doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2020.10.004

背根神经节中 TRPV1 激活对钠-钾-氯共转运体表达和功能的影响 *

邓诗瑜[1,4] 许珍珍[1,5] 陈沁怡[3] 谭朝阳[1] 田俊杰[1] 王 洋[1] 马克涛[1] 李 丽[1] 司军强[1△] 马新军[2△]
（[1] 新疆石河子大学医学院 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室，石河子 832002，[2] 新疆昌吉州人民医院麻醉科，昌吉 831100，[3] 襄阳市中心医院麻醉科，襄阳 441000；[4] 广州医科大学附属第一医院麻醉科，广州 510120；[5] 华中科技大学同济医学院协和医院麻醉科，危重症医学研究所，武汉 430022）

摘 要 目的: 探讨在急性神经源性炎性痛模型中，用辣椒素激活瞬时感受器电位香草酸受体 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 后对背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 细胞钠-钾-氯共转运体 (sodium-potassium-chloride co-transorter 1, NKCC1) 及其磷酸化蛋白表达变化及功能的影响。**方法：**雄性 SD 大鼠随机分为：正常组 (n = 24)、辣椒素组 (n = 36) 和辣椒素 + 布美他尼组 (n = 6)。运用免疫荧光和 Western blotting 技术检测 NKCC1 和 p-NKCC1 的蛋白分布及其变化；运用膜片钳技术检测 GABA 激活电流大小；运用氯离子荧光探针检测 DRG 细胞内氯离子浓度变化。**结果：**免疫荧光结果显示 TRPV1 和 NKCC1 在正常大鼠 DRG 细胞共表达，辣椒素组 NKCC1 和 p-NKCC1 荧光强度高于正常组；行为学结果显示辣椒素组热缩足反射潜伏期减小、冷缩足反射潜伏期延长，给予 NKCC1 的抑制剂布美他尼预处理后，则能逆转该效果。Western blotting 结果显示辣椒素组 NKCC1 和 p-NKCC1 的蛋白表达升高；膜片钳结果显示辣椒素组 GABA 激活电流明显增加，布美他尼可逆转此作用；荧光探针结果显示辣椒素组 DRG 细胞内氯离子浓度增加，给予布美他尼后 DRG 细胞中氯离子浓度降低。**结论：**外源性激活 TRPV1 后促进了 NKCC1 的表达增加和功能变化，提示 NKCC1 参与了激活 TRPV1 引起的疼痛。

关键词 疼痛；辣椒素；背根神经节；钠-钾-氯共转运体；瞬时感受器电位香草酸受体 1

Effect of TRPV1 activation on expression and function of sodium-potassium-chloride co-transporter in dorsal root ganglion *

DENG Shi-Yu [1,4], XU Zhen-Zhen [1,5], CHEN Qin-Yi [3], TAN Chao-Yang [1], TIAN Jun-Jie [1], WANG Yang [1], MA Ke-Tao [1], LI Li [1], SI Jun-Qiang [1△], MA Xin-Jun [2△]
([1] The key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease of Ministry of Education, Shihezi University School of Medicine, Shihezi 832002, China; [2] Department of Anesthesiology, Xinjiang Changji People's Hospital, Changji 831100, China; [3] Department of Anesthesiology, Xiangyang Central Hospital, Xiangyang 441000, China; [4] Department of Anesthesia, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China; [5] Department of Anesthesiology, Institute of Anesthesiology and Critical Care Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of activation of transient receptor potential vanilloid receptor (TRPV1) on the protein expression and function of sodium-potassium-chloride co-transporter 1 (NKCC1) and its phosphorylated protein in the dorsal root ganglion (DRG) in capsaicin-induced acute neurogenic inflammatory pain. **Methods:** Male SD rats were randomly divided into control group, capsaicin group and bumetanide group. The distribution of NKCC1 and p-NKCC1 were detected by immunofluorescence and the changes of NKCC1 and p-NKCC1 were detected by Western blotting. The patch-clamp technique was used to detect the activation of GABA current. The chloride ion fluorescence probe was used to detect the change of DRG intracellular

* 基金项目：国家自然科学基金（31260247）
△ 通讯作者 司军强 sijunqiang@shzdu.eu.cn；马新军 mxj580@126.com

chloride concentration. **Results:** Immunofluorescence revealed that NKCC1 and TRPVl were co-expressed on DRG in the normal rats, and the fluorescence intensity of NKCC1 and p-NKCC1 were higher in capsaicin group than that in normal group. Behavioral results showed that thermal withdrawal latency was decreased, and cold withdrawal latency was prolonged in the capsaicin group, which could be reversed by pretreatment with bumetanide, an inhibitor of NKCC1. Western blotting showed that the protein expression of NKCC1 and p-NKCC1 in the capsaicin group was increased. The results of Patch clamp showed that the GABA activation current of capsaicin group was significantly increased. After pretreatment with bumetanide, the effect could be reversed. The fluorescence probe showed an increase in the chloride ion concentration in the DRG of capsaicin group. The concentration of the chloride ion concentration in DRG neurons was reduced after administration of bumetanide. **Conclusion:** Activation of the TRPV1 promotes the increase of expression and the changes of function in NKCC1, suggesting the involvement of NKCC1 in the pain caused by TRPV1.

