

N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节轴突再生的影响

<https://doi.org/10.12307/2022.405>

投稿日期: 2020-11-20

采用日期: 2021-01-09

修回日期: 2021-07-17

在线日期: 2021-08-05

中图分类号:

R459.9; R394.2; R745

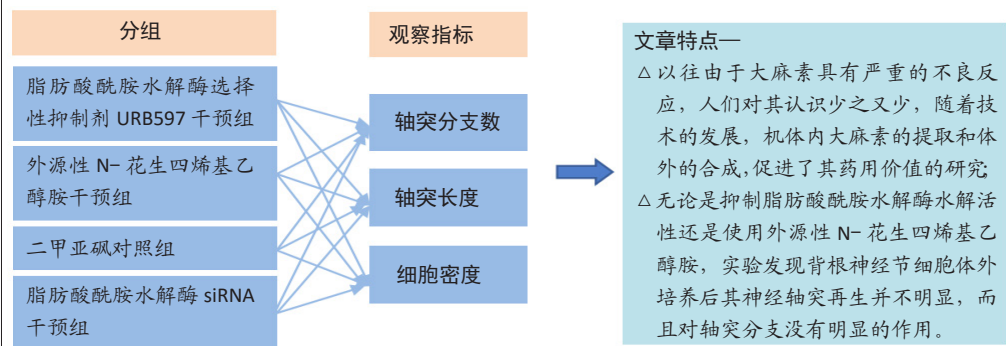
文章编号:

2095-4344(2022)25-03999-05

文献标识码: B

张浩楠¹, 王星然², 李梅梅², 马进进², 马艳霞², 赛吉拉夫^{1,2}

文章快速阅读:



文题释义:

背根神经节:是沿脊神经背脊根的卫星灰质单位。背根神经节位于椎间孔靠近背侧附近, 容纳假单极感觉神经元和卫星神经胶质细胞。

脂肪酸酰胺水解酶:是一种细胞内膜结合蛋白, 它的主要作用是作为N-花生四烯基乙醇胺的水解酶, 分解产物是花生四烯酸和乙醇胺。在神经系统中, 许多脂肪酸酰胺水解酶阳性神经元都靠近包含CB1大麻素受体的轴突末端, 主要负责N-花生四烯基乙醇胺的失活。

摘要

背景:神经轴突再生主要受其自身再生能力和抑制性外环境的影响, N-花生四烯基乙醇胺在秀丽线虫中已被证实可以调控神经轴突再生, 而在哺乳动物中的作用仍是未知。

目的:探究N-花生四烯基乙醇胺对小鼠背根神经节神经元轴突再生的作用。

方法:取6-8周龄ICR小鼠的L₄-L₅处背根神经节组织, 经过胶原酶和胰酶消化后, 分成脂肪酸酰胺水解酶选择性抑制剂URB597干预组、N-花生四烯基乙醇胺干预组、二甲亚砜对照组、电转绿色荧光蛋白与特异性脂肪酸酰胺水解酶siRNA混合物组。细胞经过3 d的体外培养后, 通过神经元特异性抗体免疫标记轴突, 测量轴突长度、初级分支和次级分支数量并对其进行统计, 判断N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节神经元轴突再生的调控作用。

结果与结论:①抑制脂肪酸酰胺水解酶活性后, 背根神经节细胞轴突再生没有明显的变化并且URB597对背根神经节神经元不具有细胞毒性作用($P > 0.05$); ②敲减脂肪酸酰胺水解酶后, 背根神经节细胞轴突再生没有明显的变化($P > 0.05$); ③外源性N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节细胞轴突再生没有明显的调控作用, 并且N-花生四烯基乙醇胺, 对背根神经节神经元细胞没有细胞毒性作用($P > 0.05$); ④无论是抑制脂肪酸酰胺水解酶活性还是加入外源性N-花生四烯基乙醇胺, 对背根神经节神经元轴突分支均没有影响($P > 0.05$)。

关键词:背根神经节; 神经元; N-花生四烯基乙醇胺; 脂肪酸酰胺水解酶; 轴突再生; 细胞毒性

Effect of N-arachidonyl ethanolamine on axon regeneration of the dorsal root ganglion

Zhang Haonan¹, Wang Xingran², Li Meimei², Ma Jinjin², Ma Yanxia², Saijilafu^{1,2}

¹First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; ²Institute of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Zhang Haonan, Master candidate, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Saijilafu, Professor, Doctoral supervisor, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China; Institute of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Co-corresponding author: Ma Yanxia, Master, Experimentalist, Institute of Orthopedics, Soochow University, Suzhou 215000, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Nerve axon regeneration is mainly affected by its own regenerative ability and inhibitory external environment. N-arachidonyl ethanolamine has been proven to regulate axon regeneration in *C. elegans*, but its role in mammals is still unknown.

OBJECTIVE: To explore the effect of N-arachidonyl ethanolamine on axon regeneration of mouse dorsal root ganglion neurons.

