

长链非编码 RNA-Paupar 在局麻药致神经毒性过程中的作用研究^{*}

张利亮¹, 祁莉娜², 姚泽宇^{1△}

1. 青海红十字医院 麻醉科(西宁 810000); 2. 青海省人民医院 介入超声科(西宁 810000)

【摘要】 目的 观察长链非编码 RNA-Paupar(lnc-Paupar)在布比卡因诱导的神经毒性过程中的调控作用。**方法** 分离培养小鼠脊髓背根神经节细胞并构建布比卡因神经毒性细胞模型,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)观察 lnc-Paupar 表达,构建 lnc-Paupar 特异的 siRNA-P 及随机对照组 siRNA-C,200 nmol/L 的 siRNA-P、siRNA-C 转染神经节细胞成功后,通过 TUNEL 法观察两组细胞凋亡率,Western blot 观察 JNK 及磷酸化 JNK(p-JNK)蛋白表达。**结果** lnc-Paupar 在布比卡因诱导的神经毒性过程表达增高($P<0.05$),与 siRNA-C 组相比,siRNA-P 组细胞凋亡率降低($P<0.05$)。同时,siRNA-P 组抑制细胞 JNK 及 p-JNK 蛋白表达($P<0.05$)。**结论** Lnc-Paupar 通过 JNK 通路产生致神经毒性作用。

【关键词】 长链非编码 RNA 神经毒性 布比卡因 凋亡

The Role of Long Chain Non-coding RNA-Paupar in the Process of Bupivacaine Induced Neurotoxicity ZHANG Li-liang¹, QI Li-na², YAO Ze-yu^{1△}. 1. Department of Anesthesiology, Qinghai Red Cross Hospital, Xining 810000, China; 2. Department of Interventional Ultrasound, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810000, China

△ Corresponding author, E-mail: qhhszyzy@163.com

【Abstract】 Objective To observe the expression mode and modulation effects of lncRNA-Paupar in the process of bupivacaine induced neurotoxicity. **Methods** Dorsal root ganglion (DRG) neurons were cultured and neurotoxicity model was produced on it. And the expression of lncRNA-Paupar was evaluated by qRT-PCR. Lnc-Paupar specific siRNA-P and random control group siRNA-C were constructed, 200 nmol/L siRNA-P, siRNA-C were transfected into ganglion cells and the apoptosis rate of transfected cells were observed by TUNEL method. The JNK and phosphorylated JNK (p-JNK) protein expression were observed with Western blot, respectively. **Results** LncRNA-Paupar was significantly up-regulated during the process of bupivacaine induced neurotoxicity and siRNA mediated lncRNA-Paupar down-regulation protected DRG neurons cells from apoptosis. Both JNK and p-JNK protein were reduced in siRNA transfected cells exemplified by Western blot. **Conclusion** LncRNA-Paupar could induced neurotoxicity through JNK pathway.

【Key words】 LncRNA Neurotoxicity Bupivacaine Apoptosis

局麻药神经毒性是临床麻醉及术后镇痛中面临的主要问题之一,其机制尚未阐明。内源性长链非编码 RNA(lncRNA)作为非编码 RNA 的重要组成部分,在包括机体生长发育和疾病等生理及病理过程具有重要的调控作用^[1-2]。研究发现 LncRNA-Paupar 在局麻药布比卡因导致的神经毒性过程表达异常^[3],然而其是否参与神经毒性过程、具体调控机制尚未可知。MAPK 激酶中 JNK 通路激活进而诱导的细胞凋亡是神经毒性的重要机制^[4-5]。本研究拟观察 lncRNA-Paupar 是否参与布比卡因诱导的脊髓背根神经节细胞神经毒性,是否通过 JNK 通

路发挥其调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验细胞选择脊髓背根神经节细胞,提取自新生 C57BL/6 小鼠(1~3 d)。DMEM/F12 培养基、10% 胎牛血清, Lipofectamin2000、JNK、磷酸化 JNK(p-JNK)及 β -actin 抗体购自 Abcam 公司(美国)。LncRNA-Paupar 特异性 siRNA(siRNA-Lnc-P: GGAGTTGGGTCATTTCCTT)及对照组 siRNA (siRNA-C: GGCTGTAGGCAAAGTAA TT)由尚柏公司(北京)合成。

