

• 论 著 •

10-11 易位蛋白 2 调节足底炎症和炎性疼痛 *

孟庆余 李春华 马灵杰 高永静[△]

(南通大学疼痛医学研究院, 特种医学研究院, 南通 226019)

摘 要 目的: 探讨 10-11 易位蛋白 2 (ten-eleven translocation 2, TET2) 在小鼠外周组织炎症和炎性疼痛中的作用。**方法:** 采用免疫荧光方法检测野生型 (wild-type, WT) 小鼠和 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底皮肤中神经纤维标记物 TUJ1 的表达与分布; 行为学方法检测福尔马林和完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 诱导的疼痛行为; HE 染色检测 WT 小鼠与 *Tet2*^{-/-} 小鼠在 CFA 7 天足底皮肤组织结构; 蛋白芯片检测 CFA 7 天, WT 小鼠与 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底皮肤中差异表达的炎症介质。**结果:** 与 WT 小鼠相比, *Tet2*^{-/-} 小鼠足底神经纤维分布未见异常; 足底注射 0.5% 福尔马林诱导小鼠出现双时相自发性疼痛, *Tet2*^{-/-} 小鼠比 WT 小鼠更强烈; 足底注射 50% CFA 诱发 WT 小鼠和 *Tet2*^{-/-} 小鼠出现较长时间的热痛觉过敏和机械性触诱发痛, *Tet2*^{-/-} 小鼠比 WT 小鼠更严重。在 *Tet2*^{-/-} 小鼠, 0.5% 福尔马林和 50% CFA 引起的足底肿胀程度比 WT 明显; CFA 注射后 7 天, *Tet2*^{-/-} 小鼠的足底皮肤真皮层与皮下组织厚度大于 WT 小鼠。蛋白芯片检测显示, 在炎性疼痛条件下, 敲除 *Tet2* 基因可使 104 种炎症介质表达发生变化, 其中基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、抗素 (resistin)、MMP3 等 19 种炎症介质表达明显上调。**结论:** *Tet2* 基因参与疼痛的调节。敲除 *Tet2* 基因通过释放更多的炎症因子增强炎症反应, 从而促进小鼠的急、慢性炎性疼痛行为, 表明 TET2 在外周炎性疼痛中可能发挥抗炎镇痛作用。

关键词 TET2; 福尔马林; 完全弗氏佐剂; 炎性疼痛; 足底皮肤

Ten-eleven translocation 2 regulates plantar inflammation and inflammatory pain *

MENG Qingyu, LI Chunhua, MA Lingjie, GAO Yongjing[△]

(Institute of Pain Medicine and Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong 226019, China)

Abstract Objective: To investigate the role of ten-eleven translocation 2 (TET2) protein in peripheral tissue inflammation and acute/chronic inflammatory pain in mice. **Methods:** Immunofluorescence staining was used to examine the expression and distribution of nerve fiber marker TUJ1 in plantar skin of wild-type (WT) and *Tet2*^{-/-} mice; Behavioral tests were used to detect Formalin- and complete Freund's adjuvant (CFA)-induced pain; HE staining was used to detect the structure of plantar skin of WT and *Tet2*^{-/-} mice at CFA 7 d; Protein array was used to detect the differentially expressed inflammatory mediators in the paw of WT and *Tet2*^{-/-} mice at CFA 7 d. **Results:** Compared with WT mice, *Tet2*^{-/-} mice showed similar distribution of plantar nerve fibers. Plantar injection of 0.5% Formalin induced dual-phase spontaneous pain, which was more intense in *Tet2*^{-/-} mice than that in WT mice. 50% CFA induced prolonged heat hyperalgesia and mechanical allodynia in WT and *Tet2*^{-/-} mice, and pain sensitivity in *Tet2*^{-/-} mice was more severe than that in WT mice. In *Tet2*^{-/-} mice, 0.5% formalin and 50% CFA induced stronger plantar swelling than that in WT mice. The thickness of the dermis and hypodermis of the *Tet2*^{-/-} mice was greater than that of WT mice at CFA 7 d. Protein array showed that under the condition of inflammatory pain, knockout of *Tet2* gene changed the expression of 104 inflammatory mediators, and 19 of them such as matrix metalloproteinase 9 (MMP9), resistin, and MMP3 were significantly up-regulated. **Conclusion:** *Tet2* gene is involved in the regulation of pain. Knockout *Tet2* gene induces inflammatory responses by releas-

* 基金项目: 国家自然科学基金 (32030048, 31871064); 江苏省自然科学基金 (BK20171255); 南通市科技局 2020 基础科学研究计划 (JC2020038)

[△] 通信作者 高永静 gaoyongjing@ntu.edu.cn



ing more inflammatory factors to enhance acute and chronic inflammatory pain, indicating that TET2 may play an anti-inflammatory and analgesic role in peripheral inflammatory pain.

Keywords TET2; formalin; complete Freund's adjuvant; inflammatory pain; paw skin

疼痛是一种与实际或潜在的组织损伤相关的不愉快的感觉和情绪情感体验,或与此相似的经历^[1]。慢性疼痛是指持续或反复发作3个月以上的疼痛^[2],包括炎性疼痛、神经病理性疼痛、癌性疼痛等^[3],影响了全球30%以上的成年人。慢性疼痛可导致病人行动不便、日常活动受限、生活质量降低等,造成极大的个人和社会负担。目前对慢性疼痛的药物治疗主要包括非甾体抗炎镇痛药(NSAIDs)、阿片类药物、5-羟色胺再摄取抑制剂、三环类抗抑郁药物等。这些药物一方面会带来毒副作用和不良反应,另一方面,部分药物(如阿片类药物)会引起耐受和依赖。尽管如此,通过上述治疗也并不能有效地缓解慢性疼痛,因此亟须寻找更有效的治疗方法和药物靶点。

