

脊神经损伤后钠电流的变化及其离子通道机制

任鹏程¹ 张旭东¹ 吕海港¹ 咎玉玲¹ 刘 怡¹ 安丽君^{2△}

(1 第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038; 2 第四军医大学唐都医院风湿免疫科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:检测脊神经切断大鼠背根节(DRG)神经元重复放电能力和钠电流的变化,并研究介导其电流变化的钠通道亚型的表达情况。**方法:**脊神经切断术后2~8 d慢性痛大鼠模型背根节急性分离,对中等直径 DRG 神经元运用全细胞膜片钳技术记录神经元放电和钠电流的变化。对背根节神经元进行 RT-PCR 检测,分析其钠通道亚型的表达情况。**结果:**电流钳下,实验组 DRG 神经元在电流刺激下产生重复放电,而对照组神经元多诱发单个动作电位,电压钳记录发现实验组背根节神经元快钠电流和持续性钠电流幅值均明显大于对照组,PCR 结果显示,Nav1.3、Nav1.7 和 Nav1.8 通道亚型 mRNA 表达显著增高。**结论:**钠通道介导了脊神经受损模型的 DRG 神经元兴奋性增高,持续性钠电流可能通过调节阈下膜电位振荡的产生调节神经元兴奋性。

关键词:背根节;持续性钠电流;钠通道

中图分类号:Q95-3,R683 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-677-03

Change of Sodium Current and Its Ion Channels Mechanism After Spinal Nerve Injury

REN Peng-cheng¹, ZHANG Xu-dong¹, LU Hai-gong¹, JIU Yu-ling¹, LIU Yi¹, AN Li-jun^{2△}

(1 Institute of Orthopedic Oncology of PLA, Xi'an 710038, China;

2 Department of Rheumatology and Immunology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

ABSTRACT Objective: To detect the changes of sodium influx in the transected spinal nerve rats and to investigate the expression of the sodium channel subunits. **Methods:** 2~8d after spinal nerve transection in rats model of chronic pain, the DRG were acutely isolated. The neuron discharge and sodium influx of medium-diameter DRG neurons were detected by the whole cell recording patch clamp technique. The DRG neurons, the expression of sodium channel subunits were detected by RT-PCR. **Results:** the repetitive firing of DRG neurons in experiment was induced under current stimulation, However, the single action potential was induced in control. According to the voltage-clamp recordings, the amplitude of the fast and persistent sodium current of DRG neurons in experiment was both obviously higher than that in control group. Meanwhile, the expression of sodium channel subunits Nav1.3, Nav1.7 and Nav1.8 mRNA was obviously higher. **Conclusions:** The sodium channel increased the excitability of DRG neurons in the spinal nerve, and the persistent sodium current could adjust the excitability of neurons by regulating the subthreshold membrane potential oscillation.

Key words: Dorsal root ganglia; Persistent sodium current; Sodium channel

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R683 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-677-03

前言

外周感觉神经损伤以后,常伴随产生异常感觉,包括痛觉过敏现象。这些异常感觉主要由外周感觉神经的异位自发放电引起^[1,2]。背根节(dorsal root ganglia, DRG)作为外周感觉信号传向中枢的第一站,担当异位自发放电"起搏点"的作用^[3,4]。电压门控钠通道在神经细胞动作电位的形成与传播过程中起着极其重要的调控作用^[5]。近年来,随着研究的深入,对钠通道的亚型和功能有了进一步的认识。越来越多的研究表明,电压门控性钠通道尤其是河豚毒素(TTx)不敏感型钠通道(TTx-resistant, TTX-R)与初级传入神经元的敏化和痛觉产生有着密切的联系^[6,7]。异位自发放电的基础是阈下膜电位振荡(subthreshold membrane potential oscillation, SMPO),但这种振荡的离子通道

基础还不清楚。本研究采用全细胞膜片钳技术观察大鼠脊神经损伤后背根节神经元钠电流的变化及其通道亚型的表达情况,有助于揭示异位自发放电产生的离子通道机制,为深入了解慢性痛信号产生的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

