

microRNA-210-3p 通过调控 TET2 的表达 抑制大鼠炎性疼痛

卫嘉晟¹, 杨保仲², 魏伟¹, 薛亚婷¹, 崔巨龙¹, 方俊¹

(1.山西医科大学麻醉学院,山西太原 030001;2.太原市中心医院麻醉手术科,山西太原 030006)

摘要:目的 探讨 microRNA-210-3p (miR-210-3p) 与 10-11 易位蛋白 2 (ten-eleven translocation 2, TET2) 在完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 诱导的大鼠炎性疼痛模型中的作用及其相互调控机制。方法 通过生物信息学方法和双荧光素酶实验,分析并确定大鼠 miR-210-3p 中可以靶向调节的基因。实验中的质粒和 miR-210-3p 共转染组合分为 pmirGLO+mimics NC 组、pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组、TET2-WT-pmirGLO+mimics-NC 组、TET2-WT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组、TET2-MT-pmirGLO+mimics-NC 组和 TET2-MT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组;60 只大鼠按随机数字表法分为正常对照 (normal control, CON) 组 ($n=20$)、CFA 组 ($n=20$)、CFA+腺相关病毒载体阴性对照 (adeno-associated virus negative control, AAV NC) 组 ($n=10$)、CFA+AAV miR-210-3p 抑制剂 (adeno-associated virus miR-210-3p inhibitor, AAVi) 组 ($n=10$)。通过在大鼠左后足底部皮下注入 CFA 的方式建立大鼠炎性疼痛模型;通过尾静脉注入 miR-210-3p inhibitor 的 AAV 建立干预模型;观察并测量大鼠行为学;采用 RT-qPCR 法检测 miR-210-3p 的表达量;采用 Western blotting 法和免疫荧光染色法检测 L4~L6 腰膨大节段脊髓中 TET2 蛋白的表达水平及荧光强度的变化;采用免疫荧光染色法观察 TET2 蛋白在大鼠脊髓中的细胞表达定位。结果 生物信息学方法发现,TET2 基因 3'UTR 区域存在与 miR-210-3p 的结合位点;双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-210-3p 与 TET2 基因之间存在结合位点,呈负向调控关系;注射 CFA 显著减小了大鼠的机械缩足反射阈值 (paw withdrawal mechanical threshold, PWMT) 和热缩足潜伏期 (paw thermal withdrawal latency, PTWL) ($P<0.05$);CFA 组大鼠脊髓腰膨大中 miR-210-3p 的表达水平明显上调,伴随着 TET2 的表达水平降低 ($P<0.05$);免疫荧光结果显示,TET2 蛋白主要和神经元细胞存在共定位;CFA 组大鼠脊髓内 TET2 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$);经过 AAVi 干预后,CFA+AAVi 组大鼠在各个时间的 PWMT 和 PTWL 较 CFA+AAV NC 组大鼠升高 ($P<0.05$);CFA+AAVi 组大鼠脊髓组织中 TET2 蛋白表达较 CFA+AAV NC 组升高 ($P<0.05$)。结论 miR-210-3p 可以抑制 TET2 蛋白表达,通过抑制 miR-210-3p 在炎性疼痛大鼠中的表达可以有效减轻炎性疼痛。

关键词: microRNA-210-3p; 10-11 易位蛋白 2; 炎性疼痛; 完全弗氏佐剂; 腺相关病毒载体

中图分类号: R741

文献标志码: A

MicroRNA-210-3p inhibits inflammatory pain in rats by regulation ten-eleven translocation 2 expression

WEI Jiacheng¹, YANG Baozhong², WEI Wei¹, XUE Yating¹, CUI Chenlong¹, FANG Jun¹

(1. College of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China;

2. Department of Anaesthesia and Surgery, Taiyuan Central Hospital, Taiyuan 030006, Shanxi, China)

Abstract: Objective To investigate the roles and mutual regulatory mechanisms of microRNA-210-3p (miR-210-3p) and ten-eleven translocation 2 (TET2) in a rat model of inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant (CFA). **Methods** Bioinformatics and dual-luciferase reporter assays were used to analyse and identify target genes regulated by miR-210-3p in rats. The combinations of plasmid and miR-210-3p cotransfection in the experiments were

grouped as follows: pmirGLO+mimics-NC group, pmirGLO+mimics-miR-210-3p group, TET2-WT-pmirGLO+mimics-NC group, TET2-WT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p group, TET2-MT-pmirGLO+mimics-NC group and TET2-MT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p group; 60 rats were divided into 4 groups according to the randomised numerical table method; Normal control (CON) group ($n=20$), Complete Freund's adjuvant (CFA) group ($n=20$), Complete Freund's adjuvant + adeno-associated virus vector negative control (CFA + AAV NC) group ($n=10$), Complete Freund's adjuvant + adeno-associated virus miR-210-3p inhibitor (CFA + AAVi) group ($n=10$). The rat inflammatory pain model was established by subcutaneous injection of CFA into the underside of the left hind paw; the intervention model was established by tail vein injection of AAV with miR-210-3p inhibitor; the behaviour of the rats was observed and measured; the expression of miR-210-3p was detected by RT-qPCR; Western blotting and immunofluorescence staining were used to detect changes in the expression level and fluorescence intensity of TET2 protein in the spinal cord of lumbar extension segments from L4 to L6; and immunofluorescence staining was used to observe the cellular expression localisation of TET2 protein in the rat spinal cord. **Results** Dual-luciferase assays confirmed a negative regulatory relationship between miR-210-3p and TET2, as evidenced by a binding site. CFA injection significantly decreased the mechanical paw withdrawal mechanical threshold (PWMT) and the thermal paw thermal withdrawal latency (PTWL) ($P<0.05$). An increase in miR-210-3p and a concomitant decrease in TET2 protein expression were observed in the CFA group ($P<0.05$). Immunofluorescence showed that TET2 protein mainly colocalised with neuronal cells and its expression in the spinal cord was decreased in the CFA group ($P<0.05$). After AAVi treatment, PWMT and PTWL were significantly higher in the CFA+AAVi group than in the CFA+AAV NC group ($P<0.05$), with increased TET2 protein levels ($P<0.05$). **Conclusion** miR-210-3p downregulates TET2 protein expression; its inhibition in rats with inflammatory pain significantly alleviates pain symptoms.

Key words: microRNA-210-3p; Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2; Inflammatory pain; Complete Freund's adjuvant; Adeno-associated virus vector

炎症是免疫系统对感染和损伤作出的自然反应。炎症反应可以对抗病原体入侵并启动组织修复过程,从而有助于修复损伤的组织^[1]。然而,异常或过度的炎症反应可能导致组织损伤和痛觉敏化。外周组织损伤后触发的炎症介质激活,可引起炎性疼痛的发生和持续^[2]。向大鼠后足部注射完全弗氏佐剂(complete freund's adjuvant, CFA)通常被用于模拟炎性疼痛患者的伤害性致敏^[3-4]。尽管非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID)常用于炎性疼痛治疗,但其存在一定的不良反应,如胃肠道出血和心肾风险等,凸显了研究新治疗靶点的紧迫性^[5-6]。因此,需要进一步深入了解炎性疼痛的发病机制和治疗方法,以便更好地帮助患者管理疼痛,提高其生活质量。

炎性疼痛与外周和中枢多个基因的表达变化密切相关,包括表观遗传修饰,如DNA甲基化、组蛋白修饰和染色质重塑等,这些修饰可以调节基因的表达,从而影响神经元对疼痛刺激的敏感性和神经递质的释放^[7-8]。胞嘧啶第五碳的甲基化(5-甲基胞嘧啶,5-hydroxymethylcytosine, 5-hmC)会导致疼痛相关基因的表达水平发生失调,抑制DNA甲基化可以预防和逆转疼痛行为,表明DNA去甲基化疼痛治疗中的潜在应用^[9]。10-11易位蛋白(ten-

eleven translocation, TET)家族是一组在细胞核中发挥重要生物学功能的酶,特别是在调节DNA去甲基化过程中。TET家族成员,特别是TET2,通过将5-mC转化为5-hmC促进DNA去甲基化,在调控疼痛相关基因表达和炎症中起重要作用^[10-13]。近年研究发现,在CFA诱导的炎症疼痛模型中,5-hmC、TET1和TET3的表达水平明显增加,TET2的表达水平无明显变化^[14]。

microRNA(miR)是一类短小的非编码RNA分子,大约由20~25个核苷酸组成。miR通过与靶标mRNA发生结合影响靶标的稳定性和翻译,这种结合通常发生在靶标的3'非翻译区(3'UTR)^[15-16]。通过生物信息学分析(TargetScan 7.1),发现TET2 mRNA的3'UTR包含跨物种(包括人,大鼠和小鼠)的miR-210-3p高度保守的结合序列。在神经炎症的进程中,miR-210-3p可能发挥了关键的神经保护作用。有研究发现,通过抑制miR-210-3p降低了小鼠大脑中TET2的表达,缓解了缺血性脑卒中引发的神经炎症反应^[17-18]。此外,miR-210-3p可以通过靶向调控多个炎症相关基因的表达影响神经炎症过程。例如,miR-210-3p可以直接抑制核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)mRNA的转录,从而抑制NF- κ B信号通路的激活和炎症反应程度^[19]。

