

Gm14461 通过招募 CSTF2 上调 CGRP 和 P2X3/7 受体表达促进三叉神经痛的作用机制研究

汪 逵, 潘 轲, 邬 立 (恩施土家族苗族自治州中心医院神经外科, 湖北恩施 445000)

摘要: 目的 研究长链非编码 RNA (lncRNA) Gm14461 促进三叉神经痛 (TN) 的作用及其潜在的可能分子机制。方法 通过眶下神经慢性压迫损伤手术诱导建立 TN 小鼠模型, 采用 Gm14461 的短发夹 RNA (shRNA) 注射 TN 小鼠, 测量小鼠三叉神经节中 Gm14461 表达水平和机械痛阈值 (MWT)。采用肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 诱导三叉神经节在体外建立 TN 细胞模型, 采用 sh-Gm14461 和裂解刺激因子 2 (CSTF2) 过表达载体 (OE-CSTF2) 处理三叉神经节。RNA 免疫共沉淀 (RIP) 分析 CSTF2 与 Gm14461, 降钙素基因相关肽 (CGRP)、嘌呤受体 P2X3 和 P2X7 mRNA 的结合情况。结果 与假手术组相比, TN 组小鼠三叉神经节中 Gm14461 表达显著升高 ($t=35.450$), 小鼠 MWT 值呈时间依赖性降低 ($t=8.427 \sim 28.190$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$); TN 小鼠三叉神经节中炎症因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 表达水平及疼痛相关蛋白 CGRP, P2X3, P2X7 水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=31.750 \sim 50.240$, 均 $P<0.05$)。敲低 Gm14461 显著改善 TN 小鼠 MWT ($t=6.019 \sim 26.548$), 降低炎症因子 ($t=43.959, 26.416, 25.431$) 和疼痛相关蛋白水平 ($t=38.709, 43.257, 45.807$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。与对照组比较, TNF- α 诱导的三叉神经节中 Gm14461 表达上调 ($t=27.710$), 炎症因子水平和疼痛相关蛋白表达水平显著升高 ($t=23.076 \sim 29.508$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。敲低 Gm14461 后, Gm14461 表达水平降低 ($t=3.641$), 显著降低 TNF- α 诱导的三叉神经节中炎症因子和疼痛相关蛋白水平 ($t=20.560 \sim 25.136$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。Gm14461 与 CSTF2 结合上调 CSTF2 蛋白水平, CSTF2 蛋白上调分别与 CGRP, P2X3, P2X7 的 mRNA 结合并促进其表达。过表达 CSTF2 可逆转 Gm14461 敲低对 TNF- α 诱导的三叉神经节 (TGs) 中炎症反应和疼痛相关蛋白表达的抑制作用 ($t=18.870 \sim 24.399$, 均 $P<0.05$)。结论 Gm14461 通过招募 CSTF2 上调 CGRP, P2X3 和 P2X7 表达, 促进炎症反应, 从而降低 TN 小鼠的机械痛阈值, 促进疼痛。

关键词: 三叉神经痛; Gm14461; 裂解刺激因子 2; 降钙素基因相关肽; P2X3/7 受体

中图分类号: R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 03-018-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.03.004

Study on the Mechanism of Gm14461 Promoting Trigeminal Neuralgia by Recruiting CSTF2 to Upregulate CGRP and P2X3/7 Receptor Expression

WANG Kui, PAN Ke, WU Li (Department of Neurosurgery, Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture Central Hospital, Hubei Enshi 445000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of long non coding RNA (lncRNA) Gm14461 in promoting trigeminal neuralgia (TN) and its potential molecular mechanisms. **Methods** A TN mouse model was induced by surgery for chronic compression injury of the infraorbital nerve. Short hairpin RNA (shRNA) of Gm14461 was injected into TN mice, and the expression level of Gm14461 and mechanical pain threshold (MWT) in the trigeminal ganglia of the mice were measured. A TN cell model was established in vitro using tumor necrosis factor - α (TNF- α) to induce trigeminal ganglia, and the trigeminal ganglia were treated with sh-Gm14461 and cleavage stimulation factor subunit 2 (CSTF2) overexpression vector (OE-CSTF2). RNA immunoprecipitation (RIP) analysis of CSTF2 binding to Gm14461, calcitonin gene-related peptide (CGRP), purine receptors P2X3 and P2X7 mRNA. **Results** Compared with the sham surgery group, the expression of Gm14461 in the trigeminal ganglia of TN group mice was significantly increased ($t=35.450$), and the MWT value of mice decreased in a time-dependent manner ($t=8.427 \sim 28.190$), with statistical significance (all $P<0.05$). The expression levels of inflammatory factors TNF - α , IL-1 β and IL-6, as well as pain related proteins CGRP, P2X3, and P2X7, were significantly increased in the trigeminal ganglia of TN mice, and the differences were statistically significant ($t=31.750 \sim 50.240$, all $P<0.05$). Knocking down Gm14461 significantly improved MWT ($t=6.019 \sim 26.548$), reduced inflammatory factors ($t=43.959, 26.416, 25.431$),

基金项目: 湖北省自然科学基金 (项目编号: 2023AFD073)。

作者简介: 汪逵 (1986-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 三叉神经痛发病机制, E-mail: Waangki@163.com。