METHODS: Dorsal root ganglion tissues were taken from L₄-L₅ of ICR mice aged 6-8 weeks, digested with collagenase and trypsin, and divided into URB597 group, N-arachidonyl ethanolamine group, methylsulfoxide control group, and electroporated green fluorescent protein and specific siRNA mixture group. After 3 days of *in vitro* culture, the axons were labeled by neuron-specific immunoassay. Axon length, and the number of primary and secondary branches were measured, and the statistics was performed to determine the regulatory effect of N-arachidonyl ethanolamine on the regeneration of dorsal root ganglion neuron axon.

¹ 苏州大学附属第一医院, 江苏省苏州市 215000; ² 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215000

第一作者: 张浩楠, 男, 1993年生, 河南省郑州市人, 汉族, 苏州大学附属第一医院在读硕士, 主要从事骨与神经再生研究。

通讯作者: 赛吉拉夫, 特聘教授, 博士生导师, 苏州大学附属第一医院, 江苏省苏州市 215000; 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215000

共同通讯作者: 马艳霞, 硕士, 实验师, 苏州大学骨科研究所, 江苏省苏州市 215000

<https://orcid.org/0000-0003-2290-9808> (赛吉拉夫)

基金资助: 国家自然科学基金(81571189, 81772353), 项目负责人: 赛吉拉夫; 国家重点研发计划(2016YFC1100203), 项目负责人: 赛吉拉夫; 江苏省创新创业计划, 项目负责人: 赛吉拉夫

引用本文: 张浩楠, 王星然, 李梅梅, 马进进, 马艳霞, 赛吉拉夫. N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节轴突再生的影响[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(25):3999-4003.



RESULTS AND CONCLUSION: (1) After inhibiting fatty acid amide hydrolase activity, there was no obvious change in dorsal root ganglion cell axon regeneration and URB597 had no cytotoxic effect on dorsal root ganglion neuron cells ($P > 0.05$). (2) After fatty acid amide hydrolase knockdown, dorsal root ganglion cell axon regeneration had no obvious change ($P > 0.05$). (3) Exogenous N-arachidonyl ethanolamine had no obvious regulatory effect on dorsal root ganglion cell axon regeneration and N-arachidonyl ethanolamine had no cytotoxic effect on dorsal root ganglion neuron cells ($P > 0.05$). (4) Inhibiting fatty acid amide hydrolase activity or adding exogenous N-arachidonyl ethanolamine has no effect on dorsal root ganglion neuron axon branches ($P > 0.05$).

Key words: dorsal root ganglion; neurons; N-arachidonyl ethanolamine; fatty acid amide hydrolase; axon regeneration; cytotoxicity

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81571189, 81772353 (to Saijilafu); the National Key Research and Development Program, No. 2016YFC1100203 (to Saijilafu); an Innovation and Entrepreneurship Program of Jiangsu Province (to Saijilafu)

How to cite this article: ZHANG HN, WANG XR, LI MM, MA JJ, MA YX, SAIJILAFU. Effect of N-arachidonyl ethanolamine on axon regeneration of the dorsal root ganglion. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(25):3999-4003.

0 引言 Introduction

大麻素最先从植物中被提取出来，但是由于其巨大的不良反应，人们对它的作用知之甚微。但是，经过科技的不断发展，科学家们在动物和人体中都发现了相关的大麻素，并且成功分离出了 N-花生四烯基乙醇胺、2-花生四烯酸甘油、大麻素受体 1 和大麻素受体 2，继而大麻素系统的概念被正式提了出来^[1]，其药用价值也逐渐显现出来。例如：N-花生四烯基乙醇胺可以缓解由人类免疫缺陷病毒 1 型引起的细胞毒性作用^[2]；N-花生四烯基乙醇胺和 2-花生四烯酸甘油参与了干扰素 α 治疗丙型肝炎时免疫调节的不同阶段^[3]；N-花生四烯基乙醇胺可以抑制纹状体中 2-花生四烯酸甘油代谢和调节作用^[4]；改变大麻素信号通路可以有助于肥胖患者肠道通透性、炎症和肠降血糖素的变化^[5]。

N-花生四烯基乙醇胺和 2-花生四烯酸甘油广泛存在于神经系统，在此方面已有不同程度的研究，例如：N-花生四烯基乙醇胺可以通过调控交感型环氧化酶 2 信号通路改善胃排空延迟^[6]；N-花生四烯基乙醇胺可以调节神经性疼痛^[7]；抑制 2-花生四烯酸甘油降解可以改善口面神经痛^[8]；N-花生四烯基乙醇胺和 2-花生四烯酸甘油可以通过调节单胺信号通路，达到抗焦虑、抗惊厥的作用^[9]。