目前,有关 miR-210-3p 在调节 TET2 方面及其在疼痛调节作用机制的研究较少。因此,本文旨在探讨 miR-210-3p 对 TET2 的影响,并阐明其在大鼠炎性疼痛中的具体机制,从而为疼痛治疗的新靶点和机制提供理论支持和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级健康雄性大鼠 60 只,体质量 250~300 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[实验动物使用许可证号:SYXK(京)2019-0030],在温度 22~25 ℃,湿度 40%~70%的稳定环境下,大鼠按照 12 h 的昼夜节律自由地进食和喝水。动物实验过程完全遵循实验动物管理条例。

1.1.2 主要试剂

pmirGLO、TET2-WT-pmirGLO 和 TET2-MT-pmirGLO 双荧光素酶报告基因载体、mimics-miR-210-3p 和 mimics-NC 由武汉金凯瑞生物工程有限公司合成,HEK-293T 细胞(武汉普诺赛生命科技有限公司),Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司),CFA(F5881,美国 Sigma 公司),腺相关病毒载体(adeno-associated virus negative, AAV) 9-GP-1-NC(上海吉玛制药技术有限公司),rno-miR-210-3p inhibitor(上海吉玛制药技术有限公司),DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(双洙生物科技有限公司),双荧光素酶报告基因检测试剂盒(11402ES60,翌圣生物科技有限公司),PCR 引物(合肥通用生物有限公司), β -action、IBA-1 和 TET2 抗体(安诺伦生物科技有限公司),吸入用七氟烷(河北一品制药股份有限公司),异戊巴比妥钠(上海上药新亚药业有限公司),miRNA 提取试剂盒(19331ES50,翌圣生物科技股份有限公司),茎环法反转录试剂盒(MF1201,北京兰博利德商贸有限公司),荧光定量 PCR 试剂盒(MR1201,北京兰博利德商贸有限公司),逆转录试剂盒(AORT-0060,美国 GeneCopoeia 公司),MagicSYBR Mixture(北京康为世纪生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器

BK-L96C 化学发光免疫分析仪(中生北控生物科技股份有限公司),NC-12775 Von Frey 纤维丝(上海玉妍科学仪器有限公司),XR1700 热板测痛仪(上海欣软信息科技有限公司),TGL-20M 台式

高速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司),超微量分光光度计(德国 Implen 公司),CFX96 实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),CM199 恒冷箱切片机(德国 Leica 公司)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学与质粒构建

在 miRDB、miRTarBase、TargetScan 等 miRNA 靶基因预测数据库上登录,根据网站的指引预测大鼠 miR-210-3p 的靶基因。在 TET2 基因的 3'UTR 区域 2620~2630 碱基位置发现 miR-210-3p 与 TET2 的结合位点,对这些结合位点进行突变。将 3'UTR 区域的结合序列克隆到萤火虫荧光素酶报告基因的下流,构建突变型载体。野生型和突变型荧光素酶报告基因质粒分别被命名为 TET2-WT-pmirGLO 和 TET2-MT-pmirGLO。将测序正确的菌株采用高纯度质粒中量抽提试剂盒抽提,将所得的质粒用于细胞转染实验。

1.2.2 质粒转染

在进行质粒转染前 1 d,当培养瓶内的 HEK-293T 细胞密度达到 70%~80%时,将 HEK-293T 细胞以每孔 2×10^5 个细胞密度接种于 24 孔板中。培养基成分为 DMEM+10% FBS。将细胞随机分为 pmirGLO+mimics NC 组、pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组、TET2-WT-pmirGLO+mimics-NC 组、TET2-WT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组、TET2-MT-pmirGLO+mimics-NC 组、TET2-MT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组,每组设 3 个复孔。将质粒加入到 50 μ L 无血清 DMEM 培养基中(总质粒浓度 4 ng/ μ L),miRNA 稀释到同一管 50 μ L 无血清培养基中(总 miRNA 浓度 50 nmol),将 4 μ L Lipo2000 转染试剂加入 50 μ L 无血清 DMEM 培养基中,将上述两者混合后室温孵育 15 min,补加无血清 DMEM 培养基至 500 μ L;吸弃孔中培养基,加入上一步制备的转染复合物 500 μ L,37 ℃培养 6 h;用 1 mL 完全培养基(含血清)替换含有转染复合物的培养基继续培养 48 h;转染重复 5 次。

1.2.3 双荧光素酶报告基因活性检测

48 h 后进行转染,去除旧培养基,PBS 洗涤 2 次,每孔添加 200 μ L 细胞溶解液(编号 11402-A),冰上孵育 5 min,充分裂解细胞,收集裂解液。10 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为待测液;溶解萤火虫荧光素酶缓冲液(编号 11402-B)和萤火虫荧光素酶底物(50 \times)(编号 11402-C),解冻海肾荧光

素酶缓冲液(编号 11402-D)和海肾荧光素酶底物(50×)(编号 11402-E),并使其达到室温。将对应的缓冲液分别稀释至1×工作液,置于冰浴备用。启动化学发光免疫分析仪,取出 96 孔板。将 10~20 μL 细胞裂解液上清加入 96 孔板中,随后加入 100 μL 萤火虫荧光素酶检测工作液,振荡板混匀;测量 350~700 nm 的发光值,检测时间为 1 s;完成上述萤火虫荧光素酶测定步骤后,加入 100 μL 海肾荧光素酶检测工作液,振荡板混匀,再次测量 350~700 nm 的发光值,检测时间为 1 s;以海肾荧光素酶为内参,将萤火虫荧光素酶测定得到的 RLU 值除以海肾荧光素酶测定得到的 RLU 值。根据比值比较不同样品间目的报告基因的激活程度。

1.2.4 动物分组与模型制备

通过在大鼠左后肢足底皮下注射 CFA 100 μL 建立大鼠炎症性疼痛模型。在炎症疼痛模型建模前 3 周,通过尾静脉注射带有 EGFP 荧光标记的 AAV miR-210-3p inhibitor(adeno-associated virus miR-210-3p inhibitor, AAVi)建立干预模型。将 60 只大鼠分为 4 组:正常对照组大鼠左后肢足底注射生理盐水 100 μL ($n=20$); CFA 组大鼠左后肢足底注射 CFA 100 μL ($n=20$); CFA+AAV NC 组大鼠左后肢足底注射 CFA 100 μL,尾静脉注射 AAV-NC (1×10^{13}) 125 μL ($n=10$); CFA+AAVi 组大鼠左后肢足底注射 CFA 100 μL,尾静脉注射 AAVi (1×10^{13}) 125 μL ($n=10$)。给药后,观察各组大鼠的存活、伤口感染等情况。

1.2.5 机械缩足反射阈值(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)和热缩足潜伏期(paw thermal withdrawal latency, PTWL)的行为学测定

机械痛测定使用 Dixon 介绍的“Up&Down”法测定大鼠的 PWMT。正常对照组、CFA 组、CFA + AAV NC 组和 CFA+AAVi 组各随机选择 5 只大鼠进行痛觉测试。在 CFA 或生理盐水注射前 1 d, CFA 后第 1、3、7、10、14 天测定大鼠的 PWMT。将动物放置于底部网格的有机玻璃隔箱内适应 20 min,使用 0.4、0.6、1.4、2、4、6、8、15 g 八根 Von Fery 针进行测试,初始质量设定为 2 g。如果出现缩足或舔足反应,标记为“X”,并按反应强度递减的顺序进行后续测定实验。如果大鼠无任何反应,标记为“O”,沿质量递增序列进行下一级别的刺激测试。测试过程中,两次刺激实验之间保持数秒,依次类推。当大鼠呈现交叉反应标记“OX”或者“XO”,连

