

瞬时感受器电位通道 6 通过 ERK5 信号通路介导 CCI 动物模型病理性神经疼痛的机制研究^{*}

董小群¹, 李晓飞^{2△}, 杨骥宁^{1,2}

(浙江省金华市中心医院/浙江大学金华医院:1. 康复科;2. 关节外科 321000)

[摘要] **目的** 探讨瞬时感受器电位通道 6 (TRPC6) 通过 ERK5 信号通路介导坐骨神经压榨性损伤 (CCI) 动物模型病理性神经疼痛的机制。**方法** 建立 CCI 大鼠模型, 利用 RT-PCR、Western blot 和免疫荧光染色的方法检测 TRPC6 的表达及细胞类型。通过免疫共沉淀方法确定 TRPC6 的下游信号分子, 利用 siRNA 技术构建 TRPC6 的沉默载体, RT-PCR 和 Western blot 检测 ERK5 的表达水平。**结果** RT-PCR 结果显示, 模型组大鼠 DRG 组织中 TRPC6 mRNA 表达随着时间延长而增加, 且术后第 5 天最多 ($P < 0.05$), Western blot 结果与 RT-PCR 结果相同。免疫荧光结果显示, 模型组 DRG 组织中 TRPC6 蛋白可以和神经元标志物 NeuN 蛋白共染, 不能与神经胶质细胞标志物 IbA1 蛋白和 GFAP 蛋白共染。免疫共沉淀确定 TRPC6 蛋白的下游信号分子为 ERK5。siRNA-TRPC6 慢病毒载体处理 CCI 动物模型后, CCI 组、CCI+生理盐水组和 CCI+无序序列载体组 DRG 组织中 ERK5 mRNA 和蛋白的表达水平均高于空白对照组 ($P < 0.05$), CCI+siRNA-TRPC6 载体组 DRG 组织中 ERK5 mRNA 和蛋白的表达水平均低于空白对照组 ($P < 0.05$)。**结论** TRPC6 通道蛋白通过 ERK5 信号通路介导 CCI 鼠模型的疼痛信号传导。

[关键词] 瞬时感受器电位通道; 神经痛; 背根神经节; 信号通路

[中图法分类号] R683

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2020)07-1047-06

Mechanisms of transient receptor potential channel 6 mediating pathological neuralgia through ERK5 signaling pathway in CCI animal model^{*}

DONG Xiaoqun¹, LI Xiaofei^{2△}, YANG Qining^{1,2}

(1. Department of Rehabilitation; 2. Department of Joint Surgery, Jinhua Central Hospital/Jinhua Hospital of Zhejiang University, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of transient receptor potential channel 6 (TRPC6) mediating pathological neuropathic pain through ERK5 signaling pathway in chronic constriction injury (CCI) animal model. **Methods** CCI rat model was established. The expression of TRPC6 and its cell type were detected by RT-PCR, Western blot and immunofluorescence staining. The downstream signal molecule of TRPC6 was determined by immunoprecipitation. The silencing vector of TRPC6 was constructed by siRNA technology. The expression of ERK5 was detected by RT-PCR and Western blot. **Results** The RT-PCR results showed that TRPC6 mRNA expression in DRG tissue of rats in the model group increased with the prolongation of time, and reached the highest on the 5th day after operation ($P < 0.05$). Western blot results were consistent with RT-PCR results. Immunofluorescence results showed that TRPC6 protein could co-stain with neuronal marker NeuN protein in DRG tissues, could not co-stain with glial cell markers IbA1 protein and GFAP protein in DRG of the model group. The downstream signal molecule of TRPC6 protein was identified as ERK5 by immunoprecipitation. After CCI animal model was treated with siRNA-TRPC6 lentiviral vector, that expression of ERK5 mRNA and protein in DRG tissues of CCI group, CCI+saline group and CCI+disordered sequence vector group were higher than that of blank control group ($P < 0.05$), and ERK5 expression in

^{*} 基金项目: 浙江省公益技术研究计划项目 (GF19H060023); 浙江省医药卫生科技项目 (2020KY343); 金华市公益类项目 (2019-4-002)。

作者简介: 董小群 (1991—), 住院医师, 本科, 主要从事骨科康复的临床和基础研究。△ 通信作者, E-mail: professorlxf@163.com。

DRG tissues of CCI+siRNA-TRPC6 vector group was lower than that of blank control group ($P<0.05$).

