

网络出版时间:2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.010.html

三叉神经痛模型大鼠三叉神经节神经元中 NPR-A 表达量的变化

韩 良¹, 崔曼曼¹, 徐文华¹, 刘悦雁², 王烈成³, 王元银¹

摘要 目的 检测三叉神经痛(TN)模型大鼠的三叉神经节(TG)神经元中 NPR-A 受体 mRNA 表达量的变化。方法 采用眶下神经缩窄术和经眶下孔注射肿瘤坏死因子 α (TNF- α)将雄性 SD 大鼠随机分成 6 组,即对照组 1(假手术组)、对照组 2(生理盐水注射组)、眶下神经缩窄模型组(ION-CCI 组)术后 1 周和 2 周以及经眶下孔注射 TNF- α 组(TNF- α 组)注射后 1 周和 2 周。Q-PCR 法检测 NPR-A 受体 mRNA 的表达。结果 每组大鼠 TG 均表达 NPR-A 受体 mRNA。其中 ION-CCI 组术后 2 周以及 TNF- α 组注射后 1 周和 2 周 TG 内 NPR-A 受体 mRNA 表达含量均显著高于相应对照组($n=4$ $P<0.05$)。结论 大鼠 TG 表达的 NPR-A 受体可能与大鼠 TN 及炎性痛的发生和发展相关。

关键词 三叉神经节;慢性压迫性损伤;三叉神经痛

中图分类号 R 745.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1097-04

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是一种神经病理性疼痛,累及三叉神经一支或几支,其分布区域内出现阵发性、电击样剧烈疼痛,持续数秒钟至数分钟,疼痛具有周期性,间歇期无症状^[1]。近年来已经建立多种较为成熟的 TN 动物模型,如光化学损伤诱导 TN 动物模型^[2]、眶下神经缩窄 TN 动物模型^[3]以及本课题组前期建立的经眶下孔注射相关炎症因子制造大鼠 TN 模型^[4]。利钠肽(natriuretic peptides, NPs)是一种神经肽,包括心房利钠肽、脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、C 型利钠肽、D 型利钠肽和 V 型利钠肽。BNP 在与其受体 NPR-A 结合后,通过第二信使 cGMP 在体内发挥相应的生

理学功能。该研究将建立两种不同的 TN 模型,即眶下神经缩窄模型和经眶下孔注射肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)模型,观察其行为学改变及 TG 神经元中 NPR-A 的 mRNA 的动态变化,以探讨 NPR-A 在两种不同造模方式下三叉神经节内的变化规律,为 TN 新的治疗途径提供生理学基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠,普通级,由安徽医科大学实验动物中心提供,180~200 g,分笼常规饲养、自由饮水,在标准环境下饲养(相对湿度:约 50%,温度:20~25 °C,12 h 明/12 h 暗)。实验开始前 1 周,对实验大鼠进行适应性刺激(用 Von-Frey hairs 疼痛测试棒刺激大鼠双侧三叉神经分布区域内的颜面部触须垫),每日连续刺激 5 次,间歇不少于 30 s,双侧交替进行,选用对以上刺激反应平静且口鼻部毛发触须完整的大鼠用于造模。

1.2 实验分组及造模方法 将符合实验标准的大鼠随机分为 6 组,即对照组 1(假手术组)、眶下神经慢性缩窄 1 周组、眶下神经慢性缩窄 2 周组、对照组 2(生理盐水注射组)、TNF- α 1 周组、TNF- α 2 周组。每组 5 只。配置 10% 水合氯醛,将各组大鼠称重后,按 0.35 ml/100 g 的标准腹腔注射,待麻醉生效后,缩窄模型组大鼠沿大鼠手术侧(左颊部)颧骨下缘距鼻背部约 0.5 cm,做长度为 0.5~1 cm 切口,钝性分离肌肉,显露眶下神经。从近端向远端分离约 4~5 mm 的长度。生物解剖镜下将两根铬线(4-0)力度适中的结扎眶下神经,间距约 2~3 mm。压迫标准:在镜下可见眶下神经直径稍微变细,但是神经传导不能完全被阻断,且其外膜的血液循环畅通。假手术组除不结扎眶下神经外,其余手术方法均与 ION-CCI 模型组相同。TNF- α 组大鼠待麻醉生效后,对注射侧(左侧)触须垫常规消毒后,固定大鼠头部,持微量注射器自左侧鼻翼旁约 1 cm 处与皮肤呈 45° 向上、后进针 1.5 cm,刺入眶下孔,注射 5 μ l 用 0.1% 牛血清白蛋白配制的 0.01 ng/ μ l TNF- α 。生理盐水注射组注射 5 μ l 0.9% NaCl。操作均在无