成年 SD 大鼠(150~200g),雌雄不拘(由第四军医大学动物中心提供)。分笼饲养,室温及室内相对湿度分别维持在(22±1)℃和(65±5)%,按照大鼠的生物节律将光照时间维持在每日的 7:00 AM-7:00 PM。将 20 只大鼠随机分为对照组和实验组,为尽量减轻实验中动物的痛苦,所有实验步骤均按照有关实验动物的使用原则操作。

1.2 脊神经损伤模型的制作

在 1%戊巴比妥钠(4 0m g/kg)腹腔注射麻醉下,实验大鼠经备皮、消毒后,按照 Chung 等^[8]描述的方法对大鼠行腰 4 和腰 5 脊神经切断手术。暴露左侧 L4-L5 脊神经,在距离背根节

作者简介:任鹏程(1972-),男,主治医师,主要从事中枢神经损伤保护研究,电话:029-84777356, Email: doctorlhg@163.com

△通信作者:安丽君, Email: anlijun01@yahoo.com

(收稿日期:2010-12-23 接受日期:2011-01-18)

3~4mm 处结扎并切断脊神经。用医用缝合线分层缝合肌肉和皮肤。手术中一切手术器具都经严格消毒。

1.3 DRG 细胞的制备及膜片钳记录

脊神经损伤后 2-8 天,SD 大鼠在戊巴比妥钠 (40mg/kg)麻醉下剪开背部皮肤,沿脊柱去除椎板,暴露 L4-L5 节段,摘取背根节,置于氧饱和的室温人工脑脊液(ACSF)中。在体视显微镜下,剥除 DRG 周围结缔组织及被膜,将组织块置于 2 ml 消化液中 (胰蛋白酶 0.375g/L, 胶原酶 1.125g/L),37℃ 水浴消化 30min 后,取出组织块,放入氧饱和室温 ACSF 中,静置 1~2 h 后开始记录。记录时将 DRG 移至记录用灌流槽内,持续 ACSF 灌流(1.5mL/min),其配方如下(mmol/L):NaCl 150,KCl 5,MgCl₂ 1,CaCl₂ 5,Glucose 10,Hepes 10。细胞贴壁 1h 后进行电生理记录。电极内液配方(mmol/L):Cs F 140,EGTA 1,NaCl 10,Hepes 10。电极阻抗 2~4 MΩ。待电极和细胞间形成大于 1 GΩ 的高阻封接后继续施以负压,将电极内膜片吸破,调节慢电容和串联电阻补偿。保持电位为 -80 mV,此时即可进行钠电流记录。电流钳模式记录时,电极内液(mmol/L):K gluconate 140,MgCl₂ 2,EGTA 1,Hepes 10,Mg-ATP 2。细胞外液配方(mmol/L):NaCl 150,KCl 5,MgCl₂ 1,CaCl₂ 5,glucose 10,Hepes 10。以上实验,封接电阻低于 1 GΩ 的细胞或静息电位低于 -40 mV,记录中电位减明显的细胞放弃。

1.4 RNA 提取及 RT-PCR

TRIzol 法提取 DRG 总 RNA,通过 1.5%的琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA,紫外分光光度计测定 OD 值评估 RNA 含量和纯度,cDNA 合成按照逆转录酶试剂盒(TaKaRa 公司)操作指南进行。反转录在 Bio-Rad 热循环仪中进行,条件为:30℃ 10 min,42℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min。反应产物置 -20℃ 冰箱保存备用。引物合成如表 1 所示。RT-PCR 反应体系包括:2× SYBR Premix Ex TaqTM (大连宝生物公司)10 μl,cDNA 2 μl,1mmol/L 引物各 0.4 μl,dH₂O 7.2 μl。反应在 LightCycler 荧光定量 PCR 仪中进行,反应条件为:95℃ 预变性 10 s,95℃ 30 s,60℃ 60 s,72℃ 60 s,40 个循环,循环结束时检测荧光,与内参基因 HPRT 进行比较,得出不同基因表达相对拷贝数。