通讯作者: 潘轲 (1974-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 三叉神经痛发病机制, E-mail: 1985680369@qq.com。

and pain related protein levels ($t=38.709, 43.257, 45.807$) in TN mice, with statistically significant differences (all $P<0.05$). Compared with the control group, TNF - α induced upregulation of Gm14461 expression in the trigeminal ganglia ($t=27.710$), significantly increased levels of inflammatory factors and pain related protein expression ($t=23.076 \sim 29.508$), and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). After knocking down Gm14461, the expression of Gm14461 was significantly reduced ($t=3.641$), and the levels of inflammatory factors and pain related proteins in the trigeminal ganglia induced by TNF - α were significantly reduced ($t=20.560 \sim 25.136$), with statistical significance (all $P<0.05$). Gm14461 upregulates CSTF2 protein levels by binding to CSTF2, and upregulates CSTF2 protein by binding to mRNA of CGRP, P2X3, and P2X7 and promoting their expression. Overexpression of CSTF2 can reverse the inhibitory effect of Gm14461 knockdown on TNF - α - induced inflammation and pain related protein expression in trigeminal ganglia (TGs) ($t=18.870 \sim 24.399$, all $P<0.05$).

Conclusion Gm14461 upregulates the expression of CGRP, P2X3, and P2X7 by recruiting CSTF2, promotes inflammatory response, thereby reducing the mechanical pain threshold of TN mice and promoting pain.

Keywords: trigeminal neuralgia; Gm14461; cleavage stimulation factor subunit 2; calcitonin gene-related peptide; P2X3/7 receptor

三叉神经痛 (trigeminal neuralgia, TN) 是一种常见的慢性神经性疼痛,其特征是三叉神经分布出现严重的偶发性疼痛^[1]。目前 TN 的主要治疗方法包括药物治疗、微血管减压术、经皮射频神经根切断术和立体定向放射治疗等,但治疗效果并不令人满意^[2]。最新证据表明,长链非编码 RNA (lncRNA) 在神经性疼痛的发展中起着重要作用,如报道 lncRNA 钾电压门控通道亚家族 Q 成员 1 反向转录物 1 (potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 opposite strand/antisense transcript 1, KCNQ1OT1) 通过下调髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 缓解坐骨神经慢性压迫损伤引发的神经性疼痛^[3]。lncRNA-Anxa10-203 通过在三叉神经节 (trigeminal ganglions, TGs) 中介导增强黑皮质素 -1 受体 (melanocortin 1 receptor, MC1R) 的 mRNA 稳定性,促进神经性疼痛^[4]。lncRNA Gm14461 被报道在 TN 模型小鼠中表达显著上调^[5],干扰 Gm14461 可以提高 TN 小鼠的机械痛阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT),缓解神经性疼痛^[6]。然而 Gm14461 在 TN 中的分子机制尚不完全清楚。神经性疼痛由多种诱发因素导致,包括过度炎症反应,肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、白细胞介素 -1 β (IL-1 β) 和 IL-6 通过调节 TGs 外周末梢内的免疫反应在 TN 的发病过程中起着非常重要的作用^[7]。此外,研究报道在三叉神经损伤中降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP)、嘌呤受体 P2X3 和 P2X7 通过调节感受器起到重要作用^[2,8]。因此,本研究试图探究 Gm14461 在 TN 发病过程中是否调节 CGRP 和 P2X3/7 受体表达以及炎症反应,旨在阐明 Gm14461 在 TN 中的发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 40 只 4 周龄 C57BL/6J 小鼠,体重 20 ± 2 g,西安交通大学动物实验中心,在 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$,相对湿度为 45% ~ 55% 的条件下,12h 光照/12h 黑暗循

环条件下适应性饲养一周。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM 培养液、胎牛血清、青霉素/链霉素、剪切刺激因子 α , TRIzol 试剂和 miScript SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (美国 Life Technologies 公司); 细胞转染试剂 Lipofectamine 3000TM (美国 Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 (TaKaRa 公司); RIPA 裂解缓冲液和 BCA 蛋白测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Anti-裂解刺激因子 2 (CSTF2), Anti-CGRP, Anti-P2X3, Anti-P2X7, Anti-GAPDH 和羊抗鼠 IgG 抗体 (Abcam 公司); Gm14461 的短发夹 RNA (sh-Gm14461), CSTF2 过表达载体 (OE-CSTF2) 和对照载体 (NC shRNA 和 pcDNA3.1 载体 [Vector]) (上海生物工程科技有限公司); 放线菌酮 (CAS: 66-81-9) (上海默克生物科技有限公司)。Centrifuge5804R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Tanno 5200 型化学发光凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司); SpectraMaxi3x 型多功能酶标仪 (美国 MD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 TN 小鼠模型建立: 通过眶下神经慢性压迫性损伤 (chronic constriction injury of the infraorbital nerve, CCI-ION) 建立小鼠 TN 模型^[9]。腹腔注射 50mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉,固定头部,术中保持嘴部张开。从第一颗臼齿旁开始,在颊黏膜的左侧牙龈颊缘切 1cm 切口,释放左侧眶下神经,用 4-0 肠道结扎线松散绑住,后缝合切口。压迫标准: 结扎显著减小了神经的直径,减缓但不阻断通过浅表血管的循环。假手术组只接受神经暴露,不进行结扎。所有动物对侧保持完整。

1.3.2 动物实验分组与处理: 将 40 只小鼠随机分为四组、每组 10 只。假手术组、TN 组、sh-NC 组和 sh-Gm14461 组。sh-NC 和 sh-Gm14461 组在 TN 模型构建后、分别通过眶下孔向三叉神经节局部注射

sh-NC 和 sh-Gml4461 腺病毒载体。

1.3.3 机械痛阈值(MWT)的测量: 在 CCl₄-ION 术后 0, 3, 7, 10 和 14 天测量 MWT, 将小鼠置于单独的透明塑料室中, 使用 Von Frey 毛刷在建模前 1 天、当天及术后每天规定时间内刺激大鼠术侧胡须垫区。刺激强度逐渐增加, 直至出现戒断反应。MWT 定义为在连续 5 次应用中产生至少三个积极反应(快速撤退、躲避、转弯、攻击和刮擦动作), 最低刺激力(g)。

