

# 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\*

张 杨<sup>1</sup> 王永慧<sup>1</sup> 丁欣利<sup>1</sup> 王艳琴<sup>1</sup> 王 荣<sup>2</sup> 岳寿伟<sup>1,3</sup>

## 摘要

**目的:**观察持续机械压迫(CCD)对瞬时感受器电位离子通道4(TRPV4)基因、蛋白表达及功能的影响,明确TRPV4是否参与CCD导致的机械和热痛敏。

**方法:**建立CCD模型后,分别于手术前及手术后第7天、第14天及第28天取材前测量运动功能、机械刺激缩爪反应阈值和热辐射刺激缩爪反应潜伏期。为了测量TRPV4反义核苷酸干扰对机械和热痛阈值的影响,在蛛网膜下腔内注入TRPV4寡脱氧核苷酸(ODN) 40 μg/d,每天1次,第7天后测量大鼠行为学变化。使用实时定量RT-PCR检测TRPV4基因表达的变化,Western blot检测TRPV4蛋白质表达量的变化,激光共聚焦检测低渗溶液和佛波醇(4α-PDD)刺激背根神经节(DRG)神经元后细胞内钙离子浓度的变化。

**结果:**所有动物在损伤前后步态均正常,持续压迫明显降低大鼠的机械和热痛阈,TRPV4干扰可部分逆转该痛敏。持续机械压迫可以明显增加TRPV4基因和蛋白的表达,手术后第7天,第14天和第28天,TRPV4 mRNA的表达分别为假手术组大鼠的4.29倍、2.95倍和2.48倍,蛋白表达量分别为假手术组大鼠的4.34倍、3.88倍和2.47倍。持续机械压迫后,对低渗溶液和4α-PDD产生反应的DRG神经元的比例数增加,细胞内钙的峰值增高。这种反应被TRPV4反义ODN所抑制。

**结论:**CCD可以上调TRPV4的基因、蛋白表达,敏化通道的功能;TRPV4参与介导CCD导致的机械和热痛敏。

**关键词** 机械性痛敏;热痛敏;瞬时感受器电位离子通道4;背根神经节;持续压迫

**中图分类号:**R49, R681.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-12-1123-08

The role of transient receptor potential vanilloid 4 in mediating mechanical and thermal allodynia following chronic compression of dorsal root ganglion in rats/ZHANG Yang, WANG Yonghui, DING Xinli, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(12):1123—1130

## Abstract

**Objective:** To investigate the role of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in mediating mechanical and thermal allodynia in rodent models of chronic compression of dorsal root ganglion (CCD).

**Method:** The levels of TRPV4 mRNA and protein expressions in dorsal root ganglion (DRG) were assessed using real-time RT-PCR and Western blot analysis respectively at the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> d post-CCD. The effects of spinal administration of TRPV4 antisense oligodeoxynucleotide (ODN) and mismatch ODN on CCD-induced mechanical and thermal allodynia were evaluated. The calcium responses to hypotonic solution and 4α-phorbol 12, 13-didecanoate (4α-PDD) were assessed following sham surgery, CCD, spinal application of TRPV4 antisense ODN and mismatch ODN.

**Result:** The levels of TRPV4 mRNA and protein expression increased significantly at the 7<sup>th</sup>-28<sup>th</sup> d post-CCD with the highest level at the 7<sup>th</sup> d post-CCD when compared with the sham group. TRPV4 antisense ODN, but not

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.12.001

\* 基金项目:国家自然科学基金资助课题(30872732,81071597);山东省自然科学基金资助课题(Z2007C04)

1 山东大学齐鲁医院康复科,济南,250012; 2 山东大学齐鲁医院心血管功能与重构实验室; 3 通讯作者

作者简介:张杨,女,博士,主治医师; 收稿日期:2010-08-01

mismatch ODN, partly reversed the CCD-induced mechanical and thermal allodynia. Additionally, TRPV4 antisense ODN had no effect on the baseline nociceptive response. The percentage of DRG neurons responsive to hypotonic solution and 4 $\alpha$ -PDD and the fluorescence ratio of calcium response also enhanced significantly in both CCD group and mismatch ODN group. These increased responses were significantly inhibited by TRPV4 antisense ODN.

