

· 论 著 ·

大鼠前列腺炎模型中 $L_6 \sim S_1$ 背根神经节 TRPV1 和 NGF 的表达

陈 勇, 张建华, 赵 涛, 孙 伟

(重庆市涪陵中心医院泌尿外科 408000)

摘 要:目的 观察大鼠前列腺炎疼痛模型中 $L_6 \sim S_1$ 节段背根神经节(DRG)瞬时感受器电位香草酸受体 1(TRPV1)和神经生长因子(NGF)的表达变化。方法 取 30 只 SPF 雄性 Wistar 大鼠随机分为实验组和对照组,分别设 0、7、14 d 3 个时相,共 6 组,每组 5 只,通过前列腺完全弗氏佐剂和生理盐水注射制作大鼠前列腺炎模型和对照组,解剖 $L_6 \sim S_1$ 节段 DRG 组织行蛋白质印迹和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TRPV1 和 NGF 的表达。结果 慢性前列腺炎大鼠中 $L_6 \sim S_1$ 节段 DRG 的 TRPV1 和 NGF 表达在 7 d 和 14 d 高于对照组和 0 d 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);TRPV1 表达在 7 d 和 14 d 组间差异无统计学意义($P > 0.05$);NGF 表达 14 d 低于 7 d($P < 0.05$)。结论 慢性前列腺炎导致的跨器官痛觉致敏与腰骶段 DRG 神经元的 TRPV1 和 NGF 高表达密切相关。

关键词:前列腺炎;瞬时感受器电位香草酸受体 1;跨器官痛觉致敏;神经生长因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.04.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)04-0325-02

Express of TRPV1 and NGF in $L_6 - S_1$ dorsal root ganglia of chronic prostatitis model in rats

Chen Yong, Zhang Jianhua, Zhao Tao, Sun Wei

(Department of Urology, Fuling District Central Hospital, Chongqing 408000, China)

Abstract:Objective To investigate the express of TRPV1(transient receptor potential vanilloid-1) and NGF(nerve growth factor)in $L_6 - S_1$ dorsal root ganglia(DRG)of chronic prostatitis model in rat. **Methods** The rat prostatitis model was made by injecting CFA to prostate. The alteration of the express of TRPV1 and NGF in $L_6 - S_1$ DRG were observed by Western blot and RT-PCR. **Results** The express of TRPV1 in $L_6 - S_1$ DRG of chronic prostatitis model on 7,14 d was significantly higher than that of control group($P < 0.01$),whereas,the express of TRPV1 on 7,14 d had no obvious difference. **Conclusion** Up-regulation of TRPV1 and NGF in $L_6 - S_1$ DRG may play an important role in cross organ sensitization following chronic prostatitis.

Key words:prostatitis;transient receptor potential vanilloid-1;cross-sensitization;nerve growth factor

跨器官痛觉致敏是近年提出的关于内脏疼痛的一个新理论^[1-2],即一个病变内脏器官的疼痛继发性引起另一个相邻器官痛觉敏化,进而导致后者功能异常。研究发现,慢性前列腺炎疼痛呈现跨器官痛觉致敏的特点,推测前列腺炎疼痛产生机制可能与跨器官痛觉致敏有关,而背根神经节(dorsal root ganglion,DRG)神经元瞬时感受器电位香草酸受体 1(transient receptor potential vanilloid-1,TRPV1)的过度表达是跨器官痛觉致敏产生的主要原因^[2-3]。本实验通过制作大鼠前列腺炎模型^[4],观察腰骶段 DRG TRPV1 和神经生长因子(nerve growth factor,NGF)的表达,以了解 DRG 继发性改变在慢性前列腺炎疼痛中的作用。

1 材料与方

1.1 材料 完全氟氏佐剂(CFA)购自 Sigma 公司,抗 TRPV1 和抗 NGF 抗体购自武汉博士德公司,二抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的分组与 DRG 标本制备 雄性成年 SPF Wistar 大鼠 30 只,体质量 200 g 左右(重庆医科大学实验动物中心提供),随机分为实验组和对照组,两组分别设 0、7、14 d 3 个时相,共 6 组。实验组在大鼠下腹正中做一长约 1 cm 的小切口,显露前列腺,前列腺内注射完全弗氏佐剂 20 μ L,对照组注射等量生理盐水,关闭切口。继续饲养 0、7、14 d 后分别用于实验。将达到实验天数的实验组和对照组大鼠分别断头处死,解剖获取 $L_6 \sim S_1$ 节段 DRG,准确称取湿质量。

