

网络出版时间: 2019-5-9 10:20 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.012.html>

线粒体抗氧化对神经病理性疼痛大鼠 TRPV1 表达的影响

孙玉红 李 锐 张 野

摘要 目的 探讨线粒体抗氧化治疗对神经病理性疼痛(NP)大鼠脊髓水平瞬时感受器电位香草酸受体1(TRPV1)表达的影响。方法 清洁级雄性SD大鼠120只,采用随机数字表法分为3组:假手术组(Sham组 $n=40$)、神经病理性疼痛组(NP组 $n=40$)、抗氧化治疗组(MT组 $n=40$)。NP组和MT组采用慢性坐骨神经结扎(CCI)制备NP模型。术后第7天MT组腹腔注射三苯基磷阳离子结合抗氧化剂(MT) 0.7 mg/kg, Sham组和NP组腹腔注射生理盐水, 1次/d, 连续14 d。术前及术后第3、7、14、21天时测定机械缩足反应阈(MWT)和热缩足潜伏期(TWL), 评价疼痛行为。术前及术后第3、7、14、21天取大鼠L4-6节段脊髓, 采用Western blot法测定TRPV1的表达。结果 与Sham组比较, NP组大鼠术后第3、7、14、21天MWT明显降低($P<0.05$), TWL明显缩短($P<0.05$), MT组大鼠术后第3、7天MWT明显降低($P<0.05$), TWL明显缩短($P<0.05$); 与NP组比较, MT组大鼠术后第14、21天MWT明显升高($P<0.05$), TWL明显延长($P<0.05$)。与Sham组比较, NP组大鼠脊髓TRPV1表达在术后第7、14、21天明显增加($P<0.05$), MT组大鼠术后第7天脊髓TRPV1表达明显增加($P<0.05$); 与NP组比较, MT组大鼠脊髓TRPV1在术后第14、21天明显降低($P<0.05$)。结论 线粒体抗氧化可以缓解NP大鼠的疼痛行为, 可能与降低脊髓水平TRPV1表达有关。

关键词 神经病理性疼痛; 线粒体抗氧化; TRPV1

中图分类号 R 741.05

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0723-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.012

2019-01-10 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学研究项目(编号: KJ2016A327)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院麻醉科, 合肥 230601

作者简介: 孙玉红, 女, 硕士研究生;

张野, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zhangye_hassan@sina.com

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是损伤或疾病累及包括外周和中枢水平在内的躯体感觉系统的结果。NP两种主要突出特征是痛觉过敏和自发疼痛。NP起因广泛, 病理生理机制复杂, 常规阿片类药物或非甾体抗炎药治疗效果均不理想^[1]。前期研究^[2]显示线粒体靶向抗氧化剂能有效缓解大鼠的疼痛行为, 与减轻氧化应激水平, 改善线粒体功能有关, 但具体机制仍不明确。瞬时感受器电位香草酸受体1(transient receptor potential cation channel subfamily V, member 1, TRPV1)是瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)超家族成员之一, 主要表达在初级传入感觉神经元上, 与痛觉传递与调制密切相关。激活的TRPV1可以介导P物质等释放产生痛觉^[3]。该研究拟探讨线粒体抗氧化对NP大鼠疼痛行为及TRPV1表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、仪器和试剂 清洁级雄性SD大鼠120只, 6~8周龄, 体质量200~230 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。von-Frey触痛仪购自美国IITC公司; 热痛刺激仪(BME-410A)购自北京中国医学科学院生物工程研究所; 三苯基磷阳离子结合抗氧化剂(mito-tempo, MT, sc-221945A)购自美国Santa Cruz公司, -20℃冰箱保存, 使用生理盐水稀释成所需浓度; TRPV1一抗购自台湾Abnova公司; β -actin一抗、山羊抗鼠IgG二抗购自美国Abcam公司。

1.2 NP模型的建立 参考Bennett et al^[4]的方法制备左侧后肢慢性坐骨神经损伤(chronic constriction injury, CCI)模型。大鼠称重后, 采用腹腔给药

significantly lower than those of the CIR group and the RES + EX527 group ($P<0.01$). The mRNA and protein expressions of FoxO1, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in RES group were significantly lower than those in CIR group and EX527 group ($P<0.01$), while the expression of SIRT1 mRNA and protein in RES group was significantly higher than that in CIR group and RES + EX527 group ($P<0.01$). **Conclusion** Resveratrol can inhibit the expression of FoxO1, reduce the release of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β and promote the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 by activating SIRT1, thereby improving cerebral ischemia/reperfusion damage in rats.