续记录 4 次测试结果,并据此生成反应序列。使用 XR1700 热板测痛仪评估 PTWL。在 CFA 或 NS 注射前 1 d,以及 CFA 注射后的第 1、3、7、10、14 天,分别测定 4 组大鼠 PWTL 值。仪器温度设定为 55 °C,观察并记录大鼠开始舔足的时间点。每次测试间隔不超过 30 s,主要是为避免对大鼠足底造成损伤,执行 5 次并取后 3 次结果,求平均值获得精确数值。

1.2.6 标本采集

使用七氟烷和异戊巴比妥钠麻醉大鼠后,切开啮齿动物的背侧皮肤以暴露椎体节段,将两侧的肌肉组织从脊柱表面分开。使用咬骨钳,仔细切断两侧肋骨,以暴露出脊髓的腰椎膨大。用咬骨钳分别在腰膨大头端向上 2 个节段和尾端向下 2 个节段横断脊髓。找到大鼠头端的椎管口,将 2 mL PBS 注入椎管内,借助水流压力将脊髓完整吹出,剥离硬脊膜。用眼科剪分离脊髓腰膨大部位,即 L4~L6 节段脊髓组织。脊髓组织分成两份,一份立刻存储于-80 °C 冰箱中备用。另一份在 4 °C 条件下,于 4%多聚甲醛中固定 24 h,放入 25%蔗糖溶液中脱水。冰冻切片机切片 15 μm。

1.2.7 采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测脊髓 miR-210-3p 和 TET2 蛋白的表达

正常对照组和 CFA 组在第 1、3、7、10、14 天各取 3 只进行脊髓样本采集。取出大鼠腰骶段的脊髓(L4~L6 节段),放入离心管中静置,研磨组织。剧烈振荡后室温静置 5 min,加入 200 μL 氯仿,颠倒混匀后,12 000 r/min 离心 10 min。吸取上层 RNA 水相,加入等体积无水乙醇,将混合液加入 RNA 吸附柱中,12 000 r/min 离心 1 min。加入去蛋白液,12 000 r/min 离心 30 s,加入漂洗液,12 000 r/min,离心 30 s,弃废液。将 RNA 吸附柱放到离心管中,12 000 r/min 离心 2 min,重复两次得到 RNA 溶液。采用 miRNA 提取试剂盒提取脊髓组织总 RNA,采用紫外分光光度计测量 RNA 浓度和纯度,样品-80 °C 冰箱保存。随后,利用 miRNA 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,采用实时荧光定量聚合酶链反应法检测脊髓组织中 miR-210-3p 的表达。以 U6 为内参,正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',反向引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3',分别为 17、20 bp;miR-210-3p 正向引物:5'-CGCTGTGCGTGTGACAGC-3',反向引物:5'-AGTGCAGGGT-CCGAGG-TATT-3',分别为 18、20 bp。反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火并延长 30 s。共 40 个循环。利用 TRIzol 试剂盒提取脊髓组织总

RNA, RNA 根据 mRNA 逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 实时荧光定量聚合酶链反应检测脊髓组织 TET2 表达。以 GAPDH 为内参, 正向引物: 5'-GAT-TCCACCCATGGCAAATTC-3', 反向引物: 5'-CTG-GAAGATGGTGATGGGATT-3'。TET2 正向引物: 5'-TGTTGTTGTCAGGGTGAGAATC-3', 反向引物: 5'-TCTTGCTTCTGGCAAACCTTACA-3', 引物由中国通用生物(安徽)股份有限公司合成。反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火并延长 30 s。共 40 个循环。读取每个延伸阶段的荧光值。实验重复 3 次, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-210-3p、TET2 的相对表达量。

1.2.8 采用 Western blotting 法检测脊髓 TET2 蛋白的表达

正常对照组和 CFA 组取适量脊髓组织, 将其匀浆后加入 100~500 μL 含有 PMSF 的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min。4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 以获取细胞裂解液。按照说明书配置 BCA 工作液和 BSA 标准待测溶液, 将待测样品加入微孔板中, 用 PBS 补足 20 μL , 随后加入 200 μL BCA 工作液混匀, 室温放置 2 h。使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白进行定量, 酶标仪 570 nm 读出 OD 值, 绘制标准曲线, 调整上样浓度为 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。根据目的蛋白分子量大小配置 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。待胶凝结后, 将凝胶置于电泳槽中, 加入适量电泳缓冲液, 拔出齿梳, 每孔加上样液 20 μL 。电泳条件: 分离胶恒压 160 V, 浓缩胶电压为 90 V, 约 60 min, 直至溴酚蓝跑到电泳槽金属铂丝以下, 终止电泳。电泳结束后, 采用半干法将蛋白转移到 PVDF 膜上, 将电转仪置于冰水浴中, 以 200 mA 恒流转膜 2 h。转膜结束后, 加入 5% BSA 封闭液, 室温封闭 1 h。TBST 洗膜, 分别加入 β -actin 和 TET2 的一抗(1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入二抗(1:10 000 稀释), 室温孵育 60 min。最后, 将显影剂 A 和 B 液按 1:1 体积混合后均匀滴加在 PVDF 膜的蛋白面上, 使用凝胶成像系统进行成像, 采用 Image J 软件计算灰度值, 并分析目的条带与内参蛋白条带的光密度比值。

1.2.9 采用免疫荧光法检测脊髓 TET2 蛋白的表达

将冰冻切片于 PBS 溶液中清洗 3 次, 切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液(pH8.0)的修复盒中进行抗原修复。切片甩干后, 滴加 5% BSA 封闭冰冻切片 45 min, 滴加 PBS 配好第 1 个一抗, 切片平放

于湿盒内 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次, 滴加一抗对应的荧光二抗覆盖组织, 避光室温孵育 1 h。按照同样方法, 在切片上滴加第 2 个一抗和二抗。4 °C 孵育过夜。玻片置于 PBS 中, 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 切片擦干后滴加 DAPI 染液, 室温避光孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次, 甩干后用抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下观察脊髓小胶质细胞形态及 TET2 蛋白的表达。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 23.0 和 Graphpad 8.0 统计学软件。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。行为测试数据采用两因素方差分析。组间结果采用两因素方差分析。若方差分析显示有显著效应, 采用 Bonferroni 多重比较事后检验来分析组间差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-210-3p 与 TET2 基因之间相互作用的表达

大鼠 miR-210-3p 的基因序列从 miRBase 数据库中获取。通过 TargetScan7.0 发现, TET2 3' UTR 与 miR-210-3p 存在结合位点, 见图 1A。通过对野生型 TET2(TET2-WT)和突变型 TET2(TET2-MT)重组克隆载体进行测序分析, TET2-WT-pmirGLO 测序图展示了 TET2 基因 3' UTR 4926-4932 的序列, 以及质粒载体中相应的序列。与此相对应, TET2-MT-pmirGLO 测序图揭示了相同位置处的序列也被成功克隆, 但含有相应的突变, 见图 1B。在转染重组载体 pmirGLO-TET2 的实验中, miR-210-3p 通过识别 TET2 基因的 3' UTR 结合位点, 特异性降解 TET2 mRNA, 沉默 TET2 表达, 抑制萤火虫荧光素酶的转录, 进而降低其酶活性。pmirGLO + mimics-miR-210-3p 组与 pmirGLO+mimics-NC 组相比荧光比值无明显变化, 差异无统计学意义(1.032 0 \pm 0.036 5 vs 1.000 0 \pm 0.065 3, P>0.05)。TET2-WT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p 组与 TET2-WT-pmirGLO+mimics-NC 组相比, 荧光比值明显降低, 差异有统计学意义(0.617 9 \pm 0.025 7 vs 1.022 0 \pm 0.044 2, P<0.05), TET2-MT-pmirGLO + mimics-miR-210-3p 组与 TET2-MT-pmirGLO+mimics-NC 组相比, 荧光比值无明显变化, 差异无统计学意义(0.984 0 \pm 0.073 87 vs 1.014 0 \pm 0.012 7, P>0.05), 见图 1C。