2016-04-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162);安徽省高等学校省级优秀青年人才基金项目(编号:2012SQRL070);安徽省高校省级优秀青年人才基金重点项目(编号:2013SQRL146ZD)

作者单位:¹安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,合肥 230032

²皖西卫生职业学院生理学教研室,六安 237000

³安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:韩 良,女,硕士研究生;

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

菌条件下进行。

1.3 模型的验证 眶下神经支配区机械痛阈测定参照 Christensen^[5]、Vos et al^[6] 的标准,在安静的实验环境下,将大鼠置于鼠笼 10 min 后,持 VonFrey hairs 疼痛测试棒缓慢靠近大鼠,刺激大鼠手术侧触须垫,在刺激过程中测试棒强度需由小到大缓慢增加,每个强度分别刺激 10 次,2 次刺激应至少间隔 30 s。大鼠的阳性反应包括:① 攻击行为,表现出大鼠迅速抓咬刺激物;② 缩头反应,表现出头部迅速后缩;③ 连续搔抓面部受刺激区域的行为,一般情况下均伴随后退动作。刺激实验阳性标准:出现以上 3 种反应中任意 1 项或 1 项以上。使大鼠产生阳性反应的最小刺激强度值即为手术侧触须垫机械痛阈值。

1.4 Q-PCR 法检测 NPR-A 的 mRNA 含量 大鼠断头处死后,快速取出左侧三叉神经节(trigeminal Ganglion, TG),用 TRizol 提取液提取组织总 RNA,然后用 NanoDrop ND-3000(美国 NanoDrop 公司)定量 RNA 样品。通过 PrimeScript™ RT 试剂盒进行逆转录。使用 sybgreen takara PCR 试剂盒进行 PCR 的扩增,总反应体系 20 μl。所涉及的引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
NPR-A	F: TGGAGACACAGTCAACACAGCTTC	71
	R: TCCAGCACAGCCTTGCTCTC	
β-actin	F: ATGGTGGGTATGGGTCAGGAG	246
	R: TGGCTGGGCTGTTGAAGGTC	

1.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析,两组数据间的比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验侧触须垫机械痛阈的变化 ION-CCI 组大鼠术后 1 周,面部触须垫机械痛域明显下降[从(16.66 ± 1.59) g 下降到(7.90 ± 1.34) g],术后第 2 周时痛域降至最低(4.22 ± 1.06) g,这种效应至少持续至术后第 8 周(9.17 ± 1.66) g,与假手术组比较差异均有统计学意义(n = 5, F = 74.32、282.59, P < 0.01)(图 1A、表 2)。TNF-α 组大鼠注射后 1 周即出现面部机械痛域降低[从(16.65 ± 1.69) g 下降至(5.86 ± 1.23) g],术后第 2 周下降至最低(3.66 ± 1.26) g,与生理盐水注射组比较差异有统

计学意义(n = 5, F = 103.04、123.16, P < 0.01)(图 1B、表 3)。TNF-α 组大鼠后期机械痛域逐渐上升,至第 8 周(14.61 ± 1.85) g 基本恢复到术前水平(图 1B)。而两组对照组大鼠术前术后的疼痛阈值没有显著性改变(图 1)。