Key words resveratrol; ischemia-reperfusion injury; SIRT1; FoxO1

戊巴比妥钠(40~50 mg/kg)麻醉。麻醉起效后,在股骨下方约1 cm平行于股骨切开皮肤,用小剥离子经股二头肌间隙钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,用神经剥离子轻柔将坐骨神经与周围软组织分离;在坐骨神经分成三支前的主干部位游离神经7 mm左右,在距神经起始处(三支分叉处)上方2 mm用4-0含铬羊肠线结扎坐骨神经4道,每道间隔约1 mm,使被结扎的神经长4~5 mm。注意结扎的松紧度,以打结时可见肌肉轻微抽动为准;局部生理盐水冲洗,间断缝合肌肉筋膜、皮下组织以及皮肤。假手术组(Sham组)除不结扎坐骨神经外,其余同模型组。剔除运动障碍或机械和热刺激无反应的大鼠。

1.3 实验分组与动物处理 所有大鼠饲养在温度、湿度、灯光受调控的房间,食物和水充足。采用随机数字表法分为3组($n=40$):假手术组(Sham组)、神经病理性疼痛组(NP组)和抗氧化治疗组(MT组),每组再根据时间点细分为术前、术后3、7、14、21 d,每组8只大鼠。Sham组和NP组分别于术后7~21 d腹腔注射生理盐水1 ml; MT组于术后7~21 d时腹腔注射三苯基磷阳离子结合抗氧化剂(mito-tempo, MT) 0.7 mg/kg(溶于1 ml生理盐水)。

1.4 疼痛行为学检测

1.4.1 机械缩足阈值(mechanical paw withdrawal threshold, MWT)的测定 有机玻璃笼(20 cm×20 cm×40 cm)置于金属筛网上,大鼠在其中适应环境15 min,用von-Frey触痛仪垂直刺激大鼠术侧足底中部,每足刺激6次,间隔10 s。大鼠会突然缩足或舔足动作视为阳性反应,记录电子Von Frey读数,将6次读数平均值计为MWT,评价机械痛敏。

1.4.2 热缩足潜伏期(thermal paw withdrawal latency, TWL)的测定 在安静的环境中,将大鼠单独放置于20 cm×20 cm×40 cm大小有机玻璃笼内,笼底为厚0.2 mm玻璃,光源自动切断时间为20 s,以防止足底烫伤。待大鼠适应环境15 min后,光辐射热照射足底表面,每足照射3次,间隔5~10 min,20 s内缩足视为阳性,记录从照射到缩足的时间,3次时间的平均值即为TWL,评价热痛敏。

1.5 脊髓TRPV1表达的测定 采用Western blot法进行测定。每组行为学结束后随机处死3只大鼠,取L4-6节段脊髓组织,加入RIPA裂解液于冰上匀浆,4℃、12 000 r/min离心30 min,取上清液,采用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白经丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至PVDF膜上,用8%

脱脂牛奶室温封闭1.5 h,加入TRPV1一抗(1:500), β -actin一抗(1:1 000),4℃孵育过夜。TBST液漂洗10 min×3次,山羊抗鼠IgG二抗(1:10 000),TBST液漂洗10 min×3次,洗膜后ECL显色,随后暗室曝光。采用Image J软件进行分析。以目的蛋白条带灰度值与 β -actin条带灰度值的百分比反映目的蛋白表达水平。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,大鼠行为学及蛋白表达比较采用重复测量单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线粒体抗氧化对大鼠机械触痛的影响 与Sham组比较,NP组术后第3、7、14、21天MWT明显降低($F=46.47, P < 0.05$); MT组术后第3、7天MWT明显降低($F=30.49, P < 0.05$);与NP组比较,MT组术后第14、21天MWT明显升高($F=39.6, P < 0.05$)。见图1A。

2.2 线粒体抗氧化对大鼠热触痛的影响 与Sham组比较,NP组术后第3、7、14、21天TWL明显降低($F=68.87, P < 0.05$); MT组术后第3、7天TWL明显降低($F=27.98, P < 0.05$);与NP组比较,MT组术后第14、21天TWL明显升高($F=48.56, P < 0.05$)。见图1B。

2.3 线粒体抗氧化对TRPV1表达的影响 与Sham组比较,NP组脊髓组织L4-6节段术后第7、14、21天时TRPV1表达明显上调($P < 0.05$),且于术后第14天达峰值; MT组TRPV1表达在术后第7天时达峰值;与NP组比较,MT组TRPV1表达在术后第14、21天明显降低($P < 0.05$),术后第3、7天差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

3 讨论

NP有机械触痛、热触痛等明显特征。一旦外周神经受损,一系列病理生理改变将会产生。本研究通过制造大鼠CCI模型,行为学测试表明机械触痛及热触痛阈值明显降低,表明NP模型建立成功。