Key words　Pain; Capsaicin; Dorsal root ganglion (DRG); Sodium-potassium-chloride co-transorter 1 (NKCC1); Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)

疼痛在人群中的发病率越来越高，有关疼痛的作用机制复杂多样，故对寻求疼痛新的作用机制的研究至关重要。瞬时感受器电位香草酸受体 1 (transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1) 是一种非选择性的阳离子通道，广泛分布于哺乳动物的感觉神经元，尤其是与痛觉有关的无髓鞘 C类纤维和部分少髓鞘的 Aδ 类纤维 [1]，有研究表明，在脊髓水平突触前 TRPV1 的激活会使伤害性信息的传入增多，增加炎性疼痛的产生 [2]，TRPV1 不仅参与疼痛的调控，TRPV1 的激活还可能诱发释放神经肽等，与痛觉过敏的发生密切相关 [3]。已有研究发现，在初级感觉神经元中，TRPV1 被激活后可同时激活钙激活的氯离子通道，正反馈促进 TRPV1 激活引起的去极化，进而加剧疼痛的发生 [4,5]，表明 Cl^- 参与了痛觉的调制。钠-钾-氯共转运体 (sodium-potassium-chloride co-transporter 1, NKCC1) 是一种内向的“Cl^- 泵”[6]，在中枢神经系统中与 KCC2 共同维持神经细胞中的 Cl^- 浓度的稳态。而成年后大鼠 DRG 上主要表达 NKCC1，以维持细胞内高 Cl^- 状态 [7]。本课题组前期实验发现 CCI 模型后 NKCC1 在 DRG 上的表达明显增加 [7]。另有研究显示 [8]，结肠内注射辣椒素后，可以在相应节段脊髓背角中发现 NKCC1 的表达上升，以上研究结果均提示 NKCC1 参与疼痛的调节，可能成为治疗疼痛的靶点。因此，本研究主要目的是观察在初级感觉神经元背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 上，在大鼠足底给予辣椒素激活 TRPV1 受体后，NKCC1 表达和功能的变化以及对疼痛的影响，进而明确疼痛发生时 NKCC1 可能作用及机制，为临床治疗疼痛提供理论依据与可能的治疗新靶点。

方　法

1. 实验动物及分组

200 只雄性 SD 大鼠购自新疆医科大学动物实验中心（许可证编号 SCXK New 2003-0001）。饲养条件为：12 h 昼夜交替，室温 20℃～25℃，湿度 60%～70%，自由饮食水，通风良好。180～250 g 大鼠供实验使用，使用之前，先适应周围环境 1 周。将大鼠随机分为：正常组 (n = 24)、辣椒素组 (n = 36) 和辣椒素 + 布美他尼组 (n = 6)。

2. 试剂、仪器

免抗 NKCC1 多克隆抗体（美国，Cell Signaling 公司）；免抗 p-NKCC1 多克隆抗体（美国，Merck 公司）；小鼠抗 TRPV1 单克隆抗体（美国，Abcam 公司）；NKCC1 的抑制剂布美他尼（美国，Abcam 公司）；辣根酶标记山羊抗兔 IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG、TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG、（中杉金桥），其余试剂均为国产分析纯试剂。全自动热幅射刺激仪 (UGO BASILE 37370 Plantar Test Apparatus, Italy)；电源、电泳仪、电转仪（北京，六一仪器厂）；LSM510 激光共聚焦显微镜（德国，Carl Zeiss 公司）；胰蛋白酶 Type III、胶原酶 Type IA、胰蛋白酶抑制剂、DMEM 培养基（美国，Sigma 公司）；Multi Clamp700B 膜片钳放大器（美国，Axon 公司）；P-2000 微电极拉制仪（美国，Sutter 公司）；Digidata 1550A 数据采集系统（美国，Axon 公司）；MP-225 微操纵仪（美国，Sutter 公司）。

3. 实验方法

（1）模型制备：支配足底的神经是从 $L_{3\text{-}6}$ 发出，本研究通过大鼠足底注射辣椒素构建急性神经源性炎症模型 [9]，观察 $L_{3\text{-}6}$ 神经节蛋白的变化情况。在

4% 七氟醚麻醉下，大鼠左侧足底皮下注射辣椒素 (3 mg/ml)（APExBIO，A3278，美国）模拟急性神经源性疼痛，即刻可以观察到大鼠大腿回缩，使针尖停留于皮下数秒，待药物吸收完全后拔出针头，此时可见大鼠大腿回蹬、甩足。待大鼠数秒清醒过后，进行后续实验。

