRNA 给药

HDAC2 siRNA 由上海吉满生物科技公司合成。siRNA 由 Entranster™ 在体转染液稀释, 稀释浓度约为 100 pmol/4  $\mu$ l, 每次鞘内给药体积 4  $\mu$ l, 术前 30 min 给药, 连续 1、2、3 共 3 天。对照组为试剂商提供的阴性对照。稀释溶剂为 Entranster™ 在

体转染液。HDAC2 siRNA 的序列如下: 5'-CCGTGAAGCTGAACCGTCA-3'。

#### 11. AAV5-HDAC2 病毒的构建

为构建表达全长 HDAC2 mRNA 的质粒, 首先通过 Trizol 方法从小鼠脊髓组织中提取总 RNA, 用 DNase I 处理。然后扩增 HDAC2 cDNA。扩增 HDAC2 引物序列如下: Forward: CCGCTCGAGGCCACC-ATGGCGTACAGTCAAGGAGGC; Reverse: GCTCTAGAAGGGTTGCTGAGTTGTTCTGACTTG。接下来, 将 HDAC2 cDNA 插入前病毒质粒 (pAAV-MCS) 中。DNA 测序用于验证 cDNA 序列和重组克隆。制备携带 cDNA 的腺相关病毒颗粒。使用 PEI 转染方法, 用表达 HDAC2 或增强的绿色荧光蛋白 (EGFP), pAAV-DJ-RC 和 pHelper 的 pAAV-MCS 转染 DH5a 感受态细胞。3 天后, 收集转染的细胞并悬浮在无血清 DMEM 中。在 4 次冻融循环后, 以 10 000 g 离心 10 min 收集 AAV 上清液, 并使用 AAV Purification Standard Kit (Cell Biolabs, Inc) 浓缩。

#### 12. 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计分析, 用 Graphpad Prism 7.0 生成图表, ImageJ 2.0 处理图片。所有计量资料均用均数  $\pm$  标准误 ( $\bar{x} \pm SEM$ ) 表示。多组间比较采用重复测量的方差分析, 两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 外周神经损伤后小鼠脊髓中 MOR 和 AcH3 表达降低, HDAC2 表达增加

在本实验中, 小鼠分成 CCI 手术组以及 Sham 手术组。在术后 7 天取材小鼠脊髓进行 Western

表 1 q-PCR 中的引物序列

Table 1 Primers and sequences used in q-PCR

| 基因名称<br>Gene Name | 引物<br>Primers | 序列 (5'-3')<br>Sequences 5' to 3' | 用途<br>Experiment |
|-------------------|---------------|----------------------------------|------------------|
| mHdac1            | Forward       | ACGGCATTGACGACGAATCCTATG         | qPCR             |
|                   | Reverse       | CTGAGCCACACTGTAAGACCACTG         | qPCR             |
| mHdac2            | Forward       | TGATGGAGATGTACCAGCCTAGCG         | qPCR             |
|                   | Reverse       | ACCGAGCATCAGCAATGGCAAG           | qPCR             |
| mHdac4            | Forward       | CCAAGCCAAGGTTCACCACAGG           | qPCR             |
|                   | Reverse       | GCGTCCACGGATGCACTCAC             | qPCR             |
| mHdac5            | Forward       | AGCACCGAGGTAAAGCTGAG             | qPCR             |
|                   | Reverse       | GAAGTCTGGTCCAAAGAAGCG            | qPCR             |
| mOprm1            | Forward       | GGATCGAACTAACCACAGCCAAC          | qPCR             |
|                   | Reverse       | GGTTCCTCATTCCTCTGTCCATGC         | qPCR             |
| m $\beta$ -actin  | Forward       | CTACCTCATGAAGATCCTGACC           | qPCR             |
|                   | Reverse       | CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC           | qPCR             |

blot、qRT-PCR 以及免疫荧光。Western blot 显示外周神经损伤后损伤侧 L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> 节段脊髓中 MOR 蛋白表达降低 (见图 1A), HDAC2 蛋白表达增加 (见图 1C)。HDAC1、HDAC4 和 HDAC5 蛋白表达变化不明显 (见图 1B、D 和 E)。神经损伤后 7 天组蛋白的乙酰化水平明显降低 (见图 1F)。qRT-PCR 显示 MOR 与 HDAC2 mRNA 的变化水平和蛋白水平

基本一致 (见图 G-K), 而 HDAC1, 4, 5mRNA 变化不明显。免疫荧光显示 MOR 主要表达在脊髓背角浅层, HDAC2 主要表达在神经元的细胞核, 而 AcH3 为广泛表达的核内蛋白 (见图 2)。