1.3.4 小鼠三叉神经节的分离和培育: 通过颈椎脱位处死小鼠, 手术刀快速切开头骨, 打开脑组织暴露三叉神经节, 在解剖显微镜下用镊子和手术刀将 TGs 取出, 在预冷的 PBS 缓冲液(pH 7.4) 中用细镊子和剪刀切断纤维组织。后将分离的 TGs 用 0.25g/dl 胶原酶消化 25 min, 再用 0.5g/dl 胰蛋白酶消化 15 min, 终止消化, 加入含 10ml/dl 胎牛血清 DMEM 培养液培养, 制成单细胞悬液, 接种于 0.1g/dl 聚赖氨酸涂层载玻片上培养 2h, 更换添加 2.5ml/dl 胎牛血清, 2g/dl B27 的 DMEM 培养液, 并补充有 0.05mg/ml 青霉素, 0.05mg/ml 链霉素和 0.1mg/ml 新霉素, 继续培养。

表 1

PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
Gml4461	5'-GAAGAACCAAGTACCACTCTA-3'	5'-TGGAAAAACGGATGCATCCCA-3'
IL-1 β	5'-ACAGGAGTAGGACCTTCCAGGT-3'	5'-GTGATGTCCGAGGCTCTACTTG-3'
TNF- α	5'-TGGGATGCCTTCTCCAGCTT-3'	5'-CAGCAACTAGTGAGATGGGAG-3'
IL-6	5'-GAACACTCTACCATCGGAGGCT-3'	5'-ACTACGTGAACGTACTTGTGTCT-3'
GAPDH	5'-TAGGACAGTCGTTACGGAAGACG-3'	5'-CAGGTGGAAGGTCGTGGAGTGA-3'

1.3.7 Western blot 检测 CGRP, P2X3, P2X7, CSTF2, GAPDH 蛋白表达水平: 用 RIPA 提取待测组织和细胞中的总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将等量的蛋白样品在 12g/dl 的 SDS-PAGE 进行分离, 并转移到 PVDF 膜上, 将膜在 5g/dl 脱脂奶粉中室温封闭 2h, 然后分别加入稀释后的 CGRP, P2X3, P2X7, CSTF2 一抗(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 次日加入辣根过氧化物酶(HRP) 标记的相应二抗, 室温孵育 2h。采用 ECL 试剂盒在增强化学发光系统中将蛋白条带可视化, Bio-Rad 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.3.8 RNA 免疫沉淀(RIP)分析 CSTF2 与 Gml4461, CGRP, P2X3/7 间的结合: 使用 Magna RIP 试剂盒进行检测, 取处理后各组待测 TGs 加入 RIP 裂解缓冲液裂解, 然后与 Anti-CSTF2 抗体偶联的磁珠在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 以抗 IgG 结合的磁珠作为阴性对照, 从珠粒中洗脱 RNA, 通过 RT-qPCR 分析 Gml4461, P2X3, P2X7 和 CGRP 的 mRNA 表达。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析, 所有资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。Student's *t* 检验分析两组之间的差异性; 单因素方差分析评估多组之间的差异性, LSD 检验进一步行组间两两比较。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.3.5 细胞实验分组和处理: 将分离的 TGs 细胞随机分为对照组、TNF- α 组(10ng/ml 的 TNF- α 处理)、TNF- α +sh-NC 组(TNF- α 和 NC shRNA 共处理)、TNF- α +sh-Gml4461 组(TNF- α 和 sh-Gml4461 共处理)、TNF- α +sh-Gml4461+Vector 组(TNF- α , sh-Gml4461 和 pcDNA 空载体共处理)和 TNF- α +sh-Gml4461+OE-CSTF2 组(TNF- α , sh-Gml4461 和 CSTF2 过表达载体共处理)。

1.3.6 RT-qPCR 分析检测 Gml4461, IL-1 β , TNF- α 及 IL-6 相对表达水平: 使用 Trizol 提取小鼠三叉神经节组织和细胞中总 RNA, Prime Script RT 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。在 ABI 7500 实时 PCR 系统上, 使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒进行 qPCR 分析。反应条件 95 $^{\circ}$ C 1min, 95 $^{\circ}$ C 20s, 56 $^{\circ}$ C 10s 和 72 $^{\circ}$ C 15s, 进行 30 个循环。以 GAPDH 作为内参, 通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 Gml4461, IL-1 β , TNF- α 及 IL-6 的 mRNA 相对表达水平。PCR 引物序列见表 1, 由上海生工生物公司设计合成。

2 结果

2.1 Gml4461 在 TN 小鼠中的表达及对小鼠 MWT 影响 见表 2, 图 1。与假手术组相比, TN 组小鼠三叉神经节中 Gml4461 表达显著升高($t=35.450$), 敲低 Gml4461 后抑制了 Gml4461 表达($t=27.819$, $P < 0.05$), TN 组小鼠 MWT 值较假手术组呈时间依赖性降低($t=8.427 \sim 28.190$), 敲低 Gml4461 可升高小鼠 MWT 值($t=6.019 \sim 26.548$), 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与此同时, TN 组小鼠 TGs 中疼痛相关蛋白 CGRP, P2X3/7 表达水平较假手术组显著升高($t=47.382$, 45.878, 50.240), 而敲低 Gml4461 显著降低 CGRP, P2X3/7 表达水平($t=38.709$, 43.257, 45.807), 差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

