

肉桂醛对0℃冷应激大鼠背根神经节神经细胞胞浆内Ca²⁺变化及TRPA1和TRPM8 mRNA表达的影响

康欣欣^{1,2}, 唐志鹏^{2*}, 王立娟², 吴中华³, 刘琳琳⁴

(1. 上海中医药大学中医文献研究所, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属龙华医院脾胃病研究所, 上海 200032; 3. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203; 4. 上海交通大学医学院附属第九人民医院北院, 上海 201999)

[摘要] 目的: 观察肉桂醛对0℃冷应激大鼠背根神经节神经细胞胞浆内Ca²⁺浓度变化, 并探讨其对瞬时受体电位通道蛋白A1(TRPA1)和M8(TRPM8)mRNA表达的影响。方法: 取大鼠原代背根节神经细胞置于0℃冷应激状态, 噻唑蓝(MTT)法检测不同时长冷应激状态下细胞的活性; 加入肉桂醛, 采用激光共聚焦显微镜观察细胞内外Ca²⁺分布的变化; 另以实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测其TRPA1, TRPM8 mRNA的表达。结果: 不同长时的冷应激状态下, 细胞存活度无明显差异; 冷应激可降低背根神经节(DRG)神经细胞胞浆内Ca²⁺浓度($P < 0.05$), 一定量的肉桂醛则能使Ca²⁺浓度显著升高($P < 0.01$)。Real-time PCR检测显示, 长时间冷应激TRPA1 mRNA表达上调($P < 0.05$); 长时间冷应激TRPM8 mRNA表达明显高于短时冷应激($P < 0.05$); 适当浓度的肉桂醛使冷应激大鼠DRG神经细胞TRPA1 mRNA表达升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 对TRPM8 mRNA的影响尚不明显。结论: 冷应激能影响TRPA1, TRPM8 mRNA的表达, 降低胞浆内Ca²⁺浓度, 作用机制可能为肉桂醛通过活化TRPA1通道, 升高胞浆内Ca²⁺浓度。

[关键词] 冷应激; 肉桂醛; 背根神经节; Ca²⁺; 瞬时受体电位通道蛋白A1; 瞬时受体电位通道蛋白M8

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0127-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017010127

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160929.0952.054.html>

[网络出版时间] 2016-09-29 9:52

Effect of Cinnamaldehyde on Ca²⁺ Change and TRPA1/TRPM8 mRNA Expressions in Dorsal Root Ganglia Cells of Rats with 0℃ Cold Stress

KANG Xin-xin^{1,2}, TANG Zhi-peng^{2*}, WANG Li-juan², WU Zhong-hua³, LIU Lin-lin⁴

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM) Literature Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 2. Gastroenterology Department in Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China; 3. Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China; 4. North Branch, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of cinnamaldehyde on Ca²⁺ concentration change in dorsal root ganglia cells of rats with 0℃ cold stress, and mRNA expressions of transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1 (TRPA1) and transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8 (TRPM8). **Method:** The rat dorsal root ganglion neuron cells were put in 0℃ cold stress to detect the activity of cells under the different time length of cold stress by the methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

[收稿日期] 20160324(008)

[基金项目] 上海中医药大学科研计划项目(778)

[第一作者] 康欣欣, 博士, 助理研究员, 从事中医药防治消化系统疾病研究, Tel: 021-64385700-9506, E-mail: atp_000@163.com

[通讯作者] *唐志鹏, 博士, 教授, 从事中医药防治消化系统疾病研究, Tel: 021-64385700-9506, E-mail: zhipengtang@sohu.com

assay. Cinnamaldehyde was added to detect the changes in intracellular Ca^{2+} distribution by the laser confocal microscopy. Furthermore, Real-time PCR method was used to measure the mRNA expression of TRPA1 and TRPM8. **Result:** There was no significant difference in cell viability under the different time length of cold stress. Cold stress decreased cytosolic Ca^{2+} concentration within dorsal root ganglia (DRG) neurons ($P < 0.05$), while a certain amount of cinnamaldehyde could make it significantly rise ($P < 0.01$). Real-time PCR method showed that under long-time cold stress, the mRNA expression of TRPA1 was up-regulated ($P < 0.05$). And the TRPM8 mRNA expression under long-time cold stress was clearly higher than that under short-time cold stress ($P < 0.05$). Cinnamaldehyde at the appropriate concentration can up-regulate the TRPA1 mRNA expression of rat DRG neurons under cold stress ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The effect of cinnamaldehyde on TRPM8 was unclear yet. **Conclusion:** The cold stress can impact TRPA1 and TRPM8, and decrease the cytosolic Ca^{2+} concentration. Its action mechanism is to activate TRPA1 channel and then increase the cytosolic Ca^{2+} concentration.