众所周知，不论是中枢神经还是外周神经损伤，其再生都是非常困难的，同样也是一直没有得到真正解决的难题。影响神经再生的因素主要表现在 2 个方面：神经自身再生能力弱和抑制性外环境。关于抑制性外环境的研究，在最近几年逐渐增多。有人发现，作为另一种经典的大麻素，2-花生四烯酸甘油有助于减少硫酸软骨素蛋白聚糖的聚集和促进髓鞘的再生^[10-11]，并且外源性 2-花生四烯酸甘油可以促进体外培养的海马神经元轴突再生^[12]。与 2-花生四烯酸甘油相同的是，N-花生四烯基乙醇胺可以通过调节离子通道 K1 活性介导星形胶质细胞的稳态功能来发挥其对中枢神经系统功能的调节作用^[13]。另外，周围神经损伤后可以引起神经末梢退化、巨噬细胞之类的炎性细胞浸润，继续加重神经损伤，在最新研究中，科学家们发现 N-花生四烯基乙醇胺的同类物 N-棕榈酰乙醇胺在炎症过程中发挥着重要的作用。用 N-棕榈酰乙醇胺处理夹伤后的坐骨神经， β -III 微管蛋白的表达显著增加并且明显降低了肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素 1 β 的表达，星形胶质细胞和小胶质细胞的活性也会随之降低，促凋亡蛋白酶 caspase-3 和 Bax 蛋白的表达显著降低而抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著增加，促进坐骨神经功能恢复^[14]。

在神经再生自身能力相关研究中，与瞬时受体电位 1 相

同的是瞬时受体电位 4，同样可以被 N-花生四烯基乙醇胺激活，人们发现，神经致病性瞬时受体电位 4 突变使瞬时受体电位 4 离子通道敏感，导致钙 / 钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 依赖性 Ca^{2+} 进入，这既破坏了线粒体轴突的运输又导致了轴突变性^[15]；由于神经营养因子对周围神经的重要性，瞬时受体电位 4 可以在未成熟的神经元中介导神经营养因子诱导神经生成^[16]。因此作者认为 N-花生四烯基乙醇胺可以通过瞬时受体电位 4 调控神经轴突再生。此外，尽管有研究报道 N-花生四烯基乙醇胺可以抑制秀丽线虫神经轴突再生^[17]，但是在哺乳动物神经轴突再生中的作用仍未可知。

背根神经节是沿脊神经背脊根的卫星灰质单位^[18]，位于椎间孔靠近背侧附近，容纳假单极感觉神经元和卫星神经胶质细胞。假单极神经元的特征是单个神经突分裂成一个外围过程，该过程携带着从外围目标到细胞体的体细胞和内脏输入，而一个中央过程则将感觉信息从细胞体提交到中枢神经系统，因此分为 2 根传入神经和 1 根传出神经。背根神经节可以支配周围组织和中枢神经系统^[19]。感觉神经元的周围神经末梢位于肌肉、皮肤、内脏器官和骨骼以及其他组织中，它们将周围的感觉信号传输到脊髓背角的神经末梢，然后信号通过不同的身体感觉上升途径传输到大脑。

利用背根神经节的本身位置特殊性可以建立中枢神经和外周神经之间的联系，可以短时间进行活体提取，并且保留完好的组织形态。感觉神经元已应用在生长发育、轴突再生和神经细胞凋亡等研究^[20-22]。因此，利用背根神经节研究感觉神经再生已有很多显著的成果^[23-25]。同时，背根神经节中的星形胶质细胞对于神经疼痛建立起着非常重要的作用^[26]，星形胶质细胞可以促进感觉神经元的再生^[27]。该研究通过背根神经节的体外培养来检验 N-花生四烯基乙醇胺是否对哺乳动物神经轴突再生具有调控作用。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞模型，背根神经节神经元轴突组织学实验。

1.2 时间及地点 2019 年 10 月至 2020 年 11 月在苏州大学附属第一医院骨科神经再生实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 成年 ICR 小鼠 12 只，雌雄各 6 只，SPF 级，体质量 25–35 g，购买于苏州大学动物中心，所有动物实验均遵守苏州大学动物伦理与使用委员会批准的实验方案进行处理。

1.3.2 实验试剂 胶原酶 A(Roche 公司)；MEM 培养基(Hyclone 公司)；层粘连蛋白(Sigma-Aldrich 公司)；多聚-D-赖氨酸

(Sigma-Aldrich 公司); 胎牛血清 (Gibco 公司); 5-氟-2'-脱氧尿苷 (Sigma-Aldrich 公司); 尿苷 (Sigma-Aldrich 公司); Triton X-100 (Sigma-Aldrich 公司); 胰酶 (Life Technology 公司); 牛血清白蛋白 (Biofroxx 公司); 青霉素/链霉素 (Sigma-Aldrich 公司); 脂肪酰胺水解酶抗体 (Abcam 公司); 脂肪酰胺水解酶 siRNA (上海吉玛公司); 小鼠抗 β -actin 抗体 (CST 公司); 小鼠抗神经元特异性 β -tubulin 抗体 (Tuj1 抗体, Sigma-Aldrich 公司); 多聚甲醛 (阿拉丁公司); N-花生四烯基乙醇胺 (CST 公司); 二甲亚砜 (Solar bio 公司)。

