论著

文章编号:1000-5404(2010)05-0418-04

慢性坐骨神经缩窄性损伤后大鼠脊髓背角神经节上 BKca-α 的表达变化

林 露[1,2],陶国才[1],易 斌[1],崔 剑[1],欧 珊[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院麻醉科[1];610083 成都,成都军区总医院麻醉科[2])

[摘要] **目的** 通过建立慢性坐骨神经缩窄性损伤模型(chronic constriction injury of the sciatic nerve model,CCI),观察神经病理性疼痛状态下大鼠脊髓背角神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元大电导的钙激活钾通道 α 亚基(large calcium-activated potassium channel alpha subunits, BKca-α)的表达。**方法** 雄性 SD 大鼠 70 只,体质量 180 ~ 230 g,分为空白对照组、假手术和手术组(CCI 组)。CCI 组于右后肢结扎坐骨神经制作 CCI 模型,假手术组仅做钝性分离,空白对照组不做任何处理。于术前及术后 1、3、7、10、14、17、21 d 测定各组机械缩爪阈值和热缩足潜伏期(radiant heat stimulation, PWHL)。于术后 7、14、21 d 采用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组大鼠脊髓 L_4 ~ L_6 段 DRG 上 BKca-α mRNA 和蛋白表达水平变化。**结果** ①与空白对照组和假手术组比较,CCI 组术后 3 ~ 21 d 热痛阈和机械痛阈明显降低($P < 0.01$);空白对照组和假手术组间热痛阈和机械痛阈差异没有统计学意义($P > 0.05$)。②与空白对照组和假手术组比较,术后 7、14、21 d CCI 组 DRG 上 BKca-α mRNA 和蛋白表达明显下调($P < 0.05$),空白对照组和假手术组间 BKca-α 表达水平无明显统计学差异($P > 0.05$)。**结论** 在坐骨神经慢性缩窄性损伤后,大鼠 DRG 神经元上 BKca-α 表达明显下降,可能削弱了 BKca 对神经元兴奋的负反馈,在大鼠神经病理性疼痛中发挥作用。

[关键词] 疼痛, 顽固性;神经痛;痛阈; 大电导钙激活钾通道 α 亚基;神经节, 脊; 大鼠
[中图法分类号] R322.81; R329.25; R745.420.2 [文献标志码] A

Decreased expression of large calcium-activated potassium channel α subunit in dorsal root ganglion neurons in rats of chronic constriction injury of the sciatic nerve

Lin Lu[1,2], Tao Guocai[1], Yi Bin[1], Cui Jian[1], Ou Shan[2] ([1]Department of Anesthesia, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Anesthesia, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To examine the changes in the plasticity of the large calcium-activated potassium channel α subunit (BKca-α) mRNA and protein in dorsal root ganglion (DRG) neurons and the role it plays in the chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI). **Methods** Seventy male SD rats weighing 180 to 230 g were randomly divided into 3 groups, control group, sham operation group and CCI group. The sciatic nerve of the right hind leg was exposed without any injury in sham group, but operated according to the methods of Bennett and Xie with slightly improvement in CCI group. Fifty percent paw withdraw thresholds (50% PWML) and radiant heat stimulation (PWTL) were measured before the surgery and in 1, 3, 7, 10, 14, 17 and 21 d later after sciatic nerve ligation. The DRG of the L_4 to L_6 segments of spinal cord were executed respectively in 7, 14 and 21 d after surgery and the expressed variation of the BKca-α mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blotting. **Results** PWTL and PWML were significantly decreased during the 7th to 21st day after CCI as compared to the baseline and sham group. There was no significant difference in BKca-α mRNA and protein expression between the control and sham groups. But the expression was markedly decreased in the surgery groups. **Conclusion** The down-regulation of the mRNA and protein expression of the BKca-α subunit in the DRG neurons may play an important role in neuropathic pain and spinal cord sensitiveness.