[**Key words**] cold stress; cinnamaldehyde; dorsal root ganglia (DRG); Ca^{2+} ; transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1 (TRPA1); transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8 (TRPM8)

温度敏感型瞬时受体电位感受器通道 (thermo transient receptor potential cation channel, thermo-TRP) 是广泛分布于细胞膜表面的一类与温度感知相关的非选择性阳离子通道^[1]。已经被确认与冷应激有关的 thermo-TRP 通道主要有瞬时受体电位通道蛋白 A1 (TRPA1)^[2], M8 (TRPM8)^[3]。其具有特殊的温度感应范围, 如 TRPA1 在温度 $< 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时^[4], TRPM8 在温度 $< 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时^[5], 可被无条件激活, 进而引发 Ca^{2+} 的内流, 细胞浆内 Ca^{2+} 浓度上升^[6]。 Ca^{2+} 作为第二信使^[7], 在细胞内和细胞间转运, 是神经冲动传递的重要的媒介。包括温度在内的多种特定外界刺激能通过细胞膜的去极化引发 Ca^{2+} 的转运, TRP 通道通过介导 Ca^{2+} 的转运引发细胞内的变构与耦合, 实现外界刺激对细胞内的影响^[8]。因此, 研究神经细胞中 Ca^{2+} 的分布转运及 TRP 通道的状况, 有助于了解神经细胞对特定应激所产生的应答, 比如温度应激对 Ca^{2+} 的分布转运情况。当前已将 TRP 通道纳入中医寒温病证及中药寒热药性本质的研究^[9-10], 隋峰等^[11-12] 研究表明, 寒热性中药对 TRPM8 及 TRPV1 功能的调节可能与中药的寒热药性相关, 而对于其机制尚未有明确的证据。

本实验采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞在不同时长冷应激状态下的细胞活性, 以共聚焦显微镜实时成像技术, 结合实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 方法研究冷应激状态以及肉桂醛处理对背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 神经细胞 Ca^{2+} 转运的影响及冷敏 thermo-TRP 通道中 TRPA1 及 TRPM8 mRNA 表达情况, 探讨冷应激和肉桂通过冷

敏 thermo-TRP 通道调控 Ca^{2+} 转运的机制, 为寒性疾病和热性药物的特征研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体重 50 g 左右, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 合格证号 SCXK(沪)2013-0016。大鼠适应性喂养 3 d 后开始实验。

1.2 仪器 DV4 quotation 型体视显微镜 (德国蔡司公司), Leica TCS SP8 型激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司), 311 型 CO_2 细胞培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), MDF-292 型低温冰箱 (日本 SANYO 公司), 7500fast 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 752 型紫外分光光度计 (上海第三分析仪器厂), synergy2 型酶标仪 (美国 Biotek 公司)。

1.3 试剂 F12 培养液, 热灭活马血清, L-谷氨酰胺, 青霉素 G/硫酸链霉素, fluo-4^{AM} (美国 Invitrogen 公司, 批号分别为 1674921, 26050088, 25030081, 15140122, F14201); 5-氟-2'-脱氧尿苷, 尿苷, 胶原酶 1A, 脱氧核糖核酸酶 I, 多聚赖氨酸, 肉桂醛 (美国 Sigma 公司, 批号分别为 F0503, 94370, C9891, D5025, P6407, WXBB1669V); Cultrex 层粘连蛋白 (美国 Trevigen 公司, 批号 340001001); MTT (上海日初生物科技有限公司, 批号 091205); 荧光定量 PCR 试剂盒, RNAiso Plus (日本 Takara 公司, 批号分别为 AK3501, AKA3502); 二甲基亚砜 (DMSO, 美国 Sigma 公司, 批号 BCBJ4508V); Trizol (日本 Takara 公司, 批号 AA3502-1); 引物由上海英俊生物科技有限公司提供, TRPA1 (110 bp): 上游 5'-CCTGTGAAGCGCTGAATGTA-3', 下游 5'-ATTTGCTC