**Conclusion:** TRPV4 plays a crucial role in CCD-induced mechanical and thermal allodynia.

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

**Key words** mechanical allodynia; thermal allodynia; transient receptor potential vanilloid 4; dorsal root ganglion; chronic compression

背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)的持续受压(chronic compression of DRG, CCD)可以产生自发性疼痛,痛觉过敏和异常疼痛,伴随着神经元的自发性放电增加,动作电位和电流阈值降低。受压的DRG成为异常放电的来源,即使无交感神经活动,或者内源性化学激活物质,仍可以产生电活动<sup>[1-4]</sup>。多种离子通道被认为与持续受压后DRG的高兴奋性有关,如电压门控性Na<sup>+</sup>通道和K<sup>+</sup>通道<sup>[5]</sup>,超极化激活性阳离子通道<sup>[6]</sup>等,但CCD导致的痛觉过敏和异常疼痛的分子基础还不甚清楚。

DRG上存在多种离子通道,其中瞬时感受器电位离子通道家族中香草素受体亚家族TRPV2(transient receptor potential vanilloid receptor 2),TRPV4(transient receptor potential vanilloid receptor 4)和锚蛋白亚家族TRPA1(transient receptor potential subtype ankyrin 1)都被认为与机械性疼痛有关<sup>[7-8]</sup>。其中TRPV4的作用越来越受到关注。TRPV4是一种非选择性阳离子通道,对钙的通透性较高<sup>[9]</sup>。在生物体许多组织、器官中均有表达,可感受低渗膨胀、机械刺激、温度(>27℃)、佛波醇酯衍生物(PKC-activating and non-activating)、H<sup>+</sup>、花生四烯酸的代谢产物等理化刺激,因此被称为多觉感受器<sup>[10]</sup>。TRPV4基因敲除的小鼠表现出体液渗透压调节功能异常,对伤害性压力刺激的回避反应降低,但对非伤害性触觉的反应正常<sup>[11-12]</sup>。近期有研究发现,在炎症环境下机械性、高渗或低渗刺激导致的痛觉反应中,TRPV4起重要作用,对TRPV4激动剂产生反应的DRG神经元的比例数也增加<sup>[13-14]</sup>。但在外伤性或糖尿病性神经痛模型中,TRPV4的表达和功能无明显变化<sup>[15]</sup>。因此,TRPV4在不同神经性疼痛模型中的作用不尽相同,而且TRPV4是否参与神经性疼痛中的

热痛觉过敏还有待进一步研究。

本研究通过观察CCD对TRPV4基因、蛋白表达及功能的影响,明确TRPV4在CCD导致的机械和热痛敏中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 CCD模型的建立与行为学测量

**1.1.1 CCD模型的建立和分组。**大鼠麻醉后,将“L”形棒的一端沿L4及L5椎间外孔的前壁上方水平插入椎管内,使之挤压L4、L5 DRG。假手术组除不插钢棒压迫神经节外,其余操作同手术组。

为了测量CCD对TRPV4表达和功能的影响,99只大鼠被随机分为7天组,14天组和28天组,每组均33只大鼠。每个组又分成CCD(n=20)和假手术(n=13)2个亚组。分别于术后第7天,第14天和第28天处死动物。

为了测量TRPV4在机械痛敏中的作用,45只大鼠被随机分为正常组(normal group, n=18)和CCD(CCD group, n=27)组。每个组又分成对照组(control)、反义寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)干扰组(antisense ODN group, AS组)和错配ODN组(mismatch ODN group, MM组)3个亚组。正常组大鼠每个亚组6只,CCD组大鼠每个亚组9只。正常组中未接受任何处理的大鼠作为对照,CCD组中只接受CCD手术的大鼠作为对照。

为了测量TRPV4在热痛敏中的作用,另外27只大鼠被随机分为CCD组,AS组和MM组3个亚组,每个亚组9只。AS组和MM组也均接受CCD手术。

**1.1.2 机械痛阈和热痛阈的测量。**运动功能,观察动物自然状态下随意行走的步态,采用记分制:1分:

正常步态、足无畸形;2分:正常步态伴明显足畸形;3分:轻度步态障碍伴足下垂;4分:严重步态障碍伴肌无力。

机械刺激缩爪反应阈值(mechanical withdrawal threshold)测量,选择刺激强度为0.09g、1.19g、3.80g、5.80g、7.60g、10.12g、17.30g的Von Frey针丝(BME-403型,中国医学科学院生物医学工程研究所),依次刺激动物手术侧足底3、4趾间皮肤,如大鼠产生明显的缩爪或舔足,即为阳性反应。每只大鼠均从小剂量的针丝开始刺激,上限为17.30g,每根针丝测量5次,至少能够引发3次缩爪反应的针丝强度即为机械痛阈值。每次测量时使尼龙丝弯曲到相同的弧度,以确保每次施加的刺激相同。

热辐射刺激缩爪反应潜伏期(thermal withdrawal latency),将动物放在6mm厚有机玻璃板上,将热痛刺激仪(BME-410A型,中国医学科学院生物医学工程研究所)光源焦距通过有机玻璃板照射动物后肢足底掌心,电子秒表记录从照射开始到引起后肢回缩反应时的潜伏期作为热痛觉观测指标。读数精确到0.01s。取每只大鼠5次测量结果的均值为统计数据,测量间隔时间为5min。事先调节光照强度,使平均潜伏期约10s。上限为20s,以免造成组织损伤。

