

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01013

• 研究快报 •

香草酸瞬时受体亚型 1 基因敲除雌性小鼠痛阈的变化

巩琦[△], 卢占英[△], 余立华, 马蓓*

第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 TRPV1 基因敲除后外周痛觉的改变。**方法** 采用甩尾热痛仪和弗莱毛测痛法测量 TRPV1 基因敲除型及野生型雌性小鼠的热和机械痛阈, 并进行比较。**结果** 热刺激后, TRPV1 基因敲除型雌性小鼠较野生型雌性小鼠的甩尾潜伏期延长 $[(3.59 \pm 0.65) \text{ s vs } (2.19 \pm 0.24) \text{ s}, P < 0.05]$, 两组间机械痛阈值差异无统计学意义 $[(1.71 \pm 0.57) \text{ g vs } (2.13 \pm 0.81) \text{ g}, P > 0.05]$ 。**结论** 在生理条件下, TRPV1 受体介导热刺激痛, 与机械刺激痛无明显相关。

[关键词] TRPV 阳离子通道; 基因敲除小鼠; 痛阈

[中图分类号] R 339.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)09-1013-03

Changes of peripheral pain threshold in transient receptor potential vanilloid 1 knockout female mice

GONG Qi[△], LU Zhan-ying[△], YU Li-hua, MA Bei*

Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the changes of peripheral pain threshold after knockout of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) gene. **Methods** Tail-Flick Analgesia Meter and von-Frey hair were used to determine the peripheral thermal and mechanical thresholds in TRPV1 knockout and wild-type female mice, and the results of the two groups were compared. **Results** The Tail-Flick latency in TRPV1 knockout mice was significantly prolonged after hot stimulation compared with that in the wild-type group $[(3.59 \pm 0.65) \text{ s vs } [2.19 \pm 0.24] \text{ s}, P < 0.05]$. There was no significant change in responses to von-Frey hair stimuli between the two groups $[(1.71 \pm 0.57) \text{ g vs } [2.13 \pm 0.81] \text{ g}, P > 0.05]$. **Conclusion** It is suggested that TRPV1 receptor mediate thermal stimuli response under physiological condition, and has no noticeable influence on mechanical stimuli response.

[Key words] TRPV cation channels; knockout mice; pain threshold

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9):1013-1015]

如何合理有效地治疗疼痛在当前仍属难题。随着对痛觉传递调控机制研究的不断深入, 许多特异性靶点被相继发现。香草酸瞬时受体亚型 1 (transient receptor potential vanilloid 1, 或 vanilloid receptor 1, TRPV1) 是近来研究较多的一种离子通道型受体^[1], 该受体在包括炎性痛、内脏痛、癌痛和神经病理性痛等多种痛觉形成中均起重要作用^[2], 因而成为目前研究疼痛机制和开发镇痛药物的热点之一。

已有的研究发现, TRPV1 是一种非选择性阳离子通道, 激活后引发 Ca^{2+} 内流^[3]。TRPV1 受体可被热刺激 ($>43^\circ\text{C}$)、氢离子 (胞外 $\text{pH} < 6.0$) 及香草类化学物质如辣椒素 (capsaicin) 激活, 并对许多诱发

疼痛和(或)瘙痒的天然和合成的化合物敏感^[4]。因而, TRPV1 受体是一个伤害性刺激的整合者^[5]。

为研究 TRPV1 对痛阈的可能作用及其对不同来源刺激所致痛觉的影响, 本研究观察了 TRPV1 基因敲除雌性小鼠机械性痛阈和热痛阈的改变, 进一步探讨 TRPV1 受体对小鼠痛觉的调节作用和机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 热板测痛仪及甩尾热痛仪购自美国 ITC Life Science 公司, 弗莱毛 (von-Frey hair) 来自中国医学科学院生物医学工程研究所。

1.2 动物分组 雌性小鼠由英国 Sheffield University 的 David Grandy 教授赠送, 分别为 TRPV1 基

[收稿日期] 2011-05-27 **[接受日期]** 2011-07-01

[作者简介] 巩琦, 助教. E-mail: zgongqi@yahoo.com.cn; 卢占英, 硕士生. E-mail: luzhanying2008@126.com

[△]共同第一作者 (Co-first authors).