1.2 方法

^{*} 青海省卫计委基金(No. 2016wyzd-11)资助

△ 通信作者, E-mail: qhhszyzy@163.com

1.2.1 细胞模型构建及转染 使用 0.3%胰蛋白酶 37 ℃裂解脊髓组织 20 min,将原代细胞重悬后接种于 6 孔板^[6]。培养条件为 37 ℃,95% O₂,5% CO₂。分别采用 0.5 mmol/L、1 mmol/L 布比卡因与细胞共培养 24 h、48 h、72 h 构建神经毒性实验模型。细胞提取后以 $1.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种,分别使用 100 nmol/L siRNA-Lnc-P 及 siRNA-C 辅以 Lipofectamin2000 进行转染,并设空白对照组,混匀后孵育 8 h 后更换新鲜培养基。

1.2.2 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 lncRNA-Paupar 表达 Trizol 法提取神经毒性实验 0、24、48、72 h,及转染 72 h 后 siRNA-Lnc-P 组及 siRNA-C 组的脊髓背根神经节细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,随后以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR。lncRNA-Paupar 正向引物:5'-CTCGAACTCTCTTCCTTGCCAGA-3',反向引物:5'-CGCTGCA AATAGATGGGTG AGTG-3';内参基因 GADPH 正向引物:5'-AGGTCGGTGTGAACG GATTTG-3',反向引物:5'-AGCACTGTGTTGGC GTACA G-3'。扩增程序为:95 ℃ 2 min,95 ℃ 10 s,55 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,循环 40 次;95 ℃ 1 min,60 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。基因的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析。

1.2.3 细胞凋亡实验 选用 TUNEL 法^[7]进行凋亡实验,将 siRNA-Lnc-P 及 siRNA-C 转染后细胞浓度调整为 $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,于培养 72 h 后在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)出现阳性表达,判定转染成功。然后进行 TUNEL 染色(Roche,瑞士)进行凋亡观察,于 200×视野下随机选择 10 个视野计算各组 72 h 的凋亡率。

1.2.4 Western blot 测量 JNK 及 p-JNK 蛋白表达 提取转染 72 h 后 3 组的脊髓背根神经节细胞总蛋白,随后经 SDS-PAGE 分离及 PVDF 转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,JNK 及 p-JNK 蛋白一抗(1:1 000 稀释)4 ℃封闭过夜,与碱性磷酸酶标记的二抗孵育 1 h 后凝胶系统成像。将目的蛋白灰度与内参蛋白 α -actin 灰度比值为目的蛋白相对表达量。

1.2.5 统计学方法 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-Paupar 在布比卡因诱导的神经毒性过程表达状况

见图 1。0.5 mmol/L 布比卡因刺激脊髓背根神经节细胞,48 h 后内源性 lncRNA-Paupar 表达始增高($P < 0.05$),72 h 后表达进一步增高($P < 0.05$)。随初始布比卡因浓度增加,在 1.0 mmol/L 布比卡因刺激下,lncRNA-Paupar 表达增高提前至 24 h 显示出有统计学意义的增高($P < 0.05$),而后显著增高。并且在同一时间点(24 h、48 h、72 h),较高浓度布比卡因可诱导更多内源性 lncRNA-Paupar 表达($P < 0.05$)。

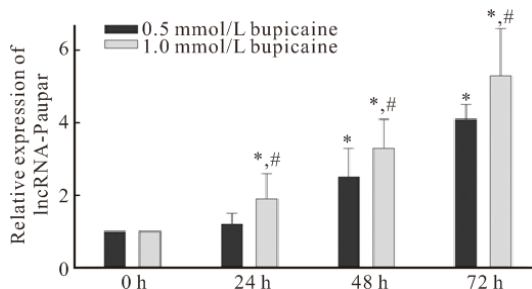


图 1 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 布比卡因诱导的 lncRNA-Paupar 表达

Fig 1 The relative expression of lncRNA-Paupar after the induction of 0.5 mmol/L and 1.0 mmol/L bupivacaine

* $P < 0.05$, vs. former time point in the same group; # $P < 0.05$, vs. 0.5 mmol/L bupivacaine at the same time point

2.2 抑制 lncRNA-Paupar 表达对细胞凋亡的影响

siRNA-Lnc-P 及 siRNA-C 72 h 后转染成功(图 2)。与 siRNA-C 组相比,siRNA-Lnc-P 降低布比卡因诱导的 lncRNA-Paupar 表达增高($12.3\% \pm 5.7\%$ vs. $47.4\% \pm 10.2\%$, $P < 0.05$)。同时,经 TUNEL 法测定,siRNA-Lnc-P 组凋亡率较 siRNA-C 组降低(图 3, $24.7\% \pm 6.2\%$ vs. $67.3\% \pm 12.4\%$, $P < 0.05$)。

