

# TMEM16A 下调缓解坐骨神经分支选择性损伤大鼠的神经病理性痛

陈沁怡 钟赫伦 付经云 贺子龙 马克涛 司军强

**【摘要】** 目的 探讨 TMEM16A 在坐骨神经分支选择性损伤(SNI)神经病理性痛模型大鼠中的作用。方法 成年雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,随机分为假手术组(sham 组,  $n=6$ )和 SNI 组( $n=12$ ), sham 组大鼠仅暴露左侧坐骨神经分支; SNI 组行 SNI。在术前 1 d、术后 3、7、10、14 d 测定大鼠热缩足潜伏期(TWL)、冷缩足潜伏期(CWL)和机械缩足阈值(MWT)。采用 Western blot 测定术前 1 d 和术后 7、14 d 术侧背根神经节(DRG)中 TMEM16A 蛋白含量。另取 72 只雄性 SD 大鼠随机分为四组: sham+生理盐水组(CS 组)、SNI+生理盐水组(SS 组)、SNI+CaCCinh-A01 组(SC 组)和 SNI+T16Ainh-A01 组(ST 组), 每组 18 只。在给药前 3 d 行鞘内置管术, CS、SS 组大鼠术后 14 d 鞘内单次注射生理盐水 10  $\mu$ l, SC、ST 组大鼠相同时点鞘内单次注射 10  $\mu$ l 浓度为 1 mg/ml 的特异性钙激活氯通道(CaCCs)抑制剂 CaCCinh-A01 或 T16Ainh-A01, 在给药后的 8 h 内每隔 1 h 测定 TWL、CWL 和 MWT。另设相同四组大鼠于术后第 12 天开始每隔 6 h 分别鞘内注射 10  $\mu$ l 的生理盐水、CaCCinh-A01 或 T16Ainh-A01, 共注射 5 次, 于术后第 14 天提取术侧 DRG 进行 Western blot 和免疫荧光实验, 观察 TMEM16A 蛋白含量及 TMEM16A 分布特点。结果 与 sham 组比较, SNI 组术后 3、7、10、14 d CWL 明显延长( $P<0.05$ ), MWT 明显降低( $P<0.05$ ), TWL 差异无统计学意义。与术前 1 d 比较, SNI 组 TMEM16A 蛋白含量在术后 7、14 d 明显增高, 且术后 14 d 明显高于术后 7 d( $P<0.05$ )。与 SS 组比较, SC 组和 ST 组 CWL 从给药后 1 h 开始降低, 3 h 达到最低, 且在给药后的 1~4 h 内 SC 组 CWL 明显小于 ST 组( $P<0.05$ ); MWT 从给药后 1 h 开始升高, 分别在 2 h 和 3 h 达到最高且在给药后的 1、2、4、7 和 8 h 内 SC 组 MWT 明显高于 ST 组( $P<0.05$ ); TWL 在各时点差异均无统计学意义。与 SS 组比较, SC 组和 ST 组 TMEM16A 蛋白含量明显降低( $P<0.05$ ), 且 ST 组明显低于 SC 组( $P<0.05$ )。免疫荧光结果显示 TMEM16A 主要表达在与伤害感受相关的中小神经元上。结论 TMEM16A 可能在 SNI 诱导的持续性痛觉过敏中起关键作用。TMEM16A 可为神经病理性痛提供新的药物靶点。