1.5 统计学分析

膜片钳实验数据采用 pCLAMP8.0 软件采集,采用 ORIGIN6.0 软件进行数据处理。结果以均数± 标准差(Mean± SE)表示,单因素方差分析进行统计,以 P<0.05 为差异具有统计学意义,用 SPSS11.0 统计学软件包完成。

2 结果

2.1 脊神经损伤对 DRG 神经元诱发重复放电的影响

对 30 个损伤背根神经节神经元和 22 个正常神经元进行了电流钳记录,细胞直径 30~40 μm。细胞平均膜电位水平为 (-51.7± 2.8)mV, 平均的 Cm= (91.6± 4.6)pF,Rm= (85.4± 6.5) mΩ。在电流钳模式下以 500ms,100pA 阶跃式去极化方波刺激 DRG 神经元,诱发产生动作电位。向记录电极内注入去极化方波电流刺激,在多数 DRG 神经元均会引起放电,随着刺激强度的增大,放电数目逐渐增加。正常神经元刺激后多表现为单个动作电位,而脊神经损伤后的 DRG 神经元在较小的刺激强度下即可诱发重复放电(图 1),其刺激阈值明显低于正常神经元。

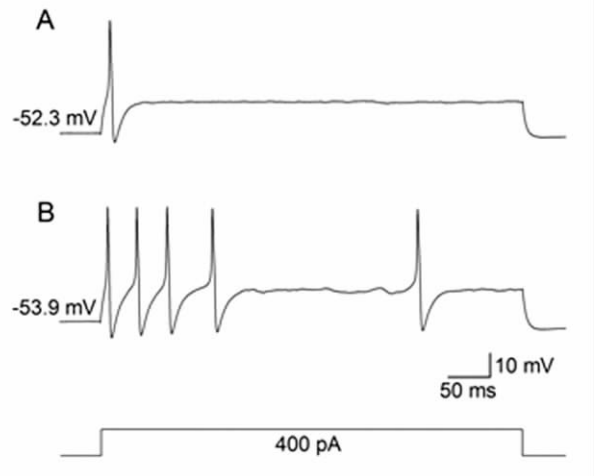


图 1 脊神经损伤对背根节神经元放电的影响:A 正常 DRG 神经元动作电位;B 电流刺激引起脊神经损伤后 DRG 神经元重复放电
Fig.1 Effect of DRG neurons discharge in spinal nerve injury model

2.2 背根节神经元电压依赖性钠电流

本实验选用了 30 个损伤后 DRG 神经元和 20 个正常细胞,采用无钙外液和无钾内液,钳位电压从 -80 mV 到 +20 mV,间隔 10 mV,记录了全细胞电压依赖性钠电流(图 2)。脊神经受损后,背根节神经元钠电流明显增加(P<0.05)。以 -80 mV~-30 mV 斜坡刺激对 DRG 神经元持续性钠电流进行测定,发现脊神经损伤后,持续性钠电流幅值也明显增大(图 3)。

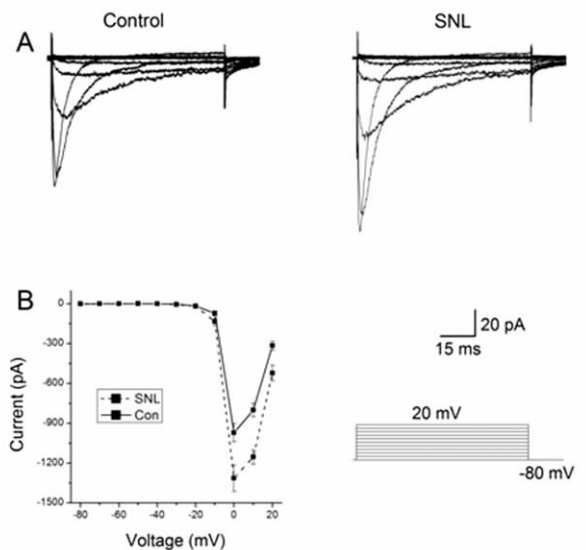


图 2 脊神经损伤后背根节神经元钠电流的变化:A 对照组和损伤组背根节神经元钠电流;B 及神经受损后背根节神经元钠电流幅值明显增加
Fig.2 Change of sodium current in DRG neurons after spinal nerve injury