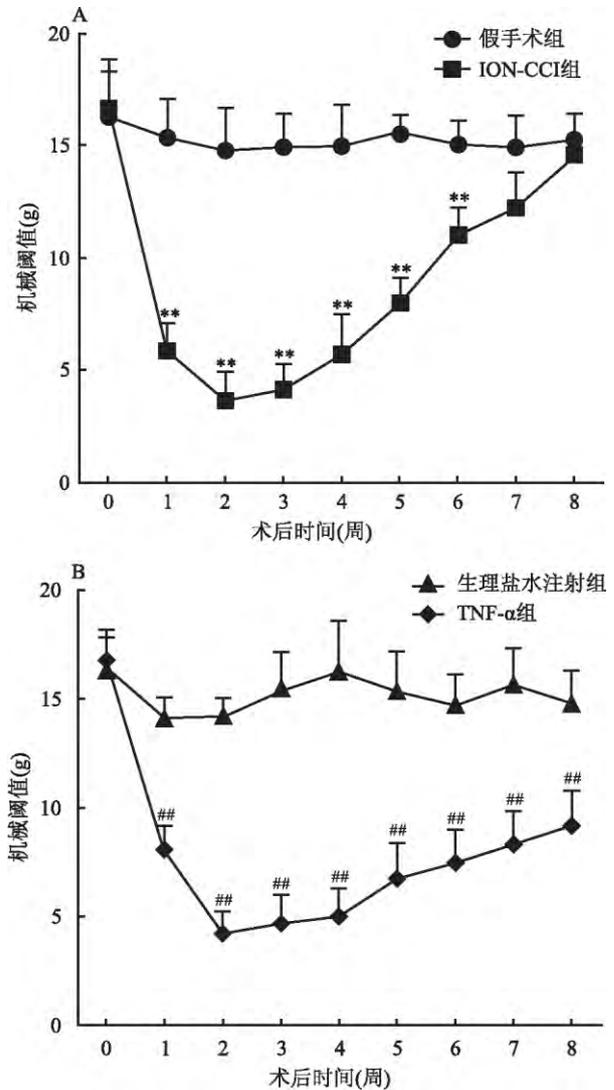


图 1 ION-CCI 组和 TNF-α 组触须垫机械痛域的变化

A: ION-CCI 组; B: TNF-α 组; 与假手术组比较: * P < 0.01; 与生理盐水注射组比较: # P < 0.01

2.2 NPR-A 的 mRNA 在 TG 的表达 与相应对照组比较,ION-CCI 组和 TNF-α 组在术后 1 周 NPR-A mRNA 的表达皆有所升高,其中 TNF-α 组差异有统计学意义(n = 4, F = 4.99、30.30, P < 0.05)。术后第 2 周,ION-CCI 组和 TNF-α 组的 NPR-A mRNA 含量均进一步升高,与相应对照组比较差异具有统计学意义(n = 4, F = 16.10、109.43, P < 0.01)。见图 2。

表2 假手术组和 ION-CCI 组触须垫机械痛域的统计结果($\bar{x} \pm s$)

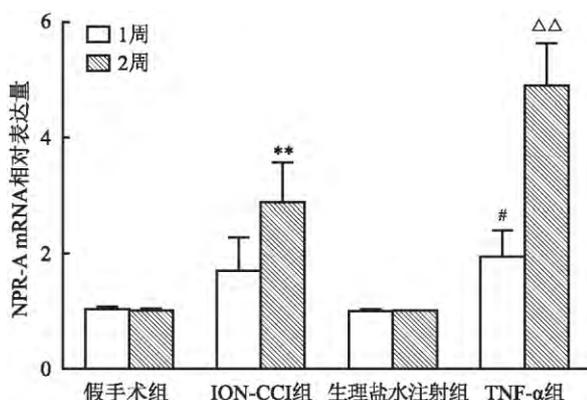
项目	假手术组	ION-CCI 组	F 值
注射前	16.46 ± 1.40	16.66 ± 1.59	0.04
注射后 1 周	14.17 ± 0.92	7.90 ± 1.34**	74.32
注射后 2 周	14.25 ± 0.81	4.22 ± 1.06**	282.59
注射后 3 周	15.45 ± 1.74	4.63 ± 1.42**	116.53
注射后 4 周	16.35 ± 2.28	4.97 ± 1.37**	91.38
注射后 5 周	15.42 ± 1.82	6.78 ± 1.61**	63.21
注射后 6 周	14.76 ± 1.38	7.53 ± 1.50**	62.64
注射后 7 周	15.70 ± 1.66	8.31 ± 1.58**	51.99
注射后 8 周	14.88 ± 1.45	9.17 ± 1.66**	33.76

与同时时间点假手术组比较, ** $P < 0.01$

表3 对照组 2 和 TNF- α 组触须垫机械痛域的统计结果($\bar{x} \pm s$)

项目	生理盐水注射组	TNF- α 组	F 值
注射前	16.26 ± 2.58	16.65 ± 1.69	8.34
注射后 1 周	15.41 ± 1.70	5.86 ± 1.23**	103.04
注射后 2 周	14.83 ± 1.86	3.66 ± 1.26**	123.16
注射后 3 周	14.99 ± 1.46	4.19 ± 1.13**	171.26
注射后 4 周	15.03 ± 1.82	5.78 ± 1.73**	67.91
注射后 5 周	15.57 ± 0.79	7.99 ± 1.13**	151.55
注射后 6 周	15.08 ± 1.05	11.02 ± 1.24**	31.14
注射后 7 周	14.97 ± 1.41	12.27 ± 1.57	8.14
注射后 8 周	15.31 ± 1.14	14.61 ± 1.85	0.51