CTTGGCTGAGAA-3'; TRPM8 (164 bp): 上游 5'-AGCTCTTCTCCACCCACTTC-3', 下游 5'-TTCCACATCCAAGTCTCCC-3'; β -actin (115 bp): 上游 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', 下游 5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'。

2 方法

2.1 试剂及配制 DRG 神经细胞培养液成分配比: F12 培养液 880 mL, 马血清 100 mL, 青霉素/链霉素 10 mL, L-谷氨酰胺 10 mL, 5-氟-2'-脱氧尿苷 300 mg, 尿苷酸 700 mg。以 0.22 μm 过滤器过滤细菌, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。肉桂醛溶液配制: 肉桂醛与无水 DMSO 混合配制成质量浓度为 0.14, 1.4, 14 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 常温避光密闭保存。

2.2 分离 DRG 神经细胞 CO_2 窒息处死大鼠, 分离脊柱, 用含 1% 双抗 Hanks Balanced Salt Solution-Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) 冲洗脊柱; 体视显微镜下, 摘取 DRG, 去除 DRG 两端神经索及表面包膜; 1.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 胶原酶液 3 mL 消化组织 2 次, 每次 45 min, 并置于培养箱内 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 温育; 将 DRG 转移至含 3 mg 无菌脱氧核糖核酸酶 I 的离心管中, 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min; 弃上清液, 重悬细胞至均匀无明显絮状物。

2.3 DRG 神经细胞培养 重悬细胞, 以台盼蓝液进行细胞计数, 调整细胞密度为 1×10^5 个/mL。将细胞接种于提前包被好的共聚焦专用 20 mm 培养皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养。2~3 d 换液 1 次。细胞培养 1 周左右, 见细胞体突触生长即可进入下一步实验。

2.4 冷应激温度选择 由于细胞对温度的敏感性, 即使在培养箱内设定细胞应激温度, 若检测时一旦离开所处温度, 细胞的状态就会发生变化。为避免温度起伏对细胞状态的影响, 细胞检测过程中涉及的激光应选择冷光源, 用白光场拍照应尽量缩短时间, 实验室环境温度保持 24 $^{\circ}\text{C}$ 。由于冰水混合物能稳定维持 0 $^{\circ}\text{C}$ 的物理特性, 因此将 0 $^{\circ}\text{C}$ 作为细胞冷应激温度。

2.5 MTT 检测冷应激对 DRG 细胞活性的影响 调整 DRG 细胞密度为 1×10^4 个/mL, 每孔 100 μL 接种于已经包被过的 96 孔培养板中, 待细胞贴壁并有突触生长时, 吸弃原有培养液, 加入 0 $^{\circ}\text{C}$ 培养液, 同时设置溶剂组 (0.1% DMSO), 每组设 4 个复孔。冷应激各组细胞置冰上培养, 时间设定为 10, 20, 30, 40, 50, 60 min, 终止冷应激后, 每孔加入 0.5% MTT 溶液 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 继续培养 4 h, 弃培养液,

每孔加入 DMSO 100 μL , 低速振荡 10 min, 在酶标仪上测定 570 nm 的吸光度 A 。

2.6 共聚焦显微镜观察荧光变化 以 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluo-4^{AM} 避光染色 30 min; 培养液缓慢冲洗 3 次。将培养皿置激光共聚焦显微镜上, 选定荧光显色良好的细胞视野, 氩离子激光预扫描, 按照以下条件设置显微镜: 激光波长 488 nm, 发射波长 516 nm; 扫描方式按照横坐标 x , 纵坐标 y , 及时间坐标 t 选择 xyt (拍照模式), xyt (时间扫描模式), 扫描密度 512×512 (分辨率); 物镜倍数 40; 电子放大倍数 (zoom) 1; 激光功率 1.4%; 时间间隔 5 s。

拍摄白光及荧光状况下照片, 根据预扫描的结果选取最清晰的焦平面进行扫描, 随机圈定细胞, 进行动态观察, 记录每个细胞的荧光强度变化, 并用随机软件自动记录。观测过程中先缓慢加入 0 $^{\circ}\text{C}$ 培养液 1 mL, 荧光值稳定后, 再缓慢注入 1 μL 肉桂醛溶液, 母液质量浓度 (0.14, 1.4, 14 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 由低到高选择, 观察荧光值变化, 选定 > 10 个细胞进行测量计算。所有试剂在有效剂量范围内经证明不产生荧光干扰, 染色条件和激光扫描参数在整个实验过程中不变。

