

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.05.020

论著 · 实验研究

瞬时受体电位通道家族 M8 亚型在大鼠偏头痛发病机制中的作用

秦冬梅 邹撰 周超然 母发光

(四川省医学科学院 / 四川省人民医院, 四川 成都 610072)

[摘要] **目的** 通过检测瞬时受体电位通道家族 M8 (TRPM8) 亚型在偏头痛模型大鼠三叉神经组织中的表达变化探讨 TRPM8 在大鼠偏头痛发病机制中的作用。**方法** 将 20 只雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠随机分为空白对照组和模型组, 每组 10 只。采用颈背部每周 1 次皮下注射硝酸甘油 (10 mg/kg) 建立无先兆性偏头痛大鼠模型, 共 5 周; 对照组则用生理盐水代替硝酸甘油行皮下注射。最后一次皮下注射 4 h 后, 对各组大鼠行为学评分, 而后采集两组大鼠颅底三叉神经节, 采用免疫组化法检测两组三叉神经节中谷氨酸受体 (NMDAR) 的表达变化; 采用免疫荧光检测法观察两组三叉神经节中蛋白激酶 A (PKA) 的表达; 采用 western blot 法检测 TRPM8 蛋白在两组中的表达情况。**结果** 模型组大鼠在建模过程中每周的行为学评分均高于对照组 ($P<0.05$)。模型组中 NMDAR、PKA 及 TRPM8 表达水平均高于对照组 ($P<0.01$)。行为学评分与 TRPM8 表达水平呈正相关 ($r=0.822$, $P<0.01$); NMDAR 与 TRPM8 表达水平亦呈正相关 ($r=0.794$, $P<0.01$)。**结论** TRPM8 可能参与了偏头痛的发病机制, 并且可能是通过 NMDAR 途径实现。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(5): 515-519]

[关键词] 瞬时受体电位通道家族 M8; 硝酸甘油; 偏头痛; 大鼠

Role of transient receptor potential melastatin 8 channels in migraine mechanism in rats

QIN Dong-Mei, ZOU Zhuan, ZHOU Chao-Ran, MU Fa-Guang. Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China (Mu F-G, Email: mufaguang@163.com)

Abstract: Objective To investigate the role of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels in migraine mechanism in rats by measuring the changes in expression of TRPM8 in the trigeminal nerve of rats with migraine. **Methods** Twenty male Sprague-Dawley rats were randomly and equally divided into a blank control group and a model group. Nitroglycerin (10 mg/kg) was injected subcutaneously in the back of the neck once a week for 5 weeks, to prepared a rat model of migraine without aura. Normal saline was injected subcutaneously instead of nitroglycerin in the control group. At 4 hours after the final injection, behavior scoring of all rats was performed, and then the trigeminal nerve ganglions of rats in both groups were collected for measurement of expression of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR), protein kinase A (PKA), and TRPM8 using immunohistochemical staining, immunofluorescence, and Western blot, respectively. **Results** The behavior score in each week during the rat model preparing was significantly higher in the model group than in the control group ($P<0.05$). The expression of NMDAR, PKA, and TRPM8 in the model group was significantly higher than in the control group ($P<0.01$). Both the behavior score and the expression of NMDAR were positively correlated with the expression of TRPM8 ($r=0.822$ and 0.794 respectively; $P<0.01$). **Conclusions** TRPM8 may be involved in migraine mechanism probably by activation of the NMDAR pathway.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(5): 515-519]

Key words: Transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels; Nitroglycerin; Migraine; Rats

