

抑制 Pannexin-1 在三叉神经节中的表达可缓解三叉神经痛

温玉环¹, 张越¹, 朱大卫¹, 杨棕昕¹, 王烈成², 王元银¹

摘要 目的 探索缝隙连接蛋白 1(Panx 1)在三叉神经痛中的作用。方法 对雄性 SD 大鼠行左侧眶下神经慢性压迫术(ION-CCI)建立三叉神经痛大鼠模型。将 ION-CCI 大鼠随机分为两组,CCI + Panx 1-siRNA 组:对 ION-CCI 大鼠左侧三叉神经节区域局部注射 Panx 1 特异性 siRNA;CCI + Ctl-siRNA 组:注射阴性对照 siRNA。采用蛋白免疫印迹和 qRT-PCR 比较两组大鼠左侧三叉神经节中 Panx 1 的表达水平。采用 Von Frey Hairs 纤维丝对两组大鼠左侧触须垫的机械刺激反应进行评估。结果 qRT-PCR 和蛋白质印迹的结果均表明 CCI + Panx 1-siRNA 组大鼠左侧三叉神经节中 Panx 1 表达量明显低于 CCI + Ctl-siRNA 组。此外,CCI + Panx 1-siRNA 组大鼠机械刺激阈值明显高于 CCI + Ctl-siRNA 组大鼠。结论 抑制三叉神经节中 Panx 1 表达可以缓解三叉神经痛的痛敏反应。

关键词 缝隙连接蛋白;神经性疼痛;三叉神经痛;眶下神经中图分类号 R 745.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1392-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.012

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是一种常见的临床疾病,是发生在三叉神经分支的分布区域中的复发性阵发性剧烈疼痛,疼痛表现为针刺样、烧灼样、刀割样或电击样^[1]。TN 严重影响了患者的生活质量,但目前临床上仍然不能彻底有效地治疗 TN。因此对 TN 的病因和发病机制的研究尤为重要。

间隙连接通道(gap junction channels, GJCs)是两个相邻细胞互相交流的重要通道之一,是哺乳动物的细胞膜上普遍存在的膜通路,在细胞间的信号传导、细胞增殖与分化、免疫炎症及病理性疼痛等生理和病理状态下起到了关键的作用^[2]。Pannexins 是 2000 年发现的缝隙连接蛋白家族的新成员,包括

Panx 1、Panx 2 和 Panx 3 三种同种型^[3]。Panx 1 蛋白在神经系统的各类细胞中广泛表达,如小胶质细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞和神经元^[4]。激活 Panx 1 可以促进 ATP^[5]和各种细胞因子的释放,包括高迁移率族蛋白 1 和白细胞介素-1,这些炎症介质也可以介导脊髓中的急性和慢性疼痛信号^[6]。研究表明,大脑中 Panx 1 的激活在癫痫^[7]和头痛^[8]的发展中起着重要作用。该课题组前期实验验证了在 TN 大鼠的三叉神经节中, Panx 1 表达会升高^[9]。该研究进一步探讨降低 TN 大鼠模型三叉神经节中 Panx 1 的表达, TN 的发展变化,为探明 TN 的发病机制及治疗靶点提供了新方向。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(7~8 周龄,体质量 180~200 g),购自安徽医科大学实验动物中心。将大鼠饲养于木屑垫底的笼子中,在温度(23±2)℃、湿度 40%~50% 的环境温度饲养 1 周,12 h/12 h 交替照明。用 Von Frey Hairs 纤维丝刺激大鼠左侧触须垫区域,筛选出机械刺激疼痛反应阈值≥0.6 g 的大鼠作为实验大鼠。将大鼠随机分成假手术组和眶下神经慢性压迫损伤(ION-CCI)组,ION-CCI 组大鼠就是该研究的 TN 模型。将 10% 水合氯醛按照 0.35 ml/100 kg 对大鼠进行腹腔注射全身麻醉。麻醉生效后,分离出大鼠面部左侧的眶下神经,用 5-0 丝线结扎眶下神经的近端和远端,然后用 3-0 丝线缝合常规缝合皮肤伤口。假手术组仅暴露眶下神经,但不进行结扎。