1.2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TRPV1、NGF mRNA 表达 准确称质量后,提取总 RNA[参照 Tripure 说明书进行,所有使用器皿均经焦碳酸二乙酯(DEPC)或高温干烤去 RNA 酶处理],RT-PCR 按试剂盒(上海 Promega 公司)说明书进行。选用 β -actin 作为内参照物。PCR 引物序列: β -actin 上游引物:5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3',下游引物:5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3',扩增片段长度 150 bp;TRPV1 上游引物序列为 5'-GCC CAA CGA AGA AAA CCA TAA-3',下游引物序列为 5'-ACA CGC TCA GCT CCC CAC-3',扩增片段长度 188 bp;NGF 上游引物序列 5'-TGG CGG TCT TTT TTC GTT-3',下游引物序列为 5'-GCA TTG CCT CCT TGA TTT GG-3',扩增片段长度 114 bp。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退水 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用 Quantity One 4.4 软件分析各产物条带光密度(OD)值,计算 TRPV1、NGF mRNA 的相对表达量。

1.2.3 蛋白质印迹检测 TRPV1、NGF 蛋白表达 10%SDS 和乙醇清洗 SDS-PAGE 电泳装置,制备 12% 的分离胶和 4% 浓缩胶,取一定量的蛋白标本 TRPV1 40 μ g 和上样缓冲液 1:1 混合,准确上样后进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶 80 V,分离胶 120 V,取适当大小的凝胶和相同大小的 PVDF 膜在 50 V 电压下转膜,观察转膜效果,PVDF 膜置于 5% 去脂奶粉中封闭,依次加入一抗 TRPV1(1:400)、抗 NGF(1:400),二抗(1

: 1 000)杂交,室温下振荡封闭,化学发光显色,用 Quantity One4. 4 软件分析图像,采用积分吸光度值(IA)相对比较蛋白的表达。

1.3 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计分析软件对数据进行随机区组间方差分析(MANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TRPV1 表达 大鼠 $L_6 \sim S_1$ 节段 DRG 中 TRPV1 的 mRNA 及蛋白表达量比较,实验组 7 d 与 14 d 比较显著高于对照组和实验组 0 d ($P < 0.01$);实验组 7 d 与 14 d 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1、2。

表 1 各组大鼠 $L_6 \sim S_1$ DRG 神经元表达 TRPV1 mRNA 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	7 d	14 d
实验组	0.411±0.021	0.789±0.065*▲	0.783±0.037*▲
对照组	0.408±0.025	0.483±0.043	0.491±0.042

*: $P < 0.01$,与对照组比较;▲: $P < 0.01$,与 0 d 比较。

表 2 各组大鼠 $L_6 \sim S_1$ DRG 神经元表达 TRPV1 蛋白的变化 ($\bar{x} \pm s$, IOD)

组别	0 d	7 d	14 d
实验组	10.23±1.42	20.05±1.86*▲	19.48±1.95*▲
对照组	10.38±1.11	13.17±1.63	12.34±1.42

*: $P < 0.01$,与对照组比较;▲: $P < 0.01$,与 0 d 比较。

2.2 NGF 表达 大鼠 $L_6 \sim S_1$ 节段 DRG 中 NGF 的蛋白及 mRNA 表达量比较,实验组 7 d 和 14 d 显著高于对照组和实验组 0 d ($P < 0.01$);实验组 14 d 低于实验组 7 d ($P < 0.05$),见表 3、4。

表 3 各组大鼠 $L_6 \sim S_1$ DRG 神经元表达 NGF mRNA 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	7 d	14 d
实验组	0.431±0.032	0.719±0.046*▲	0.582±0.019*▲◆
对照组	0.427±0.025	0.438±0.068	0.489±0.054

*: $P < 0.01$,与对照组比较;▲: $P < 0.01$,与 0 d 比较;◆: $P < 0.05$,与 7 d 比较。

表 4 各组大鼠 $L_6 \sim S_1$ DRG 神经元表达 NGF 蛋白的变化 ($\bar{x} \pm s$, IOD)

组别	0 d	7 d	14 d
实验组	9.77±1.20	19.85±1.51*▲	15.47±2.18*▲◆
对照组	9.87±1.10	12.46±1.29	12.12±1.13

*: $P < 0.01$,与对照组比较;▲: $P < 0.01$,与 0 d 比较;◆: $P < 0.05$,与 7 d 比较。

3 讨 论

慢性前列腺炎病因尚不十分清楚,治疗较为棘手,疼痛为其主要表现,也是患者就诊的主要原因^[5]。前列腺疼痛不只局限于前列腺部位,而是分布在整个腰骶神经支配区,在没有原发病变的其他部位也可能出现自发疼痛;而且临床上有些前列腺疼痛在前列腺炎消失后疼痛仍然存在。目前对疼痛产生的机制尚不清楚。