[收稿日期] 2014-08-15; [接受日期] 2014-12-04

[基金项目] 四川省卫生厅科研基金资助项目 (30305020504)。

[作者简介] 秦冬梅, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 母发光, 男, 副主任医师。

偏头痛被认为是一种中枢神经和血管发生某些功能障碍而导致的疾病,表现为单侧或双侧头痛,有搏动性,以反复发作性头痛为主要症状^[1-2]。病因和发病机制尚未完全明确,主要的发作机制依赖于血管源性学说,皮层扩散性抑制学说等^[3],目前三叉神经血管学说日益受到广大学者的关注。瞬时受体电位通道家族 M8 (transient receptor potential melastatin 8 channels, TRPM8) 亚型在三叉神经血管中起着重要的作用^[4],亦有 TRPM8 参与偏头痛发作的研究^[5-6]。谷氨酸受体 (NMDAR) 能解除 Mg^{2+} 对 Ca^{2+} 内流的抑制,使 Ca^{2+} 大量进入神经元内,从而出现钙超载,并触发细胞内钙敏感性的信号级联,促进蛋白激酶 A (PKA) 的激活^[7],导致细胞膜蛋白受体 TRPM8 表达上调。本研究拟通过动物实验来探讨 TRPM8 在偏头痛发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 20 只由四川省医学科学院 / 四川省人民医院动物实验中心提供,合格许可证号:SYXK (川) 2008-110,平均体重 180~200 g,鼠龄 2~3 个月。

1.2 实验器材

显微镜 (日本 Nikon 公司);精密天平分析仪 (Sartorius 公司);微量移液器 (法国 Gilson 公司);荧光显微镜 (日本 Nikon 公司);电泳仪、电泳槽和转膜系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 实验试剂

硝酸甘油注射液 (北京益民药业有限公司), NMDAR 抗体 (北京博奥森公司), PKA 抗体 (英国 Abcam 公司), TRPM8 抗体 (英国 Abcam 公司), 10% 水合氯醛 (天津市瑞金物化学制品有限公司), 细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒 (江苏碧云天生物有限公司), 四甲基乙二胺 (TEMED) (美国 Sigma 公司)。

1.4 硝酸甘油偏头痛模型建立及行为学观察

将 20 只大鼠进行编号,按随机数字表法随机分为模型组和空白对照组,每组 10 只。模型组依照 Tassorelli 法^[8]建立无先兆偏头痛大鼠模型:在颈背部每周 1 次皮下注射硝酸甘油,每次剂量

均为 10 mg/kg,共 5 周。空白对照组用等量生理盐水代替硝酸甘油行颈背部皮下注射,共 5 周,分笼普通喂养。注入了硝酸甘油的大鼠,在数分钟后则出现耳朵发红,烦躁不安,两前肢高频率搔头,攀爬鼠笼的次数显著增加,这些现象约 1~2 h 后消失,然后大鼠表现出困倦、闭眼、不活动等状态^[9];出现上述表现后,按照下列标准予以评分^[10]:

(1) 梳理毛发动作:10 次评为 1 分 (之后每出现 1 次加 0.1 分), (2) 围着铁笼来回打转:2 次评为 1 分 (之后每出现 1 次加 1 分), (3) 攀爬笼子:3 次评为 1 分 (之后每出现 1 次加 1 分), (4) 烦躁:往返运动 1 次计 1 分, (5) 咬尾:1 次计 1 分, (6) 耳朵发红:出现则为 1 分,以 30 min 为一个观察时间段,对每只受试大鼠的以上行为做评分记录,总分达 6 分及 6 分以上者则视为造模成功。

1.5 标本采集及处理

两组大鼠于行为学评分后用 10% 水合氯醛 (3.5 mL/kg) 麻醉,固定于手术台上,打开胸腔,剥离心包,暴露心脏,输液头皮针头从心尖搏动处插到升主动脉,止血钳固定针头,快速注入生理盐水约 150 mL 直到大鼠肝脏、肺、胸壁血管及四肢逐渐变苍白,再将 50 mL 4% 多聚甲醛先快后慢注入其中一部分大鼠体内,直到大鼠尾巴变硬则停止灌注,大鼠俯卧于手术台上,暴露并剥去颅骨,暴露大脑,去除其表面的硬脑膜,将大脑组织整体翻起,暴露颅底的三叉神经节,将三叉神经节完整剥离并剪断,剥去其表面的硬脑膜,放入 4% 多聚甲醛中固定,4℃ 保存;另一部分大鼠麻醉灌注后直接开颅取颅底三叉神经节,并迅速放于液氮中保存,备用。