1.2 大鼠行为学测试 用 Von Frey Hairs 纤维丝刺激大鼠左侧触须垫区域来测量机械刺激疼痛反应阈值。Von Frey Hairs 纤维丝的不同直径和长度代表不同的刺激强度,分别为 0.008、0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4 和 2.0 g。将一只大鼠放在一个透明塑料笼中 10 min,待大鼠适应测试环境后,进行行为学测试。测试者用 Von Frey Hairs 纤维丝刺激大鼠术侧触须垫,从 0.008 g 开始直到引起明确的行为反应。每个纤维以 10~30 s 的随机间隔施加 10 次以确定机械刺激反应阈值,该机械阈值是

2019-05-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162)

作者单位:安徽医科大学¹口腔医学院、²基础医学院,合肥 230032

作者简介:温玉环,女,硕士研究生;

王烈成,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wangliecheng@ahmu.edu.cn;

王元银,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: wyy1970548@sohu.com

指在 10 次试验中发生不小于 6 次阳性反应的最小力。阳性反应包括: ① 躲闪: 当 Von Frey Hairs 纤维丝接触大鼠术侧触须垫时迅速收缩; ② 逃避或攻击性行为: 包括逃跑、挛缩、埋头、撕咬或抓住纤维丝; ③ 不对称搔抓: 表现为大鼠出现“洗脸状”或搔抓术侧面部^[10]。以 10 min 的间隔进行 3 次测量计算平均值。测试者不知道大鼠的分组来源。

1.3 siRNA 注射 该实验采用阴性对照 siRNA (SIC001, 广州 RiboBio) 和 Panx 1 特异性 siRNA (GAACAUAAGUGAGCUCAAA, 广州 RiboBio)。将阴性对照 siRNA 和 Panx 1 特异性 siRNA 分别与 i-FECT 混合用于药物注射^[11]。在慢性压迫损伤 (chronic constriction injury, CCI) 手术 2 周后, 神经性疼痛完全建立, 将大鼠随机分为 2 组, 每组 8 只大鼠: CCI + Panx 1-siRNA 组, 每天一次经大鼠左侧眶下孔向三叉神经节区域注射 Panx 1-siRNA (5 μ g) 持续 4 d^[12]; CCI + Ctl-siRNA 组, 以与 CCI + Panx 1-siRNA 组相同的方法给 CCI 大鼠注射阴性对照 siRNA (5 μ g)。

1.4 qRT-PCR 检测 Panx 1 mRNA 含量 大鼠连续注射 siRNA 4 d 后, 行腹腔过量注射 10% 水合氯醛, 麻醉致死取出左侧三叉神经节, 称重后放入加了 1% TRIzol 预冷的 1 ml 匀浆器内充分研磨, 提取三叉神经节中的总 RNA。然后使用 PrimeScript RT 试剂盒 (Perfect Real Time, TaKaRa-Bio, Dalian, China) 制备 cDNA 进行 PCR 的扩增。反应参数为: 95 $^{\circ}$ C、30 s 一个循环, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 个循环, 65 $^{\circ}$ C、15 s。以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较各分组之间 Panx 1 mRNA 的相对表达量, 各基因扩增的引物序列见表 1。

表 1 Panx 1 和 GAPDH 引物序列

基因	引物序列
Panx 1	F: 5'-CTTCGCTCAGGAGATCTCCA-3'
	R: 5'-GGTTCCAGACTCACTCTGC-3'
GAPDH	F: 5'-TGCCACTCAGAAGACTGTGG-3'
	R: 5'-TTCAGCTCTGGATGACCTT-3'

1.5 Western blot 检测 Panx 1 蛋白含量 大鼠连续注射 siRNA 4 d 后, 行腹腔过量注射 10% 水合氯醛, 麻醉致死取出左侧三叉神经节。称重后置于预冷的含有 1% RIPA 缓冲液的匀浆器中, 充分研磨, 提取总蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 然后转移到 PVDF 膜, 用 5% BSA (Sigma 公司) 在室温下封闭 1 h, 将膜与稀释抗体一起置于 4

