

分类号:
学 号: 2012109106

密 级: 公 开
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



炎性痛模型鼠 DRG 神经元动作电位改变

学 位 申 请 人	芦碧含
指 导 教 师	司军强
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	麻醉学
研 究 方 向	疼痛机制
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2015年05月

分类号：
学 号：2012109106

密 级：
单位代码：10729

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



炎性痛模型鼠 DRG 神经元动作电位改变

学 位 申 请 人	芦碧含
指 导 教 师	司军强
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	麻醉学
研 究 方 向	疼痛机制
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子

2015年05月

**The change of action potential in inflammatory pain model
rat DRG neurons**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Lu Bihan

(Anesthesia)

SiJunqiang

Supervisor

May, 2015

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：



时间： 2015 年 6 月 8 日

使用授权声明

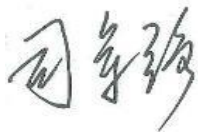
本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间： 2015 年 6 月 8 日

导师签名：



时间： 2015 年 6 月 8 日

摘要

目的：探讨炎性痛模型鼠 L5-L6 背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)神经元中、小型细胞动作电位各参数的改变。

方法：1) 实验分组及模型建立：同型 Sprague Dawley 大鼠共 16 只，雌雄不计，随机数字表法分为 2 组：福尔马林组 (n=8)：取 5%福尔马林 100 μ l 注射于右后足掌心处；正常动物对照组 (n=8)：右后足掌心注射等量生理盐水。采用 Abbott 等^[3]方法即刻用秒表记录 1 h 中每 5 min 间隔内缩、舔足等自发痛行为的累计时间。2) 神经元进行动作电位 (action potential, AP) 记录：大鼠单侧足底皮下注射福尔马林试剂致痛后，急性分离的大鼠腰 5、腰 6 背根神经节，使用酶机械分离的方法分离单个神经元细胞。采用电流钳技术对中小型 (直径<40 μ m) DRG 神经元进行动作电位记录，即分别统计中小型 DRG 神经元静息电位 (RP)、DRG 神经元动作电位阈值 (APT)、DRG 神经元动作电位峰值 (APP)、DRG 神经元动作电位半峰时间 (APD₅₀)。

结果：1) 福尔马林模型鼠炎性痛行为学改变：将福尔马林注射于大鼠右后肢足底皮下后，立即足底出现红肿，抬起、翻转、抖动患足等表现，行动中患足产生缓行、跛行、蹒跚，并伴尖叫、舔、咬患足等自发痛行为。全过程明显出现两期反应：第一阶段注射后立即出现，持续 10 min 左右。经过 5 min 间歇期，开始第二阶段疼痛期，持续约 40 min。而非注射足与对照组注射足行动正常，无舔足、抬腿，跛行等疼痛行为。2) 神经元静息电位 (RP) 记录：福尔马林组 DRG 神经元静息电位 (RP) 为 -52.55 ± 1.15 mV (n=8)，正常对照组静息电位 (RP) 为 -53.17 ± 2.52 mV (n=7)，二者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3) 神经元动作电位阈值 (APT) 记录：福尔马林组 DRG 神经元动作电位阈值 (APT) 为 -25.31 ± 0.47 mV (n=8)，正常对照组 DRG 神经元动作电位阈值 (APT) 为 -20.36 ± 0.46 mV (n=7)，二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。4) 神经元动作电位峰值 (APP)：福尔马林组 DRG 中小型神经元动作电位峰值 (APP) 为 72.43 ± 1.60 mV (n=8)，正常对照组 DRG 中小型神经元动作电位峰值 (APP) 为 85.96 ± 5.51 mV (n=7)，二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。5) 神经元动作电位半峰时间 (APD₅₀)：福尔马林组大鼠 DRG 神经元动作电位半峰时间 (APD₅₀) 为 6.40 ± 0.21 ms (n=8)，而正常对照组大鼠 DRG 神经元动作电位半峰时间 (APD₅₀) 为 6.04 ± 0.95 ms (n=7)，两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

结论：炎性痛的出现由初级感觉神经元的兴奋性增加所致。

关键词：背根神经节；炎症性疼痛；动作电位；全细胞电流钳技术

研究类型：A (基础研究)

Abstract

Objective: To explore the change of action potential in the periphery dorsal root ganglia (DRG) of the inflammation pain model rat.

Methods: 1) experimental groups and model :16 Sprague Dawley rats are randomly divided into two groups. Formalin group (n=8) : Injecting 100 μ l of 5% formalin into the palm of the right hind leg .Normal saline group (n=8): Injection the same saline into the right hind leg palm. By using Abbott and other methods^[4] immediately record the cumulative paw licking time in every 5 minutes of 1 hour. 2) Recording the action potential(AP): By using the current clamp technique to record the action potential (action in acute isolated rat L5 lumbar 6 dorsal root ganglion neurons, namely statistically compare the rest potential(RP), the action potential threshold(APT), the peak of action potential(APP), the half duration of action potential(APD₅₀) .

Result: 1) behavior changes of model rats: after subcutaneous injection of formalin into right hind foot, rats immediately occurred the spontaneous pain behavior such as swelling , lift, turn claw action bumps limbs, lameness, and licking, biting of the injected foot. Obviously there were two phases of the whole process of reactions: the first stage occurs immediately after injection, last about 5 min; 10 min after the interim period, beginning the second phase of the pain, which lasted about 40 min. And not enough action injected normal, there were no licking, leg, limping and other acts in the normal group. 2) neuronal resting potential (RP) record: Formalin group DRG neurons resting potential (RP) was -52.55 ± 1.15 mV (n = 8), the normal control group of animals resting potential (RP) is -53.17 ± 2.52 mV (n = 7), the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). 3) neuronal action potential (AP) threshold (APT) records: showed that formalin group DRG neurons action potential threshold (APT) was -25.31 ± 0.47 mV (n = 8), normal animals in the control group DRG neurons action potential threshold (APT) was -20.36 ± 0.46 mV (n = 7), the difference was statistically significant ($P < 0.01$). 4) neuronal action potential (AP) peak (APP): Formalin group of small and medium DRG neurons AP peak (APP) was 72.43 ± 1.60 mV (n = 8), normal animals in the control group of small and medium DRG neurons AP Peak (APP) was 85.96 ± 5.51 mV (n = 7), the difference was statistically significant ($P < 0.01$). 5) neuronal action potential half-peak time (APD₅₀): Formalin rat DRG neurons action potential half-peak time (APD₅₀) was 6.40 ± 0.21 ms (n = 8), and rat DRG normal animals in the control group neuronal action potential half-peak time (APD₅₀) was 6.04 ± 0.95 ms (n = 7), the difference was not statistically significant ($P > 0.05$).

Conclusion: Inflammatory pain is due to the increasing of the excitability of primary sensory neurons .

Keywords: Inflammatory pain, action potential, dorsal root ganglion, whole-cell current-clamp

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
英文缩略语表.....	III
前 言.....	1
材料与方法.....	4
1 材料.....	4
1.1 实验动物.....	4
1.2 实验试剂及材料.....	4
1.3 实验仪器.....	6
2 方法.....	6
2.1 实验动物分组.....	6
2.2 注射福尔马林建立炎性疼痛模型.....	6
2.3 模型大鼠行为学观察.....	7
2.4 背根神经节神经元急性分离.....	7
2.5 全细胞膜片钳技术记录动作电位改变.....	7
3 数据统计及技术路线.....	8
实验结果.....	9
1 福尔马林致痛模型鼠痛行为学变化.....	9
2 动作电位改变.....	9
2.1 不同实验组大鼠 DRG 神经元动作电位.....	9
2.2 静息电位变化.....	10
2.3 动作电位阈值变化.....	10
2.4 动作电位峰值变化.....	11
2.5 动作电位半峰时间变化.....	12
2.6 动作电位各参数变化.....	13
讨 论.....	14
结论和展望.....	18
1 结论.....	18
2 展望.....	18
参考文献.....	19
文献综述.....	23
致 谢.....	37
作者简介.....	38
导师评阅表.....	39

英文缩略词

List of Abbreviations

英文缩写	英文名称	中文名称
DRG	dorsal root ganglion	背根神经节
IASP	International Association for the study of Pain	国际疼痛研究会
SMPO	subthreshold membrane potential oscillation	阈下膜电位震荡
AP	action potential	动作电位
RP	rest potential	神经元静息电位
APT	threshold of action potential	神经元动作电位阈值
APP	peak amplitude of action potential	动作电位峰值
APD ₅₀	action potential duration	动作电位半峰时间
CCD	chronic compression of dorsal root ganglion	慢性背根神经节压迫模型
WDR	wide dynamic range	脊髓背角广动力范围
CCD	chronic compression of DRG	背根神经节慢性压迫损伤模型
Kv	Voltage-gated potassium	电压依赖性钾通道
BK _{Ca}	Large conductance Ca ²⁺ activated K ⁺ channels	大电导钙激活钾通道

前 言

(Introduction)

国际疼痛研究会 (IASP) 将疼痛 (pain) 定义为“一种与组织损伤或潜在的损伤相关的不愉快的主观感觉和情感体验”^[4]。研究发现, 通过激活部分高阈值周围神经的神经元, 即伤害感受器, 能够产生伤害性感觉, 从而实现有毒害或是对组织有损伤作用的刺激形成监测。痛觉是一种能对环境中潜在或者已经存在的伤害性刺激产生感知的能力, 这种能力极为重要的。如果缺失这种能力, 如先天性痛觉异常的病人, 由于无法感知疼痛而长期受到持续性组织损伤的困扰。在出现炎症、外伤、神经损伤时, 感觉神经系统将会出现明显的感觉应激变化, 通过级联放大反应以及增加感受器对外周刺激的敏感性, 使得感受器对正常无害甚至低于产生伤害性信号的刺激也表现出一定程度的痛觉反应。临床上疼痛往往是多种疾病的最初症状, 并且表现为复杂多变的生理心理活动, 其蕴含极其复杂而难解的机制使疼痛的研究成为了医学探讨的热点及难点。虽然人们对于疼痛已经进行了大量的科学研究, 不过关于疼痛发生的机制一直没有得到全面的解决。其发生机制众多且复杂, 尽管使用先进的药理学研究技术以及基因敲除技术发现了与疼痛相关的基因^[5], 但由于研究疼痛模型的同时, 细胞内还存在多种因素干预疼痛的发生过程, 因此关于疼痛的研究还需要综合多方面因素全面的考虑。

疼痛的分类方法很多, 依照发病原因对病理性疼痛进行分类可以分为关节炎性痛、糖尿病神经痛, 神经病理性痛、癌性痛等。其中大部分疼痛现象都有炎性物质诱发或参与其发展过程, 这种炎性痛在临床上十分普遍。诱发炎性痛产生的物质包括各类化学物质、外伤、细菌、病毒等。目前, 研究炎性痛的动物模型很多, 包括福尔马林模型、佐剂关节痛模型、辣椒素致痛模型、角叉菜胶模型、蜂毒模型、完全弗氏佐剂模型等, 福尔马林模型表现为特有的双相疼痛现象, 可以很好的模拟急性损伤以及其导致的持续性疼痛状态, 使其很早就被应用于镇痛药物研发以及炎性痛机制的研究中^[6]。

伤害性感受器是散在分布于身体表面的神经末梢, 负责感受各种刺激信息, 对其进行初级编码整合, 将信息继续沿神经纤维上传至高级感觉神经元最终实现对痛觉的传导。而背根神经节 (dorsal root ganglia DRG) 是由疼痛传入通路中的初级感觉神经纤维在椎间孔处汇集成的膨大部位, 近年来对其研究更加深入。由于其既包含多种受痛觉信号调节的神经递质、调质以及多种位于突触前起调节作用的受体, 所以背根神经节对于疼痛感觉的传导起重要的调节作用。痛觉信号传导过程中, 机械能、化学能及热能作用于伤害感受器被转换为特殊的电信号, 其过程经过神经元相互之间的联系以及突触水平上的信息传递, 通过电信号转换为神经递质的释放^[7]等, 依次通过第二级神经元脊髓背角的感觉神经元和第三级丘脑感觉神经元的传递, 最终运送到大脑皮层感觉神经元。

神经纤维通过位于背根神经节的神经元将感觉信息向脊髓端输入中枢神经系统。这些神经元轴突分布于周围神经组织，通过背根分布脊髓背角。而感觉纤维通常按照其传导速度，直径以及是否有髓鞘包绕以及对传导不同性质（温度的，机械的，化学的）及强度（有害，无害）的感觉刺激进行分类。 $A\alpha$ 和 $A\beta$ 纤维直径最大，并且被髓鞘紧密包绕，传导动作电位的速度最快。这两种神经细胞大部分受低强度机械刺激（无害刺激）并且不会参与伤害性刺激强度（intensity）的编码。 $A\delta$ 神经纤维直径较小，传导速度稍慢，部分被髓鞘包绕并且负责传导伤害性的温度及机械刺激。 C 神经纤维直径最小，无髓鞘包绕，并且传导速度最慢。大部分的 C 纤维可以单独被伤害性温度或者机械刺激激活。但某些 C 纤维还可以编码非伤害性的温度（冷或热）信息或被低强度的机械刺激激活，并且还对 TRPV1 通道的激动剂-辣椒素敏感^[8]。根据背根神经节内细胞直径将 DRG 神经元分大、中、小三类：其中直径大于 $40\ \mu\text{m}$ 的为大细胞，直径小于 $30\ \mu\text{m}$ 的为小细胞，直径在两者之间的中细胞。小细胞主要发出无髓鞘的 C 类轴突纤维；中细胞负责发出有髓鞘的 $A\delta$ 轴突纤维；而大细胞发出有髓鞘的 $A\beta$ 轴突纤维。以上三种细胞分别简称 C 、 $A\delta$ 、 $A\beta$ 神经元^[36]。