### 1.2 TRPV4反义ODN干扰

微量注射器吸取40μg反义ODN(反义ODN序列:5'-CATCACCAGGATCTGCCATACTG-3';错配ODN序列:5'-CAACAGGAGGTTTCAGGCAAAGT-3'。Invitrogen公司合成),使用0.9% NaCl配制为总体积20μl。麻醉大鼠后,30号针头从正中中线插入L4和L5之间的蛛网膜下腔,换用微量注射器,以1μl/s的速度注入ODN<sup>[16]</sup>,CCD组于手术12h后进行第一次注射。每天1次,共7d,第7天后处死大鼠。

### 1.3 细胞培养

7天组随机取5只大鼠(2只假手术,3只CCD),反义ODN干扰试验的CCD组中随机取9只大鼠(对照组,AS组和MM组均为3只),取出受压侧L4、L5 DRG,加入1.25mg/ml的胰酶(美国Sigma公司)消化后,加入DMEM/F12培养液(美国Hyclone公司)培养12—24h。

### 1.4 实时定量RT-PCR

1只大鼠的2个DRG(L4和L5)作为一个样本

提取RNA,假手术组n=4,CCD组n=6,每个样本重复3次。使用Trizol提取细胞总mRNA,逆转录成cDNA(RNA逆转录试剂盒购自美国Promega),以反转录后的cDNA为模板分别加入引物和SYBR PCR buffer(Takara 大连宝生物)等,使用瑞士Roche公司lightcycler 2.0型实时定量PCR仪进行RT-PCR测定。

TRPV4引物序列为:

Forward: 5'-AAGTGGCGTAAGTTCGGG-3'

Reverse: 5'-TAAGGGTAGGGTGGCGTG-3'(Invitroge)

β-actin引物序列为:

Forward: 5'-AGACCTTCAACACCCCAG-3'

Reverse: 5'-CACGATTTCCCTCTCAGC-3'(Invitroge)

为确保扩增片断为目的基因,扩增产物均进行凝胶电泳。结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算,TRPV4与β-actin的相对比值作为结果。

### 1.5 Western blot

3只大鼠的6个DRG作为一个样本提取蛋白,假手术组n=2,CCD组n=3,每个样本重复3次。Bradford法定量后,每个样本取蛋白质30μg进行SDS-PAGE凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜后,牛奶封闭。然后分别加入TRPV4抗体(以色列Alomone公司)和β-actin抗体(英国Abcam公司),4℃过夜,漂洗3次后加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育2h。按照发光试剂盒(英国Amersham公司)的说明进行放射自显影,使用Fluorochem 9900-50凝胶图像处理系统(Alpha Innotech公司)分析条带光密度,TRPV4与内参β-actin强度的比值作为结果。

### 1.6 激光共聚焦测量各种刺激下细胞内钙浓度

将各组培养细胞的培养基吸出,冲洗后加入Fluo-3/AM(美国Sigma,使用甲基亚砷配成终末浓度5μM),室温下负载45min,冲洗3次后放在激光共聚焦显微镜(德国Zeiss TCS SP2型)的载物台上,采用XYT采集模式,扫描间隔时间为5s。激发波长488nm,检测波长530nm,照片在监视器下摄影采集。灌流槽容量为300μl,灌流速度为1—2ml/min。试验在室温20—23℃下进行。每组30只。

**1.6.1 各种细胞外液贯续刺激:**给予刺激之前,测量细胞内钙离子的荧光强度50s,然后依次使用10%,20%,30%低渗液刺激细胞,刺激时间均为100s。再

贯续使用 30%无钙低渗液,等渗液冲洗,3μM 佛波醇(4α-phorbol 12,13-didecanoate,4α-PDD,美国 Sigma)刺激细胞,时间均为 50s。

**1.6.2 单独刺激:**分别使用 10%,20%,30%低渗液,30%无钙低渗液,3μM 4α-PDD 刺激细胞,计算平台期荧光强度的平均值。

**1.6.3 加用阻断剂后,单独刺激:**先用 1μM 钌红(ruthenium red,RR,美国 Sigma)孵育细胞 10min 后,再用 3μM 4α-PDD 刺激细胞,计算平台期荧光强度的平均值。

细胞内钙浓度变化用  $\Delta F/F$  表示:

$$\Delta F/F = (F - F_{base}) / (F_{base} - B)$$

$F$  为平台期荧光强度的平均值, $F_{base}$  为刺激前细胞荧光强度的平均值, $B$  为细胞周围背景荧光强度的平均值<sup>[17]</sup>。

1.7 统计学分析

使用双因素方差分析各组间机械痛阈值、热辐射刺激缩爪反应潜伏期、TRPV4 基因和蛋白表达的差别。使用单因素方差分析各组间细胞内钙浓度( $\Delta F/F$ )的差别。使用  $\chi^2$  检验分析各组间对低渗溶液和佛波醇产生反应的 DRG 神经元的比例数的差异。按照需要采用 Student-Newman-Keuls 检验(SNK),Bonferroni t-检验和 Tukey 检验作为 post-hoc 检验。