$^{\circ}$ C 冰箱内孵育过夜。使用的一抗为兔抗 Panx 1 (1 : 1 000, Invitrogen 公司) 和兔抗 GAPDH (1 : 10 000, Cell Signaling Technology, Danvers, 马萨诸塞州, 美国)。稀释第二抗体 (ZSGB-BIO, 北京, 中国), 将膜置于二抗中洗涤。使用 Millipore Western 印迹底物显现免疫反应性蛋白质条带。ECL 曝光成像, 采用凝胶图像处理系统分析并计算出目的蛋白相对表达水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。大鼠机械刺激疼痛敏感阈值采用两因素重复测定资料的方差分析, qRT-PCR 结果、Western blot 结果均采用两独立样本 t 检验来比较两组的数据。 $P < 0.05$ 时为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠机械刺激疼痛阈值检测 用 Von Frey Hairs 纤维丝检测大鼠术后第 1 天至第 7 周的机械刺激疼痛阈值。结果显示 ION-CCI 组大鼠的机械刺激疼痛阈值明显低于 sham 组大鼠。术后第 2 周疼痛阈值达到最低 [sham 组: (1.38 $\pm$ 0.18) g, ION-CCI 组: (0.22 $\pm$ 0.14) g, $n = 8$, $F = 13.11$, $P < 0.001$]。见图 1。

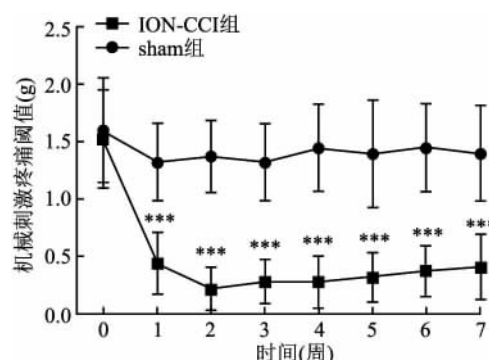


图 1 ION-CCI 组和 sham 组大鼠机械刺激疼痛阈值比较
与 sham 组比较: *** $P < 0.001$

2.2 大鼠三叉神经节中 Panx 1 mRNA 表达量 CCI 术后第 2 周, 疼痛超敏反应完全建立后, 将 ION-CCI 大鼠随机分成 2 组: CCI + Panx 1-siRNA 组, 每天一次经大鼠左侧眶下孔向三叉神经节区域注射 Panx 1-siRNA (5 μ g) 持续 4 d; CCI + Ctl-siRNA 组, 用与 CCI + Panx 1-siRNA 组相同的方法给 CCI 大鼠注射阴性对照 siRNA (5 μ g)。给药后第 4 天将各组大鼠麻醉并处死, 取出左侧三叉神经节通过 qRT-PCR 检测 Panx 1 的 mRNA 水平。结果显示, CCI +

Panx 1-siRNA 组大鼠三叉神经节中 Panx 1 mRNA 相对表达量显著低于 CCI + Ctl-siRNA 组 ($n = 4, t = 3.068, P < 0.01$)。见图 2。

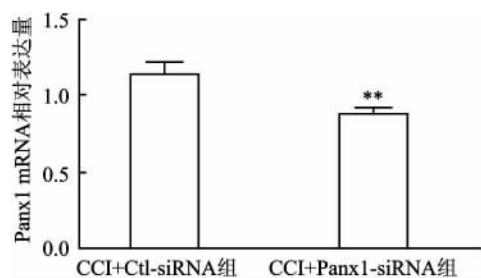


图2 注射 siRNA 4 d 后三叉神经节中 Panx 1 mRNA 的表达量与 CCI + Ctl-siRNA 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 大鼠三叉神经节中 Panx 1 蛋白表达量 持续注射 siRNA 后第 4 天将各组大鼠麻醉并处死,取出左侧三叉神经节通过 Western blot 检测 Panx 1 的蛋白表达水平。结果显示,CCI + Panx 1-siRNA 组大鼠三叉神经节中 Panx 1 蛋白表达量低于 CCI + Ctl-siRNA 组 ($n = 4, t = 2.46, P < 0.05$)。通过 qRT-PCR 和 Western blot 实验结果表明 Panx 1 特异性 siRNA 降低了 ION-CCI 大鼠三叉神经节中 Panx 1 的表达。见图 3。