**【关键词】** TMEM16A; 神经病理性痛; 背根神经节; 痛觉过敏

**Down-regulation of TMEM16A relieves neuropathic pain in sciatic nerve injury rats** CHEN Qinyi, ZHONG Helun, FU Jingyun, HE Zilong, MA Ketao, SI Junqiang. Departments of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832000, China  
Corresponding author: SI Junqiang, Email: sijnunqiang@shzu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate the role of TMEM16A in neuropathic pain elicited by sciatic nerve injury (SNI). **Methods** Adult male Sprague-Dawley rats weighing 180–220 g were randomly divided into sham-operated group (group sham,  $n=6$ ) and group SNI ( $n=12$ ). Sham-operated rats only exposed left sciatic nerve branches; group SNI underwent sciatic nerve injury. Rat behavioral measurements were performed 1 day before surgery and 3, 7, 10, 14 days after surgery including thermal withdrawal latency (TWL), cold withdrawal latency (CWL), and mechanical withdrawal threshold (MWT). The expression of TMEM16A protein in DRG was measured by Western blot on the 1st day before operation and on the 7th and 14th day after surgery. Another 72 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups ( $n=18$ ): sham+saline group (group CS), SNI+saline group (group SS), SNI+CaCCinh-A01 group (group SC) and SNI+T16Ainh-A01 group (group ST). Intrathecal catheterization was performed 3 days before ad-

DOI: 10.12089/jca.2019.09.017

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810759310)

作者单位: 832000 新疆石河子大学医学院第一附属医院麻醉科[陈沁怡(现在襄阳市中心医院麻醉科)]; 石河子大学医学院基础医学系生理教研室新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室(钟赫伦、付经云、贺子龙、马克涛、司军强)

通信作者: 司军强, Email: sijnunqiang@shzu.edu.cn

ministration. The groups CS and SS received a single intrathecal injection of 10  $\mu\text{l}$  of normal saline on the 14th day after surgery. In the groups SC and ST, a single intrathecal injection of 10  $\mu\text{l}$  of specific CaCCs inhibitor CaCCinh-A01 or T16Ainh-A01 at a concentration of 1 mg/ml was performed. The rats underwent behavior measurements every 1 h within 8 h after administration. In the same four groups of rats, 10  $\mu\text{l}$  of normal saline, CaCCinh-A01 or T16Ainh-A01 were injected intrathecally every 6 hours from the 12th day after surgery with total 5 times. The DRG was extracted on the 14th day after operation. Western blot and immunofluorescence experiments were performed to observe the changes of TMEM16A protein content and the temporal and spatial distribution of TMEM16A. **Results** Compared with the group sham, CWL was significantly increased ( $P < 0.05$ ), MWT was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and TWL was not significantly different 3, 7, 10, and 14 days after surgery in the group SNI. Compared with 1 day before surgery, the protein content of TMEM16A in DRG of group SNI increased 7 days after operation, and it was significantly higher 14 days after surgery than 7 days after surgery ( $P < 0.05$ ). Compared with the group SS, the CWL of the group SC and the group ST decreased from 1 h after administration, and reached the lowest at 3 h. The CWL of the group SC was significantly shorter than that of the group ST within 1–4 h after administration ( $P < 0.05$ ). The MWT was increased from 1 h after administration and reached the highest at 2 h and 3 h, respectively. The MWT of the group SC was significantly higher than that of the group ST at 1, 2, 4, 7 and 8 h after administration ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significant difference in TWL at each time point. Compared with group SS, the protein contents of TMEM16A in group SC and group ST were significantly lower ( $P < 0.05$ ), and it was significantly lower in group ST than in group SC ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence results showed that TMEM16A was mainly expressed in small neurons associated with nociception. **Conclusion** TMEM16A may play a key role in SNI-induced persistent hyperalgesia. TMEM16A provides a new drug target for neuropathic pain.