Conclusion TRPC6 channel protein mediate pathological neuralgia in CCI rats through ERK5 signaling pathway.

[Key words] transient receptor potential channel;neuralgia;dorsal root ganglion;signaling pathway

慢性疼痛被称为“不死的癌症”,严重影响患者的身体及心理健康^[1-2]。其中,慢性神经痛为神经系统功能异常导致的痛觉过敏,目前临床上尚无令人满意的治疗方案^[3]。背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)作为痛觉传递的第一站,是产生慢性神经痛的“起搏点”^[4-5]。既往研究证明,瞬时感受器电位通道蛋白可以表达于 DRG 中,并且与痛觉信息的传递密切相关^[6]。然而对于瞬时感受器电位通道 6 (TRPC6)通道蛋白在 DRG 中的表达及作用报道较少。基于此,本研究通过构建坐骨神经压榨性损伤(chronic constriction injury, CCI)动物模型,研究 TRPC6 蛋白的表达和可能的下游信号分子。

1 材料与方法

1.1 材料

20 只 SPF 级成年雄性 SD 大鼠(4.21 ± 0.77)周, 体质量(245 ± 42)g,购自山东省济南市实验动物中心(许可证书编号:SCXK[鲁]20171183);Trizol 试剂盒、反转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TAKARA 公司;DAB 试剂盒购自北京碧云天公司;TRPC6、MAP2、GFAP 一抗购自英国 Abcam 公司;SDS-PAGE 购自美国 Invitrogen 公司;4.0 铬制羊肠线购自上海金环生物有限公司;机械痛敏检测仪和热痛刺激仪购自中国医学科学院生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 CCI 动物模型的构建

大鼠均采用腹腔注射 3%水合氯醛(0.4 mL/kg)进行麻醉。常规去毛,消毒,严格无菌操作,采用右下肢背侧切口入路,钝性分离股二头肌,探查坐骨神经主干,4 道 4.0 铬制羊肠线环扎坐骨神经,以单环可以上下活动为准,间距为 1 mm,充分保护神经外膜的血供。碘伏消毒后逐层缝合切口。术后单独饲养,12 h/12 h 明暗交替光照,提供充足水和食物。

1.2.2 痛觉行为学检测

采用机械痛敏检测仪和热痛刺激仪检测大鼠的机械撤足阈值和热撤足潜伏期,从而确定 CCI 动物模型是否构建成功。对大鼠用 Von Frey 丝针刺激右足掌,不超过 4 s,大鼠抬足或添足,表示实验阳性,否则为阴性。初始刺激为 2 g,逐级增加,最大不超过 15 g,直至出现阳性反应,即为机械痛阈值(MWT),统计并记录 50%MWT。同时采用热痛刺激仪测定热痛阈值,利用热痛刺激仪的附件光源焦距,通过有机玻

璃板照射动物右足掌,记录照射开始至小鼠感到疼痛的时间,统计并记录热辐射刺激缩爪反应潜伏期(TWL)。

1.2.3 TRPC6 siRNA 慢病毒载体的构建

TRPC6 siRNA 基因干扰载体的构建和筛选由上海吉凯公司完成。首先通过 Pubmed Genbank 查询鼠源 TRPC6 蛋白的基因序列、ORF 序列和 3'-UTR 序列。根据 siRNA 靶点设计原理,构建 siRNA-TRPC6 的干扰序列。干扰序列为 siRNA-TRPC6-homo-3299:GCG TCA TCA TCG TGT GTA AGA;选取上海吉凯公司提供的 hU6-MCS-CMV-EGFP 慢病毒载体作为酶切对象,加入 siRNA-TRPC6 干扰序列后,转染人胚肾 293T 细胞,进行克隆测定,然后进行质粒的抽提,慢病毒的包装以备。