2.3 脊神经损伤后背根节神经元钠通道表达的变化

除了 Nav1.4 和 Nav1.5 外,其余七种钠通道亚型在背根节神经元均有一定的表达。脊神经损伤后,以 Nav1.3、Nav1.7 和 Nav1.8 升高最为明显,分别升高 2.0、1.0 和 1.5 倍,与正常对照组相比,差异有显著性(P<0.05)。

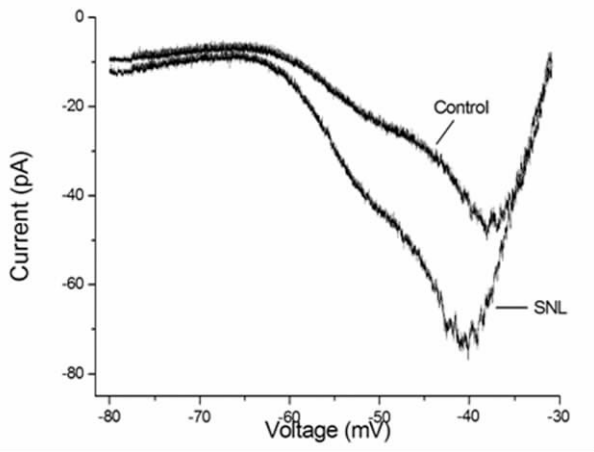


图3 脊神经损伤后背根节神经元持续性钠电流的变化

Fig.3 Change of persistent sodium current in DRG neurons after spinal nerve injury

3 讨论

DRG 神经元是初级感觉传人神经元,感觉信息包括痛觉信息在 DRG 神经元的神经纤维末梢形成,经过 DRG 神经元胞体向上级神经元传递^[8-10]。与正常的 DRG 神经元相比,脊神经切断损伤后的 DRG 神经元,其兴奋性会发生明显改变,正是这种神经元兴奋性的改变介导了动物的感觉痛敏,脊神经损伤后,初级感觉神经元虽然没有受到直接损伤,但同样可以产生兴奋性的改变,引起反应性增强甚至自发放电。

细胞兴奋性的高低与细胞膜钠通道功能状态相关。钠通道广泛分布于可兴奋细胞中,是细胞机能的分子基础之一。它对控制细胞膜兴奋性及动作电位的产生起着至关重要的作用^[11-14]。钠通道亚型有细胞特异性,并且随着发育水平的不同而变化。在病理情况下,钠通道的表达及功能会发生改变。近年来,从哺乳动物克隆出 9 种电压门控钠通道亚型,DRG 胞体上钠电流成分分为三种:(1)快失活,TTX- 敏感的快电流。(2)慢激活和失活的抗 TTX 慢电流,mM 水平的 TTX 对其无阻断作用。(3)失活常数介于上述二者之间的 TTX- 敏感钠电流^[15-17]。

本实验结果表明,脊神经损伤后背根节神经元的快钠电流和持续性钠电流均明显增加,介导快钠电流的 Nav1.3 和介导慢失活电流的 Nav1.7 和 Nav1.8 通道表达也明显高于对照组,钠电流的变化介导了神经元兴奋性的增高。有实验表明,持续性钠电流参与调节背根节神经元的膜电位振荡,在神经元兴奋性变化中起着重要的作用^[18,19]。在脊神经损伤模型,也有较高比率的损伤神经元出现阈下膜电位振荡,这些神经元在静息膜电位水平或轻微去极化时可产生长时间重复放电,而没有振荡的神经元则无该反应^[20]。关于持续性钠电流在脊神经损伤后的作用仍待进一步研究。另外,DRG 神经元存在着多种离子通道,损伤所表现的兴奋性变化应该是也必然是多个通道综合变化的结果,其它通道在神经元兴奋性变化中的作用仍不是分清楚。

