

熊翱,魏小雨,彭艳,等. 小肠过表达 Ski 蛋白对扭体小鼠的抑炎镇痛作用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(3): 369-377.
XIONG A, WEI X Y, PENG Y, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of small intestine Ski-overexpression on acetic acid-induced writhing mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(3): 369-377.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.03.011

小肠过表达 Ski 蛋白对扭体小鼠的抑炎镇痛作用

熊翱^{1,2}, 魏小雨¹, 彭艳², 杨明¹, 杨钱冬¹, 罗飞^{1*}

(1. 陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院骨科, 重庆 400038;
2. 陆军军医大学陆军特色医学中心野战外科研究部, 重庆 400042)

【摘要】 目的 研究小肠过表达鸟类癌基因(virus sloan-kettering institute, v-ski)的细胞内同源物(Ski)蛋白对醋酸致扭体小鼠的抑炎镇痛作用。方法 选取8周龄雄性ICR小鼠,给予腹腔注射现配的0.7%醋酸溶液(0.1 mL/10 g)诱发扭体反应。实验小鼠分为假手术(sham)组、醋酸(acetic acid)组、醋酸(acetic acid)+布洛芬(ibuprofen)组、醋酸(acetic acid)+腺病毒空质粒(ad-EGFP)组、醋酸(acetic acid)+腺病毒ski质粒(ad-ski)-1组、醋酸(acetic acid)+腺病毒ski质粒(ad-ski)-2组和醋酸(acetic acid)+柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)组,每组10只。观察并记录第1次扭体出现的潜伏期,同时记录15 min内的扭体次数。获取标记的小肠组织,鉴定腺病毒转染效果,检测促炎因子、疼痛生物标志物的蛋白表达量,进一步分析核转录因子- κ B(NF- κ B)通路蛋白表达及其与Ski蛋白的结合情况。结果 腹腔注射ad-ski腺病毒后,小肠成功过表达Ski蛋白。过表达的Ski蛋白延长了小鼠发生扭体的潜伏期,同时减少了扭体反应的频率,与布洛芬的效果相当($P > 0.05$)。与醋酸组比较,过表达的Ski蛋白显著抑制了促炎因子和疼痛生物标志物的蛋白表达($P < 0.05$)。而且NF- κ B p65与Ski有复合物形成。结论 过表达Ski蛋白对醋酸引起的炎性疼痛有抑炎镇痛作用,且与Ski调节NF- κ B信号通路有关。

【关键词】 Ski;扭体实验;白细胞介素-1 β ;肿瘤坏死因子- α ;神经生长因子;酪氨酸蛋白激酶A;小鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2024)03-0369-09

Anti-inflammatory and analgesic effects of small intestine Ski-overexpression on acetic acid-induced writhing mice

XIONG Ao^{1,2}, WEI Xiaoyu¹, PENG Yan², YANG Ming¹, YANG Qiantong¹, LUO Fei^{1*}

(1. Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital, Army Medical University(Third Military Medical University), Chongqing 400038, China; 2. Research Institute of Surgery, Army Characteristic Medical Center of the Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400042, China)
Corresponding author: LUO Fei. E-mail:1388386917@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the anti-inflammatory and analgesic effects of Ski protein overexpression on writhing in mice induced by acetic acid. **Methods** Eight-week-old male ICR mice were administered 0.7% acetic acid solution (0.1 mL/10 g) to induce a writhing reaction. The mice were divided into sham, acetic acid, acetic acid + ibuprofen, acetic acid + ad-EGFP, acetic acid + ad-ski-1, acetic acid + ad-ski-2, and acetic acid + sulfasalazine groups ($n = 10$

【基金项目】重庆市研究生(博士)科研创新课题(CYB23292),陆军军医大学优秀人才库重点扶持对象(XZ-2019-505-021)。Funded by the Postgraduate (Doctor) Research Innovation Project of Chongqing(CYB23292), Key Supporters of the Excellent Talent Pool of the Army Medical University (XZ-2019-505-021).
【作者简介】熊翱,男,博士,研究方向:骨科相关疾病的临床与基础,创伤基础与临床。Email:2528359578@qq.com
【通信作者】罗飞,男,教授,博士,博士生导师,骨科主任,研究方向:骨科疾病,尤其擅长脊柱外科。Email:1388386917@163.com

mice per group). The time to the first appearance of twisting and the number of twists within 15 min were recorded. Small intestine tissues were removed to identify the effect of adenovirus transfection and to detect protein expression levels of pro-inflammatory factors and pain biomarkers and protein expression of nuclear factor (NF)- κ B p65 and its binding with Ski protein. **Results** Ski protein was successfully overexpressed in small intestine after intraperitoneal injection of Ad-ski adenovirus. Overexpressed Ski protein delayed the start and decreased the frequency of writhing, comparable to ibuprofen ($P > 0.05$). Groups in which ski protein was overexpressed showed significantly inhibited protein expression of pro-inflammatory factors and pain biomarkers compared with the acetic acid group ($P < 0.05$). Moreover, NF- κ B p65 formed complexes with Ski. **Conclusions** Overexpression of Ski protein has anti-inflammatory and analgesic effects on acetic acid-induced inflammatory pain by inhibiting the expression of inflammatory factors and pain biomarkers, via regulation of the NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] Ski; writhing test; IL-1 β ; TNF- α ; nerve growth factor; tyrosine protein kinase A; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