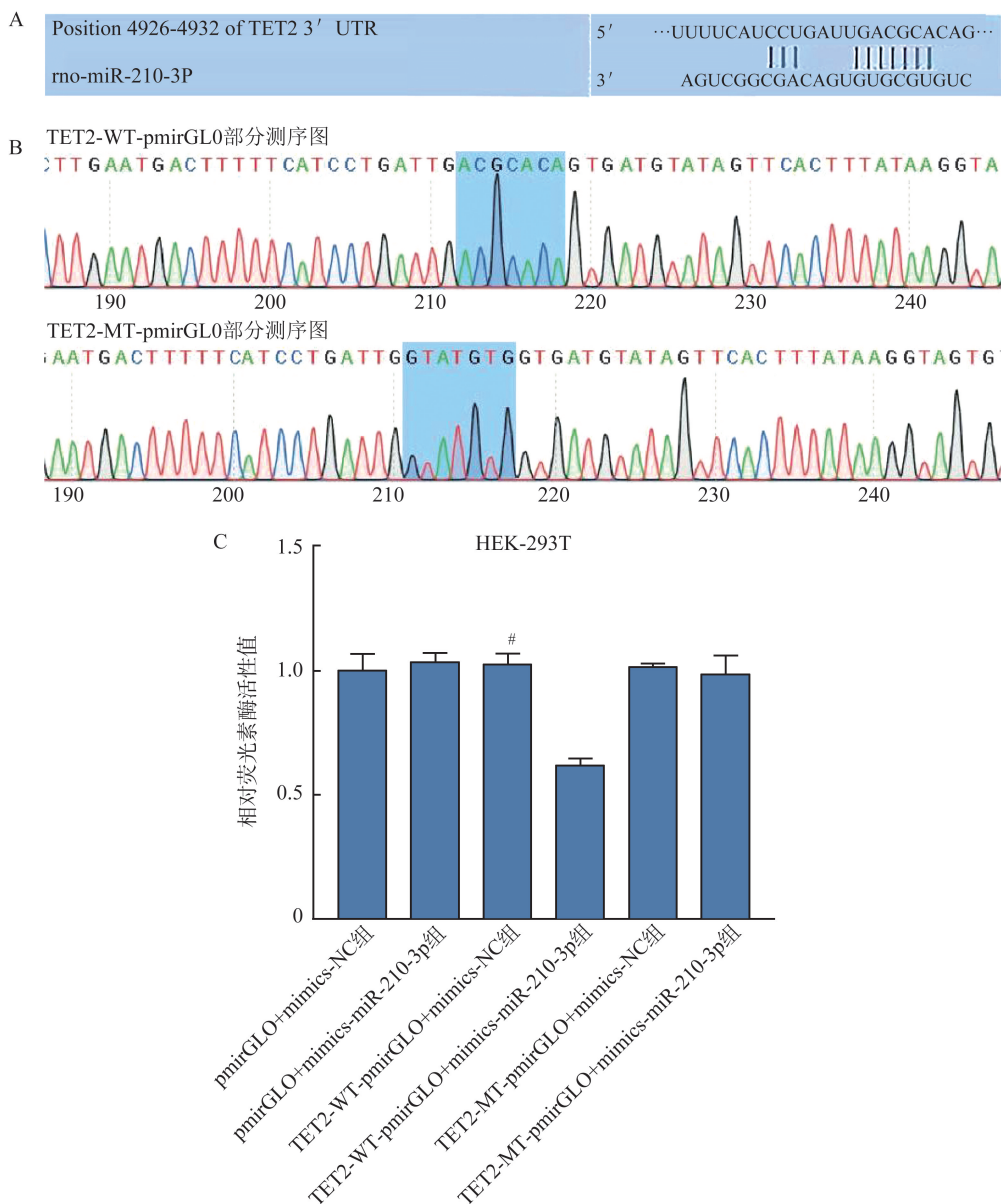


图1 miR-210-3p与TET2基因3'UTR的相互作用

A: TargetSan7.0预测miR-210-3p与TET2 3'UTR存在结合位点;B: TET2-WT-pmirGLO和TET2-MT-pmirGLO部分测序图(阴影部分为miR-210-3p与TET2-3'UTR的结合位点和突变序列);C: 各组荧光素酶活性表达(* $P < 0.001$ vs TET2-WT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p组)。

Figure 1 Interaction analysis of miR-210-3p with the 3'UTR of TET2 gene

A: TargetSan7.0 predicted the existence of binding site between miR-210-3p and TET2 3'UTR; B: Partial sequencing maps of TET2-WT-pmirGLO and TET2-MT-pmirGLO (shaded area is the binding site and mutated sequence of miR-210-3p with TET2-3'UTR); C Expression of luciferase activity in each group(* $P < 0.001$ vs TET2-WT-pmirGLO+mimics-miR-210-3p group).

2.2 CFA诱导的疼痛行为学变化与miR-210-3p表达的相关性

行为学测量显示,与正常对照组相比,CFA组在造模前1d,后1、3、7、10、14d的PWMT [$F(1,8) = 1414, P < 0.05$]和PTWL [$F(1,8) = 695.20, P < 0.05$]显著降低,见图2,表1。与正常对照组相比,CFA组脊髓L4~L6在第1、3、7天的miR-210-3p表达显著增加,见图3A。采用析因设计的两因素方差分析进行比较,样本量($n = 3$)在所有组别及时间

点上一致。结果显示,CFA干预因素的主效应显著 [$F(1,20) = 595.50, P < 0.05$]、时间因素的主效应显著 [$F(4,20) = 71.35, P < 0.05$],以及CFA干预因素和时间因素之间存在显著的交互作用 [$F(4,20) = 40.31, P < 0.05$]。皮尔逊相关分析显示,miR-210-3p的表达水平与PWMT($r = -0.814, P < 0.05$)和PTWL($r = -0.827, P < 0.05$)均呈显著负相关。分析是基于每个时间点的均数/所有个体测量值汇总,见图3B。

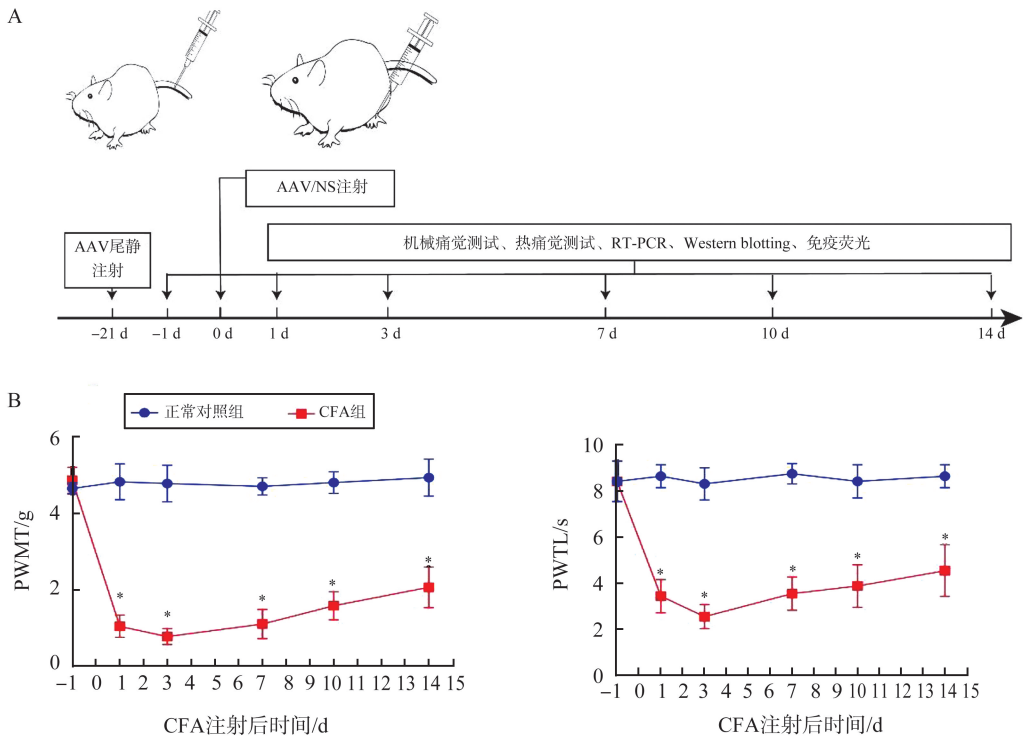


图2 CFA 诱导的炎性疼痛模型及大鼠疼痛行为学变化

A:大鼠模型造模过程;B:CFA 诱导的炎性疼痛模型建立后大鼠 PWMT 和 PTWL 的变化(* $P<0.05$ vs CFA 注射后第 1、3、7、10、14 天)。

Figure 2 CFA-induced inflammatory pain model and changes in pain behavior in rats

A: Rat model modeling process; B: Changes of PWMT and PTWL in rats after the establishment of CFA-induced inflammatory pain model (* $P<0.05$ vs CFA post-injection on day 1,3,7,10,14).