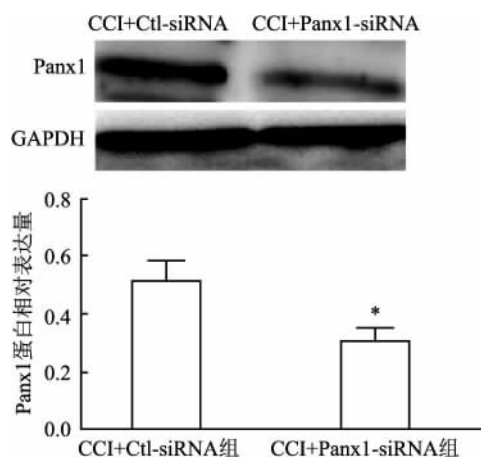


图3 注射 siRNA 4 d 后三叉神经节中 Panx 1 蛋白的表达量与 CCI + Ctl-siRNA 组比较: * $P < 0.05$

2.4 三叉神经节中 Panx 1 对大鼠机械疼痛超敏反应的影响 通过 Von Frey Hairs 纤维丝检测 ION-CCI 大鼠注射 siRNA 后的机械刺激疼痛阈值。结果显示,与 CCI + Ctl-siRNA 组比较,CCI + Panx 1-siRNA 组大鼠的机械刺激疼痛阈值显著增加,第 4 天差异最明显,CCI + Ctl-siRNA 组为 (0.25 ± 0.18) g, CCI + Panx 1-siRNA 为 (1.05 ± 0.26) g ($n = 8, F =$

$38.16, P < 0.01, P < 0.001$)。表明抑制三叉神经节中 Panx 1 的表达可以缓解 ION-CCI 引起的疼痛超敏反应。见图 4。

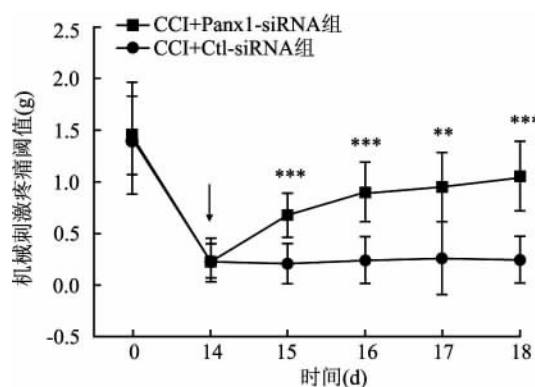


图4 注射 siRNA 后大鼠机械刺激疼痛阈值的变化

↓: 开始注射 siRNA; 与 CCI + Ctl-siRNA 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

三叉神经痛是一种反复发作的面部疼痛,常表现为电击或针刺样。这种神经性疾病非常痛苦,严重影响患者的生活质量。然而由于 TN 复杂的病因和发病机制,目前为止,TN 仍然缺乏完全有效的治疗方法。因此探索 TN 病因的分子机制是研究更有效治疗方法的关键条件。

血管压迫神经是 TN 的病因之一,该研究用结扎大鼠眶下神经作为 TN 模型,即为模拟血管压迫神经。该课题组先前的实验已证明 Panx 1 在三叉神经节神经元中的表达,以及在三叉神经痛模型中 Panx 1 表达会显著增加^[9]。Panx 1 构成细胞间相互交流的半通道,在哺乳动物组织中广泛表达,尤其是在神经系统中^[4]。Panx 1 参与某些神经疾病的病理和生理过程。有研究^[13]表明,Panx 1 参与神经性疼痛模型中腓肠神经的中枢致敏过程,抑制 Panx 1 表达可抑制神经病理学大鼠的脊髓 C 反射活动和机械超敏反应。该研究通过注射 Panx 1 特异性 siRNA,抑制 TN 大鼠模型三叉神经节中 Panx 1 的表达,采用 Von Frey Hairs 纤维丝检测大鼠的机械刺激疼痛阈值,结果表明,抑制 TN 大鼠模型三叉神经节中 Panx 1 的增加,可以显著缓解三叉神经痛的痛敏反应,确定了 Panx 1 在诱导 TN 发展中的重要作用,为研究三叉神经痛的有效治疗方法提供了新方向。

