

脊髓水平 TRPM8 激活参与疼痛-瘙痒共病的研究

汤黎黎¹ 陈家骅² 鲁显福^{1,2,3} 刘 鹤³

摘要 目的 观察神经病理性疼痛对瘙痒神经信号转导的影响,探讨瞬时受体电位 M8 离子通道 (TRPM8) 在疼痛-瘙痒共病中的作用。方法 实验一:将 KM 雄性小鼠 48 只随机分为 6 组,神经病理性疼痛组 (SNI)、假手术组 (Sham)、瘙痒组 (CQ)、瘙痒溶媒组 (NS)、疼痛瘙痒共病组 (SQ) 及空白对照组 (CON);实验二:KM 雄性小鼠 16 只,分为 SQ + AMTB (SQ-A) 组和 SQ + AMTB 溶媒对照组 (SQ-V)。CON、SNI、Sham、SQ 组在术前 1 d,术后 1、3、5 d 测定术侧机械痛阈值 (MWT)、冷痛阈值及热痛潜伏期 (PWL),CON、CQ、NS、SQ 组分别注射氯喹或生理盐水后观察搔抓发作潜伏期及发作次数;实验二:SNI 模型建立第 5 天分别鞘注 AMTB (SQ-A) 及溶媒 (SQ-V) 前后测定疼痛行为学,注射氯喹和生理盐水后观察瘙痒行为学。结果 SNI 组及 SQ 组在术后 1 d 冷痛阈值及 MWT 降低,第 5 天仍在较低水平,而 PWL 仅在术后 1 d 下降差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。SQ-A 组较 SQ-V 组鞘注后冷痛阈值、MWT 显著升高 ($P < 0.05$),两组 PWL 变化差异无统计学意义。CQ 组较 NS 组定向搔抓次数显著增多,搔抓潜伏期缩短 ($P < 0.05$),SQ 组搔抓次数明显低于 CQ 组 ($P < 0.05$),但搔抓潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。SQ-A 组搔抓次数显著高于 SQ-V 组 ($P < 0.05$),但搔抓潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 疼痛-瘙痒共病时疼痛能够抑制瘙痒神经信号传导,可能与神经病理性疼痛引起的 TRPM8 受体表达上调有关。

关键词 神经病理性痛;瘙痒;TRPM 阳离子通道;氯喹

中图分类号 R 441.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1562-04

临床上,带状疱疹后遗神经痛、尿毒症等慢性疼痛性疾病常以疼痛-瘙痒共病的症状同时出现,却缺乏特异性有效治疗药物^[1]。疼痛和瘙痒是两种不同的感觉体验,二者之间可能存在复杂的交互作用。瞬时受体电位 M8 离子通道 (transient recep-

tor potential melastatin 8, TRPM8) 是机体温度敏感性瞬时感受器电位 (transient receptor potential, TRP) 蛋白超家族中一员,主要分布在外周三叉神经节和脊髓背根神经节的初级传入神经元,主要介导机体冷痛觉^[2],可被薄荷醇、冷刺激 ($< 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) 等激活,是否参与了瘙痒症状的形成与发展,目前尚未明确。该研究拟对疼痛与瘙痒之间的相互关系进行研究,并探讨 TRPM8 活性是否参与疼痛-瘙痒共病。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要材料 SPF 级 KM 小鼠,雄性 64 只,体重 20~30 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。冷板足底触觉测量器、YLS-智能热板仪及机械痛测痛架 (安徽淮北正华实验器材有限公司);电子 Von-frey 机械测痛仪 (美国 IITC Life Science);氯喹 (批号:101197043,美国 Sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 坐骨神经选择性分支损失疼痛模型的建立

参照文献^[3],小鼠左侧后肢切开皮肤,分离皮下及肌肉,暴露并分离坐骨神经及其 3 末端分支:腓肠神经、腓总神经和胫神经,用 6-0 丝线结扎腓总神经和胫神经,靠近结扎处切断,保留大约 2 mm 的远侧残端,保持腓肠神经完整,缝合肌肉和皮肤。

1.2.2 瘙痒模型 参照文献^[4],左手戴手套固定小鼠,实验前 1 d 小鼠颈背部皮肤用脱毛剂脱毛,次日小鼠适应环境后在颈部脱毛处皮下注射 200 μg /50 μl 氯喹诱导瘙痒模型。

1.2.3 鞘内注射 拇指和中指固定小鼠腰 5 横凸,将皮肤捏紧,消毒,用微量注射器在 L4/5 椎间隙进针,直接注射,出现小鼠侧向甩尾,表明药物进入蛛网膜下腔,回抽无血即注射工具药。