2. 降低脊髓 HDAC2 的表达可增加 MOR 的表达, 增强吗啡的镇痛作用

将小鼠分为溶剂 Sham 组 (Veh-Sham), 溶剂 CCI

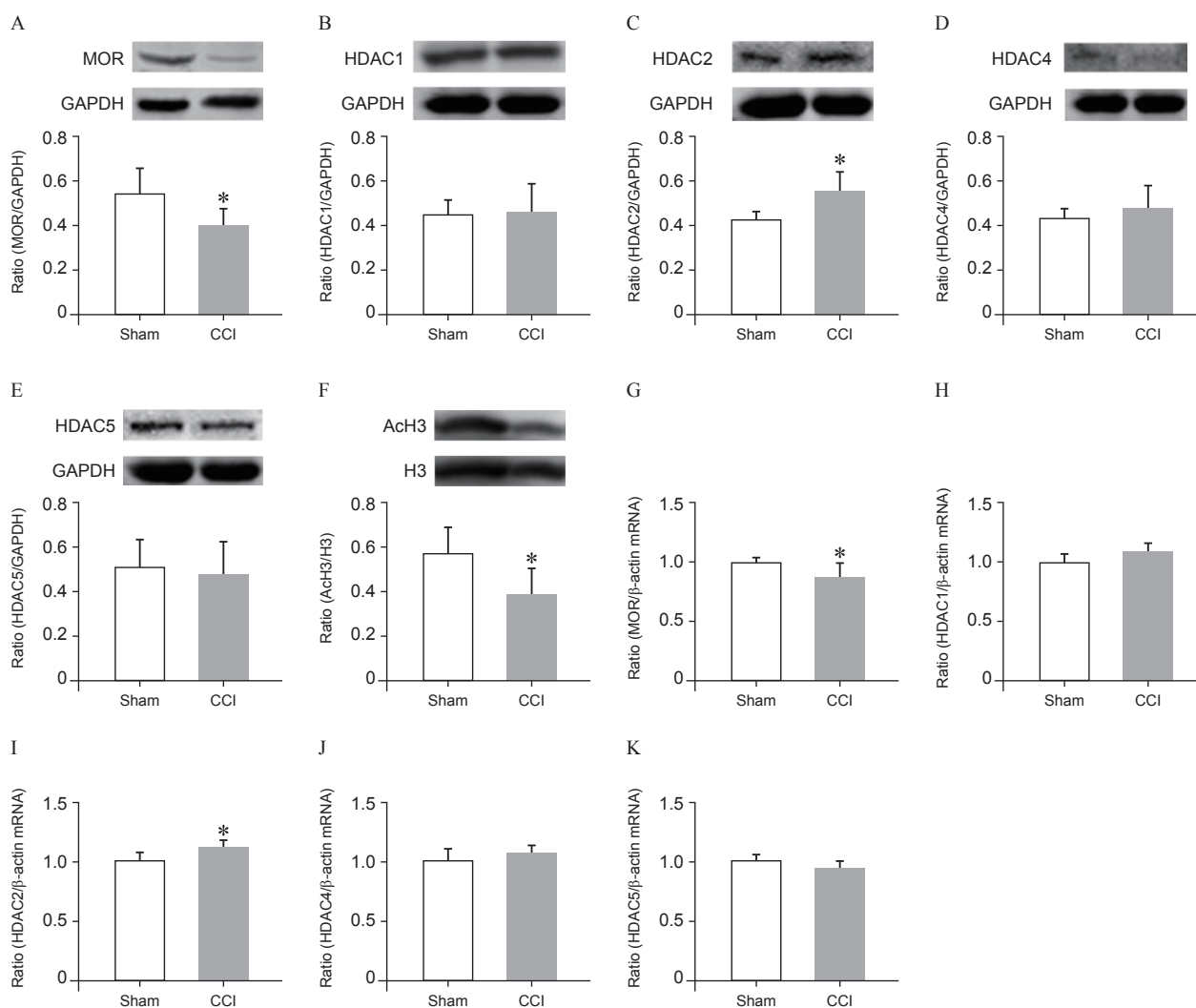


图 1 外周神经损伤导致小鼠脊髓中 MOR 和 AcH3 表达降低, HDAC2 表达增加 ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A-F) Western blot 显示神经损伤 7 天后损伤侧 L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> 节段脊髓各蛋白的表达量。MOR 和 AcH3 表达降低, HDAC2 表达增加, HDAC1, 4, 5 变化不明显,  $n = 6$  (表示做了 6 次重复, 每组用 4 只); (G-K) qRT-PCR 显示神经损伤后脊髓各蛋白的 mRNA 的表达量, 变化趋势和蛋白基本一致,  $n = 4$  (每组用 3 只)

\* $P < 0.05$ , CCI 组与 Sham 组相比

Fig. 1 The expression of MOR and AcH3 increased while the expression of HDAC2 decreased 7 days after peripheral nerve injury ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A-F) Western blot showed the expression of proteins in segment L<sub>3</sub>-L<sub>4</sub> of the injured spinal cord 7 days after surgery. An obvious decline was shown in the expression of MOR and AcH3 while an augmentation appeared in the expression of HDAC2. No obvious change was found in the expression of HDAC1, HDAC4 and HDAC5.  $n = 6$  (means 6 repetitions, 4 mice in each group); (G-K) qRT-PCR showed the level of mRNA after nerve injury, which was parallel with the tendency of the proteins change.  $n = 4$  (3 mice/group).

\* $P < 0.05$ , CCI group compared with group Sham.

组 (Veh-CCI) 以及 SAHA-CCI 组。在 SAHA-CCI 组术前 30 min 鞘内注射 HDAC 的泛抑制剂 SAHA, 连续 7 天, 以降低 HDAC2 表达。在术后第 3 天腹腔注射吗啡 1.5 mg/kg 后 30 min 测量小鼠损伤侧热 TWL 值计算吗啡的 MPAGE。结果表明与 Veh-Sham 组相比, Veh-CCI 组吗啡的 MPAGE 明显降低, 说明在神经病理性疼痛情况下吗啡的镇痛效应降低。而鞘内注射 SAHA 3 天后与 Veh-CCI 组相比, 吗啡的镇痛效应显著增加 (见图 3A)。Western blot 和 qRT-PCR 显示术后 7 天损伤节段 HDAC2 蛋白的表达降低, HDAC2 mRNA 水平降低 (见图 3C、F)。同时 SAHA 可以增加损伤侧 MOR 的蛋白表达量以及促进 MOR 基因的转录 (见图 3B、E), 增加组蛋白 H3 的乙酰化水平 (见图 3D)。因此, SAHA 对 HDAC2 表达的抑制也许能促进 MOR 的表达, 从而增强吗啡的镇痛效应。