疼痛是一种与实际或潜在组织损伤相关的不愉快感觉和情绪情感体验及其经历^[1]。2021 年 COHEN 等^[2]将疼痛分为伤害性疼痛 (nociceptive pain, NCEP)、神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NPAP) 及伤害可塑性疼痛 (nociplastic pain, NPLP) 3 种类型。其中 NCEP 的机制依赖于外周神经, 引起 NCEP 的病因是直接或潜在的组织损伤^[3]。炎性疼痛是 NCEP 的一种, 包括炎性关节疼痛、腹部炎性疼痛、胸部炎性疼痛、盆腔炎性疼痛和创伤性炎症疼痛等。

炎性疼痛的治疗策略是针对抑炎镇痛而设计的。临床治疗药物采用非甾体抗炎药 (nonsteroidal anti inflammatory drugs, NSAIDs)、皮质类固醇和阿片类药物等, 但长期使用止痛药存在许多安全问题^[4-5]。新型的抗神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 抗体 (如他尼珠) 治疗方法^[6], 也产生明显的副作用如感觉迟钝、感觉异常和关节伤害等, 尚未研制出安全有效的炎性疼痛缓解剂。所以对无副作用或副作用少的镇痛药物研究, 临床意义重大。

醋酸诱导扭体痛是评价天然药物和传统药物外周镇痛活性的成熟方法, 而且能够定性定量测量疼痛^[7]。从扭动频率的降低推断出干预扭体实验的药物镇痛效果^[7-8]。醋酸通过刺激小肠等组织释放疼痛介质诱导炎性疼痛, 导致扭体反应^[7]。而且已有报道, 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、NGF、酪氨酸蛋白激酶 A (tyrosine protein kinase A, TrkA) 和降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 是开发新型镇痛药物的重要靶点^[8]。

鸟类癌基因 Ski 蛋白 (cellular sloan-kettering institute, c-Ski) 是鸟类癌基因 (virus sloan-kettering institute, v-ski) 的细胞内同源物蛋白 (动物称 *c-ski* 或 *c-Ski*, 而人称 *ski* 或 *Ski*)。Ski 作为辅阻遏子, 可调控多种核因子的转录, 促进糖尿病伤口愈合, 下调急性伤口的 IL-1 β 和 TNF- α ^[9-10], 干预成纤维细胞增殖和凋亡^[10]。提高 Ski 表达后, 伤口炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 分泌显著减少, 而且, 转染 ad-ski 具有抑制 SD 大鼠原代滑膜细胞炎症反应^[11]。

本研究采用醋酸诱导 ICR 小鼠产生扭体反应, 应用布洛芬干预作为抑炎镇痛阳性对照, 柳氮磺胺吡啶作为抑制 NF- κ B 通路的阳性对照, 通过检测 ICR 小鼠扭体频率和小肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP、p-NF- κ B p65 (p-p65)、NF- κ B p65 (p65)、磷酸化核转录因子 κ B 抑制蛋白 α (p-I κ B α) 和 I κ B α 的蛋白表达, 探讨 Ski 的抑炎镇痛效果和可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄的 SPF 级雄性 ICR 小鼠, 18 ~ 22 g, 80 只, 购自中国人民解放军陆军特色医学中心【SCXK (渝) 2022-0004】, 将动物饲养在陆军军医大学陆军特色医学中心的标准实验室【SYXK (渝) 2022-0003】。饲喂普通维持饲料。饲养环境: 昼夜各半循环照明, 通风良好, 温度 20 ~ 26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 42% ~ 62%, 动物可以自由进食和饮水。本研究中使用的所有程序均严格按照美国国立卫生研究院《实验动物护理和使用指南》进行。所有动物实验均由陆军军医大学 (第三军医大学) 实验动物福利

伦理审查委员会批准 (AMUWEC2018 1430)。

1.1.2 主要试剂与仪器

Ski 过表达 (Ski-overexpressing) 重组腺病毒 Adeno-MCMVSKI-3Flag-P2A-EGFP (ad-Ski) 和空白对照重组腺病毒 Adeno-MCSV-3Flag-P2A-EGFP (ad-EGFP) 购自和元生物技术 (上海) 有限公司, 布洛芬 (ibuprofen, 进口分装, 重庆西南制药三厂), 腺病毒空质粒 (ad-EGFP) 和腺病毒 ski 质粒 (ad-ski) 购自和元生物技术 (上海) 有限公司, 醋酸 (500 mL, 西安天正药用辅料有限公司), 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, NF- κ B 抑制剂^[12], 上海三维制药有限公司), 生理盐水 (100 mL, 0.9 g 氯化钠, 四川科伦药业股份有限公司), 兔抗 TNF- α 抗体 (Cell Signalling 公司, 美国), 兔抗 IL-1 β 抗体 (Cell Signalling 公司, 美国), 兔抗 NGF 抗体 (Abcam 公司, 美国), 鼠抗 Ski 抗体 (Santa Cruz 公司, 美国), 兔抗 Flag 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 TrkA 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 CGRP 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 NF- κ B p65 抗体 (Abcam 公司, 中国香港), 兔抗 p-NF- κ B p65 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 中国香港), 兔抗 p-I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 兔抗 I κ B α 抗体 (Cell Signaling Technology 公司, 美国), 兔抗 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), 抗鼠 IgG-HRP 抗体 (Sigma 公司, 美国), 免疫印迹 (Western Blot) 实验系统和试剂 (Bio-Rad 公司, 美国), Western Blot 底物发光试剂盒 (Bio-Rad 公司, 美国)。手术器械 (眼科剪、眼科镊、组织剪、血管镊等)。