1.6 免疫组化法检测 NMDAR 表达

将三叉神经节标本放入不同浓度梯度乙醇中脱水至沉底、透明,石蜡包埋,行 5 μ m 厚度冠状切片。切片经脱蜡、水化,封闭内源性过氧化物酶及微波抗原修复后,滴加山羊血清封闭液 (1:200),室温孵育 20 min 后,用吸水纸吸去封闭液;滴加兔抗大鼠一抗 (NMDAR 抗体, 1:200), 37℃ 下放置 1 h 后放入 4℃ 冰箱过夜或 37℃ 下放置 2 h 以上, PBS 洗 3 次,每次 5 min;再滴加生物素羊抗兔二抗 (1:200), 37℃ 放置 0.5~1 h, PBS 洗 3 次,每次 5 min;最后滴加约 50 μ L 辣根过氧化物酶标记的链亲和素, 37℃ 放置 0.5~1 h, PBS 洗 3 次,

每次 5 min。DAB 显色，苏木素复染，盐酸酒精分色，氨水返蓝，脱水、透明，中性树胶封片。每个标本随机选取 20 张切片，每张切片在 400 倍光镜下随机选取 10 个视野进行观察，采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对每一张切片进行分析，以 NMDAR 阳性细胞的平均光密度 (OD) 来表示 NMDAR 表达水平。

1.7 免疫荧光检测 PKA 蛋白表达

取上述抗原修复后切片，滴加山羊血清封闭液 (1:100)，室温孵育 30 min 后倾去多余液体，不洗；滴加 1%BSA 稀释的兔抗大鼠一抗 (PKA 抗体，1:100)，37℃ 下放置 1 h 后放入 4℃ 冰箱过夜或 37℃ 下放置 2 h 以上，PBS 洗 3 次，每次 5 min；再滴加荧光标记的山羊抗兔二抗 (1:100)，避光，37℃ 孵育 30 min，PBS 洗 3 次，每次 5 min；最后用 5 μg/mL DAPI 对细胞核染色，抗荧光淬灭封片。每个标本随机选取 20 张切片，每张切片在 100 倍光镜下随机选取 10 个视野进行观察，采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对每张切片进行图像采集和分析，以 PKA 阳性细胞的 OD 值来表示 PKA 表达水平。

1.8 Western blot 检测 TRPM8 表达

将液氮中储存的三叉神经节标本取出并撵碎 (每 5 min 加入液氮 1 次)，预冷的 PBS 洗涤，加入 10 μL/100 mg 组织蛋白裂解液和 1 mL/100 mg 的 PMSF，分装于 EP 管中，并置于冰浴中 20~30 min 使蛋白充分裂解，震荡仪震荡混匀。4℃ 11 000 rpm 离心 10~20 min，将上清液分装于 0.5 mL EP 管中，行 SDS-PAGE 蛋白电泳，转膜 (湿转法)，封闭，抗原抗体反应及显色。采用 Quantity One 图像分析软件测量条带的光密度值，以靶蛋白灰度 /

β-actin 灰度比值表示 TRPM8 的相对表达量。实验重复 3 次。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行分析处理，符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两组间均数的比较采用 *t* 检验；相关性分析采用 Pearson 相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠行为学评分结果

与对照组比较，每周模型组大鼠行为学评分均明显升高 (*P* < 0.05)，且均高于 6 分，提示造模成功，见表 1。

2.2 两组大鼠三叉神经组织中 NMDAR 表达

NMDAR 阳性表达呈棕黄色。对照组中神经细胞 NMDAR 表达较弱，模型组神经细胞中 NMDAR 呈强阳性表达 (图 1)。通过分析显示模型组 NMDAR 表达水平 (0.420 ± 0.033) 明显高于对照组 (0.120 ± 0.015) (*t* = 242.355, *P* < 0.01)。

2.3 两组大鼠三叉神经组织中 PKA 蛋白表达

PKA 蛋白表达呈绿色荧光。对照组中神经细胞 PKA 蛋白表达较弱 (0.160 ± 0.034)，模型组神经细胞中 PKA 蛋白呈强阳性表达 (0.410 ± 0.057)，与对照组比较差异有统计学意义 (*t* = 83.104, *P* < 0.01)，见图 2。