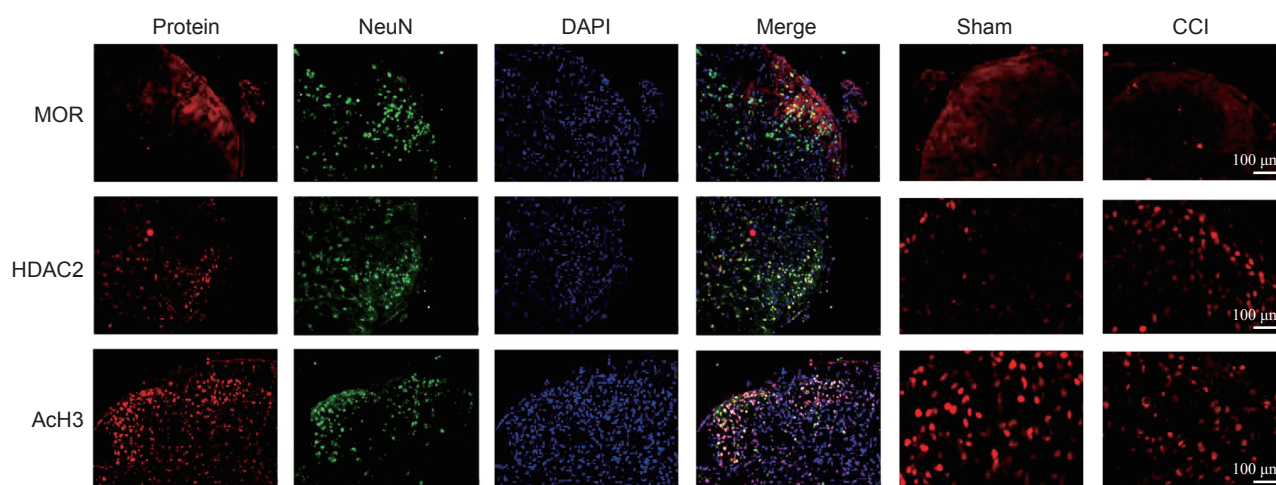
### 3. 降低脊髓 HDAC2 的表达可增加损伤侧脊髓中的 MOR 和 AcH3 的表达

将小鼠分为溶剂 CCI 组 (Veh-CCI), 阴性对照 CCI 组 (NC-CCI) 以及 HDAC2 siRNA-CCI 组 (Si-CCI)。通过鞘内注射 HDAC2 siRNA 降低神经病理性疼痛情况下脊髓 HDAC2 的表达来确定脊髓背角中 HDAC2 对 MOR 是否有调节作用。设置 Veh-CCI 组, 以排除溶剂的影响。在术前 30 min 鞘内注入 HDAC2 siRNA 或 NC siRNA, 连续 3 天。术后第 7 天腹腔给吗啡 1.5 mg/kg, 30 min 后测量小鼠损伤侧

TWL。发现在 Si-CCI 组小鼠中吗啡的镇痛作用显著增加 (见图 4)。Western blot 与 qRT-PCR 显示, 与 NC-HDAC2 处理的小鼠相比, 在第 7 天, siRNA 处理组脊髓背角中 HDAC2 蛋白和 mRNA 水平显著降低 (见图 4C、F), AcH3 的水平显著增加 (见图 4D), MOR 的蛋白水平和 mRNA 水平明显增加 (见图 4B、E)。免疫荧光也显示应用 HDAC2 siRNA 在降低 HDAC2 表达的同时可以明显增加损伤侧脊髓 MOR 和 AcH3 的表达。以上结果表明脊髓背角中 HDAC2 的减少可能通过增加 MOR 基因启动子等部位的乙酰化导致 MOR 表达的增加。