**【Key words】** TMEM16A; Neuropathic pain; Dorsal root ganglion; Hyperalgesia

神经病理性痛是指由躯体感觉神经系统的损伤或疾病而直接造成的疼痛,其临床特征主要表现为自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏<sup>[1-3]</sup>。研究表明,许多阳离子通道在神经病理性痛的发生发展中发挥着重要的作用,但阴离子通道在神经病理性痛中所扮演的角色尚缺乏深入研究。钙激活氯离子通道(CaCCs)是以 $\text{Ca}^{2+}$ 作为第二信使的阴离子通道,具有 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度依赖性。2008年,TMEM16A被发现是CaCCs的主要功能分子<sup>[4-6]</sup>。事实上,TMEM16A是一类涉及多种生理功能的跨膜蛋白,包括上皮分泌、感觉传导、伤害感受、神经元兴奋性传导和平滑肌收缩调节等。研究表明,CaCCs特别是TMEM16A,可增加炎症条件下背根神经节(DRG)神经元的兴奋性,加剧福尔马林介导的炎性疼痛<sup>[7-8]</sup>。CaCCs可被细胞内增加的 $\text{Ca}^{2+}$ 激活,引起 $\text{Cl}^-$ 外流。因此,CaCCs可能促进伤害性神经元的去极化,并且可能是动作电位产生的关键因素。本实验基于神经病理性痛的发病机制,从阴离子通道可能扮演角色的角度出发,通过鞘内注射CaCCs的两种特异性抑制剂CaCCinh-A01和T16Ainh-A01,观察坐骨神经分支选择性损伤(sciatic nerve injury, SNI)大鼠术后行为学和TMEM16A蛋白的变化及时空分布特点,探讨TMEM16A在神经病理性痛中发挥的作用,为临床治疗神经病理性痛提供新的治疗靶点。

## 材料与方 法

**实验动物与分组** 成年雄性SD大鼠180~200 g,8~12周龄,购自新疆医科大学实验动物中心。饲养环境安静,有良好的通风和空气过滤系统,室温控制在22℃左右,湿度50%左右,24 h明暗交替,自由取食,每日更新垫料和饮用水。实验分为两部分,第一部分,将18只大鼠随机均分为两组:假手术组(sham组, $n=6$ )和SNI组( $n=12$ ),两组均不鞘内置管。第二部分,另取72只大鼠随机分为四组:sham+生理盐水组(CS组)、SNI+生理盐水组(SS组)、SNI+CaCCinh-A01组(SC组)和SNI+T16Ainh-A01组(ST组)。在给药前3 d行鞘内置管术。

**SNI模型制备** 参照文献[9]制备SNI模型。通过腹膜内注射1%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉大鼠。大鼠俯卧位于操作台,备皮消毒后,于左下肢背侧部纵向切开皮肤,暴露股二头肌,经肌间钝性分离肌肉,于股骨后找到坐骨神经及其3个分支:胫神经、腓总神经和腓肠神经;分别双重结扎胫神经和腓总神经,在两处结扎的中间切断神经,并分别去除末端2~4 mm的神经干,术中避免损伤腓肠神经,然后逐层缝合。sham组大鼠仅暴露神经不做其他处理。所有大鼠于术后第1天腹膜内注射氨比西林100 mg/kg。剔除手术后肢体瘫痪的大鼠。术后进行行为学测试,若SNI大鼠对冷和机械刺激存

在痛觉过敏现象即为模型制备成功。

**鞘内置管与给药** 在腹膜内注射 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠后,参照 Pogatzki 等<sup>[10]</sup>方法,选取 SNI 模型制备成功的大鼠,在给药前 3 d 施行鞘内置管术。将大鼠俯卧位固定并在椎骨 L<sub>5-6</sub> 上方做出 2.0 cm 纵向切口,依次分离筋膜和肌肉后,将 PE-10 导管穿过椎间隙,若置管顺利可观察到尾部或后肢突然移动,同时可见导管内有清亮的脑脊液流出,置管深度约为 2.0 cm,固定导管于皮下筋膜处。做一皮下隧道将导管的另一端固定在大鼠的颈部,夹闭封口。通过导管注射 2% 利多卡因 20  $\mu$ l,如果在注射后 30 s 内出现双下肢瘫痪并于 30 min 内恢复,则判断为鞘内置管成功。

