

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2021.10.005

• 论 著 •

miR-99b-5p 靶向 FGFR3 对紫杉醇诱导慢性神经病理性疼痛形成的影响 *

韩 聪¹ 徐 力¹ 曾文玉¹ 辜文艳² 刘 庆^{1△}(西南医科大学附属中医医院¹ 疼痛科; ² 手术室, 泸州 646000)

摘 要 目的: 探讨 miR-99b-5p 对紫杉醇诱导的大鼠慢性神经病理性疼痛的影响。**方法:** 成年 SD 雄性大鼠, 按照简单随机化的方法分为空白组 (blank)、紫杉醇模型组 (model)、agomiR-99b-5p 治疗组和 agomiR-NC 对照组, 每组 8 只。采用隔日腹腔注射紫杉醇 (2 mg/kg, 共 4 次) 的方法制备紫杉醇诱导的慢性神经病理性疼痛大鼠模型。检测大鼠机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL); RT-qPCR 检测 miR-99b-5p 的表达, 判断 agomiR-99b-5p 的激活作用和背根神经节中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量的变化; Western Blot 检测背根神经节成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 的变化; 双荧光素酶报告基因实验检测 miR-99b-5p 对 FGFR3 的靶向作用。**结果:** agomiR-99b-5p 能显著增加大鼠背根神经节 miR-99b-5p 的含量, 降低紫杉醇诱导的慢性神经病理性疼痛大鼠的 MWT 和 TWL, 同时也能显著下调背根神经节的炎症因子水平。荧光素酶结果表明相对于 NC 模拟物 (mimic) 组, miR-99b-5p mimic 能够抑制 FGFR3 的表达。**结论:** miR-99b-5p 能够影响 FGFR3 的表达, 进而抑制背根神经节炎症因子的含量, 达到降低紫杉醇诱导大鼠慢性神经病理性疼痛的目的。

关键词 紫杉醇; 慢性神经痛; miR-99b-5p; 成纤维细胞生长因子受体 3

miR-99b-5p targeting FGFR3 inhibits the paclitaxel-induced chronic neuralgia *

HAN Cong¹, XU Li¹, ZENG Wenyu¹, GU Wenyang², LIU Qing^{1△}

(1 Department of Pain Medicine; 2 Department of Operating Theatre, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of miR-99b-5p on paclitaxel-induced chronic neuralgia in rats. **Methods:** Following the simple randomization method, male SD rats were divided into the blank group, paclitaxel model group, agomiR-99b-5p group and agomiR-NC group. Paclitaxel-induced chronic neuralgia rats were prepared by intraperitoneal injection of paclitaxel (2 mg/kg, four times in total) every other day. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) were measured in these rats. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-99b-5p, TNF- α , IL-6, and IL-1 β in dorsal root ganglia of rats. Western Blot was used to detect the expression of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), and luciferase assay was used to detect the targeting effect of miR-99b-5p on FGFR3. **Results:** AgomiR-99b-5p significantly increased the concentration of miR-99b-5p in the dorsal root ganglia, reduced the MWT and TWL in paclitaxel-induced chronic neuralgia rats, and significantly down-regulated the levels of inflammatory factors in dorsal root ganglia. The luciferase experiment indicated that miR-99b-5p mimic inhibited FGFR3 expression compared with the NC mimic group. **Conclusion:** MiR-99b-5p can target and inhibit the expression of FGFR3, and further inhibit the concentrations of inflammatory factors in dorsal root ganglia, thus alleviating paclitaxel-induced chronic neuralgia in rats.

Keywords paclitaxel; chronic neuralgia; miR-99b-5p; fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)

* 基金项目: 西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合项目 (2020XYLH-055)

△ 通信作者 刘庆 1105859368@qq.com

紫杉醇 (paclitaxel, PTX) 是属于紫杉烷类的一种天然生物碱, 目前作为临床一线广谱使用的抗肿瘤药物, 抗肿瘤疗效较好, 已被大量应用于癌症病人救治^[1]。紫杉醇能够控制微管蛋白发生聚合, 保持微管蛋白的稳定性, 抑制细胞有丝分裂进而抑制恶性肿瘤细胞的增殖从而达到治疗效果^[2]。但是, 目前仍存在着许多临床问题, 在治疗过程中表现的药物神经毒性问题仍未得到解决, 病人会在治疗后数月或者数年持续存在神经病理性疼痛通常是由药物造成的感觉系统损伤引起的^[3]。这种剧烈的疼痛给病人带来身体和精神上巨大的痛苦, 已经成为紫杉醇在治疗肿瘤方面存在的不容忽视的健康问题^[4]。