慢性疼痛伴随外周和中枢中多种基因表达的变化,表观遗传学(包括DNA甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等)是调节基因表达和慢性疼痛的重要因素^[4]。DNA异常甲基化及其对基因表达的影响参与多种疾病过程,如神经系统疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病等^[5]。10-11易位蛋白(ten-eleven translocation, TET)是生物体内存在的一种 α -酮戊二酸(α -KG)和 Fe^{2+} 依赖的双加氧酶^[6]。其家族成员包括TET1、TET2和TET3,是DNA去甲基化的关键调节因子,均可催化5-甲基胞嘧啶(5mC)转化为5-羟甲基胞嘧啶(5hmC),进而启动DNA去甲基化过程^[7]。其中TET2具有“管家”作用,是正常造血的重要调节因子,与急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合征和其他髓系疾病有关^[8]。TET2参与的表观遗传调控是调节炎症的关键因素,参与免疫反应和炎症的发生与消退过程^[9]。此外,TET2还参与动脉粥样硬化^[10]、I型糖尿病等疾病过程^[11]。

近年来研究表明,TET1和TET3在脊髓中参与调控炎性疼痛^[12];脊髓中的TET1还参与调节慢性内脏性疼痛^[13];另外,背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中的TET1参与神经病理性疼痛^[14]。因此,尽管TET家族在疼痛中的作用已有报道,但主要集中在TET1和TET3,且主要在脊髓和DRG水平。TET2蛋白与炎症密切相关,如TET2缺陷型巨噬细胞表现出NLRP3炎性小体介导的IL-1 β 分泌增加,因此TET2促进炎症消退^[15];艾滋病病毒辅助蛋白通过促进TET2降解,增加促炎细胞因子IL-6

的过度表达而阻碍炎症消退并加速疾病的进展^[16]。TET2在外周组织炎症和炎性疼痛中起怎样的作用,在外周是否参与炎症调节进而影响疼痛?上述问题尚未见报道。本研究主要围绕小鼠足底皮肤中的TET2在炎性疼痛中的作用进行研究,研究结果将为开发新的镇痛药物提供思路。

方 法

1. 实验动物

雄性C57BL/6野生型小鼠30只,Tet2^{-/-}小鼠30只,6~8周龄,体重20~28g,由南通大学动物实验中心提供;Tet2基因全敲除小鼠B6(Cg)-Tet2tm1.2Rao/J(Tet2^{-/-})从美国Jackson Laboratory购买。所有小鼠的饲养条件遵循实验动物标准。小鼠均在每12h明/暗循环、温度20~22℃和湿度50%±5%的标准条件下饲养,自由摄取水和食物。

2. 主要仪器和试剂

仪器: von Frey Filament (Stoeling 公司)、Model 390 足热痛觉测试仪 (IITC Life Science 公司)、肢体肿胀测量仪 (Ugo Basile 公司)、冰冻切片机 (Thermo 公司)、石蜡切片机 (Leica 公司)、黏附性载玻片 (Thermo Scientific 公司)、正置荧光显微镜 (Leica 公司)。

试剂: 福尔马林 (Formalin) 溶液 (Sigma 公司)、完全弗氏佐剂 (complete Freund's Adjuvant, CFA) (Sigma 公司)、异氟烷 (瑞沃德公司)、多聚甲醛 (Sigma-Aldrich 公司)、苏木素伊红染色试剂盒 (碧云天公司)、兔抗TUG1 (CST 公司)、Cy3-驴抗兔IgG (Jackson 公司)、DAPI 染色试剂 (Abcam 公司)。

3. 方法

(1) 模型制备: 将小鼠分为对照组和实验组,每组6只。正常小鼠清醒状态下,实验组小鼠足底皮下注射0.5%和5% Formalin 10 μ l,对照组小鼠注射生理盐水,建立急性炎性疼痛模型,检测小鼠注射前和注射后第一时相(0~10 min)与第二时相(10~45 min)产生的自发性疼痛行为;足底皮下注射50% CFA 15 μ l 建立慢性炎性疼痛模型,检测注射后6h、1天、3天、7天、10天和14天的热痛觉过敏及机械性触诱发痛;并用鼠足体积测量仪评估小鼠后足的体积。



(2) 行为学检测: 将小鼠置于温度 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 相对湿度 50%~60%, 昼夜各 12 h 环境条件下适应 48~72 h, 行为学均采用盲法检测。

福尔马林诱导的自发痛行为: 正常小鼠清醒状态下, 足底皮下注射 0.5% 和 5% Formalin $10\ \mu\text{l}$, 置于透明鼠笼中, 录像 50 min。之后回放, 用秒表记录每 5 min 内小鼠舔足和抬足的时间。将结果汇总并分为两个阶段: 第一时相 (0~10 min) 和第二时相 (10~45 min)。

热痛觉过敏测试: 小鼠放于专用的透明有机玻璃格并置于热痛仪恒温玻璃板上, 玻璃板温度设置为 30°C , 调节照射强度将基础缩足潜伏期控制在 8~14 s 之间, 将 20 s 设置为光照最长时间。在小鼠安静清醒的状态下, 将光照点对准小鼠左后足中心位置, 按下光照开始按钮, 待小鼠出现缩足、舔足现象时立刻按下按钮停止光照, 记录所得相应时间即为该小鼠本次热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)。每只小鼠需重复测量 3 次, 以 3 次的平均值作为该时间点的 TWL。缩足潜伏期越短说明该小鼠热痛觉过敏越严重。

机械性触诱发痛测试: 将小鼠置于金属网架上的有机玻璃格内适应 30~60 min, 待其安静后用 von Frey Filament 纤维丝刺激小鼠左后足底后缘皮肤, 观察小鼠缩足、舔足反应。纤维丝竖直刺激小鼠足底, 以纤维丝稍弯曲作为用力标准, 刺激时间为 2 s, 在不同部位共刺激 5 次。在多次刺激中, 若小鼠出现缩足、舔足现象则视为疼痛, 根据 “Dixon's up-down” 检测法测量和计算机机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)。

