

·基础研究·

大鼠脊髓背角 TRPV4 在背根神经节持续受压致神经病理性疼痛中的作用*

张 晓¹ 曲玉娟¹ 贾 磊¹ 滕永波¹ 岳寿伟^{1,2}

摘要

目的:探讨大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)持续受压(chronic compression of right side dorsal root ganglion, CCD)后脊髓背角瞬时感受器电位离子通道4(TRPV4)基因及蛋白变化,明确脊髓背角 TRPV4 在 CCD 致神经病理性疼痛中的作用。

方法:采用健康成年雄性 Wistar 大鼠,共 36 只,随机分为 3 组,分别为空白对照组、CCD 手术组、CCD+钉红组。制备大鼠背根神经节持续受压模型,于术前 1 天、术后第 7 天、给药前及给药 2h 后,测量大鼠机械刺激缩爪反应阈值,观察机械痛阈的变化;利用 RT-PCR 及 Western Blot 技术检测各组大鼠手术侧脊髓背角 TRPV4 基因及蛋白表达的变化。

结果:与空白对照组相比,术后第 7 天,CCD 组大鼠术侧机械痛阈值明显下降($P < 0.001$),同侧脊髓背角 TRPV4 基因及蛋白表达升高($P < 0.05$);与给药前相比,给予钉红 2h 后,术侧机械痛阈值明显升高($P < 0.001$),同侧脊髓背角 TRPV4 基因及蛋白表达下降($P < 0.05$)。

结论:CCD 后大鼠术侧机械痛阈下降,脊髓背角 TRPV4 基因及蛋白表达升高;钉红可部分逆转 CCD 后痛觉过敏,部分降低脊髓背角 TRPV4 基因及蛋白表达。脊髓背角 TRPV4 参与 CCD 后大鼠神经病理性疼痛形成。

关键词 背根神经节;脊髓背角;瞬时感受器电位离子通道;神经病理性疼痛

中图分类号:R744,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-02-0156-05

The role of TRPV4 in spinal cord dorsal horn in the neuropathic pain in Chronic compression of right side dorsal root ganglion model of rat/ZHANG Xiao, QU Yujuan, JIA Lei, et al//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(2): 156—160

Abstract

Objective: To investigate the alternation of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein and gene expression in spinal cord dorsal horn in chronic compression of the dorsal root ganglion model of rats, and the role of TRPV4 in neuropathic pain.

Method: Chronic compression of right side dorsal root ganglion(CCD) model was established in 36 healthy adult male Wistar rats and randomly divided into three groups: normal, CCD and CCD+RR (ruthenium red). At 1 day before and 7 days after operation, before and 2 hours after giving ruthenium red, the paw withdrawal mechanical pain thresholds of right side were taken; The alternation of TRPV4 gene and protein expression in right side spinal cord dorsal horn was detected with RT-PCR and Western-Blot technique.

Result: Comparing with the normal group, the mechanical pain threshold of operation side in CCD group significantly decreased ($P < 0.001$) and the TRPV4 gene and protein expression increased ($P < 0.05$) in the ipsilateral spinal cord dorsal horn on 7 days after CCD operation. Comparing with the ruthenium red giving before,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.02.006

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81372123)

1 山东大学齐鲁医院康复科,济南,250012; 2 通讯作者

作者简介:张晓,男,硕士研究生; 收稿日期:2015-10-16

2 hours after giving, the mechanical pain threshold of operation side increased ($P < 0.001$) and the TRPV4 gene and protein expression decreased ($P < 0.05$) in the ipsilateral spinal cord dorsal horn significantly.

Conclusion: The mechanical pain threshold of operation side decreased after CCD operation and the TRPV4 gene and protein expression increased in the spinal cord dorsal horn. Ruthenium red can partially inverse hyperalgesia after CCD, and lower the TRPV4 gene and protein expression in spinal cord dorsal horn. The TRPV4 of spinal cord dorsal horn takes part in the formation of neuropathic pain after CCD in rat.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, 250012

Key word dorsal root ganglion; spinal dorsal horn; transient receptor potential vanilloid; neuropathic pain