MicroRNA (miRNA) 通常是具由 19~25 个核苷酸组成的高度保守非编码小分子单链 RNA^[5]。MicroRNA 在外周神经具有调节神经元的兴奋性参与和维持慢性神经病理性疼痛的作用, 如过表达的 miR-7a 对大鼠神经病理性疼痛具有保护作用^[6]。背根神经节是感觉传导的初级神经元, 在疼痛的外周发病机制中有着不可忽视的作用^[7]。miR-99b-5p 能够参与肿瘤和关节炎发病过程, 同时 miR-99b-5p 也能调控 Akt/mTOR/STAT3 信号通路修复脊髓损伤^[8]。agomir-99b-5p 是经过特殊化学修饰的 miR-99b-5p 激动剂, 可直接注射于动物体内。通过生物信息学分析发现成纤维细胞生长因子受体 3 (fibroblast growth factor receptor 3, FGFR3) 的 3'-非编码区 (3'-untranslated region, 3'-UTR) 是 miR-99b-5p 潜在靶点。FGFR3 是成纤维细胞生长因子受体家族成员 (FGFR1-4) 之一, 作为一种酪氨酸激酶受体, 包含了配体结合结构域、跨膜结构域和酪氨酸激酶结构域^[9]。FGFR3 在与配体 (如 FGF2/9/18) 结合后, 其酪氨酸激酶结构区发生磷酸化, 进而激活下游 RAS-MAPK、PI3K-AKT、MEK/ERK、PLC γ 和 STAT 等胞内信号通路^[10,11]。这些信号通路与炎症的发生发展密切相关, 同时, 促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 通过增强兴奋性电流、抑制抑制性电流、促进 NMDA 释放兴奋递质谷氨酸等影响神经病理性疼痛^[12]。因此, 通过本研究可获得 miR-99b-5p 过表达可能通过负向调控 FGFR3 表达, 从而抑制炎症反应, 进而改善神经痛行为的实验数据, 形成 miR-99b-5p 作为化疗药物毒副作用治疗靶点的理论体系。

方 法

1. 实验材料

紫杉醇针剂购买于海南中化联合药业; 双报

告基因检测试剂盒购买于上海翊圣生物科技有限公司。Trizol 和 RT-qPCR 试剂盒 (反转加定量) 购买于日本 TAKARA 公司; FGFR3 抗体购买于 ABCAM (ab231442) 公司。h-FGFR3 双荧光载体构建于上海生工生物科技有限公司。

2. 方法

(1) 实验动物饲养及模型建立: 本实验动物进行的研究行为均严格遵守相关动物保护及使用规定, 并已通过西南医科大学实验动物福利伦理委员会批准 (SWMU20210385)。雄性 SPF 级大鼠, 8 周龄, 体重 220 ± 30 g, 购买于达硕动物实验中心, 生产许可证编号: SCXK (川) 2020-030。选择 10 只 SPF 级大鼠分为空白组和模型组, 模型组采用腹腔隔日注射紫杉醇 (2 mg/kg, 共 4 次) 的方法制备紫杉醇诱导慢性神经病理性疼痛小鼠模型, 空白组注射等体积无紫杉醇药物溶剂, 进行预实验, 检测大鼠 miR-99b-5p 和 FGFR3 的变化以及行为学的改变。预实验结束后再选择 32 只 SPF 级大鼠作为研究对象, 适应性喂养 1 周, 大鼠按照简单随机化的方法随机分为空白组 (blank)、紫杉醇模型组 (model)、agomiR-99b-5p 治疗组和 agomiR-NC 对照组, 每组 8 只。

按照预实验方法进行模型建立, 在药物注射后相同时间点每日尾静脉注射 agomiR-99b-5p 和 agomiR-NC, 在实验最后一次注射 agomiR-99b-5p 和 agomiR-NC 后, 当日 1 h 和 3 h 分别检测各组大鼠后足机械缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)。完成行为学试验后处死大鼠, 收集各组大鼠背根神经节, 用 RT-qPCR 法检测背根神经节中 miR-99b-5p、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 含量, Western Blot 检测 FGFR3 表达。

(2) 行为学测定: 使用 von Frey 纤维丝推算大鼠 50% 缩足阈值: 透明有机玻璃箱 (22 cm $\times$ 12 cm $\times$ 22 cm) 安置在 40 cm 高的金属筛网上, 大鼠置于箱内安静适应 15 min, 使用 von Frey 纤维丝垂直刺激大鼠右侧后肢足底中部, 持续时间 6~8 s, 大鼠表现为抬足或舔足被判定为阳性反应, 相反则为阴性。最大刺激克数为 15 g, 大于 15 g 时也记为 15 g, 每次刺激间隔 30 s。首先从 2 g 纤维丝刺激开始, 当该力度刺激不能造成阳性反应, 则使用相邻大一级力度的刺激, 如出现阳性反应则使用相邻小一级力度的刺激, 连续操作, 直到第 1 次阳性反应出现为止, 再连续测试 4 次。使用热辐射法测定大鼠 TWL, 将有机玻璃箱置于 3 mm 厚的玻璃板上, 对大鼠右侧

后肢足底使用辐射热测痛仪照射,测试前大鼠安静适应 15 min。以 5 mm 光斑照射大鼠右侧第一足趾下着力点开始计时,直至大鼠出现抬腿回避时为一次有效数据。为防止大鼠足底灼伤,自动切断时间为 20 s。热刺激强度在实验过程中保持一致。每只大鼠测定 6 次,每 5 min 测试 1 次,去掉最大值和最小值,取 4 次测量的平均值作为 TWL。