表 1 正常对照组和 CFA 组大鼠的 PWMT 和 PTWL 比较

Table 1 Comparison of PWMT and PTWL between normal control group and complete freund's adjuvant (CFA) group in rats

时间	PWMT/g		PTWL/s	
	正常对照组	CFA 组	正常对照组	CFA 组
前 1 d	4.66±0.34	4.88±0.341	8.44±0.88	8.50±0.83
1 d	4.84±0.47	1.05±0.29	8.67±0.50	3.44±0.73
3 d	5.02±0.43	0.78±0.209	8.33±0.71	2.56±0.53
7 d	4.72±0.22	1.11±0.38	8.778±0.44	3.56±0.73
10 d	4.82±0.28	1.59±0.37	8.44±0.73	3.89±0.93
14 d	4.95±0.48	2.07±0.53	8.67±0.50	4.56±1.13

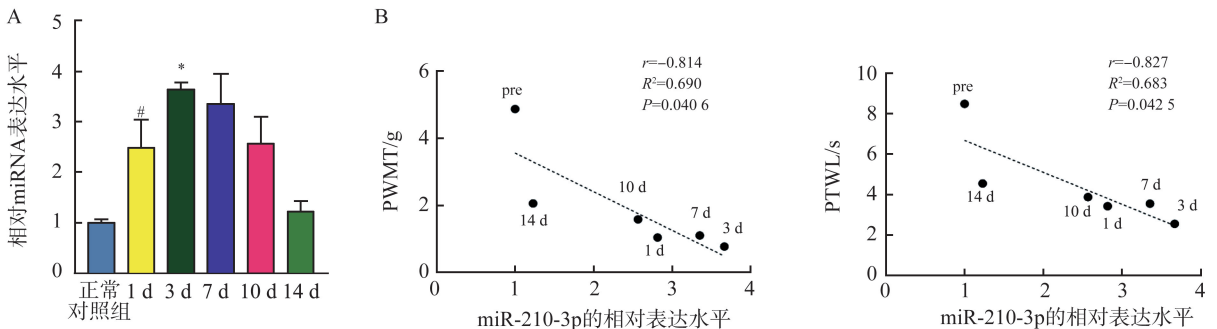


图3 CFA 注射后 miR-210-3p 在大鼠脊髓中的表达及其与疼痛行为的相关性

A:大鼠模型脊髓中 miR-210-3p 的表达(* $P<0.05$ vs CFA 注射后第 1 天;# $P<0.001$ vs CFA 注射后第 3 天);B:CFA 组大鼠 PWMT 和 PTWL 与 miR-210-3p 水平的变化。

Figure 3 Expression of miR-210-3p in rat spinal cord after CFA injection and its correlation analysis with pain behavior

A: Expression of miR-210-3p in the spinal cord of rat model (* $P<0.05$ vs CFA post-injection on day 1;# $P<0.001$ vs CFA post-injection on day 3); B: Changes in the levels of PWMT and PTWL with miR-210-3p in rats of CFA group.

2.3 TET2 在 CFA 炎性疼痛模型大鼠脊髓中的表达

Western blotting 结果显示, CFA 组大鼠 TET2 蛋白水平第 1 天下降, 第 3、7、10 天维持在较低水平。第 14 天 TET2 蛋白水平逐渐恢复到基线水平, 见图 4, 表 2。正常对照组和 CFA 组采用析因设计的两因素方差分析进行比较, 样本量($n=$

3) 在所有组别及时间点上一致。结果显示, CFA 干预因素 [$F(1, 20) = 74.860, P < 0.05$]、时间因素的主效应显著 [$F(4, 20) = 6.196, P < 0.05$], CFA 干预和时间之间存在显著的交互作用 [$F(4, 20) = 4.955, P < 0.05$]。皮尔逊相关分析显示, TET2 与 miR-210-3p 的表达水平呈负相关, 见图 4C。

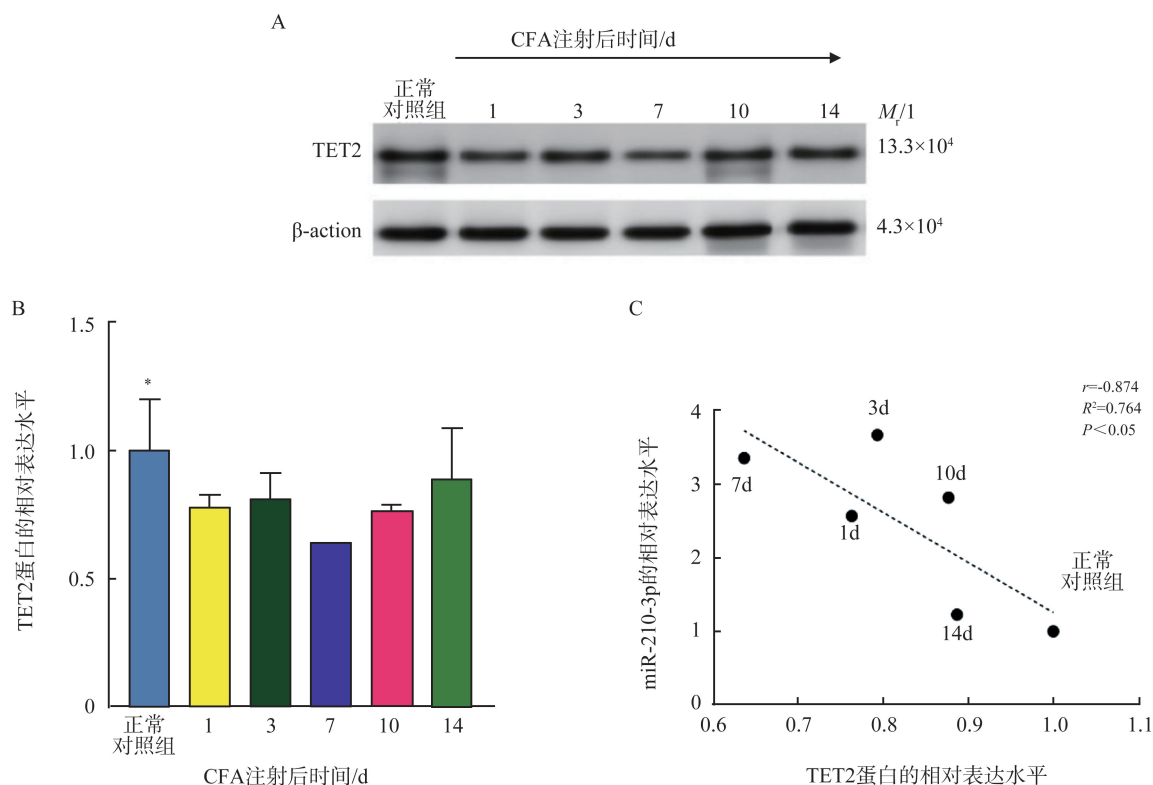


图 4 CFA 注射后脊髓 TET2 蛋白表达及与 miR-210-3p 表达的相关性

A~B: 注射 CFA 后脊髓 TET2 蛋白表达量的变化 (* $P < 0.05$ vs CFA 注射后第 7 天); C: CFA 组大鼠 TET2 与 miR-210-3p 表达水平变化的相关性。

Figure 4 TET2 protein expression and correlation with miR-210-3p expression in spinal cord after CFA injection

A-B: Changes of TET2 protein expression in spinal cord after CFA injection (* $P < 0.05$ vs CFA post-injection on day 7); C: Correlation analysis of changes in the expression levels of TET2 and miR-210-3p in rats in CFA group.

