

· 实验研究 ·

CaM/CaMK-Ⅱ 信号通路在小鼠炎性痛中的作用

王丹 王爱桃 姚尚龙 杜晓冰 董海云

【摘要】 目的 探讨钙调蛋白/钙调素依赖蛋白激酶Ⅱ(CaM/CaMK-Ⅱ)信号通路在 C57BL/6 小鼠炎性痛中的作用。**方法** 选取体重 25~27 g 的雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,随机分为对照组(C 组)、完全弗氏佐剂(CFA)组(F 组)和 KN-93+CFA 组(KF 组),每组 20 只。C 组小鼠右侧后爪趾底注射生理盐水 50 μ l, F 组注射 50 μ l CFA 制备炎性痛模型, KF 组注射 CFA 前 30 min 鞘内注射 DMSO 稀释的终浓度为 10 mmol/L 的 KN-93。分别于右侧后爪趾底注射前 30 min、注射后 1 h 和 4 h 测定小鼠热刺激缩足潜伏期(TWL);取小鼠脊髓组织,采用 Western blot 法检测 p-CaMK-Ⅱ、p-CREB、c-fos 蛋白含量;RT-PCR 法检测 CaMK-Ⅱ、CREB、c-fos 基因表达。**结果** 注射后 1 h 和 4 h, F 和 KF 组 TWL 明显短于 C 组,但 KF 组明显长于 F 组($P<0.05$);F 组和 KF 组脊髓组织 p-CaMK-Ⅱ、p-CREB 及 c-fos 蛋白含量和基因表达量均明显高于 C 组,但 KF 组明显低于 F 组($P<0.05$)。**结论** CaM/CaMK-Ⅱ 信号通路参与小鼠炎性痛的发生与发展。

【关键词】 钙调蛋白/钙调素依赖蛋白激酶Ⅱ;环磷酸腺苷效应元件结合蛋白;c-fos;炎性痛

The role of CaM/CaMK-Ⅱ signaling pathways in inflammatory pain in mice WANG Dan, WANG Aitao, YAO Shanglong, DU Xiaobing, DONG Haiyun. Department of Anesthesiology, Inner Mongolia Autonomous Region People's Hospital, Hohhot 010017, China
Corresponding author: WANG Aitao, Email: tjxhmzk@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of CaM/CaMK-Ⅱ signaling pathways in inflammatory pain in mice. **Methods** Sixty male C57BL/6 mice, weighing 25-27 g, were randomly divided into 3 groups ($n=20$): control group (group C), complete Freund's adjuvant (CFA) group (group F) and KN-93+CFA group (group KF). Saline 50 μ l were injected into the right side of the claw in group C. CFA 50 μ l were injected into the right claw foot for the preparation of inflammatory pain models in group F. KN-93 45 nmol was injected i. c. v. 30 min before CFA injection in group KF. The thermal withdrawal latency (TWL) were measured 30 min before injection, 1 h and 4 h after injection. The protein expressions of CaMK-Ⅱ, c-fos and CREB in the spinal cord were measured at above time by Western blot. **Results** Compared with group C, TWL were lower in groups F and KF 1 h and 4 h after injection ($P<0.05$). Compared with groups F, TWL in group KF were higher 1 h and 4 h after injection ($P<0.05$). Compared with group C, the protein expressions of p-CaMK-Ⅱ, p-CREB, c-fos and mRNA expression of CaMK-Ⅱ, CREB, c-fos were higher in group F and KF 1 h and 4 h after injection ($P<0.05$). Compared with group F, the protein expression of p-CaMK-Ⅱ, p-CREB, c-fos and mRNA expressions of CaMK-Ⅱ, CREB, c-fos in group KF were lower 1 h and 4 h after injection ($P<0.05$). **Conclusion** CaM/CaMK-Ⅱ signaling pathways involved in inflammatory pain in mice.