2 结果

2.1 行为学测定

**2.1.1 运动功能。**所有动物在损伤前后步态均正常,足无畸形,评分均为 1 分,损伤前后各组间差异无显著性意义。

表 1 CCD 手术后大鼠机械痛阈值 ( $\bar{x} \pm s, g$ )

| 组别    | 基础值        | 第 7 天                  | 第 14 天                 | 第 28 天                 |
|-------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 假手术组  | 10.92±0.46 | 10.28±0.64             | 11.58±0.92             | 11.19±1.01             |
| CCD 组 | 12.35±0.51 | 6.81±0.30 <sup>①</sup> | 8.68±0.36 <sup>①</sup> | 9.36±0.26 <sup>①</sup> |

①与假手术大鼠相比  $P<0.05$

表 3 CCD 手术后大鼠 DRG 上 TRPV4 基因相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别    | 第 7 天                   | 第 14 天                   | 第 28 天                   |
|-------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组  | 11.49±2.11              | 11.96±2.36               | 11.15±1.62               |
| CCD 组 | 49.35±6.57 <sup>①</sup> | 35.27±5.69 <sup>①②</sup> | 27.65±3.64 <sup>①②</sup> |

①与假手术大鼠相比  $P<0.05$ ;②与 CCD 后 7 天组大鼠相比  $P<0.05$

**2.1.2 机械和热痛阈值。**手术前,各组大鼠的机械缩爪阈基础值无差异( $F=1.63, P=0.16$ )。如表 1 所示,与假手术大鼠相比,持续压迫明显降低大鼠的机械痛阈( $P<0.001$ )。如表 2 所示,热辐射刺激缩爪反应潜伏期的变化趋势与机械痛阈相似,持续压迫明显降低大鼠的热痛阈(SNK,  $P<0.05$ )。

2.2 持续机械压迫对 DRG 上 TRPV4 基因和蛋白表达的影响

**2.2.1 受压前后 TRPV4 基因表达的变化。**如表 3 所示,持续机械压迫可以明显增加 TRPV4 基因的表达( $P<0.001$ )。手术后第 7 天,第 14 天和第 28 天,TRPV4 mRNA 的表达分别为假手术组大鼠的 4.29 倍,2.95 倍和 2.48 倍,差异有显著性意义(SNK, all  $P<0.05$ )。而假手术组大鼠之间无明显差异( $F=0.155, P=0.859$ )。

**2.2.2 受压前后 TRPV4 蛋白质表达的变化。**如表 4 所示,蛋白质的变化与 mRNA 的变化相类似,持续机械压迫可以明显增加 TRPV4 蛋白的表达( $P<0.001$ )。压迫第 7 天后,TRPV4 的表达明显增高,为假手术组的 4.34 倍。随受压时间的延长,TRPV4 蛋白的表达逐渐降低,术后第 14 天和第 28 天分别为假手术组的 3.88 和 2.47 倍,差异有显著性意义(SNK,  $P<0.05$ )。假手术组之间没有明显差异( $F=1.21, P=0.412$ )。

2.3 持续压迫导致的病理性疼痛与 TRPV4

如图 1A 所示,正常大鼠组中,对照组、AS 组和 MM 组的 TRPV4 表达量分别为 (13.75±1.05)%, (2.65±0.071)%和 (13.8±0.7)%( $P<0.005$ ),说明反义 ODN 可明显抑制 TRPV4 的合成,但错配 ODN 无明显影响。如图 1B 所示,干扰前后大鼠机械痛阈值无

表 2 CCD 手术后大鼠热痛阈值 ( $\bar{x} \pm s, g$ )

| 组别    | 基础值        | 第 7 天                  | 第 14 天                 | 第 28 天                 |
|-------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 假手术组  | 10.77±0.29 | 10.28±0.31             | 10.26±0.31             | 11.41±0.28             |
| CCD 组 | 10.62±0.30 | 5.48±0.25 <sup>①</sup> | 6.59±0.27 <sup>①</sup> | 8.64±0.37 <sup>①</sup> |