线粒体是自由基的主要来源,也是自由基攻击的目标,神经损伤后自由基过度产生可引起线粒体氧化应激、结构和功能异常,导致线粒体能量产生障碍。线粒体靶向抗氧化剂可以被线粒体有效摄取,缓解线粒体氧化应激^[5]。前期研究^[2]显示,与对照

表1 三组大鼠脊髓 TRPV1 表达水平的比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	术前 1 d	术后 3 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d
Sham	0.196 ± 0.007	0.212 ± 0.037	0.201 ± 0.017	0.211 ± 0.019	0.193 ± 0.017
NP	0.193 ± 0.016	0.287 ± 0.017	0.381 ± 0.012*	0.540 ± 0.015*	0.381 ± 0.020*
MT	0.181 ± 0.010	0.292 ± 0.007	0.409 ± 0.025*	0.253 ± 0.011#	0.310 ± 0.013#
F 值	2.571	8.601	197.200	179.400	97.800
P 值	0.248 1	0.099 0	0.000 3	0.001 2	0.001 6

与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 NP 组比较: # $P < 0.05$

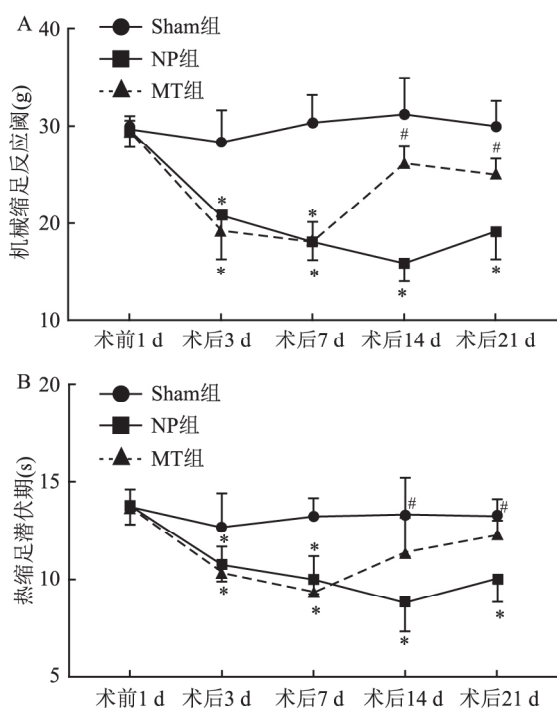


图1 3组大鼠各时间点机械触痛及热触痛

A: 3组大鼠各时间点机械触痛; B: 3组大鼠各时间点热触痛; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 NP 组比较: # $P < 0.05$

组相比,慢性坐骨神经性疼痛大鼠脊髓线粒体融合相关蛋白视神经萎缩蛋白1、线粒体融合蛋白1表达明显降低,分裂相关蛋白线粒体动力相关蛋白、分裂蛋白表达明显升高,线粒体抗氧化治疗后,线粒体分裂融合相关蛋白表达与对照组比较无明显差异。参考文献^[6],大鼠NP建立后每天腹腔注射0.7 mg/kg的MT,实验结果也证实抗氧化治疗能明显改善NP大鼠的疼痛阈值。线粒体抗氧化治疗可以逆转慢性坐骨神经痛大鼠脊髓TRPV1表达的上调。这些结果提示MT可能通过抑制脊髓TRPV1的表达来发挥镇痛作用。

TRPV1作为一种非选择性离子通道,可能被大量生理或化学刺激激发。有报道^[7]称TRPV1在神经元上表达可能导致神经病变。很多研究^[8-9]证实TRP通道涉及紫杉醇或奥沙利铂诱导的神经性疼

痛。长春新碱抗肿瘤治疗不可避免地会引起外周神经病变,研究^[7]显示长春新碱诱导的NP大鼠小背根神经节神经元上TRPV1表达会明显增加。TRPV1表达可能导致长春新碱诱导的神经性疼痛的发生发展。本实验也显示NP大鼠脊髓TRPV1表达有明显增加;抗氧化治疗后,TRPV1表达明显下降,说明TRPV1可能参与慢性坐骨神经痛的发展。

线粒体抗氧化治疗减轻NP的具体机制尚未明确。前期研究^[2]表明线粒体抗氧化治疗能降低NP大鼠氧化应激水平,改善线粒体功能。其他抗氧化剂如迷迭香酸,可通过抑制肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、诱导型一氧化氮合酶、凋亡因子来减轻慢性坐骨神经痛大鼠的疼痛阈值^[10]。也有研究^[11]报道炎症因子TNF可使TRPV1表达上调产生疼痛,予以抗TNF生物制剂可明显缓解疼痛。本研究表明NP大鼠线粒体靶向抗氧化治疗后,TRPV1表达明显下调。线粒体抗氧化治疗是否通过缓解氧化应激,减轻炎症反应来调节TRPV1的表达还需要进一步研究。