【Key words】 CaM/CaMK-Ⅱ; CREB; c-fos; Inflammation pain

炎性痛是临床上常见的一种慢性痛,机体发生损伤或炎症时,组织释放出炎性介质作用于初级疼痛感受器及 C 纤维,启动一系列的信号通路,引起脊髓伤害性神经元的兴奋性增强,产生痛觉过

敏^[1]。临床表现主要包括痛阈下降、痛反应增强及自发性疼痛^[2]。目前的观点认为:炎性痛主要由外周和中枢敏化共同作用引起^[3]。研究表明,炎性痛时细胞内 Ca^{2+} 相关级联反应所引起的伤害性感受器敏化促进炎性痛的发生^[4],而钙调蛋白/钙调素依赖蛋白激酶Ⅱ(CaM/CaMK-Ⅱ)在 Ca^{2+} 敏感的信号通路中起主导作用^[5]。且炎症发生时,脊髓背角的兴奋性氨基酸释放增多,增加细胞内 Ca^{2+} 浓度,可激活 CaMK-Ⅱ,提示其可能参与炎性痛的

基金项目:内蒙古自治区人民医院博士科研启动资金(BS201511)

作者单位:010017 呼和浩特市,内蒙古自治区人民医院麻醉科(王丹、王爱桃、杜晓冰);华中科技大学附属武汉协和医院(姚尚龙);内蒙古医科大学研究生院(董海云)

通信作者:王爱桃,Email:tjxhmzk@163.com

形成。因此,本研究应用 CaMK-II 的选择性抑制剂 KN-93^[6],探讨 CaM/CaMK-II 信号通路在小鼠炎性痛发生发展中的作用。

材料与方法

实验动物与分组 本实验小鼠均由内蒙古医科大学微生物免疫学实验室提供,并通过动物保护协会批准,在本院伦理委员会监督下进行。选择 C57BL/6 小鼠 60 只,体重 25~27 g,室温 22~24℃,昼夜交替,自由进食水,适应环境 3 d,并随机分为对照组(C 组)、完全弗氏佐剂(CFA)组(F 组)和 KN-93+CFA 组(KF 组),每组 20 只。

炎性痛模型的制备和鞘内给药 C 组小鼠右侧后爪趾底注射生理盐水 50 μ l。F 组小鼠于右侧后爪趾底注射 CFA(批号:F5881)50 μ l 制备炎性痛模型^[7]。KF 组小鼠右侧后爪趾底注射 CFA 前 30 min 鞘内注射 45 nmol KN-93(批号:sc-202199)。鞘内给药:以双侧骶骨前缘连线中点(L₅ 棘突)为穿刺点,局部剪毛并消毒。使用 10 μ l 微量加样器与脊柱上方成 20°进针,针尖进入一侧棘突、横突间组织后 10°继续缓慢进针,进针深度约为 4 mm,鼠尾突然出现侧向运动,提示穿刺成功,30 s 内注完 KN-93 45 nmol,停留 30 s 后缓慢退针^[8]。

热刺激缩足潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL) 小鼠均处于 20~25℃ 安静环境下,分别于注射前 30 min、注射后 1 h 和 4 h 测定小鼠 TWL。采用热痛测试仪照射足跖部中后 1/3 处,从照射到发生缩爪反应的时间即为 TWL,连续测定 3 次,每次间隔 5 min,取其平均值。

标本取材 各组分别于注射前 30 min、注射后 1 h 各处死 5 只小鼠,注射后 4 h 处死 10 只小鼠,在冰上取 L₅ 脊髓组织,-80℃ 冰箱冻存,用于蛋白和基因的测定。

脊髓组织 p-CaMK-II、p-CREB 及 c-fos 蛋白含量的测定 将脊髓组织研磨匀浆,取上清,测定蛋白含量。采用图像分析软件分析目的条带灰度值,以各蛋白灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值反映各蛋白含量。

脊髓组织 CaMK-II、CREB 及 c-fos 基因表达的测定 采用 TRIZOL 法提取总 RNA,检测总 RNA 的浓度和纯度。并以总 RNA 为模板,使用 RevertAid 1st cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒(Thermo K1622)合成 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 Palmer 5.0 引物设计软件设计引物。使用