①与假手术大鼠相比  $P<0.05$

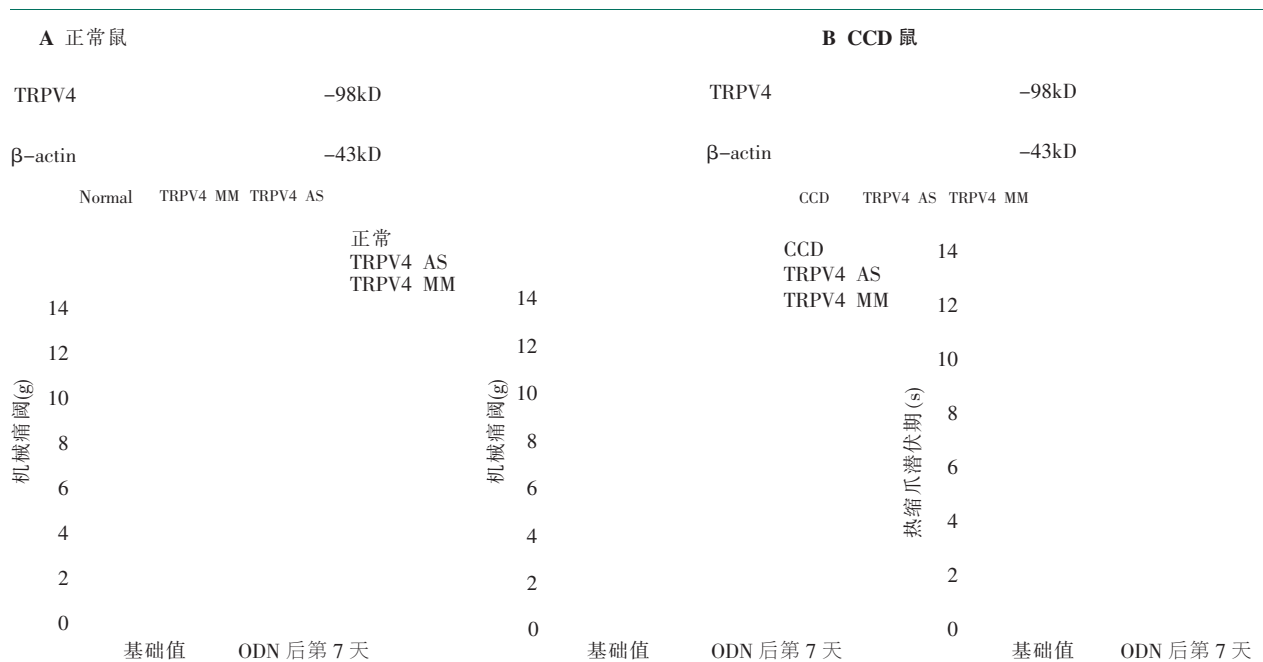
表 4 CCD 手术后大鼠 DRG 上 TRPV4 蛋白相对表达量 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

| 组别    | 第 7 天                   | 第 14 天                   | 第 28 天                   |
|-------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 假手术组  | 12.89±1.13              | 11.53±0.71               | 12.27±0.56               |
| CCD 组 | 55.94±3.61 <sup>①</sup> | 44.73±4.24 <sup>①②</sup> | 30.31±1.73 <sup>①②</sup> |

①与假手术大鼠相比  $P<0.05$ ;②与 CCD 后 7 天组大鼠相比  $P<0.05$



图 1 TRPV4 ODN 干扰后蛋白的表达和痛阈变化的关系



变化( $P=0.93$ )。CCD 大鼠组中,对照组、AS 组和 MM 组的 TRPV4 表达量分别为  $(42.2\pm 7.19)\%$ ,  $(8.75\pm 0.25)\%$  和  $(44.6\pm 6)\%$  ( $P<0.05$ )。3 个组的基础机械痛阈值无差异( $P=0.844$ )。与基础痛阈值相比,对照组和 MM 组的机械痛阈值明显下降 (Bonferroni  $t$ -检验,  $P<0.05$ )。而在 AS 组,CCD 导致的机械痛阈值降低被部分逆转(Bonferroni  $t$ -检验,  $P>0.05$ )。该结果说明 TRPV4 参与介导持续压迫导致的机械性痛敏。

如图 1B 所示,3 组术前热刺激缩爪时间无差异 ( $P>0.05$ ),鞘内连续注射反义 ODN 第 7 天后,CCD 和 MM 组缩爪时间较术前显著降低( $P<0.001$ ),AS 组缩爪时间虽有所降低,但较术前无明显变化 ( $P=0.059$ )。该结果说明 TRPV4 参与介导持续压迫导致的热痛敏。