1.2.4 动物处理及实验分组

所有模型动物均通过鞘内注射给药。根据动物伦理的要求,所有鞘内均和 CCI 动物模型构建同时进行,可以减轻实验动物的痛苦。取背部 $L_3\sim L_4$ 间隙入路,取 $L_3\sim L_4$ 关节突内侧,置入 PE-10 导管,深入约为 1 cm,以清凉液体流出为准,然后固定在 $L_3\sim L_4$ 椎旁肌肉,游离端通过皮下隧道固定于颈部,远端封闭。根据实验目的将实验动物分成 5 组,每组 4 只。空白对照组:未做处理;CCI 组:通过坐骨神经捆扎构建 CCI 模型,未置入髓腔导管;CCI+siRNA-TRPC6 载体组:CCI 模型组大鼠通过导管输注 siRNA-TRPC6 慢病毒载体(经 0.9%NaCl 溶液混合为总体积 $50\text{ }\mu\text{L}$),每次 $10\text{ }\mu\text{L}$,5 d 1 次;CCI+无序序列载体组:CCI 模型组大鼠通过导管输注无序序列 RNA 慢病毒载体(经 0.9%NaCl 溶液混合为总体积 $50\text{ }\mu\text{L}$),每次 $10\text{ }\mu\text{L}$,5 d 1 次;CCI+生理盐水组:CCI 模型组大鼠通过导管生理盐水,每次 $10\text{ }\mu\text{L}$,5 d 1 次。各组均治疗 2 周。

1.2.5 反转录 PCR(RT-PCR)

所有动物处死后,取大鼠 DRG 组织约 10 mg,加入 1 mL Trizol 试剂,研磨棒充分研磨,EP 管中静置后加入 0.2 mL 的氯仿,10 000 r/min 离心 5 min,取上层溶剂,加入 1 mL 75%乙醇,7 500 r/min 离心 5 min,测定 RNA 的光密度(OD)值,保证纯度在 1.8~2.1。反转录试剂盒,将 RNA 反转为 DNA,采用 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反转录反应体系,按照反转录试剂盒说明书加入各试剂。应用荧光定量 PCR 试剂盒,测定总 RNA 中的 TRPC6 和 ERK5 mRNA 的相对表达水平。采用

表 1 引物序列

引物名称		序列	长度(bp)
TRPC6(鼠源)	正义链	5'-CGT GCG GGA GCG TGT CAA TCT TGG-3'	427
	反义链	5'-GCA CGG CCT GGC TTT CCT GGT TCC-3'	
ERK5(鼠源)	正义链	5'-CGT CAA GGC TGA GAA TGT GCG TC-3'	372
	反义链	5'-GCA GTG GTG AAG ACG CCA GTG GA-3'	
GAPDH(鼠源)	正义链	5'-TTA ATG CCC CTG AGA ATG TAA TGC-3'	191
	反义链	5'-AAG GCC TGA AGA CGC CAG TTT GC-3'	

20 μL 荧光定量 PCR 反应体系,按照试剂盒说明书加入各试剂。加入美国 ABI 7900 荧光定量 PCR 仪,设定 50 个循环,记录 CT 值,应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行比较分析。引物序列由上海生物化学有限公司提供,见表 1。

1.2.6 Western blot

所有动物处死后,取大鼠 DRG 组织约 10 mg,加入蛋白提取试剂(1 mL RIPA 裂解液+PMSF 50 μL),研磨棒充分混合,冰上裂解,混合液加入 EP 管中,4 ℃ 13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 凝胶,根据试剂盒说明书,配制 8%分离胶和浓缩胶,静置待凝胶凝固,加入蛋白样品,根据蛋白质分子量标准结合测得的蛋白浓度,加入各组蛋白样品,进行电泳处理,加入 SDS-PAGE 电泳液,电伏设置为 100 V,加载时间为 90 min,溴酚蓝到达凝胶底部为标准。然后进行转膜处理,将蛋白转到 PVDF 膜上,使用 Bio-Rad 的标准转膜装置,转膜电流为 300 mA,时间为 30 min,转膜完毕后加入 Western 封闭液进行处理,然后加入 TRPC6 和 ERK5 蛋白一抗(经一抗稀释液稀释),4 ℃ 冰箱摇床避光孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 HRP 二抗(经二抗稀释液稀释),PBST 洗膜 3 次,每次 5 min,BeyoECL Plus ECL 试剂盒检测蛋白印迹显影,Image J 软件分析蛋白条带。