2.3 lncRNA-Paupar 对 MAPK 通路中 JNK 及 p-JNK 蛋白表达的影响

见图 4。脊髓背根神经节细胞转染 72 h 后,经 Western blot 测定,与空白对照组和 siRNA-C 组相比,siRNA-Lnc-P 转染神经节细胞使 JNK 通路中包括 JNK 及 p-JNK 蛋白的表达均降低($P < 0.05$)。

3 讨论

局麻药致神经毒性的发生机制是目前研究的热点和难点,我们对临床麻醉过程常见的局麻药神经毒性研究发现:lncRNA-Paupar 通过作用于凋亡相关 MAPK 通路导致神经细胞凋亡,进而揭示出 lncRNA 在局麻药神经毒性过程的重要调控作用。

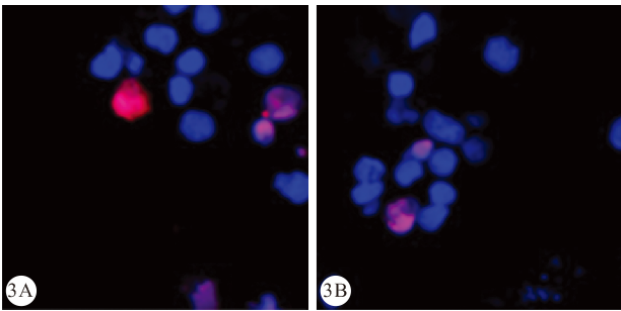
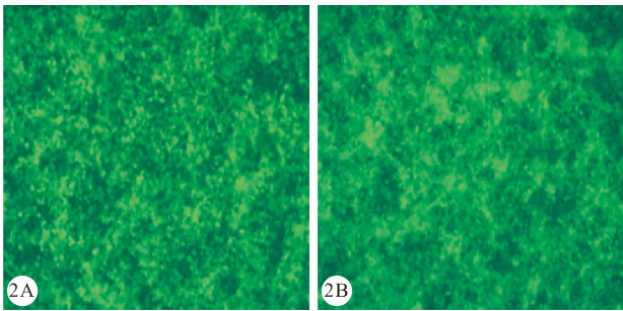


图 2 LncRNA-Paupar 特异 siRNA-Lnc-P(A)及 siRNA-C(B)转染。×100 图 3 siRNA 转染脊髓背根神经节细胞 72 h。×400
Fig 2 Green fluorescent protein (GFP) expression of dorsal root ganglion neurons transfected with lncRNA-Paupar specific siRNA-Lnc-P (A) and siRNA-C (B). ×100 Fig 3 Laser confocal microscopy of siRNA transfected dorsal root ganglion neurons after 72 h. ×400

Cells transfected with siRNA-C and (3A) siRNA-Lnc-P (3B). The nuclei are shown in blue (DAPI staining), the apoptotic cells are in red (TUNEL staining)

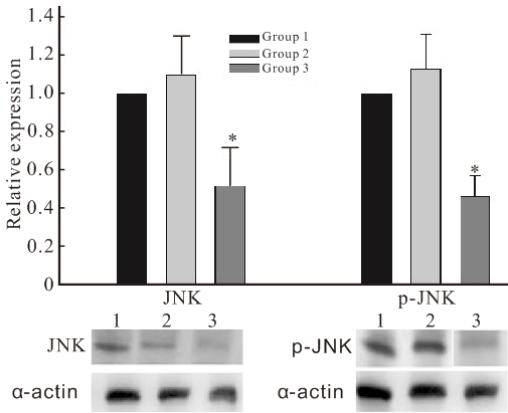


图 4 siRNA 转染脊髓背根神经节细胞后对 JNK 及 p-JNK 蛋白表达的影响
Fig 4 The expression of JNK and p-JNK protein after siRNA transfected dorsal root ganglion neurons

* $P<0.05$, vs. Group 1 and group 2. 1, 2, 3: Blank control, siRNA-C, and siRNA-Lnc-P, respectively

lncRNA 作为非编码 RNA 的重要部分,在众多生理及病理过程存在重要的调控作用,然而尚未有 lncRNA 参与局麻药神经毒性方面的研究。本研究对局麻药神经毒性的发生机制进行了有效的补充,为其解决提供了新的研究思路。