(3) 组织免疫荧光染色: 异氟烷麻醉小鼠, 0.9% 氯化钠溶液 (20 ml) 经心内灌注至小鼠血液完全排出, 再换用 4% 多聚甲醛 (PFA) 灌流 50 ml。取小鼠足底皮肤用 4% PFA 进行后固定 4~6 h, 再依次用 20% 和 30% 蔗糖溶液过夜脱水至组织沉底。使用 Thermo 冰冻切片机进行冰冻切片。修剪组织, 用 OCT 包埋, 连续切片, 皮肤切片厚度为 $14\ \mu\text{m}$, 使用粘附载玻片贴片, 晾干后染色。染色: 用 0.01 M 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 漂洗切片 3 次, 每次 15 min; 1% BSA 封闭液, 室温封闭 1 h; 加入一抗 4°C 过夜孵育; 次日拿出组织, 0.01 M PBS 漂洗切片 3 次, 每次 15 min; 用 0.01 M PBS 稀释免疫组化用荧光二抗, 室温避光孵育 2 h; 弃去二抗, 用 0.01 M PBS 漂洗 3 次, 每次 15 min; 晾干后用防淬灭荧光封片剂避光封片, 于显微镜下拍片。

(4) 苏木素伊红 (HE) 染色: 灌注方法同 (3),

取足底皮肤用 4% PFA 后固定过夜。依次用梯度浓度乙醇对组织进行脱水处理, 分别为 30% $\times$ 30 min; 50% $\times$ 30 min; 75% $\times$ 30 min; 80% $\times$ 30 min; 95% $\times$ 60 min; 95% $\times$ 30 min; 100% $\times$ 5 min; 100% $\times$ 5 min; 二甲苯透明 5 min $\times$ 2 次, 完全浸蜡 1 h, 进行石蜡包埋, 石蜡切片 (厚 $5\ \mu\text{m}$), 37°C 摊片, 45°C 烤片, 以防脱片。HE 染色: 二甲苯脱蜡 5 min $\times$ 2 次, 用梯度浓度乙醇进行脱二甲苯处理, 分别为 100% $\times$ 2 min; 95% $\times$ 2 min; 80% $\times$ 2 min; 75% $\times$ 2 min, 再用流水冲洗 30 s。苏木素染色 8 min, 流水冲洗 30 s, 1% 盐酸乙醇处理 2~3 s, 流水冲洗 30 s; 热水加速蓝化, 流水冲洗数分钟至颜色不再加深即可。伊红染色 45 s, 流水冲洗适当长时间, 用梯度浓度乙醇进行脱水处理, 分别为 75% $\times$ 2 min; 95% $\times$ 2 min; 100% $\times$ 2 min; 二甲苯脱乙醇处理, 2 min $\times$ 2 次。中性树胶封片剂封片, 通风橱晾干, 正置荧光显微镜拍片。

(5) 蛋白芯片检测: 正常小鼠清醒状态下, 对 WT 及 *Tet2*^{-/-} 小鼠均进行足底皮下注射 50% CFA $15\ \mu\text{l}$, 7 天后灌注取小鼠足底皮肤, 由 Bio-Rad 公司进行蛋白芯片检测。

4. 统计学分析

数据统计分析使用 GraphPad Prism (version 8.01), 均采用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示。主要采用 Student's *t*-test 检验, 双因素方差分析 (Two-way ANOVA followed by the Bonferroni test)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. *Tet2*^{-/-} 小鼠的鉴定以及 WT 和 *Tet2* 小鼠足底 TUJ1 与 DAPI 的表达与分布

取小鼠耳部全基因组 DNA, 经普通 PCR 扩增区分 *Tet2*^{-/-} 小鼠与 WT 小鼠。DNA 凝胶电泳显示, WT 小鼠对应的条带大小为 536 bp, 杂合型 (*Tet2*^{+/-}) 小鼠对应的条带大小为 536/200 bp, *Tet2*^{-/-} 小鼠对应的条带大小为 200 bp (见图 1A)。*Tet2*^{-/-} 小鼠与 WT 小鼠外观无差异 (见图 1B)。免疫荧光检测 *Tet2*^{-/-} 小鼠与 WT 小鼠足底皮肤中神经纤维标记物 TUJ1 及表皮角质细胞标记物 DAPI 的表达, 结果差异无统计学意义 (见图 1C-I)。

2. WT 和 *Tet2*^{-/-} 小鼠的急、慢性炎性疼痛行为

WT 和 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底注射 5% Formalin, 观察其自发痛行为。结果显示, WT 小鼠和 *Tet2*^{-/-} 小鼠在第一时相 (0~10 min) 与第二时相 (10~45 min)