当今社会神经病理性疼痛已成为严重危害人类健康的世界性难题。据统计,目前全世界患病人数以百万计^[1-3],给患者的生活带来严重影响。目前针对其发病机制的研究存在多种动物模型,其中背根神经节持续受压(chronic compression of the dorsal root ganglion, CCD)模型是一种常见的神经病理性疼痛模型,可以很好地模拟椎间盘突出导致的根性神经痛症状。CCD后大鼠能够产生自发性疼痛、痛觉过敏等现象^[4-5]。瞬时感受器电位离子通道家族中香草素受体亚家族4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)是一种非选择性阳离子通道,具有机械敏感性,广泛分布于动物脑、背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)、肾和肺等组织。本课题组前期研究发现,CCD后大鼠背根神经节神经元TRPV4基因及蛋白表达明显增加,TRPV4参与CCD导致神经病理性疼痛的外周机制^[6]。脊髓背角是接受外周伤害性信息并向上位脑结构传递的中继站,还是调制伤害性信息传递的脑干下行抑制/易化系统的投射纤维的终止部位,在伤害性信息的传递和调制过程中发挥着重要的作用。目前针对CCD后脊髓背角TRPV4与神经病理性疼痛的关系的研究相对较少,因此,本研究探讨CCD后大鼠脊髓背角TRPV4基因及蛋白变化,以明确脊髓背角TRPV4在CCD致神经病理性疼痛中的作用,以期为今后神经病理性疼痛的治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SPF级健康成年雄性Wister大鼠36只,体重为200—220g,购自山东大学动物实验中心。大鼠室温、常湿饲养,普通饮食、自由饮水。随机分为空白对照组、CCD手术组、CCD+钆红组,每组各12只。

1.2 实验主要试剂及仪器

反转录试剂盒ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit(东洋纺,日本)、PCR试剂盒SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix(东洋纺,日本),引物,Tgradient 96反转录仪,lightcycler 2.0型实时定量PCR仪(Roche公司,瑞士);总蛋白提取试剂盒(上海贝博生物),TRPV4兔抗大鼠一抗(1:500, Abcam, Cambridge, UK), β -Tubulin兔抗大鼠一抗(1:3,000, CST, USA),山羊抗兔二抗(1:8,000,北京中杉金桥生物技术有限公司),一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司),HRP化学发光试剂盒(1:1, USA);钆红(sigma, GER),BME-404型电子式机械测痛仪(中国医学科学院生物工程研究所)。

1.3 CCD模型的制备

参考胡三觉等^[4]制作CCD模型的方法:腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉大鼠,腰背部剃毛,75%酒精消毒皮肤,铺无菌洞巾。沿两侧髂棘连线正中向上做一约2cm皮肤切口,分离右侧椎旁肌肉,充分暴露右侧L4、L5椎体横突及椎间孔,将直径0.63mm“L”形棒的长端沿L4及L5椎间孔的前壁与脊柱斜向上成30°角插入椎间孔内,短端置于椎间孔外。术后用生理盐水冲洗切口,依次缝合肌肉、腰背筋膜和皮肤,腹腔注射青霉素40万单位预防感染。排除术后出现肢体瘫痪的大鼠,术后第7天于L5/L6椎间隙鞘内注射给药。

1.4 大鼠机械刺激缩爪反应阈值测量

分别于术前1天、术后第7天、术后第7天鞘内注射给药2h后测量各实验组大鼠机械刺激缩爪反应阈值。方法如下:大鼠于红色半透明玻璃箱内适应环境30min后,使用BME-404型电子式机械测痛仪测量大鼠右后肢缩爪反应阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)。透过玻璃箱底部网格层以针

刺端垂直刺激大鼠后肢足底第三、四趾间皮肤,大鼠出现缩爪或舔足现象视为阳性,记录刺激数值(G),每次刺激间隔5min,连续测5次,取其平均值作为统计变量。

1.5 动物组织取材

术后第7天,CCD+钉红组大鼠鞘注10 μ l钉红(10 μ mol/L)2h后进行机械刺激缩爪反应阈值测量,然后将全部大鼠处死取材:腹腔注射戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉大鼠,开胸,200ml预冷生理盐水经左心室快速灌注,冰上快速取出L4及L5节段脊髓,-80 $^{\circ}$ C冰箱保存。