外周敏化（peripheral sensitization）的出现建立在高阈值的伤害性感受器的阈值降低等现象的基础之上。正如在手术切割后，在损伤处出现大量的化学物质释放，并且还有大量的炎性物质由未受损处释放并随血液循环到达损伤部位。分布于损伤区域的小直径初级传入神经 $A\delta$ 和无髓 C 神经纤维进入一种进行性放电状态，低强度刺激就可以诱发兴奋现象的发生即痛觉敏化。当痛觉纤维发生敏化后，其对正常情况下的非伤害性刺激也能产生反应现象，即痛觉超敏。外科手术切口是发生在损伤原始区域的一种静态机械痛觉过敏现象。很快在原始区域出现周围红斑、水肿，通过轴突反射诱导痛觉过敏现象的出现。而肌肉、肌腱、韧带和其他深部躯体结构都受到 $A\delta$ 和无髓 C 神经纤维的支配，这些纤维被伤害性刺激激活后会致弥散的、定位模糊的疼痛感。而伤口愈合后初级传入神经元恢复高阈值状态使得外周敏化状态的消失。外周敏化的机制不但涉及伤害性感受纤维，也和所谓的沉默性伤害性感受器有关。后者在正常情况下对伤害性刺激产生的炎症介质如前列腺素和缓激肽不产生作用。关于外周敏化发生的细胞内机制，目前研究与 cAMP 相关，并且 cAMP-PKA 通路在降低伤害性神经元的激活阈值、以及增加 TTX- Na^+ 通道的激活幅度以及频率方面也有重要作用。

生理条件下，神经元忠实传导来自外周的神经刺激信息，很少在局部出现连续放电等自发活动，当受到各种外界刺激时，如炎症、神经损伤等，才会伴随出现阈下膜电位震荡现象（subthreshold membrane potential oscillation, SMPO）^[9]。细胞膜阈下震荡现象累积到一定的程度就有可能诱导动作电位并产生连续放电现象；然而有研究发现在病理条件下远离受损区域的神经元细胞也可能出现自发放电，这种现象称为异位放电^[10]。例如局部神经纤维髓鞘变，神经切断以及坐骨神经或脊神经结扎后，虽然初级感觉神经

元没有受到直接损伤,也同样出现连续性自发放电现象。说明在疼痛的传入过程中,神经细胞对痛觉信号的编码以及传导能力出现异常。外周慢性炎症会引起 A δ 传入纤维发生功能性改变,导致痛觉的敏感性显著的增加,神经递质的数量以及释放发生变化进而影响细胞膜受体功能以及离子通道表达以及活性,这些调节可能导致 A δ 纤维兴奋性的增加,进在受到机械性刺激时出现痛觉超敏现象^[12-14]。宋英等^[9]研究发现,大鼠背根神经节慢性压迫损伤(chronic compression of DRG,CCD)术后,非特异性伤害感觉神经元的自发放电现象增多,并且发电频率也明显增加。将浦肯野神经元细胞置入缺血环境中诱导动作电位的产生会增加,并且编码动作电位的能力发生改变^[15]。这些神经元兴奋性改变甚至出现超兴奋状态的现象引起人们注意。

本课题采用 SD 大鼠右后足底注射福尔马林试剂的方法建立炎性致痛模型,采用膜片钳电流钳技术,通过记录和比较痛觉信息传递过程中的初级感觉神经元-背根神经节神经元动作电位的各参数变化情况。并从离体细胞水平上,初步研究正常和炎性痛状态下,背根神经节神经元动作电位各参数的变化情况,从而进一步探讨初级感觉神经元在炎性神经痛发生机制中起到的作用,并为丰富临床疼痛治疗提供相关理论依据。

材料和方法 (Material & Methods)

1 材料

1.1. 实验动物

同型 Sprague Dawley 大鼠 (体重 $150 \pm 50 \text{g}^{[16]}$, 周龄 6 周) 16 只, 清洁级, 购自新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 许可证号: SYXK (新) 2003-0003, 动物饲养环境平均温度 25°C , 湿度 40% 左右。所有操作程序均获得石河子大学第一附属医院动物伦理委员会批准。

1.2. 实验试剂及材料

1.2.1. 模型建立所需要材料及试剂

水合氯醛晶体	上海五联化工厂
0.9% NaCl	新疆华氏丹制药厂生产
75% 酒精及碘伏消毒液	山东 LIRCON 消毒科技股份有限公司
医用棉签	江西松鹤医疗器械有限公司
无菌注射器 带针	上海康德莱企业发展集团股份有限公司
金属笼, 托盘及秒表	自制
福尔马林试剂 分析纯	天津市致远化学试剂有限公司

A. 细胞外液配制

1) 细胞外液配置所需试剂及设备

NaCl 分析纯	天津市致远化学试剂有限公司
KCl 分析纯	天津市福晨化学试剂厂
CaCl ₂ 分析纯	天津市福晨化学试剂厂
MgCl ₂ 分析纯	天津市福晨化学试剂厂
HEPES	美国 Sigma 试剂公司
葡萄糖 分析纯	天津市光晨科技发展有限公司
PH 测定仪	意大利 HANNA 公司
渗透压测定仪	上海依达医疗器械有限公司
AB204E 电子天平	Mono Bloc 公司
Milli-Q Academic 超纯水仪	美国 Millipor 公司

2) 细胞外液试剂配制方案

NaCl	150.00 mmol/L
CaCl ₂	2.50 mmol/L
KCl	5.00 mmol/L
HEPES	10.00 mmol/L
MgCl ₂	1.00 mmol/L
HEPES	10.00 mmol/L
葡萄糖	10.00 mmol/L

pH=7.3~7.4 (1 mol/L NaOH 溶液调定), 渗透压=320 mOsm/L (10×母液调定), 4℃冰箱保存备用。

B. 细胞内液配制

1) 细胞内液配制所需试剂

KCL 分析纯	天津市福晨化学试剂厂
MgCl ₂ 分析纯	天津市福晨化学试剂厂
CaCl ₂ 分析纯	天津市福晨化学试剂厂
ATP 二钠盐	四川九河化工有限责任公司
HEPES	美国 Sigma 试剂公司
EGTA	美国 Sigma 试剂公司

2) 细胞内液试剂配制方案

KCl	140.00 mmol/L
ATP 二钠盐	2.00 mmol/L
HEPES	10.00 mmol/L
MgCl ₂	2.00 mmol/L
CaCl ₂	1.00 mmol/L
EGTA	11.00 mmol/L

pH=7.3~7.4 (1 mol/L KOH 溶液调定), 渗透压=305 mOsm。使用滤器充分过滤, 分装后避光-20℃保存, 使用之前解冻。

C. 细胞消化酶配制

1) 消化酶配制所需试剂及设备

胶原蛋白酶 I (collagense I)	美国 Sigma 试剂公司
胰蛋白酶 (TRYRSIN)	美国 Sigma 试剂公司
DMEM 培养基	Hyclone 试剂公司
胰蛋白酶抑制剂 (TRYRSIN inhibitor)	美国 Sigma 试剂公司
振荡器	江苏医疗器械厂
离心机	珠海黑马医学仪器有限公司

2) 消化酶配制方案

将 6mg 胰蛋白酶 I 与 15mg 胶原蛋白酶混入 25mlDMEM 培养基中,充分震荡混匀,每 0.75ml 分装-20℃冰箱低温保存。

1. 3. 实验仪器

1. 3. 1. 福尔马林模型制备

秒表

托盘、金属笼

自制

1. 3. 2. 膜片钳记录

AXON multicalmp 700B 膜片钳大器	Axon 公司, 美国
微操纵器(PCS5001)	Siskiyou Design, 美国
P-97 拉制仪	Sutter 公司, 美国
体视正置显微镜 SZX10	Olympus, 日本
气压式减震台 TM-1	上海医科, 国产
玻璃微电极毛胚 1.5mm	Sutter, 美国
恒温水浴箱 HSS-1C	上海仪器厂, 国产

2 方法

2. 1. 实验动物分组

Sprague Dawley 大鼠共 16 只,雌雄不计,随机数字表法分为 2 组:福尔马林组(n=8):取 5%福尔马林 10 μ l 注射于右后足掌心处; 正常动物对照组 (n=8): 右后足底部注射等量生理盐水。采用 Abbott^[3]等方法, 马上使用秒表记录注射后 1 h 时间内每 5 min 累计缩足舔足行为时间。

2. 2. 注射福尔马林建立炎性疼痛模型

取 Sprague Dawley 大鼠在温度恒定的特制的金属笼中充分适应环境后,使用酒精棉球消毒右后足底部皮肤, 取 1 ml 注射器吸取 5 %的福尔马林试剂 0.01 ml 注入固定好的老

鼠右后足底中心处。再次使用酒精棉球按压注射部位数秒钟，保证药物无外溢后，将老鼠放回金属笼中任其自由活动，使药物在动物体内充分扩散及作用，从而建立良好的模型。

2.3. 模型大鼠行为学观察

注意观察及记录在自由活动过程中，右后足是否发生红肿，抬脚，啃咬患肢，抖动后足等现象，运动过程中出现停滞，拖足，跛行并伴有尖叫等现象。使用秒表记录注射福尔马林试剂后 1 h 内，每 5 min 时间内大鼠抬足时间。

2.4. 背根神经节神经元急性分离

麻醉大鼠后断头，清除大鼠右后肢毛发，在股骨中心处解剖分离坐骨神经找到与之相连的 L5、L6 部位的背根神经节，使用游丝镊仔细完整地取出神经节并置于准备好的细胞外液中。10×镜下使用游丝镊固定神经节纤维，眼科剪仔细修剪位于胞体两侧的神经纤维。保证此操作过程中不会碰触、剪破胞体。使用移液管吸去所有的细胞外液，眼科剪将神经节组织剪碎均匀。移入配置好的消化酶中，于 37 °C 恒温箱中消化 15 min, 期间吹打 2-3 次使得组织完全接触消化酶液，吹打动作要轻柔不可产生气泡。向消化完毕的细胞浑浊液加入少量的胰蛋白酶抑制剂 (TRYRSIN inhibitor) 终止消化。1000 rpm 离心 5 min，使用移液管吸走上清液，将细胞外液加入余下的沉淀中，轻轻吹打数次制备成细胞悬液。将其滴到细胞培养皿中，静置待其细胞贴壁。

2.5. 全细胞膜片技术记录动作电位变化

2.5.1. 玻璃微电极拉制

玻璃微电极经过甲醛浸泡处理后，冲洗数次，入烘箱烘干待用。使用前先用酒精灯将玻璃微电极两端加热，注意过程中不可触碰电极中央位置防止污染电极尖端。取处理过的玻璃微电极置入电极拉制仪中。调整好两步拉制的温度及时间，获得适宜直径的尖端，保持电极电阻在 3~5 M Ω 之间。

2.5.2. 电压钳封接细胞过程

细胞贴壁完全的培养皿置于显微镜载物台上，低倍镜视野下进行细胞状态的观察，挑选细胞膜完整性好、折光性强并且胞质均匀、细胞核清晰可见并且直径在 < 40 μm 的中小型神经细胞作为研究对象。玻璃微电极内冲灌入细胞内液，并保持电极尖端完整无杂质，电极内液无气泡。将微电极固定于记录电极的银丝上，调整电极位置，配合微操使记录电极靠近细胞，并注意观察电极入液后给予液接补偿，使电极入液测试方波回到基线。继续调整微电极位置使其靠近细胞上方中线偏右的位置，当电极接触到细胞膜时电阻会发生突然的增加，随后使用注射器给予一定的负压，电阻持续上升至 G Ω 水平，待其稳定后电击破膜形成全细胞 (whole cell) 模式。等待数分钟使细胞内液与电极内液

