

大鼠背根神经节持续受压后脊髓背角 TRPV4 蛋白表达及分布的变化*

曲玉娟¹ 张 晓¹ 魏 慧¹ 怀 娟¹ 张 杨¹ 岳寿伟^{1,2}

摘要

目的:探讨大鼠背根神经节持续受压(chronic compression of the dorsal root ganglion, CCD)后瞬时感受器电位离子通道香草素亚族受体4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)在脊髓背角中的蛋白表达及分布规律。

方法:选取清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只,按随机数字表法分组:空白对照组 5 只,手术组 25 只(术后 4 天、7 天、14 天、28 天各 5 只;免疫荧光组 5 只)。制备大鼠背根神经节持续受压模型,于术后 4 天、7 天、14 天及 28 天,测量机械刺激缩爪反应痛阈,观察机械痛阈的变化;利用 western blot 技术检测空白对照组及术后 4 天、7 天、14 天及 28 天,手术侧及对侧脊髓背角 TRPV4 蛋白表达的变化;利用免疫荧光技术检测术后 4 天,手术侧与对侧脊髓背角 TRPV4 阳性细胞分布。

结果:大鼠背根神经节持续受压后 4—14 天,机械痛阈值明显下降($P<0.001$);术后 4—7 天,手术侧脊髓背角 TRPV4 表达升高($P<0.01$),对侧无明显变化;手术侧脊髓背角内 TRPV4 阳性细胞数目高于对侧($P=0.0008$)。

结论:大鼠背根神经节持续受压后,机械痛阈下降的同时,手术侧脊髓背角内 TRPV4 蛋白表达上调及阳性数目增多,TRPV4 可能参与 CCD 后病理性神经痛的中枢敏化机制。

关键词 脊髓背角;TRPV4;病理性神经痛

中图分类号: R744, R493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1242(2017)-02-0151-05

Alternation of TRPV4 protein expression and distribution in spinal dorsal horn in chronic compression of the dorsal root ganglion model of rats/QU Yujuan, ZHANG Xiao, WEI Hui, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(2): 151—155

Abstract

Objective: To investigate the alternation of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) protein expression and distribution in spinal dorsal horn in chronic compression of the dorsal root ganglion(CCD) model of rats.

Method: A total of 30 Wistar rats were randomly divided into a control group (5 rats) and operated group (4, 7, 14 and 28 days after operation, 5 rats in each group; and 5 rats in immunofluorescence group). Chronic compression of dorsal root ganglion (DRG) model was established. At 4, 7, 14 and 28 days after CCD operation, the paw withdrawal mechanical threshold was tested, then the expression of TRPV4 in ipsilateral and contralateral spinal dorsal horn was tested. The distribution of TRPV4 positive neurons in ipsilateral and contralateral spinal dorsal horn were detected at 4 days after operation.

Result: 4—14 days after CCD operation, the paw withdrawal mechanical threshold decreased significantly($P<0.001$). 4—7 days after CCD operation, the expression of TRPV4 in ipsilateral spinal dorsal horn was up-regulated ($P<0.01$), while there was no significant change of TRPV4 in contralateral spinal dorsal horn. At 4 days after CCD operation, the number of TRPV4 positive neurons in ipsilateral spinal dorsal horn was significantly

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.02.005

*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:曲玉娟,女,博士研究生;收稿日期:2015-05-18

more than that in contralateral spinal dorsal horn ($P=0.0008$).

Conclusion: After CCD operation, the paw withdrawal mechanical threshold decreased, the expression of TRPV4 in ipsilateral spinal dorsal horn was up-regulated and the number of TRPV4 positive neurons increased. TRPV4 may take part in the central sensitization mechanism of neuropathic pain of CCD rats.