1.3 动物行为学测定

1.3.1 冷痛阈值测定 参照文献^[5]方法,将小鼠放在表面温度为 $(4 \pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冷板上,外罩透明塑料笼子,适应环境 5 min,其探究活动基本消失后,开始记录随后 20 min 内术侧后肢的抬足次数及累计抬足时间,小鼠因活动或体位变化所引起的抬足不计入内。

1.3.2 热痛阈值测定 采用 58 $^{\circ}\text{C}$ 的热板进行热痛

2014-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目 (编号:81300957);
江苏省教育厅高校省级重点实验室开放课题 (编号:KJS1101)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 麻醉科、² 疼痛科,合肥 230022

³ 江苏省麻醉学重点实验室,徐州 221000

作者简介:汤黎黎,女,住院医师,硕士研究生;

陈家骅,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: chenjihua001@sina.com

缩爪潜伏期(paw withdrawal latency, PWL)测定^[6]。动物先在室温 20 ~ 23 °C 的实验环境内适应(至少 30 min)后,采用智能热板仪测定小鼠术侧 PWL,每间隔 4 min 测定 1 次,计 3 次平均值作为最终测定结果;最大热痛潜伏期设定为 15 s。

1.3.3 机械痛阈值测定 采用电子 Election Von-frey 测定机械阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)。小鼠置于透明有机玻璃箱内适应环境 30 min 将 Election Vonfrey Rigid tip 垂直安放在传感器上,空载调零后,观察最大折力数据,间隔 5 min 测 1 次,共测 3 次,取平均值作为 MWT 测定结果。

1.3.4 瘙痒行为反应观察 该研究采用氯喹诱导的非组胺依赖性瘙痒模型。小鼠在玻璃罩内适应环境后,氯喹皮下注射,注射结束到第一次定向颈部脱毛处搔抓时间记为搔抓潜伏期,后足定向向注射部位连续搔抓的动作定义为搔抓发作,30 min 的观察期内每 5 min 的时间间隔记录搔痒发作的数目^[4]。

1.4 实验分组 实验一:雄性 KM 小鼠 48 只随机分为 6 组,分别为坐骨神经分支选择性损伤组(SNI)、假手术组(Sham)、瘙痒组(CQ)、瘙痒对照组(NS)、空白对照组(CON)及疼痛-瘙痒共病组(SQ)。SNI 组为选择性切断腓总神经和胫神经组;Sham 组只分离神经不进行结扎切断;CQ 组于小鼠颈背部注射 200 μ g/50 μ l 氯喹;NS 组于小鼠颈背部注射 50 μ l 的生理盐水;SQ 组是小鼠进行 SNI 疼痛模型后第 5 天于颈背部注射 200 μ g/50 μ l 氯喹;CON 组不进行处理。实验二:健康雄性 KM 小鼠 16 只随机分为 2 组,分别是疼痛瘙痒共病模型加 TR-PM8 拮抗剂(AMTB)组(SQ-A)和疼痛瘙痒共病模型加 AMTB 溶媒组(SQ-V)。

1.5 统计学处理 采用 Graphpad_Prism 5.0 统计软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用双因素方差分析或 t 检验。

2 结果

2.1 各组疼痛行为学的变化 SNI 组较 Sham 组及 CON 组术后不同时点机械痛阈值、冷板抬足时间、抬足次数行为学指标差异均有统计学意义($P < 0.01$),术后 SNI 组热痛阈值较术前下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),但是各组间差异无统计学意义。Sham 组在术后 1 d 机械痛阈值 MWT 较术前 1 d 下降($P < 0.05$),其他时点及热痛阈值及冷痛阈值行为学指标较术前差异均无统计学意义($P > 0.05$),Sham 组和 CON 组在同一时点行为学指标差异比较无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 瘙痒行为学变化 CQ 组较 NS 组瘙痒发作潜伏期明显缩短(133.70 ± 7.94 vs 303.80 ± 42.48 , $P < 0.05$),前 20 min 的每 5 min 观察周期内,搔抓次数显著多于 NS 组及 CON 组($P < 0.01$),后 10 min 搔抓次数较前有所下降但仍高于 NS 组($P < 0.05$)。NS 组在 30 min 搔抓总次数及 5 min 小周期内搔抓次数较 CON 组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