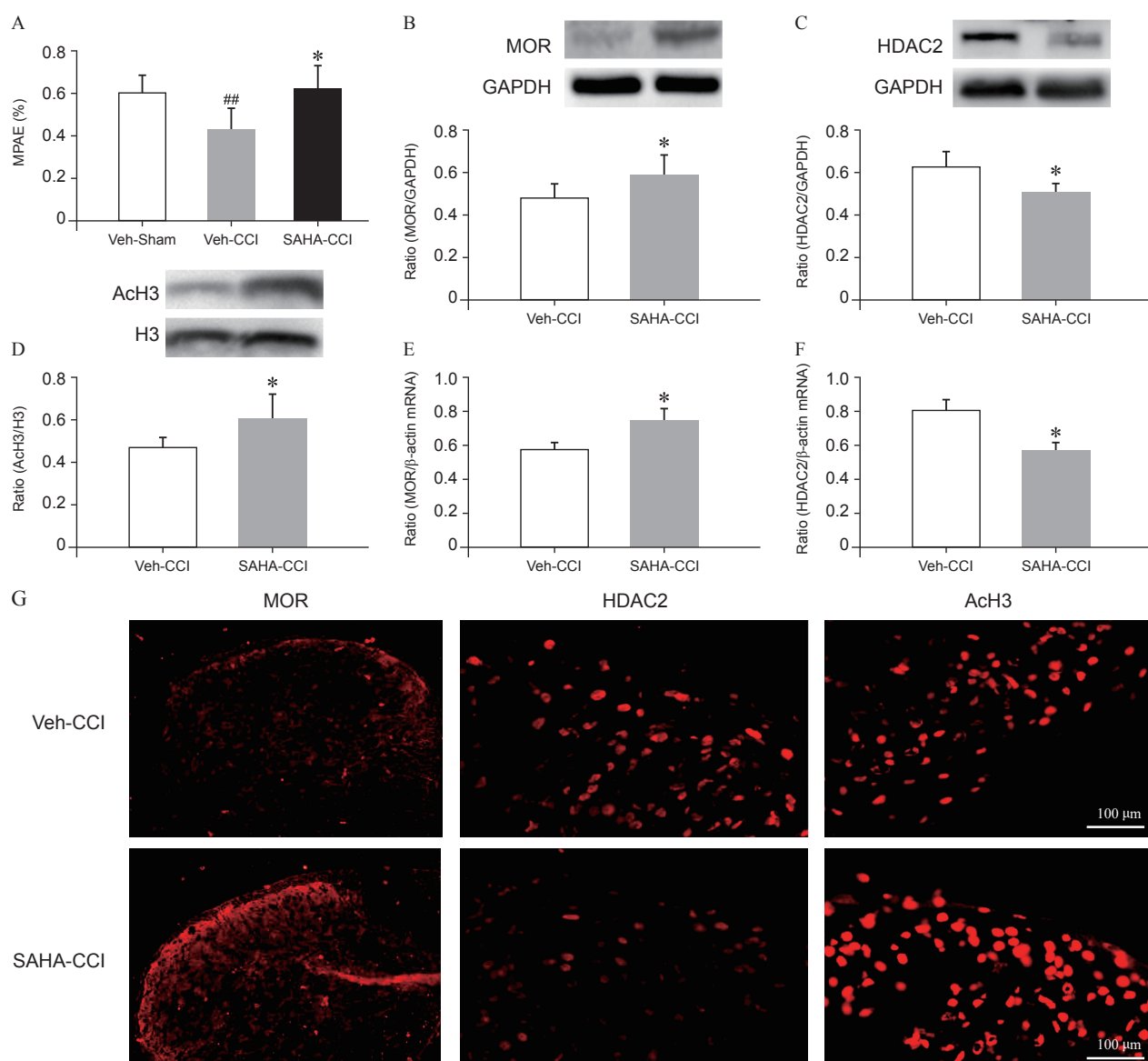
### 4. HDAC2 过表达降低正常小鼠脊髓背角中的 MOR 表达

将小鼠分为 AAV5-HDAC2 和 AAV5-EGFP 组。通过鞘内注射 AAV5-HDAC2 过表达脊髓内 HDAC2, 以此模拟 HDAC2 在神经病理性疼痛表达增加的过程。在脊髓 L<sub>5-6</sub> 椎间隙鞘内注射重组腺相关病毒 5 (AAV5) 来实现在该节段脊髓背角表达全长 HDAC2 (AAV5-HDAC2)。注射后第 28 天, 和对照组相比, 测量小鼠的 TWL, 计算吗啡的 MPAGE, 脊髓过表达 HDAC2 后吗啡的镇痛效能降低 (见图 5A), 同时, Western blot 和 qRT-PCR 显示 HDAC2 的过表达降低了 MOR 和 AcH3 的表达水平。单独应用 AAV5-EGFP 不会改变 MOR 蛋白水平 (见图 5B-D)。qRT-PCR 显示过表达 HDAC2 对 MOR 的转录有抑制作用 (见图 5E、F)。综上所述, MOR



**图 2** 免疫荧光显示 MOR 主要表达在脊髓背角浅层 I-II, 损伤组较对照组表达降低; HDAC2 在脊髓与神经元共标, 神经损伤侧表达较对照组增加; AcH3 在脊髓广泛表达, 与细胞核共标, 神经损伤组较对照组表达降低。红色: 目标蛋白; 绿色: 神经元; 蓝色: 细胞核 标尺 = 100 μm

**Fig. 2** IF showed MOR located mainly in the I-II layers of the spinal cord while HDAC2 and AcH3 expressed widely in the spinal cord. Both of them merged well with nucleus. An obvious decrease was shown in the expression of the MOR and AcH3 and the expression of HDAC2 increased in the CCI group 7 days after surgery. red: target protein; green: neurons; blue: nucleus. Scale bar = 100 μm



**图 3** 降低 HDAC2 的表达可增加 MOR 的表达, 增强吗啡的镇痛作用 ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 与 Veh-Sham 组相比, Veh-CCI 组在术后 3 天吗啡的最大可能镇痛效应明显降低, 而在鞘内连续给 SAHA 后吗啡的镇痛效应明显增加,  $n = 6$  (每组用 6 只)。 (B, E) 鞘内给 SAHA 后 7 天脊髓损伤节段 MOR 蛋白的表达增加, MOR mRNA 的水平增加; (C, F) 鞘内给 SAHA 后 7 天, 脊髓 HDAC2 在蛋白水平和基因转录水平表达均有明显下降; (D) SAHA 促进组蛋白的乙酰化水平,  $n = 6$  (每组用 4 只); (G) 免疫荧光进一步证实各蛋白在鞘内注射 SAHA 7 天后在脊髓的表达改变情况。给 SAHA 后 7 天, MOR 的表达增加, HDAC2 表达降低, AcH3 表达增加,  $n = 4$  (每组用 3 只) 标尺 = 100  $\mu m$

