

BNP 信号通路在眶下神经损伤大鼠模型中的研究

张越¹, 姚育智¹, 朱大卫¹, 王烈成², 王元银¹

摘要 目的 通过构建大鼠三叉神经痛动物模型,探究眶下神经慢性压迫对大鼠三叉神经节内 BNP 受体 NPR-A 表达及 cGMP 含量的影响。方法 通过大鼠眶下神经慢性压迫损伤构建三叉神经痛动物模型,采用 Von Frey hairs 检测模型大鼠触须垫区域机械刺激疼痛阈值,应用 Western blot 技术检测 NPR-A 在模型大鼠三叉神经节内的表达,ELISA 技术检测模型大鼠三叉神经节内 cGMP 的含量。结果 与对照组大鼠比较,眶下神经慢性压迫损伤组(ION-CCI 组)大鼠在术后第 1 周~第 3 周出现术侧面部机械刺激疼痛阈值的降低,差异有统计学意义($P < 0.001$)。两组模型大鼠三叉神经节中均有 NPR-A 和 cGMP 蛋白表达,相比于对照组大鼠,ION-CCI 组大鼠三叉神经节中 NPR-A 和 cGMP 蛋白表达均显著增加($P < 0.001$)。结论 BNP 信号通路可能参与大鼠三叉神经痛的发生和发展。

关键词 三叉神经痛;三叉神经节;BNP;cGMP

中图分类号 R 745.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1174-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.004

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是慢性神经性疼痛的一种,其临床表现为在三叉神经分布区域的剧烈疼痛,任何刺激口腔颌面部的“扳机点”均可引起疼痛的剧烈发作,严重影响患者的生活质量。虽然临床上采用多种方法治疗 TN,但由于其病因以及发病机制尚不完全明确,因此尚缺乏有效的治疗方案来解除 TN 患者的剧烈疼痛。脑利钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)可以与其受体利钠肽受体 A(natriuretic peptide receptor-A, NPR-A)发生特异性结合,并增强细胞内环化酶的活性,使得环磷鸟嘌呤核苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)细胞内

表达水平增加,从而参与神经信号的调控和传导进程^[1]。该研究通过眶下神经慢性压迫损伤(infraorbital nerve chronic constriction injury, ION-CCI)建立大鼠 TN 模型,研究 ION-CCI 对大鼠三叉神经节内 BNP 受体 NPR-A 的表达以及 cGMP 含量的影响,探究 BNP 通路在 TN 模型大鼠三叉神经节(trigeminal ganglion, TG)中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级成年雄性 SD 大鼠 40~50 只(7~8 周,体质量 180~200 g),常规条件饲养,自由进食饮水,12 h/12 h 交替照明,温度 18~25 °C,湿度 40%~50%。常规饲养 1 周后,用 Von Frey hairs 开始对实验大鼠进行机械刺激适应性训练。用 Von Frey hairs 纤维丝刺激大鼠触须垫区域,两侧交替进行,每天 3~5 次,使大鼠从开始的攻击、搔抓或躲避行为反应逐渐转变为平静状态,1 周后筛选出触须垫区域机械刺激疼痛阈值 ≥ 1 g 的大鼠作为本次实验对象,并将其随机分为 4 组:假手术对照组和眶下神经慢性压迫损伤模型组(ION-CCI 组)1 周、2 周、3 周组。

1.2 主要试剂和仪器 Von Frey hairs(美国 North Coast Medical 公司);RIPA、蛋白酶抑制剂 PMSF(北京 Solarbio 公司);BSA(美国 Sigma 公司);Western blot NPR-A 和 GAPDH 抗体、ELISA 试剂盒(美国 Abcam 公司);Western blot 设备(美国 Bio-Rad 公司);ECL 试剂盒(德国 Millipore 公司);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验模型建立 选取适应性训练后的大鼠,通过 10% 水合氯醛(0.35 ml/100 g)腹腔注射全身麻醉。约 5 min 麻醉显效后,无菌手术刀在大鼠左侧触须垫区域做约 1 cm 纵行切口,显微组织器械钝性分离触须垫皮下组织,避免损伤周围血管。玻璃分针暴露大鼠左侧眶下神经,以 4-0 缝合线分别于玻璃分针近端和远端进行结扎,力度适中,以轻微压迫为宜。术区创口常规缝合,涂敷抗菌软膏预防术后创口感染。对照组大鼠与模型组大鼠手术方式