#### 2.4 持续神经节压迫对 TRPV4 通道功能的影响

本研究检测了 7 天假手术组和反义 ODN 干扰 CCD 大鼠 (CCD 组,AS 组和 MM 组)DRG 对各种刺激因素的反应,用细胞内钙浓度的变化表示。

低渗液可以引起细胞内钙浓度的增加,为渗透压依赖性,渗透压越低,细胞内钙浓度越高。去除溶液中的钙,细胞对低渗液体的反应丧失。如图 2 所

示,TRPV4 激动剂  $4\alpha$ -PDD ( $3\mu\text{M}$ )也可以引起细胞内钙浓度的升高。预先用  $1\mu\text{M}$  钙红孵育 10min,可以将佛波醇引起的钙反应降低 76.4%。如图 2C 所示,持续压迫 7d 后,30%低渗溶液和佛波醇引起的细胞内钙浓度的峰值产生明显变化(both  $P<0.01$ )。与假手术组相比,30%低渗溶液引起的 CCD 组和 MM 组钙浓度的峰值明显增加 (Tukey 检验,  $P<0.01$ ),对低渗溶液产生反应的 DRG 细胞比例数也明显升高 (CCD 组 52.6%,  $\chi^2=5.14$ ,  $P<0.05$ ;MM 组 50.8%,  $\chi^2=4.32$ ,  $P<0.01$ )。与 CCD 组和 MM 组相比,AS 组 DRG 对低渗溶液的反应明显降低 (Tukey 检验,  $P<0.05$ ),产生反应的 DRG 细胞比例数也明显降低 (29.1%,  $\chi^2=8.65$ ,  $P<0.01$  vs. CCD 组;  $\chi^2=7.59$ ,  $P<0.01$  vs. MM 组)。4 $\alpha$ -PDD 引起细胞内钙变化与对低渗溶液反应的变化相类似。与假手术组相比,4 $\alpha$ -PDD 引起的 CCD 组和 MM 组钙浓度的峰值明显增加 (Tukey Test, both  $P<0.01$ ),对 4 $\alpha$ -PDD 产生反应的 DRG 细胞比例数也明显升高 (CCD 组 46.1%,  $\chi^2=4.25$ ,  $P<0.05$ ;MM 组 47.6%,  $\chi^2=4.95$ ,  $P<0.05$ )。4 $\alpha$ -PDD 引起 AS 组 DRG 内钙峰值明显低于 CCD 组和 MM 组 (Tukey 检验,  $P<0.05$ ),AS 组起反

图 2 低渗溶液和 4α-PDD 引起 DRG 细胞内钙浓度的增加

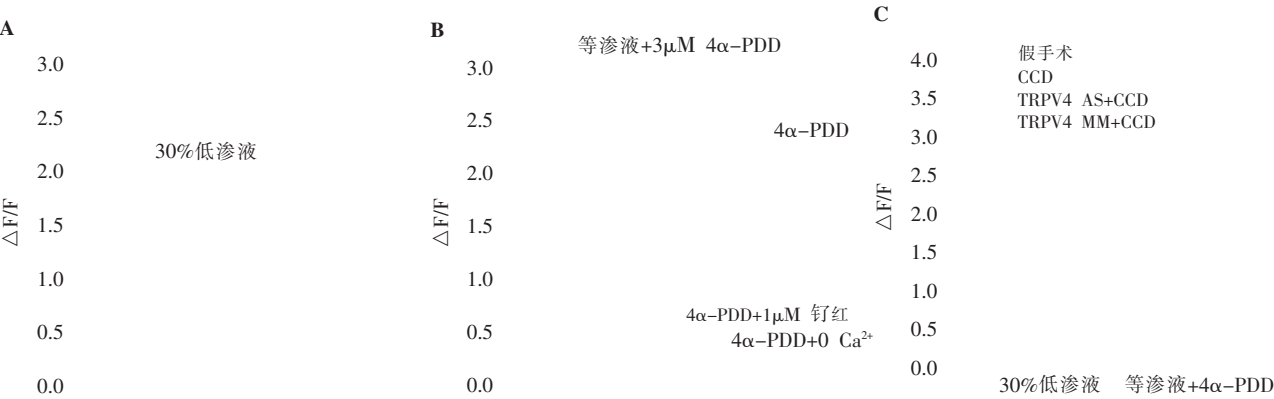


图 A、B:不同的刺激引起的细胞内钙浓度的变化的荧光曲线。去除细胞外液中的钙可以抑制刺激引起的钙浓度的变化。钇红可以抑制该反应。图 C:30%低渗溶液和 4α-PDD 引起的 DRG 细胞内钙峰值。持续压迫可以明显提高 30%低渗溶液和 4α-PDD 引起的细胞内钙峰值。TRPV4 ODN 干扰明显降低各种刺激引起的钙浓度的增加,而错配 ODN 无明显影响。  
“\*”与假手术组相比  $P<0.05$ ;“#”CCD 和 MM 组相比  $P<0.05$ 。

应的 DRG 细胞比例数也明显低于 CCD 组和 MM 组 (26.3%,  $\chi^2=7.31$ ,  $P<0.01$  vs. CCD 组;  $\chi^2=8.22$ ,  $P<0.01$  vs. MM 组)。

### 3 讨论

本研究显示,TRPV4 参与 CCD 导致的机械和热痛敏。CCD 增加 TRPV4 基因和蛋白的表达,并增强 TRPV4 对低渗溶液和 4α-PDD 的反应。TRPV4 表达和功能的改变的时程与痛阈值的降低相一致。TRPV4 反义 ODN 干扰可以部分逆转 CCD 导致的机械和热痛阈值的降低,而对大鼠的基础机械痛阈值无影响。