1.2 方法

1.2.1 Ad-Ski 的构建、扩增、纯化和转染

将人 ski cDNA (GenBank 登录号 NM_003036.3) 包装到腺病毒载体中。该病毒在人胚胎肾 293 (HEK293) 细胞中扩增, 由 Vivapure Adeno PACK 20 (Sartorius) 纯化, 并如参考文献^[10]所述滴定。按照试剂说明书介绍方法, 用 ad-EGFP 或 ad-ski 转染 ICR 小鼠腹腔小肠组织 48 h 后, 进行扭体实验。

1.2.2 醋酸致扭体实验

(1) 实验分组: ICR 小鼠分为假手术 (sham) 组、醋酸 (acetic acid) 组、醋酸 (acetic acid) + 布洛芬 (ibuprofen) 组、醋酸 (acetic acid) + 腺病毒空质粒 (ad-EGFP) 组 (2×10^8 IU)、醋酸 (acetic acid) + 腺

病毒 ski 质粒 (ad-ski)-1 组 (1×10^8 IU)、醋酸 (acetic acid) + 腺病毒 ski 质粒 (ad-ski)-2 组 (2×10^8 IU) 和醋酸 (acetic acid) + 柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine) 组。每组 10 只。测定 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP、p-NF- κ B p65 (p-p65)、NF- κ B p65 (p65)、p-I κ B α 和 I κ B α 等分子生物学指标, 每组取 5 只动物完成。

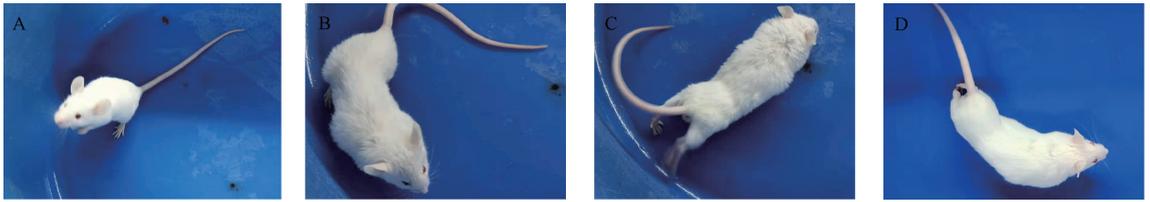
(2) 预处理各组 ICR 小鼠: 用 1.5% 戊巴比妥钠麻醉小鼠, 剪去腹部毛发, 消毒后铺带孔无菌手术巾, 开腹。采用可吸收缝合线在近盲肠处标记回肠。然后, 假手术组、醋酸组、醋酸 + 布洛芬组和醋酸 + 柳氮磺胺吡啶组小鼠在标记的回肠多点处被注入生理盐水 (总量控制在 0.1 mL/10 g), 腺病毒各组小鼠在回肠多点处被注入 0.1 mL/10 g 腺病毒 (1×10^8 IU 或 2×10^8 IU), 最后缝合腹腔。48 h 后, 醋酸 + 布洛芬组小鼠腹腔注入 0.1 mL/10 g 布洛芬溶液 (200 mg/kg), 醋酸 + 柳氮磺胺吡啶组以小鼠 100 mg/kg 的柳氮磺胺吡啶灌胃, 其余各组小鼠腹腔注入 0.1 mL/10 g 生理盐水。

(3) 0.7% 的醋酸溶液制备: 模型制备前 30 min, 配制 10% 醋酸 (用生理盐水) 10 mL, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰水盒中; 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 15 min 后, 取 10% 醋酸 450 μ L 配制成 0.7% 醋酸溶液 (用生理盐水) 5 mL, 放于 4 $^{\circ}$ C 冰水盒中; 在 4 $^{\circ}$ C 孵育 12 min 后, 取 0.7% 醋酸溶液 5 mL 放入 37 $^{\circ}$ C 水浴锅中热浴 3 min 后立即使用。

(4) 扭体模型制备: 各组 ICR 小鼠 (除假手术组外) 第 2 次预处理 30 min 后, 小鼠按 0.1 mL/10 g 的标准, 给予腹腔注射现配的 0.7% 醋酸溶液。室温需保持在 (25 ± 1) $^{\circ}$ C, 在观察盒 (24 $^{\circ}$ C) 里, 观察并记录小鼠第 1 次扭体出现的潜伏期, 同时记录 15 min 内的扭体次数。一次完整扭体反应的标准^[8]: ICR 小鼠出现腹部内凹, 躯干与后肢伸张、臀部高起等行为反应, 可记为完整扭体反应 1 次 (图 1)。15 min 后, 小鼠被安乐死, 取盲肠处回肠组织, 检测 Ski、Flag-Ski、IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP、NF- κ B p65 (p-p65)、p-NF- κ B p65 (p65)、p-I κ B α 和 I κ B α 等蛋白表达。观察并记录小鼠扭体反应时, 采用双盲法。

1.2.3 Western Blot 分析

根据标准程序^[13-14]进行 Western Blot 分析。将组织裂解物进行十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide



注:A:扭体前;B:腹部内凹;C:躯干与后肢伸张;D:臀部高起。

图1 醋酸导致的完整扭体反应

Note. A. Before twisting. B. Depressed abdomen. C. Trunk and hind limbs stretched. D. High hips.