2.4 两组大鼠三叉神经组织中 TRPM8 表达

Western blot 检测结果显示模型组 TRPM8 表达水平 (149 ± 14) 高于对照组 (62 ± 8) (*t* = 560.93, *P* < 0.01)，见图 3。

表 1 两组大鼠行为学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
对照组	10	1.79 ± 0.43	1.89 ± 0.29	1.95 ± 0.38	2.09 ± 0.36	2.10 ± 0.34
模型组	10	8.02 ± 1.44	16.5 ± 2.61	21.3 ± 3.50	23.36 ± 3.30	25.60 ± 3.52
<i>t</i> 值		13.12	17.60	17.39	20.35	20.98
<i>P</i> 值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

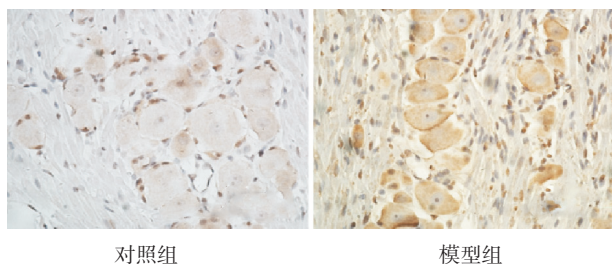


图1 免疫组化法检测两组大鼠三叉神经组织中 NMDAR 的表达 (DAB 显色, $\times 400$) NMDAR 表达于细胞膜和细胞质中, 其阳性表达呈棕黄色。对照组中神经细胞 NMDAR 表达较弱, 模型组神经细胞中 NMDAR 呈强阳性表达。

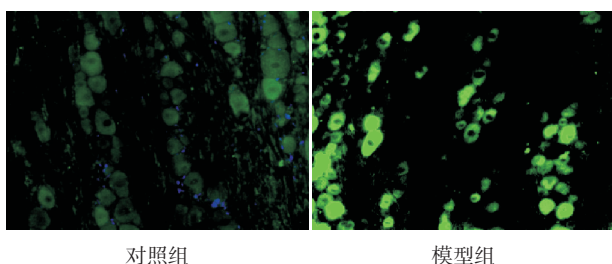


图2 免疫荧光法检测两组大鼠三叉神经组织中 PKA 蛋白的表达 (DAPI, $\times 400$) PKA 蛋白表达于细胞膜和细胞质中, 绿色荧光为 PKA 的阳性表达。对照组中神经细胞 PKA 蛋白表达较弱, 模型组神经细胞中 PKA 蛋白呈强阳性表达。

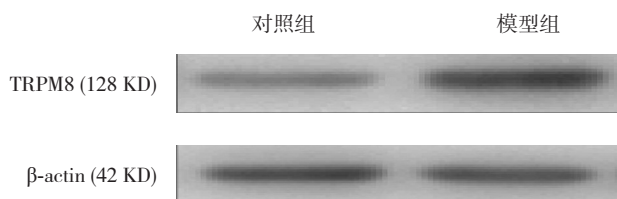


图3 Western blot 检测两组大鼠三叉神经组织中 TRPM8 的表达

2.5 模型组大鼠行为学评分与 TRPM8 水平的相关性分析

模型组大鼠行为学评分与 TRPM8 水平之间呈正相关 ($r=0.822$, $P<0.01$), 说明 TRPM8 的表达水平越高, 行为学评分越高, 症状越典型, 提示 TRPM8 可能参与了偏头痛的发病机制。

2.6 模型组 NMDAR 与 TRPM8 的相关性分析

模型组大鼠三叉神经组织中 NMDAR 水平与 TRPM8 水平之间呈正相关 ($r=0.794$, $P<0.01$), 说明 NMDAR 表达增加, TRPM8 表达亦增加, 提示 NMDAR 可能与 TRPM8 共同参与了偏头痛的发病机制。