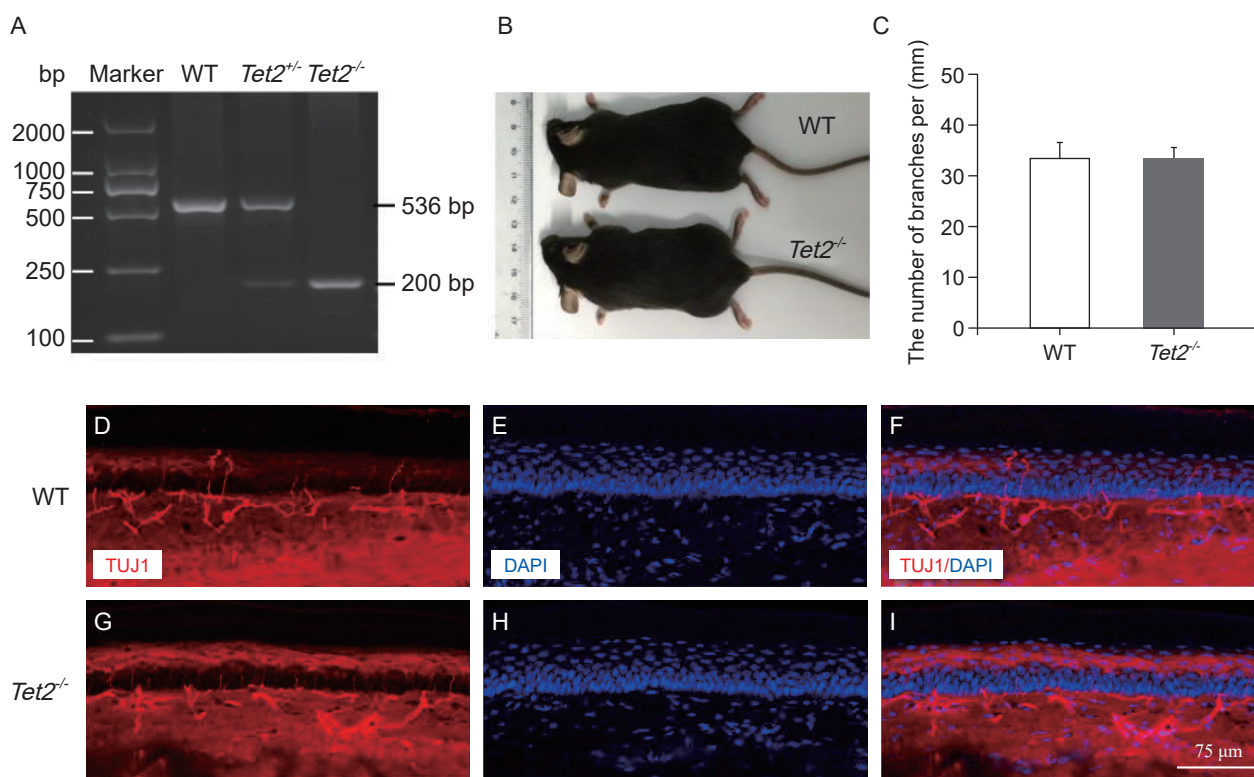


图1 *Tet2*^{-/-}小鼠的鉴定及其对TUJ1与DAPI表达与分布的影响

(A) *Tet2*^{-/-}小鼠与WT小鼠基因型鉴定；(B) WT小鼠与*Tet2*^{-/-}小鼠的外观；(C) WT小鼠与*Tet2*^{-/-}小鼠足底皮肤中TUJ1分布统计（每组3只）；(D-I) 免疫荧光显示WT小鼠(D-F)和*Tet2*^{-/-}小鼠(G-I)正常足底皮肤中神经纤维TUJ1与表皮角质细胞标记物DAPI的表达与分布

Fig. 1 Identification of *Tet2*^{-/-} mice and the expression and distribution of TUJ1 and DAPI in paw skin

(A) Genotyping of WT and *Tet2*^{-/-} mice; (B) Appearance of WT *Tet2*^{-/-} mice; (C) Statistical graph of TUJ1 in paw skin of WT and *Tet2*^{-/-} mice ($n = 3$); (D-I) Expression and distribution of nerve fiber TUJ1 and nuclear marker DAPI in normal paw skin of WT mice (D-F) and *Tet2*^{-/-} mice (G-I) by immunofluorescence.

均呈现抬足、舔足、甩足等自发痛行为。在第一时相，*Tet2*^{-/-}小鼠的自发痛行为比WT小鼠强烈 ($P < 0.05$, Student's *t*-test)，第二时相无显著性差异（见图2A）。注射低浓度的Formalin (0.5%) 后，*Tet2*^{-/-}小鼠在第一时相和第二时相的抬足、舔足、甩足均高于WT小鼠 ($P < 0.05$, Student's *t*-test，见图2B)。

小鼠单侧足底注射50% CFA，检测WT小鼠与*Tet2*^{-/-}小鼠的热痛觉过敏（见图2C）和机械性触诱发痛（见图2D）。结果显示CFA引起WT小鼠和*Tet2*^{-/-}小鼠均产生明显的热痛觉过敏和机械性触诱发痛，两者均在注射后6 h产生并持续10天以上；但*Tet2*^{-/-}小鼠的TWL和MWT均短于WT小鼠。

3. WT和*Tet2*^{-/-}小鼠在急、慢性炎性疼痛模型中的足底皮肤肿胀程度

足底注射0.5% Formalin引起的*Tet2*^{-/-}小鼠足底肿胀程度比WT小鼠更明显（见图3A）。单侧足底注射50% CFA后WT小鼠与*Tet2*^{-/-}小鼠均表现出

明显的足底肿胀，并从注射后6 h一直持续到第10天；在整个CFA时程中，与WT小鼠相比，*Tet2*^{-/-}小鼠表现出更为明显的足底肿胀（见图3B）。

对WT和*Tet2*^{-/-}小鼠Saline 7天和CFA 7天的足底皮肤染色（见图3C-F）。结果表明，在慢性炎性疼痛模型中，WT和*Tet2*^{-/-}小鼠均表现出足底皮肤的真皮层 (dermis) 和皮下组织 (hypodermis) 增厚，并且*Tet2*^{-/-}小鼠更为明显。

4. CFA模型小鼠足底皮肤中炎症介质表达

采用蛋白芯片检测WT和*Tet2*^{-/-}小鼠CFA造模后7天144种炎症介质在皮肤组织的表达。与WT组相比，*Tet2*^{-/-}小鼠足底皮肤中的104种炎症介质表达变化（图中未显示），19种炎症介质表达明显上调，包括MMP9 (pro) (Matrix metalloproteinase 9, 基质金属蛋白酶9前体)、Resistin (抗素)、MMP3 (基质金属蛋白酶3)、OPG (Osteoprotegerin, 骨保护素)、IGF-II (Insulin-like growth factor 2, 胰岛素