#### 3.1 TRPV4 参与 CCD 导致的机械和热痛敏

TRPV4 是 DRG 上一种重要的机械或渗透压感受器,能够传导伤害性的机械刺激,而在正常状态下的机械痛觉的传导过程中作用较小。TRPV4 基因敲除的小鼠表现出体液渗透压调节功能异常,对伤害性压力刺激的回避反应降低,但对非伤害性触觉的反应正常<sup>[11-12]</sup>。在化疗药紫杉醇诱导的大鼠周围神经痛模型和混合炎性物质导致的炎症痛模型中,机械性和低渗性痛觉过敏也是由 TRPV4 介导,但对基础痛阈没有影响<sup>[13-14]</sup>。

TRPV4 也是 DRG 内一种重要的温度伤害性感受器。在炎症状态下,TRPV4 基因敲除小鼠较正常

小鼠相比,表现出对热刺激不敏感<sup>[18]</sup>,说明 TRPV4 能够传导伤害性热刺激,在炎症性疼痛中发挥作用。

以上的文献报道,联合本研究结果,提示在神经性疼痛和炎症性疼痛等不同的病理状态下,TRPV4 既是一种机械感受器,又是一种温度伤害性感受器,可以介导多种原因导致的机械和热痛敏。但值得注意的是,抑制 TRPV4 的表达只能部分逆转痛敏,这提示该痛敏的产生还存在其他机制。

#### 3.2 CCD 可增加 TRPV4 基因、蛋白的表达,敏化通道功能

持续受压后,TRPV4 基因、蛋白的表达量增加,低渗溶液和 4α-PDD 引起的细胞内钙峰值升高,对低渗溶液和 4α-PDD 产生反应的 DRG 神经元的比例数也增加。TRPV4 反义 ODN 干扰可抑制 CCD 导致的钙峰值和细胞比例数的增加。这说明 CCD 可以敏化 TRPV4 的功能,而且这种敏化的时程与痛敏的产生和保持相一致。

多种因素可以影响 TRPV4 的表达和功能。紫杉醇可以增加对低渗溶液和 4α-PDD 产生反应的 DRG 神经元的比例数,但细胞内钙峰值和 TRPV4 通道蛋白的表达量没有发生变化<sup>[19]</sup>。Frederick<sup>[20]</sup>等使用多重核糖核酸酶保护测定方法,发现 CCI 没有影响损伤 DRG 上 TRPV4 mRNA 的表达。而 Yang<sup>[21]</sup>等发现慢性缺氧可以增加大鼠肺动脉壁内皮细胞中的

TRPV4 的基因和蛋白的表达,也可以明显提高低渗刺激引起的细胞内钙峰值。在不同模型中得到不同的结果,证明在不同的组织和不同的病理状态下,机体对 TRPV4 的调控方式不同。而且检测方法和动物种类对结果也有很大影响。

### 3.3 TRPV4 与 CCD 神经元的高兴奋性

许多试验已经证明,CCD 可以提高 DRG 神经细胞的兴奋性,产生自发性放电和异位放电。cAMP-PKA 能够引起 CCD 后受损 DRG 胞体的高兴奋性,而正常情况下,对此无兴奋作用<sup>[4,22]</sup>,只能引起 DRG 外周神经末梢的高兴奋性<sup>[23-24]</sup>。同样,炎性物质混合液可以增强 CCD 后受损 DRG 的放电频率和异位放电,但对未受损的 DRG 无效<sup>[25]</sup>。只有当 cAMP 达到足够的浓度,PGE2 导致的机械痛敏才转变为 TRPV4 依赖性<sup>[14]</sup>。而且,对大鼠海马神经元的研究显示,TRPV4 是神经元兴奋性的重要的调节因素<sup>[26]</sup>。我们的研究显示 CCD 可以增加 TRPV4 的表达和敏化通道的功能,而且增加的 TRPV4 可能是 CCD 神经元高兴奋性的机制之一。

CCD 模型中,插入钢棒不仅导致机械压迫、DRG 缺血、水肿<sup>[2,27]</sup>,而且伴发炎症因子的释放,如神经营养因子、细胞因子、质子、自由基、组织胺、缓激肽、5-羟色胺和类前列腺素等<sup>[28]</sup>。所以机械性异常疼痛和 TRPV4 的表达、功能的改变可能来自于机械压迫和炎症因子的共同作用。但在体试验已经证明炎症引起的异常疼痛保持的时间较短<sup>[2]</sup>,所以 CCD 导致的机械异常疼痛和 TRPV4 的表达、功能的改变可能主要来源于持续机械压迫。