充分交换。

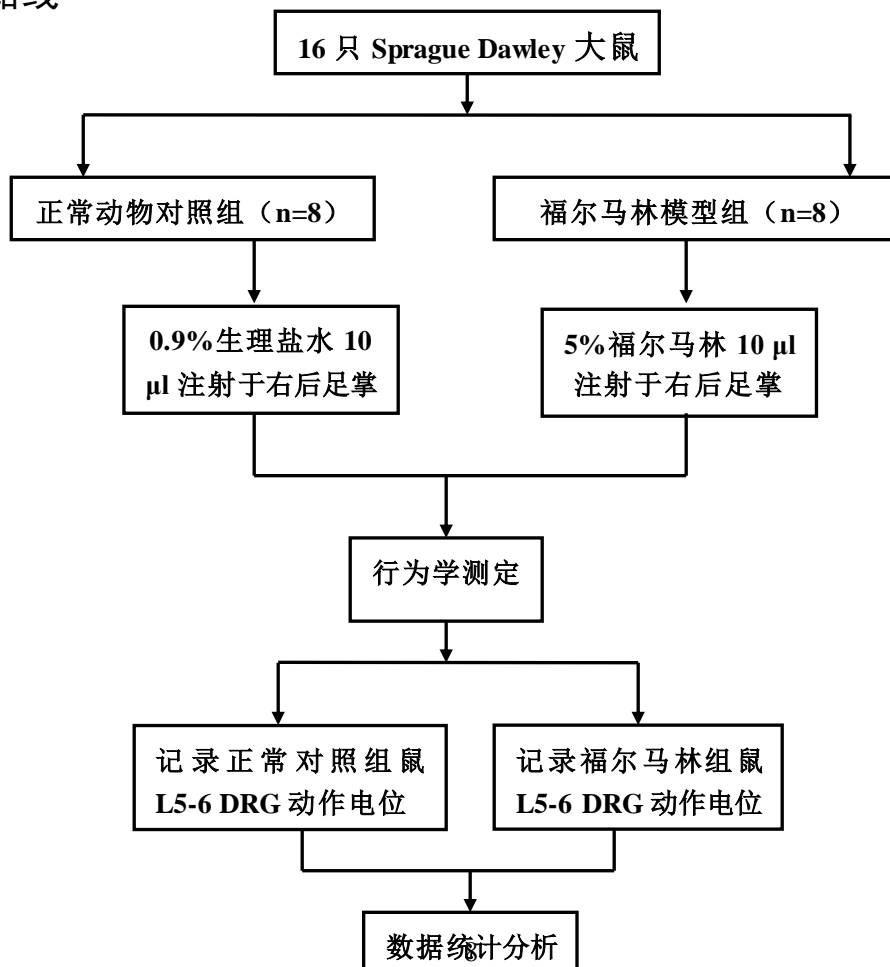
2.5.3. 电流钳记录过程

封接破膜完成后，将电压钳转变成电流钳（current patch）模式，首先观察记录细胞静息电位水平。选择静息电位在-40 mv 以下的神经细胞作为研究对象。给予细胞 500 ms 从 0 PA 到 500 PA 的跃阶刺激，观察神经元细胞爆发动作电位的情况，即分别统计 DRG 中小型神经元静息电位（Rest potential,RP）、DRG 中小型神经元动作电位阈值（ Action potential threshold,APT）、DRG 中小型神经元 AP 峰值(Action potential peak,APP)、DRG 神经元动作电位半峰时间（half duration of action potential ,APD₅₀）。

3. 数据统计及分析

膜片钳电流图用 Clampfit 10.2 分析得出数据，再应用 SPSS 17.0 分析软件进行统计学分析。实验结果用均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，多组之间的样本比较采用单因素方差分析，组间样本两两比较采用 Dunnett-t 检验和 LSD-t 检验，以 p<0.05 为差异有统计学意义。

4. 技术路线



结 果

(Result)

1. 福尔马林致痛模型鼠痛行为学变化

将配置好的福尔马林试剂注入大鼠右后肢足底皮下后，鼠足立即出现红肿、发热、抬起、抖动、背翻等现象，行动中右后肢蹒跚、跛行等行动障碍的现象并伴有舔舐、啃咬注射足等自发痛行为。全过程明显出现两期反应：第一阶段为注射后即刻出现自发痛现象，持续 10 min 左右；经过 5 min 左右无痛间歇期，开始第二阶段疼痛期，持续约 40 min。而非注射足与正常对照组行动正常，无舔足、抬足，跛行等行为。见图 1。

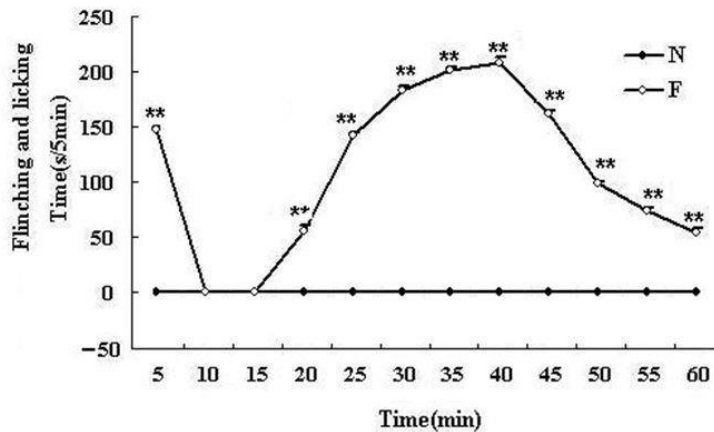


图 1 福尔马林组与正常动物对照组行为学比较

Fig 1 The comparison between Formalin model and the normal

注：N:Normal group; F:Formalin group; 福尔马林组与正常动物对照组比较，**表示 $P < 0.01$

2. 动作电位改变

2.1 不同实验组大鼠 DRG 神经元动作电位

本实验进一步记录炎性痛过程中小型 DRG 神经元（直径 $< 40 \mu\text{m}$ ）动作电位的改变情况，向 DRG 神经元注入 500 ms 幅度为 500 pA 的阶跃（ramp）刺激。使细胞去极化达到一定程度诱导动作电位的爆发。福尔马林模型组动作电位的个数为 14.43 ± 0.82 ($n=8$)，正常生理盐水对照组动作电位的个数为 6.85 ± 1.06 ($n=7$)。两者之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，即福尔马林模型组动作电位的个数较正常生理盐水对照组明显增加，见图 2。

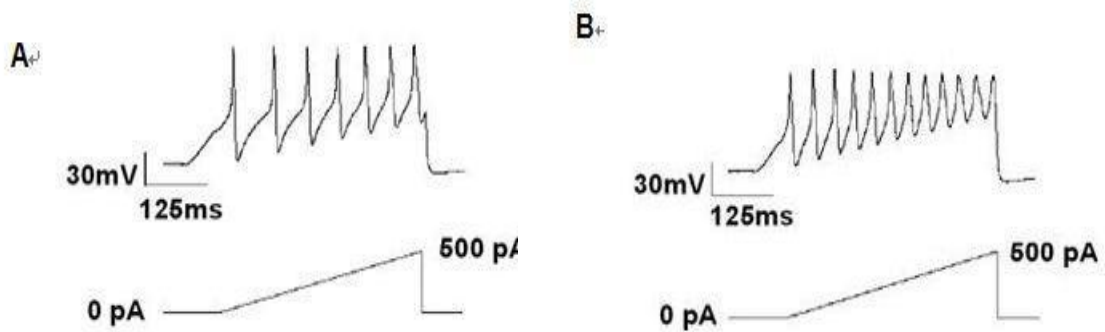


图 2 福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元动作电位

A.正常动物对照组大鼠 DRG 神经元动作电位； B.福尔马林组大鼠 DRG 神经元动作电位；

Fig 2 The firing of action potential of normal and formalin model rat DRG

A.Normal rat DRG neurons action potentials; B.Formalin rat DRG neurons action potentials.

2.2 静息电位变化

SD 大鼠右后肢足底皮下注射福尔马林试剂建立炎性致痛模型，对大鼠 L5、L6 背根神经节神经元进行急性分离，采用全细胞膜片钳电流钳技术进行动作电位（action potential, AP）记录。福尔马林组 DRG 神经元静息电位（RP）为 -52.55 ± 1.15 mV(n=8)，正常动物对照组静息电位（RP）为 -53.17 ± 2.52 mV(n=7)，二者比较差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），即福尔马林组 DRG 神经元静息电位与正常生理盐水对照组比较未见明显变化。见图 3。

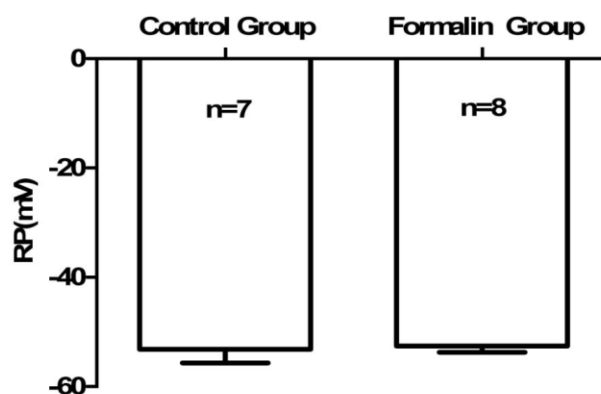


图 3 福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 RP 变化

注：福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元静息电位统计图。

Fig 3 The firing of RP of normal and formalin model rat DRG

PS: The chart of RP of AP in normal and formalin model rat DRG neurons.

2.3 动作电位阈值变化

SD 大鼠右后肢足底皮下注射福尔马林试剂建立炎性致痛模型，对大鼠 L5、L6 背根神经节神经元进行急性分离，采用全细胞膜片钳电流钳技术进行动作电位（action potential, AP）记录。动作电位阈值代表细胞受刺激后诱发 AP 的难易程度，结果显示福尔马林组 DRG 神经元动作电位阈值（APT）为 -25.31 ± 0.47 mV (n=8)，正常动物对照组 DRG 神经元动作电位阈值（APT）为 -20.36 ± 0.46 mV (n=7)，二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，即福尔马林组 DRG 神经元动作电位阈值较正常动物对照组明显向超级化水平发展。说明与对照组相比，模型鼠 DRG 神经元中、小型神经元容易产生动作电位。见图 4。

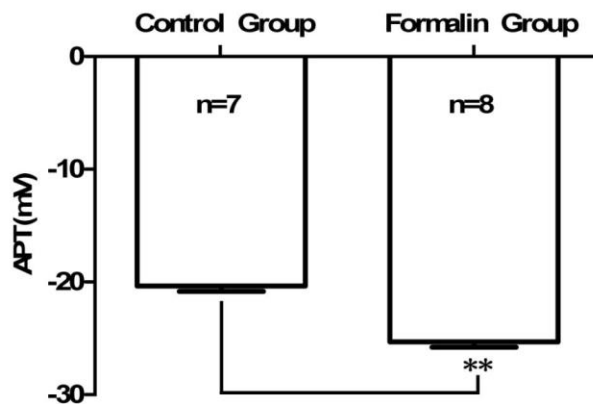


图 4 福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 APT 变化

注：福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 APT 统计图。 **表示 $P < 0.01$

Fig 4 The firing of APT of normal and formalin model rat DRG

PS: The chart of APT in normal and formalin model rat DRG neurons. ** $P < 0.01$.

2.4 动作电位峰值变化

SD 大鼠右后肢足底皮下注射福尔马林试剂建立炎性致痛模型，对大鼠 L5、L6 背根神经节神经元进行急性分离，采用全细胞膜片钳电流钳技术进行动作电位（action potential, AP）记录。福尔马林组 DRG 中小型神经元 AP 峰值 (APP) 为 72.43 ± 1.60 mV (n=8)，正常动物对照组 DRG 中小型神经元 AP 峰值 (APP) 为 85.96 ± 5.51 mV (n=7)，二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，即福尔马林组 DRG 中小型神经元 AP 峰值较正常对照组降低，见图 5。

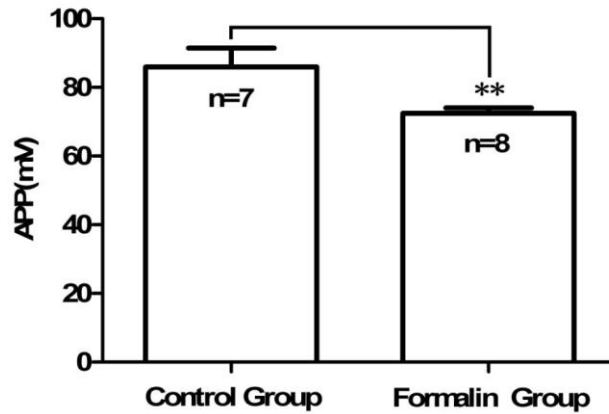


图 5 福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 APP 变化

注：福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 APP 统计图。 **表示 $P < 0.01$

Fig 5 The firing of APP of normal and formalin model rat DRG

PS :The chart of APP in normal and formalin model rat DRG neurons.** $P < 0.01$.