(3) RT-qPCR 实验:用 Trizol 试剂盒提取大鼠背根神经节 mRNA,利用逆转录试剂盒进行逆转录合成 cDNA。严格按照试剂盒要求进行实时荧光定量操作, GAPDH 作为内参。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达式。miR-99b-5p 的引物由 miRBASE 数据库获得成熟序列,采用加尾法设计获得,其他引物由文献获得并在 NCBI Primerblast 进行验证后由上海生工生物合成科技有限公司采用 PAGE 技术合成。引物 miR-99b-5p: 5'-CACCCGTAGAACCGACCTTGC-3', 5'-CAGTGCGTGTCTGGAGT-3'; U6: 5'-CTC-GCTTCGCTTCGGCAGCACA-3', 5'-AACGCTTGAG-GAATTTGCGT-3'; IL-1 β : 5'-CGACAAGAGCTTCAG-GAAGGCAGTG-3', 5'-TGGGTCAGACAGCACAGG CATT-3'; IL-6: 5'-CCGCAAGAGACTTCCAGC-CAGTTG-3', 5'-CGGAAC TCCAGAAGACCAGAG-CAGA-3'; TNF- α : 5'-CCACACCGTCAGCCGATTTC-CATT-3', 5'-TGAACACGCCAGTCGACTCACAGA-3'; GAPDH: 5'-TCGGCATTGTGG AGGGGCT C-3', 5'-TC-CCG TTCAGCTC GGGGATG-3'。

(4) Western Blot 实验:将大鼠背根神经节进行组织匀浆裂解,用 BCA 蛋白浓度试剂盒测量蛋白浓度, SDS-PAGE 进行分离,用 5% 的脱脂奶粉封闭后,使用等量蛋白质上样,选择 10% 的 SDS-PAGE 进行分离,转膜,结合一抗 (FGFR3)。4℃ 孵育过夜后 TBST 清洗,用对应的二抗室温孵育, ECL 暗室显色,使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像,以 β -actin 为内参,计算各蛋白的相对表达量。

(5) 双荧光素酶报告基因系统:设计构建 FGFR3 的 3'UTR 突变和未突变萤光素酶报告基因质粒,体外培养人胚肾 HEK-293T 细胞,用 LipofectamineTM 3000 将 miR-99b-5p mimics 或 NC-mimic 转染至对数期的 HEK-293T 细胞,继续培养 48 h 后收集细胞,根据试剂盒操作说明,取 50 μ l 细胞裂解液于半量板,多功能酶标仪上机检测各组细胞荧光强度。

3. 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,数据用均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示。组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way

ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 前期预实验及可行性验证

对大鼠按照空白组和模型组进行基础阈值测定,去除耐受性差异较大的个体,排除不可控干扰因素 (见图 1A, B)。前期预实验检测 miR-99b-5p 在背根神经节的表达,确定与空白组相比,模型组 miR-99b-5p 的表达显著降低 (见图 1C),证明实验的可行性。Western Blot 检测发现 FGFR3 在模型组背根神经节的表达相较于空白组显著升高 (见图 1D)。对完成注射紫杉醇诱导的大鼠模型,进行 MWT 和 TWL 检测,与空白对照组比,模型组 MWT 和 TWL 均显著低于空白组,提示模型建立成功 (见图 1E, F)。

2. agomiR-99b-5p 对大鼠痛觉行为及 FGFR3 蛋白的影响

在注射 agomiR-99b-5p 前,各组大鼠进行 MWT 和 TWL 检测基础痛阈值,剔除差异较大个体后,所有实验大鼠 MWT 和 TWL 在各组之间的基础阈值无显著性差异 (见图 2A, B)。大鼠最后一次注射 agomiR-99b-5p 后 1 h,后足 MWT 实验结果模型组显著低于空白组,显示空白组为 (14.78 ± 0.30)、模型组为 (8.85 ± 0.55)、agomiR-99b-5p 治疗组显著高于模型组为 (14.56 ± 0.38)、agomiR-NC 组为 (9.06 ± 0.34),见图 2C。在药物注射后 3 h 测量大鼠 TWL,结果显示发现大鼠空白组 TWL 反应时间为 (14.15 ± 0.65)、模型组 TWL (8.84 ± 0.50),模型组 TWL 和空白组相比反应明显缩短,提示模型组出现了热痛敏现象,模型组 TWL 反应时间明显缩短,表明建模成功;与模型组比,agomiR-99b-5p 治疗组反应时间为 (13.76 ± 0.63),与空白组几乎一致,而与 agomiR-NC 组 (9.14 ± 0.43) 比较,反应时间延长 (见图 2D)。完成行为学实验后处死大鼠,收集大鼠背根神经节进行 RT-qPCR 检测 agomiR-99b-5p 注射后大鼠 miR-99b-5p 的变化,治疗组 miR-99b-5p 含量明显高于模型组 (见图 2E)。将收集的大鼠背根神经节进行 Western Blot 检测,结果显示在 agomiR-99b-5p 治疗组 FGFR3 的含量明显低于模型组 (见图 2F)。