2018-04-09 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271162);安徽省科技攻关计划项目(编号:1401045013)

作者单位:安徽医科大学¹口腔医学院、²基础医学院生理学教研室,合肥 230032

作者简介:张越,男,硕士研究生;

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

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

相似,但对照组大鼠眶下神经只进行暴露但不结扎。

1.3.2 实验模型验证 两组模型大鼠,每组8只,参照 Vos et al^[2]标准,使用 Von Frey hairs 对大鼠左侧触须垫区域每周进行一次疼痛敏感阈值检测,为期3周。将大鼠置于鼠笼中,安静放置 10 min 适应周围环境后,持 Von Frey hairs 疼痛测试棒缓慢接近大鼠,刺激大鼠左侧触须垫区域,刺激过程中依次增加测试纤维丝强度,每个刺激强度刺激 10 次,2 次刺激之间应至少间隔 30 s。模型大鼠对于 Von Frey hairs 机械刺激敏感反应的阳性行为包括:① 躲闪:当 Von Frey hairs 接触大鼠同侧触须垫时出现快速的缩头行为;② 逃避或攻击行为:表现为大鼠逃跑、蜷缩、埋藏头部,或咬或抓住刺激物;③ 不对称搔抓:大鼠出现“洗脸状”,搔抓术侧刺激部位及附近区域。记录诱发大鼠疼痛阳性反应的最小刺激强度,即为机械刺激敏感阈值。

1.3.3 Western blot 检测 分别选取对照组和 ION-CCI 1 周、2 周、3 周组大鼠,每组 5 只,采用 10% 水合氯醛过量腹腔注射处死,大鼠断头迅速取术侧三叉神经节,置于含预冷 RIPA 裂解液(含 1% PMSF)的玻璃匀浆器中提取组织蛋白,BCA 测定蛋白浓度。配置 10% 分离胶和 5% 浓缩胶恒压 100 V 电泳 90 min,恒流 220 mA 转膜 90 min。将转膜完成的 PVDF 膜置于含 5% BSA 的 TBST 溶液中室温封闭 1 h。一抗 NPR-A,内参 GAPDH 4 °C 孵育过夜,二抗 HRP 标记山羊抗兔 IgG 孵育 1 h。取 ECL 蛋白显色液试剂,滴加于孵育二抗完成后的 PVDF 膜,曝光机内曝光处理。Image J 软件对目的蛋白和内参的条带灰度值进行记录分析。

1.3.4 ELISA 检测 分别选取对照组和 ION-CCI 组 1 周、2 周、3 周组大鼠,每组 8 只,采用 10% 水合氯醛过量腹腔注射处死,断头处死迅速取术侧三叉神经节。玻璃匀浆器充分研磨,离心后取上清液。分别设置 3 组:空白孔、标准品孔和样本孔,将混合后的标准品液 50 μ l 加入标准品孔中,将样本和样本稀释液依次加入各反应孔中。各反应孔中每孔加入新鲜稀释的辣根过氧化物酶标记的检测抗体,37 °C 孵育 1 h,洗板。每孔加入底物液 A 和 B 进行底物显色,37 °C 避光 15 ~ 30 min;各反应孔中加入终止液 0.05 ml,完成终止反应。酶标仪检测各反应孔 450 nm 波长的 OD 值,计算各组样本中 cGMP 浓度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, Von Frey hairs 机械刺激触须垫区

域疼痛敏感阈值采用重复测量设计的两因素方差分析,Western blot 和 ELISA 数据比较应采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ION-CCI 组大鼠出现机械刺激敏感反应 与对照组(1.525 ± 0.151 g)大鼠比较,ION-CCI 组大鼠在术后 1 周出现术侧面面部机械刺激疼痛阈值的持续下降(0.454 ± 0.109 g),CCI 术后第 2 周术侧面面部机械刺激疼痛阈值下降至最低点(0.146 ± 0.041 g),差异具有统计学意义。这种机械痛阈降低的现象至少持续到 ION-CCI 术后第 3 周(0.163 ± 0.040 g, $F = 27.697$, $P < 0.001$)。对照组大鼠的机械刺激疼痛阈值术前与术后对比差异无统计学意义($F = 0.281$, $P > 0.05$),见图 1。