Figure 1 Writhing response induced by acetic acid

gel electrophoresis, PAGE), 电转移到聚偏氟乙烯 (PVDF)膜 (Millipore)上,并用指定的抗体探测。抗体信息如下:(1)兔抗 TNF- α 抗体(1:1000),(2)兔抗 IL-1 β 抗体(1:1000),(3)兔抗 NGF 抗体(1:1000),(4)鼠抗 Ski 抗体(1:500),(5)兔抗 Flag 抗体(1:1000),(6)兔抗 TrkA 抗体(1:1000),(7)兔抗 CGRP 抗体(1:1000),(8)兔抗 NF- κ B p65 抗体(1:1000),(9)兔抗 p-NF- κ B p65 抗体(1:1000),(10)兔抗 p-I κ B α 抗体(1:1000),(11)兔抗 I κ B α 抗体(1:1000),(12)小鼠抗 β -actin 抗体(1:10 000)。一抗孵育结束,用 PBS(0.01 mol/L, pH = 7.2)洗涤膜后,用与一抗相应的辣根过氧化物酶结合的抗兔或抗鼠二级抗体孵育,并用化学发光底物检测,且感光在 X 线感光片上。在每个样品中测量 β -actin 表达以验证相等的蛋白质负载。

1.2.4 免疫沉淀

醋酸 + 腺病毒 ski 质粒-2 组的小肠组织在 IP 裂解/洗涤缓冲液 (ierce) 中冰上裂解 15 min,并添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂,获取蛋白裂解液并蛋白定量。根据 Crosslink Immunoprecipitation Kit 说明书进行实验:10 μ g 抗体 (IgG, Ski 或 p65 抗体)与蛋白 A/G 琼脂糖珠在 4 $^{\circ}$ C 交联 1 h,然后与 500 μ g 可溶性细胞裂解物在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 IP 裂解/洗涤缓冲液洗涤 4 次去除未结合蛋白。SDS-PAGE 后,将免疫沉淀蛋白转移到 PVDF 膜上,并用 Ski 或 NF- κ B p65 抗体进行检测。最后,使用 Western Blot 增强化学发光 (ECL) 试剂对 PVDF 膜进行可视化,且感光在 X 线感光片上。

1.3 统计学分析

所有独立实验的数据均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,所有指标数据运用 SPSS 15.0 先进行正态分布评估,符合正态分布的数据,使用配对样本双尾 t 检验进行统计分析。所有的统计分析结果, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。所有数据均使用医

学绘图软件 (GraphPad Prism V9.5.1.733) 和实验工作平台软件 (LabWorks 4.6) 进行分析。

2 结果

2.1 腹腔注射 ad-ski 腺病毒对小肠 Ski 蛋白的影响

腹腔注射 ad-ski 和 ad-EGFP 后,与醋酸组比较,醋酸 + 腺病毒 ski 质粒组 Ski 蛋白表达上调显著,醋酸 + 腺病毒空质粒组 Ski 蛋白表达无显著变化 (图 2)。标签蛋白 Flag-Ski,只在转染 ad-ski 的小肠标记组织有表达 (图 2)。

2.2 Ski 蛋白对小鼠扭体反应的影响

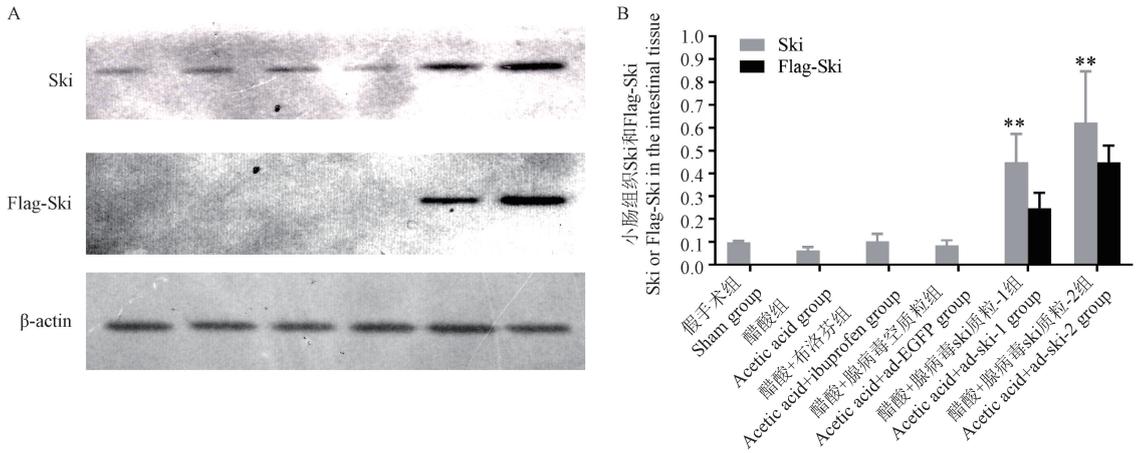
过表达 Ski 蛋白可减少扭体数 (图 3)。小鼠腹腔感染 2×10^8 IU 的 ad-ski 后,小鼠扭体反应的减少率为 54.12%,与标准药物布洛芬 (50.00%) 在 200 mg/kg 剂量下的作用效率相当。ad-ski 和布洛芬对醋酸诱发第 1 次扭体反应的时间 (潜伏期) 有延长 (图 3),与醋酸组相比,具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 Ski 蛋白对扭体小鼠肠道组织疼痛介导因子的影响

与醋酸组比较,过表达的 Ski 蛋白显著抑制了小肠组织中 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA 和 CGRP 的蛋白表达 (图 4),且 Ski 蛋白过表达产生的对上述致痛生物标志物的抑制作用均与标准药物布洛芬具有类似的作用。

2.4 Ski 蛋白对 NF- κ B 信号通路的影响

Ski 蛋白过表达抑制了 p65 的蛋白表达,与布洛芬的抑制作用相同 (图 5A)。醋酸 + ad-ski-2 组小肠组织裂解后,分别用 IgG、Ski 或 NF- κ B p65 抗体进行了免疫沉淀反应,Ski 与 NF- κ B p65 蛋白有结合 (图 5B,5C)。醋酸 + 腺病毒 Ski 质粒组-2 组和醋酸 + 柳氮磺胺吡啶组小肠组织 p-p65、p65、p-I κ B α 、I κ B α 、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白相对表达量均低于醋酸组 ($P < 0.05$) (图 6)。