3 讨论

偏头痛是一种血管和 / 或神经功能紊乱性反复发作性慢性疾病, 有些还伴有畏光、声音恐惧、恶心、呕吐、腹痛等症状。近年来, 偏头痛发病率有逐年上升的趋势, 而且伴随年龄趋于年轻化, 该病严重影响了患者的学习和日常生活, 其中儿童偏头痛发作的特点: (1) 大多数偏头痛患儿具有家族遗传史^[11]; (2) 发作时间较短, 常常持续时间为 2~48 h, 少数持续仅约 1 h; (3) 发生部位以额部最为好发, 其次是一侧或双侧额颞部^[12]; (4) 女性患者疾病发作可能与雌二醇有极大的关系, 常常在妊娠期停止发作或发作次数明显减少, 周期缩短^[13]; (5) 搏动性及中、重度头痛不明显。

对年龄较大的儿童偏头痛患者而言, 常见的先兆症状为眼前出现瞬间的强光束、一侧视觉消失、眼前闪现金星或各种形态的黑点, 往往发生在头痛前半小时, 然而有先兆偏头痛只占很少部分。无先兆偏头痛占 70%~85%, 发作时患儿常寻找一个安静、光线暗淡的地方躺下, 避免声音和光线刺激, 易受外界环境或者学习压力而反复发作, 因此也是本次实验研究观察的要点。

然而, 偏头痛的发作机理还不完全清楚, 目前公认的机理主要依赖于三种学说: 即神经源性、血管源性和三叉神经血管学说^[14]。目前, 三叉神经血管学说作为主流学说受到广大学者们的关注, 该学说是将血管源性和神经源性学说融入一体: 中枢血管强烈扩张, 神经炎性递质的大量释放, 使三叉神经受内部和外部因素刺激, 神经递质产生, 将痛觉信号沿三叉神经传导至三叉神经脊束核, 再经过脑干前端、丘脑传入皮层, 使大脑皮层产生炎症反应^[15]。最终导致偏头痛发生, 很好的诠释了偏头痛的发生和发展。

在此研究中, 考虑到临床儿童偏头痛多为无先兆偏头痛, 以此为研究出发点, 所以建立无先兆硝酸甘油偏头痛大鼠模型。该模型支持三叉神经血管学说: 由于 NTG 释放出的 NO 通过血脑屏障激活了血管周围的三叉神经末梢, 释放神经肽, 使脑膜血管过度紧张, 血浆蛋白渗出, 肥大细胞脱颗粒, 从而导致脑膜神经血管系统产生神经性炎症^[16], 这种伤害性刺激沿着三叉神经传入纤维

传至三叉神经核尾部,冲动达到延脑化学感受器,引起恶心、呕吐;传入下丘脑,出现畏光;传入大脑皮层产生疼痛^[17]。这再一次验证了以往学者研究的三叉神经血管理论具有真实性和可重复性,故本研究认为三叉神经节是偏头痛发生发展的重要枢纽。

本实验研究在偏头痛动物模型制作成功后,TRPM8表达水平较对照组明显升高,说明TRPM8可能参与了偏头痛的发生和发展过程。但TRPM8表达的增加也会导致冷痛觉过敏^[18]。TRPM8参与慢性疼痛的机制中,主要是炎症组织中蛋白激酶和磷酸激酶的激活,导致细胞膜蛋白受体TRPM8表达上调,通道开放阈值下降,突触严重受损,对疼痛感应部位产生痛觉过敏和超敏^[19]。故偏头痛大鼠三叉神经节中TRPM8蛋白表达是上调的,这与以往的其他研究结果一致。

NMDAR可以通过条件性钙离子内流调节突触传导、突触可塑性和神经细胞变性^[20]。本实验通过建立硝酸甘油偏头痛大鼠模型的结果显示:NMDAR表达上调能使PKA激活,PKA膜转位促使NMDAR磷酸化,两者之间的恶性循环导致偏头痛的发生与发展,更说明NMDAR的调节在偏头痛发作中发挥着不可或缺的作用^[21]。而TRPM8的激活主要依赖PKA的激活^[7],然而,本研究通过对NMDAR与TRPM8表达水平相关性分析得出结论:NMDAR与TRPM8灰度值之间呈正相关,提示NMDAR表达增加,TRPM8表达亦增加,再一次验证了在偏头痛发作中,TRPM8升高与NMDAR表达密切相关^[5],而PKA可能作为NMDAR与TRPM8之间的桥梁,共同参与偏头痛的发作。然而,能否证明TRPM8参与偏头痛发作机制,它将通过怎样的途径发挥调节作用,还需加大样本量,作进一步考察。