1.3.3 实验器材 Picospritzer III 压力注射系统 (Parker 公司); 毛细管显微注射针拉制仪 (NARISHIGE Group 公司); BTX 方波电穿孔仪 ECM830 (Harvard Apparatus 公司); 细胞培养皿 (Costar 公司); 圆形载玻片 (Costar 公司); 细胞培养箱 (Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 背根神经节组织提取 利用颈椎脱臼方法快速处死小鼠, 去除小鼠皮肤、内脏、头部、四肢和肌肉。留下完整的脊柱, PBS 洗去多余的血液, 平铺于手术台上, 于显微镜下暴露出椎体, 去除椎间盘, 刨开椎体暴露出背根神经节组织, 用显微剪去除相连神经和其余结缔组织, 只留下完整的背根神经节球形组织, 放入事先装有 MEM 培养基的 1.5 mL 离心管中。

1.4.2 层粘连蛋白铺板 将圆形载玻片放入 24 孔细胞培养板中, 紫外照射 30 min。将层粘连蛋白和多聚-D-赖氨酸混合, 以每孔 80 μ L 均匀加入 24 孔培养板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱中 2-4 h。

1.4.3 背根神经节细胞培养 弃掉 MEM 培养基, 加入提前制备好的胶原酶 A, 置于 37 $^{\circ}$ C 金属浴消化 90 min, 待消化结束后弃去胶原酶 A 换成胰酶, 继续 37 $^{\circ}$ C 金属浴消化 15 min, 期间将培养箱中包被好的 24 孔培养板用无菌 PBS 洗 3 遍, 之后去除胰酶, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 MEM 培养基终止消化并将组织清洗 3 遍, 第 3 遍时用 1 mL 枪头缓慢吹散背根神经节组织至无明显块状, 然后将细胞悬液进行离心 (700 r/min, 6 min), 弃上清, 用含体积分数为 5% 胎牛血清的 MEM 培养基缓慢吹散细胞沉淀, 根据所需细胞密度均匀种植于 24 孔培养板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱中培养 3 d。培养过程中分别加入 1.0, 5.0 μ mol/L 脂肪酰胺水解酶选择性抑制剂 URB597 以及 1.0, 5.0 μ mol/L 外源性 N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节细胞进行干预, 对照组使用二甲亚砜对背根神经节细胞进行干预。

1.4.4 背根神经节细胞体外电转染 如上所示步骤, 背根神经节细胞悬液离心后, 弃去上清, 实验组加入 100 μ L 电转液、绿色荧光蛋白质粒 (6 μ g) 和脂肪酰胺水解酶 siRNA 混合物, 对照组加入 100 μ L 电转液、绿色荧光蛋白质粒 (6 μ g) 和阴性对照 siRNA 混合物, 吹散沉淀, 迅速转移至电转杯中, 在 110 V, 10 ms, 间隔 400 ms, 重复 3 次的条件下进行电穿孔转染, 电转后的细胞均匀接种于 24 孔培养板, 置于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 细胞培养箱, 4 h 后换液, 而后继续培养 3 d。

1.4.5 Western blot 检测 siRNA 的敲减效率 收集上述电转后并接种于 24 孔细胞培养板中的背根神经节细胞, 吸弃培养

基, 加入 RIPA 缓冲液、磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂混合物裂解提取蛋白, 蛋白定量后 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 提取的蛋白样品进行 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯膜上, 用含有 5% 脱脂乳的 1 $\times$ TBS 封闭膜, 加入脂肪酰胺水解酶 (FAAH) 和内参蛋白 GAPDH 一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育 24 h, 然后与相应的二抗室温孵育 1 h, 使用 ECL 进行显影, Image Lab 软件对结果进行定量分析。

1.4.6 背根神经节细胞免疫荧光特异性染色 将培养好的背根神经节细胞从培养箱中取出, 吸去培养基, 加入 200 μ L 40 g/L 多聚甲醛固定 20 min, 去除多聚甲醛, PBS 洗 3 遍, 加入 2% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 之后在常温下用神经元特异性标记物 Tuj1 (1 : 1 500) 孵育 90 min, PBS 清洗 3 遍, 加入相应的免疫荧光二抗染色 60 min, PBS 洗 3 遍, 用防荧光猝灭剂进行封固。

1.4.7 背根神经节神经元轴突的测量、细胞密度及树突分支统计 将封固后的背根神经节细胞置于正置显微镜下拍摄, 用 AxioVision 4.72 软件测量轴突长度, 所选取的轴突必须大于其胞体直径的 2 倍, 同时统计每平方厘米中细胞的数量, 计算出细胞密度值, 最后统计神经元树突的初级分支和次级分支, 初级分支是从胞体发出的轴突, 而次级分支则为初级分支发出的分支, 每组统计 100 个神经元, 重复 3 次实验。