1.6 实时荧光定量PCR

取L4及L5节段脊髓组织,1 \times PBS清洗、修剪后,中间纵切,取右侧脊髓采用Trizol法提取组织总mRNA,紫外分光光度计测量RNA浓度,按照TOYOBO公司ReverTra Ace[®] qPCR RT Kit说明书进行逆转录反应,将逆转录产物cDNA -20 $^{\circ}$ C保存备用;取1 μ g cDNA,按照TOYOBO公司SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix说明书进行操作,应用Roche公司Lightcycler 2.0型实时定量PCR仪进行。

TRPV4引物序列为:

Forward: 5'-AAGTGGCGTAAGTTCGGG-3'

Reverse: 5'-TAAGGGTAGGGTGGCGTG-3'

GAPDH引物序列为:

Forward: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

Reverse: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGG-3'

扩增条件:预变性95 $^{\circ}$ C 30s;变性95 $^{\circ}$ C 5s,退火56 $^{\circ}$ C 10s,共40个循环;延伸72 $^{\circ}$ C 15s。扩增完毕进行溶解曲线分析,记录各管中CT值。实验结果采用2^{- Δ CT}方法进行分析。

1.7 Western blot

取L4及L5节段脊髓组织,1 \times PBS清洗、修剪后,中间纵切,取右侧脊髓提取组织总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,每组蛋白样本加入1/4倍体积5 \times 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C,6—8min使蛋白变性,取适量蛋白样品进行SDS-PAGE凝胶电泳,蛋白转印至0.45nm PVDF膜上后,5%脱脂牛奶封闭。一抗孵育,4 $^{\circ}$ C摇床上过夜。TBST洗膜3次,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1.5h,再次用TBST洗膜3次,加入新鲜配制HRP化学发光试剂,FcluroChem9900成

像系统显影。采用ImageJ软件进行结果分析。

1.8 统计学分析

采用Graphpad 5.0版统计学软件进行数据分析,所有数据采用均数 \pm 标准差形式表示。机械痛阈及Western blot光密度分析结果采用组间比较单因素方差分析方法进行比较。

2 结果

2.1 大鼠背根神经节持续受压后机械痛阈变化

于术前1天、术后第7天、术后第7天鞘注给药2h后,测量大鼠机械刺激缩爪反应阈值,观察机械痛阈的变化。与空白组相比,CCD后第7天,大鼠术侧机械痛阈明显下降($P < 0.001$)。与给药前相比,鞘注TRPV4抑制剂钉红后2h,CCD+钉红组大鼠术侧机械痛阈明显升高($P < 0.001$)。见表1。

2.2 大鼠背根神经节持续受压后脊髓背角TRPV4蛋白表达变化

CCD后第7天测试完机械痛阈后取材。与空白组比较,CCD后第7天,术侧脊髓背角TRPV4蛋白表达明显升高($n=6, P < 0.001$)。与给药前相比,鞘注TRPV4抑制剂钉红后2h,CCD+钉红组大鼠术侧脊髓背角TRPV4蛋白表达明显下降($n=6, P < 0.05$)。见图1。

2.3 大鼠背根神经节持续受压后脊髓背角TRPV4基因表达变化

CCD后第7天测试完机械痛阈后取材。与空白组比较,CCD后第7天,术侧脊髓背角TRPV4基因表达明显升高($n=6, P < 0.05$)。与给药前相比,鞘注TRPV4抑制剂钉红后2h,CCD+钉红组大鼠术侧脊髓背角TRPV4基因表达明显下降($n=6, P < 0.05$)。见图2。

3 讨论

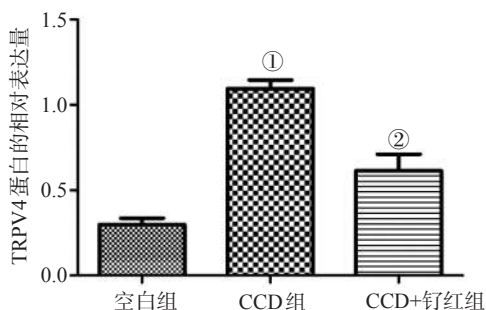
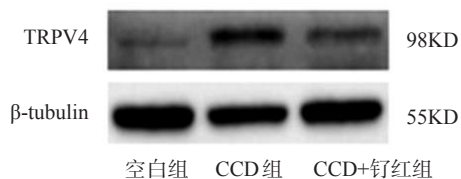
瞬时感受器电位离子通道(transient receptor potential channel, TRP)广泛分布于高等动物组织