虽然确定了 Panx 1 在 TN 中的重要作用,但其调控 TN 的具体机制仍不清楚。参与调节神经元基

因表达的两个主要表观遗传机制是 DNA 甲基化和组蛋白修饰^[14]。启动子区域中的 DNA 甲基化水平控制基因表达。Panx 1 的组蛋白修饰可能是一个独立的影响因素,有助于 TN 的发展。有报道虽然脊髓损伤对 Panx 1 启动子的 DNA 甲基化水平没有影响,但它改变了 DRG 中 Panx 1 启动子周围的组蛋白修饰^[15]。在后续的研究中,需要进一步探查 Panx 1 在 TN 中的作用机制。

参考文献

- [1] Punyani S R, Jasuja V R. Trigeminal neuralgia: an insight into the current treatment modalities [J]. *J Oral Biol Craniofac Res*, 2012, 2(3): 188–97.
- [2] Scholz J, Woolf C J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia [J]. *Nat Neurosci*, 2007, 10(11): 1361–8.
- [3] Decrock E, Krysko D V, Vinken M, et al. Transfer of IP(3) through gap junctions is critical, but not sufficient, for the spread of apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(6): 947–57.
- [4] Bravo D, Maturana C J, Pelissier T, et al. Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: possible role on chronic pain [J]. *Pharmacol Res*, 2015, 101: 86–93.
- [5] Sandilos J K, Chiu Y H, Chekeni F B, et al. Pannexin 1, an ATP release channel, is activated by caspase cleavage of its pore-associated C-terminal autoinhibitory region [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(14): 11303–11.
- [6] Koyanagi S, Kusunose N, Taniguchi M, et al. Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13102.
- [7] Santiago M F, Veliskova J, Patel N K, et al. Targeting pannexin1 improves seizure outcome [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25178.
- [8] Karatas H, Erdener S E, Gursay-Ozdemir Y, et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels [J]. *Science*, 2013, 339(6123): 1092–5.
- [9] 张越. 三叉神经痛模型大鼠三叉神经节内 Pannexin-1 的表达 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.
- [10] Wu C, Xie N, Lian Y, et al. Central antinociceptive activity of peripherally applied botulinum toxin type A in lab rat model of trigeminal neuralgia [J]. *Springerplus*, 2016, 5: 431.
- [11] Luo M C, Zhang D Q, Ma S W, et al. An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons [J]. *Mol Pain*, 2005, 1: 29.
- [12] Wang Y, Li X, Cao L, et al. Analgesic effect of diprospan in rats with trigeminal neuralgia [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2011, 31(3): 395.
- [13] Bravo D, Ibarra P, Retamal J, et al. Pannexin 1: a novel participant in neuropathic pain signaling in the rat spinal cord [J]. *Pain*, 2014, 155(10): 2108–15.
- [14] Ronan J L, Wu W, Crabtree G R. From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(5): 347–59.
- [15] Zhang Y, Laumet G, Chen S R, et al. Pannexin-1 up-regulation in the dorsal root ganglion contributes to neuropathic pain development [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(23): 14647–55.

Inhibition of Pannexin-1 expression in the trigeminal ganglion can alleviate trigeminal neuralgia

Wen Yuhuan, Zhang Yue, Zhu Dawei, et al

(College of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the role of Pannexin-1 (Panx 1) in trigeminal neuralgia. **Methods** Rat models of trigeminal neuralgia were established in male SD rats by chronic constriction of the left infraorbital nerve (ION-CCI). ION-CCI rats were randomly divided into two groups: CCI + Panx 1-siRNA group which the ION-CCI rats were received injection of Panx 1 specific siRNA to the left trigeminal ganglion area; CCI + Ctl-siRNA group which the ION-CCI rats were received injection of negative control siRNA to the left trigeminal ganglion area. The expression of Panx 1 in the left trigeminal ganglion of the two groups were compared by Western blot and quantitative RT-PCR. The mechanical stimulation response of the left whisker pads of the two groups was evaluated by Von Frey Hairs. **Results** The results of quantitative RT-PCR and Western blot both indicated that Panx 1 expression in the left trigeminal ganglion of CCI + Panx 1-siRNA group was significantly lower than that of CCI + Ctl-siRNA group. In addition, the mechanical stimulation threshold of the CCI + Panx 1-siRNA group was significantly higher than that of the CCI + Ctl-siRNA group. **Conclusion** Inhibition of Panx 1 expression in the trigeminal ganglion can alleviate the allodynia response of trigeminal neuralgia.

Key words Pannexin; neuropathic pain; trigeminal neuralgia; infraorbital nerve