

瞬时感受器电位离子通道4在大鼠背根神经节持续受压后异位放电中的作用*

范真真¹ 曲玉娟¹ 魏 慧¹ 王永慧¹ 马剑锋² 岳寿伟^{1,3}

摘要

目的:利用在体神经纤维电生理技术记录大鼠背根神经节(DRG)持续受压(CCD)后的异位放电情况,明确瞬时感受器电位离子通道4(TRPV4)是否参与了CCD后受损DRG的异位放电。

方法:共采用35只Wistar大鼠。制备大鼠DRG的CCD模型,分别于术前和术后测量损伤侧的机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期。利用在体神经纤维电生理技术分别记录正常组大鼠DRG及CCD组、CCD+钡红(RR)组、CCD+佛波醇(4 α -PDD)组受损DRG神经元的异位放电情况。

结果:持续压迫明显降低大鼠损伤侧的机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期($n=30, P < 0.05$);CCD组可以记录到受损DRG神经元的异位放电,放电率约为67%,而正常组DRG的异位放电率约为4.5%;以TRP家族阻断剂钡红(RR)100 μ m孵育受损DRG,较CCD组受损DRG神经元异位放电的频率和波幅均明显下降($n=10, P < 0.05$);以TRPV4特异性激动剂佛波醇(4 α -PDD)10 μ m孵育受损DRG,较CCD组受损DRG异位放电频率和波幅均明显增加($n=10, P < 0.05$)。

结论:CCD后受损DRG可出现异位放电,TRPV4参与了CCD后受损DRG的异位放电。

关键词 异位放电;瞬时感受器电位离子通道4;背根神经节;持续压迫;电生理技术

中图分类号:R338.8, R745 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-03-0193-05

The role of transient receptor potential vanilloid 4 in mediating the ectopic discharges following chronic compression of dorsal root ganglion in rats/ FAN Zhenzhen, QU Yujuan, WEI Hui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(3): 193—197

Abstract

Objective: To investigate the role of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in mediating the ectopic discharges of the injured dorsal root ganglion(DRG) with chronic compression.

Method: A total of 35 Wistar rats were used. Chronic compression of dorsal root ganglion(CCD) model was established. Mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency were administered before and after operation. The ectopic discharges of normal DRG and injured DRG were recorded by nerve fibers electrophysiological technique in vivo.

Result: Mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency reduced significantly after CCD ($n=30, P < 0.05$); The ectopic discharges were present in 67% of the fibers recorded from DRG neurons injured with chronic compression in contrast to 4.5% from uninjured DRG neurons; Compared with CCD group the frequency and amplitude of ectopic discharges decreased significantly after incubating the injured DRG with TRPs inhibitor 100 μ m RR($n=10, P < 0.05$); Compared with CCD group frequency and amplitude of ectopic discharges increased significantly after incubating the injured DRG with TRPV4 specific activator 10 μ m 4 α -PDD($n=10, P < 0.05$).

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.03.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872732;81071597)

1 山东大学齐鲁医院康复科,济南,250012; 2 山东大学医学院机能实验室; 3 通讯作者

作者简介:范真真,女,硕士研究生; 收稿日期:2012-11-10

Conclusion: TRPV4 plays a crucial role in mediating ectopic discharges of injured DRG after CCD.

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

Key word ectopic discharge; transient receptor potential vanilloid 4; dorsal root ganglion; chronic compression; electrophysiological technique

腰背痛主要源于脊柱及其周围结构的异常,由小关节痛、椎间盘突出、椎管狭窄、肿瘤、感染、血管畸形及坐骨神经痛等引起^[1]。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)在腰背痛的发病过程中起重要作用,各种损伤因素导致背根神经节持续受压(chronic compression of dorsal root ganglion, CCD)产生的根性神经痛是最常见致病原因^[2]。DRG持续受压后可产生自发性疼痛、机械性的异常疼痛和热痛觉过敏,而且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成为异位放电的来源,即使无交感神经活动或者内源性化学激活物质,仍存在自发放电^[3-5]。