2.5 动作电位半峰时间变化

SD 大鼠右后肢足底皮下注射福尔马林试剂建立炎性致痛模型，对大鼠 L5、L6 背根神经节神经元进行急性分离，采用全细胞膜片钳电流钳技术进行动作电位 (action potential, AP) 记录。福尔马林组大鼠 DRG 神经元动作电位半峰时间 (APD_{50}) 为 6.40 ± 0.21 ms ($n=8$)，而正常动物对照组大鼠 DRG 神经元动作电位半峰时间 (APD_{50}) 为 6.04 ± 0.95 ms ($n=7$)，两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 6。

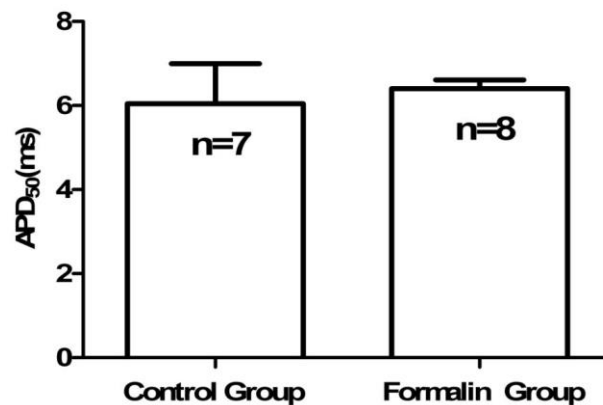


图 6 福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 APD_{50} 变化

注：福尔马林组与正常动物对照组大鼠 DRG 神经元 APD_{50} 统计图。

Fig 6 The firing of APD_{50} of normal and formalin model rat DRG

Ps :The chart of APD_{50} of AP in normal and formalin model rat DRG neurons.

2.6 动作电位各参数变化

SD 大鼠右后肢足底皮下注射福尔马林试剂建立炎性致痛模型，对大鼠腰 5、腰 6 背根神经节神经元进行急性分离，采用全细胞膜片钳电流钳技术进行动作电位（action potential, AP）记录及比较。分别统计 DRG 神经元静息电位（RP）、DRG 神经元动作电位阈值（APT）、DRG 中小型神经元 AP 峰值（APP）、DRG 神经元动作电位半峰时间（APD₅₀）。见表 1

表 1 实验组与正常动物对照组电生理变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab1 The comparison of change in action potential between the control and formalin model ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	RP (mV)	Number of AP	APT (mV)	APP (mV)	APD ₅₀ (ms)
Control	7	-53.17±2.52	6.85±1.06	-20.36±0.46	85.96±5.51	6.04±0.95
Formalin	8	-52.55±1.15	14.43±0.82**	-25.31±0.47**	72.44±1.61**	6.40 ±0.21

注：福尔马林组与正常动物对照组比较**表示 $P < 0.01$

Ps :The compation between formalin model group and normal control group **indicates $P < 0.01$

讨 论

(Discussion)

20 世纪 90 年代国际疼痛研究会 (IASP) 定义疼痛 (pain) 为“一种与组织损伤或潜在损伤相关的不愉快的主观的感觉和情感的体验”。对心理生理学模型的研究发现疼痛现象及产生的是一系列生理、心理、社会因素间复杂因素相互作用的结果。为众多疾病发生发展过程中的重要临床表现。疼痛会对病人在生理和心理上产生多重影响,但同时也是一种提示信号,保护躯体免受各种伤害。能对环境中潜在或者已经存在的伤害性刺激产生感知是极其重要的,如果缺失这种能力,如先天性痛觉缺失的病人,因无法感知疼痛而将会受到持续性组织损伤的困扰。在世界范围内,疼痛是临床上面临的主要难题,至今难以解决。导致疼痛的原因众多:包括炎性物质、周围神经损伤、癌症甚至是精神异常状态。疼痛机制研究成为了医学探讨的热点及难点,在导致疼痛的众多原因中其中炎症或者说炎性物质是临床上最常见的致痛因素之一,但对于其发病机制目前尚不明确。

炎性痛是由各种化学物质、外伤、细菌或病毒感染等原因引起的疼痛反应。不仅只发生在成年人同时也对婴儿及儿童产生着重要的影响。幼儿类风湿关节炎就是典型的炎性疼痛,最常见于 1 至 3 岁儿童,病人常表现为晨起关节的僵硬,静止痛以及夜间痛,而婴幼儿表现为易怒性增加,厌食以及拒绝爬行等表现,从而影响患者后天的生长发育^[17]。然而很重要的一点是对于这些有基础疼痛症状的患儿,与正常同龄人相比存在痛阈降低的表现,使得患儿在生长发育过程中更易感知疼痛并深受其困扰。疼痛是炎症后主要的表现。认为组织损伤后释放的炎性物质包括经典的炎性因子(例如白三烯,前列腺素, H^+ , ATP, 神经生长因子),促炎细胞因子以及趋化因子都可以直接刺激并导致位于初级感觉神经末梢的疼痛感觉相关的伤害性受体出现敏化^[31]。致使急性炎症伴随着急性痛敏现象。但通过临床观察发现:当炎症状态解除以及消失后,痛敏现象还持续存在,致使病人处于长期慢性疼痛状态,严重影响患者的工作以及生活质量。

在人类进化过程中,生物发展出一种称为伤害性感受器的特殊感觉器,用来感知周围环境并避免危险信号。伤害性初级感觉神经元通过高阈值的 C 以及 $A\delta$ 纤维传递密集的伤害性刺激诱导痛觉的产生,这种现象在正常情况下发生迅速并具有保护意义的。而随着疼痛系统的进一步进化,出现了创伤以及疾病状态下伤害性感受器敏感性增加的现象,从而加剧并延长疼痛状态。目前的研究认为神经活动的可塑性(即神经可塑性)能够导致慢性疼痛的发生。这种神经活动的改变会引起外周初级感觉神经元背根神经节、三叉神经节神经元^[31-33]以及脊髓、脑干、皮层的中枢神经元的敏化^[34,35]。敏化现象的出现带给疼痛研究更深入的认识。

研究发现^[21],组织损伤过程中所产生及合成的化学物质与痛觉传导有着直接关系,

这些炎性物质在生理学浓度范围就可以激活或者敏化伤害性感受器。外周伤害性感受器及周围神经纤维通过上/下调伤害性感受阈以及增加特异性的离子通道表达或者通过调整电压依赖性阳离子通道的电学特性，使外周神经元细胞膜兴奋增加导致初级传入神经纤维输入的信号显著增强，从而使微弱的刺激强度就可以对身体造成的强烈伤害反应，即痛觉敏化；或者非伤害水平的刺激可以激活伤害感受器，即异常的痛觉过敏（异常痛敏）。痛敏与异常痛敏就构成了各种痛觉传导敏化状态的外周机制。所以，伤害信息传导的真正目的是通过伤害相关性受体，接收刺激机体相关的有害信息，对其模式，强度，持续时间等进行最基本的编码，再按照一定的时间序列沿身体感觉的外周和中央神经纤维突向中枢传递。

动物的神经系统可以对来自体内及外环境中所有信息进行综合的转化、有序的编码、复杂的整合、筛查式的储存和快速的传递，上面所述这些复杂的过程主要是通过“全或无”的动作电位以一定的规则或不规则的放电的形式，在神经纤维上的传导和突触之间的传递而实现的，并最终完成大脑对于信息的整合和感知，从而做出进一步的反应。痛觉信号传导过程中，机械能、化学能及热能通过作用于伤害感受器被转换为电信号（伤害性刺激使得细胞膜去极化导致动作电位产生），依次通过第二级神经元脊髓背角的感觉神经元和第三级丘脑感觉神经元的传递，将伤害性信号运送到大脑皮层感觉神经元，再完成神经元相互之间的联系以及突触水平上的信息传递，从而将电信号转换为神经递质的释放^[8]。例如，通过影响 GABA 的释放产生突触前抑制作用。

自发痛以及痛觉敏感等多为炎性痛的表现形式。自发痛是由炎性物质直接激活位于痛觉传导通路末端的特殊受体而产生的现象，而痛觉超敏多是由于感受器的周围末梢神经以及背根神经节神经元发生早期翻译后（early posttranslational changes）改变以及后期效应基因的转录后改变的结果。而神经元和特定的信号分子启动特殊的信号途径会产生炎症性神经的可塑性（neuroplasticity）^[11]，这些途径使膜蛋白发生磷酸化并激活转录因子，同时改变相关基因的表达。感觉神经元随着这些过程的变化出现两部分不同的功能改变：即对外界刺激的敏感性，以及在刺激过程产生疼痛的能力。翻译后改变将会很大程度的影响神经元的基础敏感性（basal sensitivity）同时改变神经元的表型并且影响整个系统的功能。背根神经节神经元以及脊髓背角上相关受体上调使得其对应的传入反应被增强，尤其是那些刺激引起的痛觉超敏以及神经纤维表型的改变，例如 A 类神经纤维表现出 C 类纤维的神经化学功能。

福尔马林模型于 1985 年被 Hunskaar 等人提出，使用足下注射福尔马林试剂的方法模拟急性外伤、术中感染等导致的持续性疼痛状态。同时被广泛应用的疼痛模型还有：佐剂关节痛模型、辣椒素致痛模型、蜂毒模型、完全弗氏佐剂模型、角叉菜胶致痛模型等。但福尔马林模型是研究炎性痛机制中最为经典的模型，可以很好模拟临床上急性炎性痛的产生以及其持续性的疼痛状态，也是早期就被应用于研究各种药物镇痛效果的理

想模型。其疼痛过程分为两个时程：第一时程，即在后足注射福尔马林后出现典型的炎性痛表现，足底红肿并伴有抬足，舔舐以及运动过程中的抖足、跛行，持续 5-10 分钟，这是第一项疼痛发应；第二时程，经历约数分钟的静止期后，再次出现上述疼痛行为持续 30-40 分钟，总过程约 1 小时。本实验建模后痛行为学与经典的双相痛反应现象一致。有研究认为第一时相是由于伤害性感受器直接受到福尔马林物质的刺激产生的，是短暂的急性反应，而第二时相疼痛行为与各种炎性介质引起的中枢痛敏现象相关^[37]。

动作电位是可兴奋细胞受刺激时在静息电位的基础上产生的可扩步的电位变化过程。本实验研究发现，福尔马林模型鼠背根神经节(dorsal root ganglia DRG) 神经元神经元的兴奋性明显增加。当受到特定时间、强度的阶跃刺激后，模型鼠背根神经节(dorsal root ganglia DRG) 神经元产生动作电位的个数与正常动物对照组相比增加，本实验研究结果与邓^[22]等人研究神经病理性痛模型鼠背根神经节神经元电生理特性的结果相一致。但与王^[23]等人对关节炎性痛背根神经节神经元兴奋性研究结果相反。考虑到疼痛是多种因素相互作用的复杂过程，而且动作电位时空特性的改变不仅是一种单纯的现象，虽然研究发现^[23]病理条件下背根神经节神经元兴奋性降低，但其复极时程的延长仍能对细胞内各种离子特别是钙离子的量产生影响，导致其胞内的数量增加引起抑制性神经递质 γ -氨基丁酸(γ -aminobulanoic acid, GABA)的释放量减少，使其介导的突触前抑制作用减弱，最终促使疼痛状态的发生。

本实验对急性分离的 DRG 神经元静息电位进行记录发现模型鼠 L5, L6 背根神经节中小型神经元静息电位水平与对照组相比无明显变化。这和大部分疼痛模型鼠背根神经节神经元的静息电位改变一致。钾离子通道的开放与关闭不仅影响静息电位的水平，还直接参与动作电位的复极化以及自发放电活动^[24]。对大脑内侧核梯状神经元研究^[25]发现电压依赖性钾通道 (Voltage-gated potassium, K_v) 家族对动作电位产生不同的影响： K_v1 增加 AP 放电的阈值； K_v2 影响 AP 复极过程并且在高频放电过程中使细胞膜超级化； K_v3 加速动作电位的复极过程。并且这些过程被认为与信息传递的保真性，动作电位的时程，放电的频率以及时程相关。 K_v 介导的电流对感觉神经元兴奋性调控起重要作用。A 型钾离子通道也参与了疼痛可塑性以及病理痛的过程^[38-41]。外周神经损伤导致 I_A 的下调将引起 DRG 神经元兴奋性的增加，最终导致疼痛感觉的增加^[38, 42]。炎性痛模型鼠 DRG 神经元的兴奋性以及 AP 波形发生变化，与 K^+ 通道密度以及电流幅度减少有关。使用 K^+ 通道阻断剂减少 DRG 神经元或其他神经元 K^+ 电流后，会出现膜电位去极化、AP 的幅度降低以及阈电位的下降，还会出现自发性和单刺激诱发的成串放电现象^[48-52]。Safronov^[48]等在 DRG 的小神经元中观察到延迟整流的 K^+ 通道 (IK) 对 RP 的设定发挥部分作用，同时在决定 DRG 神经元 AP 产生的阈电位以及 APP 的幅度上起重要作用，而其又参与 AP 的复极化过程，因此又可以影响动作电位时程。

阈电位是指膜电位去极化到某一临界值，突然膜上的 Na^+ 通道大量的开放， Na^+ 大量

集聚至一定水平产生动作电位，膜电位的这一临界值为阈电位。阈电位的变化代表静息电位到达阈电位过程中需要克服的能障，可以反应突触输入信号驱使神经元爆发动作电位的难易程度^[26]。而福尔马林组阈电位水平的降低意味着细胞接受外来信号刺激后，细胞由静息电位水平到爆发动作电位需要克服障碍降低，使背根神经节神经元对外周刺激的敏感性增加，表现为兴奋性增加甚至出现超兴奋现象^[27]。对脊神经结扎而成的神经病理性痛模型鼠背根神经节神经元动作电位的研究^[22]也发现，受损后产生动作电位的阈值与正常动物对照组相比较明显降低。