置管成功的大鼠纳入第二部分实验。CS、SS 组大鼠术后 14 d 鞘内单次注射生理盐水 10  $\mu$ l,SC、ST 组则鞘内单次注射 10  $\mu$ l 浓度为 1 mg/ml 的 CaCCinh-A01 (美国 Sigma) 或 T16Ainh-A01 (美国 Sigma),在给药后的 8 h 内每隔 1 h 进行行为学测试。另设相同四组大鼠于术后第 12 天开始每隔 6 h 分别鞘内注射 10  $\mu$ l 的生理盐水、CaCCinh-A01 或 T16Ainh-A01,共注射 5 次,于术后第 14 天提取术侧 L<sub>4-6</sub>DRG 进行 Western blot 和免疫荧光实验。

**行为学测试** 通过测量大鼠足底的热缩足潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 来评估大鼠热痛阈。将大鼠置于透明的有机玻璃箱,使大鼠适应环境 30 min。辐射热源通过有机玻璃板聚焦在术侧足底。数字计时器自动记录刺激启动到引起后肢回缩反应时的潜伏期之间的持续时间。调节光照刺激强度,并设刺激上限为 30 s,以免造成组织损伤。冷痛觉过敏由丙酮冷刺激引发大鼠抬足持续时间即冷缩足潜伏期 (cold withdrawal latency, CWL) 进行判定。即用注射器抽取 0.1 ml 的丙酮刺激大鼠术侧足底,大鼠抬足并在空中停留的时间作为冷痛阈观测指标。机械缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 测定方法:待大鼠在高架铁丝网中安静后,将金属细丝 (直径 0.5 mm) 触及术侧足底,后爪抬足的同时机器自动记录引起缩足所需的刺激大小。以上所有测试均为每 5 分钟测试 1 次,取 3 次试验的平均值。

**Western bolt 检测** 在含有蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液中匀浆,离心裂解物后吸取上清液。使用二辛可宁酸 (BCA) 试剂盒测定蛋白浓度。每孔上样 30  $\mu$ g,电泳并转膜。将膜在室温中用 5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,之后在 TMEM16A 一抗 (英国 Abcam)

稀释液中 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗掉一抗后,将膜在二抗稀释液中室温孵育 2 h 并用 TBST 洗掉二抗后,使用 ECL 荧光显色。通过 Image-Pro Plus 6.0 软件定量蛋白质条带的灰度值。

**免疫荧光检测** 腹膜内注射 1% 戊巴比妥钠深度麻醉大鼠,用生理盐水和多聚甲醛先后通过主动脉灌注,快速取出左侧 L<sub>4-6</sub> 的 DRG,包埋在 OCT 中,切片厚度为 5  $\mu$ m。切片经相应处理后,于 LSM510 激光共聚焦显微镜下观察切片。根据 DRG 神经细胞的直径大小分为两类,大神经细胞直径在 40  $\mu$ m 以上,中小神经细胞直径在 40  $\mu$ m 以下。选取核居中,细胞形态完好的神经细胞,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分别统计两类神经细胞的荧光强度。

**观察指标** 第一部分实验两组大鼠均测定术前 1 d 和术后 3、7、10、14 d 的术侧足底 TWL、CWL 和 MWT,并在术前 1 d 和术后 7、14 d 处死 SNI 大鼠,取术侧 L<sub>4-6</sub> 检测 TMEM16A 蛋白含量。第二部分实验四组大鼠从给药后 8 h 每隔 1 h 测定术侧足底 TWL、CWL 和 MWT。另设相同四组大鼠于术后第 12 天开始每隔 6 h 分别给药,共注射 5 次,于术后第 14 天提取术侧 DRG 进行 Western blot 和免疫荧光实验。

**统计分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件处理。正态分布计量资料以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Tukey 法;不同时点比较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

与 sham 组比较,术后 3、7、10、14 d SNI 组 CWL 明显延长 ( $P < 0.05$ ),MWT 明显降低 ( $P < 0.05$ ),而 TWL 差异均无统计学意义 (图 1—3)。