[**Key words**] pain, intractable; neuralgia; pain threshold; large-conductance calcium-activated potassium channel alpha subunits; ganglia, spinal; rats

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5063). Corresponding author: Tao Guocai, Tel: 86-23-68754197, E-mail: tgctsc@mail.tmmu.com.cn

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5063)
[通信作者] 陶国才,电话:(023)68754197,E-mail:tgctsc@mail.tmmu.com.cn

外周神经损伤后导致的顽固、剧烈的神经病理性疼痛(neuro pathic pain, NPP)是目前临床与科研的研究热点。脊髓背角神经节(dorsal root ganglion,DRG)作为痛觉传导的初级中枢,几乎表达所有亚型的离子通道和神经递质受体。目前有研究[1,2]表明,外周神经损伤后的神经病理性疼痛可导致DRG上的Na^+、Ca^{2+}等兴奋性离子通道表达上调和重分布。大电导的钙激活钾通道(large calcium-activated potassium channel, BKca)广泛分布于DRG各种直径的感觉神经元表面,在增强细胞复极化,抑制神经元过度放电,减轻细胞内钙超载等方面具有重要作用[3]。但是外周神经损伤后DRG神经元上的BKca的表达分布是否发生可塑性变化尚不清楚。本研究拟建立慢性坐骨神经缩窄性损伤模型(chronic constriction injury of the sciatic nerve model, CCI),观察NPP时大鼠DRG上BKca-α亚基mRNA转录及蛋白表达水平改变,探讨其在神经病理性疼痛发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

成年健康SD大鼠70只,8周龄,雄性,体质量180~220 g(本校实验动物中心提供)。分为3组:CCI组($n=30$)、假手术组($n=30$)和空白对照组($n=10$)。CCI组和假手术组的30只动物又分为7、14、21 d 3组,每组各10只。所有实验大鼠安静饲养,室温21~24 ℃,湿度55%左右,自由饮水摄食,适应环境1周后进行实验。

1.2 模型制作

改良CCI模型参考文献[4]方法,并依据王金保等[5]的方法稍作改良:在坐骨神经三叉分支的近端约5 mm处,用0.4 cm×1 cm的多孔胶片包裹结扎部位的神经,4-0医用铬制羊肠线做4道结扎,间距1~2 mm,以不影响神经外膜的血运为准。假手术组仅作切皮分离,不做神经结扎。空白对照组不做任何处理。

1.3 仪器和试剂

总RNA抽提试剂Trizol(Tiangen公司,中国)、定量聚合酶链反应试剂盒(TaKaRa公司,日本),逆转录试剂盒(Toyoto公司,日本),兔抗鼠BKca-α单抗(Millipore公司,美国,AB5228),HRP标记羊抗兔二抗(Millipore公司,美国,AP342P),BME-410A热刺激仪(中国医学工程研究所),Electronic Von Frey刺激仪(IITC Inc,美国)。

1.4 检测指标

1.4.1 痛阈测定 于术前及术后1、3、7、10、14、17、21 d测定各组的机械缩足阈值(50% paw withdraw thresholds,PWML)和热缩足阈值(radiant heat stimulation,PWHL)。PWML参照Dixon[6]的方法用Electronic Von Frey刺激仪测量。PWHL按Hargreaves等[7]方法用BME-410A热刺激仪测量。同一部位刺激的间隔时间为5 min,反复测量3次取平均值记录。

1.4.2 DRG上的BKca-α表达检测 于术后7、14、21 d取CCI组和假手术组大鼠各10只,腹腔注射4%水合氯醛(400 mg/kg)麻醉后,冰面上摘取L_4~L_6节段DRG,均分为2份,分别用于BKca-α mRNA和蛋白检测。

1.4.2.1 BKca-α mRNA表达检测 将摘取的大鼠术侧L_4~L_6节段DRG,按Trizol说明书提取总RNA,测定$D(260)/D(280)$比值大于1.6者为可用。取各样品RNA 2 μg进行实验。引物序列:BKca-α亚基上游5′-GGCCCATCTGCTCAACATCC-3′,下游5′-TCGGCTTCGGCTCTCCCTGT-3′,扩增产物长度324 bp。GAPDH上游5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′,下游5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′,扩增产物长度500 bp。引物序列由上海生工生物工程公司合成。在20 μl的多重PCR体系中按42 ℃孵育10 min,30 ℃×20 min,99 ℃×5 min,5 ℃×5 min的顺序完成逆转录过程,产物cDNA各取2 μl,扩增28个PCR循环后,取5 μl产物于1%琼脂糖凝胶电泳,紫外光凝胶成像并测定光密度值(OD),与GAPDH比值表示为最终结果。