1.2.7 免疫荧光双标染色

所有动物处死后,取大鼠 DRG 组织制成蜡块,冰冻切片机处理。PBS 清洗 3 次,每次 5 min,10%山羊血清常温封闭 30 min,加入 TRPC6、NeuN、IbA1 和 GFAP 一抗,4 ℃ 冰箱湿盒孵育过夜,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,避光条件下加入二抗 IgG-FITC,室温孵育 30 min。弃掉二抗溶液后加入 DAPI 试剂,避光孵育 5 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min,加入防淬灭剂和盖玻片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 模型建立

模型组大鼠术后 1 d、3 d、5 d、7 d、10 d、2 周和 3 周的 50%MT 和 TWL 均明显降低,差异有统计学差异(*P* < 0.05),CCI 模型构建成功,见图 1。

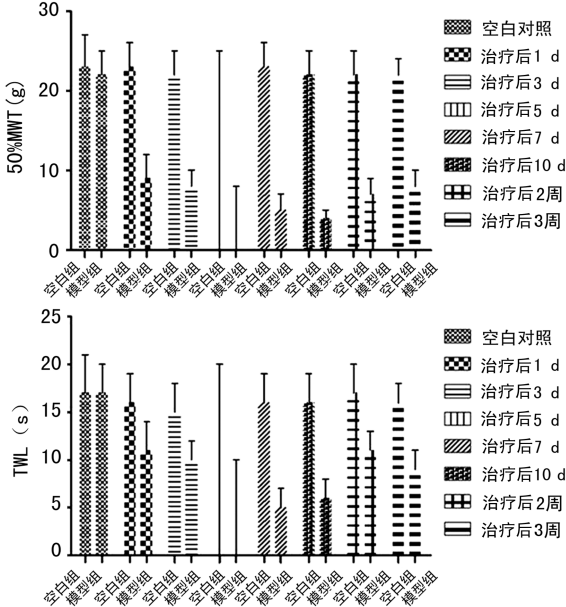


图 1 模型组大鼠的 50%MT 和 TWL 情况