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81870980, E-mail: mabei2004@yahoo.com.cn

因敲除型和野生型,各 10 只。

1.3 小鼠外周痛阈的测定

1.3.1 热板测痛仪测痛 小鼠在室内适应 30 min 后放置于恒温热板上,热板四周围有上方开放的透明有机玻璃,热板温度设定保持在 55.0℃。以小鼠舔后足为反应阳性,记录反应潜伏期(latency)。每只至少间隔 5 min,共测 6 次。

1.3.2 甩尾热痛仪测痛 小鼠在室内适应 30 min 后放于固定盒内,以热光源刺激鼠尾,刺激部位在距尾尖约 1.5 cm 处。以小鼠甩尾(tail flick)为反应阳性,记录自鼠尾受热至小鼠甩尾时间段为潜伏期。每只测 6 次。

1.3.3 弗莱毛测痛 将测试小鼠置于特制笼中,熟悉环境 30 min 后以弗莱毛刺激小鼠左后足底,以小鼠抬起左后足为反应阳性。弗莱毛的力量分别 0.18、0.51、1.08、3.85、5.50、7.05 g。从细到粗,逐个进行左后足底刺激,每个力量的弗莱毛刺激每只小鼠各 10 次,出现缩足反应记为阳性。以 50%缩足反应阳性作为机械刺激阈值(50%PWT)^[6]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,甩尾热痛潜伏期参数分析采用独立样本 *t* 检验,弗莱毛机械刺激采用双因子方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠热板测痛结果比较 野生型小鼠的热痛反应形式不一,不是每只都有舔后足行为,或快速奔跑始终无舔后足行为,或跳跃多次以图逃离热板,其出现热痛反应的起始时间和行为标准难以把握,无法量化分析。TRPV1 基因敲除型小鼠大多数会有舔后足行为。总体来看,敲除型小鼠出现热痛反应潜伏期较长,且在笼中行为不如野生型活跃。

2.2 各组小鼠的热刺激痛阈比较 用甩尾热痛仪测痛结果显示,TRPV1 基因敲除型雌性小鼠组甩尾潜伏期为(3.59 ± 0.65) s,野生型雌性小鼠组为(2.19 ± 0.24) s,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠的机械性刺激痛阈比较 弗莱毛测试结果显示,TRPV1 基因敲除型雌性小鼠组 50% PWT 值为(1.71 ± 0.57) g,野生型雌性小鼠组 50% PWT 值为(2.13 ± 0.81) g,两组间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

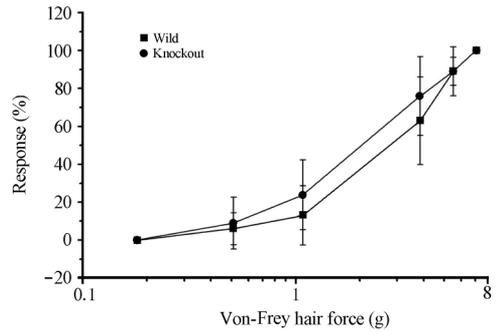


图 1 TRPV1 基因敲除型雌性小鼠和野生型雌性小鼠弗莱毛刺激反应曲线
Fig 1 Von-Frey hair force-response curves of wild-type and TRPV1 knockout female mice
 $n = 10, \bar{x} \pm s$

3 讨论

TRPV1 受体广泛表达于神经系统特别是外周感觉神经系统,如 A δ -纤维、C-纤维以及非神经细胞(角质形成细胞、肥大细胞、脂肪细胞、朗格罕细胞及平滑肌细胞)等。激活感觉神经上 TRPV1 受体可产生温感、烧灼性疼痛、辛辣感及瘙痒^[7]。TRPV1 受体作为非选择性阳离子通道,受各种刺激激活后引起 Ca²⁺ 内流,初级感觉神经元细胞膜去极化,有助于引发动作电位传导疼痛。这是伤害性感受信息形成和传递的第一步^[8]。相反,如果缺失 TRPV1 受体,就会减少疼痛信号的转导,动物在行为学上可表现为从接受刺激到出现疼痛反应的潜伏期延长(与野生型相比)。

关于热刺激激活 TRPV1 受体的具体机制目前尚未完全阐明。曾经普遍认为,热刺激可直接作用于 TRPV1 受体,导致受体激活。而 Patwardhan 等^[9]发现,伤害性热刺激可使体内亚油酸(细胞膜的一种主要成分)产生代谢产物:9-羟基十八碳酸(9-HODE)和 13-羟基十八碳酸(13-HODE),此类物质可直接激活 TRPV1 受体,推测热刺激可能是通过(或部分通过)9-HODE 及 13-HODE 作为“热信号”来激活 TRPV1 受体的。