Maxima SYBR Green/ROX Qpcr Master Mix(: K0221)试剂,于 ABI7500 中按程序进行 RT-PCR。循环 40 次。CaMK-II 的引物序列:正义 5'-CACC-CGCTTCACCGACGACTA-3',反义 5'-TGTTT-GGATGTTTCAGAAGTCGG-3'。CREB 引物序列:正义 5'-GCACCATTGCCCTGGAGTT-3',反义 5'-GGTGAAGACCGTGTCAGGAG-3'。c-fos 的引物序列:正义 5'-GTGCCCCGAGTTAGT-GCCTGTT-3',反义 5'-CATTCATCTTCTTCTG-GGGTCTGA-3'。基因表达用倍数变化来表示($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)。

统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件包处理数据。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

与注射前 30 min 比较,注射后 1 h 和 4 h, F 组和 KF 组 TWL 明显缩短,且明显短于 C 组,但 KF 组 TWL 明显长于 F 组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 三组小鼠不同时点 TWL 的比较($s, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	注射前 30 min	注射后 1 h	注射后 4 h
C 组	5	11.2 $\pm$ 0.3	11.5 $\pm$ 0.3	11.7 $\pm$ 0.2
F 组	5	12.1 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.3 ^{ab}	5.2 $\pm$ 0.1 ^{ab}
KF 组	5	11.5 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.2 ^{abc}	7.5 $\pm$ 0.3 ^{abc}

注:与注射前 30 min 比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 F 组比较,^c $P < 0.05$

与注射前 30 min 比较,注射后 1 h 和 4 h, F 组和 KF 组脊髓组织 p-CaMK-II、p-CREB 及 c-fos 蛋白含量明显升高,且明显高于 C 组,但 KF 组明显低于 F 组($P < 0.05$)(表 2)。

与注射前 30 min 比较,注射后 1 h 和 4 h, F 组和 KF 组脊髓组织 CaMK-II、CREB 及 c-fos 基因表达量明显升高且明显高于 C 组,但 KF 组明显低于 F 组($P < 0.05$)(表 3)。

讨 论

CFA 注射是常用的炎性痛模型,CFA 注入后 2~4 h,小鼠便出现局部红肿等炎症反应,并逐渐出现痛行为学的改变,表现为热刺激痛觉过敏和行为的异常,其痛行为改变可持续 28 d^[9]。研究疼痛

表 2 三组小鼠脊髓组织 CaMK-Ⅱ、CREB、c-fos 蛋白含量的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	注射前 30 min	注射后 1 h	注射后 4 h
p-CaMK-Ⅱ	C 组	5	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	F 组	5	0.14 ± 0.02	0.62 ± 0.03 ^{ab}	0.73 ± 0.04 ^{ab}
	KF 组	5	0.11 ± 0.02	0.31 ± 0.02 ^{abc}	0.45 ± 0.02 ^{abc}
p-CREB	C 组	5	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.18 ± 0.01
	F 组	5	0.15 ± 0.01	0.40 ± 0.02 ^{ab}	0.75 ± 0.04 ^{ab}
	KF 组	5	0.10 ± 0.01	0.25 ± 0.01 ^{abc}	0.25 ± 0.02 ^{abc}
c-fos	C 组	5	0.21 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01
	F 组	5	0.24 ± 0.01	0.72 ± 0.03 ^{ab}	0.95 ± 0.10 ^{ab}
	KF 组	5	0.22 ± 0.01	0.41 ± 0.02 ^{abc}	0.50 ± 0.01 ^{abc}

注:与注射前 30 min 比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 F 组比较,^c $P < 0.05$

发病初期的信号通路,可以从源头上抑制疼痛的发生及发展,所以本研究的观察时点为注射前 30 min、注射后 1 h 及 4 h^[10]。

T 型 Ca^{2+} 离子通道是钙通道家族中重要的一员,又名低电压激活钙通道,在静息电位下就可以激活,阈下电位时 Ca^{2+} 就可以进入细胞内,进而增加细胞的兴奋性。在多种病理性疼痛情况下,例如炎症或神经损伤,T 型 Ca^{2+} 离子通道表达增多,参与痛觉的信号传递^[4]。而 CaMK-Ⅱ 在 Ca^{2+} 敏感的信号通路中起主导作用^[6]。CaMK-Ⅱ 是一种多功

能丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要表达于外周的背根神经节及中枢的脊髓,在外周和中枢水平都参与了伤害性刺激的感觉处理过程^[11]。研究显示, Ca^{2+} /CaM 结合到 CaMK-Ⅱ 亚单位上,首先触发 CaMK-Ⅱ 的磷酸化反应,同时促进 CaMK-Ⅱ 分子内第 286 位苏氨酸(Thr)的自身磷酸化,其磷酸化及自身磷酸化在疼痛信号转导中起了重要作用^[12, 13]。另有研究显示,神经病理性疼痛时,CaMK-Ⅱ 活化后会激活 CREB/c-fos 信号通路^[14],能够提高 CREB 转录的活性,调节靶基因的转录,参与形成痛觉的持续状态及痛觉过敏,而 KN-93 为 CaMK-Ⅱ 的选择性抑制剂^[6]。所以本实验检测了 CaM/CaMK-Ⅱ/CREB/c-fos 信号通路在促进炎性痛发生和发展中的作用。

本实验结果显示,CFA 注射可引起炎性痛及促进脊髓组织 CaMK-Ⅱ、CREB 及 c-fos 基因和 p-CaMK-Ⅱ、p-CREB 及 c-fos 蛋白表达上调,说明经典的致炎佐剂可以引起炎性痛及激活钙敏感的信号通路。有研究显示,抑制钙通道能够减轻炎性痛敏的状态^[15],减少胞内的 Ca^{2+} 释放可以缓解炎性痛^[16],这些研究说明钙通道相关的信号通路参与炎性痛的发生发展。而预先 30 min 给予 KN-93 阻断钙敏感的 CaMK-Ⅱ 信号通路,可降低 CFA 注射导致的炎性痛和脊髓组织 CaMK-Ⅱ、CREB 及 c-fos 基因和 p-CaMK-Ⅱ、p-CREB 及 c-fos 蛋白表达,提示 CFA 可通过 CaM/CaMK-Ⅱ 信号通路导致小鼠炎性痛。但是给予 CaMK-Ⅱ 的拮抗剂并没有完全

表 3 三组小鼠脊髓组织 CaMK-Ⅱ、CREB、c-fos 基因表达的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	注射前 30 min	注射后 1 h	注射后 4 h
CaMK-Ⅱ	C 组	5	1.00 ± 0.01	1.22 ± 0.08	1.16 ± 0.04
	F 组	5	1.00 ± 0.01	28.42 ± 4.21 ^{ab}	8.77 ± 1.58 ^{ab}
	KF 组	5	1.00 ± 0.01	6.74 ± 0.62 ^{abc}	4.72 ± 0.43 ^{abc}
CREB	C 组	5	1.00 ± 0.01	1.18 ± 0.09	1.22 ± 0.05
	F 组	5	1.00 ± 0.01	16.63 ± 1.61 ^{ab}	7.95 ± 0.82 ^{ab}
	KF 组	5	1.00 ± 0.01	5.78 ± 0.52 ^{abc}	3.72 ± 0.34 ^{abc}
c-fos	C 组	5	1.00 ± 0.01	1.26 ± 0.16	1.28 ± 0.11
	F 组	5	1.00 ± 0.01	18.54 ± 1.62 ^{ab}	8.88 ± 0.81 ^{ab}
	KF 组	5	1.00 ± 0.01	4.86 ± 0.36 ^{abc}	2.01 ± 0.23 ^{abc}

注:与注射前 30 min 比较,^a $P < 0.05$;与 C 组比较,^b $P < 0.05$;与 F 组比较,^c $P < 0.05$

逆转炎性痛和 CaMK-II、CREB 及 c-fos 基因和 p-CaMK-II、p-CREB 及 c-fos 蛋白表达,说明 CaM/CaMK-II 信号通路是 CFA 致炎性痛的机制之一。其他信号通路可能也会对炎性痛产生影响,其详细机制有待于进一步研究。