本研究对 lncRNA-Paupar 在局麻药致神经毒性过程的表达模式、神经细胞表型改变及具体通路进行了阐释。实验细胞选择了连接中枢和外周神经系统的脊髓背根神经节细胞,此类细胞是发生局麻药神经毒性病变的主要部位^[8]。我们选择在脊椎动物进化高度保守、调控神经细胞发育分化等功能的内源性 lncRNA-Paupar 进行研究^[9]。我们通过构建布比卡因诱导的局麻药神经毒性细胞模型发现:

lncRNA-Paupar 在导致神经毒性过程表达增高,其表达模式随布比卡因使用剂量和刺激时间增加而增加。这与临床麻醉中神经毒性发生与局麻药使用剂量及使用时间的关系一致。凋亡是神经毒性的主要病变基础,我们采用 siRNA 技术抑制 lncRNA-Paupar 表达后,发现细胞凋亡率下降,即缓解了局麻药诱导的神经毒性发生率,从而明确了 lncRNA-Paupar 的致神经毒性作用。为进一步研究 lncRNA-Paupar 在调控神经毒性过程的具体机制,我们对导致细胞凋亡的 JNK 通路进行了研究。JNK 通路是 MAPK 激酶中致局麻药神经毒性过程的重要通路之一,其持续激活会引起细胞内大量活性氧自由基产生,进而损伤细胞、导致细胞凋亡,一旦其生产过多即会导致细胞死亡。本研究发现,抑制内源性 lncRNA-Paupar 表达显著降低了 JNK 通路中 JNK 及 p-JNK 蛋白的表达,从而明确 lncRNA-Paupar 参与神经毒性过程中的具体通路。本研究为细胞学实验,仍需进一步在体动物实验及临床证据支持。

参 考 文 献

[1] BATISTA PJ, CHANG HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease. *Cell*,2013,152(6): 1298-1307.
[2] AHADI A, KHOURY S, LOSSEVA M, *et al.* A comparative analysis of lncRNAs in prostate cancer exosomes and their parental cell lines. *Genomics Data*,2016,9:7-9[2017-03-17]. http://ac.els-cdn.com/S2213596016300691/1-s2.0-S2213596016300691-main.pdf?_tid=b2bc066c-3c9e-11e7-8b86-00000aabb0f01&acdnat=1495203975afee8ed2f50e2507adb440a804dd431e. doi: 10.1016/j.gdata.2016.05.010

- [3] VANCE KW, SANSOM SN, LEE S, *et al.* The long non-coding RNA Paupar regulates the expression of both local and distal genes. *EMBO J*, 2014, 33(4): 296-311.
- [4] LIU J, CHANG F, LI F, *et al.* Palmitate promotes autophagy and apoptosis through ROS-dependent JNK and p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 262-267.
- [5] ZHANG L, DITTMER MR, BLACKWELL K, *et al.* TRAIL activates JNK and NF- κ B through RIP1-dependent and -independent pathways. *Cell Signalling*, 2015, 27(2): 306-314.
- [6] ZHANG Y, YAN LL, CAO Y, *et al.* Long noncoding RNA BDNF-AS protects local anesthetic induced neurotoxicity in dorsal root ganglion neurons. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80: 207-212 [2017-03-19]. http://ac.els-cdn.com/S0753332216302335/1-s2.0-S0753332216302335-main.pdf?_tid=7a22a18e-3c9f-11e7-beea-00000aabb0f26&acdnat=1495204310_1d5875727647c82932062034a822a0c2. doi: 10.1016/j.biopha.2016.03.003.
- [7] KYRYLKOVA K, KYRACHENKO S, LEID M, *et al.* Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*, 2012, 887: 41-47. doi: 10.1007/978-1-61779-860-3_5.
- [8] YU B, ZHOU S, HU W, *et al.* Altered long noncoding RNA expressions in dorsal root ganglion after rat sciatic nerve injury. *Neurosci. Lett*, 2013, 534: 117-122 [2017-04-11]. http://ac.els-cdn.com/S0304394012015765/1-s2.0-S0304394012015765-main.pdf?_tid=6be850ea-3ca0-11e7-a923-00000aabb362&acdnat=1495204716_7c8fa8f3b2751aeaf8ad2824ff6e93ed. doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.014.
- [9] DING X, WANG X, LIN M, *et al.* PAUPAR lncRNA suppressed tumorigenesis by H3K4 demethylation in uveal melanoma. *FEBS Letter*, 2016, 590(12): 1729-1738. (2017-03-25 收稿, 2017-06-21 修回)