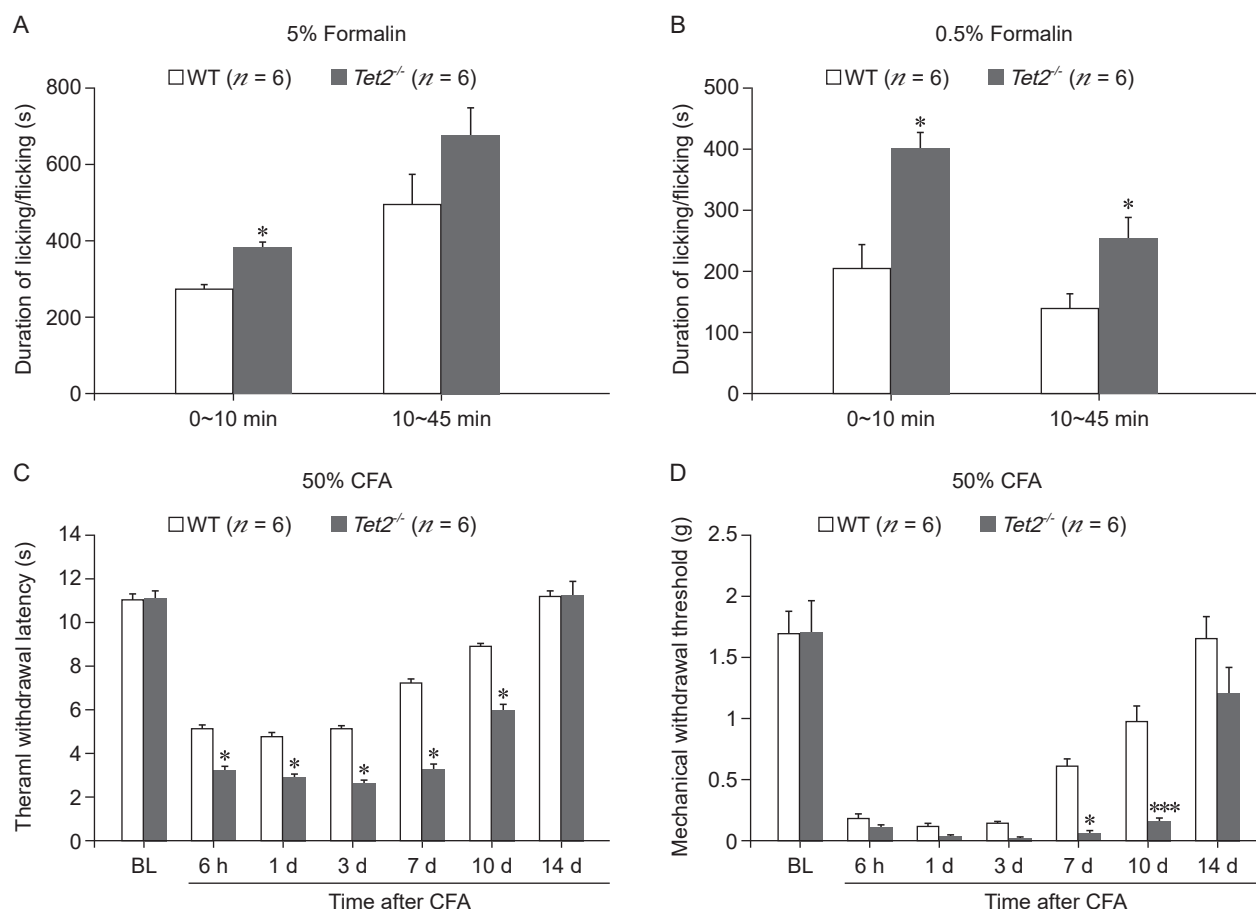


图2 WT和Tet2^{-/-}小鼠的急、慢性炎症疼痛行为

(A) WT与Tet2^{-/-}小鼠足底注射5% Formalin后的自发痛行为；(B) WT和Tet2^{-/-}小鼠足底注射0.5% Formalin后的自发痛行为；(C) WT与Tet2^{-/-}小鼠足底注射50% CFA后的热缩足反射潜伏期；(D) WT与Tet2^{-/-}小鼠足底注射50% CFA后的机械刺激缩足反射阈值

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与WT组相比

Fig. 2 Acute and chronic inflammatory pain behavior in WT and Tet2^{-/-} mice

(A) The spontaneous pain of WT and Tet2^{-/-} mice after intraplantar injection of 5% Formalin; (B) The spontaneous pain of WT and Tet2^{-/-} mice after intraplantar injection of 0.5% Formalin; (C, D) The thermal withdrawal latency (C) and mechanical withdrawal threshold (D) after intraplantar injection of 50% CFA in WT and Tet2^{-/-} mice.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, compared with group WT. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni test.

样生长因子2)、TCK-1 (Thymus chemokine-1, 胸腺趋化因子1)、PF4 (Platelet factor 4, 血小板因子4)、TIMP2 (Tissue inhibitor of metalloproteinase 2, 金属蛋白酶组织抑制剂2)、IL-28 (Interleukin-28, 白介素28)、MIP-3alpha (Macrophages inflammatory protein-3alpha, 巨噬细胞炎症蛋白3alpha)、GITRLigand (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand, 糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体的配体)等(见图4A, B)。

讨论

TETs 最初在急性骨髓和淋巴细胞白血病中被

发现, 是Fe²⁺和α-酮戊二酸依赖的10-11易位蛋白(ten-eleven translocation), 它的三个家族成员TET1、TET2、TET3均可催化5-甲基胞嘧啶(5mC)依次氧化成5-羟甲基胞嘧啶(5hmC)、5-甲酰胞嘧啶(5fC)、和5-羧基胞嘧啶(5cac)。TET2功能障碍与急性髓细胞白血病、骨髓增生异常综合征和其他髓系疾病有关^[17]。TET2通过催化5mC调节DNA甲基化/去甲基化过程参与免疫和炎症相关的多种疾病, 如抑制TET2可加速动脉粥样硬化性心血管疾病病程^[9]; TET2可通过TGF-β1启动子中CpG岛的去甲基化激活TGF-β1的表达, 在糖尿病肾病(DN)的发病机制中发挥作用^[18]; TET2在类风湿关节炎病人的单核细胞和T细胞中的表达增加^[19]。