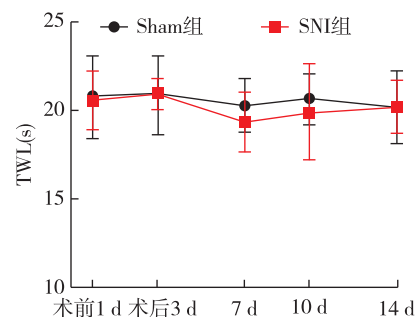
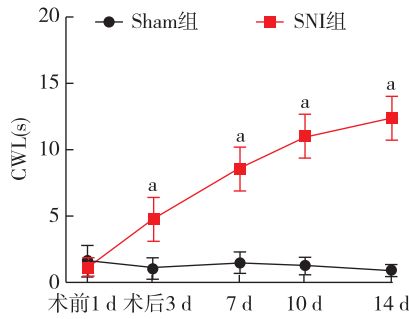


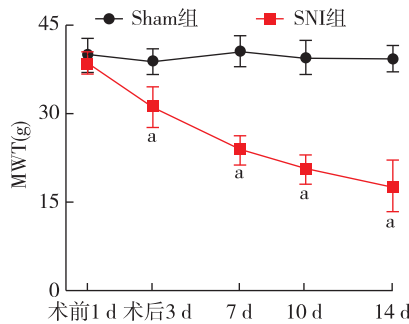
图 1 sham 组和 SNI 组大鼠不同时点 TWL 的比较

与术前 1 d 比较,术后 7、14 d SNI 组 TMEM16A 蛋白含量明显增高 ( $P < 0.05$ ),且术后 14 d 明显高于术后 7 d ( $P < 0.05$ ) (图 4)。



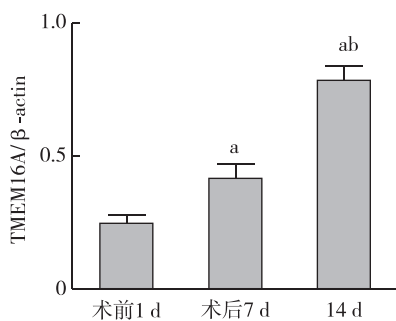
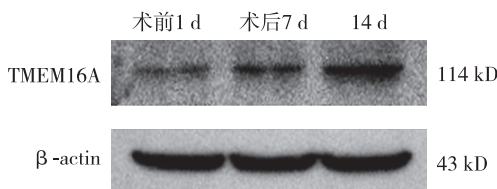
注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 2 sham 组和 SNI 组大鼠不同时点 CWL 的比较



注:与 sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 3 sham 组和 SNI 组大鼠不同时点 MWT 的比较



注:与术前 1 d 比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与术后 7 d 比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 4 SNI 组大鼠 TMEM16A 蛋白含量的比较

CS 组、SS 组、SC 组和 ST 组大鼠鞘内给药前及给药后 1~8 h TWL 差异均无统计学意义(图 5)。

CS 组、SS 组、SC 组和 ST 组大鼠鞘内给药前 CWL 差异无统计学意义。与 SS 组比较,SC 组和 ST

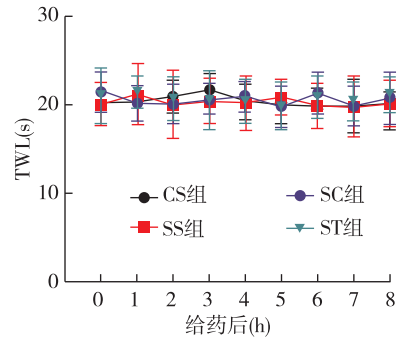
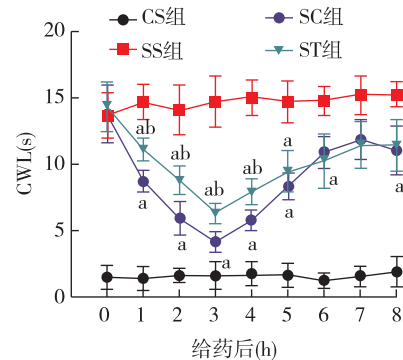


图 5 四组大鼠 TWL 的比较

组术侧后肢 CWL 均从给药后第 1 小时开始降低,第 3 小时达到最低,缓解冷痛效果至少持续 8 h ( $P < 0.05$ )。且在给药后的 1~4 h 内 SC 组 CWL 明显小于 ST 组( $P < 0.05$ )(图 6)。