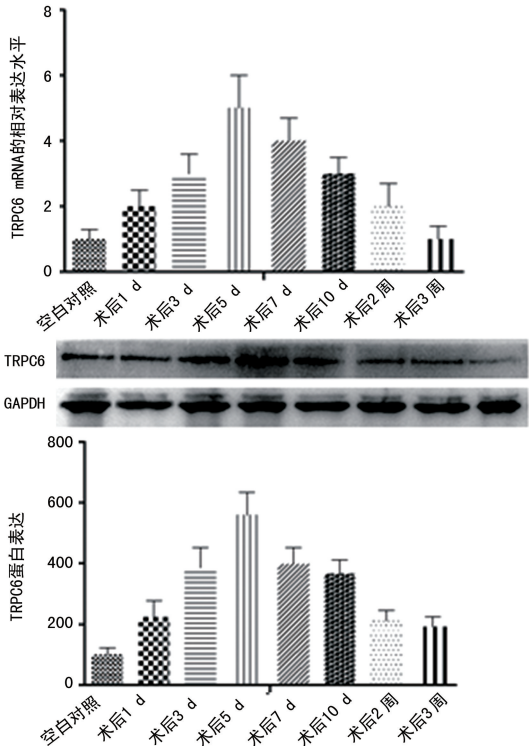
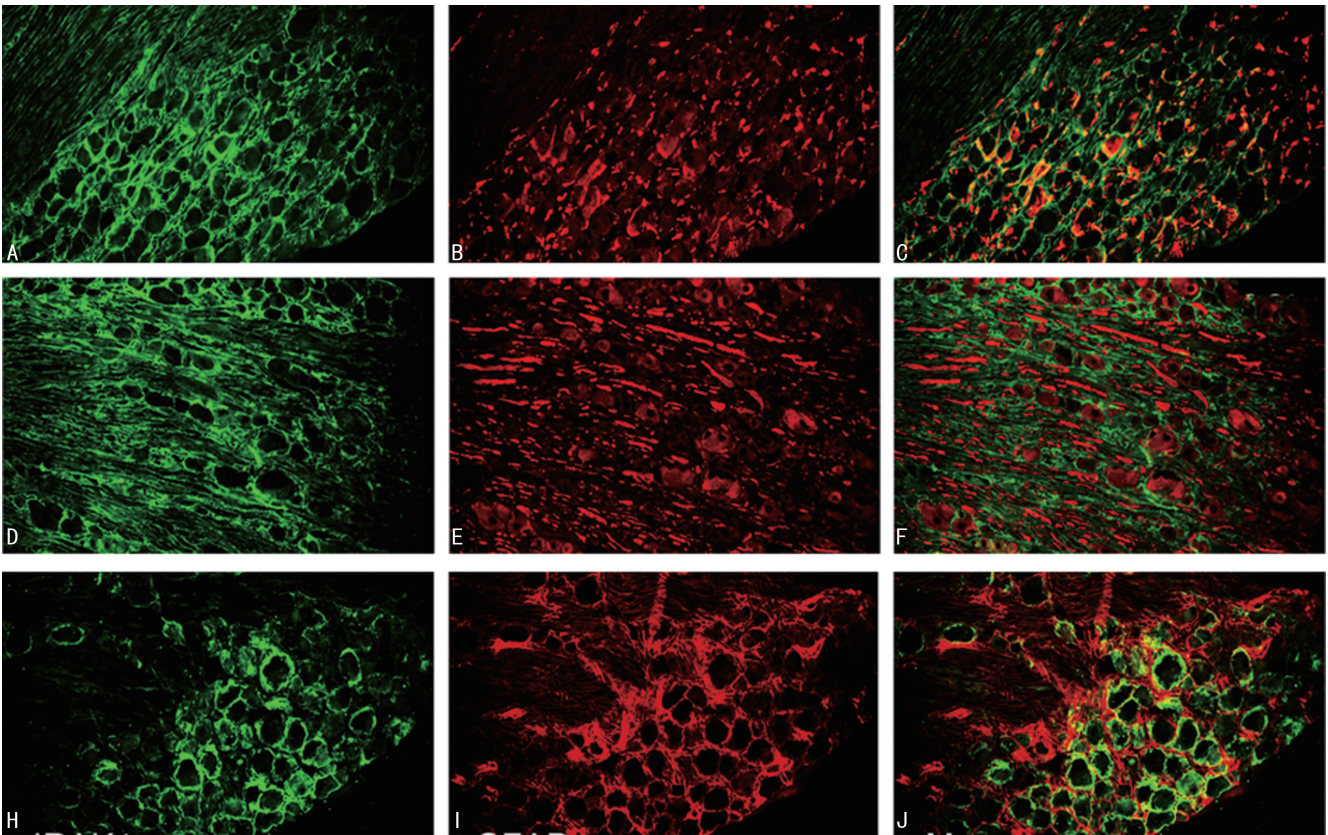


图 2 模型组大鼠 DRG 组织中 TRPC6 的表达情况



A:胸段 DRG 组织切片 TRPC6 表达;B:胸段 DRG 组织切片 NeuN 表达;C:胸段 DRG 组织切片合并图层;D:节前 DRG 组织切片 TRPC6 表达;E:节前 DRG 组织切片 IbA1 表达;F:节前 DRG 组织切片合并图层;H:节后 DRG 组织切片 TRPC6 表达;I:节后 DRG 组织切片 GFAP 表达;J:节后 DRG 组织切片合并图层。

图 3 模型组 DRG 组织中 TRPC6 蛋白的荧光定位表达(×200)

2.2 模型组大鼠 DRG 组织中 TRPC6 表达

模型组大鼠 DRG 组织中 TRPC6 mRNA、TRPC6 蛋白表达随着时间延长而增加,且术后第 5 天表达水平最多,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.3 模型组 DRG 组织中 TRPC6 蛋白的荧光定位表达