1.4.2.2 BKca-α蛋白表达检测 参考Chen等[8]方法将术侧L_4~L_6节段DRG在4 ℃预冷的组织裂解液中研磨破碎,置冰浴中5 min,4 ℃,14 000 r/min×15 min离心取上清,用BCA法测定调整蛋白浓度。各样本取80 μg蛋白点样,电泳后18 V,45 min恒压半干转膜,5%脱脂奶粉封闭,4 ℃,一抗(1∶400)孵育24 h,0.01 mol/L PBS漂洗后室温下二抗(1∶1 000)孵育1.5 h,漂洗后ECL法显色,紫外光凝胶成像,记录光密度比值的均数及标准差。

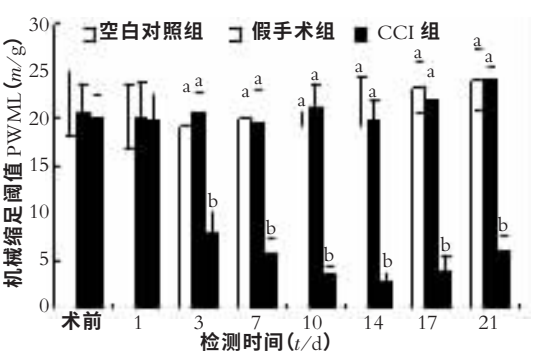
1.5 统计学处理

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件分析,各组间采用两样本t检验,组内采用单因素方差分析。

2 结果

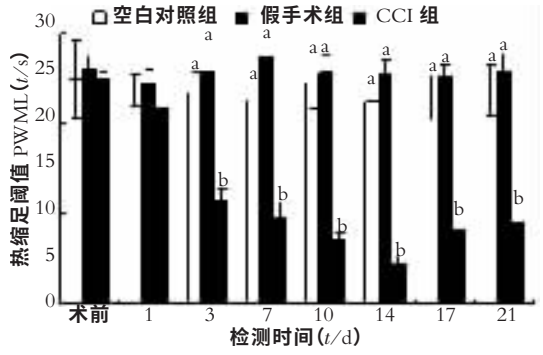
2.1 机械/热痛阈值(PWML/PWHL)

与空白对照组和假手术组相比,术后3~21 d CCI组PWML/PWHL急剧下降,其差异有明显统计学意义($P<0.01$)。CCI组机械/热痛阈值均于术后3 d明显下调,以7~14 d为疼痛高峰期,术后14 d达到阈值最低点,后逐渐恢复,术后21 d的PWML、PWHL与术后7 d水平相近,但与术前相比仍有明显下降($P<0.01$),CCI组内7、14、21 d机械/热痛阈值差异有统计学意义($P<0.05$),其PWML和PWHL下降幅度14 d>7 d>21 d。空白对照组和假手术组组间、组内PWML和PWHL并无明显统计学差异($P>0.05$)。见图1、2。



a:$P<0.01$,与同时相点CCI组比较;b:$P<0.01$,与CCI组术前比较

图1 各组大鼠手术前及术后各时相点机械缩足阈值(PWML)的变化



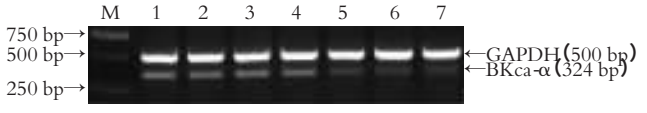
a:$P<0.01$,与同时相点CCI组比较; b:$P<0.01$,与CCI组术前比较