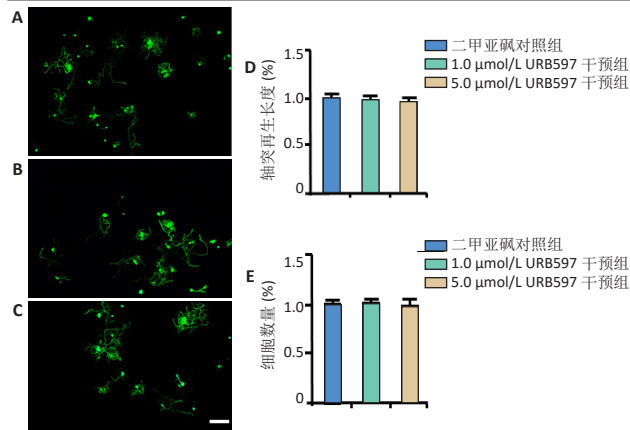
1.5 主要观察指标 ①神经元免疫荧光特异染色标记的轴突再生长度; ②神经元数量、树突分支统计。

1.6 统计学分析 所有数据以平均值 $\pm$ 标准误表示, 数据统计分析使用 GraphPad Prism 8.0 软件。用独立样本 t 检验确定两组间是否有差异, $P < 0.05$ 表示两组间差异有显著性意义。

2 结果 Results

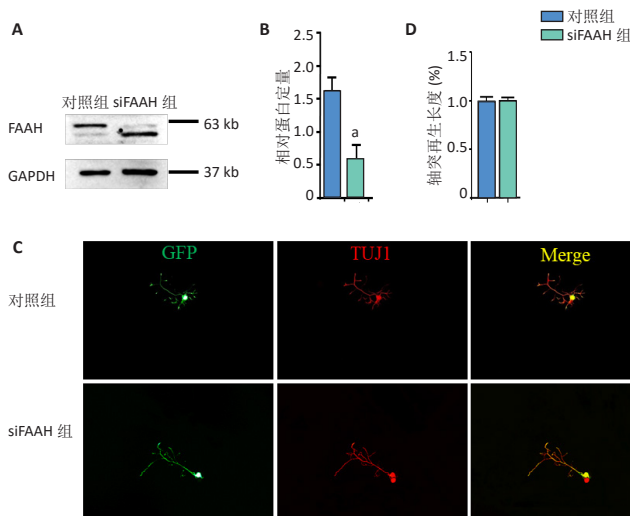
2.1 抑制脂肪酰胺水解酶活性对背根神经节细胞轴突再生的影响 脂肪酰胺水解酶选择性抑制剂 URB597 可以通过抑制脂肪酰胺水解酶活性提高小鼠神经系统中的 N-花生四烯基乙醇胺水平^[28], 因此在体外培养背根神经节神经元细胞时加入不同剂量的 URB597, 观察神经元轴突再生情况。选用 1.0 μ mol/L URB597 和 5.0 μ mol/L URB597 对背根神经节神经元细胞进行干预, 统计结果显示, URB597 处理后各组神经元轴突长度无明显差异 ($P > 0.05$), 见图 1A-C。对细胞密度进行统计, 结果显示 URB597 处理后背根神经节细胞数量并没有明显减少, 证明了 URB597 并无细胞毒性, 见图 1D, E。

2.2 敲减脂肪酰胺水解酶对背根神经节细胞轴突再生的影响 将绿色荧光蛋白质粒和脂肪酰胺水解酶特异性 siRNA 混合物通过电穿孔技术转染到体外培养的背根神经节神经元细胞内^[25, 29], 利用 siRNA 敲减使脂肪酰胺水解酶的表达水平降低, Western blot 检测 siRNA 的敲减效率, 结果显示所用 siRNA 达到了使脂肪酰胺水解酶蛋白表达降低的效果 ($P < 0.05$), 见图 2A, B。此外, 转染成功的背根神经节神经元细胞表达绿色荧光, 统计结果显示, 敲减脂肪酰胺水解酶后背根神经节神经元轴突再生情况并无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 2C, D。



图注: 图中A为二甲亚砜对照组背根神经节神经元细胞免疫荧光染色 (标尺为 100 μm); B, C 为脂肪酸酰胺水解酶选择性抑制剂 URB597 干预组背根神经节神经元细胞免疫荧光染色 (标尺为 100 μm), 抑制剂浓度分别为 1.0 μmol/L 和 5.0 μmol/L; D 为神经元轴突长度统计分析; E 为背根神经节神经元细胞存活数量统计分析

图 1 | 抑制脂肪酸酰胺水解酶活性对背根神经节细胞轴突再生的影响
Figure 1 | Effect of inhibiting fatty acid amide hydrolase activity on axon regeneration of dorsal root ganglion cells