参照 Pogatzki 等 [10] 的方法 , 在正常大鼠身上行鞘内置管术。将大鼠麻醉后俯卧固定、备皮、在 L_{5-6} 上方做纵切口，依次分离组织，用 PE-10 导管穿过椎间隙，若看到尾部或者后肢抽动，同时有清亮的脑脊液流出，则固定导管，经皮下隧道于颈部传出，外露 2 cm 左右固定，待大鼠清醒，通过导管注射 2% 利多卡因 10 μl，若在注射后 30 s 内出现双下肢瘫痪并于 30 min 内恢复，则判断置管成功。

（2）痛行为学测试：各组分别在术前 1 h、术后 10 min、30 min、60 min、120 min 随机抽取 6 只大鼠进行热痛阈值和冷痛阈值测定。热痛阈值依据 Hargreaves 等 [11] 的方法进行操作。在安静环境中，将大鼠单独放入底部透明的有机玻璃箱内提前适应周围环境 10～15 min 后，用热辐射刺激仪热源垂直照射注射辣椒素侧的皮肤，记录从照射开始至大鼠抬足时间，最长时间为 30 s，测定时保持刺激强度相同。每一个时间点重复测定 3 次，每次至少间隔 5 min，取 3 次平均值为热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) [12]。TWL 值越低，表示大鼠对热刺激的痛觉过敏越严重。

冷痛阈值根据 Norcini 等 [13] 的方法，将大鼠放置在自备网笼内，待其安静后，将 0.1 ml 丙酮滴到大鼠注射辣椒素的左后足底皮肤上，并同时计时。记录大鼠抬足至将足放下的时间，即为大鼠的冷刺激抬足时间。每一个时间点重复测定 3 次，每次至少间隔 5 min，取 3 次平均值为冷缩足反射潜伏期 (cold withdrawal latency, CWL)。CWL 值越高，表示大鼠对冷刺激的痛觉过敏越严重。

（3）免疫荧光：腹膜内注射 1% 戊巴比妥钠深度麻醉大鼠，暴露心脏，用针尖从心尖稍偏左的位置刺穿左心室壁进入升主动脉，将右心耳剪破。用生理盐水灌流至流出的液体澄清，之后换用 4% 的多聚甲醛继续进行灌流，观察到大鼠四肢及头颈部僵硬为止。随后沿棘突依次剪开椎管，暴露脊髓，在显微镜下迅速剥离背根神经节。将修剪好的 DRG 置于 4% 多聚甲醛中后固定 12 h，脱水后石蜡包埋，制作石蜡切片 (5 μm)。石蜡切片进行常规的脱蜡，用枸橼酸进行抗原修复，破膜，5% BSA 封闭 1 h，一抗 4℃过夜孵育：共同孵育小鼠抗 TRPV1 (1:50) 和兔抗 NKCC1 (1:100)，单独孵育兔抗 p-NKCC1 (1:100)。复温，PBS 清洗 3 次，37℃避光孵育对应的二抗 1 h：TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记山羊抗兔 IgG，再用 PBS 清洗 3 次，滴加抗荧光淬灭封片剂进行封片，共聚焦显微镜下观察计数并摄取图片。选用 Image-J 图像分析软件进行阳性细胞面积率的统计。

（4）Western blotting：大鼠麻醉后处死，取 L_{4-6} 节段脊柱，置于人工脑脊液 (aCSF):1.3 mmol $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2.6 mmol KCl, 0.9 mmol $MgCl_2$, 21 mmol $NaHCO_3$, 2.5 mmol $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 125 mmol NaCl, 3.5 mmol 葡萄糖，pH 7.2～7.4 中，在显微镜下分离术侧 DRG，剪碎后加入裂解液，提取总蛋白，用 BCA 法对蛋白浓度进行测定，100℃，10 min 使蛋白变性，取一定量的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，电转至 0.45 nm PVDF 膜上后，5% 脱脂牛奶封闭 2 h。一抗 4℃摇床过夜孵育。TBST 洗膜 3 次，用二抗：辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG，孵育 2 h，再次用 TBST 洗膜 3 次，加入新鲜配制 ECL 荧光显色。采用 Image-J 软件进行结果分析。

（5）急性分离 DRG 神经元：参考本实验室前期采用的方法 [14]，大鼠麻醉后处死后，取 L_{4-6} 节段脊柱，放入盛有氧饱和的细胞外液中 (NaCl 150 mmol/L, KCl 5 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, D-glucose 10 mmol/L, Sucrose 20 mmol/L, $CaCl_2$ 3.32 mmol/L, pH 为 7.2～7.4，渗透压为 320～350 mOsm)。用精细角膜剪和游丝镊分离修剪 DRG，将 DRG 充分剪碎，用消化酶（胰蛋白酶 Type III 0.24 mg/ml 和胶原酶 TypeIA 0.6 mg/ml，溶剂为 DMEM 培养基）在 37℃水浴锅中消化 3～4 min。消化结束后立即加入少量胰蛋白酶抑制剂终止消化。静置待细胞贴壁，待细胞贴壁充分后，加入氧饱和的细胞外液。