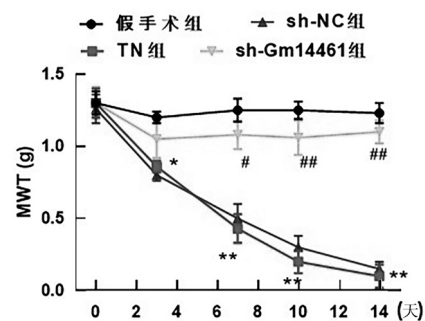


图 1 不同时间点各组小鼠的 MWT 值检测结果

2.2 敲低 Gm14461 缓解 TN 小鼠的炎症反应 见表 3。与假手术组比较, TN 组小鼠三叉神经节中炎症因子 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 相对表达水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=46.376, 31.750, 34.766,$

均 $P<0.05$); 而敲低 Gm14461, sh-Gm14461 组与 sh-NC 组比较, 小鼠 TGs 中 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 相对表达水平显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=43.959, 26.416, 25.431,$ 均 $P<0.05$)。

表 2 敲低 Gm14461 对 TN 小鼠疼痛及相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$)

项目	假手术组	TN 组	sh-NC 组	sh-Gm14461 组	F	P
Gm14461 mRNA	1.01 \pm 0.01	2.45 \pm 0.12	2.49 \pm 0.11	1.36 \pm 0.08	692.232	<0.001
MWT 值						
0 天	1.30 \pm 0.13	1.27 \pm 0.11	1.29 \pm 0.14	1.28 \pm 0.12	0.106	0.956
3 天	1.24 \pm 0.10	0.89 \pm 0.09*	0.86 \pm 0.08	1.11 \pm 0.10	38.222	<0.001
7 天	1.27 \pm 0.12	0.50 \pm 0.06*	0.52 \pm 0.05	1.17 \pm 0.12	194.575	<0.001
10 天	1.26 \pm 0.11	0.23 \pm 0.04*	0.29 \pm 0.03	1.15 \pm 0.11	449.975	<0.001
14 天	12.5 \pm 0.13	0.14 \pm 0.03*	0.16 \pm 0.03	1.24 \pm 0.10	483.092	<0.001
CGRP 蛋白	1.02 \pm 0.02	3.26 \pm 0.15	3.08 \pm 0.13	1.25 \pm 0.07	1 247.987	<0.001
P2X3 蛋白	1.00 \pm 0.01	2.75 \pm 0.11	2.79 \pm 0.12	1.14 \pm 0.05	1 329.026	<0.001
P2X7 蛋白	0.98 \pm 0.02	2.68 \pm 0.10	2.71 \pm 0.10	1.16 \pm 0.05	1 547.176	<0.001

表 3 敲低 Gm14461 对 TN 小鼠炎症反应因子的作用 ($\bar{x}\pm s$)

项目	假手术组	TN 组	sh-NC 组	sh-Gm14461 组	F	P
TNF- α mRNA	1.01 \pm 0.02	3.12 \pm 0.15	3.08 \pm 0.13	1.08 \pm 0.04	1361.119	<0.001
IL-1 β mRNA	1.02 \pm 0.03	2.27 \pm 0.11	2.31 \pm 0.12	1.27 \pm 0.06	577.667	<0.001
IL-6 mRNA	1.01 \pm 0.02	2.09 \pm 0.10	1.95 \pm 0.08	1.16 \pm 0.05	618.497	<0.001

2.3 敲低 Gm14461 抑制 TNF- α 诱导的三叉神经节细胞中 CGRP 和 P2X3/7 受体的表达和炎症反应 见表 4。TNF- α 诱导的 TGs 细胞中 Gm14461 表达水平显著升高 ($t=27.710$), 敲低 Gm14461 后 Gm14461 表达水平降低 ($t=3.641$), 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组比较, TNF- α 诱导的 TGs 细胞中 CGRP, P2X3/7 蛋白表达显著升高 ($t=24.211, 23.076, 23.947$), 炎症因子 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6

的 mRNA 表达水平显著上调 ($t=29.508, 27.383, 27.196$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。敲低 Gm14461, NF- α +sh-NC 组与 TNF- α +sh-Gm14461 组比较, CGRP, P2X3/7 蛋白表达水平显著降低 ($t=20.560, 20.732, 20.887$), 抑制 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 的 mRNA 相对表达 ($t=25.136, 24.198, 24.435$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。