3. 大鼠背根神经节中炎症因子表达

取大鼠背根神经节,检测 agomiR-99b-5p 对大鼠背根神经节炎症因子的调控作用。模型组和 agomiR-NC 组 TNF- α 和 IL-6 无明显统计学差异,而与

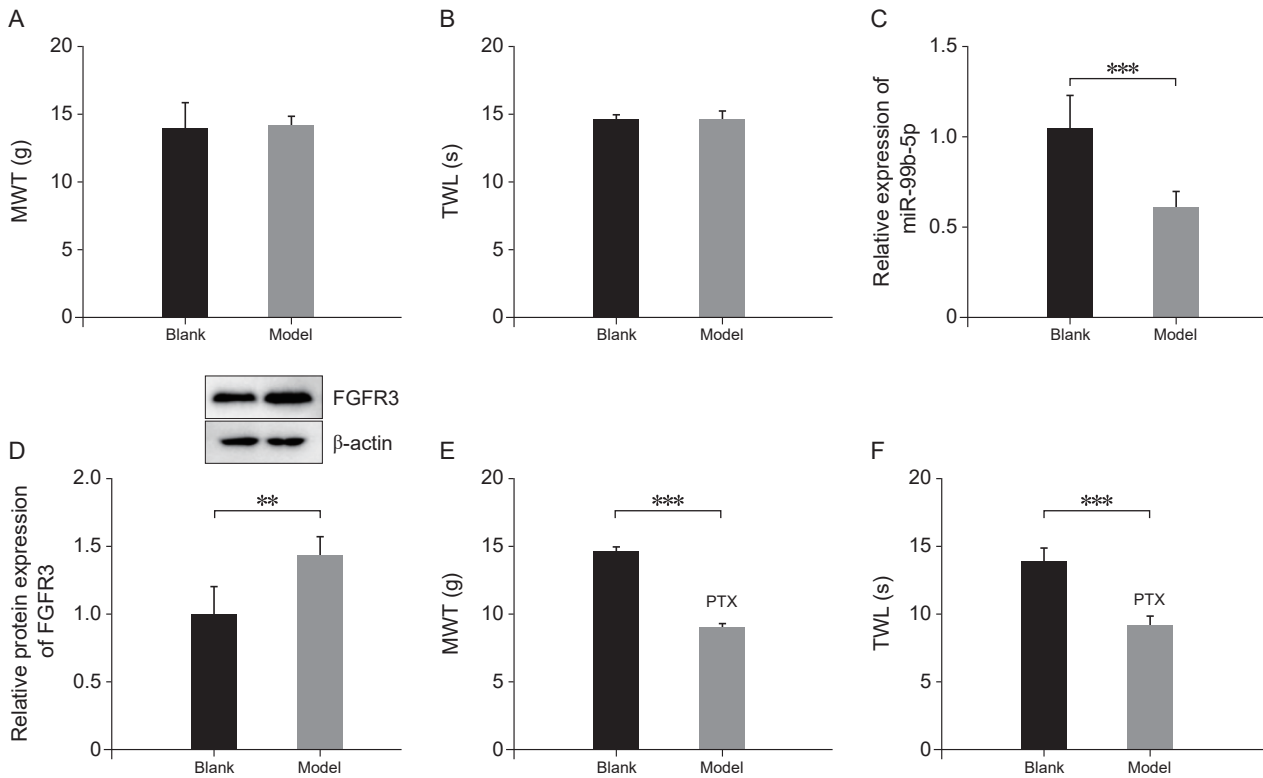


图1 FGFR3与miR-99b-5p在紫杉醇诱导疼痛模型的表达

(A) 空白组与模型组紫杉醇诱导前 MWT; (B) 空白组与模型组紫杉醇诱导前 TWL; (C) 空白组与模型组完成紫杉醇诱导后 miR-99b-5p 表达; (D) 空白组与模型组完成紫杉醇诱导后 FGFR3 蛋白显影及结果统计; (E) 紫杉醇诱导后大鼠 MWT; (F) 紫杉醇诱导后大鼠 TWL

** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, 与空白组相比

Fig. 1 Expression of FGFR3 and miR-99b-5p in Paclitaxel-induced rats Model

(A) MWT before paclitaxel induction in rats; (B) TWL before paclitaxel induction in rats; (C) Expression of miR-99b-5p after completion of paclitaxel induction in rats; (D) The protein level of FGFR3 after completion of paclitaxel induction in rats; (E) MWT after paclitaxel induction; (F) TWL after paclitaxel induction.

** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, compared with the group blank.

空白组比, 模型组 TNF- α 和 IL-6 水平较高。同时, 与模型组组比, agomiR-99b-5p 给药组 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低, 而与空白组则无明显差异 (见图 3A, B)。大鼠背根神经节中 IL-1 β 无统计学差异, 但与模型组相比, agomiR-99b-5p 给药组较模型组具有下降的趋势且与空白组一致 (见图 3C)。

4. 双荧光素酶报告基因验证 miR-99b-5p 对 FGFR3 的靶向抑制作用

通过 Targetscan 发现 FGFR3 是 miR-99b-5p 的潜在靶基因, 从数据库中获得了 miR-99b-5p 与 FGFR3 的结合位点 (见图 4A)。h-FGFR3 选择双荧光为载体构建质粒, 作为 miR-99b-5p 与 FGFR3 的靶向关系理论验证 (见图 4B)。报告基因结果显示, 与 NC mimics 相比, hsa-miR-99b-5p 能够显著抑制 h-FGFR3-3UTR-wt 质粒的转录活性, 而 NC mimics 和 hsa-miR-99b-5p 对 h-FGFR3-3UTR-mu 质粒的活性

则无影响 (见图 4C)。为进一步验证 miR-99b-5p 对 FGFR3 的靶向抑制作用, Western Blot 检测实验细胞 HEK-293T 的 FGFR3 的变化, 与 NC mimics 给药组相比, miR-99b-5p 的作用下 FGFR3 蛋白表达水平显著降低 (见图 4D)。

讨 论

神经病理性疼痛的发生机制较复杂, 为一种常见的慢性疾病, 为病人的生活带来了沉重的负担, 其具体发病机制并不明确, 临床表现为痛觉过敏及触觉异常性疼痛, 目前尚无非常有效的治疗药物^[13,14]。严进红等^[15]证明, 紫杉醇处理能引起大鼠脊髓中炎症因子 TNF- α 及 IL-1 β 的水平升高。miR-99b-5p 在脊髓损伤小鼠脊髓中高表达, 沉默 miR-99b-5p 能抑制脊髓损伤导致的神经元数量和神经突触数量减少^[16]。

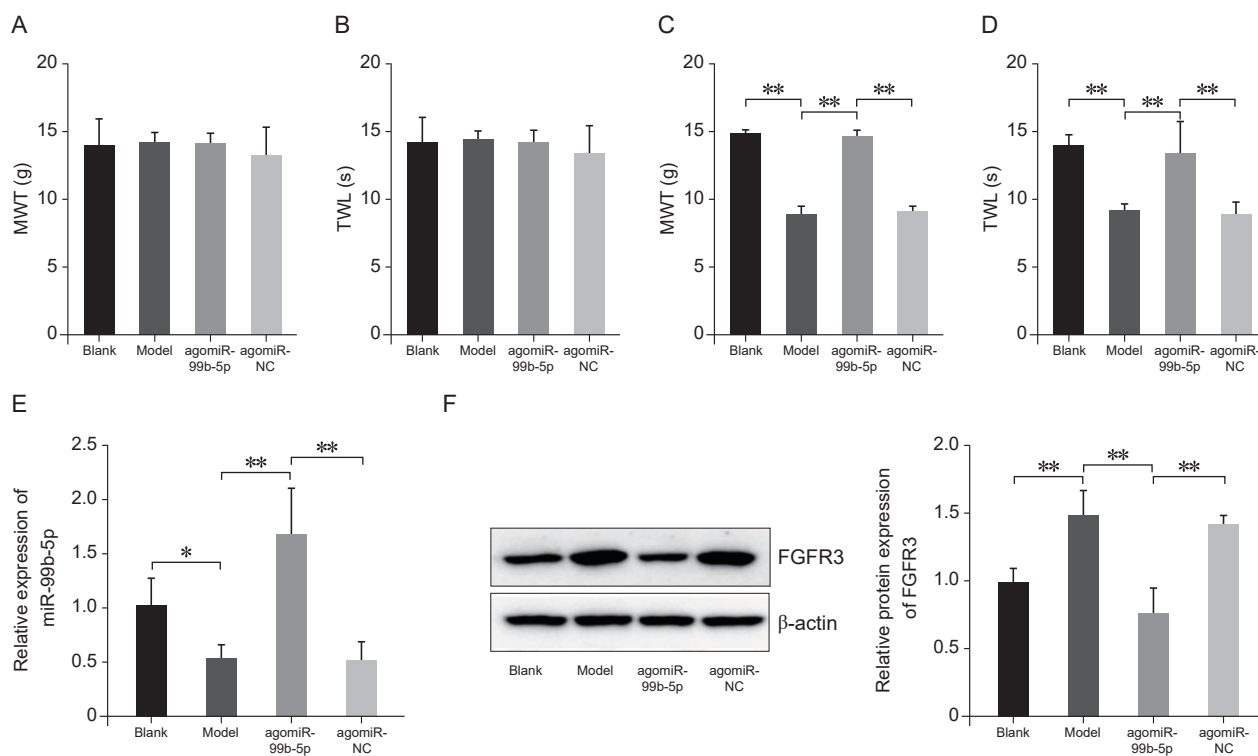


图2 agomiR-99b-5p 对大鼠痛觉行为及 FGFR3 蛋白的影响

(A) 紫杉醇诱导前 MWT 基础阈值; (B) 紫杉醇诱导前 TWL 基础阈值; (C) 给予 miR-99b-5p 后 MWT; (D) 治疗后 TWL; (E) 治疗后 miR-99b-5p; (F) 治疗后 FGFR3 蛋白显影及结果统计