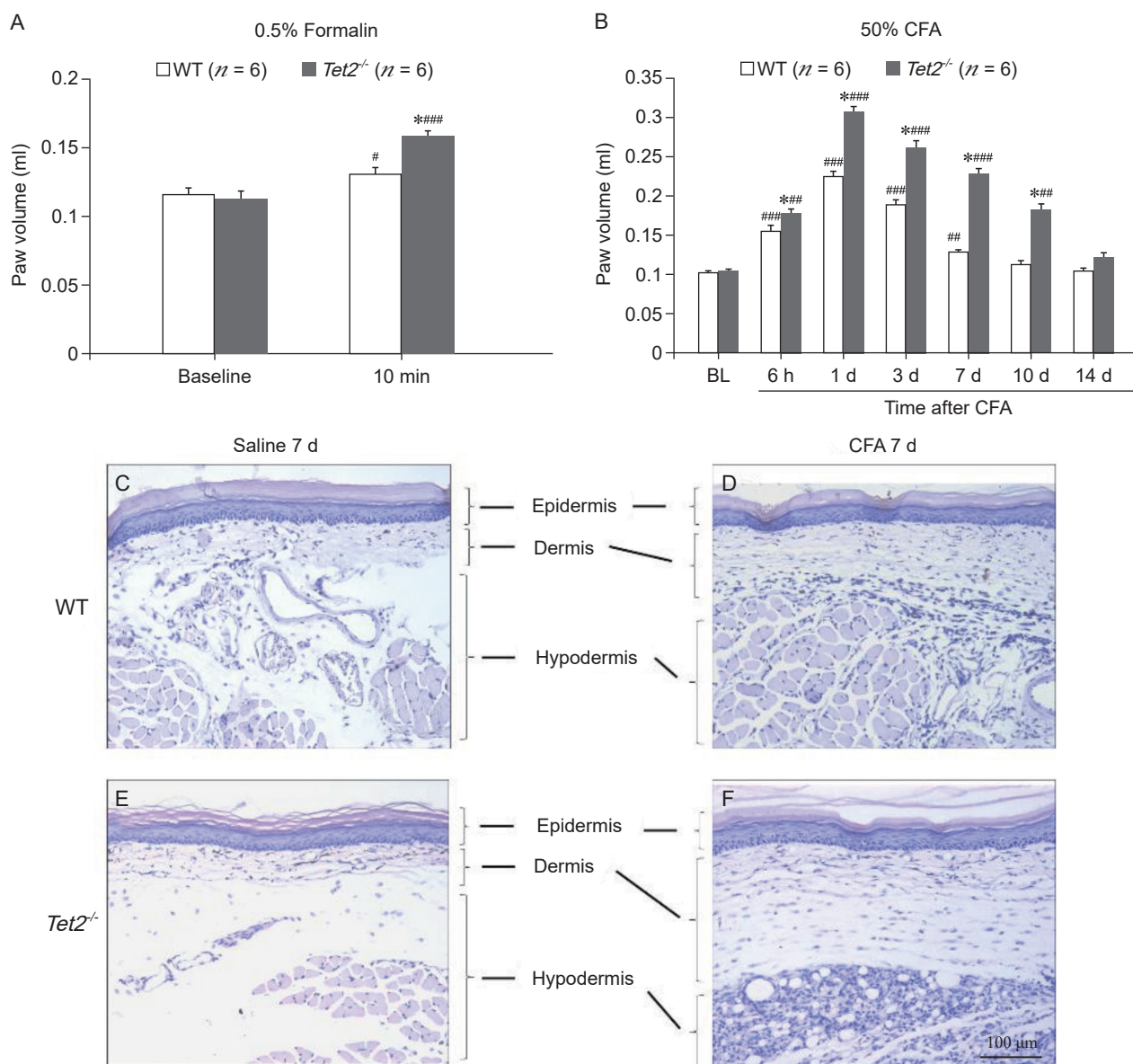


图 3 WT 和 *Tet2*^{-/-} 小鼠在急、慢性炎症性疼痛模型中足底皮肤肿胀程度 (A) 足底注射 0.5% Formalin 后, WT 和 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底体积; (B) 足底注射 50% CFA 后 WT 与 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底体积; (C-F) 组化染色显示对照组和 CFA 组的 WT 和 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底皮肤结构

**P* < 0.05, 与 WT 组相比; [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01, ^{###}*P* < 0.001, 与 Baseline 相比

Fig. 3 The plantar skin swelling in WT and *Tet2*^{-/-} mice in acute and chronic inflammatory pain models

(A) The paw volume of WT and *Tet2*^{-/-} mice after injection of 0.5% Formalin; (B) The paw volume of WT and *Tet2*^{-/-} mice after injection of 50% CFA; (C-F) Histochemistry showing the structure of paw skin in WT and *Tet2*^{-/-} mice after injection of saline or CFA.

**P* < 0.05, compared with group WT; [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01, ^{###}*P* < 0.001, compared with Baseline.