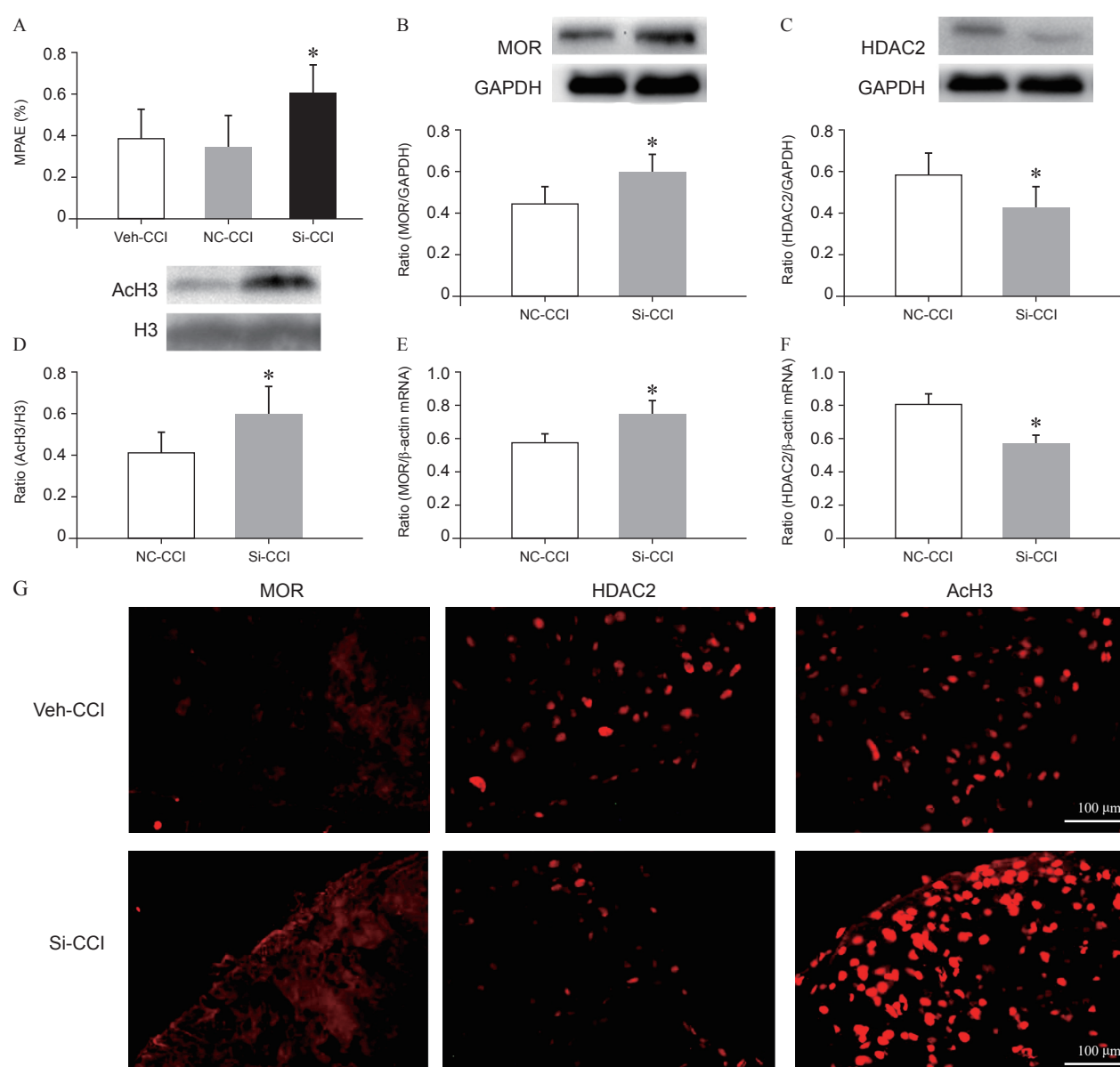
\* $P < 0.05$ , SAHA-CCI 组与 Veh-CCI 组相比; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , Veh-CCI 组与 Veh-Sham 组相比

**Fig. 3** Decreased HDAC expression is associated with increased expression of MOR and enhanced analgesic effect of morphine ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) Compared with the Veh-Sham group, the MPAE of morphine is significantly reduced in the Veh-CCI group 3 days after surgery,  $n = 6$  mice/group; (B, E) The expression of MOR protein increased and the level of MOR mRNA increased on the injury side of the spinal cord 7 days after intrathecal administration of SAHA; (C, F) 7 days after intrathecal administration of SAHA, the expression of HDAC2 in the spinal cord is decreased at both protein level and transcription level; (D) SAHA promote acetylation levels of histones,  $n = 6$  (4 mice/group); (G) Immunofluorescence further confirm the expression change of each protein in the spinal cord 7 days after intrathecal injection of SAHA. 7 days after SAHA, the expression of MOR and AcH3 increased, while the expression of HDAC2 decreased,  $n = 4$  (3 mice/group). Scale bar = 100  $\mu m$

\* $P < 0.05$ , group SAHA-CCI compared with group Veh-CCI, <sup>##</sup> $P < 0.01$ , group Veh-CCI compared with group Veh-Sham.





**图 4** 脊髓 HDAC2 下调增加损伤侧脊髓中的 MOR 和 AcH3 表达 ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 鞘内注射 HDAC2 siRNA 后 7 天 Si-CCI 组吗啡的 MPAGE 明显高于 NC-CCI 组, 差异有统计学意义,  $n = 6$  (每组用 4 只); (B-D) Western blot 显示鞘内给 HDAC2 siRNA 7 天后, MOR 蛋白水平增加, HDAC2 蛋白水平降低, AcH3 蛋白水平增加,  $n = 6$  (每组用 4 只); (E, F) qRT-PCR 显示鞘内给 HDAC2 siRNA 7 天后, MOR mRNA 水平增加, HDAC2 mRNA 水平降低,  $n = 4$  (每组用 3 只); (G) 免疫荧光显示在给 HDAC2 siRNA 后各蛋白水平的改变, 与对照组相比, 给 HDAC2 siRNA 后 MOR 的表达增加, HDAC2 表达降低, AcH3 表达增加,  $n = 4$  (每组用 3 只) 标尺 = 100  $\mu m$