模型组 DRG 组织中 TRPC6 蛋白可以和神经元标志物 NeuN 蛋白共染,不能与神经胶质细胞标志物 IbA1 蛋白和 GFAP 蛋白共染,见图 3。

2.4 免疫共沉淀确定蛋白互作的分子

TRPC6 蛋白的下游信号分子为 ERK5,可以通过 ERK5 信号通路起到信息传递的作用,见图 4。

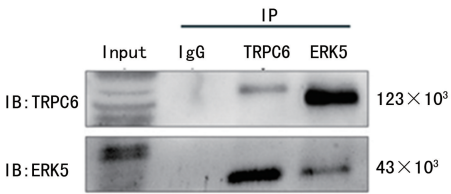


图 4 免疫共沉淀结果

2.5 siRNA-TRPC6 慢病毒载体的构建

siRNA-TRPC6 载体慢病毒转染滴度为 5×10^7 TU/mL,慢病毒转染效率较高,为 95%以上,见图 5。

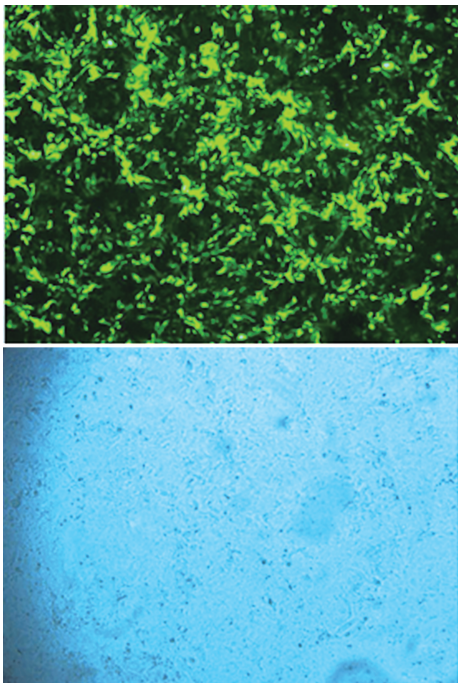


图 5 siRNA-TRPC6 慢病毒载体的构建和转染(×200)

2.6 siRNA-TRPC6 慢病毒载体转染后 ERK5 的表达量

CCI 组、CCI+生理盐水组和 CCI+无序序列载体组 DRG 组织中 ERK5 mRNA、蛋白的表达均高于

空白对照组($P<0.05$),但组间比较差异无统计学差异($P>0.05$);CCI+siRNA-TRPC6 载体组 DRG 组织中 ERK5 mRNA、蛋白的表达均低于空白对照组($P<0.05$),见图 6。