Author's address Qilu Hospital of Shandong University, NO.107 Wenhuxi Road, Jinan, 250012

Key word spinal dorsal horn; TRPV4; neuropathic pain

由椎间盘突出及椎间孔狭窄等引起的脊神经节或脊神经根受压导致的疼痛是临床上常见的慢性疼痛症状^[1]。大鼠背根神经节持续受压(chronic compression of dorsal root ganglion, CCD)模型可有效地模拟腰椎间盘突出症时脊神经节受压状态,术后大鼠出现自发疼痛、痛觉过敏、异位放电等病理性神经痛现象。瞬时感受器电位离子通道4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)是TRP家族的一员,是一种多觉型感受器,可被低渗、机械刺激、热、佛波醇醋、低pH值、柠檬酸盐、anandamide(AEA)和其代谢产物花生四烯酸(arachidonic acid, AA)及bisandrographolide A(BAA)等激活^[2-4]。本课题组前期的研究发现,TRPV4介导大鼠背根神经节持续受压后病理性神经痛的产生与传导^[5-7]。脊髓背角神经元是伤害性信号传递通路上的中间神经元,有研究表明外周组织及神经的炎症使脊髓内TRPV1、TRPA1及TRPM8表达上调^[8-10],而有关TRPV4在脊髓背角处的变化与疼痛信号传递的研究甚少。本研究探讨大鼠背根神经节持续受压后脊髓背角TRPV4蛋白表达及分布的变化,为腰椎间盘突出所致疼痛的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康清洁级雄性Wistar大鼠30只,2—3月龄,体重200—220g,由山东大学动物实验中心提供,按随机数字表法分组。空白对照组5只,手术组25只(术后4d、7d、14d、28d各5只;免疫荧光组5只)。实验试剂及仪器,总蛋白提取试剂盒(贝博,上海,中国),兔抗TRPV4多克隆抗体(1:800, Abcam, Cambridge, UK),兔抗 β -Tubulin抗体(1:1000, CST, USA),山羊抗兔二抗(1:8000, 中杉金桥, 北京, 中国), Andy Fluor 488 荧光二抗(GeneCopoeia, USA),一抗稀释液(碧云天, 上海, 中国), HRP化学

发光试剂盒(1:1, USA), BME-404型电子式机械测痛仪(中国医科院)。

1.2 背根神经节持续受压模型制备

腹腔注射10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉大鼠,剃除背部鼠毛,消毒皮肤后,在两侧髂棘连线正中切开皮肤,向上延长约2cm,于右侧筋膜三角上端稍偏外侧剪开深筋膜及肌肉,向外拨开鼠尾提肌,可见L4及L5乳突,小心分离椎间孔外肌肉,暴露右侧L4及L5椎间外孔,将直径0.63mm“L”形棒的长端沿L4及L5椎间外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,腹腔注射青霉素预防感染。术后大鼠没有发生自噬现象,也没有表现出感觉完全缺失。

1.3 机械痛阈的测量

机械刺激缩爪反应痛阈(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)的测量,室温25℃,安静明亮,将大鼠置于40×20×40cm的红色半透明玻璃笼内,底部及顶部无玻璃覆盖,底部铺以孔洞大小为0.5×0.5cm的金属网格。大鼠适应环境30min后,以BME-404型电子式机械测痛仪进行测试。以针刺端垂直刺激大鼠足底第三、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。

Western blot 免疫印迹检测:腹腔注射10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉大鼠,用预冷生理盐水快速灌注,冰上快速取出L4及L5节段脊髓。将脊髓组织从中间纵切,分别研磨至无明显肉眼可见固体物质,每100mg组织加入500 μ l总蛋白提取混合液,静置15min,以上操作均在冰上进行。4℃,12000r/min离心15min,取上清,加入4倍体积5 $\times$ 上样缓冲液,95℃,6—8min使蛋白变性,-20℃保存。取蛋白样品10 μ l于聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,5%浓缩胶

中恒定电压80V,分离约30min,待loading buffer至分离胶且蛋白Marker分散清晰后,切换电压至120V,约1—1.5h后,将蛋白转印至0.45nm PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭1—1.5h。一抗孵育,4℃摇床上过夜。TBST洗膜3×10min,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育1.5h,再次用TBST洗膜3×10min,加入新鲜配制HRP化学发光试剂,FcluroChem9900成像系统显影。采用Quantity one软件进行光密度分析。