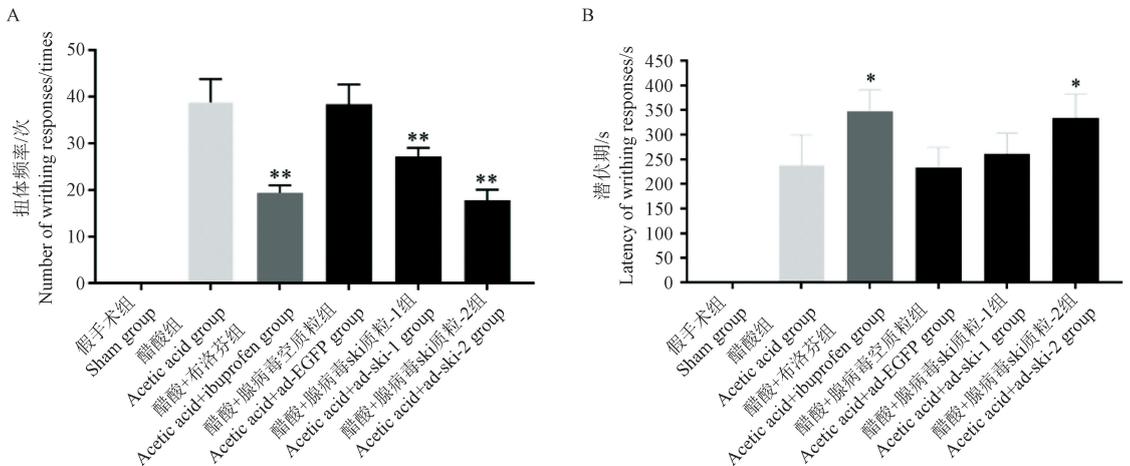


注:A:小肠 Ski 和 Flag-Ski 的 Western Blot 结果;B:小肠 Ski 和 Flag-Ski 的表达分析;检测指标的积分光密度值经过 β -actin 内参蛋白的积分光密度值校正;与醋酸组相比, $** P < 0.01$ 。(下同)

图 2 腺病毒转染后的小肠 Ski 和 Flag-Ski 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Note. A. Western Blot results of Ski and Flag-Ski in small intestine. B. Expression of Ski and Flag-Ski in small intestine. Integral optical density value of each detection index was corrected by the integral optical density value of the β -actin reference protein. Compared with acetic acid group, $** P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 2 Expression of Ski and Flag-Ski in small intestine after adenovirus transfection ($\bar{x} \pm s$)



注:A:各组的扭体频率;B:各组扭体反应发生的潜伏期;与醋酸组相比, $* P < 0.05$ 。(下同)

图 3 Ski 和布洛芬对醋酸诱导的 ICR 小鼠扭体反应潜伏期和次数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

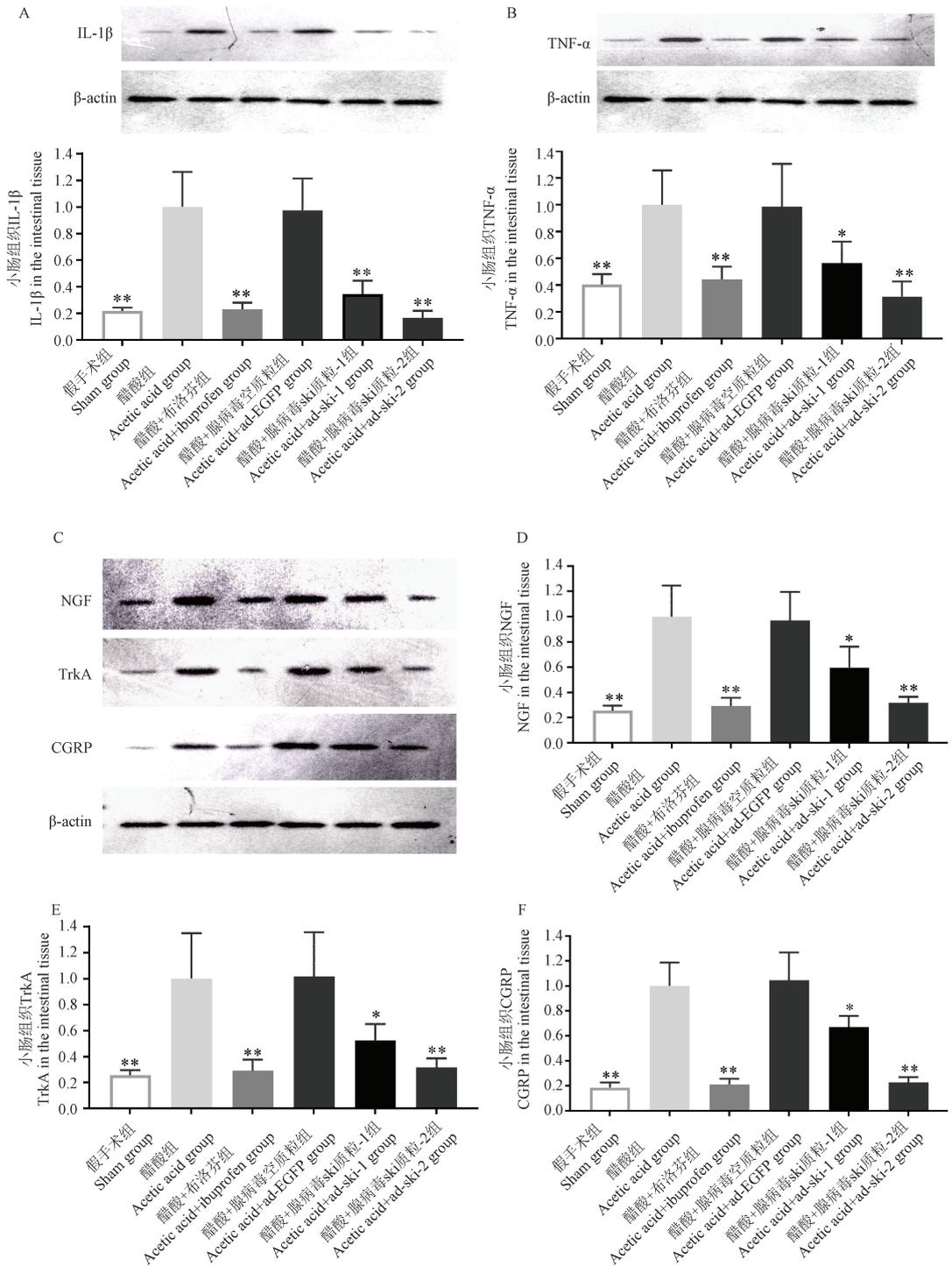
Note. A. Twisting frequency of each group. B. Latency of writhing reaction in each group. Compared with acetic acid group, $* P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of Ski and ibuprofen on writhing response of ICR mice induced by acetic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