注:与 SS 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 SC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

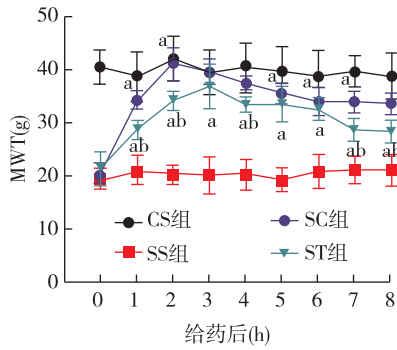
图 6 四组大鼠 CWL 的比较

CS 组、SS 组、SC 组和 ST 组大鼠鞘内给药前 MWT 差异无统计学意义。与 SS 组比较,SC 组和 ST 组 MWT 均从给药后第 1 小时开始升高,分别在第 2 小时和第 3 小时达到最高,缓解机械痛效果至少持续 8 h ( $P < 0.05$ )。且在给药后的 1、2、4、7 和 8 h 内 SC 组 MWT 明显高于 ST 组( $P < 0.05$ )(图 7)。

与 SS 组比较,SC 组和 ST 组 TMEM16A 蛋白含量明显降低( $P < 0.05$ ),且 ST 组明显低于 SC 组( $P < 0.05$ )(图 8)。

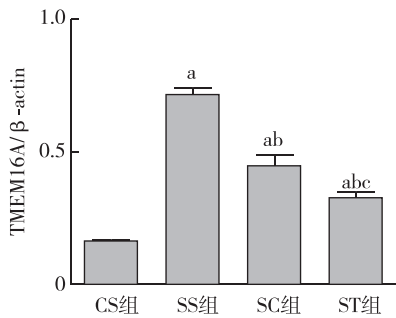
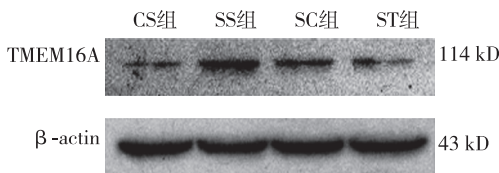
TMEM16A 主要在 DRG 神经元的细胞质和细胞膜上表达(图 9)。与 CS 组比较,无论是中小神经细胞还是大神经细胞,SS 组 TMEM16A 的荧光强度明显增加( $P < 0.05$ )。SC 组和 ST 组荧光强度明显下降( $P < 0.05$ ),且 ST 组下降更明显( $P < 0.05$ )。此外,TMEM16A 在中小神经细胞中的荧光强度波动幅度比大神经细胞更明显。且在每一组中,中小神





注:与 SS 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 SC 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 7 四组大鼠 MWT 的比较



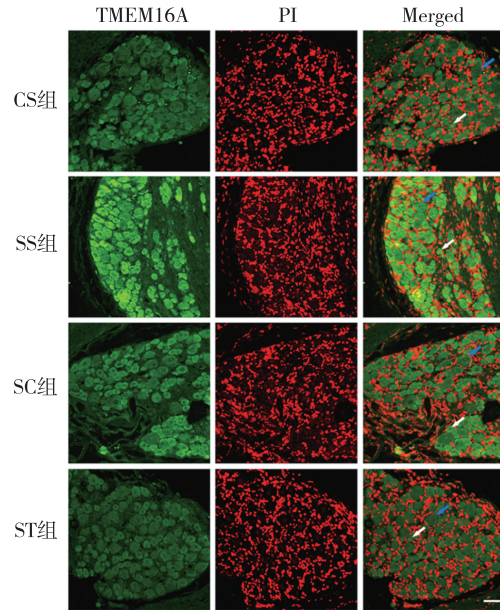
注:与 CS 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 SS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 SC 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 8 四组大鼠 TMEM16A 蛋白含量的比较