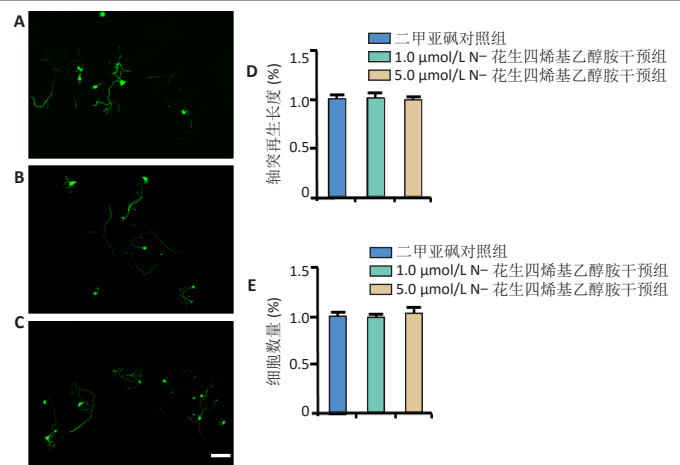


图注: 图中A为背根神经节神经元细胞中脂肪酸酰胺水解酶蛋白表达量; B 为图 A 的统计结果, 与对照组比较, $^aP < 0.05$; C 为绿色荧光蛋白标记 (绿色) 和 TUJ1 标记 (红色) 的背根神经节神经元轴突, 橙色为两者合成图像, 图中标尺为 100 μm; D 为 C 图像中背根神经节神经元轴突长度统计分析

图 2 | 敲减脂肪酸酰胺水解酶 (FAAH) 对背根神经节细胞轴突再生的影响

Figure 2 | Axon regeneration in dorsal root ganglion cells after knocking down fatty acid amide hydrolase

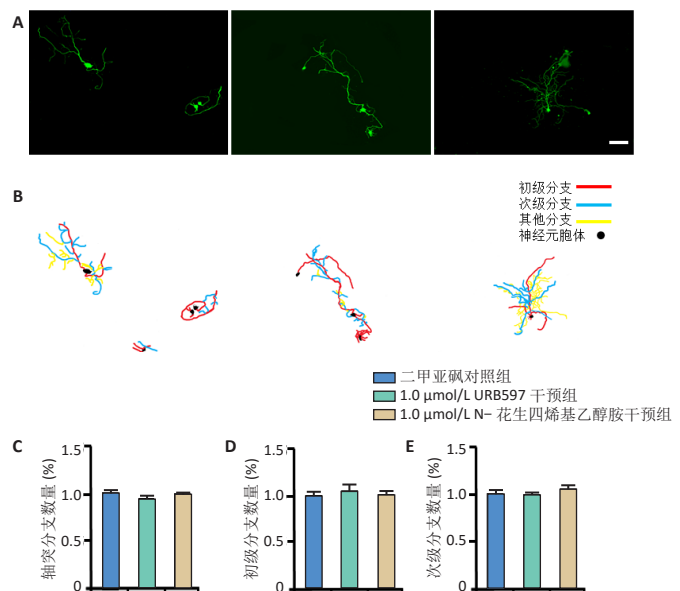
2.3 外源性 N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节轴突再生的影响 鉴于前面的结果, 进一步使用外源性 N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节细胞进行干预。选用 1.0 μmol/L N-花生四烯基乙醇胺和 5.0 μmol/L N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节神经元细胞进行干预, 统计结果显示, 外源性 N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节神经元轴突无明显的作用 ($P > 0.05$), 见图 3A-D。对细胞密度进行了统计, 结果显示经 N-花生四烯基乙醇胺干预后背根神经节神经元细胞数量并没有减少, 证明了外源性 N-花生四烯基乙醇胺并无细胞毒性作用 ($P > 0.05$), 见图 3E。



图注: 图中A为二甲亚砜对照组背根神经节神经元细胞免疫荧光染色 (标尺为 100 μm); B, C 为外源性 N-花生四烯基乙醇胺干预组背根神经节神经元细胞免疫荧光染色 (标尺为 100 μm), N-花生四烯基乙醇胺浓度分别为 1.0 μmol/L 和 5.0 μmol/L; D 为神经元轴突长度统计分析; E 为背根神经节神经元细胞存活数量统计分析

图 3 | 外源性 N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节细胞轴突再生的影响
Figure 3 | Effect of exogenous N-arachidonylethanolamine on axon regeneration of dorsal root ganglion cells

2.4 N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节树突分支的影响 统计背根神经节神经元细胞初级分支和次级分支的数量, 结果显示, 经过 URB597 和外源性 N-花生四烯基乙醇胺干预后背根神经节神经元细胞分支数量和对照组相比并无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 4。



图注: 图中A从左到右分别为二甲亚砜对照组、1.0 μmol/L URB597 组和 1.0 μmol/L N-花生四烯基乙醇胺组背根神经节神经元轴突免疫荧光染色 (标尺为 100 μm); B 从左到右分别对应 A 图轴突的模式图, 其中红色代表初级分支, 蓝色代表次级分支, 黄色代表其余分支, 黑色代表细胞胞体; C 为 A 图中所有轴突分支数量统计分析; D 为 A 图中轴突初级分支数量统计分析; E 为 A 图中轴突次级分支数量统计分析