（6）膜片钳：镜下选取膜表面光滑、透亮、状态良好的直径在 30～50 μm 的 DRG 细胞作为实验对象 [15]。选取电阻值为 2～8 MΩ 的微电极，充灌电极内液 (K-Gluconate 130 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.2 mmol/L, $CaCl_2$ 2 mmol/L, EGTA 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, D-Glucose 7.5 mmol/L, pH 值为 7.2～7.4，渗透压为 320～350 mOsm)，将充灌好细胞内液的玻璃微电极连接在微操纵仪上。操作微操纵仪，电极尖端接触细胞，接触细胞的瞬间可以从膜测试窗口观察到电极电阻略微升高。用嘴吸法给予微电极内部一定负压，同时将钳制电位逐步调节至 -60 mV，待细胞与电极间形成 GΩ 封接后，用嘴吸破膜法或同时辅助以电击破膜法破膜。破膜后，阻值仍维持

在 GΩ 以上的细胞用于实验。在显微镜下记录细胞直径。所用药物：γ 氨基丁酸 (γ-amino-butylic acid, GABA)(10^{-4} M)、辣椒素 (10 μM)，以上药物用排药管给药，给药管口距离所记录细胞 100 μm。记录的信号经 Multi Clamp 700B 膜片钳放大器放大，给予 10 kHz 的滤波后，由 AxonDigidata 1550A 数模/模数转换器转换，采样频率为 10～20 kHz。

（7）氯离子荧光探针 (MQAE)：足底给予辣椒素 60 min 后，急性分离各组大鼠 DRG，用眼科剪剪碎、消化、离心、弃上清，加入 96 孔板中，抑制剂组孵育布美他尼 (10 μM) 30 min，吸出后再加入含有布美他尼的 MQAE 缓冲液，37℃孵育 30 min，缓冲液清洗，荧光显微镜拍照。当氯离子浓度升高时，MQAE 的荧光强度随着氯离子浓度的增加而降低。

4. 统计学分析

研究结果计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示，实验数据图形用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘制，采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析，免疫荧光、Western blotting 数据组间差异采用单因素方差分析，组间疼痛行为学比较采用重复测量方差分析。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　果

1. TRPV1 和 NKCC1 在 DRG 上的分布

DRG 可以根据细胞直径分为小细胞 (< 25 μm)，中细胞（25 μm ≤直径 < 40 μm），大细胞 (≥ 40 μm)。以往的研究证实在 DRG 神经元细胞中，传递伤害性感受信号主要是无髓鞘的 C 类纤维和有髓鞘的 Aδ 纤维，而绝大多数都是中小型细胞 [15]。免疫荧光结果显示，在正常大鼠 DRG 神经元上可观察到 TRPV1 主要在中小型细胞上表达，而 NKCC1 不仅在大细胞的膜上有表达，在中小型神经元细胞上也有表达，并且观察到 TRPV1 和 NKCC1 在中小型神经元细胞存在共表达（见图 1）。

2. 足底注射辣椒素后大鼠疼痛行为学改变

足底注射辣椒素后，发现大鼠 TWL 降低，而 CWL 明显延长，60 min 左右可见大鼠抬足、舔足时间明显增加；而鞘内给予 NKCC1 抑制剂布美他尼 (5 μg/μl) 后给予辣椒素，大鼠 TWL 和 CWL 均有所恢复（见图 2）。

3. 给予辣椒素后 DRG 上 NKCC1 及 p-NKCC1 的蛋白分布及其变化

免疫荧光结果显示（见图 3），辣椒素组 NKCC1 在中小细胞的核膜上表达明显增多，而 p-NKCC1 在中小细胞的细胞膜上表达增多。Western blotting 结果显示（见图 4），辣椒素组 DRG上 NKCC1 和 p-NKCC1 的蛋白表达量均增加，在 60 min 时表达量最高，蛋白变化与行为学变化一致。

4. GABA 的激活电流

选取直径大小为 30～50 μm DRG 细胞，排

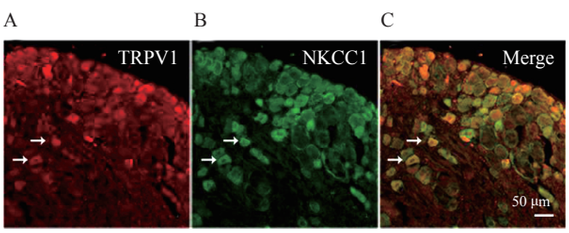

图 1　免疫荧光显示正常组 TRPV1 和 NKCC1 表达分布情况　标尺 = 50 μm

Fig. 1　Immunofluorescence showing distribution of TRPV1 and NKCC1 in the DRG　Scale bar = 50 μm