已有的研究表明,TRPV1 基因敲除型动物对伤害性或非伤害性机械刺激在行为学上表现与野生型的应答无明显差异;但对能引起疼痛的热刺激反应明显迟钝^[10]。本实验结果与上述研究结果一致,TRPV1 基因敲除型和野生型小鼠的机械痛阈差异无统计学意义,而 TRPV1 基因敲除的雌性小鼠较野生型雌性小鼠甩尾热潜伏期延长($P < 0.05$),显示

TRPV1 基因敲除型雌性小鼠对的热刺激痛的敏感性减弱。

也有研究表明,缺失 TRPV1 受体的小鼠对外周热刺激的反应应答较野生型明显降低,外周机械痛阈差异无统计学意义;但在局部致炎(后足底注射芥子油)后,两型的后足底机械痛阈可观察到明显差异^[11]。在神经源性疼痛的模型大鼠,发现 TRPV1 拮抗剂可减弱其机械痛觉过敏^[12]。另外,反复多次对大鼠结肠给予扩张膨胀引起的机械性结肠痛觉过敏,可被 TRPV1 受体拮抗剂抑制^[13]。这些结果提示,在炎症等病理条件下,TRPV1 受体还是可以介导机械刺激引起的痛觉。TRPV1 受体对机械刺激的介导可能需要通过炎性介质等物质的参与,或者说,在炎症等病理情况下,TRPV1 受体介导机械刺激的信号被放大了,故可观察到明显差异。

综上所述,结合本实验可见,TRPV1 受体可介导热刺激引起的痛觉;在生理条件下,与机械刺激引起的痛觉无明显相关性;TRPV1 受体是与疼痛相关的重要受体。TRPV1 基因敲除鼠是研究 TRPV1 受体功能的良好模型,进一步研究 TRPV1 受体在各种病理性疼痛模型中的作用,对临床镇痛药物的开发具有重要价值和意义。

[参考文献]

- [1] Mohammadi-Farani A, Sahebgharani M, Sepehrizadeh Z, Jaberi E, Ghazi-Khansari M. Diabetic thermal hyperalgesia: role of TRPV1 and CB1 receptors of periaqueductal gray[J]. *Brain Res*, 2010, 1328: 49-56.
- [2] Geppetti P, Meterazzi S, Nicoletti P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 533: 207-214.
- [3] Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, Murayama N, Saito N,

- Armati P J, et al. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800[J]. *Pain*, 2006, 123(1-2): 106-116.
- [4] Bíró T, Tóth B I, Marincsák R, Dobrosi N, Géczy T, Paus R. TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch[J]. *Bioch Bioph Acta*, 2007, 1772: 1004-1021.
- [5] Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, Rosen T A, Levine J D, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway[J]. *Nature*, 1997, 389: 816-824.
- [6] Chaplan S R, Bach F W, Pogrel J W, Chung J M, Yaksh T L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. *J Neurosci Meth*, 1994, 53: 55-63.
- [7] Ständer S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures[J]. *Exp Dermatol*, 2004, 13: 129-139.
- [8] 贾岳, 洪炎国. 瞬时受体电位香草酸亚型1 (TRPV1) 与炎性痛[J]. *生命科学*, 2010, 22: 1259-1263.
- [9] Patwardhan A M, Akopian A N, Ruparel N B, Diogenes A, Weintraub S T, Uhlson C. Heat generates oxidized linoleic acid metabolites that activate TRPV1 and produce pain in rodents[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120: 1617-1626.
- [10] Immke D C, Gava N R. The TRPV1 receptor and nociception[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006, 17: 582-591.
- [11] Caterina M J, Leffler A, Malmberg A B, Martin W J, Trafton J, Petersen-Zeitz K R. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor[J]. *Science*, 2000, 288: 306-313.
- [12] Christoph T, Bahrenberg G, Vry J D, Englberger W, Erdmann V A, Frech M. Investigation of TRPV1 loss-of-function phenotypes in transgenic shRNA expressing and knockout mice[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2008, 37: 579-589.
- [13] Ravnefjord A, Brusberg M, Kang D W, Bauer U, Larsson H, Lindström E. Involvement of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the development of acute visceral hyperalgesia during colorectal distension in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 611: 85-91.

[本文编辑] 尹茶

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编: 200433) 邮发代号: 4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编: 200433) 邮发代号: 4-725