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

Fig. 2 The effect of agomiR-99b-5p on pain behavior and FGFR3 protein expression in rats

(A) Basal threshold of MWT in rats before paclitaxel induction; (B) Basal threshold of TWL in rats before paclitaxel induction; (C) MWT in rats after treatment of miR-99b-5p; (D) TWL in rats after treatment; (E) miR-99b-5p level in rats after treatment; (F) The protein level of FGFR3 in rats after treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

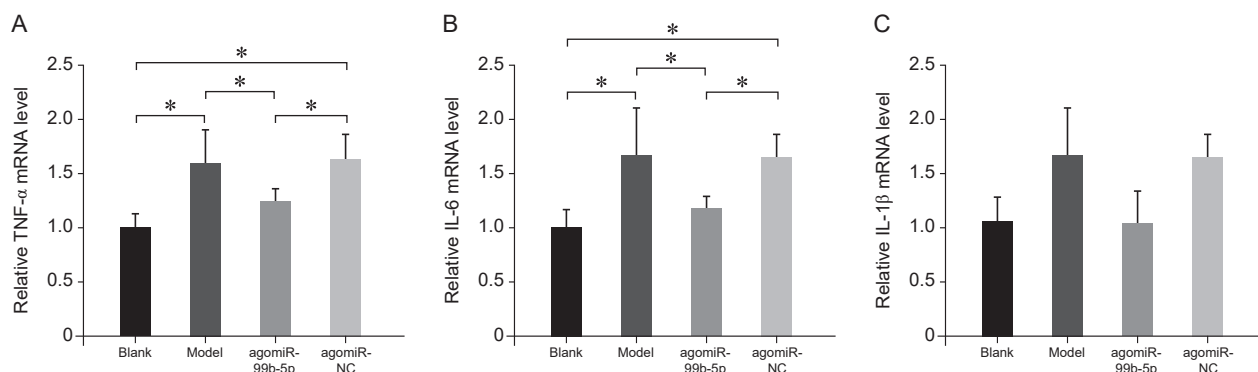


图3 大鼠背根神经节中炎症因子表达

(A) 治疗后 TNF- α mRNA 水平; (B) 治疗后 IL-6 mRNA 水平; (C) 治疗后 IL-1 β mRNA 水平

* $P < 0.05$

Fig. 3 The expression of inflammatory factors in rat dorsal root ganglion

(A) The mRNA level of TNF- α ; (B) The mRNA level of IL-6; (C) The mRNA level of IL-1 β . * $P < 0.05$

FGFR3 在多种疾病的炎症和免疫反应中发挥重要作用,能下调抑制机体的炎症损伤^[17]。本研究显示 agomiR-99b-5p 能够改善大鼠神经性疼痛的形成,双

荧光素酶实验证明 miR-99b-5p 能够靶向 FGFR3。实验结果表明 agomiR-99b-5p 治疗组炎症因子的表达水平也显著低于紫杉醇诱导模型组。miR-99b-5p 靶向