总之,CCD 可以上调 TRPV4 的基因、蛋白表达,上述改变与 CCD 手术后机械和热痛敏发生的时程相一致。而且,反义 ODN 抑制 TRPV4 的表达,可部分逆转 CCD 导致的机械和热痛敏,证明 TRPV4 参与介导 CCD 导致的机械和热痛敏。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Song XJ, Vizcarra C, Xu DS, et al. Hyperalgesia and neural excitability following injuries to central and peripheral branches of axons and somata of dorsal root ganglion neurons[J]. *J Neurophysiol*, 2003, 89(4):2185—2193.
- [4] Song XJ, Wang ZB, Gan Q, et al. cAMP and cGMP contribute to sensory neuron hyperexcitability and hyperalgesia in rats with dorsal root ganglia compression [J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(1):479—492.
- [5] Tan ZY, Donnelly DF, LaMotte RH. Effects of a chronic compression of the dorsal root ganglion on voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> currents in cutaneous afferent neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2006, 95(2):1115—1123.
- [6] Yao H, Donnelly DF, Ma C, et al. Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(6):2069—2074.
- [7] Mutai H, Heller S. Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors[J]. *Cell Calcium*, 2003, 33(5—6):471—478.
- [8] Liedtke W, Kim C. Functionality of the TRPV subfamily of TRP ion channels: add mechano-TRP and osmo-TRP to the lexicon! [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(24):2985—3001.
- [9] Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor[J]. *Cell*, 2000, 103(3):525—535.
- [10] O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels[J]. *Pflugers Arch*, 2005, 451(1):193—203.
- [11] Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, et al. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4 [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25):22664—22668.
- [12] Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in TRPV4<sup>-/-</sup> mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23):13698—13703.
- [13] Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA, et al. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator [J]. *Pain*, 2005, 118(1—2):70—79.
- [14] Alessandri-Haber N, Dina OA, Joseph EK, et al. A transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators[J]. *J Neurosci*, 2006, 26(14):3864—3874.
- [15] Facer P, Casula MA, Smith GD, et al. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy[J]. *BMC Neurol*, 2007, 7:11.
- [16] Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, et al. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat [J]. *Neuron*, 2003, 39(3):497—511.
- [17] Yao A, Su Z, Nonaka A, et al. Effects of overexpression of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> transients in murine ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 1998, 82(6):657—665.

- [18] Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, et al. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia [J]. J Biol Chem, 2004, 279:35133—35138.
- [19] Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat [J]. J Neurosci, 2004, 24(18):4444—4452.
- [20] Frederick J, Buck ME, Matson DJ, et al. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 358(4):1058—1064.
- [21] Yang XR, Lin MJ, Sham JSK. Up-regulation of TRPV4 channels in pulmonary arteries of chronic hypoxic pulmonary hypertensive rats[J]. FASEB J, 2007, 21(6):A1436.
- [22] Hu SJ, Song XJ, Greenquist KW, et al. Protein kinase A modulates spontaneous activity in chronically compressed dorsal root ganglion neurons in the rat[J]. Pain, 2001, 94(1):39—46.
- [23] Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain[J]. J Neurosci, 1999, 19(6):2181—2186.
- [24] Aley KO, Levine JD. Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat [J]. Neuroscience, 2002, 111(2):389—397.
- [25] Song XJ, Zhang JM, Hu SJ, et al. Somata of nerve-injured sensory neurons exhibit enhanced responses to inflammatory mediators[J]. Pain, 2003, 104(3):701—709.
- [26] Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, et al. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4[J]. J Neurosci, 2007, 27(7):1566—1575.
- [27] Igarashi T, Yabuki S, Kikuchi S, et al. Effect of acute nerve root compression on endoneurial fluid pressure and blood flow in rat dorsal root ganglia [J]. J Orthop Res, 2005, 23(2):420—424.
- [28] Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain [J]. Curr Biol, 2006, 16(16):1591—1605.

## 本刊成功入选 WHO 西太平洋地区医学索引

经过全球卫生图书馆 (Global Health Library, GHL) 中国委员会评审, 本刊 2009 年已成功入选 WHO 西太平洋地区医学索引。世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 近年来启动的全球卫生图书馆 (Global Health Library, GHL) 项目内容之一是建立全球医学索引 (Global Index Medicus, GIM), 提供全世界医学文献题录及文摘, 旨在增进全球卫生医学信息资源的收集、组织、传播和获取利用, 实现资源共享。WHO 西太平洋地区医学索引 (The Western Pacific Region Index Medicus,

WPRIM) 主要收录 WHO 西太平洋地区成员国出版的覆盖卫生、生物医学领域的期刊题录信息。WPRIM 与 WHO 其他五个区域的地区医学索引共同组成了 GIM, 研究人员可以通过联合搜索引擎查找、下载所需要的相关信息。本刊成为 2009 年入选 WPRIM 的中国期刊 (<http://www.wprim.org/>)。WPRIM 平台已于 2010 年 5 月开通。