图2 各组大鼠手术前及术后各时相点热缩足阈值(PWHL)变化

2.2 BKca-α 蛋白和 mRNA 表达变化

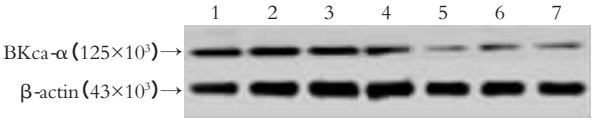
BKca-α mRNA 表达:术后7、14 d 和21 d,CCI 组大鼠 BKca-α mRNA 表达明显低于同时间点的假手术组($P<0.05$)。术后7 d,CCI 组大鼠和同时间点假手术组相比,其 mRNA 表达下调了45.81%。术后14 d时 CCI 组 BKca-α mRNA 表达降至最低,与空白对照组和假手术组相比分别下降了50.72%和52.19%。见图3,表1。

BKca-α 蛋白表达:CCI 组大鼠 DRG 上的 BKca-α 蛋白表达在术后7、14、21 d,较空白对照组和假手术组分别下调76.91%、75.69%、70.91%和75.14%、74.92%、67.32%,差异显著($P<0.01$)。CCI 组内 BKca-α 蛋白表达差异无明显统计学意义($P>0.05$)。假手术组和空白对照组相比,BKca-α 蛋白表达和 mRNA 转录水平无统计学差异($P>0.05$)。见图4,表1。



M:DNA 标准;1:空白对照组;2:假手术组7 d;3:假手术组14 d;4:假手术组21 d;5:CCI 组7 d;6:CCI 组14 d;7:CCI 组21 d

图3 各组大鼠 DRG 中 BKca-α mRNA 表达的变化



1:空白对照组;2:假手术组7 d;3:假手术组14 d;4:假手术组21 d;5:CCI 组7 d;6:CCI 组14 d;7:CCI 组21 d

图4 各组大鼠 DRG 中 BKca-α 蛋白表达的变化

表1 各组大鼠手术前及术后 DRG 中 BKca-α 蛋白和 mRNA 表达的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	BKca-α mRNA 表达	BKca-α 蛋白表达
CCI 组		
7 d	0.326 1±0.042 9^{ab}	0.382 7±0.032^{ab}
14 d	0.216 6±0.022 9^{ab}	0.402 9±0.074^{ab}
21 d	0.297 8±0.021 9^{ab}	0.482 0±0.102^{ab}
假手术组		
7 d	0.601 7±0.122 6	1.539 3±0.223
14 d	0.572 1±0.124 0	1.606 3±0.241
21 d	0.599 4±0.095 3	1.475 0±0.198
空白对照组	0.581 6±0.070 3	1.657 2±0.296

a:$P<0.05$,与同时相点假手术组比较;b: $P<0.01$,与空白对照组比较

3 讨论

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NPP)是指以广泛的神经元去极化和细胞内钙超载为基础,以痛觉过敏、痛觉超敏和异常疼痛为特征的顽固性疼痛[9]。DRG 作为痛觉产生和传导的初级中枢,表达包括钙激活钾通道(calcium-activated potassium channel, Kca)在内的多种离子通道。BKca-α 是钙激活钾通道的主要亚型,产生的后超极化钾电流构成了动作电位复极化的重要组分,在抑制神经元放电频率,调节神经元兴奋性,减轻细胞内钙超载等方面发挥负反馈作用[3]。前期研究[10]认为 BKca-α 受多种炎症介质、第二信使和神经因子调节,参与了 NPP 产生和发展涉及的多条信号通路,可调节神经细胞激素、递质、神经因子等的合成分泌。但在外周神经损伤后,剧烈而持久的 NPP 是否导致初级痛觉中枢 DRG 上的 BKca 通道发生核酸或蛋白水平的表达变化尚不清楚。

本研究采用的 CCI 模型是研究 NPP 的经典模型,兼具神经病理性疼痛和炎症性疼痛的病理特点。坐骨神经结扎后,所有 CCI 组大鼠均在术后3~21 d 表现出明显的机械/热痛阈下降,在术后7~14 d 为痛敏高峰期,14 d 以后逐渐恢复。因此选择术后第7、14、21天检测 BKca-α 表达改变,贯穿了 CCI 模型 NPP 的发生、高峰和恢复期,检测时间点选择正确,建模可靠。