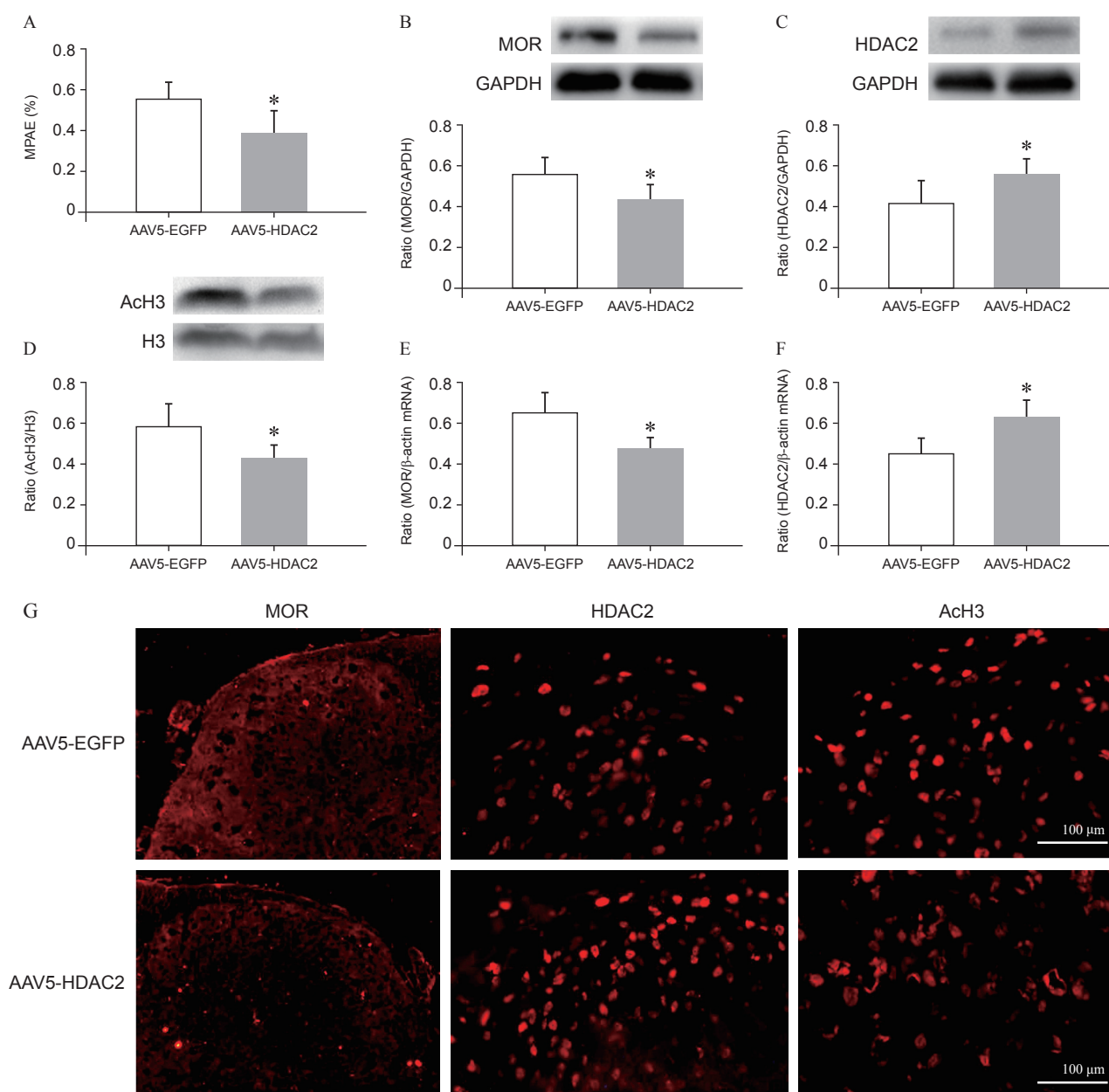
\* $P < 0.05$ , Si-CCI 组与 NC-CCI 组相比

**Fig. 4** Down-regulation of spinal cord HDAC2 increases MOR and AcH3 expression in the injured side of the spinal cord ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) The MPAGE of morphine is significantly higher in the Si-CCI group than in the NC-CCI group, 7 days after intrathecal injection of HDAC2-siRNA.  $n = 6$  mice/group; (B-D) 7 days after intrathecal administration of HDAC2 siRNA, western blot shows the expression of MOR and AcH3 protein levels increase, while HDAC2 protein decrease.  $n = 6$  (4 mice/group); (E, F) qRT-PCR shows an increase of MOR mRNA levels and a decrease of HDAC2 mRNA levels 7 days after intrathecal administration of HDAC2 siRNA.  $n = 4$  (3 mice/group); (G) Immunofluorescence shows the changes in the levels of each protein after HDAC2 siRNA administration, the expression of MOR and AcH3 protein levels increase, while HDAC2 protein decrease. compared with the Veh-Sham group.  $n = 4$  (3 mice/group). Scale bar = 100  $\mu m$

\* $P < 0.05$ , group Si-CCI compared with group NC-CCI.





**图 5** HDAC2 过表达降低正常小鼠损伤侧脊髓背角中的 MOR 表达 ( $\bar{x} \pm SEM$ )

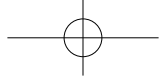
(A) 鞘内注射 AAV5-HDAC2 后 28 天, 和对照组相比, 吗啡的镇痛效应降低,  $n = 6$  (每组用 6 只); (B-D) Western blot 显示过表达 HDAC2 后 MOR 表达降低, HDAC2 表达增加, AcH3 表达降低,  $n = 6$  (每组用 4 只); (E,F) qRT-PCR 显示, 过表达 HDAC2 后 HDAC2 的 mRNA 水平增加, MOR 的 mRNA 的水平降低,  $n = 4$  (每组用 3 只); (G) 免疫荧光显示过表达 HDAC2 后各蛋白在脊髓的表达情况。MOR 表达降低, HDAC2 表达增加, AcH3 表达降低,  $n = 4$  (每组用 3 只) 标尺 = 100  $\mu m$

\* $P < 0.05$ , AAV5-HDAC2 组与 AAV5-EGFP 组相比

**Fig. 5** HDAC2 overexpression downregulates MOR expression in the ipsilateral spinal dorsal horn of mice ( $\bar{x} \pm SEM$ )

(A) 28 days after intrathecal injection of AAV5-HDAC2, the analgesic effect of morphine is reduced compared with the control group.  $n = 6$  mice/group; (B-D) Western blot shows that MOR expression is decreased after overexpression of HDAC2, while HDAC2 expression is increased. Overexpression of HDAC2 decrease the acetylation of histone H3.  $n = 6$  (4 mice/group); (E,F) qRT-PCR shows that HDAC2 mRNA levels are increased after overexpression of HDAC2, and MOR mRNA levels are decreased.  $n = 4$  (3 mice/group); (G) Immunofluorescence shows an increased expression of MOR and while inhibit the expression of HDAC2. The acetylation of histone H3 increase as well.  $n = 4$  (3 mice/group). Scale bar = 100  $\mu m$

\* $P < 0.05$ , group AAV5-HDAC2 compared with group AAV5-EGFP.