表1 各组大鼠机械痛阈变化 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	例数	大鼠机械痛阈
空白组	12	32.60 \pm 6.41
CCD组	12	22.01 \pm 6.94 ^①
CCD+钉红组	12	31.18 \pm 5.04 ^②

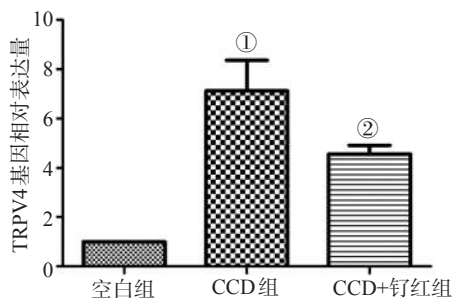
与空白组相比:① $P < 0.001$;与CCD组相比:② $P < 0.001$

图1 Western blot检测大鼠术侧脊髓背角 TRPV4蛋白表达



与空白组相比:① $P < 0.001$;与CCD组相比:② $P < 0.05$

图2 RT-PCR检测大鼠术侧脊髓背角 TRPV4基因表达



与空白组相比:① $P < 0.05$;与CCD组相比:② $P < 0.05$

器官内^[7]。研究表明,TRP通道可能参与了视觉、听觉、味觉、触觉和痛觉等不同感觉信号转导过程。TRPV4属TRP香草素受体亚家族成员,在DRG神经元胞膜、胞浆和胞核中均有表达^[8]。TRPV4是一种多觉感受器,可被酸、机械牵张力、低渗透压、花生四烯酸和4 α -佛波酯等激活^[9-11]。有研究发现,与野生型小鼠相比,TRPV4基因敲除小鼠表现为对伤害性的机械刺激痛阈值明显升高,提示TRPV4可能参与了机械性痛的产生^[12]。另有研究发现,对某些癌痛诱导剂如紫杉醇、长春新碱等诱导的机械痛敏,TRPV4基因敲除小鼠表现为痛觉敏感度降低^[11]。鞘内注射TRPV4的反义寡核苷酸后,紫杉醇诱导的神

经病理性痛模型大鼠表现为机械刺激痛阈值明显升高^[13]。

背根神经节持续受压模型是一种常见的神经病理性疼痛模型,可以很好地模拟临床上由椎间盘突出等导致的根性神经痛现象。本课题组前期研究发现^[6],CCD后DRG神经元TRPV4基因及蛋白表达明显升高,同时术侧机械刺激痛阈值明显下降,提示TRPV4可能参与CCD后痛觉过敏的外周机制。我们研究还发现,TRPV4反义核苷酸干扰仅可部分逆转CCD导致的机械刺激痛阈值的降低,提示CCD后病理性神经痛的发生还存在其他机制。目前普遍认为,虽然外周及中枢敏化共同参与和介导了神经病理性疼痛的发生,但是越来越多的研究表明,中枢敏化在神经病理性疼痛中的作用似乎更为重要。部分学者认为^[14],组织受损后,初级伤害性感受器神经元外周末梢释放的5-HT、缓激肽、花生四烯酸、脂质代谢物、核苷酸、神经生长因子等物质与相应受体或离子通道作用后,导致许多胞内信号通路的活化,引起初级伤害感受性神经元的敏感性和兴奋性增加,形成外周敏化。另有研究发现,电刺激已麻醉的受损组织,仍可以出现痛觉过敏和痛觉超敏现象^[15],说明中枢敏化似乎起着更加重要的作用。中枢敏化是指脊髓及脊髓以上结构(如丘脑、脑干、大脑皮质)对疼痛信号的放大。中枢敏化发生时脊髓背角出现神经元敏化、中间神经元抑制性作用减弱、A β 传入纤维出芽等变化。疼痛信号的传导起始于DRG内伤害性感受器神经元外周端,以神经冲动的形式经中枢端将疼痛信号传递至脊髓背角,而后脊髓背角通过相应中间神经元进一步将伤害性信息上传至丘脑和大脑,加工整合后产生痛觉。整个过程脊髓背角起着放大及初步整合痛觉信号的作用,是痛觉传递通路的重要环节。同时脊髓背角还可作为某些临床药物的作用靶点,如阿片受体激动剂吗啡通过激动位于大脑和脊髓背角突触前和突触后受体,产生强效镇痛作用。我们前期的研究重点主要为CCD后大鼠痛敏的外周机制,未对其中枢敏化机制做进一步探讨。当前已有研究发现^[16],预先鞘内注射TRPV1抑制剂后,树脂毒素致痛模型大鼠脊髓背角TRPV1表达上调的同时大鼠热痛阈升高得到延缓,提示脊髓背角TRPV1可能与树脂毒素致痛模型大