经细胞的 TMEM16A 荧光强度均比大神经细胞高 ( $P < 0.05$ ) (图 10)。

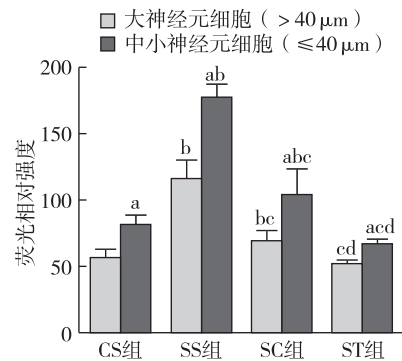
### 讨 论

躯体感觉神经元是机体感觉系统的重要组成部分,其胞体存在于 DRG 中。DRG 神经元外周轴突末梢可感受各种各样的外周刺激,例如温度刺激、化学刺激和机械刺激等,并将其转化为神经冲动向中枢传递,从而形成温度觉、痛觉和触觉等感觉。DRG 神经元按其胞体大小可分为 3 类,其中小神经元主要发出伤害性感受的无髓 C 类纤维,与温痛觉有关;中神经元发出细髓 A $\delta$  纤维,与触觉有关;大神经元则发出粗髓纤维 (A $\alpha$ /A $\beta$ ),与本体感觉有关。本研究发现 TMEM16A 主要表达在与疼痛相关的中小神经元上,且神经损伤后在中小神经元



注:蓝色箭头标注直径在 40  $\mu\text{m}$  以上的大神经元,白色箭头标注直径在 40  $\mu\text{m}$  以下的中小神经元

图 9 TMEM16A 在 DRG 不同神经元上的表达



注:与大神经元细胞比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 CS 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 SS 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 SC 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$

图 10 TMEM16A 在 DRG 不同神经元上的荧光强度的比较

上的表达明显增高,进一步说明 TMEM16A 可能参与了疼痛调节。

神经病理性痛由躯体感觉系统的病变或疾病引起的疼痛,影响着 7%~10% 的一般人群。神经病理性痛的难治性在于传统的非甾体类和阿片类镇痛药特异性不高,因此疗效有限且许多患者必须忍受药物的长期副作用。相比于针对临床症状的治疗,基于发病机制的治疗更有可能改善患者的疼痛。目前神经病理性痛的发病机制仍不明确,但离子通道的改变是形成异常放电的主要原因,因此对离子通道的研究一直是疼痛研究领域的热点。

CaCCinh-A01 是 CaCCs 的特异性抑制剂,可抑

制 TMEM16A 和 CaCCs 其他蛋白组分,而 T16Ainh-A01 是 TMEM16A 的特异性抑制剂。两种抑制剂均可抑制 TMEM16A 的通道活性,但抑制机制目前尚不清楚。两种抑制剂均不会改变细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度,但 CaCCinh-A01 阻断  $\text{Cl}^-$  电流更强。有报道称, CaCCinh-A01 可促进 TMEM16A 的蛋白酶体降解<sup>[11]</sup>,但 T16Ainh-A01 影响 TMEM16A 蛋白表达的机制尚不清楚。本实验发现,鞘内注射 CaCCinh-A01 或 T16Ainh-A01 后可明显缓解 SNI 大鼠的冷和机械异常性疼痛,且减少了 TMEM16A 的蛋白含量。CaCCinh-A01 抑制冷和机械痛的效果比 T16Ainh-A01 明显,说明 CaCCs 上可能有除了 TMEM16A 之外的蛋白参与了神经病理性痛的产生。

CaCCs 是具有  $\text{Ca}^{2+}$  浓度依赖性的阴离子通道,影响细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度。感觉神经元内的  $\text{Cl}^-$  参与痛觉过敏的调节或伤害性信号的传递<sup>[12-13]</sup>。而 CaCCinh-A01 和 T16Ainh-A01 可影响细胞摄取  $\text{Cl}^-$ ,改变细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度,从而影响疼痛行为。因而神经损伤诱导的伤害感受行为可被 CaCCinh-A01 和 T16Ainh-A01 显著减弱,同时两种抑制剂可减少 TMEM16A 的表达,进一步影响细胞摄取  $\text{Cl}^-$ 。