免疫荧光检测:腹腔注射10%水合氯醛(0.3ml/100g)麻醉大鼠,用预冷的PBS 200ml快速灌注至肝脏变为灰白色,然后用4%多聚甲醛100ml慢速灌注至大鼠出现PFA舞蹈至僵硬,取L4及L5节段脊髓,浸入10倍以上体积4%多聚甲醛4℃过夜,脱水浸蜡,包埋,制作5μm厚石蜡切片。脱蜡复水,PBS清洗,用0.01M, pH6.0枸橼酸缓冲液, 92—98℃, 15min,进行抗原修复。PBS清洗后,一抗孵育,4℃湿盒内过夜。PBS再次清洗后加荧光二抗,37℃, 30min。PBS清洗,DAPI染核,37℃,30min。防淬灭封片剂封片,采用DMRXA全自动明场/荧光显微镜和Q550A图像分析系统采集图像,用IPP6.0图像分析软件进行分析,统计阳性细胞数目。

1.4 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±标准差形式表示, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。机械痛阈及western blot光密度分析结果组间比较采用单因素方差分析;免疫荧光分析结果采用配对 t 检验进行比较。

2 结果

2.1 大鼠背根神经节持续受压后机械痛阈变化

手术组分别于术前及背根神经节持续受压后4d、7d、14d、28d测量大鼠机械刺激缩爪反应痛阈,对照组同时进行测量。与术前相比,术后4d、7d及14d时机械痛阈值明显下降,差异有显著性意义($P<0.001$);对照组不同时间测量结果无明显差异。

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

于术后4、7、14及28d进行完行为学测试后取材。与空白对照组比较,大鼠背根神经节持续受压后4d及7d,手术侧脊髓背角TRPV4表达升高,差异有显著性意义($P<0.01$);14天及28天,差异显著性意义。手术对侧与对照组相比,差异无显著性意义。见图1及表2。

2.3 大鼠背根神经节持续受压后脊髓背角TRPV4阳性细胞数目变化

大鼠背根神经节持续受压4天后,手术侧及对侧均存在TRPV4阳性细胞,荧光信号分布于胞质及胞膜上,轴丘处荧光信号集中。共5只大鼠,每只大鼠选取5张不连续切片,统计高倍视野内,脊髓背角TRPV4阳性细胞数目。相较于对侧,手术侧脊髓背角内TRPV4阳性细胞数目较多,差异有显著性意义($P=0.0008$)。见图2。

3 讨论

慢性疼痛广泛存在于多种疾病过程中,其中炎性疼痛和神经性疼痛最常见。炎性疼痛是由创伤、感染等引起外周组织损伤,发生炎症,而引起的疼痛,特征性表现是受损组织对热刺激、机械刺激等的敏感性升高。神经性疼痛是由于外周和中枢神经系统(如传入神经、脊髓或大脑)等结构损伤或部分功能异常引起的慢性疼痛状态,以自发性疼痛、痛觉过

表1 大鼠背根神经节持续受压后机械痛阈变化

($\bar{x}\pm s$, G)

组别	背根神经节持续受压后时间				
	术前	第4天	第7天	第14天	第28天
对照组	35.07±2.15	36.28±1.53	35.39±2.37	34.46±1.10	36.28±1.57
CCD组	32.19±2.17	24.01±1.22 ^①	24.52±1.24 ^①	26.63±1.19 ^①	30.75±2.38

①与对照组相比 $P<0.001$

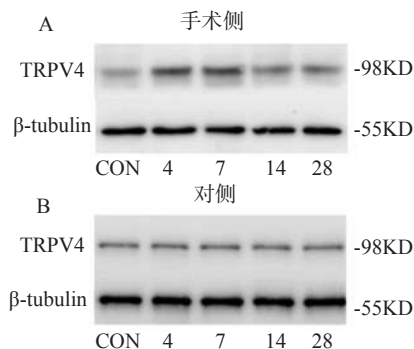
表2 脊髓背角TRPV4蛋白表达光密度分析结果

($\bar{x}\pm s$, %)