背根神经节上的瞬时感受器电位离子通道(transient receptor potential vanilloid, TRPV)家族中的TRPV2及TRPV4都被认为与机械性疼痛有关^[6-7],其中TRPV4的作用越来越受到关注。TRPV4是一种非选择性的外向整流阳离子通道,可以被温度、低渗透压、佛波醇酯(4α -phorbol 12, β -didecanoate, 4α -PDD)、低pH等激活,被钨红(ratheniumred, RR)及反义寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)、SiRNA等抑制或阻断^[8-9]。TRPV4对钙离子和钠离子都有通透性,钙钠的通透比值为5:7,TRPV4受体激活后引起细胞内钠离子和钙离子浓度增加,异位放电增加^[10]。TRPV4基因敲除的小鼠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^[11],同时这类小鼠对热刺激不敏感^[12]。以上文献报道提示在神经性疼痛和炎症性疼痛等不同的病理状态下,TRPV4可以介导多种原因引起的机械和热痛敏。

有报道称,通过膜片钳技术可以记录到离体的持续受压的DRG细胞出现异位放电,DRG细胞经(phorbol 12, 13-dibutyrate, PDBu)孵育后,在DRG细胞上可以记录到一显著增强的TRPV4放电^[13]。因此,我们推测TRPV4可能与CCD后受损DRG的异位放电有关。本实验拟采用在体神经纤维电生理技

术观察CCD后受损DRG异位放电情况及RR和 4α -PDD对放电的影响,明确TRPV4是否参与了CCD后受损DRG的异位放电。

1 材料与方法

1.1 试剂与主要仪器

健康雄性Wistar大鼠35只,体重180—220g,由山东大学实验动物中心提供,随机分为正常组5只,CCD组、RR组和 4α -PDD组各10只。常规试剂:氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、氯化钙(CaCl_2)、氯化镁(MgCl_2)、氢氧化钠(NaOH)、葡萄糖(Glucose)、戊巴比妥钠、液体石蜡等购自山东试剂厂;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、 4α -PDD、RR购自美国Sigma公司;BME-403型Von Frey机械痛刺激仪和BME-410A型热痛刺激仪由中国医学科学院生物医学工程研究所生产;BL-420E⁺生物机能实验系统购自成都泰盟科技有限公司。

1.2 模型的制备与行为学测量

1.2.1 背根神经节持续受压模型的制备:腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg)麻醉动物,消毒后进行手术。沿L4—S1脊柱右侧切开皮肤,钝性分离脊柱右侧肌肉至横突,暴露右侧L5—L6横突及其间的L5椎间孔。将一根L型钢棒(每侧长约4mm,直径0.63mm)插入椎间孔,以对右侧L5背根神经节及邻近神经根形成持续的压迫^[3]。

1.2.2 机械痛阈和热痛阈的测量:①机械刺激缩爪反应痛阈(mechanical withdrawal threshold)的测量:每次测试前让大鼠在铺有金属网格的透明玻璃箱里适应30min,然后采用一套标有固定刻度的Von Frey针丝刺激足心,刺激强度由小到大,逐渐增加。同一强度的Von Frey针丝对同一个足底刺激5次,每次刺激间隔为5min。如大鼠出现快速缩足或舔足,即为阳性反应。5次中有3次以上出现阳性反应(>60%)的最小刺激强度为该侧后足的机械痛阈。②热辐射刺激缩爪反应潜伏期(thermal with-

drawal latency)的测量:每次测试前让大鼠在铺有6mm厚的有机玻璃板的透明玻璃箱里适应30min,当其安静且后爪接触玻璃板时,使热痛刺激仪的光源聚焦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。