编辑 吕 熙

• 个案报告 •

HBV/HCV 合并感染患者使用 DAAs 类抗 HCV 药物后 HBV 复制激活 2 例报告*

章青波¹, 严丽波^{2,3}, 唐 红^{2,3△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 法医病理教研室 (成都 610041); 2. 四川大学华西医院 感染性疾病中心 (成都 610041); 3. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室 感染性疾病研究室 (成都 610041)

【关键词】 乙型肝炎病毒(HBV) 丙型肝炎病毒(HCV) 合并感染 病毒复制 激活

病例 1, 患者, 男性, 45 岁。因“乙肝标志物阳性 20⁺ 年, 肝功能异常 3⁺ 年”9 月前于我院门诊就诊, 未行抗乙型肝炎病毒(HBV)治疗。肝功能检查示谷丙转氨酶(ALT)291 IU/L、总胆红素(TB)28.2 μ mol/L, HBV DNA < 100 IU/mL (阴性), anti-丙型肝炎病毒(HCV)阳性, HCV RNA 8.93×10^5 IU/mL, HCV 基因型 1b, 腹部彩超提示肝硬化, 其余检查未见明显异常。随后, 患者服用针对 HCV 的直接抗病毒药物(DAAs)类药物 Harvoni(ledipasvir 和 sofosbuvir), 治疗第 2 周 HCV RNA 下降至 63 IU/mL, HBV DNA 阴性; 第 4 周 HCV RNA 扩增阴性, HBV DNA 阴性; 第 12 周时来我院复查, HCV RNA 扩增阴性, 但此时 HBV DNA 453 IU/mL; 第 24 周 HCV RNA 扩增阴性, HBV DNA 5 280 IU/mL, 此时加用恩替卡韦(entecavir)0.5 mg po qd 抗 HBV 治疗, 同时抗 HCV 治疗结束。DAAs 停药 12 周时(第 36 周)复查, HBV DNA < 500 IU/mL, HCV RNA 扩增阴性, 恩替卡韦一直继续使用。

病例 2, 肾移植术后患者, 男性, 34 岁, 发现 HBV 合并 HCV 感染 5⁺ 年。3 月前于我院门诊查得 ALT 84 IU/mL, TB 18.9 μ mol/L, 肌酐 89.0 μ mol/L, HCV RNA 8.23×10^5 IU/mL, HCV 基因型 1b, HBV DNA 阴性, 其余未见明显异常。以 DAAs 类药物 sofosbuvir 以及 daclatasvir, 治疗第 2 周 HCV RNA 下降至 47.5 IU/mL, HBV DNA 阴性; 第 4 周 HCV RNA 扩增阴性, 未查 HBV DNA; 第 8 周 HCV RNA 扩增阴性, HBV DNA 1 140 IU/mL, 加用了替比夫定(Telbivudine)600 mg po qd 抗 HBV 治疗; 第 12 周 HCV RNA 扩增阴性, HBV DNA 阴性, 抗 HCV 治疗结束, 替比夫定继续使用。

讨论 目前使用 DAAs 治疗 HCV 逐渐普遍, 对于 HBV/HCV 合并感染人群, DAAs 药物的使用究竟对 HBV 有何影响? 在临床诊治中, 我们发现 2 例 HBV/HCV 合并感染患者使用 DAAs 类药物后 HBV 复制激活的病例。这 2 例患者在接受积极的抗 HBV 治疗后, HBV 病毒均得到了有效的控制。

近两年国外文献亦有使用 DAAs 后 HBV 再激活的个案报道。而且 HBV 激活不仅只发生于 HBsAg 阳性的患者, HBsAg 阴性、HBcAb 阳性的患者亦也可能出现 HBV 激活、肝炎发作。HBV 再激活的患者中有出现肝衰竭、甚至死亡的病例。因此, 最近美国食品药品监督管理局(FDA)要求所有 DAAs 药物说明书中增加黑框警告, 以提醒这类特殊群体使用 DAAs 类药物时应注意监控。需要注意的是对于 HCV 感染合并 HBcAb 阳性的患者, DAAs 治疗 HCV 期间亦需警惕 HBV 激活, 治疗过程中亦需监测肝功能、HBV DNA。HBV/HCV 合并感染的患者使用 DAAs 类药物抗 HCV 治疗后 HBV 复制激活的机制还有待进一步研究阐明。

* 四川省科技计划项目 (No. 2015SZ0049) 和四川省卫计委科研课题 (No. 17PJ002) 资助

△ 通信作者, E-mail: htang6198@hotmail.com

(2017-03-16 收稿, 2017-07-17 修回)

编辑 沈 进