大量证据提示轴突损伤后，DRG 神经元的异常兴奋性和 Na⁺通道的密度或电流增加有关^[44]。而临床中观察到，Na⁺通道阻断剂能在神经病理性痛的治疗中产生部分效果^[45]。分子水平的研究发现损伤后数种 Na⁺通道亚型发生表达上调，如 TTX-S 的 Na⁺通道亚型 Na_v1.3，仅在胚胎期才有高表达，而在坐骨神经切断术后表达也明显上调^[46]。而在糖尿病神经病理性痛中 Na_v1.1、Na_v1.3、Na_v1.6、Na_v1.7、Na_v1.8 以及 Na_v1.9 亚基都有上调^[47]。

本实验研究发现福尔马林炎性痛模型鼠背根神经节神经元动作电位的时程 (APD₅₀) 并没有与正常动物对照组产生明显差异。而糖尿病神经痛模型^[43]中记录到的 DRG 神经元动作电位的时程 (APD₅₀) 增加，并且兴奋性增加，考虑这可能是由于动物模型的不同导致的动作电位兴奋性表现不同。研究表明^[30]大电导钙激活钾通道 (large conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels, BK_{Ca}) 对动作电位时程调节其重要作用。细胞膜去极化使得细胞内 Ca²⁺水平增加激活 BK_{Ca} 通道，导致钾离子外流使得细胞膜复极化改变。而 BK_{Ca} 通道对 Ca²⁺的敏感性产生负反馈抑制神经元的重复放电。而 BK_{Ca} 通道的失调会使神经元出现超兴奋 (hyperexcitability) 现象，甚至导致癫痫的发生。然而炎性痛模型 DRG 神经元 BK_{Ca} 研究还未见报道，仍需要进一步研究。

综上，福尔马林炎性模型鼠 DRG 神经元兴奋性增加以及动作电位时空参数的改变，导致初级感觉神经元传导伤害性刺激的能力增加，介导外周敏化状态的产生。外周敏化现象可能引起脊髓背角神经细胞的兴奋性增加，进一步导致中枢敏化的产生。这些可塑性的改变可能成为炎性痛产生以及持续存在的原因。

结论和展望

(Conclusion)

1 结论：

炎性痛的出现与初级感觉神经元兴奋性增加有关。

2 展望：

于20世纪90年代国际疼痛研究会（IASP）将疼痛定义为“一种与组织损伤或潜在组织损伤相关的不愉快的主观感觉和情感体验”^[4]。疼痛作为众多疾病伴发的主要症状也是困扰患者的主要原因之一。而炎性疼痛以其特殊的发病原因以及临床表现备受关注，成为目前世界范围内研究的热点及难点。本研究通过对其传导通路初级感觉神经元产生动作电位情况的研究，发现炎性痛Sprague Dawley大鼠背根神经节神经元出现动作电位数量增加，阈值降低，峰电位降低等兴奋性增加的表现。上述结果提示控制痛觉的传导可从干扰或抑制动作电位时空特性改变入手，所以对于背根神经节在疼痛发生发展病理机制中的研究，尤其是在炎性痛发生发展中的研究极为重要。因此，研究背根神经节神经元在炎性神经痛发生发展病理机制中的所起的作用，将进一步加深对炎性神经痛的理解并探寻疼痛的神经元治疗靶点，并希望通过深入研究确定外周神经兴奋性增加的重要生物分子基础，进而从根本上解决炎性痛的发生，相信在不远的将来，最终可将背根神经节介导的外周敏化在炎性痛机制中的作用应用于临床工作，使之成为临床诊疗中的不可或缺的重要支柱之一。

参考文献

(REFERENCE)

- [1] 罗超, 余明华, 刘忠武. 糖尿病神经痛中大鼠背根神经节细胞电生理特性的改变[J]. 山西医科大学学报. 2011, 42(5):366-369.
- [2] 李建宁, 刘一辉, 任维. 神经病理性痛外周自发放电与钙激活钾离子通道的研究进展[J]. 广东医学. 2012, 10, 33, 19.
- [3] Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test:scoring properties of the first and second Phases of the pain response i n rats[J]. Pain, 1995, 60(1):91.
- [4] LUIS R, Harald B, Helge R, etal. Chronic pain and sensory changes after augmentation mammoplasty:long term effects of preincisional administration of methylprednisolone[J]. Pain, 2006, 124(1/2):92-99.
- [5] Hiroshi ueda. In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanism of pain[J]. J Pharmacol. 1999, 3, 79:263-268.
- [6] 汪伟, 王文等. 炎症性痛和神经病理性痛模型[J]. 神经解剖学杂志, 2007, 1, 019, 1000-7547
- [7] Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. [J]. Nature. 1996, 379(6562):257-262.
- [8] Hanns Ulrich Zeilhofer, Hendrik Wildner, and Gonzalo E. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control[J]. Physiol Rev, 2012, 92:193-235.
- [9] 宋英, 张咏梅, 徐洁等. 慢性痛大鼠背根神经节神经元自发放电对脊髓背角广动力神经元的影响[J]. 生理学报, 2013, 65(5)533-539.
- [10] Hu SJ, Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat[J]. Pain, 1998 Jul;77(1):15-23.
- [11] Petersen Felix S, Curtolo M. Neuroplasticity - an important factor in acute and chronic pain[J]. Swiss Med Wkly, 2002 Jun 1;132(21-22):273-278.
- [12] Todd AJ: Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn[J]. Nat Rev Neurosci 2010, 11:823 - 836.
- [13] Kuner R: Central mechanisms of pathological pain[J]. Nat Med 2010, 16:1258 - 1266.
- [14] Ueda H: Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms[J]. Pharmacol Ther , 2006, 109:57 - 77.
- [15] 赵士弟, 黄丽, 陈前芬. 缺血对大鼠小脑浦肯野细胞动作电位编码的影响. [J] 蚌埠医学院. 2009, 06, 001, 1000-2200.
- [16] 张非煜, 万有, 张震康等. 福尔马林与完全福氏佐剂疼痛模型大鼠脊髓环氧合酶两种亚型表达比较[J]. 中国疼痛医学杂志. 2008, 14(4):226-229.
- [17] Walco GA, Oberlander TF. Musculoskeletal pain syndromes in children[J]. Pain Management

in Children and Adolescents. 1994;459-471.

[18]Liu BY, Zhang HL. Bradykinin modulates ion channel in inflammatory pain[J]. Yao Xue Xue Bao, 2009, 44(10):1066-1071.

[19]沈立姿, 房立丛, 于津鹏等. 大鼠疼痛模型研究进展. 重庆医学, 2013, 4, 42(10).

[20]Jen-Kun Cheng, Ru-Rong Ji. Intercellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain[J]. Neurochem Res, 2008, 33(10):1970-1978.

[21]刘翔宇, 武胜昔等. 福尔马林致痛大鼠背根神经节内 5-HT 受体亚型 mRNA 的表达变化[J]. 中国疼痛医学杂志. 2006, 12(1).

[22]邓论斌, 姚磊, 王贺春等. 神经病理痛大鼠背根神经节细胞电生理特性的改变[J]. 中国疼痛医学杂志 2003, 9(1):31-34.

[23]王学庆, 万有, 于英 d, 韩济生. 关节炎大鼠背根神经节细胞的膜电生理学特征[J]. 北京大学学报, 2001, 33(1):50-53.

[24]孙钱, 涂会引, 万有. 异位电活动的特点及其与慢性神经病理性痛的关系[J]. 生理科学进展. 2004, 35(4):325-328.

[25]Jamie Johnston, Ian D. Forsythe. Symposium Review: Going native: voltage-gated potassium channels controlling neuronal excitability[J] Physiology. 2010, 9(17):3187-3200.

[26]Zhang M, Hung Fs, Zhu Yu. et al. Calcium signal-dependent plasticity of neuronal excitability developed postnatally[J]. Neurobiol. 2004. 61(2):277-287.

[27]Xing JL, Hu SI, Long KP. Subthreshold membrane potential oscillations of type A neurons in injured DRG. Brain res. 2001, 901:128-136.

[28]Amaya F, Wang H, Costigan M, et al. The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity [J]. J Neurosci, 2006, 26:12852 - 12860.

[29]王波, 邵先舫等 Nav1.7 在福尔马林足底炎性疼痛大鼠模型背根神经节中表达的研究[J] 湖南中医药大学学报[J]. 2014, 34(4):10-12, 45.

[30]N`Gouemo P, BKCa channel dysfunction in neurological diseases. [J]Front Physiol. 2014, 29(5), 373.

[31]Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. Cell. 2009; 139:267 - 284. [PubMed: 19837031]

[32]Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. J Neurosci. 1998; 18:10345 - 10355. [PubMed: 9852572]

[33]Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. J Neurosci. 1999; 19:2181 - 2186. [PubMed: 10066271]

[34]Woolf CJ. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. Nature.

1983; 306:686 - 688. [PubMed: 6656869]

[35]Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest.* 2010; 120:3779 - 3787. [PubMed: 21041960]

[36]Study RE, Kral MG. Spontaneous action potential activity in isolated dorsal root ganglion neurons from rats with a painful neuropathy[J]. *Pain*, 1996, 65:235-242.

[37]林雪梅, 王泉云等; 福尔马林致痛对大鼠行为学及脊髓 NO、Fos 的影响, [J] *四川大学学报*; 2003; 34 (3); 523-526.

[38] Kim DS, Choi JO, Rim HD, Cho HJ. Downregulation of voltage-gated potassium channel alpha gene expression in dorsal root ganglia following chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;105:146 - 52.

[39]Chien LY, Cheng JK, Chu D, Cheng CF, Tsauro ML. Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J Neurosci* 2007;27:9855 - 65.

[40]Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, et al. The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron* 2006;50:89 - 100.

[41]Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S. Contribution of activated interleukin receptors in trigeminal ganglion neurons to hyperalgesia via satellite glial interleukin-1beta paracrine mechanism. *Brain Behav Immun* 2008;22:1016 - 23.

[42]Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13373 - 78.

[43]罗超, 余明华, 刘忠武; 糖尿病神经痛中大鼠背根神经节细胞电生理特性的改变; *山西医科大学学报*; 2011, 5, 42, (5).

[44]Rizzo, M. A., Kocsis, J. D., and Waxman, S. G. Selective loss of slow and enhancement of fast Na⁺ currents in cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons following axotomy. *Neurobiol Dis* 2(2), 87-96, 1995.

[45]Chabal, C., Russell, L. C., and Burchiel, K. J. The effect of intravenous lidocaine, Tocainide and mexiletine on spontaneously active fibers originating in rat sciatic neuromas. *Pain* 38(3) 333-338. 1989.

[46]Black, J. A., Cummins, T. R., Plumpton, C., Chen, Y. H., Hormuzdiar, W., Clare, J. J., and Waxman, S. G. Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* 82(5), 2776-2785. 1999.

[47]Craner, M. J., Klein, J. P., Renganathan, M., Black, J. A. and Waxman, S. G. Changes of sodium channel expression in experimental painful diabetic neuropathy, *Ann Neurol* 52(6), 786-792. 2002.

[48]Safronov, B. V., Bischoff, U., and Vogel, W. Single voltage-gated K⁺ channels and their

- functions in small dorsal root ganglion neurones of rat. *J Physiol* 493 (Pt 2), 393–408. 1996.
- [49] Glazebrook, P. A., Ramirez, A. N., Schild, J. H., Shieh, C. C., Doan, T., Wine, B. A., and Kunze, D. L. Potassium channels Kv 1.1, Kv 1.2 and Kv 1.6 influence excitability of rat visceral sensory neurons, *J Physiol* 54 I (Pt 2) 467–482. 2002.
- [50] Barrett, E. F., Morita, K., and Scappaticci, K. A. Effects of tetraethylammonium on the depolarizing after-potential and passive properties of lizard myelinated axons. *J Physiol* 402, 65–78. 1988.
- [51] David, G., Modney, B., Scappaticci, K. A., Barrett, J. N., and Barrett, E. F. Electrical and morphological factors influencing the depolarizing after-potential in rat and lizard myelinated axons. *J Physiol* 489 (Pt 2), 141–157, 1995.
- [52] Radicheva, N. I. and Kolev, V. B. 4-Aminopyridine and tetraethylammonium-induced changes in action potentials of unmyelinated axons. *Acta Physiol Pharmacol Bulg* 180, 21–26, 1992.