在神经损伤后表达的降低很有可能是由脊髓背角 HDAC2 表达增加所导致的。

## 讨 论

根据去乙酰化酶的初级结构和二级结构, 人类 HDACs 可分为 4 类共 18 型。I 类包括 HDAC1, 2, 3, 8, 主要分布在细胞核内。II 类包括 II a (HDAC4, 5, 7, 9), II b (HDAC6, 10), 主要根据所受刺激在胞质和胞核中穿梭。III 类包括 SIRT1-7, 是一群依赖 NAD 的酶, 主要分布于细胞核、细胞质和线粒体内。IV 类只有 HDAC11, 作用兼具 I 和 II 类<sup>[24,25]</sup>。本实验主要研究了几种在神经系统表达丰富的亚型 HDAC1, 2, 4, 5。通过 Western blot 和 qRT-PCR 发现, 在 CCI 模型中, 与对照组相比, 脊髓 HDAC2 稳定且明显的升高, 神经元和胶质细胞都有表达。同时 HDAC1 也有升高的趋势, 这和之前的多项研究一致<sup>[20,26-28]</sup>。与对照组相比, MOR 的表达在术后 7 天明显的下降。考虑到 HDAC2 的表观遗传作用, 提出 HDAC2 对 MOR 有调节作用。通过鞘内注射 HDACs 的泛抑制剂 SAHA, 以及 HDAC2 siRNA 降低神经病理性疼痛情况下升高的 HDAC2, 与对照组相比, MOR 的表达有所提高, 且差异有统计学差异。通过鞘内注射 AAV5-HDAC2 过表达正常小鼠脊髓的 HDAC2, HDAC2 表达增加后 MOR 的表达降低。充分证实了 HDAC2 对 MOR 表达的调节作用, 并且这种调节可能是通过 MOR 基因启动子区的组蛋白的去乙酰化实现的。

组蛋白乙酰化和去乙酰化是生物过程中的两种主要组蛋白修饰。已有多项研究表明神经损伤上调组蛋白去乙酰化酶, 导致组蛋白去乙酰化增加并引起慢性疼痛<sup>[29,30]</sup>。组蛋白去乙酰化酶抑制剂可以通过使神经损伤诱导的代谢型谷氨酸受体<sup>[31]</sup>、谷氨酸转运蛋白、谷氨酸脱羧酶 65<sup>[30]</sup>、肿瘤坏死因子  $\alpha$ <sup>[32]</sup>、神经元限制性沉默因子<sup>[2]</sup>和血清和糖皮质激素诱导激酶 1<sup>[33]</sup>的下调正常化来减轻疼痛。另一方面, 有研究发现神经损伤导致组蛋白的乙酰酶的表达, 促进组蛋白乙酰化导致疼痛<sup>[34,35]</sup>。之前有研究表明, 组蛋白乙酰转移酶抑制剂可以通过阻断趋化因子和环氧合酶-2 的上调来缓解慢性疼痛<sup>[36,37]</sup>, 趋化因子和环氧合酶-2 是与组蛋白乙酰化诱导疼痛的关键因素。本实验在对 CCI 小鼠的研究中发现神经损伤组中损伤侧脊髓 HDAC2 的水平有明显且稳定的升高, 组蛋白 H3 的乙酰化明显低于假手术组, 正如 Liang 等的发现<sup>[19]</sup>。HDAC2 可能通过降低 MOR 基因启

动子乙酰化从而抑制 MOR 的基因转录, 降低 MOR 的表达。然而, 在神经病理性疼痛模型的术后 7 天, 组蛋白乙酰化存在全面降低, 而应用 HDAC2 siRNA 敲减脊髓 HDAC2 后, 组蛋白 H3 的乙酰化全面增高, 说明 HDAC2 调节基因转录的选择性不强, 这也限制了 HDAC2 抑制剂在吗啡镇痛方面的应用。本研究也存在一些不足之处, 结果提示外周神经损伤后脊髓 HDAC2 通过降低组蛋白 H3 的乙酰化水平降低 MOR 在脊髓背角的表达, 但并没有检测 MOR 基因启动子区的组蛋白 H3 的乙酰化水平, 因此还需要进行下一步的研究来具体说明。

综上所述, 脊髓背角 HDAC2 表达增加可能是导致神经病理性疼痛情况下 MOR 表达降低的一个因素。但由于其会广泛影响组蛋白 H3 的乙酰化, 所以 HDAC 抑制剂在临床上的应用受到限制, 需要更有针对性的药物出现来辅助吗啡在神经病理性疼痛的治疗。