通过醋酸诱导的扭体反应对动物外周性炎性疼痛的模拟已得到广泛认可。该模型的优点是操作方便,对动物影响轻微;不必麻醉动物,避免麻醉药对模型的影响;行为反应出现即时、变化明显、利于定量。以上优点使该模型成为外周镇痛药评价

的最常规方法,特别适用于筛选非麻醉性镇痛药^[7]。炎性疼痛的致痛因素包括炎性因子(IL-1 β 、TNF- α)、疼痛的生物标志物(NGF、TrkA 和 CGRP)等炎症介质。炎性因子可以直接激活痛觉感受器引起疼痛^[15],NGF 在组织损伤后的痛觉致敏中发挥着重要的作用,通过与 TrkA 等高亲和力受体结合实现痛觉传递^[16],同时,疼痛与 CGRP 有关^[17]。

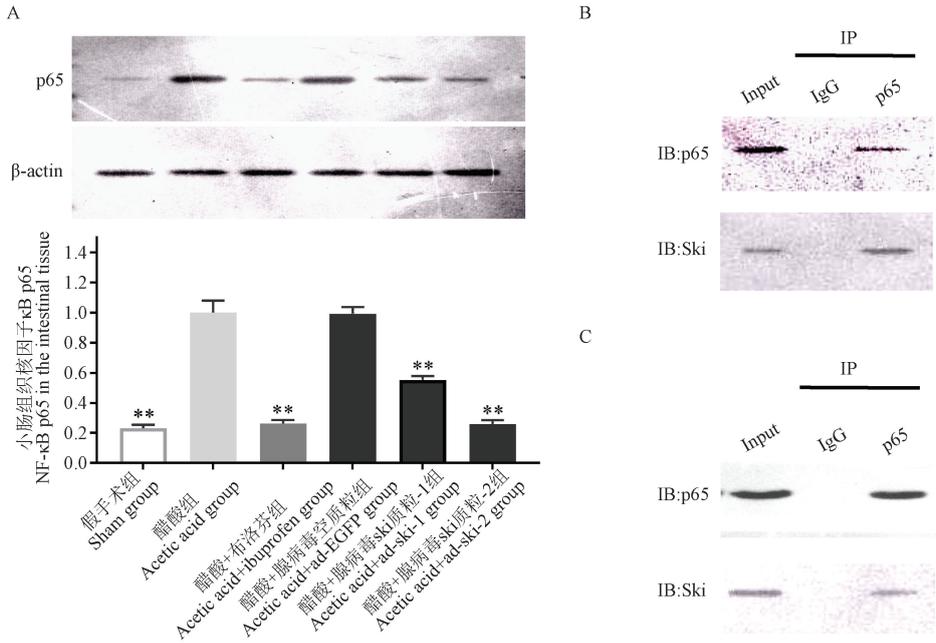


注:A:小肠 IL-1 β 蛋白的 Western Blot 结果分析;B:小肠 TNF- α 蛋白的 Western Blot 结果分析;C:小肠 NGF、TrkA 和 CGRP 蛋白的 Western Blot 结果分析;D:小肠 NGF 蛋白的 Western Blot 结果分析;E:小肠 TrkA 蛋白的 Western Blot 结果分析;F:小肠 CGRP 蛋白的 Western Blot 结果分析。检测指标的积分光密度值经过 β -actin 内参蛋白的积分光密度值校正,醋酸组归一。

图4 腺病毒转染后的小肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA 和 CGRP 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of IL-1 β protein in small intestine. B. Western Blot analysis of TNF- α protein in small intestine. C. Western Blot of NGF, TrkA and CGRP protein in small intestine. D. Western Blot analysis of NGF protein in small intestine. E. Western Blot analysis of TrkA protein in small intestine. F. Western Blot analysis of CGRP protein in small intestine. The integral optical density value of each detection index was corrected by the integral optical density value of the β -actin reference protein, normalized by acetic acid.