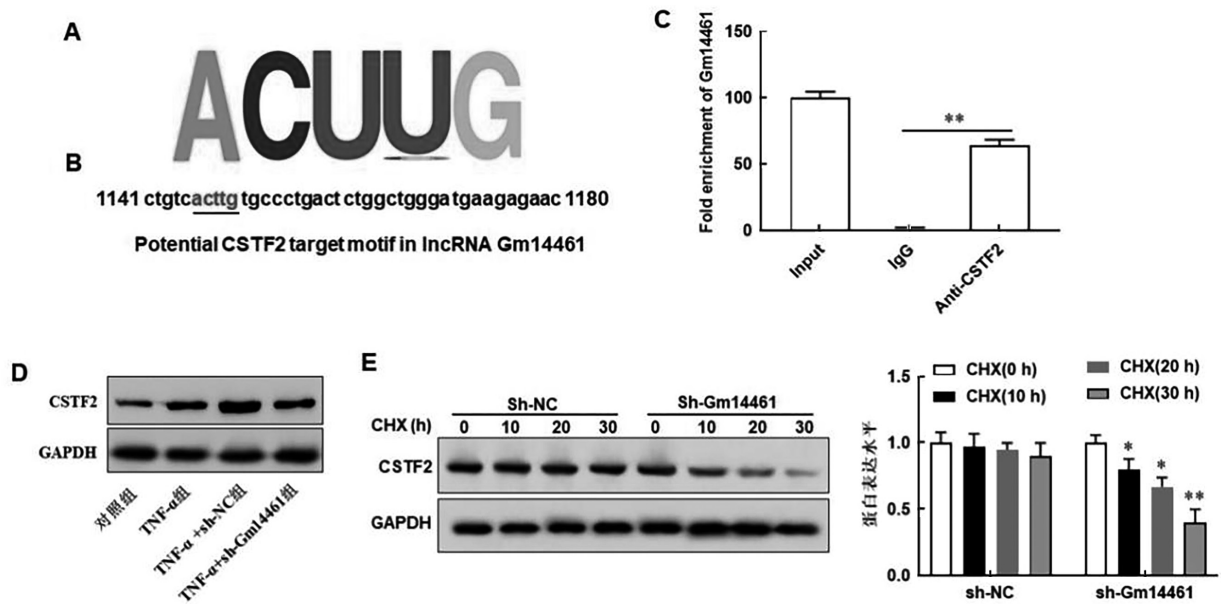
表 4 敲低 Gm14461 对 TNF- α 诱导的 TGs 细胞中 CGRP, P2X3/7 相关蛋白及炎症反应因子的影响 ($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	TNF- α 组	TNF- α +sh-NC 组	TNF- α +sh-Gm14461 组	F	P
Gm14461 mRNA	1.01 \pm 0.02	5.12 \pm 0.26	5.07 \pm 0.24	1.53 \pm 0.08	308.851	<0.001
CGRP 蛋白	1.02 \pm 0.01	3.54 \pm 0.18	3.49 \pm 0.17	1.35 \pm 0.06	337.514	<0.001
P2X3 蛋白	1.01 \pm 0.02	2.88 \pm 0.13	2.92 \pm 0.14	1.24 \pm 0.05	322.627	<0.001
P2X7 蛋白	1.01 \pm 0.01	2.81 \pm 0.12	2.83 \pm 0.13	1.26 \pm 0.05	338.723	<0.001
TNF- α mRNA	0.99 \pm 0.02	5.31 \pm 0.24	5.35 \pm 0.25	1.67 \pm 0.09	504.883	<0.001
IL-1 β mRNA	1.01 \pm 0.03	4.02 \pm 0.19	4.05 \pm 0.18	1.39 \pm 0.06	447.441	<0.001
IL-6 mRNA	1.02 \pm 0.02	3.68 \pm 0.16	3.64 \pm 0.17	1.25 \pm 0.05	446.193	<0.001

2.4 敲低 Gm14461 降低 CSTF2 蛋白水平 见图 2。Starbase 数据库预测结果显示, CSTF2 在 Gm14461 上存在结合位点, 见图 2A, 2B。经 RIP 分析验证发现, 在 Anti-CSTF2 抗体下拉的 RNA- 蛋白复合物中 Gm14461 显著富集 ($P<0.01$), 见图 2C, 提示 CSTF2 能够与 Gm14461 相互结合。此外发现, TNF- α 诱导组 TGs 细胞中 CSTF2 mRNA (5.12 ± 0.26) 和蛋白 (2.38 ± 0.07) 水平较对照组显著上调 ($1.01 \pm 0.02, 0.98 \pm 0.03$), 差异具

有统计学意义 ($t=27.710, 28.284, P<0.05$); 敲低 Gm14461 组 CSTF2 蛋白 (1.19 ± 0.05) 水平较 TNF- α +sh-NC 组 (2.41 ± 0.08) 显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=24.648, P<0.05$), 但 CSTF2 mRNA (2.57 ± 0.09 vs 2.55 ± 0.08) 水平差异无统计学意义 ($t=0.336, P>0.05$), 见图 2D。研究采用放线菌酮处理 sh-Gm14461 转染的 TG 来抑制蛋白合成, 结果显示敲低 Gm14461 加速 CSTF2 蛋白降解, 见图 2E, 提示敲低 Gm14461 可能通过加速