与同时时间点生理盐水注射组比较: ** $P < 0.01$

图2 ION-CCI 组和 TNF- α 组

NPR-A 的 mRNA 表达含量变化趋势

与 2 周假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与 1 周生理盐水注射组比较: # $P < 0.05$; 与 2 周生理盐水注射组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

本实验中 ION-CCI 模型和经眶下孔注射 TNF- α 模型大鼠, 在术后第 1 周出现面部眶下神经支配区域机械痛域显著降低, 到约第 2 周到达痛域的最低值, 至少可以维持至术后第 6 周。对照组术后相同区域机械痛域无显著性改变, 与前期文献^[4,7] 报道相一致。

现已发现神经节中存在多种神经肽及其受体。

CGRP 在 TG 中直径较小的细胞中表达, 受到刺激后可有 C 纤维和 A 纤维释放^[8]。生长抑制素及其受体在 TG 有表达, 可抑制较小直径的 TG 神经元的兴奋性^[9]。这些神经肽及其受体的含量在外周神经受损或炎症时有较大的改变。这种改变暗示着神经肽及其受体可能在 TN 的痛觉传递和调节中有潜在的作用。BNP 最初是从猪脑组织中分离出来, 其合成和分泌主要是在心房和心室内, 而且心房中 BNP 量是心室中 BNP 量的 50 ~ 100 倍^[10]。至目前为止, 在哺乳动物体内发现三种利钠肽受体 (natriuretic peptide receptor, NPR), 即 NPR-A、NPR-B、NPR-C, NPs 选择性与其相应受体结合并产生生理学效应。NPR-A 基本上分布在某些大血管、肾脏、肾上腺, 其是心房利钠肽和 BNP 的共同受体^[11]。NPR-A 是一种鸟嘌呤环化酶受体, 分子量 120 ~ 140 ku, 分为细胞外结构域、激酶同源结构域以及鸟嘌呤环化酶结构域 3 个结构域。BNP 与其受体的细胞外结构域结合, 激活细胞内鸟嘌呤环化酶, 产生第二信使 cGMP^[12], 继而调节 cGMP 依赖蛋白的活性来发挥生理学活性。这三种 cGMP 依赖蛋白分别是依赖于 cGMP 的蛋白激酶 (cGMP-dependent protein kinases, PKG)、依赖于 cGMP 的磷酸二酯酶、环核苷酸门控离子通道。细胞外结构域可与 ATP 结合, 使其鸟嘌呤环化酶活性增大; 细胞外结构域在一定条件下可磷酸化和去磷酸化, 这种结构的变化对 NPR-A 的生理功能调节发挥极大影响^[13]。在外周神经节中, BNP 在与 NPR-A 受体结合后, 通过其受体的腺苷酸环化酶催化 GTP 转化成第二信使 cGMP, 再通过 cGMP 参与 PKG 等不同信号通路的调节, 可能会参与疼痛的发生发展, 且对疼痛起调节作用。

近年来, 有研究显示 BNP 对痛觉具有调控作用, 主要集中在背根神经节和脊髓组织; 其可能机制是伤害性感觉神经元中 BNP 及其受体 NPR-A 的基因表达在外周组织炎症作用下显著增加, 并在谷氨酸作用条件下, BNP 通过增大 BK_{ca} 开放概率来减少伤害性感觉神经元兴奋性, 抑制了痛觉信息的传入。在脊髓腔内注射 BNP 后, 急性和慢性炎症痛可被显著性的抑制^[14]。通过激活位于突触前的 NPR-A, 由伤害性感觉传入纤维分泌的 BNP 可对兴奋性突触传递起抑制性调节作用。在大鼠的离体 TG 中小神经元中也有 BNP 及其受体的存在, 并可通过调节 TRPV1 和 P₂X₃ 受体的活性参与疼痛的传导^[15]。本研究显示大鼠 ION-CCI 模型中术后 1 周 NPR-A 的 mRNA 表达约为对照组的 1.7 倍, 术后 2 周时 NPR-