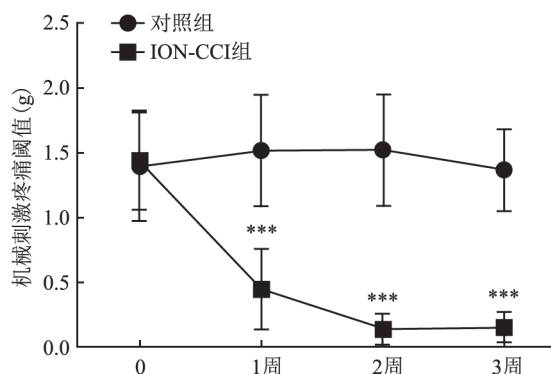


图1 ION-CCI组和对照组大鼠术侧面触须垫区域机械刺激疼痛阈值与对照组比较。*** $P < 0.001$

2.2 Western blot 检测大鼠三叉神经节神经元中 NPR-A 蛋白的表达变化 Western blot 检测显示,与对照组比较,ION-CCI 组大鼠的 NPR-A 蛋白表达量在 ION-CCI 术后的第 1 周、第 2 周、第 3 周呈现增加趋势($F = 30.588$, $P < 0.001$)。且对照组与 ION-CCI 组 2 周、ION-CCI 组 3 周的差异具有统计学意义($P < 0.001$),见图 2。

2.3 大鼠三叉神经节神经元中 cGMP 的表达变化

ELISA 法检测对照组、ION-CCI 1 周、2 周、3 周组 TG 神经元中 cGMP 的表达量,检测结果显示:与对照组比较,ION-CCI 组大鼠 TG 中 cGMP 的含量呈现出显著的升高。同时通过统计分析表明,与对照组比较,ION-CCI 组 2 周和 ION-CCI 组 3 周三叉神经节内 cGMP 的表达量呈现显著性升高,差异具有统计学意义($F = 88.59$, $P < 0.001$),见图 3。