	背根神经节持续受压后时间				
	术前	第4天	第7天	第14天	第28天
对侧	40.26±6.98	43.36±4.32	40.10±4.62	40.82±5.13	39.38±4.95
手术侧	37.74±4.41	63.69±11.85 ^①	66.17±14.99 ^①	48.00±7.48	46.67±6.56

①手术侧,与术前相比, $P<0.01$

图1 手术侧及对侧脊髓背角 TRPV4蛋白表达情况

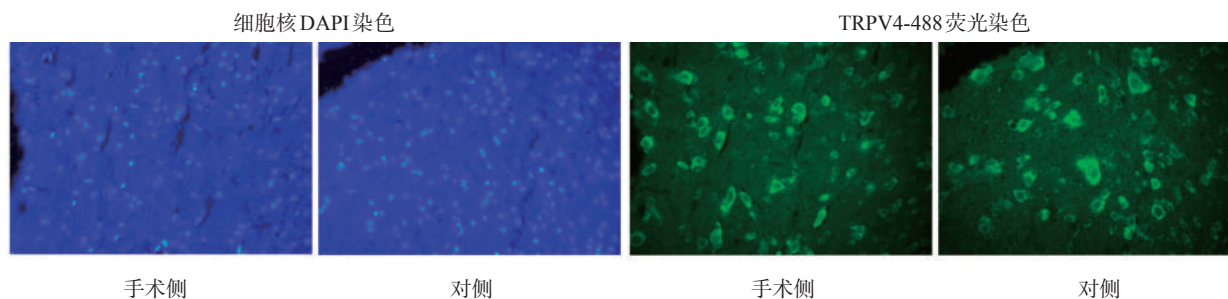


敏和触诱发痛为特征,又称病理性神经痛。两种疼痛机制并非完全孤立,而是相互关联,相互影响的。大鼠背根神经节持续受压模型有效地模拟腰椎间盘突出所致的慢性疼痛状态,大鼠机械刺激缩爪反应阈值的改变可有效地反映大鼠的机械痛敏状态。

疼痛的传导起始于背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中的初级感觉神经元,称为“伤害性感受器”(nociceptor)^[11]。其神经纤维的中枢端将伤害性信息传向脊髓背角,终止于脊髓背角的浅层和深层中间神经元,这些神经元再发出神经纤维经脊髓丘脑侧束等痛觉传导通路,进一步将伤害性信息

图2 大鼠背根神经节持续受压4天后,脊髓背角 TRPV4阳性细胞数目比较

(×400)



上传至丘脑和大脑,经加工整合最后产生痛觉。其中伤害性感受器将刺激信号转变为神经冲动,再沿初级传入神经纤维传到脊髓背角,是痛觉信号产生及整合放大的过程,是痛觉传递通路的重要环节。在CCD模型中,对DRG的慢性压迫,使其缺血、水肿,促进炎性介质释放,引起DRG神经元的兴奋性增高,通过A δ 及C类纤维将伤害性刺激信号传入脊髓背角,进而兴奋脊髓背角,产生痛敏和异常疼痛。

脊髓背角是伤害性信息传入的第一站,是脊髓中神经结构和化学组成最复杂的区域。神经损伤后脊髓去抑制被认为是中枢敏化和神经病理性疼痛综合征的主要机制^[12-13]。脊髓背角是阿片类等镇痛药物的主要作用部位。初级感觉传入神经元末梢主要终止于脊髓背角的I, II和V三层,其中A δ 传入纤维主要终止于脊髓背角的I, II, III, V层;C纤维终止于I, II, III层。脊髓背角内含有种类丰富、数量众多的神经活性物质及受体,主要分布于板层I—II。当外周组织受损后,伤害性信号经C纤维传入,并释放神经生长因子、P物质(substance P, SP)、谷