文献综述

(Review)

初级感觉神经元以及持续性疼痛的细胞内信号通路

芦碧含(综述) 司军强(审校)

摘要: 神经系统功能不仅仅只是将信息从外周传入脑。在神经损伤或炎症后外周神经, 脊髓以及更高级中枢脑都存在多种复杂的变化。这些改变可能增加疼痛的程度参与慢性疼痛综合征的发展过程。尽管, 我们对其认识在增加, 但感觉神经参与调控疼痛的细胞内机制还不十分清楚。这篇综述将展示目前已有的关于疼痛的细胞内信号通路改变的机制, 深入了解疼痛的发生发展过程

关键词: 神经可塑性; 慢性痛

躲避伤害性刺激是动物与人类十分重要的生存能力。这种有感知能力的特殊感觉体被称为伤害性受体, 并能监测到环境中可能存在的危险。密集地并高阈值地刺激伤害性感受器可以产生痛觉, 这种传导始于外周感受末梢产生的动作电位。痛觉信号通过初级感觉神经元无髓 C 纤维以及有髓 A δ 纤维传递到脊髓背角的第二级感觉神经元, 最终通过丘脑到达大脑皮质。起初, 伤害性疼痛是一种快速的“哦”痛并起到保护的作用。在近些年, 很多参与疼痛传导的物质被发现, 例如温度瞬时受体蛋白离子通道家族(TRP)。TRPV1 以及 TRPV2 能够监测热刺激^[1], TRPM8^[2,3]以及 TRPA1^[4]感受冷刺激。例如, 热刺激 TRPV1 (>42°C) 会使伤害性感受器外周末梢产生内向电流导致伤害性神经纤维产生动作电位诱导痛觉的产生^[5-8]。

痛觉感受系统的进一步进化出现了增强伤害后感觉能力的现象即痛敏现象, 于是出现了持续性疼痛现象。从电生理学研究角度, 这种痛敏现象特点是背景发电增加, 对非伤害性刺激的反应增强, 并且对温度以及机械刺激的阈值降低。这些电生理现象可能解释相关的行为学现象: 自发疼痛, 痛觉超敏以及异常疼痛现象。痛敏现象甚至在海兔这种简单生物中也存在, 密集的伤害性刺激能产生长久的反射活动增强的现象^[9]。这种痛敏现象指的是外周痛敏^[6,7,10,11], 因为发生在外周神经系统。相反, 发生在中枢神经系统的感觉能力增加现象称为中枢痛敏^[12]。尽管损伤后中枢痛敏参与持续性疼痛的产生过程但对持续性疼痛状态的维持更加重要。

虽然非伤害性疼痛即生理性疼痛是短暂的, 临床疼痛以及病理性疼痛却常是慢长的。持续性疼痛的动物模型是通过外周组织损伤(炎性痛)或者是外周神经损伤(神经病理性痛)引起的。外周痛敏导致动物的痛觉超敏状态, 例如自发痛以及异常痛敏包括

热痛敏以及机械痛敏。痛觉超敏也被称为异常痛敏。例如，动物正常状态下并不对丙酮或低强度的 von Frey 产生反应。然而，在神经损伤后却对这两种物质产生强烈的痛觉反应。

1. 外周痛觉产生以及维持

手术伤口带来的组织损伤或者注射化学物质（例如，辣椒素，福尔马林，蜂毒或完全弗氏佐剂）产生炎性痛以及持续的疼痛状态^[14]。疼痛超敏状态源自炎性介质的产生以及释放例如 PGE₂，白三烯，ATP，质子，神经生长因子（NGF）以及非神经细胞和初级感觉神经末梢产生的前炎性物质例如 TNF- α 以及 IL-1 β 。在神经损伤后，这些物质从施万细胞以及受损神经末梢被释放出来^[15]。而初级感觉神经元包含了上述炎性物质的受体例如 G 蛋白偶联受体，离子通道受体，激酶受体^[16,17]。重要的是，这些炎性介质在疼痛超敏过程中不但都有参与而且其分子机制也已经得到了深入研究^[6,7,10,11,16-18]。

DRG 初级感觉神经元被分成两类：有髓以及无髓。大多数的 DRG 神经元（大约 70%）是无髓神经纤维（C 纤维）。这些无髓神经纤维进一步分成肽能神经元（占全部神经元的 40%）表达 CGRP、P 物质以及 NGF 受体 TrKA 和非肽能神经元（占全部 DRG 神经元的 30%）表达 IB4 以及 GDNF 受体 c-ret^[19-21]。根据神经化学物质的特性，大部分的 DRG 神经元是伤害性感受器，包括（1）位于皮肤以及肌肉的外周神经末梢，（2）外周神经纤维（例如坐骨以及隐神经），（3）DRG 细胞胞体，（4）背角的中枢神经纤维以及（5）脊髓的中枢纤维末梢。尽管外周敏化在神经末梢以及脊髓水平上受到很好的研究，但其发生其实是存在于整个痛觉传导途径中。伤害性受体表达很多种离子通道例如 TRP 通道（TRPV1-V4, TRPA1, TRPM8）^[4-6]，ATP 受体 P2X₃^[22,23]，酸敏感通道（ASIC1-4）^[24]，TTX 敏感的 Na⁺通道（TTX-S，例如 Na_v1.1, Na_v1.2, Na_v1.3, Na_v1.6, 以及 Na_v1.7）以及 TTX 不敏感 Na⁺通道（TTX-R，例如 Na_v1.8 以及 Na_v1.9）^[25-28]，以及很多种钙离子通道^[29]和钾离子通道^[30]。而值得注意的是，这些通道的敏感性都会受到炎性介质的调控^[6,7,17]。

目前的研究集中在两种通道上，TRP 通道特别是 TRPV1（辣椒素受体-1（VR1）），能够将细胞外刺激转变成细胞膜的电活动^[6,7]，以及 Na⁺通道，特别是 TTX-RNa⁺通道对于动作电位的传导十分重要^[25-27]，其他例如 TRPA1^[31]，Na_v1.7^[32]，以及嘌呤受体例如 P2X₃^[22,23]也得到了深入的研究。TRPV1 表达在 C 伤害性神经纤维上并参与热痛敏的产生过程^[6]。由缓激肽^[33]，NGF^[33]，TNF- α ^[34]，CFA^[35]以及卡拉胶^[36]等物质诱导的炎性热痛超敏现象不会出现在 TRPV1 敲出鼠。而持续的炎症状态会增加 DRG 神经元上 TRPV1 的表达^[37]。导致疼痛的外周传入依赖于电压门控性的 Na⁺通道。尽管快速激活的 TTX-SNa⁺通道可能足够传导动作电位，伤害性受体上 TTX-RNa⁺通道（Na_v1.8 和 Na_v1.9）的特异表达^[39]并且其慢激活以及慢失活的特性都介导了组织损伤后伤害性受体的持续兴奋性状态^[25-27]。TRPV1 以及 TTX-R Na⁺通道的敏感性以及超敏性状态在外周痛敏以及持续性

疼痛状态起到重要作用^[6,25-27,33,34,36-38]。

通过磷酸化能够快速（数分钟内）调节这些通道的敏感性，TRPV1 有多个蛋白激酶的磷酸化位点^[11]。然而，转录后调节常需要数小时及数天的时间，导致前伤害性分子的表达增加，从而维持外周敏化状态增加疼痛现象。组织损伤以及持续性炎症可以引起伤害性受体中多种前伤害性基因的表达增加，例如编码 P 物质，CGRP，BDNF，TRPV1 以及 $\text{Na}_v1.8$ 的基因^[17,37]。这些肽的基因表达改变都依赖 NGF，然而那些非肽类受体改变可能依赖 GDNF^[17,20]。在神经损伤后，DRG 神经元基因转录更加活跃以及复杂^[40,41]，部分是由于神经退化以及再生的不同过程。很多改变例如 DRG 神经元的钙离子通道的 $\alpha2\delta$ 亚基^[42]以及 Na^+ 通道的 $\beta2$ 亚基^[43]的上调参与了神经病理性痛敏过程。

重要的是，感觉神经的快速翻译以及慢速转录调节需要通过细胞内信号传导途径激活多种蛋白激酶。

2. 经典蛋白激酶信号传导通路以及外周敏化

蛋白激酶 A(PKA)通过第二信使 cAMP 活化。激活伤害性末梢的 PKA 能够产生痛觉异常，因为皮下注射 cAMP 的类似物或者腺苷酸环化酶激活剂产生外周痛敏以及痛觉异常^[10,44,45]。炎症后的痛觉异常状态需要外周 PKA 的参与^[10,44,45]。cAMP/PKA 级联反应增强 PGE_2 介导的 TRPV1^[46]以及 TTX-R Na^+ ^[47]电流。PKA 也通过磷酸化直接阻止 TRPV1 的脱敏化^[11,48]。相反，阿片受体激动剂吗啡通过抑制腺苷酸环化酶以及 PKA 介导的 TRPV1 反应产生持续的镇痛作用^[49]。PKA 调节慢性压迫性 DRG 神经元的自发活动并参与 TNF- α 介导的 C 神经纤维的放电现象^[50,51]。虽然，普遍认为 cAMP 反应受到 PKA 的调节，PKA 并不介导所有的 cAMP 的反应。其他的蛋白激酶可能也参与其中。例如 cAMP 能激活 Epac(直接通过 cAMP 交换蛋白)，一种鸟嘌呤核苷酸交换因子，导致 $\text{PKC}\epsilon$ 的激活^[10]。

外周敏化过程中 PKC 作用得到了进一步的研究。伤害性神经末梢中 PKC 的激活参与痛觉异常的产生^[52]。PKC 能敏化 TRPV1^[11,53]以及 TTX-R Na^+ 通道^[47]。特别的是， $\text{PKC}\epsilon$ ，一种钙离子依赖性的 PKC 家族成员，能到达伤害性感受器细胞膜并受到如缓激肽以及 P 物质等炎性介质刺激后在炎性以及神经病理性痛外周敏化过程中起重要作用^[10,54,55]。实际上，TRPV1 的敏化需要 $\text{PKC}\epsilon$ 介导的磷酸化^[10,11,56]参与。其他 PKC 异构体例如 $\text{PKC}\delta$ ^[57]以及 $\text{PKC}\mu$ ^[58]在 TRPV1 敏化过程中起重要作用。

相较而言，对通过一氧化氮/cGMP 途径激活的 PKG 的作用了解较少^[10]。一氧化氮/cGMP 通路在疼痛调节的角色很矛盾，从痛觉超敏^[59,60]到镇痛^[61,62]，其数量以及空间分布^[11]都有不同。然而，神经损伤能上调 DRG 神经元的一氧化氮合酶^[63]。在海兔感觉神经元，PKG 偶联细胞外信号调节激酶(ERK)通路并参与神经干切断引起的长期超兴奋状态^[64]。特别是，GTP 环化酶通过合成四氢蝶呤，一种重要的一氧化氮合成辅助因子^[65]

参与外周神经病理性以及炎性痛过程。

3. MAPK 信号通路以及外周敏化

MAPKs 是进化上保留的分子家族的成员并在细胞信号转导过程中起重要作用。包括三个主要的成员: ERK((ERK1/2 或 p44/42 MAPK), p38, JNK, 代表 3 种不同的信号级联反应。MAPK 将广泛的细胞外刺激转变成不同的细胞内反应^[66-69]。虽然 ERK 最初参与有丝分裂, 增殖, 分裂以及哺乳动物细胞的生存过程, 但后来发现在调节神经可塑性以及炎症反应中也有重要作用^[66,70]。P38 以及 JNK 是典型的通过细胞应激反应(紫外线照射, 渗透性休克, 热休克), 脂多糖以及前炎症性细胞因子例如 TNF- α 以及 IL-1 β ^[70] 被激活的。MAPKs 通过上游激酶的磷酸化激活。值得注意的是, 不像其他的激酶, 相对特异性的抗体使得研究 MAPK 通路的功能成为可能。使用多种抑制剂抑制三条 MAPK 通路能够减少组织以及神经损伤后带来的持续性疼痛状态^[67-69]。

ERK 的激活需要连续性的级联反应的参与, 包括 Ras, Raf, MEK, 以及 ERK^[66]。作为生长因子的主要效应器, ERK 在 DRG 上被 NGF 激活^[71]。不同于胚胎的 DRG 神经元, 成熟的 DRG 神经元不需要 NGF 维持存活, 但需要 NGF 来维持伤害性受体表型^[20]。作为炎症组织产生的炎症因子, NGF 也能敏化伤害性受体以及离子通道(例如, TRPV1 以及 TTX-Na⁺通道)^[72]。不同于作用在高亲和性的 TrKA 受体, 高浓度的 NGF 也能通过第二信使神经酰胺结合于低亲和性的 p75 受体来敏化 TTX-RNa⁺电流^[73]。使用 MEK1/2 抑制剂 PD98059 阻断 ERK 级联反应, 能够废除 NGF 依赖性的辣椒素敏感现象^[74], 但此结果没有在其他研究中证实^[75]。需要指出的是 MEK 抑制剂 PD98059 需要足够的预处理时间(>20min) 达到理想的透膜状态。实验证明活化的 ERK 参与 NGF 介导的 TRPV1 敏化以及热超敏反应^[71]。ERK 不但能在中枢背角神经元^[76]以及外周 DRG 神经元被生长因子以及伤害性反应激活^[68]。而且辣椒素通过 C 神经纤维也能导致 DRG 神经元 ERK 快速并短暂的活化^[71]。不仅仅外周伤害性刺激后体内出现 ERK 的激活^[77], 伤害性受体的胞体以及神经末梢都发现了 ERK 的活化现象^[71,77]。此外 ERK 通路失活能减少辣椒素^[77], NGF^[71], 肾上腺素^[78]产生的热与机械痛敏现象。ERK 可能通过敏化 TRPV1 介导热超敏^[71]。有趣的是, 在正常状态 PGE2 引导的超敏现象是 ERK 非依赖性的。然而, 当先使用卡拉胶预处理阻组织, PGE2 引导的超敏现象需要依赖 ERK^[79], 说明伤害性感受器可塑性中 ERK 起到重要作用。除了前述的翻译后调节, ERK 也通过 DRG 神经元转录调节维持疼痛敏化现象^[68]。

p38 被细胞应激反应以及炎症介质激活^[70]。DRG 神经元的 p38 也是被伤害性活动活化^[80]。磷脂 A2 激活导致花生四烯酸转化为肾上腺素^[70]。进一步, 活化的 p38 被转移到细胞核, 使转录因子磷酸化并增加多种炎症因子的生物合成例如 TNF- α 和 IL-1 β ^[66,70,81]。磷酸化-p38(p-p38)即 p38 的活化状态, 正常表达在 10%-15%的 DRG 神经元^[37,82]。在外周炎症以及神经损伤后 DRG 神经元上 P-p38 表达增加^[37,82,83]。在神经损伤后, p38 不仅