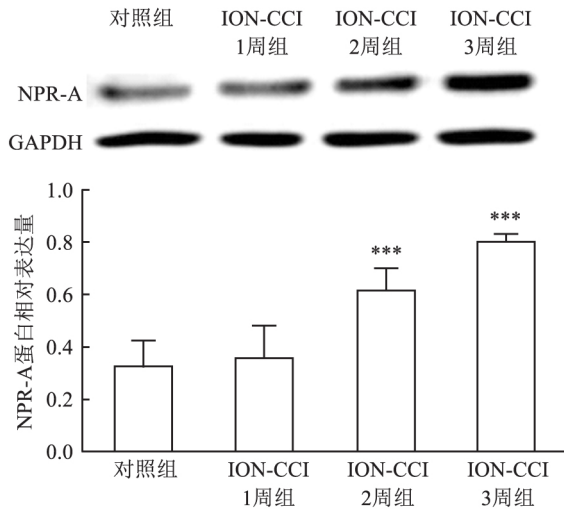


图2 ION-CCI组和对照组大鼠TG神经元中NPR-A蛋白的表达变化
与对照组比较:***P<0.001

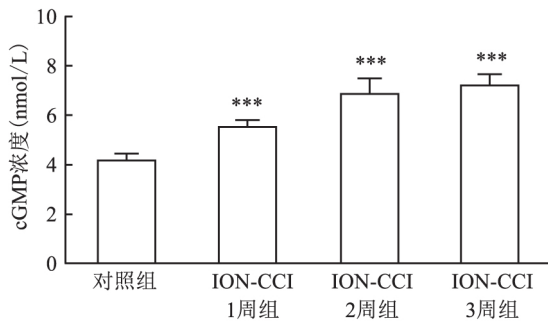


图3 ION-CCI组和对照组大鼠TG神经元中cGMP表达量变化
与对照组比较:***P<0.001

3 讨论

TN 是临床常见的一种慢性神经性疾病,其以阵发性、针刺样和电击样疼痛为重要临床特征。临床上通常将其分为原发性TN和继发性TN,原发性TN的主要病因存在有:中枢和周围病因学说两大方面。中枢病因学说认为原发性TN的发生与闸门控制和癫痫样活动有关,而周围病因学说则认为微血管压迫三叉神经会导致TN的发生。继发性TN的病因可能为颅中窝和颅后窝的颅内病变,此外病灶感染也会引起TN的发生^[3]。临床上对TN的治疗大多以药物为主,如卡马西平、奥卡西平等,但是长期服用药物机体易产生耐药性,难以根治,并且容易复发,射频温控热凝术也是TN治疗的常见方法,但其复发率依然较高,严重影响患者的生活质量。所以到目前为止临床上对TN患者的治疗仍然是一个具

有挑战性和迫切性的工作^[4]。因此深入探索TN发生发展的分子机制是攻克TN的必要前提。

血管压迫学说是目前被学者广泛认可的TN病因,本研究采用三叉神经上颌支中的眶下神经结扎模拟TN病因中的血管压迫三叉神经分支构建TN动物模型。通过Western blot和ELISA技术检测到TN动物模型TG神经元内BNP受体NPR-A以及第二信使cGMP的表达,并且眶下神经损伤后TG内NPR-A和cGMP的表达含量增加。利钠肽家族主要包括心房利钠肽(ANP)、BNP和C型利钠肽^[5]。神经肽和神经肽受体在疼痛信号的转导和调节中发挥着重要的作用,外界伤害性刺激诱导脊髓内传入性C纤维和A δ 纤维。BNP是心肌细胞合成的具有生物学活性的天然激素,其结构由二硫键和氨基酸组成,主要表达与心脏以及脑组织中。神经系统中BNP大量表达于含有降钙素基因相关肽的背根神经节和TG。BNP的受体主要是NPR-A、NPR-B和NPR-C,其中NPR-A在心脑血管系统疾病中的研究较多。BNP与其受体NPR-A发生特异性结合激活NPR-A通路,NPR-A表达上调能够抑制疼痛的发生和发展并影响神经元的放电频率^[6-7]。有研究^[8-10]证实BNP和NPR-A通路通过激活背根神经节感觉神经元表达NPR-A降低感觉神经元的兴奋性从而调节疼痛信号,参与疼痛的发生发展过程。cGMP是一类环化核苷酸,是具有调节细胞内信号传导作用的第二信使,多表达于脊髓背角浅层^[11],细胞内cGMP的浓度由其合成和分解的比率决定。cGMP的生理学功能包括参与细胞膜离子通道的开放,调节信号传导、相关配对基因的表达和神经元的增殖分化等^[12]。同时cGMP在PKG通道的活化中以及环核苷酸门控通道的开放中发挥着至关重要的调节作用。神经系统中的研究^[13]表明,激活NPR-A通道会引起cGMP/PKG信号升高,阻断BNP信号通路,可以有效缓解神经痛动物模型的疼痛敏感反应,这些研究^[14]结果表明BNP/NPR-A信号通路对于神经性疼痛的调节作用同时需要cGMP信号通路的参与。研究^[15]表明神经损伤会引起神经元内NPR-A介导的cGMP的浓度升高,对于神经性疼痛的产生可能有一定的调节作用。

本研究通过眶下神经结扎构建TN大鼠动物模型,探究ION-CCI对大鼠TG内BNP受体表达及cGMP含量的影响。研究显示,眶下神经损伤后TG神经元内NPR-A和cGMP的表达相对增加,这可能对TN的发生发展有着至关重要的调节作用,接下