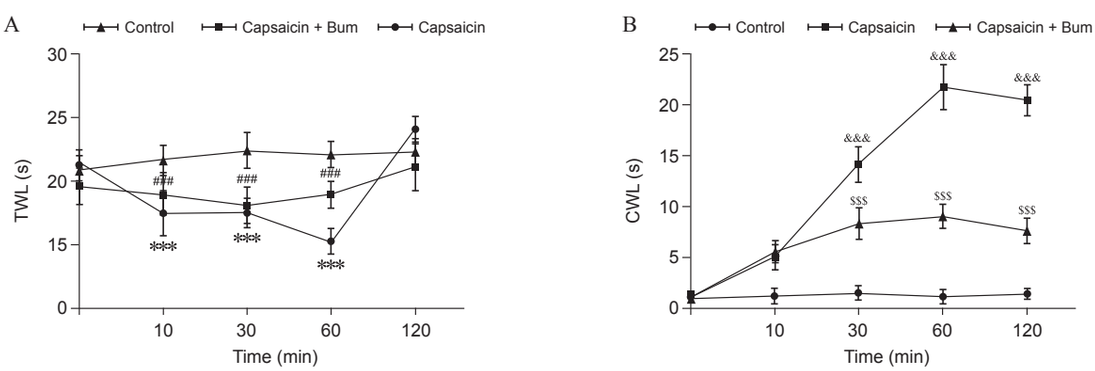

图 2　足底注射辣椒素后疼痛行为学变化 ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$)
***$P < 0.001$，$^{\&\&\&}P < 0.001$，与正常组相比；$^{\#\#\#}P < 0.001$，$^{\$\$\$}P < 0.001$，与辣椒素组相比

Fig. 2　The change of pain behavior after plantar injection of capsaicin ($n = 6$, $\bar{x} \pm SD$)
***$P < 0.001$, $^{\&\&\&}P < 0.001$, compared with the control group; $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\$\$\$}P < 0.001$, compared with the capsaicin group.

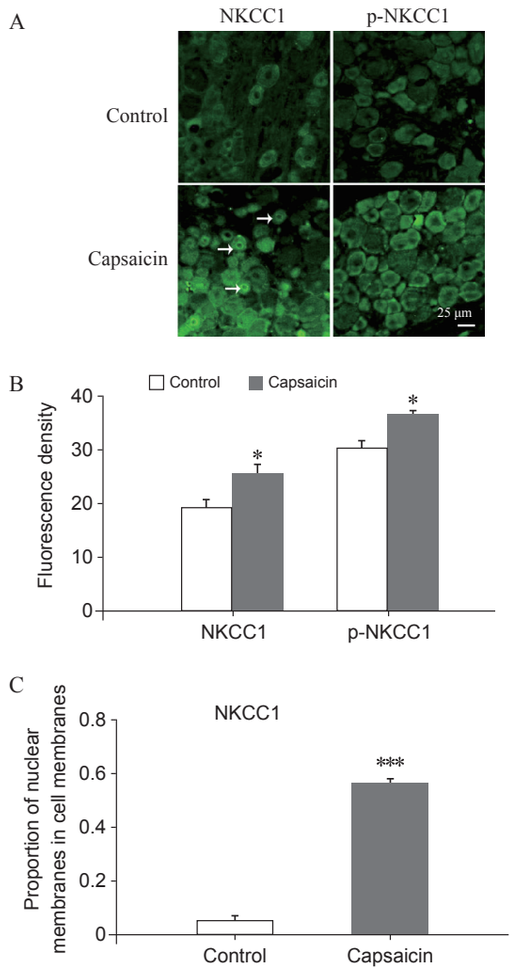

图 3 (A) 免疫荧光显示给予辣椒素后 NKCC1 和 p-NKCC1 表达情况 (n = 3, $\bar{x}\pm SD$)　标尺 = 25 μm；(B) 正常组和辣椒素组 NKCC1 和 p-NKCC1 的荧光密度比较；(C) 正常组和辣椒素组 NKCC1 的核膜表达在细胞膜上的比例
*P < 0.05，***P < 0.001，与正常组相比

Fig. 3 (A) Immunofluorescence showing the expression of NKCC1 and p-NKCC1 after capsaicin administration. (n = 3, $\bar{x}\pm SD$). Scale bar = 25 μm; (B) Fluorescence density of NKCC1 and p-NKCC1 in the control group and capsaicin group; (C) Proportion of nuclear membrane expression on the cell membrane of NKCC1 in the control group and the capsaicin group.
*P < 0.05, **P < 0.001, compared with the control group.