在损伤的 DRG 神经元也在相邻的完整的神经元被激活^[82,84]。然而, TNF- α 参与早期的 p38 活化^[85,86], NGF 介导更持续的 p38 活化状态。重要的是, 鞘内注射 p38 抑制剂后能够抑制热以及冷超敏现象^[38,82,85]。NGF 在 p38 介导的热超敏现象中有着重要作用^[88]。靶源性的 NGF 能逆行到达 DRG 的胞体激活 p38, 导致 TRPV1^[37]以及 TRPA1^[87]的上调。P-p38 与 TRPV1 以及 TRPA1 共表达在 DRG 伤害性受体上, 并且通过 p38 抑制炎症后 TRPV1 以及 TRPA1 的上调^[37,87]。由于 TRPV1 蛋白水平的上升比 TRPV1mRNA 的上升水平更加明显, p38 通过翻译调控 TRPV1 的表达^[37], 尽管 p38 的转录^[66,89]以及转录后调节^[70,90]在其他方面的作用不可否认。

此外, p38 能通过快速的翻译后调节敏化伤害性受体。例如, 在分离的 DRG 神经元上 TNF- α 激活 p38 并快速增强 TTX-R Na⁺电流, 并且这种增强作用能被 p38 抑制剂 SB202190 阻断^[34]。

与 ERK 和 p38 相比, 在疼痛调解过程中 JNK 的作用却了解的很少。JNK 能被细胞应激反应例如热休克, 直接的 DNA 损伤, 以及活性氧所激活^[66], 并在细胞凋亡中起重要作用^[91]。神经损伤引导 DRG 伤害性感受器的 JNK 快速但短暂地激活^[92]。不同与 p38, JNK 只在受损的神经元中被激活^[82,92]。在 DRG 神经元上 JNK 的活化与细胞凋亡无关, 因为在神经损伤后神经凋亡在起初的数星期内被不引人注目^[93]。短暂的 JNK 活化与神经损伤后机械性异常痛敏的早期发展相关, 因为向 DRG 注入微量的 JNK 抑制剂 D-JNKI-1 能预防机械性异常痛敏但不能逆转其现象^[92]。下行通路中, JNK 能激活转录因子 c-Jun^[92,94], 导致多种包括 AP-1 结合位点的多个基因发生转录^[95]。不同于转录调节, JNK 也与快速的转录后调节相关。足底注射辣椒素, 内皮素-1, CFA, 或蜂毒产生的急性痛觉过敏现象能被 JNK 抑制剂 SP600125 抑制^[95,96-98]。

4. PI3K 信号通路以及外周敏化

PI3K 是一种油脂性激酶通过磷酸化磷脂酰肌醇产生 PI^[3,4,5], 作为膜嵌入式的第二信使丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt(也称为蛋白激酶 B)活化。Akt 被推测介导了大多数的 PI3K 参与的反应^[99]。活化过程受到 NGF 的影响, 例如, NGF 能明显的激活 DRG 神经元的 PI3K 通路^[71,100]。辣椒素也能通过增加 DRG 细胞内 Ca⁺激活 PI3K^[71]。进一步, 神经元的 Akt 的活化是活性依赖性的^[101]。组底注射 PI3K 抑制剂能防止 NGF 以及辣椒素介导的热超敏现象^[71]。与其一致的是, 在外周活化的 Akt 有助于辣椒素诱导的疼痛行为的产生^[102]。PI3K 参与了 NGF 介导的 TRPV1 的急性敏化状态^[71,100]。特别是, NGF 能导致 PI3K 和 Src 激酶的依次激活, Src 与 TRPV1 结合并磷酸化 TRPV1^[103]。TRPV1 的酪氨酸残基 Y200 被 Src 磷酸化导致 TRPV1 通道插入细胞膜表面, 进而产生 NGF 介导的 TRPV1 快速敏化现象^[103]。不同于急性痛敏现象, DRG 伤害性受体 PI3K 以及 Akt 也参与神经损伤介导的神经病理性痛的发展过程^[104]。

5. 总结

据统计慢性痛影响全球 20% 的人口。目前的治疗仅限于减轻疼痛症状。慢性痛是由初级感觉神经元的外周敏化所引起的，而此过程多是由组织损伤或者神经组织损伤后产生的炎性因子引起的。多种细胞内信号传导通路例如 PKC,PKA,PKG,PI3K 以及三条 MAPK 通路都被证实参与了外周敏化以及持续性疼痛的产生以及维持。其他的激酶通路例如 CaMK II^[105]以及 Cdk5^[106]可能也与之相关。这些激酶通路通过以下的机制起作用。首先，这些信号通路的快速翻译后调节导致 TRPV1, TTX-R Na⁺通道的磷酸化以及超兴奋状态，以及初级伤害性神经元的其他促疼痛分子，导致外周敏化以及超敏现象。第二，这三条通路的转录以及翻译导致伤害性受体的离子通道（例如，TRPV1 以及 TTX-R Na⁺通道）以及神经调质（例如，BDNF 以及 P 物质）的合成增加。尤其是，维持持续性疼痛的外周敏化状态。进一步，伤害性受体的也会受外来刺激影响发生改变，并且离子通道可能与这些通路有关^[103,107]。

尽管，这些信号通路与外周敏化同超敏状态相关，还有两个重要的问题仍未被解释。首先，每种通路在外周敏化过程中单独作用是什么？为了回答这个问题，在初级感觉神经元的信号通路的不同激活模式应该在同样的炎性介质或同样的损伤条件下进行相互比较。同样，不同通路的抑制作用应在同样的疼痛模型同一时间点上相互比较。更难的事情是阐释这些通路的分子机制（例如，重要的离子通道以及受体）。第二，这些信号传导通路间是否存在的相互作用以及相互影响？ERK 通路下调 PI3K^[71,100]，PKG^[64]，cAMP/Epac^[108]以及 PKA, PKC^[109,110]，说明该通路参与多条信号级联反应并起重要的作用。对于神经元的这些不同信号通路的相互作用的进一步研究对于揭示信号转导的本质以及验证有效的药物作用靶点十分重要。

神经元表达数百种离子通道以及 G 蛋白偶联受体参与外周敏化并成为新的镇痛药物的药物靶点。然而，考虑到数目庞大的受体以及离子通道，仅阻断单一的离子通道或受体产生的抗伤害性效应是十分有限的。而控制例如 MAPK 这种重要的信号传导通路能够调控多条通路以及受体的活性，可能成为更加有效管理疼痛的策略。维持正常的疼痛感觉通路很重要，因为生理性疼痛保护我们日常生活。总之，对初级感觉神经元使用抑制剂能阻断重要的信号传导通路能有效地从源头上处理非生理疼痛。也希望通过研究外周活性的激酶抑制剂减小这些抑制剂的副作用。

参考文献

- [1]Rau KK, Jiang N, Johnson RD, et al. Heat sensitization in skin and muscle nociceptors expressing distinct combinations of TRPV1 and TRPV2 protein. *J Neurophysiol* 2007;97:2651 - 2662.
- [2]Dhaka A, Earley TJ, Watson J, et al. Visualizing cold spots: TRPM8-expressing sensory neurons and their projections. *J Neurosci* 2008;28:566 - 575.
- [3]Xing H, Chen M, Ling J, et al. TRPM8 Mechanism of Cold Allodynia after Chronic Nerve Injury. *J Neurosci* 2007;27:13680 - 13690.
- [4]Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 2006;50:277 - 289.
- [5]Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 1999;398:436-441.
- [6]Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-210.
- [7]Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007;55:353-364.
- [8]Lumpkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 2007;445:858- 865.
- [9]Small SA, Cohen TE, Kandel ER, et al. Identified FMRFamide-immunoreactive neuron LPL16 in the left pleural ganglion of *Aplysia* produces presynaptic inhibition of siphon sensory neurons. *J Neurosci* 1992;12:1616-1627.
- [10]Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 2007;55:365-376.
- [11]Bhave G, Gereau RWt. Posttranslational mechanisms of peripheral sensitization. *J Neurobiol* 2004;61:88-106.
- [12]Ji RR, Kohno T, Moore KA, et al. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 2003;26:696-705.
- [13]Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 1996;64:493-501.
- [14]Stein C, Millan MJ, Herz A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;31:455-451.
- [15]Campana WM. Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun* 2007;21:522-527.
- [16]Ji RR, Strichartz G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. *Sci STKE* 2004;252:reE14.
- [17]Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7723-7730.
- [18]Nicol GD, Klingberg DK, Vasko MR. Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J Neurosci* 1992;12:1917-1927.

- [19]Averill S, McMahon SB, Clary DO, et al. Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci* 1995;7:1484–1494.
- [20]Snider WD, McMahon SB. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 1998;20:629–632.
- [21]Molliver DC, Radeke MJ, Feinstein SC, et al. Presence or absence of TrkA protein distinguishes subsets of small sensory neurons with unique cytochemical characteristics and dorsal horn projections. *J Comp Neurol* 1995;361:404–416.
- [22]Souslova V, Cesare P, Ding Y, et al. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* 2000;407:1015–1017.
- [23]Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh CC, et al. Painful purinergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324:409–415.
- [24]Alvarez de la Rosa D, Zhang P, Shao D, et al. Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:2326–2331.
- [25]Wood JN, Boorman JP, Okuse K, et al. Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol* 2004;61:55–71.
- [26]Lai J, Porreca F, Hunter JC, et al. Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:371–397.
- [27]Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA, et al. Sodium channels and the molecular pathophysiology of pain. *Prog Brain Res* 2000;129:3–19.
- [28]Berta T, Poirot O, Pertin M, et al. Transcriptional and functional profiles of voltage-gated Na⁺ channels in injured and non-injured DRG neurons in the SNI model of neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci* 2008;37:196–208.
- [29]Heinke B, Balzer E, Sandkuhler J. Pre- and postsynaptic contributions of voltage-dependent Ca²⁺ channels to nociceptive transmission in rat spinal lamina I neurons. *Eur J Neurosci* 2004;19:103–111.
- [30]Passmore GM, Selyanko AA, Mistry M, et al. KCNQ/M currents in sensory neurons: significance for pain therapy. *J Neurosci* 2003;23:7227–7236.
- [31]McMahon SB, Wood JN. Increasingly irritable and close to tears: TRPA1 in inflammatory pain. *Cell* 2006;124:1123–1125.
- [32]Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, et al. From genes to pain: Na(v)1.7 and human pain disorders. *Trends Neurosci* 2007;30:555–563.
- [33]Chuang HH, Prescott ED, Kong H, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 2001;411:957–962.
- [34]Jin X, Gereau RWt. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci* 2006;26:246–255.

- [35]Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306–313.
- [36]Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 2000;405:183–187.
- [37]Ji RR, Samad TA, Jin SX, et al. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 2002;36:57–68.
- [38]Luo H, Cheng J, Han JS, et al. Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. *Neuroreport* 2004;15:655–658.
- [39]Fang X, Djouhri L, Black JA, et al. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na_v1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci* 2002;22:7425–7433.
- [40]Hokfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z. Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* 1994;17:22–30.
- [41]Xiao HS, Huang QH, Zhang FX, et al. Identification of gene expression profile of dorsal root ganglion in the rat peripheral axotomy model of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:8360
- [42]Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, et al. Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001;21:1868–1875.
- [43]Pertin M, Ji RR, Berta T, et al. Upregulation of the voltage-gated sodium channel beta2 subunit in neuropathic pain models: characterization of expression in injured and non-injured primary sensory neurons. *J Neurosci* 2005;25:10970–10980.
- [44]Taiwo YO, Bjerknes LK, Goetzl EJ, et al. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience* 1989;32:577–580.
- [45]Kress M, Rodl J, Reeh PW. Stable analogues of cyclic AMP but not cyclic GMP sensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, *in vitro*. *Neuroscience* 1996;74:609–617.
- [46]Lopshire JC, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E₂ enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* 1998;18:6081–6092.
- [47]Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and their role in PGE₂-induced sensitization of rat sensory neurons *in vitro*. *J Neurosci* 1998;18:10345–10355.
- [48]Bhave G, Zhu W, Wang H, et al. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 2002;35:721–731.
- [49]Vetter I, Wyse BD, Monteith GR, et al. The mu opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol Pain* 2006;2:22.