来将通过特异性药物实验进一步探究 BNP 通路对 TN 的影响,并深入探索其作用机制,以期能够为 TN 的治疗寻找到新靶点。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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, 14:2708–23.
- [3] Parise M, Acioly M A, Ribeiro C T, et al. The role of the cerebellopontine angle cistern area and trigeminal nerve length in the pathogenesis of trigeminal neuralgia: a prospective case-control study [J]. *Acta Neurochir (Wien)* 2013, 155(5):863–8.
- [4] Henry M A, Fairchild D D, Patil M J, et al. Effect of a novel, orally active Matrix Metalloproteinase-2 and -9 inhibitor in spinal and trigeminal rat models of neuropathic pain [J]. *J Oral Facial Pain Headache* 2015, 29(3):286–96.
- [5] De Bold A J, De Bold M L. Techniques for the evaluation of the genetic expression, intracellular storage, and secretion of polypeptide hormones with special reference to the natriuretic peptides (NPs) [J]. *Methods Mol Biol* 2017, 1527:163–76.
- [6] 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:e81138.
- [7] Marchenkova A, Vilotti S, Fabbretti E, et al. Brain natriuretic peptide constitutively downregulates P2X3 receptors by controlling their phosphorylation state and membrane localization [J]. *Mol Pain* 2016, 11:102–10.
- [8] Liu X Y, Wan L, Huo F Q, et al. B-type natriuretic peptide is neither itch-specific nor functions upstream of the GRP-GRPR signaling pathway [J]. *Mol Pain* 2014, 10:4.
- [9] Li Z W, Wu B, Ye P, et al. Brain natriuretic peptide suppresses pain induced by BmK I, a sodium channel-specific modulator, in rats [J]. *J Headache Pain* 2016, 17:90.
- [10] Solorzano C, Villafuerte D, Meda K, et al. Primary afferent and spinal cord expression of gastrin-releasing peptide: message, protein, and antibody concerns [J]. *J Neurosci* 2015, 35:648–57.
- [11] Zheng Y, Yin X, Huo F, et al. Analgesic effects and possible mechanisms of iridoid glycosides from *Lamiophlomis rotata* (*Benth.*) *Kudo* in rats with spared nerve injury [J]. *J Ethnopharmacol* 2015, 173:204–11.
- [12] Dong C J, Guo Y, Ye Y, et al. Presynaptic inhibition by $\alpha 2$ receptor/adenylate cyclase/PDE4 complex at retinal rod bipolar synapse [J]. *J Neurosci* 2014, 34(28):9432–40.
- [13] Zhang J, Zhao Z, Zu C, et al. Atrial natriuretic peptide modulates the proliferation of human gastric cancer cells via KCNQ1 expression [J]. *Oncol Lett* 2013, 6(2):407–14.
- [14] Li K, Cai B, Li C, et al. Presynaptic inhibition of nociceptive neurotransmission by somatosensory neuron-secreted suppressors [J]. *Sci China Life Sci* 2017, 60(9):1013–8.
- [15] Manivasagam S, Vellaichamy E. Suppression of Npr 1, not Npr 2 gene function induces hypertrophic growth in H9c2 cells *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2017, 491(2):250–6.

BNP signaling pathway in a rat model of infraorbital nerve injury

Zhang Yue, Yao Yuzhi, Zhu Dawei, et al

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

Abstract Objective To establish the trigeminal neuropathic (TN) pain model rats by infraorbital nerve chronic constriction injury (ION-CCI) and investigate the effects of the infraorbital nerve (ION) after chronic constriction injury (CCI) on the expression of BNP receptor NPR-A and cGMP content in trigeminal ganglion (TG) of model rats. **Methods** TN model rats were produced by ION-CCI. Von Frey hairs were used for the mechanical stimulation test on the ipsilateral whisker pad of rats. Western blot was used to detect the expression of NPR-A in TG. The content of cGMP in TG was detected by ELISA. **Results** From the 1st week to 3rd week after ION-CCI, the rats showed significantly increased responses to mechanical stimulation in the territory of the ligated nerve, which had a statistically significant difference ($P < 0.001$) compared with that in the control group. Both NPR-A and cGMP were expressed in TG of the two groups. The expression level of NPR-A and cGMP in the TG of ION-CCI group were significantly enhanced compared with the control group ($P < 0.001$). **Conclusion** BNP signal pathway may participate in the development of TN.

Key words trigeminal neuralgia; trigeminal ganglion; BNP; cGMP