药管给予辣椒素 (10 μM) 后检测的 GABA 激活电流相比正常组明显增加；在给辣椒素之前孵育布美他尼 (10 μM)15 min，GABA 的激活电流减小。各组的 GABA 激活电流大小依次为：正常组 (151.93±18.50) pA、辣椒素组 (540.77±45.91) pA、布美他尼组 (211.43±24.36) pA（见图 5）。

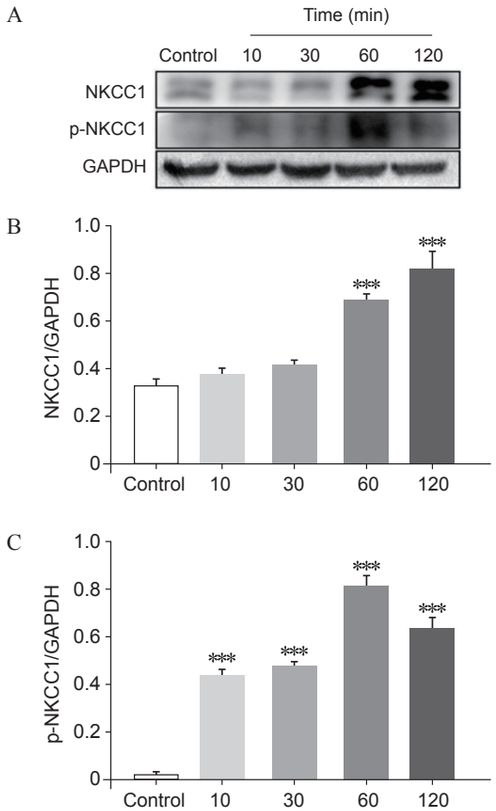

图 4 足底注射辣椒素对大鼠不同时间点 NKCC1 和 p-NKCC1 表达的影响 (n = 6, $\bar{x}\pm SD$)
***P < 0.001，与正常组相比

Fig. 4 Effect of plantar injection of capsaicin on the expression of NKCC1 and p-NKCC1 in rats at different time points (n = 6, $\bar{x}\pm SD$)
***P < 0.001, compared with the control group.

5. 给辣椒素后大鼠 DRG 神经元中氯离子浓度的变化

氯离子荧光探针结果显示：辣椒素组 DRG 神经元细胞内氯离子浓度比正常组明显增高，布美他尼组氯离子浓度有所降低（见图 6）。

讨　论

有关疼痛的机制复杂多样，其中离子通道的改变是形成异常放电、引起疼痛的主要原因之一。本研究的痛行为学结果显示辣椒素组 TWL 降低、CWL 延长，而给予布美他尼预处理后 TWL 升高、CWL 缩短；免疫荧光和 western blotting 显示在正常大鼠 DRG 神经元上 TRPV1 和 NKCC1 在与疼痛相关的中、小 DRG 神经元上共表达，激活 TRPV1 后 NKCC1 在核膜上的表达增多，而 p-NKCC1 在胞质

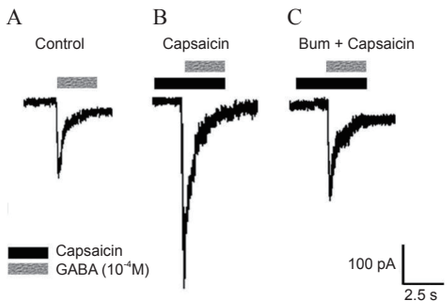

图 5 膜片钳记录 (A) 正常组；(B) 辣椒素组；(C) 辣椒素+布美他尼组的 GABA 激活电流大小 (n = 6)

Fig. 5 Patch clamp recording of GABA currents (n = 6) in the control group (A); the capsaicin group (B); the bumetanide group (C).

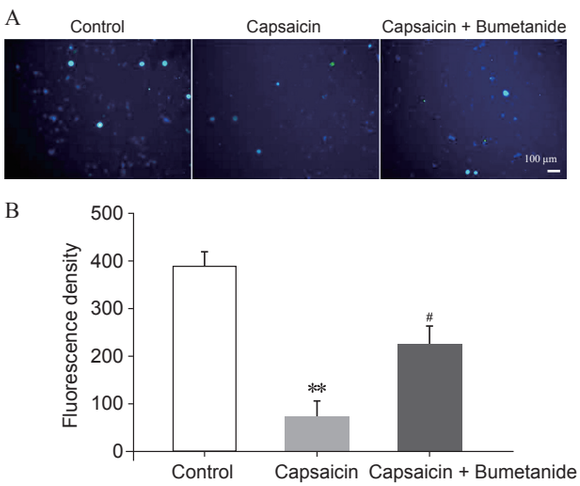

图 6 氯离子荧光探针显示 (A) 正常组、辣椒素组和辣椒素+布美他尼组，大鼠 DRG 中细胞内氯离子的浓度变化 (n = 3)　标尺 = 100 μm；(B) 各组荧光密度的比较

$^{**}P < 0.01$，与正常组相比；$^{\#}P < 0.05$，与辣椒素组相比

Fig. 6 Chloride ion fluorescent probe shows (A) changes in intracellular chloride ion concentration in DRG of control group, capsaicin group, and bumetanide group (n = 3). Scale bar = 100 μm; (B) statistical diagram of fluorescence density of each group.