【参 考 文 献】

- [1] Soon YY, Siow HC, Tan CY. Assessment of migraineur referred to a specialist headache clinic in Singapore: diagnosis, treatment strategies, outcomes, knowledge of migraine treatments and satisfaction[J]. *Cephalalgia*, 2005, 25(1): 122-132.
- [2] 方洁,王子才.托吡酯治疗儿童偏头痛的临床研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2006, 8(6): 509-510.
- [3] Xiao Y, Richter JA, Hurley JH. Release of glutamate and CGRP from trigeminal ganglion neurons: Role of calcium channels and 5-HT1 receptor signaling[J]. *Moll Pain*, 2008, 4: 12.
- [4] Chasman DI, Schurks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population[J]. *Nat Genet*, 2011, 12(7): 695-843.
- [5] Markus Schurks. Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies[J]. *J Headache Pain*, 2012, 13(1): 1-9.
- [6] Greg A, Zameel M. New directions in migraine[J]. *Weir and Cader BMC Medicine*, 2011, 9: 116.
- [7] Devesa I, Ferrer-Montiel A. Neurotrophins, endocannabinoids and thermo-transient receptor potential: a threesome in pain signaling[J]. *Eur J Neurosci*, 2014, 39(3): 353-362.
- [8] Tassorelli C, Greco R, Morocutti A, et al. Nitric oxide-induced neuronal activation in the central nervous system as an animal model of migraine: mechanisms and mediators[J]. *Funct Neurol*, 2001, 16(4 Suppl): 69-76.
- [9] Sarria I, Gu J. Menthol response and adaptation in nociceptive-like and nonnociceptive-like neurons: role of protein kinases[J]. *Moll Pain*, 2010, 6: 47.
- [10] 朱晓凤,韩月臣,樊兆民,等.热凝脑膜中动脉对硝酸甘油致偏头痛大鼠三叉神经尾核c-fos基因表达的影响[J]. *山东大学耳鼻喉眼学报*, 2010, 24(1): 61-64.
- [11] 杨丽萍,张育才.儿童偏头痛的临床研究进展[J]. *临床儿科杂志*, 2005, 23(4): 246-247.
- [12] 吴希如,林庆.小儿神经系统疾病基础与临床[M].北京:人民出版社,2000: 633-637.
- [13] 陈锦泳,尹昭.儿童和青少年偏头痛[J]. *新医学杂志*, 2009, 40(12): 771-774.
- [14] 郭琳,洪治平.硝酸甘油型实验性偏头痛模型原理与研究现状[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2004, 10(6): 357-364.
- [15] 吴敏,陈美娟.偏头痛发病机制的研究进展[J]. *四川生理科学杂志*, 2007, 29(4): 173-176.
- [16] 张敏.偏头痛发病机制的研究进展[J]. *中国临床医生*, 2010, 38(9): 14-15.
- [17] 姚宝珍,丁琼,凌伟,等.儿童偏头痛的临床特点及脑电图表现[J]. *中国当代儿科杂志*, 2002, 4(5): 395-396.
- [18] 郭张华,陈建平.NMDA受体在神经病理性疼痛中作用的研究进展[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2013, 19(3): 173-176.
- [19] Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain[J]. *Curr Biol*, 2006, 16(16): 1591-1605.
- [20] Kayo T, Kempinski O, Hermann A, et al. Cluster analysis of mRNA expression levels identifies multiple sequential patterns following focal cerebral ischemia[J]. *Turk Neuron Surge*, 2012, 22(4): 441-447.
- [21] 朱正萍,杨晓苏.PKC- γ /NMDAR1在硝酸甘油致偏头痛大鼠发病机制中的作用探讨[D].中南大学硕士学位论文,2009.

(本文编辑:万静)