本研究发现, 敲除 *Tet2* 基因使小鼠产生更明显的急性炎症性疼痛和慢性炎症痛觉过敏行为; 并且在福尔马林引起的双时相反应中, 两个时相均有变化。既往的研究表明, 福尔马林引起的第一时相主要反映外周机制, 由外周伤害性感受器的直接激活引起, 第二时相主要反映中枢机制, 由脊髓和脊髓以上的结构发生的中枢敏化引起。因此, 本研究结果提示

Tet2 基因可能在外周和中枢均发挥作用。既往的研究显示, 在脊髓神经元中, 敲低或下调 *METTL3* 与 *YTHDF2* 协调机制, 通过稳定上调 *TET1* 调节炎症性疼痛^[20]。在脊髓背角星形胶质细胞, *TET3* 和 *GATA1* 协同调节 DNA 去甲基化参与慢性内脏疼痛^[13]。脊髓和脊髓上中枢中的 *TET2* 在慢性疼痛中的作用还需要以后进一步研究。

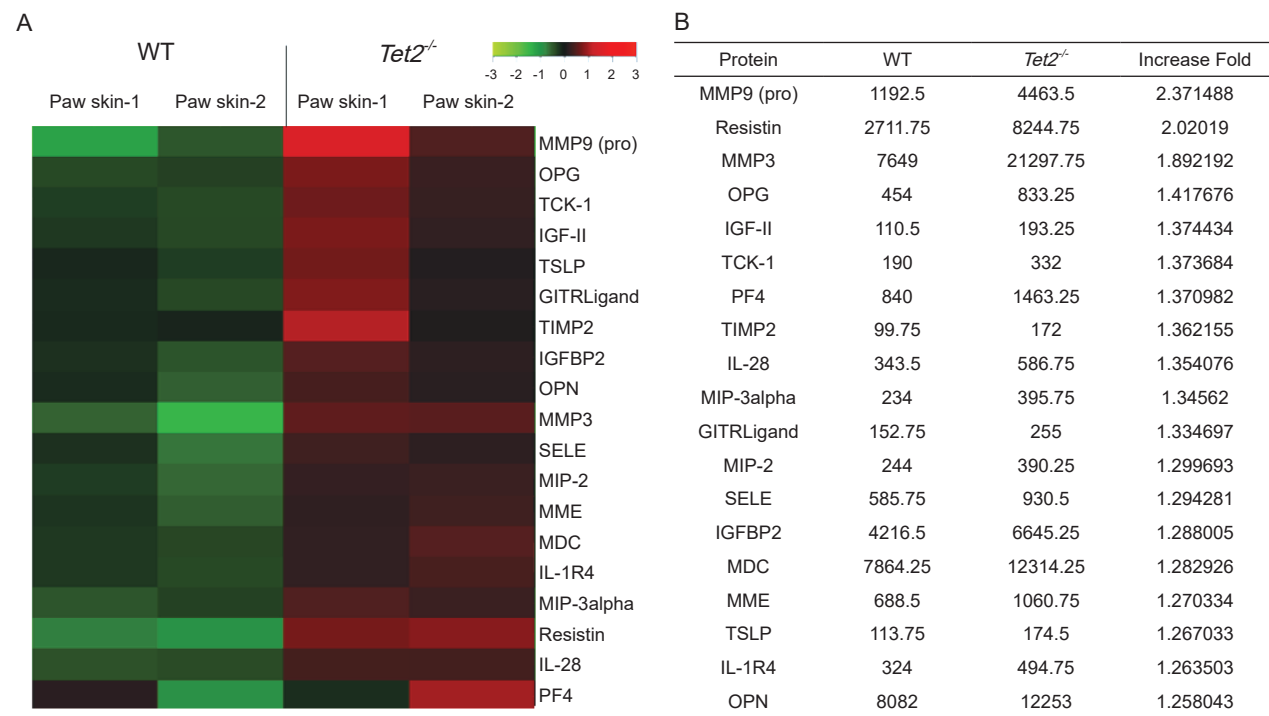


图 4 CFA 模型小鼠足底皮肤中炎症介质表达
(A) WT 与 *Tet2*^{-/-} 小鼠 CFA 7 d 模型中足底皮肤中炎症蛋白表达 ($n = 2$)。红色越亮代表相应蛋白表达水平越高，绿色越亮代表该蛋白表达水平越低；(B) 图 A 的数据表
Fig. 4 The expression of inflammatory mediators in plantar skin after CFA injection
(A) Protein assay of plantar skin in WT and *Tet2*^{-/-} mice 7 d after CFA injection ($n = 2$). The brighter the red is, the higher the expression level of the corresponding protein, and the brighter the green is, the lower the expression level of the protein; (B) Data sheet of Figure A.

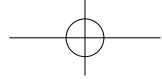
本实验中观察到足底注射 Formalin 和 CFA 后 *Tet2*^{-/-} 小鼠足底皮肤肿胀明显增加、真皮层和皮下组织增厚，说明外周皮肤中的 TET2 发挥抑制炎症的作用。炎症的特征是免疫细胞浸润以及炎症介质的产生，典型的炎症相关的变化通常导致神经纤维对周围的化学环境敏化，在慢性疼痛的诱导和维持中有重要作用。相应地，炎症的消退是指一个复杂的过程，包括炎症因子的清除，炎症介质的分解或抑制等。研究发现，TET2 参与调节炎症反应，通过与 I κ b ζ 相互作用抑制巨噬细胞和树突状细胞中促炎细胞因子 IL-6，并通过介导组蛋白去乙酰化酶 1/2 (HDAC1/2) 的募集以抑制 IL-6 和 IL-1 β 表达^[21,22]。缺乏 TET2 表达的肿瘤相关巨噬细胞表现出免疫活性表型，包括炎症细胞因子表达增加和 ARG1 表达减少^[23]。与此相一致，本研究的蛋白芯片结果显示，在 CFA 诱导的慢性炎症性疼痛模型中，敲除 *Tet2* 基因可导致小鼠足底皮肤中 pro-MMP9、Resistin、MMP-3、OPG、PF4、IL-28 等 19 种细胞因子表达上调。MMP-9 由非活性的 pro-MMP-9 活化生成；而且 MMP-3 是 MMP-9 最有效的激活剂^[24]。MMP-9 在