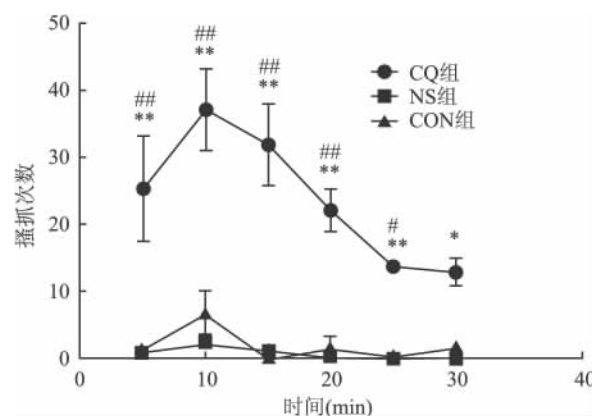


图1 各组搔抓次数比较(次 $n=8 \bar{x} \pm s$)

与 NS 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CON 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表1 各组小鼠疼痛行为学不同时点的比较($n=8 \bar{x} \pm s$)

项目	组别	术前 1 d	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d
MWT(g)	SNI	11.17 \pm 0.21	1.26 \pm 0.22 ^{ΔΔ**}	1.20 \pm 0.15 ^{ΔΔ**}	0.91 \pm 0.22 ^{ΔΔ**}
	Sham	11.86 \pm 0.31	10.65 \pm 0.15 ^Δ	11.73 \pm 0.36	11.89 \pm 0.12
	CON	11.93 \pm 0.10	11.69 \pm 0.15	11.97 \pm 0.19	12.02 \pm 0.45
PWL(s)	SNI	8.30 \pm 0.20	7.46 \pm 0.33 ^Δ	7.96 \pm 0.36	7.21 \pm 0.19
	Sham	8.56 \pm 0.58	8.47 \pm 0.39	8.60 \pm 0.18	7.85 \pm 0.58
	CON	8.28 \pm 0.47	8.47 \pm 0.50	8.13 \pm 0.51	8.10 \pm 0.60
抬足次数(次)	SNI	8.67 \pm 1.26	27.33 \pm 2.49 ^{ΔΔ}	29.33 \pm 3.70 ^{ΔΔ}	25.00 \pm 4.24 ^{ΔΔ}
	Sham	9.17 \pm 2.21	8.50 \pm 1.73	8.67 \pm 2.06	8.67 \pm 2.19
	CON	8.17 \pm 1.01	8.33 \pm 1.38	8.17 \pm 1.47	8.67 \pm 1.71
抬足时间(s)	SNI	8.61 \pm 1.06	28.98 \pm 3.47 ^{ΔΔ**}	31.13 \pm 4.07 ^{ΔΔ**}	25.73 \pm 3.44 ^{ΔΔ**}
	Sham	9.00 \pm 2.39	10.25 \pm 2.12	8.82 \pm 3.12	8.78 \pm 3.21
	CON	8.88 \pm 1.91	8.95 \pm 1.78	9.42 \pm 2.91	9.05 \pm 2.03

与同组术前 1 d 比较: ^Δ $P < 0.05$; 与同时点 CON 组比较: ^{ΔΔ} $P < 0.05$, ^{ΔΔΔ} $P < 0.01$; 与同时点 Sham 组比较: ** $P < 0.01$

表2 SQ-A组和SQ-V组术前1 d、术后1 d、术后5 d腰段鞘注AMTB及溶媒前后疼痛行为学的变化 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

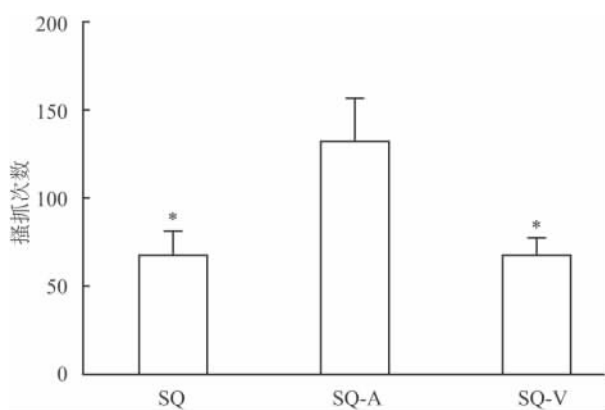
观察项目	组别	术前1 d	术后1 d	鞘注前	鞘注后
机械痛阈值(g)	SQ-A	11.79 \pm 0.32	1.21 \pm 0.23 ^{**}	1.20 \pm 0.11	6.34 \pm 0.41 ^{Δ▲▲}
	SQ-V	10.94 \pm 0.34	1.22 \pm 0.08 ^{**}	1.21 \pm 0.28	1.11 \pm 0.15
热痛阈值(S)	SQ-A	8.79 \pm 0.71	6.87 \pm 0.48 [*]	7.23 \pm 0.71	7.33 \pm 0.37
	SQ-V	8.08 \pm 0.50	6.59 \pm 0.36 [*]	7.76 \pm 0.37	7.69 \pm 0.25
冷板抬足次数(次)	SQ-A	8.50 \pm 1.82	25.00 \pm 4.20 ^{**}	25.83 \pm 1.22	8.50 \pm 1.78 ^{Δ▲▲}
	SQ-V	8.33 \pm 1.02	21.67 \pm 1.26 ^{**}	22.83 \pm 1.01	19.33 \pm 1.99
冷板抬足时间(s)	SQ-A	8.07 \pm 1.91	28.35 \pm 5.83 ^{**}	29.80 \pm 1.87	8.13 \pm 1.69 ^{Δ▲▲}
	SQ-V	7.42 \pm 0.94	23.27 \pm 1.28 ^{**}	24.38 \pm 2.53	20.13 \pm 2.35