检测 DRG 上的 BKca-α mRNA 转录和蛋白表达水平,发现 CCI 组大鼠损伤侧 BKca 表达明显降低($P<0.05$),而空白对照组和假手术组则没有此表达改变。CCI 组大鼠 BKca-α mRNA 转录在术后7 d 即明显下降,14 d 达最低水平,术后21 d 略有恢复,其变化趋势和 CCI 组大鼠机械/热痛阈变化一致,术后各检测时间点间 mRNA 转录水平有统计学差异($P<0.05$),提示 BKca-α 的 mRNA 下调可能和 NPP 程度相关。CCI 组的 BKca-α 蛋白表达虽没有各检测时间点间的统计学差异,但同假手术组和空白对照组比较,其表达下降具有明显统计学意义($P<0.01$),说明结扎坐骨神经导致的病理性疼痛,可以明显下调 BKca-α 表达水平,且 mRNA 的改变比蛋白明显。此实验结果和 Boettger 等[11]观察到人的臂丛损伤 DRG 神经元上,钙激活通道家族的另外2个亚型 SK1、IK-1 的免疫阳性产物表达降低结论一致,证明外周神经损伤可以导致初级痛觉中枢神经元上 BKca-α 的可塑性改变。

BKca 广泛分布于多种可兴奋组织上,是维持多条正常生理信号通路的重要中间环节,在心脑血管增殖,缺血再灌注损伤、细胞免疫及组织发育分化等方面有较大的研究价值。异常表达的 BKca-α 可以启动或加重多种神经系统病变,导致癫痫、阿尔兹海默病、帕金

森病等中枢神经退行性疾病和恶性胶质瘤的发生[12,13]。在NPP状态下,DRG神经元大量合成分泌的多种单胺类物质(5-HT、NA、多巴胺、血管紧张素)及Glu、SP、NO等致痛物质,可以直接或通过G蛋白耦联受体,磷酸化或氧化BKca-α蛋白上的氨基酸位点,抑制BKca放电频率和幅度[14]。鞘内注射BKca的特异性开放剂可以明显逆转疼痛模型大鼠的热/机械疼痛,反之注射BKca阻断剂Ibx则可以增强假手术组大鼠的异常疼痛[8],证明BKca是参与NPP形成和调节的重要伤害性感受器。最新药理实验[15,16]也证实目前临床常用的多种镇痛药物如氯胺酮,羟丁酸钠,瑞芬太尼以及新型镇痛药物白藜芦醇和YC-1等是通过激活BKca而不是通过激活ATP敏感的钾通道(K_{ATP})发挥镇痛作用,提示BKca可能是镇痛药物研究和疼痛治疗的新靶点。本研究发现大鼠DRG上的BKca-α蛋白和mRNA在坐骨神经慢性损伤后有明显的表达下降,提示其可能参与了BKca在NPP状态下的功能抑制,是BKca磷酸化/氧化调节外的另一种调节方式。其表达下调的原因可能包括:① CCI大鼠神经结扎后脱髓鞘,导致EGF、NT-3和NGF等对BKca有激活作用的神经因子合成运输障碍[17,18]。② NPP时ROS、乳酸、H^+等局部蓄积,可氧化或磷酸化BKca-α蛋白肽链,改变亚基的空间构象或使其侧链僵硬断裂[19]。③ BKca主要表达在大、中直径神经元上。CCI模型DRG上大、中直径神经元比小直径神经元凋亡率高,可能导致BKca总体表达减少[8]。④ Bell等[20]发现BKca-α的核酸转录水平可以影响其在神经元细胞膜上的蛋白表达。本实验同样发现NPP时BKca-α mRNA下调比蛋白改变敏感,可能是其蛋白表达下降的原因之一。

综上所述,在坐骨神经慢性损伤后,大鼠脊髓DRG神经元上BKca-α表达有明显下调,可能参与削弱了NPP时BKca对神经元兴奋性损伤的负反馈调节。研究BKca-α在NPP时的可塑性改变,为深入研究NPP发病机制,寻找治疗临床疼痛的新靶点提供了参考和选择。

参考文献:

[1] Schofield G G, Puhl H L 3rd, Ikeda S R. Properties of wild-type and fluorescent protein-tagged mouse tetrodotoxin-resistant sodium channel (Na V 1.8) heterologously expressed in rat sympathetic neurons[J]. J Neurophysiol, 2008, 99(4): 1917 - 1927.