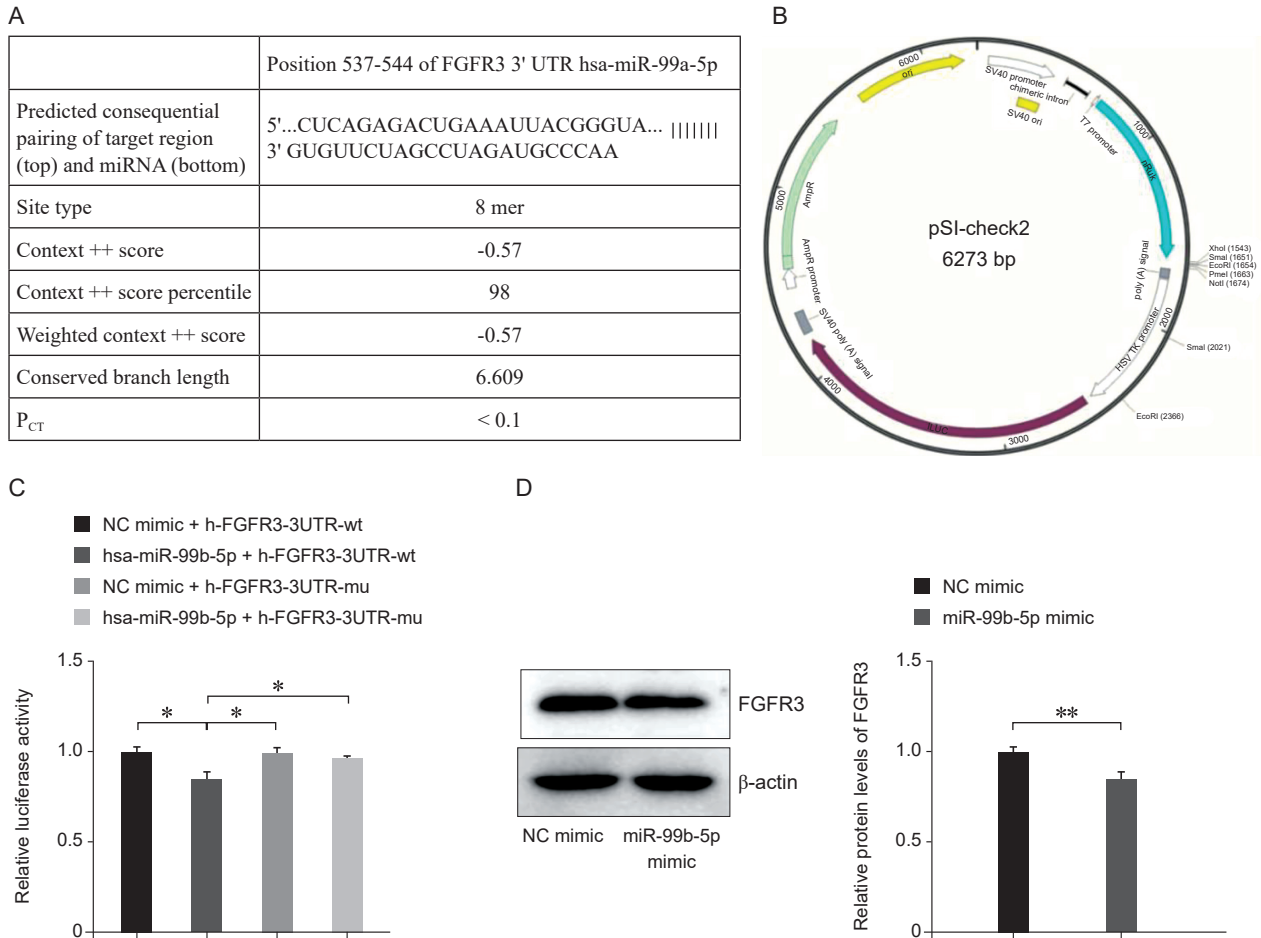


图4 miR-99b-5p 对 FGFR3 的靶向抑制作用

(A) Targetscan 获得 miR-99b-5p 与 FGFR3 的结合位点图; (B) h-FGFR3 双荧光质粒结构示意图; (C) 双报告基因 miR-99b-5p 与 FGFR3 靶向关系验证结果统计图; (D) HEK-293T 细胞中 FGFR3 的表达

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

Fig. 4 The targeted inhibitory effect of miR-99b-5p on FGFR3

(A) Binding site map of miR-99b-5p and FGFR3 obtained by Targetscan; (B) Schematic diagram of h-FGFR3 dual fluorescent plasmid; (C) Relationship between miR-99b-5p and FGFR3; (D) Expression of FGFR3 in HEK-293T cells.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$.

抑制 FGFR3, 从而抑制下游信号通路的传导, 进一步抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 的产生。

细胞因子与神经病理性疼痛的发生和维持密切相关, 促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6, 它们调节神经病理性疼痛机制复杂, 可能直接参与了神经病理性疼痛的产生。芍药甘草汤水提取物对坐骨神经痛模型大鼠有明显镇痛作用, 其作用机制与减少脊髓后角 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平有关^[18]。雷公藤甲素可缓解脊神经结扎大鼠疼痛, 并具有预防性镇痛作用, 其机制表明与阻碍胶质细胞的激活 (星形胶质细胞和小胶质细胞), 抑制 MAPKs 磷酸化, 抑制炎症细胞因如 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein, MCP-1) 的

表达有关^[19,20]。miRNA 也是体内具有调节炎症因子功能的一类的分子, miRNA-136-5p 能够调节炎症因子, 对急性脊髓损伤模型大鼠具有一定保护作用^[21]。miR-99b-5p 能够靶向 FGFR3, 进而影响肿瘤、炎症反应、免疫反应的发生, FGFR3 能直接调节巨噬细胞功能, 进而影响炎症反应^[17]。同时, TNF- α 是机体炎症的重要启动因子, 能够促使 IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子的释放, 也能诱使 EAA 和 C-反应蛋白出现神经毒性作用^[22]。因此, 大鼠慢性神经病理性疼痛的消失可能与炎症因子的减弱有一定的关系。

综合对注射紫杉醇后大鼠的机械阈值改变、背根神经节中炎症因子变化分析, 本研究认为, 隔日腹腔注射 2 mg/kg 紫杉醇可以成功建立大鼠神经病

理性疼痛模型, 表现为外周感觉神经的机械超敏, 且出现显著的 miR-99b-5p 含量减少和 FGFR3 表达增加。agomiR-99b-5p 注射给药能够诱导 miR-99b-5p 的表达水平增加, 对紫杉醇诱导疼痛模型具有显著的治疗作用。因此, 基于 miR-99b-5p 探索化疗后神经疼痛的机制, 有助于为临床治疗提供一定理论依据。