图 4 | N-花生四烯基乙醇胺对背根神经节细胞轴突分支的影响
Figure 4 | Effects of N-arachidonylethanolamine on axon branching of dorsal root ganglion cells

3 讨论 Discussion

该研究发现 N- 花生四烯基乙醇胺对背根神经节神经元轴突的再生并无明显影响。然而正如之前所说, 同样作为重要的内源性大麻素, 2- 花生四烯酸甘油却能达到促进神经轴突再生的作用, 并且发现 TAPIA 等^[12] 利用的是胎鼠海马神经元作为实验对象从而达到其实验结果。众所周知, 由于胎鼠和成年的发育阶段不同, 中枢神经元和外周神经元调控机制不同, 得出的实验结果不同, 因此有理由怀疑 N- 花生四烯基乙醇胺对胎鼠的中枢神经元轴突再生具有另外的作用。

此外, 相比于 PASTUHOV 等^[17] 在秀丽线虫上的实验, 作者所进行的研究依然有很大的不足, 并没有真正意义上在体外进行神经元轴突切断。因为神经元轴突损伤后, 一些相关基因会上调, 而调控 N- 花生四烯基乙醇胺的脂肪酸酰胺水解酶同样如此^[30]。基因调控神经元轴突再生的作用主要是发生于转录阶段或轴突远端的微管组装阶段^[31], 因此实验结果可能证明了 N- 花生四烯基乙醇胺在基因转录阶段并不发挥调控背根神经节神经元轴突再生的作用, 需要进一步在体外实验中建立可靠的轴突切断模型, 判断 N- 花生四烯基乙醇胺是否可以通过微管组装调控背根神经节神经元轴突的再生。

在整个大麻素系统中, 有 2 种典型的受体: 大麻素受体 1 和大麻素受体 2, 而 N- 花生四烯基乙醇胺具有大麻素受体 1 高度亲和性。已有研究表明, 大麻素受体 1 激活可以促进神经突生长^[14]; 大麻素受体 1 可以减轻神经退行性病变, 增加下游基因 Rasgef1c 和 Egr1 的 mRNA 表达, 同时改善大鼠的运动功能^[32]。

综上所述, 无论是中枢神经还是周围神经、成熟还是未成熟神经, 在其发生病变时, N- 花生四烯基乙醇胺或大麻素系统才会发挥着重要的作用, 这可能和其需求表达模式有关^[33]。该研究依然可以看到很大的不足之处, 但是, 在哺乳动物中论证了 N- 花生四烯基乙醇胺对背根神经节神经轴突的调控作用。整个大麻素系统是一个非常复杂的调节系统, 在神经轴突再生领域中应该是一个非常值得研究的新领域。

作者贡献: 实验设计为张浩楠, 实验实施为张浩楠和王星然, 实验评估为赛吉拉夫, 资料收集为马艳霞和李梅梅。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金(81571189, 81772353)”“国家重点研发计划(2016YFC1100203)”及“江苏省创新创业计划”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经苏州大学附属第一医院动物实验伦理委员会批准, 批准号为 SUDA20201216A01。实验过程遵循了国际兽医伦理学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已进行专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发表稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过赛吉拉夫教授审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] ZOU S, KUMAR U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):833.