- [50]Hu SJ, Song XJ, Greenquist KW, et al. Protein kinase A modulates spontaneous activity in chronically compressed dorsal root ganglion neurons in the rat. *Pain* 2001;94:39–46.
- [51]Zhang JM, Li H, Liu B, et al. Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 2002;88:1387–1392.
- [52]Souza AL, Moreira FA, Almeida KR, et al. In vivo evidence for a role of protein kinase C in peripheral nociceptive processing. *Br J Pharmacol* 2002;135:239–247.
- [53]Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 2000;408:985–990.
- [54]Khasar SG, Lin YH, Martin A, et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron* 1999;24:253–260.
- [55]Zhang H, Cang CL, Kawasaki Y, et al. Neurokinin-1 receptor enhances TRPV1 activity in primary sensory neurons via PKCepsilon: a novel pathway for heat hyperalgesia. *J Neurosci* 2007;27:12067–12077.
- [56]Mandadi S, Tominaga T, Numazaki M, et al. Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain* 2006;123:106–116.
- [57]Obreja O, Biasio W, Andratsch M, et al. Fast modulation of heat-activated ionic current by proinflammatory interleukin 6 in rat sensory neurons. *Brain* 2005;128:1634–1641.
- [58]Wang Y, Kedei N, Wang M, et al. Interaction between protein kinase C and the vanilloid receptor type 1. *J Biol Chem* 2004;279:53674–53682.
- [59]Aley KO, McCarter G, Levine JD. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J Neurosci* 1998;18:7008–7014.
- [60]Holthusen H, Arndt JO. Nitric oxide evokes pain at nociceptors of the paravascular tissue and veins in humans. *J Physiol* 1995;487 (Pt 1):253–258.
- [61]Duarte ID, dos Santos IR, Lorenzetti BB, et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol* 1992;217:225–227.
- [62]Cunha FQ, Teixeira MM, Ferreira SH. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1999;127:671–678.
- [63]Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 1993;335:563–575.
- [64]Sung YJ, Walters ET, Ambron RT. A neuronal isoform of protein kinase G couples mitogen-activated protein kinase nuclear import to axotomy-induced long-term hyperexcitability in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurosci* 2004;24:7583–7595.
- [65]Tegeeder I, Costigan M, Griffin RS, et al. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat Med* 2006;12:1269–1277.

- [66]Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, et al. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a threekinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999;79:143–180.
- [67]Ji RR. Mitogen-activated protein kinases as potential targets for pain killers. *Curr Opin Investig Drugs* 2004;5:71–75.
- [68]Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci* 2004;74:2643–2653.
- [69]Ji RR, Kawasaki Y, Zhuang ZY, et al. Protein kinases as potential targets for the treatment of pathological pain. *Handb Exp Pharmacol* 2007;177:359–389.
- [70]Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 2001;8:1–10.
- [71]Zhuang ZY, Xu H, Clapham DE, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J Neurosci* 2004;24:8300–8309.
- [72]Nicol GD, Vasko MR. Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? *Mol Interv* 2007;7:26–41.
- [73]Zhang YH, Vasko MR, Nicol GD. Ceramide, a putative second messenger for nerve growth factor, modulates the TTX-resistant Na⁺ current and delayed rectifier K⁺ current in rat sensory neurons. *J Physiol* 2002;544:385–402.
- [74]Ganju P, O’Bryan JP, Der C, et al. Differential regulation of SHC proteins by nerve growth factor in sensory neurons and PC12 cells. *Eur J Neurosci* 1998;10:1995–2008.
- [75]Shu X, Mendell LM. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *J Neurophysiol* 2001;86:2931–2938.
- [76]Ji RR, Baba H, Brenner GJ, et al. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat Neurosci* 1999;2:1114–1119.
- [77]Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, et al. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci* 2002;22:7737–7745.
- [78]Aley KO, Martin A, McMahon T, et al. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci* 2001;21:6933–6939.
- [79]Dina OA, McCarter GC, de Coupade C, et al. Role of the sensory neuron cytoskeleton in second messenger signaling for inflammatory pain. *Neuron* 2003;39:613–624.
- [80]Mizushima T, Obata K, Yamanaka H, et al. Activation of p38 MAPK in primary afferent neurons by noxious stimulation and its involvement in the development of thermal hyperalgesia. *Pain* 2005;113:51–60.
- [81]Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 1994;372:739–746.

- [82]Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2004;24:10211–10222.
- [83]Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 2003;23:4017–4022.
- [84]Xu JT, Xin WJ, Wei XH, et al. p38 activation in uninjured primary afferent neurons and in spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain induced by selective motor fiber injury. *Exp Neurol* 2007;204:355–365.
- [85]Schafers M, Svensson CI, Sommer C, et al. Tumor necrosis factor- α induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 2003;23:2517–2521.
- [86]Pollock J, McFarlane SM, Connell MC, et al. TNF- α receptors simultaneously activate Ca^{2+} mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology* 2002;42:93–106.
- [87]Obata K, Katsura H, Mizushima T, et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 2005;115:2393–2401.
- [88]Wilson-Gerwing TD, Dmyterko MV, Zochodne DW, et al. Neurotrophin-3 suppresses thermal hyperalgesia associated with neuropathic pain and attenuates transient receptor potential vanilloid receptor-1 expression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 2005;25:758–767.
- [89]Paul A, Cuenda A, Bryant CE, et al. Involvement of mitogen-activated protein kinase homologues in the regulation of lipopolysaccharide-mediated induction of cyclo-oxygenase-2 but not nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages. *Cell Signal* 1999;11:491–497.
- [90]Mahtani KR, Brook M, Dean JL, et al. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor α mRNA stability. *Mol Cell Biol* 2001;21:6461–6469.
- [91]Chitnis NS, D’Costa SM, Paul ER, et al. Modulation of iridovirus-induced apoptosis by endocytosis, early expression, JNK, and apical caspase. *Virology* 2008;370:333–342.
- [92]Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance. *J Neurosci* 2006;26:3551–3560.
- [93]Kuo LT, Simpson A, Schanzer A, et al. Effects of systemically administered NT-3 on sensory neuron loss and nestin expression following axotomy. *J Comp Neurol* 2005;482:320–332.

- [94]Kenney AM, Kocsis JD. Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia in vivo. *J Neurosci* 1998;18:1318–1328.
- [95]Gao YJ, Ji RR. Activation of JNK pathway in persistent pain. *Neurosci Lett*. 2008(in press)
- [96]Doya H, Ohtori S, Fujitani M, et al. c-Jun N-terminal kinase activation in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335:132–138.
- [97]Motta EM, Calixto JB, Rae GA. Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:1141–1145.
- [98]Cao FL, Liu MG, Hao J, et al. Different roles of spinal p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways in bee venom-induced multiple pain-related behaviors. *Neurosci Lett* 2007;427:50–54. [PubMed:17923327]
- [99]Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–1274.
- [100]Zhu W, Oxford GS. Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1. *Mol Cell Neurosci* 2007;34:689–700.
- [101]Pezet S, Spyropoulos A, Williams RJ, et al. Activity-dependent phosphorylation of Akt/PKB in adult DRG neurons. *Eur J Neurosci* 2005;21:1785–1797.
- [102]Sun R, Yan J, Willis WD. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. *Neuroscience* 2007;144:286–294.
- [103]Zhang X, Huang J, McNaughton PA. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heatgated ion channels. *Embo J* 2005;24:4211–4223.
- [104]Xu JT, Tu HY, Xin WJ, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol* 2007;206:269–279.
- [105]Price TJ, Jeske NA, Flores CM, et al. Pharmacological interactions between calcium/calmodulin-dependent kinase II alpha and TRPV1 receptors in rat trigeminal sensory neurons. *Neurosci Lett* 2005;389:94–98.
- [106]Yang YR, He Y, Zhang Y, et al. Activation of cyclin-dependent kinase 5(Cdk5) in primary sensory and dorsal horn neurons by peripheral inflammation contributes to heat hyperalgesia. *Pain* 2007;127:109-120.
- [107]Zhang X, Bao L, Guan JS. Role of delivery and trafficking of delta-opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:324–329.
- [108]Monaghan TK, Mackenzie CJ, Plevin R, et al. PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J Neurochem* 2008;104:74–88.
- [109]Kawasaki Y, Kohno T, Zhuang ZY, et al. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci* 2004;24:8310–8321.

[110]Hu HJ, Gereau RWt. ERK integrates PKA and PKC signaling in superficial dorsal horn neurons. II. Modulation of neuronal excitability. *J Neurophysiol* 2003;90:1680–1688.

致谢

顿笔于此，感慨万千，三年的求学经历历历在目，终生难忘。值此论文完稿之际，谨以最诚挚的感谢献给三年来指导、帮助和关心我的师长、朋友和亲人。

首先衷心感谢导师司军强教授三年来对我的悉心培养和和谆谆教诲，在我硕士学习的三年中，司军强教授在我的课题、实验设计的实施以及论文修改等方面倾注了大量的心血和汗水，在学习、生活及成长等方面给予我无微不至的关怀。您对事业的执着追求，严谨的治学态度和勇于开拓的精神，是我终身学习的楷模；严谨务实的态度和乐观积极的处世风范使我受益匪浅；生活中的为人正直热情，宽以待人，是我一生学习的榜样！您的教诲我将永远铭记在心，终身难忘。

衷心感谢马克涛老师、李丽老师在选题与课题设计过程中给予的无私的关怀和帮助，从论文的选题、实验设计到论文的实施及写作都是在他们的悉心指导下完成的。感谢马克涛老师、李丽老师在实验过程当中细心指点，在实验遇到困难时提出的宝贵意见以及论文写作中的指点。感谢赵磊老师在电生理实验仪器维护、维修方面对本人的帮助，使研究工作得以顺利进行。他们严谨求实的治学态度、敏锐丰富的科研思维、孜孜不倦的工作态度、简朴正直的生活作风都将使我受益终生，他们给予的帮助是遇到的问题迎刃而解。

感谢朱贺老师、王洋老师、魏丽丽老师、于秀石老师，师兄樊超、张传林，师姐杨越、陈梦洁、从丽娜、王洋、王蕊、梁建娥，同学张文雯、田伟伟、王艳萍、田镇溥、刘欢、张治平，师妹钱燕飞、薛文静等对本人的帮助，感谢他们对我工作及生活上的支持、关心和帮助。

真心感谢我的父母及家人给予的无私资助及对我学业的关心，使我解除了许多后顾之忧，有了前进的动力，并能顺利完成学业。

最后谨向所有教导过我的师长、鼓励过我的前辈、帮助过我的老师和朋友、患难与共的同窗，支持我的大学和医学院的各级领导一并表示衷心的感谢。

作者简介

芦碧含，女，生于 1988 年 4 月，籍贯大庆。2006 年考入吉林大学白求恩医学院，学习五年，2011 年毕业获得医学学士学位。2012 年考入石河子大学医学院麻醉专业，攻读硕士研究生，研究方向疼痛机制。

学历与经历


2003 年 9 月—2006 年 6 月	大庆市第四中学
2006 年 9 月—2011 年 6 月	吉林大学白求恩医学院
2012 年 9 月—2015 年 6 月	石河子大学医学院

研究生期间的研究成果

1. 芦碧含 张文雯 马克涛 李丽 司军强 《炎症性痛大鼠背根神经节神经元动作电位的改变》中国疼痛医学杂志 已录用

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	芦碧含	学制	三年
专业	麻醉学	研究方向	疼痛机制研究
学术评语: <p>本实验探讨炎性痛模型鼠 L5-L6 背根神经节中小型神经元动作电位的时空特性的改变。采用足底注射福尔马林试剂模拟炎性痛模型,使用酶机械方法分离单个 DRG 神经元细胞。使用电流钳技术记录中小型神经元动作电位的改变。并分析炎性痛模型鼠 DRG 神经元动作电位各参数的改变,比较炎性痛初级感觉神经元兴奋性的变化情况,分析其可能的原因。</p> <p>该课题选题新颖,基础理论强,实验设计合理,技术方法先进,数据翔实,结果可靠,结论可信。论文机构严谨,逻辑性强,书写流畅,条理清楚,观点明确。</p> <p>纵观实验的研究以及综述的撰写,体现作者具有本学科扎实的理论基础以及系统的专业知识,具有较好的从事科研的能力。</p> <p>综上,该论文内容丰富,具有较高的理论价值,为进一步研究炎性痛的机制提供理论依据。完全符合硕士研究生答辩标准。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字: </p> <p style="text-align: right;">2015 年 6 月 8 日</p>			