综上所述,线粒体抗氧化能明显降低慢性坐骨神经损伤大鼠的疼痛行为;NP的发生发展与TRPV1表达明显增加有关,线粒体抗氧化治疗能降低TRPV1表达,可能成为NP治疗的新靶点。

参考文献

[1] Smith T E, Chong M S. Neuropathic pain[J]. Hosp Med, 2000, 61(11): 760-6.
 [2] Zhan L, Li R, Sun Y, et al. Effect of mito-TEMPO, a mitochondria-targeted antioxidant, in rats with neuropathic pain[J]. Neuro Report, 2018, 29(15): 1275-81.
 [3] Utsumi D, Matsumoto K, Tsukahara T, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential ankyrin 1 contribute to the progression of colonic inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: Links to calcitonin gene-related peptide and substance P[J]. J Pharmacol Sci, 2018, 136(3): 121-32.
 [4] 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.

- [5] Gandhi S, Abramov A Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012 (3): 428010.
- [6] MartáNez-Revelles S, GarcáA-Redondo A B, Avendaño M S, et al. Lysyl oxidase induces vascular oxidative stress and contributes to arterial stiffness and abnormal elastin structure in hypertension: role of p38MAPK [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(7): 379–97.
- [7] Chiba T, Oka Y, Sashida H, et al. Vincristine – induced peripheral neuropathic pain and expression of transient receptor potential vanilloid 1 in rat [J]. *J Pharmacol Sci*, 2017, 133(4): 254–60.
- [8] Li Y, Adamek P, Zhang H, et al. The cancer chemotherapeutic paclitaxel increases human and rodent sensory neuron responses to TRPV1 by activation of TLR4 [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(39): 13487–500.
- [9] Yamamoto K, Chiba N, Chiba T, et al. Transient receptor potential ankyrin 1 that is induced in dorsal root ganglion neurons contributes to acute cold hypersensitivity after oxaliplatin administration [J]. *Mol Pain*, 2015, 11(1): 1–11.
- [10] Rahbardar M G, Amin B, Mehri S, et al. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects [J]. *Phytomedicine*, 2018, 40: 59–67.
- [11] Lis K, Grygorowicz T, Cudna A, et al. Inhibition of TNF reduces mechanical orofacial hyperalgesia induced by complete Freund's adjuvant by a TRPV1 – dependent mechanism in mice [J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(6): 1380–5.

Effect of mitochondria-targeted antioxidant on TRPV1 expression in neuropathic pain rats

Sun Yuhong, Li Rui, Zhang Ye

(Dept of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To evaluate the effect of mitochondria – targeted antioxidant on transient receptor potential cation channel subfamily V, member 1 (TRPV1) expression in neuropathic pain (NP) rats. **Methods** 120 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n = 40$ each) using a random number table: sham operation group (Sham group), neuropathic pain group (NP group), mitochondrial antioxidant treatment group (MT group). Neuropathic pain was induced by chronic constriction injury in NP and MT groups. Starting from 7th day after operation, mito-tempo (triphenylphosphine cation combined with antioxidant) 0.7 mg/kg in 1 ml of normal saline was injected intraperitoneally once a day for 14 consecutive days in MT group, and the equal volume of normal saline was given once a day for 14 consecutive days in Sham and NP groups. On 1 day before operation and 3, 7, 14 and 21 days after operation, the mechanical paw withdrawal threshold (MWT) and thermal paw withdrawal latency (TWL) were measured. Lumbar 4–6 segments of the spinal cord were harvested to detect the expression of TRPV1 (by Western blot) before operation and on days 3, 7, 14 and 21 after operation. **Results** Compared with group Sham, the MWT and TWL in NP group were significantly decreased on the 3rd, 7th, 14th and 21st day after operation ($P < 0.05$), the MWT and TWL in MT group were significantly decreased on the 3rd and 7th day after operation ($P < 0.05$); Compared with group NP, the MWT and TWL in MT group were significantly increased on the 14th and 21st day after operation ($P < 0.05$). Compared with group Sham, the expression of TRPV1 in NP group was significantly increased on the 7th, 14th and 21st day after operation ($P < 0.05$), the expression of TRPV1 in MT group was significantly increased on the 7th day after operation ($P < 0.05$); Compared with group NP, TRPV1 expression in MT group was significantly decreased on the 14th and 21st day after operation ($P < 0.05$). **Conclusion**

The mechanism by which mitochondrial antioxidant treatment increases behavior threshold may be related to TRPV1 expression reduction.

Key words neuropathic pain; mitochondria-targeted antioxidant; TRPV1