1.3 背根神经节异位放电的引导及记录

DRG持续受压后第3—8天的大鼠,腹腔注射戊巴比妥钠(50mg/kg)将其麻醉,进行腰骶部椎板切开术,在L1—L2和L4—L5分别制备2个浴槽。在L4—L5浴槽内,充分暴露受压迫的L5背根神经节,并在其外周端5—10mm处切断脊神经,以中断外周感受器传入冲动,另外切断L5周围的交通支,以中断其他节段感觉的传入,并在该浴槽内加入35—37℃的人工脑脊液,其成分为:NaCl 150mmol/L, KCl 5mmol/L, MgCl₂ 1mmol/L, CaCl₂ 2mmol/L, Glucose 10mmol/L, Tris 5mmol/L, pH 7.4。在L1—L2浴槽内,分离与辨认连接受损DRG的L5背根神经,并用35—37℃的液体石蜡覆盖^[3]。在显微镜下用精细制表镊从L5背根神经分离出直径约30—50 μm的神经细束,将中枢端悬挂在铂金丝(直径25 μm)引导电极上,参考电极插入附近的皮肤组织内,通过BL-420E⁺生物机能实验系统记录来自损伤DRG的异位放电^[4]。

1.4 统计学分析

所测数据采用SPSS 17.0统计软件进行分析。采用配对样本*t*检验分析对照组与CCD组间机械痛阈、热辐射刺激缩爪反应潜伏期的差异,以及用药前后放电频率、放电波幅的变化。采用χ²检验分析对照组与CCD组间放电率的差异,所有结果采用均数±标准差表示。

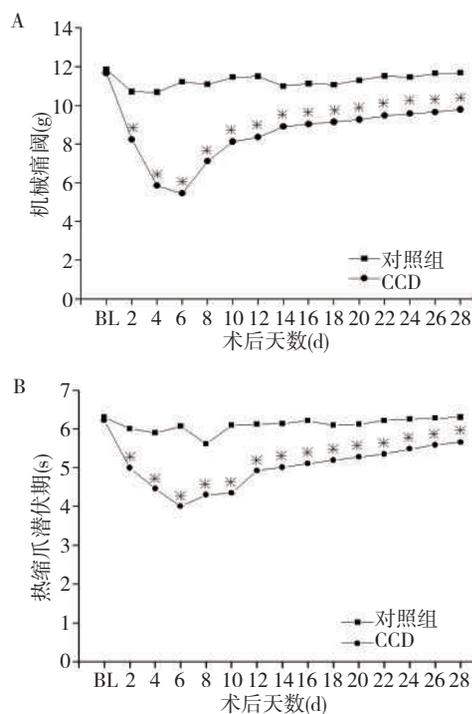
2 结果

2.1 背根神经节持续受压后机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期

CCD明显降低机械痛阈和缩短热辐射刺激缩爪反应潜伏期(见图1, $P < 0.05$)。术后第1天机械

痛阈开始下降,到第5—7天达到最低值,然后逐渐恢复,但直到术后第28天,CCD组大鼠的机械痛阈仍明显低于正常对照组大鼠(见图1A, $P < 0.05$)。热辐射刺激缩爪反应潜伏期的变化趋势与机械痛阈相似,CCD组大鼠的热辐射刺激缩爪反应潜伏期明显缩短(图1B, $P < 0.05$)。

图1 机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期的时间变化曲线



与对照组大鼠相比: * $P < 0.05$ 。BL: 基线

2.2 背根神经节持续受压后受损背根神经节神经元的异位放电

2.2.1 受损背根神经节的异位放电:大鼠背根神经节持续受压后第3—8天,受损DRG异位放电的放电率明显升高($P < 0.05$),与报道一致^[4]。实验观察了10例CCD模型大鼠,共记录到了42根神经束,其中28根异位放电阻性,放电率约为67%,所记录的放电波形波宽较窄,且峰峰间期比较稳定(见图2B)。在相同条件下实验观察了5例正常大鼠的DRG放电,共记录到了22根神经束,其中1根自发放电阳性,放电率约为4.5%,放电波形与异位放电相似。