与同组术前1 d比较:^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$;与同组鞘注前比较: ^{▲▲} $P < 0.01$;与鞘注后SQ-V组比较: ^Δ $P < 0.05$

2.3 SQ组鞘注TRPM8阻断剂AMTB及溶媒后行为学变化

2.3.1 疼痛行为学 SNI模型术后1 d及术后5 d较术前MWT、冷板抬足时间、抬足次数行为学指标差异均有统计学意义($P < 0.01$), PWL较术前显著下降($P < 0.05$),第5天腰段鞘注5 μ l AMTB 30 μ g/kg后各行为学指标较鞘注前差异有统计学意义($P < 0.01$),而SQ-V组鞘注溶媒后较鞘注前无明显变化($P > 0.05$),在术后5 d分别鞘注前后观察, SQ-A组与SQ-V组疼痛行为学差异无统计学意义($P > 0.05$),而鞘注后SQ-A组较SQ-V组MWT、PWL及冷板抬足次数、冷板抬足时间变化差异均有统计学意义。见表2。

2.3.2 瘙痒行为学 本实验中SNI模型术后鞘注AMTB剂量为30 μ g/kg, 30 min后,颈背部皮下注射氯喹, 30 min瘙痒发作次数比鞘注前及溶媒组显著增多($P < 0.05$),但发作潜伏期较鞘注前及溶媒组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

图2 小鼠的搔抓次数变化(次 $n=8$, $\bar{x} \pm s$)

与SQ-A组比较:^{*} $P < 0.05$

3 讨论

本研究制备SNI神经病理性疼痛模型,术后

24 h即可观察到MWT明显降低和冷板抬足次数及抬足累计时间显著增多,随时间进展持续较低水平,是一种对机械刺激更为敏感、稳定性也更高的神经病理性疼痛模型^[7]。但国内既往研究^[8]及本研究表明:在较短的周期内SNI模型对热刺激敏感性稍差,术后1 d,各组间热痛敏化反应不明显,可能与观察周期较短有关,与文献^[3]结果一致。TRPM8选择性阻断剂鞘内注射后机械痛阈值及冷痛阈值较鞘注前有显著的行为学变化,表明TRPM8通道参与了神经病理性疼痛中冷痛觉敏化的发生和维持。有学者在CCI神经病理性疼痛模型观察到该模型中TRPM8增多的趋势与冷异常性疼痛的发展过程一致^[9-10]。

本研究观察到CQ组的搔抓发作潜伏期较NS组明显缩短,30 min总搔抓次数显著增多也验证了MrgprA3+初级传入神经纤维兴奋后在脊髓背角与特异性介导瘙痒反应的GRPR+神经元形成直接的突触联系^[11]。在疼痛瘙痒共病模型中,观察到神经病理性疼痛形成后,30 min观察周期内搔抓次数较单纯瘙痒组明显下降,因此可推测神经病理性疼痛与瘙痒在脊髓背角或以上的中枢神经系统可能存在神经突触联系,抑制瘙痒的信号传导,减少其行为的发作次数。疼痛瘙痒共病模型鞘注AMTB 30 μ g/kg后,这种抑制作用减弱, SQ-A组小鼠搔抓发作次数较鞘注SQ-V组显著增多,该变化的神经机制尚不清楚,神经病理性疼痛时TRPM8的表达上调可能参与其中。