氨酸、降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)等递质或调质,然后作用于相应的受体,如神经激肽1受体和N-甲基-D-天门冬氨酸受体等,致使脊髓背角神经元兴奋性升高。另外,外周伤害性信息的不断传入可引起脊髓背角一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、即刻早期基因(如c-Fos)、环氧合酶、神经递质及其受体、神经肽等表达上调。这些变化共同导致脊髓背角神经元的过度兴奋,进而导致中枢敏化的形成。本课题组前期的研究主要着眼于CCD后的外周敏化机制的研究,但脊髓背角作为伤害性信息传导通路中不可或缺的重要组成部分,亟需进一步的研究。

瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)通道是一种普遍存在于各种细胞的非电压依赖性阳离子通道蛋白,广泛分布于大脑、脊髓、外周神经系统、心脏、肾脏、肺、血管内皮、平滑肌、胃肠道、前列腺、卵巢、子宫等组织细胞。它具有介导感觉传导,参与细胞信号转导及调节发育等作用。研究表明TRPV1、TRPA1和-TRPM8通道在感觉传导

纤维介导的外周至中枢神经系统的疼痛信号传递中期重要作用,鞘内注射相应的激动剂和拮抗剂可影响啮齿动物神经性疼痛模型中的痛觉过敏^[8-10,14]。TRPV4通道是TRP香草素受体亚家族的成员,我们前期的研究结果显示,大鼠背根神经节持续受压可使受损DRG中TRPV4基因、蛋白表达上调,并敏化TRPV4通道的功能,TRPV4参与介导CCD后的机械痛敏及热痛敏。另有对大鼠海马神经元的研究显示,TRPV4可调节海马神经元的兴奋性^[15]。

本研究初步观察了大鼠背根神经节持续受压后,脊髓背角内TRPV4蛋白表达及分布的变化,结果显示,术后大鼠手术侧机械痛敏增强的同时,TRPV4蛋白表达明显增加,TRPV4阳性细胞数目较对侧增加。TRPV4可能参与大鼠背根神经节持续受压所致病理性神经痛在脊髓背角的中枢敏化机制,但相关的上下游分子及影响机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] Goupille P, Mulleman D, Valat JP. Radiculopathy associated with disc herniation[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65:141—143.
- [2] O'Neil RG, Heller S. The mechanosensitive nature of TRPV channels[J]. *Pflugers Arch*, 2005, 451:193—203.
- [3] Smith PL, Maloney KN, Pothen RG, et al. Bisandrographolide from *Andrographis paniculata* activates TRPV4 channels[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281:29897—29904.
- [4] Watanabe H, Vriens J, Prenen J, et al. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels[J]. *Nature*, 2003, 424:434—438.
- [5] 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.
- [6] Wei H, Zhang Y, Fan ZZ, et al. Effects of colchicine-induced microtubule depolymerization on TRPV4 in rats with chronic compression of the dorsal root ganglion[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 534:344—350.
- [7] 范真真, 曲玉娟, 魏慧, 等. 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[J]. *中国康复医学杂志*, 2013, 28(3):193—197.
- [8] Lappin SC, Randall AD, Gunthorpe MJ, et al. TRPV1 antagonist, SB-366791 inhibits glutamatergic synaptic transmission in rat spinal dorsal horn following peripheral inflammation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 540:73—81.
- [9] Da CDS, Meotti FC, Andrade EL, et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperaesthesia in persistent inflammation[J]. *Pain*, 2010, 148:431—437.
- [10] Su L, Wang C, Yu YH, et al. Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12:120.
- [11] Woolf, C.J. And Q. Ma. Nociceptors--noxious stimulus detectors[J]. *Neuron*, 2007, 55(3):353—364.
- [12] Castro-Lopes JM, Tavares I, Coimbra A. GABA decreases in the spinal cord dorsal horn after peripheral neurectomy[J]. *Brain Res*, 1993, 620:287—291.
- [13] Moore KA, Kohno T, Karehewski LA, et al. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2002, 22:6724—6723.
- [14] Watabiki T, Kiso T, Tsukamoto M, et al. Intrathecal administration of AS1928370, a transient receptor potential vanilloid 1 antagonist, attenuates mechanical allodynia in a mouse model of neuropathic pain[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34:1105—1108.
- [15] 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.