综上所述,CaM/CaMK-II 信号通路参与了氟氏佐剂所致炎性痛的发生发展。

参 考 文 献

- [1] Berrueta L, Muskaj I, Olenich S, et al. Stretching impacts inflammation resolution in connective tissue. *J Cell Physiol*, 2016, 231(7): 1621-1627.
- [2] Arnoux I, Audinat E. Fractalkine signaling and microglia functions in the developing brain. *Neural Plast*, 2015, 2015: 689404.
- [3] Bali KK, Venkataramani V, Satagopam VP, et al. Transcriptional mechanisms underlying sensitization of peripheral sensory neurons by granulocyte-/granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Mol Pain*, 2013, 9: 48.
- [4] Huang D, Liang C, Zhang F, et al. Inflammatory mediator bradykinin increases population of sensory neurons expressing functional T-type Ca^{2+} channels. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(2): 396-402.
- [5] Cai Q, Zhang B, Huang S, et al. The effects of prenatal stress on expression of CaMK-II and L- Ca^{2+} channel in offspring hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2011, 43(8): 601-606.
- [6] Faccidomo S, Reid GT, Agolia AE, et al. CaMKII inhibition in the prefrontal cortex specifically increases the positive reinforcing effects of sweetened alcohol in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res*, 2016, 298(Pt B): 286-290.
- [7] Wu XB, Liang B, Gao YJ. The increase of intrinsic excitability of layer V pyramidal cells in the prelimbic medial prefrontal cortex of adult mice after peripheral inflammation. *Neurosci Lett*, 2016, 611: 40-45.
- [8] Wang Y, Cheng X, Xu J, et al. Anti-hyperalgesic effect of CaMKII inhibitor is associated with downregulation of phosphorylated CREB in rat spinal cord. *J Anesth*, 2011, 25(1): 87-92.
- [9] Refsgaard LK, Hoffmann-Petersen J, Sahlholt M, et al. Modelling affective pain in mice: Effects of inflammatory hypersensitivity on place escape/avoidance behaviour, anxiety and hedonic state. *J Neurosci Methods*, 2016, 262: 85-92.
- [10] Hartung JE, Eskew O, Wong T, et al. Nuclear factor-kappa B regulates pain and COMT expression in a rodent model of inflammation. *Brain Behav Immun*, 2015, 50: 196-202.
- [11] Kadivar M, Farahmandfar M, Ranjbar FE, et al. Increased calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity by morphine-sensitization in rat hippocampus. *Behav Brain Res*, 2014, 267: 74-82.
- [12] 闫丽萍,侯保权,李守栋,等.电针对坐骨神经分支选择性损伤大鼠脊髓 CaMK II-CREB 通路的影响. *针刺研究*, 2015, 40(5): 358-363.
- [13] Buenrostro-Jauregui M, Ciudad-Roberts A, Moreno J, et al. Changes in CREB and deltaFosB are associated with the behavioural sensitization induced by methylenedioxypyrovalerone. *J Psychopharmacol*, 2016, 30(7): 707-712.
- [14] Yao YX, Zhang YF, Yang Y, et al. Spinal synaptic scaffolding protein Homer 1b/c regulates CREB phosphorylation and c-fos activation induced by inflammatory pain in rats. *Neurosci Lett*, 2014, 559: 88-93.
- [15] Garcia-Caballero A, Gadotti VM, Chen L, et al. A cell-permeant peptide corresponding to the cUBP domain of USP5 reverses inflammatory and neuropathic pain. *Mol Pain*, 2016, 12: 1-8.
- [16] Zhuang GZ, Keeler B, Grant J, et al. Carbonic anhydrase-8 regulates inflammatory pain by inhibiting the ITPR1-cytosolic free calcium pathway. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118273.

(收稿日期:2017-04-20)