表 2 注射 CFA 后正常对照组和 CFA 组大鼠脊髓 miRNA-210-3p 和 TET2 蛋白的相对表达

Table 2 Relative expressions of miRNA-210-3p and TET2 proteins in rat spine of NC and CFA groups after CFA injection

时间	miRNA-210-3p		TET2	
	正常对照组	CFA 组	正常对照组	CFA 组
1 d	0.96±0.04	2.48±0.32	0.93±0.11	0.80±0.05
3 d	1.08±0.08	3.64±0.08	1.05±0.16	0.87±0.11
7 d	1.27±0.15	3.36±0.35	0.99±0.10	0.63±0.07
10 d	0.90±0.40	2.57±0.53	1.12±0.09	0.78±0.03
14 d	0.78±0.10	1.23±0.12	1.01±0.13	0.91±0.20

2.4 TET2 在大鼠脊髓中的分布与特异性细胞标记的共定位分析

TET2 在大鼠脊髓中的分布主要与 NeuN 标

记的神经元呈现共定位, 而与 GFAP 标记的星形胶质细胞和 Iba1 标记的小胶质细胞的共定位较少, 见图 5。

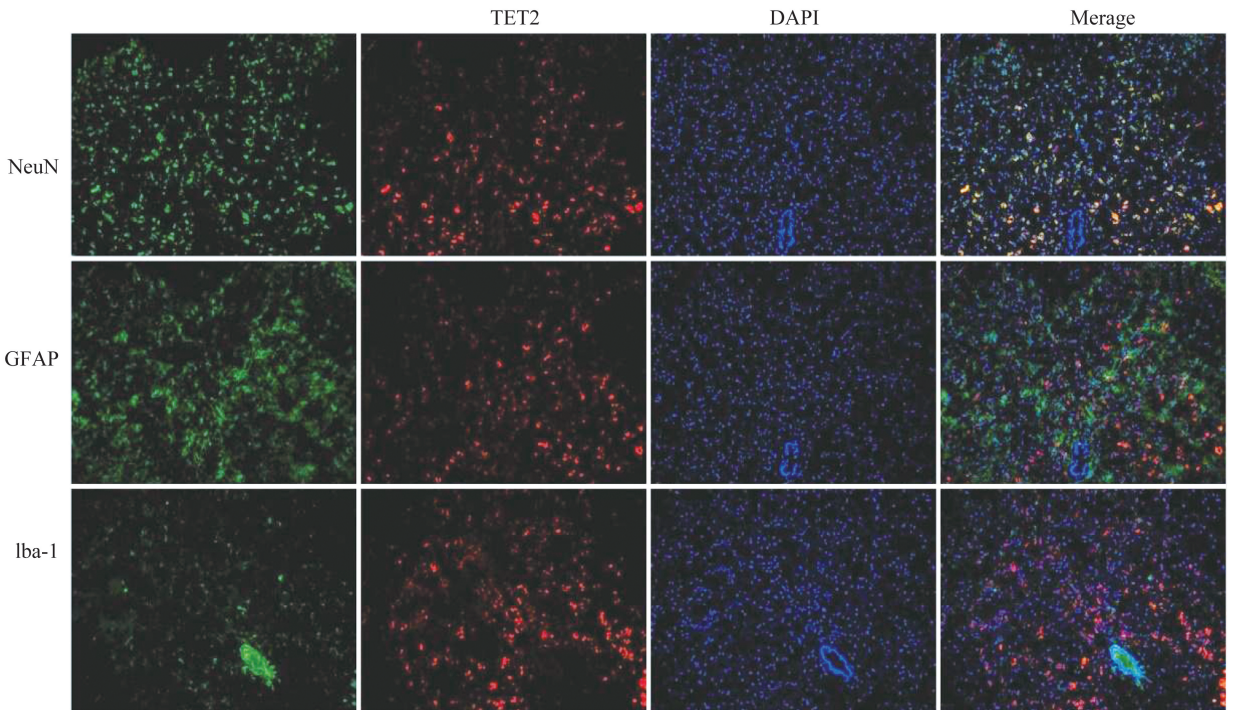
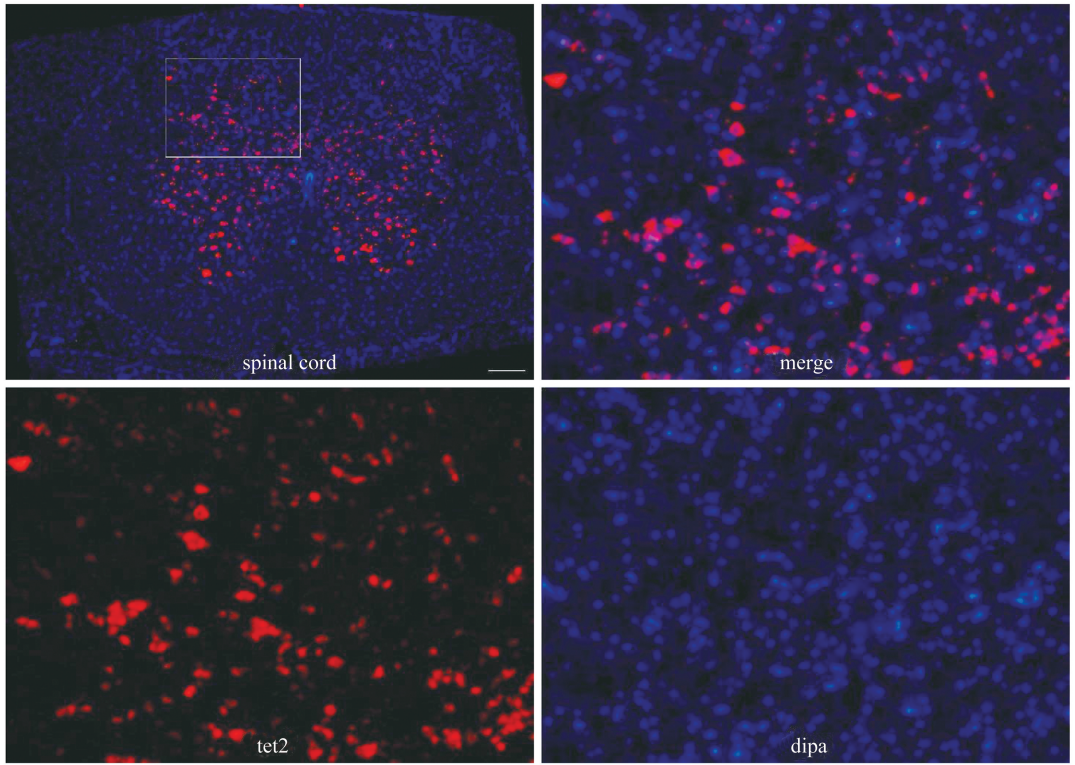


图 5 TET2(红色)与 NeuN(神经元标记物,绿色)、Iba1(小胶质细胞标记物,绿色)和 GFAP(星形胶质细胞标记物,绿色)的共定位情况

Figure 5 Co-localisation of TET2 (red) with NeuN (neuronal marker, green), Iba1 (microglial marker, green) and GFAP (astrocyte marker, green)

2.5 AAVi 对脊髓 miR-210-3p、TET2 蛋白表达及疼痛行为学的影响

PCR 结果显示,AAVi 可显著抑制脊髓 miR-210-3p 的表达水平($P<0.05$)。行为学测量显示,与 CFA+AAV NC 组相比,CFA+AAVi 组 PWMT

[($F(1,8)=50.98, P<0.05$)] 和 PTWL [$F(1,8)=119.60, P<0.05$] 表达增加,见图 6,表 3。免疫荧光显示,与 CFA+AAV NC 组相比,CFA+AAVi 组 TET2 蛋白表达上调($P<0.05$),见图 7。

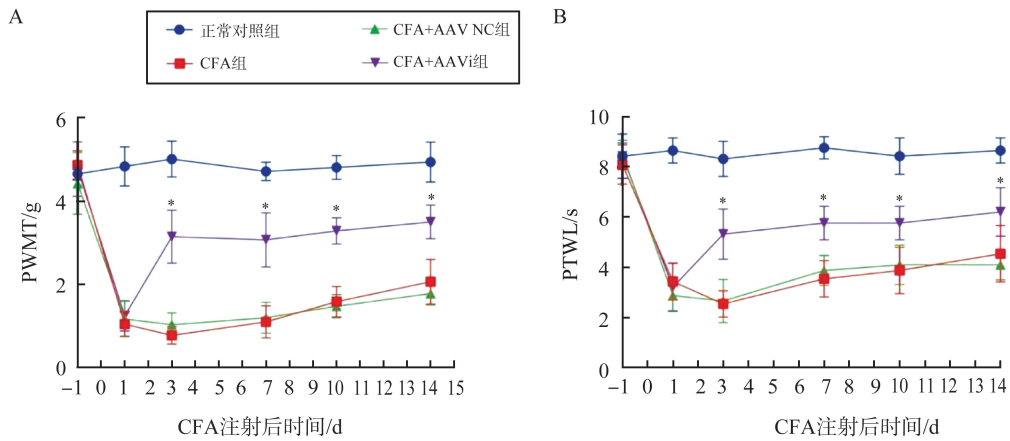


图 6 AAVi 注射对脊髓 miR-210-3p 表达及疼痛行为学指标的影响

A~B: 正常对照组、CFA 组、CFA+AAV NC 组、CFA+AAVi 组 PWMT 和 PTWL 的变化 (**P*<0.05 vs CFA+AAV NC 组)。

Figure 6 Effect of AAVi injection on miR-210-3p expression in spinal cord and pain behaviour indices

A-B: Changes in PWMT and PTWL in NC, CFA, CFA+AAV NC, and CFA+AAVi in spinal cord groups (**P*<0.05 vs CFA+AAV NC group).