综上所述, 紫杉醇诱导的慢性神经病理性疼痛大鼠模型表现为痛反应增强, 而 agomiR-99b-5p 治疗组大鼠的 MWT 和 TWL 值明显减小, 说明 miR-99b-5p 对紫杉醇诱导的慢性神经病理性疼痛具有显著的治疗效果。本研究首次探究 miR-99b-5p 在紫杉醇诱发神经病理性疼痛模型大鼠背根神经节中的表达情况, 并探究其通过 FGFR3 对紫杉醇诱导的 SD 大鼠神经病理性疼痛行为学和炎症反应的影响, 为 micorRNA 在疾病的临床治疗提供了前瞻性的理论依据。然而, miR-99b-5p 在靶向抑制 FGFR3 后下游的相关信号通路并未做深入研究。因此, 接下来的研究重点为 miR-99b-5p 影响神经病理性疼痛的涉及到的相关信号通路传导机制。

参 考 文 献

- [1] Chavez JD, Keller A, Zhou B, *et al.* Cellular interactome dynamics during paclitaxel treatment[J]. Cell Rep, 2019, 29(8):2371-2383.e5.
- [2] Liu Y, Dong Y, Zhu H, *et al.* Nanoparticle albumin bound paclitaxel in elder patients with advanced squamous non-small-cell lung cancer: A retrospective study[J]. Cancer Med, 2020, 9(4):1365-1373.
- [3] 徐佩行, 沈益君, 肖文军, 等. 高肿瘤负荷转移性激素敏感性前列腺癌内分泌治疗联合化疗的近期疗效与不良反应[J]. 中华外科杂志, 2019, 57(6):418-421.
- [4] 宋莉, 吴超然, 刘慧, 等. 关于华西医院肿瘤中心住院患者癌痛情况的调查分析[J]. 中国疼痛医学杂志, 2014, 20(9):630-634.
- [5] Zhang S, Cheng J, Quan C, *et al.* circCELSR1 (hsa_circ_0063809) contributes to paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating FOXR2 expression via miR-1252[J]. Mol Ther Nuc Acids, 2020, 19:718-730.
- [6] Sakai A, Saitow F, Miyake N, *et al.* miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability[J]. Brain, 2013, 136(9):2738-2750.
- [7] 罗涛, 李力燕. 外周神经系统中背根神经节的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2015, 21(5):543-546.
- [8] 孙世威. miR-99b-5p 调控 Akt/mTOR/STAT3 信号通路修复脊髓损伤的作用机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2018.
- [9] Yannick T, Peter MC, Carole R, *et al.* Clinical characterisation of sensory neuropathy with anti-FGFR3 autoantibodies[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2020, 91(1):49-57.
- [10] Yadav V, Zhang X, Liu J, *et al.* Reactivation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway by FGF receptor 3 (FGFR3)/Ras mediates resistance to vemurafenib in human B-RAF V600E mutant melanoma[J]. J Biol Chem, 2012, 287(33):28087-28098.
- [11] Okada T, Enkhjargal B, Travis ZD, *et al.* FGF-2 Attenuates neuronal apoptosis via FGFR3/PI3k/Akt signaling pathway after subarachnoid hemorrhage[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(12):8203-8219.
- [12] 李秋月, 许海玉, 杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19):3709-3712.
- [13] Jean-Toussaint R, Tian Y, Chaudhuri A, *et al.* Proteome characterization of small extracellular vesicles from spared nerve injury model of neuropathic pain[J]. J Proteomics, 2020, 211:103540.
- [14] 邵寒雨, 符元元, 王娟, 等. 背根神经节血红素加氧酶 1 过表达缓解小鼠神经病理性疼痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(2):105-112.
- [15] 严进红, 韩克跃, 夏杰, 等. 槲皮素减轻紫杉醇致神经病理性大鼠疼痛的作用与机制[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(12):2065-2070, 2181.
- [16] Cao F, Liu T, Sun S, *et al.* The role of the miR-99b-5p/mTOR signaling pathway in neuroregeneration in mice following spinal cord injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6):9355-9360.
- [17] Jacky B, Garay P, Dupuy J, *et al.* Identification of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) as a protein receptor for botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A)[J]. PLoS pathog, 2013, 9(5):e1003369.
- [18] 郑冬明, 张娟, 王锐, 等. 芍药甘草汤有效组分对慢性坐骨神经结扎大鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(4):801-803.
- [19] Wang W, Mei XP, Chen L, *et al.* Triptolide prevents and attenuates neuropathic pain via inhibiting central immune response[J]. Pain physician, 2012, 15(6):995-1006.
- [20] 张秀梅, 赵文平, 刘星芳, 等. 脊髓 HMGB1/NF- κ B 参与雷公藤红素对慢性炎症痛大鼠的镇痛作用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(12):891-896.
- [21] 邓贵营, 曾高峰, 岑忠喜, 等. miRNA-136-5p 对急性脊髓损伤模型大鼠炎症因子的作用[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(15):2397-2402.
- [22] Shen WS, Li CF, Zhou ZS, *et al.* MicroRNA-204 silencing relieves pain of cervical spondylotic radiculopathy by targeting GDNF[J]. Gene Ther, 2020, 27(6):254-265.