CSTF2 蛋白降解参与 TN 进展。

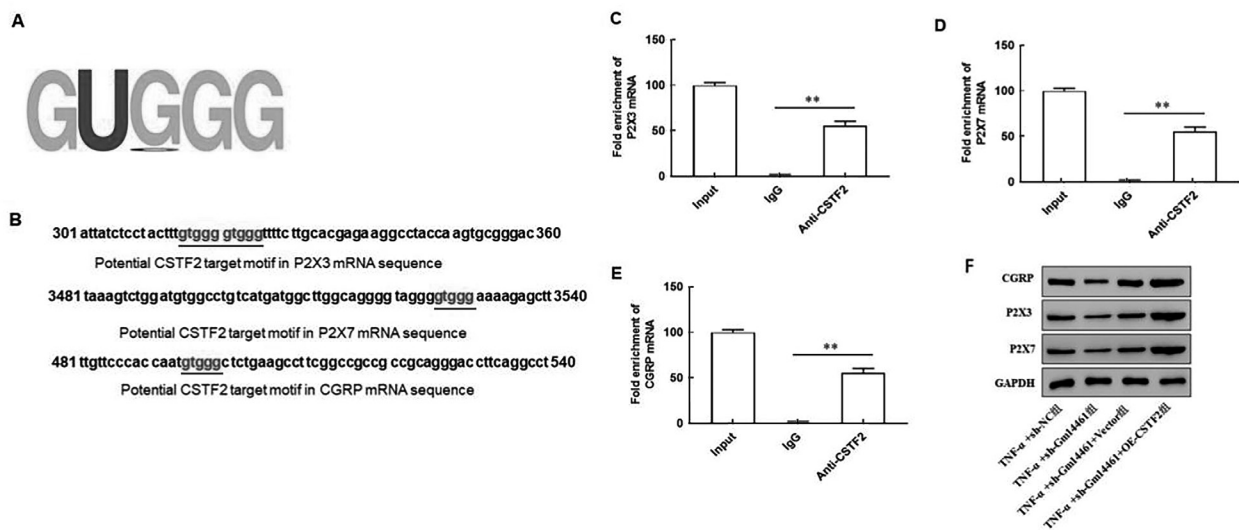


A. CSTF2 蛋白结合基序; B. CSTF2 在 Gm14461 上的潜在结合位点; C-E. RIP 分析 CSTF2 与 Gm14461 的相互作用; D. Western blot 检测 CSTF2 蛋白表达水平; E. Western blot 检测放线菌酮 (CHX) 处理不同时间的三叉神经节细胞中 CSTF2 蛋白水平。与 IgG 组或 CHX 处理 0h 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 敲低 Gm14461 降低 CSTF2 蛋白水平

2.5 Gm14461 通过调节 CSTF2 促进 CGRP 和 P2X3/7 受体表达 见图 3。Starbase 数据库预测结果显示, CSTF2 蛋白基序可能在 CGRP, P2X3 和 P2X7 的 mRNA 上均存在结合位点, 见图 3A 和 3B。经 RIP 分析验证发现, 在 Anti-CSTF2 抗体下拉的 RNA-蛋白复合物中 CGRP, P2X3 和 P2X7 表达显著富集 ($P < 0.01$), 见图 3C~3E, 提示 CSTF2 能够与 CGRP, P2X3 和 P2X7 相互作用。进一步检测发现, 过表达 CSTF2 能够升高 CGRP, P2X3/7 蛋白

表达水平 ($t = 21.145, 20.302, 18.632$), 见图 3F; 促进炎症因子 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 相对表达水平 ($t = 24.195, 24.059, 23.022$, 均 $P < 0.05$), 并且过表达 CSTF2 能够抵消敲低 Gm14461 对 TNF- α 诱导的 TGs 疼痛相关蛋白及炎症反应的抑制作用 ($t = 20.634, 19.937, 18.870, 24.399, 23.776, 23.210$), 差异具有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 5。表明 Gm14461 可能通过促进 CSTF2 介导的 CGRP 和 P2X3/7 受体表达和炎症反应加速 TN 进展。



A. CSTF2 的蛋白结合基序; B. CSTF2 在 CGRP, P2X3 和 P2X7 的 mRNA 上的潜在结合位点; C-E. RIP 分析 CSTF2 与 CGRP, P2X3 和 P2X7 的 mRNA 的相互作用; F. Western blot 检测 CGRP, P2X3 和 P2X7 蛋白表达。与 IgG 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 CSTF2 与 CGRP, P2X3/7 的相互作用调控作用

表5 Gm14461 调节 CSTF2 对 CGRP, P2X3/7 受体及炎症因子表达的作用

项目	TNF- α +sh-NC 组	TNF- α +sh-Gm14461 组	TNF- α +sh-Gm14461+Vector 组	TNF- α +sh-Gm14461+OE-CSTF2 组	F	P
CGRP 蛋白	3.49 ± 0.17	1.35 ± 0.06	1.30 ± 0.05	3.37 ± 0.15	308.833	<0.001
P2X3 蛋白	2.92 ± 0.14	1.24 ± 0.05	1.21 ± 0.04	2.88 ± 0.13	276.539	<0.001
P2X7 蛋白	2.83 ± 0.13	1.26 ± 0.05	1.28 ± 0.06	2.85 ± 0.14	231.484	<0.001
TNF- α mRNA	5.35 ± 0.25	1.67 ± 0.09	1.70 ± 0.08	5.26 ± 0.23	403.661	<0.001
IL-1 β mRNA	4.05 ± 0.18	1.39 ± 0.06	1.36 ± 0.05	3.91 ± 0.17	403.340	<0.001
IL-6 mRNA	3.64 ± 0.17	1.25 ± 0.05	1.27 ± 0.06	3.71 ± 0.18	346.283	<0.001

3 讨论

TN 是典型的神经病理性疼痛之一，基于分子生物学的研究发现，lncRNAs 通过转录、转录后水平等方式调控相关基因表达参与神经病理性疼痛及神经系统疾病的发生，为神经病理性疼痛的研究及治疗提供了新的潜在靶点和方向，越来越受到学者的广泛关注^[10]。Gm14461 是近年发现参与神经病理性疼痛发生的 lncRNA，如 WU 等^[11]报道在脊髓神经结扎诱导的神经痛小鼠的背根神经节中 Gm14461 显著高表达。与 TN 的研究中，WANG 等^[12]报道 Gm14461 是 TN 诊断和治疗的潜在候选标志物。XU 等^[9]报道 TN 小鼠手术侧三叉神经节中 Gm14461 表达增加。CAI 等^[6]报道 Gm14461 沉默通过增强自噬减弱星形胶质细胞活化，从而增加 TN 模型小鼠的 MWT 值，减轻 TN 疼痛。CCI-ION 是目前用于建立 TN 动物模型普遍方法^[13]，本研究通过此方式构建 TN 小鼠模型，观察发现 TN 小鼠 MWT 值在 14 天内显著降低，这与文献 [14-15] 报道相一致，表明 TN 小鼠模型构建成功。通过观察 Gm14461 在 TN 中的作用，显示敲低 Gm14461 可升高 TN 小鼠 MWT 值，与文献 [6,9,12] 研究结果近似，证实 Gm14461 可能是 TN 发病过程中重要的生物标志物。