## 参 考 文 献

- [1] 朱谦, 樊碧发, 张达颖. 周围神经病理性疼痛诊疗中国专家共识 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(5):321-328.
- [2] Uchida H, Ma L, Ueda H. Epigenetic gene silencing underlies C-fiber dysfunctions in neuropathic pain[J]. J Neurosci, 2010, 30(13):4806-4814.
- [3] Bouhassira D, Attal N. Translational neuropathic pain research: A clinical perspective[J]. Neuroscience, 2016, 338:27-35.
- [4] Albers JW, Pop-Busui R. Diabetic neuropathy: Mechanisms, emerging treatments, and subtypes[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2014, 14(8):473.
- [5] 景磊, 雷静, 尤浩军. 糖尿病性周围神经病理性疼痛表现、机制及治疗进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(9):649-652.
- [6] Li J, He J, Li H, et al. Proportion of neuropathic pain in the back region in chronic low back pain patients-a multi-center investigation[J]. Sci Reports, 2018, 8(1):16537.
- [7] Martinez-Navarro M, Maldonado R, Banos JE. Why mu-opioid agonists have less analgesic efficacy in neuropathic pain?[J]. Eur J Pain, 2018, 23(3):435-454.
- [8] Cooper TE, Chen J, Wiffen PJ, et al. Morphine for chronic neuropathic pain in adults[J]. Cochrane DB Syst Rev, 2017, 5:Cd011669.
- [9] Els C, Jackson TD, Hagtvædt R, et al. High-dose opioids for chronic non-cancer pain: An overview of Cochrane Reviews[J]. Cochrane DB Syst Rev, 2017, 10:Cd012299.
- [10] 张静泽, 王宇飞, 武剑. 神经病理性疼痛药物治疗

- 史 [J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(12):70-75.
- [11] Rojewska E, Wawrzczak-Bargiela A, Szucs E, *et al.* Alterations in the activity of spinal and thalamic opioid systems in a mice neuropathic pain model[J]. Neuroscience, 2018, 390:293-302.
- [12] Razin A, Riggs AD. DNA methylation and gene function[J]. Science, 1980, 210(4470): 604-610.
- [13] Geranton SM, and Tochiki KK. Regulation of gene expression and pain states by epigenetic mechanisms[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015, 131:147-83.
- [14] Li Z, Li X, Chen X, *et al.* Emerging roles of long non-coding RNAs in neuropathic pain[J]. Cell proliferation, 2019, 52(1):e12528.
- [15] Wu S, Bono J, and Tao YX. Long noncoding RNA (lncRNA): A target in neuropathic pain[J]. Exp Opin Ther Tar, 2019, 3(1):15-20.
- [16] Mao Y, Zhou J, Liu X, *et al.* Comparison of Different Histone Deacetylase Inhibitors in Attenuating Inflammatory Pain in Rats[J]. Pain Res Manag, 2019. doi: 10.1155/2019/1648919.
- [17] de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, *et al.* Histone deacetylases (HDACs): Characterization of the classical HDAC family[J]. Biochem J, 2003, 370(Pt 3):737-749.
- [18] Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation[J]. Ann Rev Biochem, 2007, 76:75-100.
- [19] Liang L, Tao YX. Expression of acetyl-histone H3 and acetyl-histone H4 in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn in rat chronic pain models[J]. Life sciences, 2018, 211:182-188.
- [20] Hou X, Weng Y, Wang T, *et al.* Suppression of HDAC2 in spinal cord alleviates mechanical hyperalgesia and restores KCC2 expression in a rat model of bone cancer pain[J]. Neuroscience, 2018, 377:138-149.
- [21] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33(1):87-107.
- [22] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. Pain, 1988, 32(1):77-88.
- [23] Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: A new technique[J]. Eur J Pharmacol, 1980, 67(2-3):313-316.
- [24] Cho Y, Cavalli V. HDAC signaling in neuronal development and axon regeneration[J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 27:118-126.
- [25] Wang W, Cui SS, Lu R, Zhang H. Is there any therapeutic value for the use of histone deacetylase inhibitors for chronic pain? [J]. Brain Res Bull, 2016, 125:44-52.
- [26] Wang SE, Ko SY, Jo S, *et al.* TRPV1 regulates stress responses through HDAC2[J]. Cell Reports, 2017, 19(2):401-412.
- [27] Hu XF, He XT, Zhou KX, *et al.* The analgesic effects of triptolide in the bone cancer pain rats via inhibiting the upregulation of HDACs in spinal glial cells[J]. J Neuroinflamm, 2017, 14(1):213.
- [28] Liao YH, Wang J, Wei YY, *et al.* Histone deacetylase 2 is involved in microopioid receptor suppression in the spinal dorsal horn in a rat model of chronic pancreatitis pain[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2):2803-2810.
- [29] Cherng CH, Lee KC, Chien CC, *et al.* Baicalin ameliorates neuropathic pain by suppressing HDAC1 expression in the spinal cord of spinal nerve ligation rats[J]. J Formos Med Associ, 2014, 113(8):513-520.
- [30] Zhang Z, Cai YQ, Zou F, *et al.* Epigenetic suppression of GAD65 expression mediates persistent pain[J]. Nat Med, 2011, 17(11):1448-1455.
- [31] Chiechio S, Zammataro M, Morales ME, *et al.* Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain[J]. Mol Pharmacol, 2009, 75(5):1014-1020.
- [32] Kukkar A, Singh N, and Jaggi AS. Attenuation of neuropathic pain by sodium butyrate in an experimental model of chronic constriction injury in rats[J]. J Formos Med Associ, 2014, 113(12):921-928.
- [33] Lin TB, Hsieh MC, Lai CY, *et al.* Modulation of nerve injury-induced HDAC4 cytoplasmic retention contributes to neuropathic pain in rats[J]. Anesthesiology, 2015, 123(1):199-212.
- [34] Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, *et al.* Epigenetic augmentation of the macrophage inflammatory protein 2/C-X-C chemokine receptor type 2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves elicits neuropathic pain[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 340(3):577-587.
- [35] Sun Y, Sahbaie P, Liang DY, *et al.* Epigenetic regulation of spinal CXCR2 signaling in incisional hypersensitivity in mice[J]. Anesthesiology, 2013, 119(5):1198-208.
- [36] Zhu XY, Huang CS, Li Q, *et al.* p300 exerts an epigenetic role in chronic neuropathic pain through its acetyltransferase activity in rats following chronic constriction injury (CCI) [J]. Mol Pain, 2012, 8:84.
- [37] Manjavachi MN, Quintao NL, Campos MM, *et al.* The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice[J]. Eur J Pain, 2010, 14(1):23-31.