表 3 CFA+AAV NC 组和 CFA+AAVi 组 PWMT 和 PTWL 比较

Table 3 Comparison of PWMT and PTWL in rats of CFA+AAV NC group and CFA+AAVi group

时间	PWMT/g		PTWL/s	
	CFA+AAV NC 组	CFA+AAVi 组	CFA+AAV NC 组	CFA+AAVi 组
前 1 d	4.43±0.73	4.77±0.66	8.55±0.52	8.44±0.52
1 d	1.01±0.53	1.21±0.86	2.55±0.52	3.22±0.97
3 d	1.70±0.27	3.26±0.46	2.83±0.86	5.33±1.41
7 d	1.43±0.44	3.07±0.65	4.11±0.92	5.77±0.97
10 d	1.78±0.28	3.65±0.30	4.44±1.13	5.91±1.05
14 d	1.95±0.48	3.83±0.53	3.77±0.60	6.44±1.23

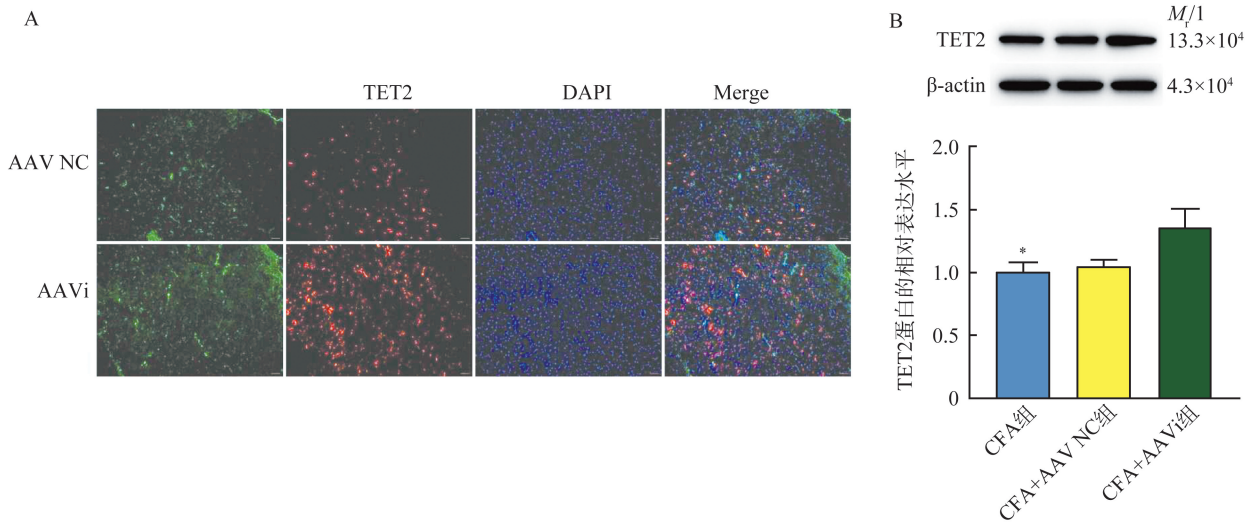


图 7 miR-210-3p 抑制剂对 CFA 诱导的炎性疼痛的影响

A~B: 注射 AAV-miR-210-3p inhibitor 后 TET2 的表达升高。 (**P*<0.05 vs CFA+AAVi 组)

Figure 7 Effect of miR-210-3p inhibitor on CFA-induced inflammatory pain

A-B: Up-regulation of spinal cord TET2 expression after application of AAVi injection (**P*<0.05 vs CFA+AAVi group)

3 讨论

炎性疼痛是常见的临床症状,但其潜在机制尚不明确。一般认为,炎性疼痛的发生机制涉及多个复杂的生物学过程。首先,在组织受伤后,伤处会释放多种炎症介质,如细胞因子和激活的免疫细胞,不仅引发局部炎症反应,而且增加了神经元的兴奋性。其次,疼痛反应的持续和增强与基因表达模式的改变直接相关,例如通过 DNA 甲基化等表观遗传机制调节基因表达,以及 microRNAs 介导的翻译后抑制机制^[20-22]。这些因素联合影响了神经元的信号传递和感痛阈值,导致疼痛感的持续和放大。

近年研究表明,microRNAs 在疼痛的生理和病理机制中起到关键的调节作用,特异性的 microRNAs 有潜力成为预防和减轻疼痛的新分子目标^[23-24]。其中,miR-210-3p 作为“炎症 microRNAs”的一员,在炎症反应中被上调^[25]。在神经炎症的进程中,miR-210-3p 作为一种潜在的生物标志物,其表达水平的变化受到广泛关注^[26]。临床上,miR-210-3p 的表达水平上调与缺血性脑卒中后的神经炎症反应紧密相关,有研究显示,利用 miR-210-3p 的抑制剂可以有效降低大脑中 TET2 蛋白表达量,进而缓解由脑卒中引起的神经炎症^[17-18]。小胶质细胞作为中枢免疫系统的先锋,可通过沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 的表达调控其活化状态^[27]。miR-210-3p 途径其靶向路径作用于小胶质细胞,促使这些细胞转变成促炎的 M1 型态,从而通过释放肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 等促炎细胞因子,靶向 SIRT1 影响小胶质细胞的活化状态,导致向促炎 M1 型转变。进一步研究表明,抑制 miR-210-3p 可以防止体内小胶质细胞活化介导的神经炎症,表明其作为潜在的疼痛治疗靶点的可行性^[28]。同时,抑制 miR-210-3p 对提高线粒体功能和促进神经元细胞的存活率具有积极作用^[26]。但有关 miR-210-3p 对炎性疼痛作用的研究较少。

通过生物信息学及双荧光素酶报告基因实验,本实验确认了 miR-210-3p 与 TET2 基因之间存在结合位点,并且 miR-210-3p 对 TET2 表达具有抑制作用。在 CFA 诱导的炎症性疼痛模型中,脊髓中 miR-210-3p 水平的上升伴随着 TET2 表达的减少,表明 miR-210-3p 可能通过下调 TET2 调节炎症反应。行为学测定结果表明,miR-210-3p 表达水平的

上升与大鼠疼痛敏感性的增加相关联,表明 miR-210-3p 与疼痛敏感性之间存在着密切联系。与相关研究^[29]关于 miR-210-3p 在炎性疼痛机制中的关键作用一致,进一步强化了 miR-210-3p 作为治疗炎性疼痛新分子靶标的潜力。

TET2 作为一种 DNA 羟甲基化酶,在调节炎症性基因表达、调控免疫细胞功能以及影响炎症反应过程中发挥重要作用^[10]。尽管 TET2 在炎性疼痛中的具体作用仍有待进一步明确,但近年研究揭示了其在不同细胞类型中的表达差异,显示 TET2 在调节中枢神经系统炎症反应中可能扮演着关键角色^[30]。研究显示,TET2 通过影响小胶质细胞和星形胶质细胞中炎症基因的表达,可能在神经炎症过程中起到关键作用,特别是在促进促炎和抗炎细胞因子生成方面。例如,TET2 介导的激活 T 细胞核因子启动子去甲基化作用促进 CD11b 的表达,激活小胶质细胞,促进 TNF- α 和 IL- 1β 等促炎细胞因子的产生,表明 TET2 参与了神经炎症的发展过程^[31]。此外,TET2 还可能调控胶质细胞与神经元之间的通信,影响神经元的基因表达和存活能力。通过调节胶质细胞的活化状态及其功能,TET2 在神经系统损伤和炎症后的修复过程中发挥重要作用,促进神经再生和功能恢复^[32-33]。然而,TET2 在巨噬细胞中抑制促炎基因的表达,TET2 的激活能够增强 IL-10 表达,减少 TNF- α 及 IL-6 的产生^[34-35]。

本实验结果发现,TET2 蛋白表达水平的下调与神经元内的疼痛敏感性增加之间存在关联,并且 TET2 与神经元细胞的共定位进一步表明 TET2 在调节痛觉敏化及神经元兴奋性方面可能发挥着至关重要的作用。目前 TET2 表达降低的分子机制尚不明确,突出了未来研究的必要性,有待深入了解 TET2 在脊髓神经元调控网络中的作用及其机制。此外,本实验使用 miR-210-3p 抑制剂不仅显著减轻了由 CFA 引发的炎症性疼痛,同时也有效地增加了 TET2 的表达水平。本研究结果有望为新一代疼痛治疗方法的开发提供科学依据,其中 miR-210-3p 的调控途径可能成为未来疼痛治疗的一个重要方向。