CaCCs 主要包括 Bestrophin、Twenty 和 TMEM16 三个家族, TMEM16 家族中的 TMEM16A 是 CaCCs 的重要组成部分<sup>[4-6]</sup>。TMEM16A 在多种神经元上表达,如脊髓神经元, DRG 神经元等。虽然在神经元中 TMEM16A 所发挥的功能尚不十分明确,但约 45%~90% 的 DRG 神经元上有 TMEM16A 的表达,这些神经元参与感知皮肤的温度、触觉、肌张力和疼痛,可以推断 TMEM16A 在其中发挥特定的功能。研究表明, TMEM16A 可被 44 °C 以上的温度激活<sup>[14]</sup>。敲除 DRG 神经元上的 TMEM16A 后,小鼠对热痛的感知显著下降<sup>[14]</sup>。这些结果表明 TMEM16A 似乎起到介导或放大热伤害感受传感器的作用。本实验发现外周神经损伤后, TMEM16A 被激活,但 SNI 大鼠对热刺激却不敏感,说明体内还存在其他调控机制影响着大鼠的热痛觉,但是具体机制未明,还需要进一步研究。

目前,对神经损伤如何激活 TMEM16A 的相关作用机制暂无研究,结合本实验结果,可以推测神经损伤会引起外周致敏,导致兴奋机制的大量激活,从而增加细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平。这种反应足以激活 TMEM16A,从而使  $\text{Cl}^-$  流出和膜去极化,最终导致神经病理性痛。

综上所述, SNI 大鼠 DRG 神经元中 TMEM16A 蛋白表达上调,选择性 CaCCs 抑制剂 CaCCinh-A01 和 T16Ainh-A01 可减轻由 SNI 导致的大鼠痛觉过敏。这些结果有力地表明定位于初级传入神经元 DRG 上的钙激活氯通道 TMEM16A 参与神经病理性痛的产生和维持。

#### 参 考 文 献

- [1] Thakur KK, Saini J, Mahajan K, et al. Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 224-232.
- [2] Lim EY, Kim YT. Food-derived natural compounds for pain relief in neuropathic pain. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 7917528.
- [3] Gangadharan V, Kuner R. Pain hypersensitivity mechanisms at a glance. *Dis Model Mech*, 2013, 6(4): 889-895.
- [4] Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science*, 2008, 322(5901): 590-594.
- [5] Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 2008, 134(6): 1019-1029.
- [6] Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 2008, 455(7217): 1210-1215.
- [7] Garcia G, Martínez-Rojas VA, Rocha-González HI, et al. Evidence for the participation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated chloride channels in formalin-induced acute and chronic nociception. *Brain Res*, 2014, 1579: 35-44.
- [8] Lee B, Cho H, Jung J, et al. Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol Pain*, 2014, 10: 5.
- [9] Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [10] Pogatzki EM, Zahn PK, Brennan TJ. Lumbar catheterization of the subarachnoid space with a 32-gauge polyurethane catheter in the rat. *Eur J Pain*, 2000, 4(1): 111-113.
- [11] Bill A, Hall ML, Borawski J, et al. Small molecule-facilitated degradation of ANO1 protein: a new targeting approach for anti-cancer therapeutics. *J Biol Chem*, 2014, 289(16): 11029-11041.
- [12] Kitayama T. The role of  $\text{K}^+$ - $\text{Cl}^-$ -cotransporter-2 in neuropathic pain. *Neurochem Res*, 2018, 43(1): 110-115.
- [13] Mahadevan V, Woodin MA. Regulation of neuronal chloride homeostasis by neuromodulators. *J Physiol*, 2016, 594(10): 2593-2605.
- [14] Cho H, Yang YD, Lee J, et al. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci*, 2012, 15(7): 1015-1021.

(收稿日期: 2018-11-16)