本研究仅通过瘙痒-疼痛模型的行为学变化,初步考察了冷感觉通道TRPM8在疼痛抑制瘙痒现象中的作用,但TRPM8阻断剂鞘注后易化瘙痒症状的发作,其参与疼痛-瘙痒的具体机制仍有待进一步研究,可能仍有潜在的引起皮肤瘙痒的副作用,因此,TRPM8可能并不是探索新型镇痛药物的理想靶点。

参考文献

- [1] Pfab F, Schalock P C, Napadow V, et al. Complementary integrative approach for treating pruritus [J]. *Dermatol Ther*, 2013, 26(2): 149–56.
- [2] Knowlton W M, Bifolck-Fisher A, Bautista D M, et al. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics *in vivo* [J]. *Pain*, 2010, 150(2): 340–50.
- [3] Decosterd I, Woolf C J. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain [J]. *Pain*, 2000, 87(2): 149–58.
- [4] Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, et al. Sensory neuron-specific GPCRs Mrgpr8 are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus [J]. *Cell*, 2009, 139(7): 1353–65.
- [5] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87–107.
- [6] Bianchi M, Sacerdote P, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Central effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha on nociceptive thresholds and spontaneous locomotor activity [J]. *Neurosci Lett*, 1992, 148(1–2): 76–80.
- [7] 梁 啸, 刘洪美, 李庆伟, 等. 对 SNI 和 CCI 两种大鼠神经病理性疼痛模型的实验观 [J]. *济宁医学院学报*, 2013, 36(1): 22–7.
- [8] 林 露, 陶国才, 易 斌, 等. 3 种神经病理性疼痛大鼠模型的评价 [J]. *重庆医学*, 2011, 40(1): 3–6.
- [9] Su L, Wang C, Yu Y H, et al. Role of TRPM8 in dorsal root ganglion in nerve injury-induced chronic pain [J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 120.
- [10] Rossi H L, Jenkins A C, Kaufman J, et al. Characterization of bilateral trigeminal constriction injury using an operant facial pain assay [J]. *Neuroscience*, 2012, 224: 294–306.
- [11] Han L, Ma C, Liu Q, et al. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch [J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16(2): 174–82.

Activation of spinal TRPM8 signaling pathway contributes to the co-morbidity of itch and pain

Tang Lili¹, Chen Jiahua², Lu Xianfu^{1,2,3}, et al

(¹Dept of Anesthesiology, ²Dept of Pain Management, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Jiangsu Provincial Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou 221000)

Abstract Objective To evaluate the roles for the co-morbidity of itch and pain, and to investigate the effect of TRPM8 in these processes. **Methods** In test 1, Forty-eight male KM mice were randomly divided into the CON group, Sham group, SNI group, CQ group, NS group and SQ group. The threshold of cold hyperalgesia, heat hyperalgesia and mechanical hyperalgesia were measured before operation and at 1, 3 and 5 d after operation in CON, SNI, Sham and SQ group. The scratching numbers were calculated within 30 minutes after chloroquine or saline injection in CON, CQ, NS and SQ group. In test 2, sixteen male KM mice were randomly divided into SQ-A and SQ-V group after 5 d of SNI operation, whose threshold of cold hyperalgesia, heat hyperalgesia and mechanical hyperalgesia were measured respectively. Mice underwent lumbar intrathecal injection of TRPM8 specific blocker AMTB 30 µg/kg in SQ-A group, while the SQ-V group received TRPM8 specific blocker AMTB vehicle. The scratching numbers were observed within 30 minutes of two groups' hair removal after chloroquine injection. **Results** Compared with Sham group and CON group, the total number and time of brisk lifts of operated hind paw in SNI group and SQ group were significantly increased on 1 d after SNI, and reached the peak on 3 d; MWT following SNI was significantly lower on 1 d and reached the peak on 5d; PWL was significantly reduced only on 1d postoperation ($P < 0.05$). Compared with SQ-V group, SQ-A group had significantly higher cold threshold and higher MWT ($P < 0.05$). However, there were no significant differences in PWL between the two groups. The directional scratching number of CQ group was significantly increased than the NS group and CON group, and the scratching latency was shorter ($P < 0.05$). The scratching number in the SQ group was significantly lower than that of CQ group ($P < 0.05$). The directional scratching number in the SQ-A group was significantly increased than that of the SQ-V group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the scratching latency. **Conclusion** Neuropathic pain suppress the transmission of pruritic information in the spinal dorsal horn, which the mechanism may be related to the upregulation of TRPM8 protein expression after neuropathic pain.

Key words neuropathic pain; itch; TRPM cation channels; chloroquine