2.2.2 钉红对受损背根神经节异位放电的影响:实验观察了10例CCD大鼠,共记录到了37根神经束,

图2 正常DRG和CCD后受损DRG的异位放电



A: 正常DRG无放电; B: CCD后受损DRG的异位放电, 放电率较高, 受损DRG放电波形波宽较窄, 且峰峰间期比较稳定。

表1 CCD后加入RR及4α-PDD前后频率和峰放电波幅的比较 (x±s)

组别	加药前		加药后	
	频率 (Hz)	峰放电波幅 (μV)	频率 (Hz)	峰放电波幅 (μV)
CCD+RR组	139.53 ± 6.93	10.55 ± 0.86	122.16 ± 4.53 ^①	8.09 ± 0.80 ^②
CCD+4α-PDD组	134.48 ± 1.61	9.79 ± 0.98	157.52 ± 1.75 ^③	14.66 ± 2.14 ^④

与加RR前相比: ①P < 0.05; ②P < 0.05; 与加4α-PDD前相比: ③P < 0.05; ④P < 0.05

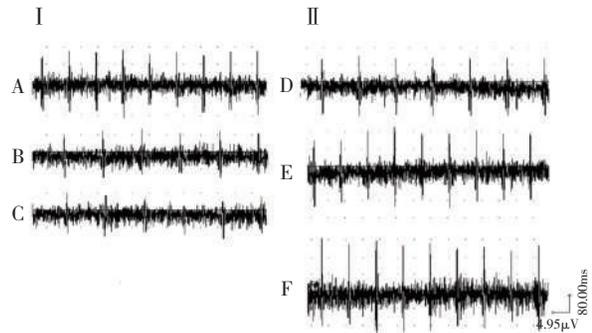
其中24根异位放电阳性的神经束对RR有反应。在L4—L5孵育槽内加入100μm RR孵育受损DRG, 较加药前受损DRG异位放电频率和波幅均下降(P < 0.05, 见表1), 30min后神经放电几乎被完全阻断(见图3 I), 用人工脑脊液冲洗后放电活动未恢复。

2.2.3 佛波醇对受损背根神经节异位放电的影响: 实验观察了10例CCD大鼠, 共记录到了40根神经束, 其中26根异位放电阳性的神经束对4α-PDD有反应。根据文献报道^[13], 在L4—L5孵育槽内加入10μm的4α-PDD对受损DRG进行孵育, 较加药前受损DRG异位放电频率和波幅均升高(P < 0.05, 见表1), 20min后异位放电达最大值且稳定(见图3 II)。

3 讨论

DRG作为感觉传入的第一级神经元, 它的主要功能是对支配的神经纤维起营养和支持作用, 正常情况下, DRG神经元胞体既不直接传递电活动, 也不直接产生自发放电^[13]。当DRG及外周神经受损后, 该神经元的生理功能会产生明显的改变, 表现为兴奋性过高, 体内微小的物理或化学变化的刺激都可导致神经损伤区或相应的感觉神经胞体大量持久地产生异位放电活动, 进而出现自发疼痛、痛觉过敏及感觉异常等慢性神经病理痛症状, 成为神经病理性痛的信号源^[14]。

图3 100μm RR和10μm 4α-PDD对受损DRG异位放电的影响



I A: 加RR前受损DRG的异位放电; I B: 以100μm RR孵育受损DRG过程中的异位放电; I C: 以100μm RR孵育受损DRG 30min后的异位放电, 与加药前相比频率降低了(17.37 ± 1.15)Hz, 波幅降低了(2.46 ± 0.15)μV (n=24, P < 0.05)。

II D: 加4α-PDD前受损DRG的异位放电; II E: 以10μm 4α-PDD孵育受损DRG过程中的异位放电; II F: 以10μm 4α-PDD孵育受损DRG 20min后的异位放电, 与加药前相比频率增加了(23.04 ± 2.49)Hz, 波幅增加了(4.87 ± 0.34)μV (n=26, P < 0.05)。两者加药前后放电波形没有变化。