Figure 4 Expression of IL-1 β , TNF- α , NGF, TrkA and CGRP protein in small intestine after adenovirus ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

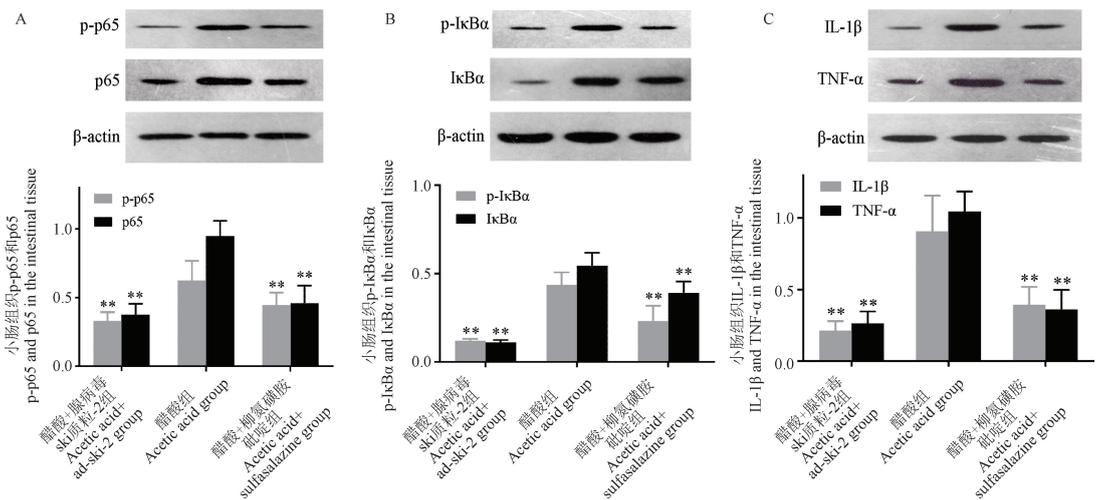


注: A: 小肠 p65 蛋白的 Western Blot 结果分析, 检测指标的积分光密度值经过内参指标校正; B: 醋酸 + 腺病毒 Ski 质粒组-2 组小肠组织裂解液用 Ski 抗体进行免疫沉淀反应结果; C: 醋酸 + 腺病毒 Ski 质粒组-2 组小肠组织裂解液用 p65 抗体进行免疫沉淀反应结果。

图 5 腺病毒转染小肠组织后 p65 蛋白表达及其与 Ski 蛋白的结合 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of NF- κ B p65 (p65) protein in small intestine. Integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index. B. Immunoprecipitation reaction was performed using Ski antibody on small intestinal tissue lysate from the acetic acid + ad-ski-2 group. C. Immunoprecipitation reaction was performed using NF- κ B p65 (p65) antibody on small intestinal tissue lysate from the acetic acid + ad-ski-2 group.

Figure 5 Expression of p65 protein and its binding to Ski protein after adenovirus transfection into small intestine tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注: A: 小肠 p-p65 和 p65 蛋白的 Western Blot 结果和分析; B: 小肠 p-IkBa 和 IkBa 蛋白的 Western Blot 结果和分析; C: 小肠 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的 Western Blot 结果和分析; 每个检测指标的积分光密度值被 β -actin 内参指标的积分光密度值校正。

图 6 三组小鼠小肠组织 p-p65、p65、p-IkBa、IkBa、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Western Blot analysis of p-p65 and p65 protein of small intestine. B. Western Blot analysis of p-IkBa and IkBa proteins in small intestine. C. Western Blot analysis of IL-1 β and TNF- α proteins in small intestine. Integrated optical density value of the detection index is corrected by the internal reference index.

Figure 6 Expression of p-p65, p65, p-IkBa, IkBa, IL-1 β and TNF- α in small intestine tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

本研究首先采用腺病毒预处理 ICR 小鼠腹腔回肠,过表达 Ski 蛋白。然后腹腔肠外注射醋酸引起炎性疼痛(外周性疼痛的一种)而导致扭体反应。实验观察到:Ski 不仅降低了 ICR 小鼠的扭体反应频率,而且降低了扭体小鼠小肠组织 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP 和 NF- κ B 通路蛋白的表达。Ski 和 NF- κ B p65 形成了复合物,说明 Ski 抑炎镇痛作用的发挥,可能是 Ski 通过调节 NF- κ B 信号通路完成的。

醋酸注入腹腔引发的疼痛,属于醋酸刺激损伤小肠而释放炎症和疼痛介质引起。炎症环境除了炎症因子直接刺激引起疼痛外,还促使 NGF 大量表达使神经末梢对痛觉更加敏感^[18]。NGF 与其功能性受体 TrkA 结合,引发 NGF 疼痛信号通路。NGF 除产生疼痛外,进一步强化“炎症环境”,诱发 IL-1 β 、TNF- α 等炎性介质的释放,可通过增加痛觉感受器兴奋性或直接激活伤害性感受器来导致外周敏化,从而诱导疼痛^[14]。Ski 抑制了醋酸诱导的 IL-1 β 、TNF- α 、NGF、TrkA、CGRP 和 NF- κ B 蛋白的高表达,减弱了致痛生物标志物诱导痛觉神经生长和痛觉敏感性,阻断痛觉传递^[16,19]。

Ski 具有促进创伤愈合和抑制瘢痕增生双重作用,且其双重作用与减轻炎症反应有密切关系,但作用机制尚不明确^[10]。有文献报道,转染 ad-ski 具有抑制 SD 大鼠原代滑膜细胞炎症反应,且 NF- κ B 的下游蛋白分子的表达发生了改变^[11]。本实验结果表明 Ski 蛋白抑制 NF- κ B 通路的作用与柳氮磺胺吡啶抑制 NF- κ B 通路^[12]的作用一致,下调了 p-p65、p65、p-I κ B α 、I κ B α 、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的表达。从现有结果推测 Ski 的抑制炎症因子和疼痛生物标志物蛋白的表达,与 Ski 抑制核 NF- κ B 的信号途径,阻碍 NF- κ B 的转录活性有关。