神经退行性疾病的病理生理机制中发挥重要作用^[25]，并且参与多种急性和慢性炎症性疾病^[26]。Resistin 通过诱导炎症细胞因子、促进细胞黏附分子表达调节炎症、免疫和自身免疫反应^[27]，因此我们推测 *Tet2* 可能通过 MMP-9 和 Resistin 在炎症疼痛中发挥镇痛作用。根据上述结果，*Tet2*^{-/-} 小鼠炎症疼痛和组织炎症程度增加很有可能与我们检测到的这些因子（如 MMP-9、Resistin、OPG、IL-28、MIP-2）的表达上调有关，已有较多报道表明了它们与炎症的相关性。因此我们推测可能是敲除 *Tet2* 基因后导致小鼠足底皮肤细胞释放神经炎症物质增加，进而增强疼痛。通过外源性给予 TET2 过表达病毒上调 TET2 的水平可能为抗炎、镇痛提供有效的治疗途径。但是，TET2 在外周调节炎症和炎症疼痛的机制以及其是否参与脊髓水平疼痛调节还需要以后进一步研究。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

[1] 宋学军, 樊碧发, 万有, 等. 国际疼痛学会新版疼痛



- 定义修订简析[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(9): 641-644.
- [2] 杜涛, 袁文茜, 曹伯旭, 等. 慢性神经病理性疼痛[J]. 中国疼痛医学杂志, 2021, 27(7):481-485.
- [3] Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1[J]. *Science*, 2009, 324(5929):930-935.
- [4] Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, *et al.* Epigenetic mechanisms of chronic pain[J]. *Trends Neurosci*, 2015, 38(4):237-246.
- [5] Greenberg MVC, Bourc'h D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10):590-607.
- [6] Cong B, Zhang Q, Cao X. The function and regulation of TET2 in innate immunity and inflammation[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(3):165-173.
- [7] Chamesian AG, Qadri YJ, Cummins M, *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC) and Ten-eleven translocation 1-3 (TET1-3) proteins in the dorsal root ganglia of mouse: expression and dynamic regulation in neuropathic pain[J]. *Somatosens Mot Res*, 2017, 34(2):72-79.
- [8] Alvarez-Errico D, Vento-Tormo R, Sieweke M, *et al.* Epigenetic control of myeloid cell differentiation, identity and function[J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15(1):7-17.
- [9] Zhaolin Z, Jiaojiao C, Peng W, *et al.* OxLDL induces vascular endothelial cell pyroptosis through miR-125a-5p/TET2 pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5):7475-7491.
- [10] Gong D, Zhang Q, Chen LY, *et al.* Coiled-coil domain-containing 80 accelerates atherosclerosis development through decreasing lipoprotein lipase expression via ERK1/2 phosphorylation and TET2 expression[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 843:177-189.
- [11] Stefan-Lifshitz M, Karakose E, Cui L, *et al.* Epigenetic modulation of beta cells by interferon-alpha via PNPT1/mir-26a/TET2 triggers autoimmune diabetes[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(5):e126663.
- [12] Pan Z, Xue ZY, Li GF, *et al.* DNA hydroxymethylation by Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 and 3 regulates nociceptive sensitization in a chronic inflammatory pain model[J]. *Anesthesiology*, 2017, 127(1):147-163.
- [13] Wu YY, Zhang HL, Lu XM, *et al.* Targeting GATA1 and p2x7r locus binding in spinalastrocytes suppresses chronic visceral pain by promoting DNA demethylation[J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(4):359-372.
- [14] Wu Q, Wei G, Ji F, *et al.* TET1 overexpression mitigates neuropathic pain through rescuing the expression of mu- opioidreceptor and Kv1.2 in the primary sensory neurons[J]. *Neurotherapeutics*, 2019, 16(2):491-504.
- [15] Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, *et al.* Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice[J]. *Science*, 2017, 355(6327):842-847.
- [16] Lv L, Wang Q, Xu Y, *et al.* Vpr targets TET2 for degradation by CRL4^{VprBP} E3 ligase to sustain IL-6 expression and enhance HIV-1 replication[J]. *Mol Cell*, 2018, 70(5):961-970.e5.
- [17] Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, *et al.* Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(7):838-842.
- [18] Yang L, Zhang Q, Wu Q, *et al.* Effect of TET2 on the pathogenesis of diabetic nephropathy through activation of transforming growth factor β 1 expression via DNA demethylation[J]. *Life Sci*, 2018, 207:127-137.
- [19] de Andres MC, Perez-Pampin E, Calaza M, *et al.* Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1):233.
- [20] Pan Z, Zhang Q, Liu X, *et al.* Methyltransferase-like 3 contributes to inflammatory pain by targeting TET1 in YTHDF2-dependent manner[J]. *Pain*, 2021, 162(7):1960-1976.
- [21] Zhang Q, Zhao K, Shen Q, *et al.* Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6[J]. *Nature*, 2015, 525(7569):389-393.
- [22] Cull AH, Snetsinger B, Buckstein R, *et al.* Tet2 restrains inflammatory gene expression in macrophages[J]. *Exp Hematol*, 2017, 55:56-70.e13.
- [23] Pan W, Zhu S, Qu K, *et al.* The DNA methylcytosine dioxygenase TET2 sustains immunosuppressive function of tumor-infiltrating myeloid cells to promote melanoma progression[J]. *Immunity*, 2017, 47(2):284-297.e5.
- [24] Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K[J]. *BMC Res Notes*, 2015, 8:322.
- [25] Tokito A, Jougasaki M. Matrix metalloproteinases in non-neoplastic disorders[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1178.
- [26] Vandooren J, Knoops S, Aldinucci Buzzo JL, *et al.* Differential inhibition of activity, activation and gene expression of MMP-9 in THP-1 cells by azithromycin and minocycline versus bortezomib: a comparative study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0174853.
- [27] Filkova M, Haluzik M, Gay S, *et al.* The role of resistin as a regulator of inflammation: implications for various human pathologies[J]. *Clin Immunol*, 2009, 133(2):157-170.