- [2] KRISHNAN G, CHATTERJEE N. Differential immune mechanism to HIV-1 Tat variants and its regulation by AEA [corrected]. *Sci Rep.* 2015;5:9887.
- [3] ZAJKOWSKA Z, BORSINI A, NIKKHESLAT N, et al. Differential effect of interferon-alpha treatment on AEA and 2-AG levels. *Brain Behav Immun.* 2020;90:248-258.
- [4] MACCARRONE M, ROSSI S, BARI M, et al. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci.* 2008;11(2):152-159.
- [5] LITTLE TJ, CVIJANOVIC N, DIPATRIZIO NV, et al. Plasma endocannabinoid levels in lean, overweight, and obese humans: relationships to intestinal permeability markers, inflammation, and incretin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2018;315(4):E489-E495.
- [6] LI H, YIN J, ZHANG Z, et al. Auricular vagal nerve stimulation ameliorates burn-induced gastric dysmotility via sympathetic-COX-2 pathways in rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2016;28(1):36-42.
- [7] MALEK N, KUCHARCZYK M, STAROWICZ K. Alterations in the anandamide metabolism in the development of neuropathic pain. *Biomed Res Int.* 2014;2014:686908.
- [8] KAMIMURA R, HOSSAIN MZ, UNNO S, et al. Inhibition of 2-arachidonoylglycerol degradation attenuates orofacial neuropathic pain in trigeminal nerve-injured mice. *J Oral Sci.* 2018;60(1):37-44.
- [9] OAKES MD, LAW WJ, CLARK T, et al. Cannabinoids Activate Monoaminergic Signaling to Modulate Key C. elegans Behaviors. *J Neurosci.* 2017;37(11):2859-2869.
- [10] FELIÚ A, BONILLA DEL RÍO I, CARRILLO-SALINAS FJ, et al. 2-Arachidonoylglycerol Reduces Proteoglycans and Enhances Remyelination in a Progressive Model of Demyelination. *J Neurosci.* 2017;37(35):8385-8398.
- [11] MECHA M, YANGUAS-CASAS N, FELIÚ A, et al. The endocannabinoid 2-AG enhances spontaneous remyelination by targeting microglia. *Brain Behav Immun.* 2019;77:110-126.
- [12] TAPIA M, DOMINGUEZ A, ZHANG W, et al. Cannabinoid Receptors Modulate Neuronal Morphology and AnkyrinG Density at the Axon Initial Segment. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:5.
- [13] WOOLUMS BM, MCCRAY BA, SUNG H, et al. TRPV4 disrupts mitochondrial transport and causes axonal degeneration via a CaMKII-dependent elevation of intracellular Ca2+. *Nat Commun.* 2020;11(1):2679.
- [14] HE JC, GOMES I, NGUYEN T, et al. The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem.* 2005;280(39):33426-33434.
- [15] JANG Y, JUNG J, KIM H, et al. Axonal neuropathy-associated TRPV4 regulates neurotrophic factor-derived axonal growth. *J Biol Chem.* 2012;287(8):6014-6024.
- [16] GUGLIANDOLO E, D'AMICO R, CORDARO M, et al. Effect of PEA-OXA on neuropathic pain and functional recovery after sciatic nerve crush. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):264.
- [17] PASTUHOV SI, FUJIKI K, NIX P, et al. Endocannabinoid-Gqα signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing Gqα-PKC-JNK signalling. *Nat Commun.* 2012;3:1136.
- [18] FORNARO M, SHARTHIYA H, TIWARI V. Adult Mouse DRG Explant and Dissociated Cell Models to Investigate Neuroplasticity and Responses to Environmental Insults Including Viral Infection. *J Vis Exp.* 2018;(133):56757.
- [19] LIN YT, CHEN JC. Dorsal Root Ganglia Isolation and Primary Culture to Study Neurotransmitter Release. *J Vis Exp.* 2018;(140):57569.
- [20] MALIN SA, DAVIS BM, MOLLIVER DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc.* 2007;2(1):152-160.
- [21] DAVIES A, LUMSDEN A. Relation of target encounter and neuronal death to nerve growth factor responsiveness in the developing mouse trigeminal ganglion. *J Comp Neurol.* 1984;223(1):124-137.
- [22] LINDWALL C, KANJE M. The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons. *Exp Neurol.* 2005;196(1):184-194.
- [23] MA JJ, JU X, XU RJ, et al. Telomerase Reverse Transcriptase and p53 Regulate Mammalian Peripheral Nervous System and CNS Axon Regeneration Downstream of c-Myc. *J Neurosci.* 2019;39(46):9107-9118.
- [24] SAIJILAFU, ZHANG BY, ZHOU FQ. In vivo ectoporation of adult mouse sensory neurons for studying peripheral axon regeneration. *Methods Mol Biol.* 2014;1162:167-175.
- [25] ZHANG BY, SAIJILAFU, LIU CM, et al. Akt-independent GSK3 inactivation downstream of PI3K signaling regulates mammalian axon regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(2):743-748.
- [26] COSTA FA, MOREIRA NETO FL. Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2015;65(1):73-81.
- [27] AVRAHAM O, DENG PY, JONES S, et al. Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nat Commun.* 2020;11(1):4891.
- [28] BAI J, LIU F, WU LF, et al. Attenuation of TRPV1 by AMG-517 after nerve injury promotes peripheral axonal regeneration in rats. *Mol Pain.* 2018;14:1744806918777614.
- [29] WINKLER K, RAMER R, DITHMER S, et al. Fatty acid amide hydrolase inhibitors confer anti-invasive and antimetastatic effects on lung cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(12):15047-15064.
- [30] LEVER IJ, ROBINSON M, CIBELLI M, et al. Localization of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase in rat dorsal root ganglion cells and its regulation after peripheral nerve injury. *J Neurosci.* 2009;29(12):3766-3780.
- [31] SAIJILAFU, HUR EM, LIU CM, et al. PI3K-GSK3 signalling regulates mammalian axon regeneration by inducing the expression of Smad1. *Nat Commun.* 2013;4:2690.
- [32] HE XL, YANG L, WANG ZJ, et al. Solid lipid nanoparticles loading with curcumin and dexanabol to treat major depressive disorder. *Neural Regen Res.* 2021;16(3):537-542.
- [33] PACHER P, BÁTKEI S, KUNOS G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):389-462.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)