CCD模型中, 椎间孔处插入的钢棒可对DRG产生机械压迫, 使其缺血、水肿以及促进炎症因子的释放, 进而提高受损DRG神经元的兴奋性, 表现为电流阈值和动作电位阈值的降低及自发性放电增加^[3,5]。DRG神经元的高兴奋性导致脊髓背角高兴奋性, 进而产生痛敏和异常疼痛^[15]。本实验通过建立CCD模型, 采用在体神经纤维电生理技术记录受损DRG的放电的情况, 发现受损DRG的异位放电率明显增加, 而且CCD大鼠的机械痛阈和热辐射刺激缩爪反应潜伏期明显降低, 与上述报道一致^[3]。

本课题组前期研究结果显示, CCD可以明显增加受损DRG中TRPV4基因、蛋白的表达, 并敏化TRPV4通道的功能。另外, TRPV4既是大鼠DRG中重要的机械感受器, 又是DRG中重要的温度伤害性感受器, 能够介导CCD导致的机械和热痛敏^[16]。对大鼠海马神经元的显示, TRPV4是神经元兴奋性的重要调节因素^[17]。所以, 增加的TRPV4可能是CCD神经元高兴奋性的机制之一。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。所以, TRPV4可能是CCD后受损DRG产生异位放电的机制之一。

钆红是TRP家族的阻断剂, 能抑制TRP通道的开放^[18]。有报道称100μm钆红可以阻断89%的颈动

脉窦压力感受器上的TRP通道,使其自发放电降低^[9]。本研究以100 μm 钉红孵育受损DRG,发现受损DRG异位放电频率和波幅均明显下降,用人工脑脊液冲洗仍无恢复,与报道相一致。这提示TRP家族可能参与了受损DRG的异位放电过程。4 α -PDD是一种非蛋白磷脂酶c途径激活通道的佛波酯类,对TRPV4有强效的特异性激动作用^[13],激活TRPV4受体,使异位放电增加。10 μm 的4 α -PDD可以显著升高受损DRG放电频率及波幅。以上两个结果提示TRP4可能参与了受损DRG的异位放电过程。

4 结论

CCD后受损DRG出现异位放电,TRPV4参与了CCD后受损DRG的异位放电过程。

参考文献

- [1] Govind J. Lumbar radicular pain[J]. Aust Fam Physician, 2004, 33(6):409—412.
- [2] Ma C, Greenquist KW, Lamotte RH. Inflammatory mediators enhance the excitability of chronically compressed dorsal root ganglion neurons[J]. J Neurophysiol, 2006, 95(4):2098—2107.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 岳寿伟. TRPV4在根性神经痛中的作用机制[J]. 中国康复医学杂志, 2010, 25(10):921—922.
- [8] Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, et al. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels[J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(4):183—191.
- [9] 刘廷会, 魏华, 赵海燕, 等. 苯阿米洛利和钉红对颈动脉窦压力感受器放电的阻断作用[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(02):218—223.
- [10] Nilius B, Watanabe H, Vriens J. The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour [J]. Pflugers Arch, 2003, 446(3):298—303.
- [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] 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(34):35133—35138.
- [13] Cao DS, Yu SQ, Premkumar LS. Modulation of transient receptor potential Vanilloid 4-mediated membrane currents and synaptic transmission by protein kinase C[J]. Molecular Pain, 2009, (5):5.
- [14] 李云庆, 陈军, 胡三觉. 神经病理性痛模型的创建及其在镇痛机制和治疗研究中的应用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2010, 16(04):236—237.
- [15] Zhang Y, Wang YH, Ge HY, et al. A transient receptor potential vanilloid 4 contributes to mechanical allodynia following chronic compression of dorsal root ganglion in rats[J]. Neuroscience Letters, 2008, 432(3):222—227.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Bobkov YV, Ache BW. Pharmacological properties and functional role of a TRP-related ion channel in lobster olfactory receptor neurons[J]. J Neurophysiol, 2005, 93(3):1372—1380.