炎症反应是 TN 病理损伤的重要机制之一，报道显示，促炎细胞因子 TNF- α ，IL-1 β 和 IL-6 通过调节三叉神经节外周末梢内的免疫反应在 TN 发病中起着重要作用^[7]。一些细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 β 也被证明可以使伤害性神经元敏感^[16]。本研究表明，TN 小鼠三叉神经节中上述炎症因子表达显著上调，表明 TN 伴随炎症反应发生，而敲低 Gm14461 后炎症反应减弱。在 TNF- α 等细胞因子存在下，三叉神经节的体外培养可以模拟炎症状态下的神经源性疼痛^[13]。据报道，眶下孔注射 TNF- α 和 IL-1 β 可成功制备具有 TN 样症状和病理变化的大鼠 TN 模型，证实炎症因素参与 TN 发病机制^[13,17]。在本项研究中，通过用 TNF- α 处理三叉神经节细胞构建体外模型来模拟 TN，发现与 TN 小鼠模型相似，经 TNF- α 处理的三叉神经节细胞中 Gm14461 表达显著升高，敲低 Gm14461 显

著降低了炎症因子水平，证实敲低 Gm14461 可能通过抑制炎症反应缓解 TN 疾病进展。

既往报道显示，TN 发病的分子机制涉及各种与疼痛相关的神经肽和受体的变化^[1,18]。CGRP 由降钙素 Cal/CGRP 基因表达，是一种具有促痛作用的生物活性多肽，而三叉神经系统的激活会诱导 CGRP 的释放，阻断 CGRP 受体可能是治疗 TN 的方法之一^[18]。此外，ATP 是中枢和外周神经系统的协同递质或调质，参与生理和病理性疼痛的发生，当机体受到损伤时，ATP 被释放后能够激活嘌呤能受体 P2X3，导致 Ca²⁺ 浓度增加流入细胞，引发神经冲动，从而产生疼痛感^[19]。同时 P2X3 受体还参与调节炎症细胞因子水平，并可引起细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 磷酸化，进一步加剧疼痛^[20]。P2X3 和 P2X7 受体属于 ATP 嘌呤受体家族，作为配体门控离子通道发挥作用，可能转导 ATP 诱发的伤害感受器激活^[21]。在本研究中观察到 TN 模型小鼠三叉神经节和 TNF- α 诱导的三叉神经节细胞模型中疼痛相关蛋白 CGRP, P2X3 和 P2X7 表达均增加，敲低 Gm14461 后各蛋白水平降低，表明 Gm14461 可能通过调节 CGRP, P2X3 受体和 P2X7 受体的表达参与 TN 病理机制。

为更进一步探究 Gm14461 在 TN 中的调节机制，研究利用在线数据库预测并验证发现 Gm14461 与 CSTF2 相互结合，且 CSTF2 与 CGRP, P2X3 和 P2X7 的 mRNA 间存在结合关系，证实 Gm14461 可能通过招募 CSTF2 来上调 CGRP, P2X3/7 参与 TN 疾病进展。CSTF2 是一种 RNA 结合蛋白，作为调节因子通过与 RNA 结合在多个生物学途径中发挥作用。关于 CSTF2 的研究主要集中在癌症相关报道中，本研究证明了 CSTF2 在 TN 中的作用机制，敲低 Gm14461 可显著降低 CSTF2 蛋白水平，过表达 CSTF2 则能够逆转敲低 Gm14461 对疼痛相关蛋白表达及炎症反应的抑制作用。本研究进一步完善了 TN 病理调节网络，并为 TN 治疗策略的开发提供了新的视角，但其在 TN 中的作用还需继续进一步探究阐明。

- mice by mediating the USP2/JUP/Akt/ β -catenin cascade [J]. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2024, 24(1): 82.
- [16] SONG Shan, WANG Yang, WANG Haiyan, et al. Role of sevoflurane in myocardial ischemia-reperfusion injury via the ubiquitin-specific protease 22/lysine-specific demethylase 3A axis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13366-13383.
- [17] ZHAN Xiaona, YANG Yi, LI Qing, et al. The role of deubiquitinases in cardiac disease[J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2024, 25(26): e3.
- [18] ROEDIG J, KOWALD L, JURETSCHKE T, et al. USP22 controls necroptosis by regulating receptor-interacting protein kinase 3 ubiquitination[J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(2): e50163.
- [19] CHANG Liang, WANG Qi, JU Jiannan, et al. Magnoflorine ameliorates inflammation and fibrosis in rats with diabetic nephropathy by mediating the stability of lysine-specific demethylase 3A [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 580406.
- [20] 张天瑞, 高文怡, 姚娟. KDM3A 沉默对人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 凋亡和侵袭能力的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(1): 33-37.
- ZHANG Tianrui, GAO Wenyi, YAO Juan. Effects of KDM3A silencing on the apoptosis and invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2021, 41(1): 33-37.
- [21] ZHANG Bofang, LIU Gen, HUANG Bing, et al. KDM3A attenuates myocardial ischemic and reperfusion injury by ameliorating cardiac microvascular endothelial cell pyroptosis[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 4622520.
- 收稿日期: 2024-04-27
修回日期: 2024-07-15