[2] Takahashi E, Niimi K. Modulators of voltage-dependent calcium channels for the treatment of nervous system diseases[J]. Recent Pat CNS Drug Discov, 2009, 4(2): 96 - 111.

[3] Fuchs A, Lirk P, Stucky C, *et al*. Painful nerve injury decreases resting cytosolic calcium concentrations in sensory neurons of rats[J]. Anesthesiology, 2005, 102(6): 1217 - 1225.

[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] 王金保, 聂发传. 改良坐骨神经慢性压迫性损伤模型的建立[J]. 华北国防医药, 2007, 19(3): 1 - 3.

[6] Dixon W J. Efficient analysis of experimental observations[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20: 441 - 462.

[7] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al*. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. Pain, 1988, 32(1): 77 - 88.

[8] Chen S R, Cai Y Q, Pan H L. Plasticity and emerging role of BKCa channels in nociceptive control in neuropathic pain[J]. J Neurochem, 2009, 110(1): 352 - 362.

[9] Campbell J N, Meyer R A. Mechanisms of neuropathic pain[J]. Neuron, 2006, 52(1): 77 - 92.

[10] Hou S, Heinemann S H, Hoshi T. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules[J]. Physiology (Bethesda), 2009, 24: 26 - 35.

[11] Boettger M K, Till S, Chen M X, *et al*. Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors[J]. Brain, 2002, 125(Pt 2): 252 - 263.

[12] Pacheco-Otalora L F, Hernandez E F, Arshadmansab M F, *et al*. Down-regulation of BK channel expression in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J]. Brain Res, 2008, 1200: 116 - 131.

[13] Qi J S, Ye L, Qiao J T. Amyloid beta-protein fragment 31-35 suppresses delayed rectifying potassium channels in membrane patches excised from hippocampal neurons in rats[J]. Synapse, 2004, 51(3): 165 - 172.

[14] Lu T, He T, Katusic Z S, *et al*. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels by high glucose[J]. Circ Res, 2006, 99(6): 607 - 616.

[15] 林鹏焘, 廖大清, 罗南富, 等. 瑞芬太尼对人肠系膜小动脉平滑肌细胞钙激活钾电流的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2006, 26(6): 509 - 511.

[16] Bermudez-Ocana DY, Ambriz-Tututi M, Perez-Severiano F, *et al*. Pharmacological evidence for the participation of NO-cyclic GMP-PKG-K^+ channel pathway in the antiallodynic action of resveratrol [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2006, 84(3): 535 - 542.

[17] Ivanov A, Gerzanich V, Ivanova S, *et al*. Adenylate cyclase 5 and KCa1.1 channel are required for EGFR up-regulation of PCNA in native contractile rat basilar artery smooth muscle[J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 1): 73 - 84.

[18] Kuhlmann C R, Wu Y, Li F, *et al*. bFGF activates endothelial Ca^{2+}-activated K^+ channels involving G-proteins and tyrosine kinases [J]. Vascul Pharmacol, 2004, 41(6): 181 - 186.

[19] Dong D L, Yue P, Yang B F, *et al*. Hydrogen peroxide stimulates the Ca(2+)-activated big-conductance K channels (BK) through cGMP signaling pathway in cultured human endothelial cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22(1/4): 119 - 126.

[20] Bell T J, Miyashiro K Y, Sul J Y, *et al*. Cytoplasmic BK(Ca) channel intron-containing mRNAs contribute to the intrinsic excitability of hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(6): 1901 - 1906.

(**收稿**:2009-10-23;**修回**:2009-11-24)

(编辑 王小寒)