$^{**}P < 0.01$, compared with the control group; $^{\#}P < 0.05$, compared with the capsaicin group.

中或胞膜上表达明显增加；荧光探针结果显示辣椒素组 DRG 神经元内 Cl^- 浓度明显增加，给予布美他尼预处理后 Cl^- 浓度降低，这些结果均提示 TRPV1 的激活可以引起 NKCC1 的改变，并加重实验动物的疼痛。

有研究显示，在正常大鼠 DRG 神经元上 NKCC1 mRNA 与 TRPV1 在中、小型神经元上存在共表达 [16]。Galan 等 [17] 在小鼠腹部结肠内给予辣椒素 10 min 后，发现脊髓背角快速短暂的 p-NKCC1 变化，并且给予布美他尼后，可以阻断辣椒素引起的疼痛。Mòdol 等 [18] 发现在坐骨神经损伤 2 周后，给予布美他尼可以防止痛觉过敏的出现。另有研究显示 [19]，高渗环境中会激活晶状体上 TRPV1 通道，使大量的 Ca^{2+} 内流，激活 ERK/OSR1 等激酶，进而使 NKCC1 活化。也有研究发现 [20]，辣椒素能引起小鼠脊髓内 Ca^{2+}/CaMKII 的快速激活，使 NKCC1 发生磷酸化。但是有关初级感觉神经元上 NKCC1 的活化是否可以在功能上增强 TRPV1 引起的疼痛，目前还不明了。

本研究结果显示，大鼠足底给予辣椒素激活 TRPV1 后，可能通过非选择性的阳离子通道促使 Ca^{2+} 内流，也可能通过激活神经元细胞内的 Ca^{2+}/CaMKII 或相应的激酶，使 NKCC1 和 p-NKCC1 的蛋白表达增加，同时使 NKCC1 通道蛋白活化。本研究结果还表明，辣椒素组 NKCC1 在 DRG 神经元的核膜上表达增加明显，而 p-NKCC1 在细胞质和细胞膜上的表达增加明显，这可能与 TRPV1 激活后 NKCC1 的转录和翻译增强，新合成 NKCC1 增加，同时使磷酸化后的 p-NKCC1 由核膜转运至细胞质或细胞膜发挥生理功能有关。

不仅如此，本研究电生理结果显示，辣椒素组 DRG 神经元 GABA 激活电流明显增加，同时氯离子荧光探针结果也显示，辣椒素组 DRG 神经元内氯离子浓度明显增高，但预处理布美他尼均能逆转辣椒素激活 TRPV1 后的作用，提示辣椒素激活 TRPV1 后，NKCC1 不仅表达量增加，而且转运 Cl^- 的能力也明显增强，使 DRG 神经元内保持较高水平的 Cl^- 浓度。DRG 神经元内的 Cl^- 浓度升高如何引起辣椒素激活 TRPV1 后的疼痛加剧？推测可能有两方面的原因：第一，在初级感觉传入的外周端，由于 TRPV1 和钙激活氯离子通道相互作用 [4,5]，当 DRG 神经元中 Cl^- 浓度提高时，TRPV1 激活后引起的钙激活氯离子通道开放，Cl^- 外流介导的去极化正反馈作用加强，因而使外周痛觉感受器部位更容易爆发动作电位，产生疼痛。第二，在初级感觉传入的中枢端，初级传入的兴奋到脊髓背角激活抑制性中间神经元，其末梢释放 GABA，正常时 GABA 能神经元作为中间抑制性神经元参与初级感觉传递的调节，可通过 GABA 能神经纤维与初级感觉末梢中枢端形成的突触，降低初级感觉末梢中枢端突触前膜的膜电位，产生初级传入去极化，使突触前膜 Ca^{2+} 内流减少，驱动突触小体融合成突触囊泡释放的兴奋性神经递质减少，发生突触前抑制，产生抑制疼痛作用。但是当 TRPV1 激活后，DRG 神

经元内由于 NKCC1 的活动增加使 Cl^- 浓度大大提升，此时中间抑制性神经元激活释放的 GABA 作用于 $GABA_A$ 受体，开放 Cl^- 通道，Cl^- 外流增加（内向电流加大，见图 5），使初级感觉末梢中枢端突触前膜的膜电位发生急剧的、过度的去极化而达到阈电位引发动作电位，可直至引起背根反射 (dorsal root reflex, DRR)，产生痛敏 [21] 引起疼痛。