鼠神经痛的形成相关。TRPV1和TRPV4都属于TRP家族,氨基酸序列同源性较高^[17],二者的生物活性具有较高的统一性。且我们通过预实验研究发现,CCD后4—14天,大鼠机械痛阈值明显下降,其中4—7天下降最明显。术后4—7天,手术侧脊髓背角TRPV4表达明显升高,该研究提示脊髓背角TRPV4可能参与介导CCD后神经病理性疼痛。因此,本实验采用钉红对脊髓背角TRPV4进行干预,进一步探讨TRPV4与神经病理性疼痛的关系,以期神经病理性疼痛机制研究提供新思路。实验结果显示,CCD后7天大鼠术侧机械刺激痛阈值较正常组明显下降,TRPV4在基因水平及蛋白表达水平均明显增加;给予TRPV4抑制剂钉红2h后,可部分逆转CCD导致的机械刺激痛阈值下降,且TRPV4基因及蛋白表达明显减少。综上所述,脊髓背角内TRPV4参与介导CCD后神经病理性疼痛的中枢敏化。

本研究仅阐述了脊髓背角内TRPV4参与介导CCD后神经病理性疼痛的发生,对其具体的上下游分子机制仍需做进一步探讨。

参考文献

[1] Dworkin RH, Malone DC, Panarites CJ, et al. Impact of postherpetic neuralgia and painful diabetic peripheral neuropathy on health care costs[J]. *J Pain*, 2010, 11(4):360—368.

[2] Jeon Y, Kim CE, Jung D, et al. Curcumin could prevent the development of chronic neuropathic pain in rats with peripheral nerve injury[J]. *Curr Ther Res Clin Exp*, 2013, (74): 1—4.

[3] Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes[J]. *Neurology*, 2008, 70(18):1630—1635.

[4] Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat[J]. *Pain*, 1998, 77(1):15—23.

[5] Song XJ, Hu SJ, Greenquist KW, et al. Mechanical and thermal hyperalgesia and ectopic neuronal discharge after

chronic compression of dorsal root ganglia[J]. *J Neurophysiol*, 1999, 82(6):3347—3358.

[6] 张杨,王永慧,丁欣利,等. TRPV4在介导大鼠背根神经节持续受压后机械和热痛敏中的作用[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(12):1123—1130.

[7] Montell C. Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels[J]. *Sci STKE*, 2001, 2001(90): re1.

[8] Mutai H, Heller S. Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors[J]. *Cell Calcium*, 2003, 33(5—6):471—478.

[9] Costigan M, Befort K, Karchewski L, et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury[J]. *BMC Neurosci*, 2002, (3):16.

[10] Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels[J]. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(6):1262—1279.

[11] Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, et al. Interaction of transient receptor potential vanilloid 4, integrin, and SRC tyrosine kinase in mechanical hyperalgesia[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(5):1046—1057.

[12] Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13698—13703.

[13] Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain[J]. *Neuroscience*, 2011, (193):440—451.

[14] Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception[J]. *Nature*, 2001, 413(6852):203—210.

[15] Seybold VS. The role of peptides in central sensitization [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, (194):451—491.

[16] 吴楠,张丹龙,衡立军,等. TRPV1与pJNK在树脂毒素致痛模型大鼠脊髓背角的表达变化[J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(2): 155—160.

[17] Foulkes T, Nassar MA, Lane T, et al. Deletion of annexin 2 light chain p11 in nociceptors causes deficits in somatosensory coding and pain behavior[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(41):10499—10507.