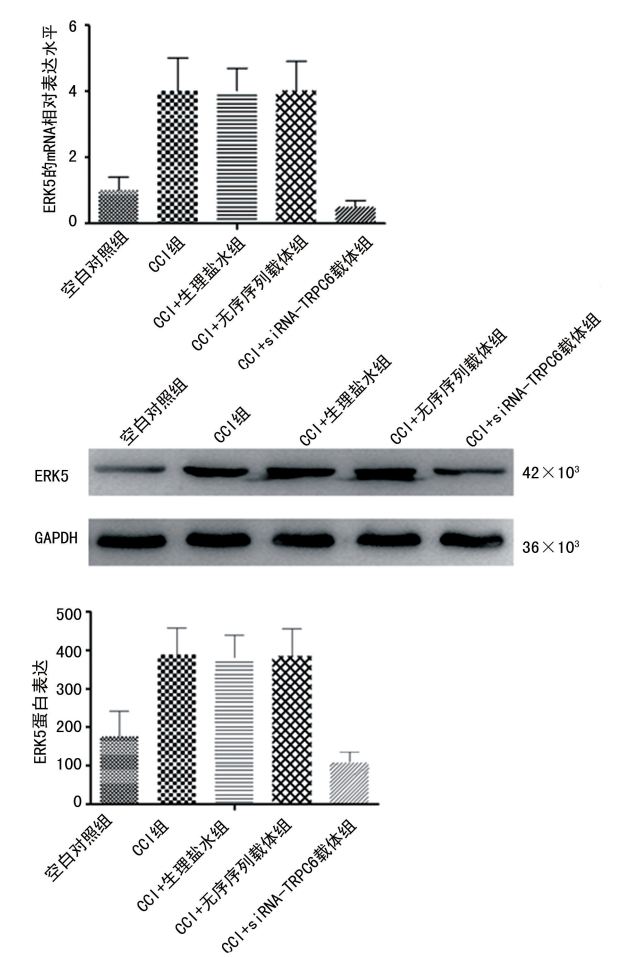


图 6 siRNA-TRPC6 慢病毒载体转染后 ERK5 的表达水平

3 讨 论

慢性疼痛的处理是临床上的难点问题,目前的镇痛手段主要通过药物镇痛和局部利多卡因注射液局部麻醉药物的封闭处理^[7-8]。但是由于神经根神经节的疼痛机制不同,所以对于此类疼痛,药物和局部麻醉药物效果不佳^[9-10]。因此,探究神经根性疼痛的作用机制,为神经根性疼痛寻找新的治疗靶点具有十分重要的意义。

随着 TRPC 与神经细胞的生长发育关系的逐步揭露,TRPC6 在神经系统的恢复和神经痛的致病机制方面的研究也引起的广大学者的兴趣^[11-12]。GUO 等^[13]构建脑缺血再灌注的动物模型,发现 TRPC6 在神经系统的恢复过程中起到重要作用,花萼蛋白对脑组织的保护作用是通过诱导 TRPC6 的过度表达来实现。另外,TRPC6 蛋白不仅在中枢神经中有表达,在周围神经系统中也可以表达。有研究发现^[14-15],TRPC6 通道蛋白和 TRPC3 蛋白也可以表达在痛觉传导通路中,尤其是第一站的 DRG 中,然而,其具体的介

导机制及涉及的信号通路尚未研究。本研究显示,模型组大鼠 DRG 组织中 TRPC6 的表达水平均明显升高($P<0.05$),从而进一步验证了前人的研究结果。另外,通过免疫荧光双染的方法,进一步确定 TRPC6 蛋白是表达于神经元细胞,而不是神经胶质细胞,更进一步肯定了其疼痛传导的作用。

为了进一步确认 TRPC6 可能涉及的信号通路及分子机制,笔者利用免疫共沉淀的方法,通过蛋白之间的作用,确定 ERK5 是作为 TRPC6 的下游信号分子而存在。既往研究中对 ERK5 信号通路参与神经痛的研究也有涉及,卢波等^[16]通过脊神经结扎建立疼痛小鼠模型,通过鞘内注射 CX3CR1 来抑制 ERK5 的表达,结果表明 ERK5 信号通路参与神经痛的信号传导过程。上述研究与本实验研究结果相似,进而为本研究实验结果的成立提供了佐证。笔者利用 siRNA 干扰技术构建 TRPC6 siRNA 干扰载体,通过鞘内注射的方法处理模型组细胞,RT-PCR 和 Western blot 检测 ERK5 表达,结果显示 CCI+siRNA-TRPC6 载体组 DRG 组织中 ERK5 mRNA 和蛋白的表达水平均低于空白对照组($P<0.05$),说明 ERK5 是 TRPC6 的下游信号分子。

综上所述,TRPC6 通道蛋白通过 ERK5 信号通路介导 CCI 大鼠模型的疼痛信号传导。

参考文献

[1] 李文健,谢安木.普瑞巴林治疗脊髓炎后神经痛(附 1 例报告并文献复习)[J]. 青岛大学医学院学报,2012,48(5):452-453.

[2] ZHAO H,ZHANG X,ZHU J,et al. Microvascular decompression for glossopharyngeal neuralgia: long-term follow-up[J]. World Neurosurg,2017,102(2):151-156.

[3] BEIGI B,BEIGI M,NIYADURUPOLA N,et al. Infraorbital nerve decompression for infraorbital neuralgia/causalgia following blow-out orbital fractures: a case series[J]. Cranio-maxillofac Trauma Reconstr,2017,10(1):22-28.

[4] LYNCH P J,MCJUNKIN T,EROSS E,et al. Case report: successful epiradicular peripheral nerve stimulation of the C2 dorsal root ganglion for postherpetic neuralgia [J]. Neuromodulation,2011,14(1):58-61.