综上所述，通过足底注射辣椒素激活 TRPV1，能使 NKCC1 和 p-NKCC1 的蛋白及其功能发生改变。因此，认为 TRPV1 激活后不仅只激活了非选择性的阳离子通道引起疼痛，而且可以活化 NKCC1，使通道开放，提高 DRG 神经元胞体中的 Cl^-（阴离子）浓度，正反馈地加强了 TRPV1 引起的疼痛，表明 TRPV1 和 NKCC1 两者共同对疼痛产生调节。但 TRPV1 激活后对 NKCC1 调节的中间机制还不清楚，仍需要去进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation[J]. Pharmacol Ther, 2010, 125(2):181-195.

[2] Takayama Y, Furue H, Tominaga M. 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anoctamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities[J]. Sci Rep, 2017, 7:43132.

[3] Uta D, Yoshimura M, Koga K. Chronic pain models amplify transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor responses in adult rat spinal dorsal horn[J]. Neuropharmacology, 2019, 160(undefined):107753.

[4] Takayama Y, Uta D, Furue H, *et al*. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons[J]. Proc Natl Acad Sci U.S.A, 2015, 112(16):5213-5218.

[5] Makoto T, Yasunori T. Interaction between TRP and Ca^{2+}-activated chloride channels[J]. Channels, 2014, 8(3):178-179.

[6] Kanaka C, Ohno K, Okabe A, *et al*. The differential expression patterns of messenger RNAs encoding K-Cl cotransporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system[J]. Neuroscience, 2001, 104(4):933-946.

[7] 韩媛媛 , 黄征 , 王艳萍 , 等 . 氯离子转运体在神经病理性疼痛大鼠背根神经节上表达的研究 [J]. 中国疼痛医学杂志 , 2016, 22(8): 583-590.

[8] Pitcher MH, Nieto FR, Cervero F. Stimulation of cutaneous low threshold mechanoreceptors in mice after intracolonic capsaicin increases spinal c-Fos labeling in an NKCC1-dependent fashion[J]. J Pain, 2013, 14(1):57-65.

[9] Valencia-de Ita S, Lawand NB , Lin Q, *et al*. Role of the Na^+-K^+-$2Cl^-$ cotransporter in the development of capsaicin-induced neurogenic inflammation[J]. J.Neurophysiol, 2006, 95(6):3553-3561.

[10] Pogatzki EM, Zahn PK, Brennan TJ. Lumbar catheterization of the subarachnoid space with a 32-gauge polyurethane catheter in the rat[J]. Eur J Pain, 2000, 4(1):111-113.

[11] 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.

[12] He WY, Zhang B, Zhao WC, *et al*. mTOR activation due to APPL1 deficiency exacerbates hyperalgesia via Rab5/Akt and AMPK signaling pathway in STZ-induced diabetic rats[J]. Mol Pain, 2019. doi: 10.1177/1744806919880643.

[13] Norcini M, Sideris A, Martin Hernandez LA, *et al*. An approach to identify microRNAs involved in neuropathic pain following a peripheral nerve injury[J]. Front Neurosci, 2014, 8:266.

[14] 芦碧含 , 张文雯 , 李丽 , 等 . 炎症痛模型大鼠背根神经节神经元动作电位改变 [J]. 中国疼痛医学杂志 , 2015, 21(9):658-661.

[15] Zhang J, Cavanaugh DJ, Nemenov MI, *et al*. The modality-specific contribution of peptidergic and non-peptidergic nociceptors is manifest at the level of dorsal horn nociresponsive neurons[J]. J Physiol (Lond), 2013, 591(4):1097-1110.

[16] Price TJ, Hargreaves KM, Cervero F. Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat [J]. Brain Res, 2006, 1112(1):146-158.

[17] Galan A, Cervero F. Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter[J]. Neuroscience, 2005, 133(1):245-252.

[18] Mòdol L, Cobianchi S, Navarro X. Prevention of NKCC1 phosphorylation avoids downregulation of KCC2 in central sensory pathways and reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury[J]. Pain, 2014, 155(8):1577-1590.

[19] Shahidullah M, Mandal A, Delamere NA. Activation of TRPV1 channels leads to stimulation of NKCC1 cotransport in the lens[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(6):C793-C802.

[20] Fang L, Wu J, Lin Q, *et al*. Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II contributes to spinal cord central sensitization[J]. J Neurosci, 2002, 22(10):4196-4204.

[21] Tan CY, Wang YP, Han YY, *et al*. Expression and effect of sodium-potassium-chloride cotransporter on dorsal root ganglion neurons in a rat model of chronic constriction injury[J]. Neural Regen Res, 2020, 15:912-921.

2020疼痛10期.indd 747 2020/10/25 9:44:18