(上接第 23 页)

综上所述, 在 CCI-ION 诱导的小鼠 TN 模型中, Gm14461 通过招募 CSTF2 上调 CGRP, P2X3 受体和 P2X7 受体表达, 促进炎症反应, 从而降低 TN 小鼠的 MWT 值, 促进疼痛传递。

参考文献:

- [1] ASHINA S, ROBERTSON C E, SRIKATKACHORN A, et al. Trigeminal neuralgia[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2024, 10(1): 39.
- [2] PERGOLIZZI J V J, LEQUANG J A, EL-TALLAWY S N, et al. An update on pharmacotherapy for trigeminal neuralgia[J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2024, 24(8): 773-786.
- [3] LI Da, YUAN Chang, ZHAO Bingxiao, et al. lncRNA Kcnq1ot1 relieves neuropathic pain through downregulation of Myd88[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 119: 110218.
- [4] LIU Yajing, LIU Fei, LI Yike, et al. lncRNA Anxa10-203 enhances Mc1r mRNA stability to promote neuropathic pain by recruiting DHX30 in the trigeminal ganglion [J]. *the Journal of Headache and Pain*, 2024, 25(1): 28.
- [5] 许牧. lncRNA Gm14461 在三叉神经痛中的作用及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- XU Mu. The role and mechanism of lncRNA Gm14461 in trigeminal neuralgia [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [6] CAI Jun, YAN Yi, ZHANG Daying, et al. Silencing of lncRNA Gm14461 alleviates pain in trigeminal neuralgia through inhibiting astrocyte activation[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(12): 2663-2671.
- [7] LI Lu, LI Tian, QU Xinyu, et al. Stress/cell death pathways, neuroinflammation, and neuropathic pain[J]. *Immunological Reviews*, 2024, 321(1): 33-51.
- [8] MOISSET X. Are CGRP and PACAP involved in the pathophysiology of peripheral neuropathic pain[J]. *Revue Neurologique (Paris)*, 2023, 179(3): 123-124.
- [9] XU Mu, YAN Yi, ZHU Mengye, et al. Effects of long non-coding RNA Gm14461 on pain transmission in trigeminal neuralgia[J]. *Journal of Inflammation (London)*, 2020, 17: 1.
- [10] 张如月, 武彩花, 李嫚, 等. 长链非编码 RNA 调控神经病理性疼痛的研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(7): 490-496.
- ZHANG Ruyue, WU Caihua, LI Man, et al. Research progress of long non-coding RNA regulating neuropathic pain[J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*, 2021, 27(7): 490-496.
- [11] WU Shaogen, MARIE LUTZ B, MIAO Xuerong, et al. Dorsal root ganglion transcriptome analysis following peripheral nerve injury in mice [J]. *Molecular Pain*, 2016, 12: 1744806916629048.
- [12] WANG Tianyi, LIU Liu, SONG Dongzhe, et al. Emerging roles of lncRNAs in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of trigeminal neuralgia[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2022, 50(2): 1013-1023.
- [13] MA Xiaohan, ZHU Taomin, KE Jin. Progress in animal models of trigeminal neuralgia[J]. *Archives of Oral Biology*, 2023, 154: 105765.
- [14] ISLAM J, KC E, KIM S, et al. Optogenetic inhibition of glutamatergic neurons in the dysgranular posterior insular cortex modulates trigeminal neuropathic pain in CCI-ION rat[J]. *Neuromolecular Medicine*, 2023, 25(4): 516-532.
- [15] GUO Rong, FANG Yuxin, ZHANG Yuyao, et al. SHED-derived exosomes attenuate trigeminal neuralgia after CCI of the infraorbital nerve in mice via the miR-24-3p/IL-1R1/p-p38 MAPK pathway[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 458.
- [16] KUMARI S, DHAPOLA R, SHARMA P, et al. The impact of cytokines in neuroinflammation-mediated stroke [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2024, 78: 105-119.
- [17] DEMARTINI C, GRECO R, ZANABONI A M, et al. URB937 prevents the development of mechanical allodynia in male rats with trigeminal neuralgia[J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2023, 16(11): 1626.
- [18] DONG B, XU R, LIM M. The pathophysiology of trigeminal neuralgia: a molecular review[J]. *Journal of Neurosurgery*, 2023, 139(5): 1471-1479.
- [19] GINIATULLIN R, NISTRI A. Role of ATP in migraine mechanisms: focus on P2X3 receptors[J]. *the Journal of Headache and Pain*, 2023, 24(1): 1.
- [20] 贾清越, 陶怡, 闵晓曼, 等. 中医药调控 P2X 受体治疗神经病理性疼痛的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2024, 21(32): 59-64.
- JIA Qingyue, TAO Yi, MIN Xiaoman, et al. Research progress on the regulation of P2X receptors by traditional Chinese medicine in the treatment of neuropathic pain[J]. *China Medical Herald*, 2024, 21(32): 59-64.
- [21] RYAN K, CRIGHTON A. Trigeminal neuralgia and trigeminal neuropathic pain[J]. *British Dental Journal*, 2024, 236(4): 323-328.
- 收稿日期: 2024-12-26
修回日期: 2025-03-13