[5] HAMER J F,PURATH T A. Response of cervicogenic headaches and occipital neuralgia to

- radiofrequency ablation of the C2 dorsal root ganglion and/or third occipital nerve[J]. Headache, 2014, 54(3):500-510.
- [6] SEXTON J E, DESMONDS T, QUICK K, et al. The contribution of TRPC1, TRPC3, TRPC5 and TRPC6 to touch and hearing[J]. Neurosci Lett, 2016, 610(1):36-42.
- [7] 赵长地, 孔姣, 刘学宽. 微血管减压术治疗原发性舌咽神经痛并三叉神经痛 1 例[J]. 青岛大学医学院学报, 2004, 40(4):376.
- [8] DEER T R, LEVY R M, KRAMER J, et al. Dorsal root ganglion stimulation yielded higher treatment success rate for complex regional pain syndrome and causalgia at 3 and 12 months: a randomized comparative trial[J]. Pain, 2017, 158(4):669-681.
- [9] KIM K H, JO D H, KIM E D. Pulsed radiofrequency to the dorsal root ganglion in acute herpes zoster and postherpetic neuralgia[J]. Pain Physician, 2017, 20(3):E411-418.
- [10] CHANG W, BERTA T, KIM Y H, et al. Expression and role of Voltage-Gated Sodium channels in human dorsal root ganglion neurons with special focus on Nav1. 7, species differences, and regulation by paclitaxel[J]. Neurosci Bull, 2018, 34(1, SI):4-12.
- [11] WANG X L, TENG L L, LI A, et al. TRPC6 Channel protects retinal ganglion cells in a rat model of retinal ischemia/reperfusion-induced cell death[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(11):5751-5758.
- [12] ALESSANDRI-HABER N, DINA O A, CHEN X A. TRPC1 and TRPC6 channels cooperate with TRPV4 to mediate mechanical hyperalgesia and nociceptor sensitization[J]. J Neurosci, 2009, 29(19):6217-6228.
- [13] GUO C, MA Y Y, MA S B, et al. The role of TRPC6 in the neuroprotection of calyculin A against cerebral ischemic injury[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):3039-3047.
- [14] QUICK K, ZHAO J, EIJKELKAMP N, et al. TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells[J]. Open Biol, 2012, 2(5):120068-120078.
- [15] BANDYOPADHYAY B C, SWAIM W D, LIU X, et al. Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca²⁺-signaling complex in polarized epithelial cells role in apical Ca²⁺ influx[J]. J Biol Chem, 2005, 280(13):12908-12916.
- [16] 卢波, 姚娟, 雷卫平, 等. 大鼠脊髓小胶质细胞 CX3CR1/ERK5 信号通路在神经病理性疼痛中的作用[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(25):1997-2000.

(收稿日期:2019-11-28 修回日期:2020-02-01)

(上接第 1046 页)

- [12] 赵万全, 赵瑞丰, 姜悦. 基于北京地区住院医疗服务绩效评价平台的主诊医师绩效评价研究[J]. 中华医院管理杂志, 2015, 31(11):858-860.
- [13] 苗丽琼, 山德生, 陈晋, 等. DRGs 评价指标在医疗绩效管理体系中的应用[J]. 中华医院管理杂志, 2015, 31(9):693-696.
- [14] 苗丽琼, 山德生, 李礼, 等. 疾病诊断相关组在绩效管理体系中的应用研究[J]. 中国医院统计, 2015, 22(8):258-263.
- [15] 季新强. 基于 DRGs 和综合指数法的某肿瘤专科医院肿瘤外科住院医疗服务绩效评价分析[J]. 中国卫生统计, 2016, 33(5):817-822.
- [16] 李舒丹, 陈阳, 江婷, 等. DRGs 应用于医院内部绩效管理的述评与思考[J]. 卫生经济研究, 2017(5):69-71.
- [17] 王振宇. DRGs 综合绩效评价方法在科室评价中的应用[J]. 中国卫生经济, 2017, 36(10):72-75.

(收稿日期:2019-11-20 修回日期:2020-02-14)