跨器官痛觉致敏是近年提出的关于内脏疼痛的一个新理论^[1,3],即一个病变内脏器官的疼痛继发起另一个相邻器官痛觉敏化,进而导致后者功能异常。脊髓前、脊髓、脊髓上(大脑)的 3 段不同但相互关联的神经通路构成盆腔跨器官痛觉致敏的解剖基础^[1,6];这 3 段通路共同对盆腔器官的跨器官痛觉致敏起作用。目前认为脊髓前(背根神经节)起主要作用,同时对其研究较多^[1-3],通常认为跨器官痛觉致敏外周通路的解剖基础是 DRG 神经元通过分支轴突联结到不同盆腔结构。

跨器官痛觉致敏理论的提出为阐明 CP/CPPS 疼痛的发生机制提供了一条崭新思路^[3]。慢性前列腺炎疼痛具备跨器官痛觉致敏的特点,而且作者前期研究发现腰骶段 DRG 神经元有分支同时投射到前列腺与盆底、会阴部^[7],也即前列腺与盆腔器官存在跨器官痛觉致敏产生的解剖学基础。因此,作者认为慢性前列腺炎疼痛产生与跨器官痛觉致敏密切相关,具体信号传导通路需进一步研究。

TRPV1 广泛分布于初级感觉神经元末梢的伤害性感受器上,现已证明其参与炎症和痛觉过敏的形成^[2,6]。TRPV1 是一种非选择性阳离子通道,参与初级感觉神经元外周末端中伤害性刺激分子整合,可探测和整合诱发痛觉的化学和热刺激信号,主要有辣椒素(红辣椒的辛辣成分)、伤害性热($>43^{\circ}\text{C}$)及质子等。TRPV1 的活性可以通过 NGF、缓激肽等刺激来启动细胞内瀑布信号转导,以这种方式,NGF、缓激肽就能降低 TRPV1 阈值,以至在正常的情况下允许通道开放,从而诱导痛觉过敏^[8]。TRPV1 主要分布于背根神经节和三叉神经节,在前列腺与膀胱主要分布在上皮细胞和上皮下的初级感觉传入纤维浆膜表面^[9],其主要生理功能是参与排尿反射,病理情况下与膀胱炎性痛、痛觉过敏以及膀胱刺激症有关。Miller 等^[10]报道慢性前列腺炎患者前列腺液的 NGF 浓度与患者的 NIH-CPSI 的疼痛评分成正相关,而 NGF 是一种炎症痛觉过敏的关键因子^[11]。因此,作者推测 NGF 与 TRPV1 在慢性前列腺炎疼痛起重要作用。

CFA 常用于制作疼痛模型,其原理是以结核杆菌等复合物作为抗原的迟发性过敏反应或自身免疫性疾病,急性期主要为炎症性痛,慢性期主要为神经源性痛^[4]。本实验通过大鼠前列腺注射 CFA 制作慢性前列腺炎疼痛模型,发现腰骶段 DRG 神经元 NGF 的表达在 7 d 达到高峰,14 d 时表达有所下降;而 TRPV1 在 7 d 和 14 d 呈现持续高表达。作者前期工作发现,前列腺注射 CFA,前列腺炎反应在 7 d 时较为明显,但在 14 d 时炎症反应明显减轻^[12],从而说明 NGF 表达随前列腺炎消退而降低,但 TRPV1 表达并不随前列腺炎的消退而降低,TRPV1 持续的高表达与慢性前列腺炎疼痛的维持与泛化密切相关。Amaya 等^[8]发现炎症反应时,DRG 的 NGF 表达增加可以引起 TRPV1 表达增加,并进一步引起痛觉过敏。因此推测,慢性前列腺炎患者的前列腺液 NGF 浓度增加^[10],激活初级感觉神经元外周末端 A δ 和 C 纤维,信息上传至 DRG,上调 DRG 神经元 TRPV1 表达,开放离子通道,通过 DRG 会聚神经元轴突反射引起跨器官痛觉致敏,但 NGF 和 TRPV1 在 DRG 的信号传递通路尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Malykhina AP. Neural mechanisms of pelvic organ cross-sensitization[J]. Neuroscience,2007,149(下转第 329 页)

药物浓度增加,药物的分布容积加大有关。而输注速度过快,时间过长,则可能导致血压下降,心率减慢。本实验中,维持剂量达到 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 时,血压下降明显,心率减慢,这与外周血管阻力下降、心肌抑制、心输出量减少以及抑制压力感受器对低血压的反应有关^[14-15]。本文结果显示,在儿童全麻中,使用 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 丙泊酚,按照 15、10、8 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 维持麻醉是可行的,结合镇痛药和肌松药并适时按照 BIS、心率、血压等指标调整剂量以适应手术需要,维持适当的应激反应,以保持内稳态的平衡,可减少并发症。

参考文献:

- [1] Murat I, Billard V, Vernois J, et al. Pharmacokinetics of propofol after a single dose in children aged 1—3 years with minor burns. Comparison of three data analysis approaches[J]. *Anesthesiology*, 1996, 84(3):526-532.
- [2] 顾洪斌, 陈煜. 全麻下儿童丙泊酚的药代动力学特征[J]. *临床麻醉学杂志*, 2007, 23(6):463-465.
- [3] Allegaert K, de Hoon J, Verbesselt R, et al. Maturational pharmacokinetics of single intravenous bolus of propofol [J]. *Paediatr Anaesth*, 2007, 17(11):1028-1034.
- [4] Peeters MY, Allegaert K, Blussé van Oud-Alblas HJ, et al. Prediction of propofol clearance in children from an allometric model developed in rats, children and adults versus a 0.75 fixed-exponent allometric model[J]. *Clin Pharmacokinet*, 2010, 49(4):269-275.
- [5] Mahmood I. Prediction of drug clearance in children: impact of allometric exponents, body weight, and age[J]. *Ther Drug Monit*, 2007, 29(3):271-278.
- [6] 王祥瑞, 孙大金, 杭燕南, 等. 异丙酚血液浓度与临床效应

[J]. *中华麻醉学杂志*, 1996, 16(7):292-294.

- [7] Tufano R, Palomba R, Lambiase G, et al. The utility of bispectral index monitoring in general anesthesia[J]. *Minerva Anestesiol*, 2000, 66(5):389-393.
- [8] Hannallah RS, Baker SB, Casey W, et al. Propofol: effective dose and induction characteristics in unpremedicated children[J]. *Anesthesiology*, 1991, 74(2):217-219.
- [9] Westrin P. The induction dose of propofol in infants 1—6 months of age and in children 10-16 years of age[J]. *Anesthesiology*, 1991, 74(3):455-458.
- [10] 刘华程, 上官王宁, 连庆泉, 等. 小儿异丙酚药代动力学及其靶控输注[J]. *实用医学杂志*, 2005, 21(4):437-438.
- [11] Raoof AA, van Obbergh LJ, Verbeeck RK, et al. Propofol pharmacokinetics in children with biliary atresia[J]. *Br J Anaesth*, 1995, 74(1):46-49.
- [12] McFarlan CS, Anderson BJ, Short TG. The use of propofol infusions in paediatric anaesthesia: a practical guide [J]. *Paediatr Anaesth*, 1999, 9(3):209-216.
- [13] Schüttler J, Ihmsen H. Population pharmacokinetics of propofol: a multicenter study[J]. *Anesthesiology*, 2000, 92(3):727-738.
- [14] 赵俊. 新编麻醉学[M]. 北京:人民军医出版社, 2000:299-299.
- [15] Sato M, Tanaka M, Umehara S, et al. Baroreflex control of heart rate during and after propofol infusion in humans [J]. *Br J Anaesth*, 2005, 94(5):577-581.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)

(上接第 326 页)

- (3):660-672.
- [2] Peng HY, Chang HM, Lee SD. TRPV1 mediates the uterine capsaicin-induced NMDA NR2B-dependent cross-organ reflex sensitization in anesthetized rats [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 295(5):1324-1335.
- [3] 陈勇, 吴小候, 秦潮. 盆腔内跨器官痛觉致敏产生机制的研究进展[J]. *生理科学进展*, 2010, 41(1):65-68.
- [4] 唐伟, 宋波, 卢根生, 等. 树酯毒素抑制大鼠前列腺神经肽表达的实验研究[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(24):2456-2458.
- [5] Michele PM. Chronic prostatitis syndrome: a common, but poorly understood condition[J]. *Updates Series*, 2007(5):1-15.
- [6] Peng HY, Chen GD, Tung KC, et al. Colon mustard oil instillation induced cross-organ reflex sensitization on the pelvic-urethra reflex activity in rats [J]. *Pain*, 2009, 142(1):75-88.
- [7] Chen Y, Song B, Jin XY, et al. Possible mechanism of referred pain in the perineum and pelvis associated with the

prostate in rats[J]. *J Urol*, 2005, 174(6):2405-2408.

- [8] Amaya F, Shimosato G, Nagano M, et al. NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia[J]. *Eur J Neurol*, 2004, 20(9):2303-2310.
- [9] Stein RJ, Santos S, Nagatomi J, et al. Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract[J]. *J Urol*, 2004, 172(3):1175-118.
- [10] Miller LJ, Fischer KA, Goralnick SJ, et al. Nerve growth factor and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *Urology*, 2002, 59(4):603-608.
- [11] Ji RR, Samad TA, Jin SX, et al. p38MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia [J]. *Neuron*, 2002, 36(1):57-68.
- [12] Chen Y, Wu XH, Liu J, et al. Distribution of convergent afferents innervating bladder and prostate at dorsal root ganglia in rats[J]. *Urology*, 2010, 76(3):764e1-764e6.

(收稿日期:2011-03-03 修回日期:2011-07-20)