过表达 Ski 蛋白的抗炎和镇痛效果意义重大,因为 Ski 是内源性因子,从药物副作用方面来看,Ski 优于其他任何药物。但 Ski 作为治疗炎性疼痛的候选药物,用于临床还需进一步研究。要明确 Ski 镇痛和抗炎的详细分子机制等问题,比如 Ski 通过降低疼痛的生物标志物(NGF、TrkA 和 CGRP)蛋白的表达,从而减弱疼痛的详细分子机制。

Ski 蛋白通过抑制促炎因子的释放,削弱炎症环境和神经末梢对痛觉的敏感性以及痛觉传递,达到抑炎镇痛作用。而且这种抑炎镇痛作用,与 Ski 阻断 NF- κ B 信号通路途径有关。

参 考 文 献(References)

- [1] RAJA S N, CARR D B, COHEN M, et al. The revised international association for the study of pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises [J]. Pain, 2020, 161(9): 1976-1982.
- [2] COHEN S P, VASE L, HOOTEN W M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances [J]. Lancet, 2021, 397(10289): 2082-2097.
- [3] 艾琳, 韩奕, 季然, 等. 疼痛治疗及镇痛靶点的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2023, 29(7): 484-494.
AI L, HAN Y, JI R, et al. Research progress in pain treatment and analgesic targets [J]. Chin J Pain Med, 2023, 29(7): 484-494.
- [4] CHE AHMAD TANTOWI N A, LAU S F, MOHAMED S. *Ficus deltoidea* prevented bone loss in preclinical osteoporosis/osteoarthritis model by suppressing inflammation [J]. Calcif Tissue Int, 2018, 103(4): 388-399.
- [5] SHARMA V K, MAMONTOV E, TYAGI M. Effects of NSAIDs on the nanoscopic dynamics of lipid membrane [J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862(2): 183100.
- [6] 张常建, 陈秀秀, 周丽君. 抗体治疗疼痛的研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 8(2): 130-133.
ZHANG C J, CHEN X X, ZHOU L J. Research progress in antibody therapy for pain [J]. Chin J Pain Med, 2022, 8(2): 130-133.
- [7] LEE D, JU M K, KIM H. *Commiphora* extract mixture ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis [J]. Nutrients, 2020, 12(5): 1477.
- [8] 熊翱, 魏小雨, 许建中, 等. 碘乙酸单钠诱导 SD 大鼠膝关节炎后 HIF-1 α 、OPN、IL-1 β 、TNF- α 、MMP-13 和 NGF 蛋白表达及意义 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(5): 643-652.
XIONG A, WEI X Y, XU J Z, et al. Expression and significance of HIF-1 α , OPN, IL-1 β , TNF- α , MMP-13, and NGF proteins after MIA-induced KOA in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(5): 643-652.
- [9] XIONG A, XIONG R P, LUO F. Ski ameliorates synovial cell inflammation in monosodium iodoacetate-induced knee osteoarthritis [J]. Heliyon, 2024, 10: e24471.
- [10] PENG Y, XIONG R P, ZHANG Z H, et al. Ski promotes proliferation and inhibits apoptosis in fibroblasts under high-glucose conditions via the FoxO1 pathway [J]. Cell Prolif, 2021, 54(2): e12971.
- [11] 熊翱. Ski 对碘乙酸单钠诱导的 SD 大鼠膝关节炎滑膜细胞炎症的抑制作用 [D]. 郑州: 郑州大学; 2022.
XIONG A. Inhibitory effect of Ski on synovial cell inflammation induced by monosodium iodoacetate in SD rats with knee osteoarthritis [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University; 2022.
- [12] WAHL C, LIPTAY S, ADLER G, et al. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B [J]. J Clin Invest, 1998, 101(5): 1163-1174.
- [13] 熊翱, 熊仁平, 彭艳, 等. 脂多糖诱导 SD 大鼠膝关节成纤维

- 样滑膜细胞炎症模型建立及特征分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(4): 436-446.
- XIONG A, XIONG R P, PENG Y, et al. Establishment and characteristic analysis of a model of knee fibroblast-like synoviocytes in lipopolysaccharide-induced Sprague-Dawley rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(4): 436-446.
- [14] XIONG A, XIONG R, YU J, et al. Aquaporin-4 is a potential drug target for traumatic brain injury via aggravating the severity of brain edema [J]. Burns Trauma, 2021, 9: tkaa050.
- [15] MATSUDA M, HUH Y, JI R R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain [J]. J Anesth, 2019, 33(1): 131-139.
- [16] PECCHI E, PRIAM S, GOSSET M, et al. Induction of nerve growth factor expression and release by mechanical and inflammatory stimuli in chondrocytes: possible involvement in osteoarthritis pain [J]. Arthritis Res Ther, 2014, 16(1): R16.
- [17] KINNE R W, STUHLMÜLLER B, BURMESTER G R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(6): 224.
- [18] KEELER J L, PATSALOS O, CHUNG R, et al. Short communication: Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and association with pro-inflammatory cytokines in acute and recovered anorexia nervosa [J]. J Psychiatr Res, 2022, 150: 34-39.
- [19] LIAO L, ZHANG S, ZHAO L, et al. Acute synovitis after trauma precedes and is associated with osteoarthritis onset and progression [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(6): 970-980.

[收稿日期] 2023-10-29

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