参考文献(References)

[1] Yang J, Xing JL, Wu NP, et al. Membrane current-based mechanisms for excitability transitions in neurons of the rat mesencephalic trigemi-

nal nuclei[J]. Neuroscience, 2009, 163: 799-810

- [2] Yang RH, Wang WT, Chen JY, et al. Gabapentin selectively reduces persistent sodium current in injured type-A dorsal root ganglion neurons[J]. Pain, 2009, 143: 48-55
- [3] Schaeffer V, Meyer L, Patte MC, et al. Progress in dorsal root ganglion neurosteroidogenic activity: basic evidence and pathophysiological correlation[J]. Prog Neurobiol, 2010, 92(1): 33-41
- [4] Ernsberger U. Role of neurotrophin signalling in the differentiation of neurons from dorsal root ganglia and sympathetic ganglia[J]. Cell Tissue Res, 2009, 336(3): 349-384
- [5] Xu R, Thomas E A, Jenkins M, et al. A childhood epilepsy mutation reveals a role for developmentally regulated splicing of a sodium channel[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 35(2): 292-301
- [6] O'Callaghan JP, Miller DB. Spinal glia and chronic pain [J]. Metabolism, 2010, 59(1): 21-26
- [7] Le Chapelain L, Perrouin VB, Fattal C, et al. Chronic neuropathic pain in spinal cord injury patients: what relevant additional clinical exams should be performed? [J] Ann Phys Rehabil Med, 2009, 52 (2): 103-110
- [8] Stein C, Clark JD, Oh U, et al. Peripheral mechanisms of pain and analgesia[J]. Brain Res Rev, 2009, 60(1): 90-113
- [9] Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. Contribution of the activation of satellite glia in sensory ganglia to pathological pain [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2009, 33(6): 784-792
- [10] Scholz J, Woolf CJ. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia[J]. Nat Neurosci, 2007, 10(11): 1361-1368
- [11] Mathie A. Ion channels as novel therapeutic targets in the treatment of pain[J]. J Pharm Pharmacol, 2010, 62(9): 1089-1095
- [12] Schaible HG. Epidemiology and pathophysiology of pain--new targets for pain therapy[J]. Med Monatsschr Pharm, 2009, 32(5): 164-171
- [13] Matulenko MA, Scanio MJ, Kort ME. Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of chronic pain [J]. Curr Top Med Chem, 2009, 9(4): 362-376
- [14] Rigoard S, Wager M, Buffenoir K, et al. Major mechanisms involved in the synaptic transmission of the neuromuscular apparatus [J]. Neurochirurgie, 2009, 55(1): 22-33
- [15] Maier LS. A novel mechanism for the treatment of angina, arrhythmias, and diastolic dysfunction: inhibition of late I (Na) using ranolazine[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2009, 54(4): 279-286
- [16] Saint DA. The cardiac persistent sodium current: an appealing therapeutic target?[J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(6): 1133-1142
- [17] Hains BC, Waxman SG. Sodium channel expression and the molecular pathophysiology of pain after SCI [J]. Prog Brain Res, 2007, 161: 195-203
- [18] Yang RH, Wang WT, Chen JY, et al. Gabapentin selectively reduces persistent sodium current in injured type-A dorsal root ganglion neurons[J]. Pain, 2009, 143: 48-55
- [19] Basić-Kes V, Zavoreo I, Bosnar-Puretić M, et al. Neuropathic pain[J]. Acta Clin Croat, 2009, 48(3): 359-365
- [20] Kovalsky Y, Amir R, Devor M. Simulation in sensory neurons reveals a key role for delayed Na⁺ current in subthreshold oscillations and ectopic discharge: implications for neuropathic pain [J]. J Neurophysiol, 2009, 102(3): 1430-1442