A 的 mRNA 的表达约为对照组的 2.9 倍。在经眶下孔注射 TNF- α 制造大鼠 TN 模型中,术后第 1 周 NPR-A 的 mRNA 约为对照组 1.94 倍,术后第 2 周其 mRNA 约为对照组的 4.9 倍。此结果的变化趋势与术后大鼠机械痛域的变化趋势相符,提示 NPR-A 可能会参与疼痛的发生发展。

综上所述,本实验从两种不同的 TN 模型大鼠中均可检测到 NPR-A 的 mRNA 表达升高,提示在疼痛的发生发展过程中 NPR-A 可能会起调节作用。在后续研究中,将进一步观察两种不同模型大鼠三叉神经元中 BNP 和 NPR-A 对疼痛的具体调节机制,为深入探索 TN 的病因及其机制提供依据。

参考文献

- [1] 张志愿. 口腔颌面外科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 405-7.
- [2] 崔悦, 赵佳, 王晔, 等. 一种光化学损伤的三叉神经痛的建立 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(7): 1026-30.
- [3] 孙晖, 李国超, 王元银, 等. 眶下神经慢性缩窄环三叉神经痛动物模型的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(12): 2113-6.
- [4] 马腾飞, 王霁蕾, 黄珊珊, 等. 经眶下孔注射相关炎症因子制造大鼠三叉神经痛模型的实验研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(6): 753-5.
- [5] Christensen D, Gautron M, Guilbaud G, et al. Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (+)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain [J]. *Pain*, 1999, 83(3): 433-40.
- [6] Vos B P, Strassman A M, Maciewicz R J. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve [J]. *J Neurosci*, 1994, 14(5 Pt 1): 2708-23.
- [7] 赵莉莉, 雷洁, 王元银, 等. P2X2/3 受体在大鼠眶下神经慢性压迫性损伤中表达水平的动态变化 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(5): 676-808.
- [8] Eftekhari S, Warfvinge K, Blixt F W, et al. Differentiation of nerve fibers storing CGRP and CGRP receptors in the peripheral trigemino-vascular system [J]. *J Pain* 2013, 14(11): 1289-303.
- [9] Takeda M, Kadoi J, Takahashi M, et al. Somatostatin inhibits the excitability of rat small-diameter trigeminal ganglion neurons that innervate nasal mucosa and project to the upper cervical dorsal horn via activation of somatostatin 2a receptor [J]. *Neuroscience*, 2007, 148(3): 744-56.
- [10] Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, et al. A new natriuretic peptide in porcine brain [J]. *Nature*, 1988, 332(6159): 78-81.
- [11] Pandey K N. Endocytosis and trafficking of natriuretic peptide receptor-A: potential role of short sequence motifs [J]. *Membranes (Basel)*, 2015, 5(3): 253-87.
- [12] de Denus S, Pharand C, Williamson D R. Brain natriuretic peptide in the management of heart failure: the versatile neurohormone [J]. *Chest*, 2004, 125(2): 652-68.
- [13] 徐丽, 陈兰英. 利钠肽结构、受体的生理和病理作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(8): 1517-21.
- [14] Zhang F X, Liu X J, Gong L Q, et al. Inhibition of inflammatory pain by activating B-type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(32): 10927-38.
- [15] Vilotti S, Marchenkova A, Ntamati N, et al. B-type natriuretic peptide-induced delayed modulation of TRPV1 and P2X3 receptors of mouse trigeminal sensory neurons [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81138.

Variation of NPR-A receptor expression on mouse trigeminal ganglion neurons of trigeminal neuralgia model

Han Liang, Cui Manman, Xu Wenhua, et al

(College of Stomatology, Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression of NPR-A receptor on mouse trigeminal ganglions of trigeminal neuralgia model. **Methods** Male SD rats were randomly assigned into 6 groups: control group 1 (sham group), control group 2 (infraorbital foramen inject normal saline group), chronic constriction injury of the infraorbital nerve group (ION-CCI group) 1 week and 2 weeks and infraorbital foramen inject TNF- α group (TNF- α group) 1 week and 2 weeks. The expressions of NPR-A mRNA were detected by Q-PCR. **Results** The expression of NPR-A was detected in all groups. And the expressions of NPR-A in the ION-CCI group 2 weeks and TNF- α group 1 week and 2 weeks were higher than that in the corresponding control group. **Conclusion** NPR-A receptor on mouse trigeminal ganglions may be involved in the trigeminal neuralgia and inflammatory pain.

Key words trigeminal ganglion; chronic constriction injury; trigeminal neuralgia