综上所述,本实验揭示了 miR-210-3p 在炎性疼痛进程中扮演重要作用,以及 miR-210-3p 对 TET2 蛋白表达的抑制作用。miR-210-3p/TET2 信号通路有望成为疼痛治疗的有效策略。然而,microRNAs 作为潜在的治疗工具面临着诸多挑战,首要是 microRNAs 在体内容易降解,限制了其作为潜在治疗药物的稳定性。其次,鉴于 microRNAs 的多靶性特

点,它们在调节一个靶标基因的同时,可能影响其他信号通路产生预期之外的生物学效应。因此,如何设计和高度特异性的 miRNA 药物,以减少非预期不良反应,是未来研究和临床应用中需要解决的重要问题。

参考文献:

- [1] 朱方强, 陈民佳, 朱明, 等. 炎症与组织再生修复[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2017, 12(1): 72-76.
ZHU Fangqiang, CHEN Minjia, ZHU Ming, et al. Inflammatory and tissue regeneration, repair[J]. Chinese Journal of Injury Repair and Wound Healing (Electronic Edition), 2017, 12(1): 72-76.
- [2] Dai Z, Chu H, Ma J, et al. The regulatory mechanisms and therapeutic potential of microRNAs: from chronic pain to morphine tolerance [J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 80. doi:10.3389/fnmol.2018.00080.
- [3] Altarifi A, Alsalem M, Mustafa A. Effects of intraplantar administration of Complete Freund's Adjuvant (CFA) on rotarod performance in mice[J]. Scand J Pain, 2019, 19(4): 805-811.
- [4] 王威严, 杨清锐, 师健民, 等. 伯氏疏螺旋体诱导大鼠类风湿关节炎模型的建立[J]. 山东大学学报(医学版), 2015, 53(9): 47-52.
WANG Weiyan, YANG Qingrui, SHI Jianmin, et al. Establishment of rat models of rheumatoid arthritis induced by Borrelia burgdorferi[J]. Journal of Shandong University (Health Science), 2015, 53(9): 47-52.
- [5] 陈佳祎, 潘莹倩, 张新军, 等. 非甾体抗炎药相关小肠损伤的研究进展[J]. 中国现代医生, 2023, 61(29): 135-138.
- [6] Feehan AK, Zadina JE. Morphine immunomodulation prolongs inflammatory and postoperative pain while the novel analgesic ZH853 accelerates recovery and protects against latent sensitization [J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 100.
- [7] Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, et al. Epigenetic mechanisms of chronic pain[J]. Trends Neurosci, 2015, 38(4): 237-246.
- [8] Zhang Z, Cai YQ, Zou F, et al. Epigenetic suppression of GAD65 expression mediates persistent pain [J]. Nat Med, 2011, 17(11): 1448-1455.
- [9] Li X, Liu DZ, Dai ZS, et al. Intraperitoneal 5-azacytidine alleviates nerve injury-induced pain in rats by modulating DNA methylation [J]. Mol Neurobiol, 2023, 60(4): 2186-2199.
- [10] Cong BY, Zhang Q, Cao XT. The function and regulation of TET2 in innate immunity and inflammation[J]. Protein Cell, 2021, 12(3): 165-173.
- [11] Bird L. Inflammation: TET2: the terminator [J]. Nat Rev Immunol, 2015, 15(10): 598.
- [12] Chamessian 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.
- [13] 贾树山. 初级感觉神经元 TET1 调控钾通道表达参与化疗痛的表观遗传学机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [14] 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.
- [15] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease [J]. Nat Rev Genet, 2011, 12: 861-874. doi:10.1038/nrg3074.
- [16] 伍华东, 丁颖, 徐广峰. microRNA 与 mRNA 不同位点结合后的生物学效应研究进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(30): 111-112.
- [17] Ma Q, Dasgupta C, Shen G, et al. MicroRNA-210 downregulates TET2 and contributes to inflammatory response in neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 6.
- [18] Li Y, Song R, Shen G, et al. MicroRNA-210 downregulates TET2 (ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2) and contributes to neuroinflammation in ischemic stroke of adult mice [J]. Stroke, 2023, 54(3): 857-867.
- [19] Zhang DW, Cao XR, Li J, et al. MiR-210 inhibits NF- κ B signaling pathway by targeting DR6 in osteoarthritis [J]. Sci Rep, 2015, 5: 12775. doi:10.1038/srep12775.
- [20] Weng HR, Taing K, Chen L, et al. EZH2 methyltransferase regulates neuroinflammation and neuropathic pain [J]. Cells, 2023, 12(7): 1058.
- [21] Liang L, Lutz BM, Bekker A, et al. Epigenetic regulation of chronic pain [J]. Epigenomics, 2015, 7(2): 235-245.
- [22] Hua T, Yang M, Song H, et al. Huc-MSCs-derived exosomes attenuate inflammatory pain by regulating microglia pyroptosis and autophagy via the miR-146a-5p/TRAF6 axis [J]. J Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 324.
- [23] Bai G, Ambalavanar R, Wei D, et al. Downregulation of selective microRNAs in trigeminal ganglion neurons following inflammatory muscle pain [J]. Mol Pain, 2007, 3: 15. doi: 10.1186/1744-8069-3-15.
- [24] Wang C, Zhang ZZ, Yang W, et al. MiR-210 facilitates ECM degradation by suppressing autophagy via silencing of ATG7 in human degenerated NP cells [J]. Biomed

- Pharmacother, 2017, 93: 470-479. doi:10.1016/j.biopha.
- [25] Virga F, Cappellesso F, Stijlemans B, et al. Macrophage miR-210 induction and metabolic reprogramming in response to pathogen interaction boost life-threatening inflammation[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(19): eabf0466.
- [26] Voloboueva LA, Sun X, Xu L, et al. Distinct effects of miR-210 reduction on neurogenesis: increased neuronal survival of inflammation but reduced proliferation associated with mitochondrial enhancement [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(11): 3072-3084.
- [27] Chen Y, Peng F, Yang C, et al. SIRT1 activation by 2, 3, 5, 6-tetramethylpyrazine alleviates neuroinflammation via inhibiting M1 microglia polarization [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1206513. doi:10.3389/fimmu.
- [28] Li B, Dasgupta C, Huang L, et al. MiRNA-210 induces microglial activation and regulates microglia-mediated neuroinflammation in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17: 976-991. doi:10.1038/s41423-019-0257-6.
- [29] Xie W, Su W, Xia H, et al. Synovial fluid microRNA-210 as a potential biomarker for early prediction of osteoarthritis[J]. *BioMed Res Int*, 2019, 2019: 7165406. doi:10.1155/2019/7165406.
- [30] Rodrigues D, Monteiro C, Cardoso-Cruz H, et al. Altered brain expression of DNA methylation and hydroxymethylation epigenetic enzymes in a rat model of neuropathic pain[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7305. doi:10.3390/ijms24087305.
- [31] Jiang BC, Ding TY, Guo CY, et al. NFAT1 orchestrates spinal microglial transcription and promotes microglial proliferation via c-MYC contributing to nerve injury-induced neuropathic pain [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(27): e2201300. doi:10.1002/adv.202201300.
- [32] Mi Y, Gao X, Dai J, et al. A novel function of TET2 in CNS: sustaining neuronal survival [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21846-21857.
- [33] Xia M, Yan R, Wang W, et al. GID complex regulates the differentiation of neural stem cells by destabilizing TET2[J]. *Front Med*, 2023, 17(6): 1204-1218.
- [34] Zhang Q, Zhao K, Shen QC, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6[J]. *Nature*, 2015, 525: 389-393. doi:10.1038/nature15252.
- [35] Hassan N, Ali A, Withycombe C, et al. TET-2 up-regulation is associated with the anti-inflammatory action of Vicenin-2 [J]. *Cytokine*, 2018, 108: 37-42. doi:10.1016/j.cyto.

(编辑:徐苗蓁)

读者·作者·编者

缩略语使用

凡已被公知公认的缩略语可以不加注释直接使用。例如:DNA、RNA、HbsAg、PCR等。不常用的、尚未被公知公认的缩略语,以及原词过长在文中多次出现者,若为中文可于文中第一次出现时写出全称,在圆括号内写出缩略语;若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称,在圆括号内写出外文全称及其缩略语。例如:流行性脑脊髓膜炎(流脑),阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语,以免影响可读性。西文缩略语不得拆开转行。

(本刊编辑部)