细胞 Ca^{2+} 浓度变化以荧光强度值 (Intensity) 表示, 此数值与细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化成正相关。细胞 Ca^{2+} 浓度变化率 ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) 以给药前后荧光强度变化值与给药前荧光强度值的百分比值来表示; F , 给药后的荧光强度峰; F_0 , 给药前的荧光强度基础值。

$$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = (F - F_0) / F_0 \times 100\%$$

2.7 冷应激及肉桂醛处理 用 0.25% EDTA-胰蛋白酶冲洗收集细胞, 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 去上清, 加入细胞培养液。将从不同大鼠脊柱中收集的 DRG 神经细胞, 混匀并计数, 保证总 DRG 神经细胞数量不少于 6×10^6 个/mL, 离心浓缩至细胞液总体积为 3 mL。

将所收集的 DRG 神经细胞分为正常组、冷应激 1 组、冷应激 2 组、肉桂醛 1 组、肉桂醛 2 组、肉桂醛 3 组。正常组 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱内一直培养; 冷应激 1 组 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 30 min; 冷应激 2 组 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 50 min; 肉桂醛 1 组 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 30 min, 再予 7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛 0.5 μL 反应 20 min; 肉桂醛 2 组 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 30 min, 再予 14 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛 1 μL 反应 20 min; 肉桂醛 3 组 0 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴 30 min, 再予 28 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛 2 μL , 反应 20 min。收集各组细胞, 1 万 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 RNAiso Plus

1 mL, -20 °C 保存。

2.8 Real-time PCR 检测 TRPA1, TRPM8 mRNA 表达 抽提 DRG 神经细胞 mRNA, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 取细胞 1 mL, 加入 Trizol 液 1 mL, 混匀; 室温静置 5 min; 加入四氯化碳, 混匀, 室温静置 3 min; $4\text{ }^\circ\text{C}$, $14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积异丙醇, 混匀, 室温静置 10 min; $4\text{ }^\circ\text{C}$, $14\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min; 弃上清, 加入冰 75% 乙醇, 混匀; $4\text{ }^\circ\text{C}$, $1\ \text{万}\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 干燥; 用无酶水溶解, $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

在 260, 280 nm 下用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度, 反转录合成 cDNA, 反应条件: $37\text{ }^\circ\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。PCR 扩增, 反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 3 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 40 个循环。数据采用仪器自带软件 ABI 7500fast Software v2.0 分析。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TRPA1, TRPM8 mRNA 表达水平。

2.9 统计学方法 使用 SPSS 19.0 和 GraphPad 软件统计分析, 计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞抑制率数据采用 *t* 检验, 荧光数据统计符合正态分布且方差为齐性的数据, 多组间比较采用单因素方差分析; 不服从正态分布或方差不齐的数据, 采用 Kruskal Willas H 秩和检验, 两两比较采用 Bonferroni 法对 *P* 值进行校正。基因数据两组间比较以 Levene's 检验方差齐性, 若符合方差齐性, 采用独立样本 *t* 检验; 若不符合方差齐性, 则采用非参数检验的 Wilcoxon 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 冷应激对 DRG 细胞活性的影响 对于 DRG 在不同时长的冷应激状态下, 其活性无明显差异。见表 1。

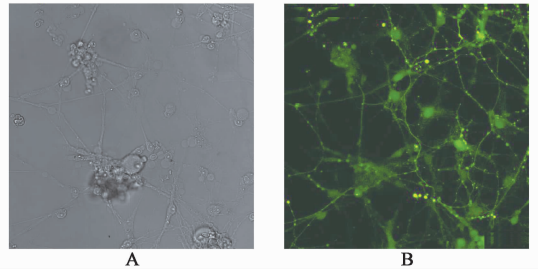
表 1 冷应激对 DRG 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of cold stress on DRG cell activity ($\bar{x} \pm s$)

组别	温度/°C	作用时间/min	A
溶剂	37	0	0.213 ± 0.012
10 min	0	10	0.214 ± 0.013
20 min	0	20	0.208 ± 0.017
30 min	0	30	0.188 ± 0.029
40 min	0	40	0.211 ± 0.020
50 min	0	50	0.193 ± 0.015
60 min	0	60	0.201 ± 0.017

3.2 DRG 神经细胞形态结构 白光下观察 DRG 神经细胞透亮如水珠, 条索状神经突触相互连接, 细

胞贴壁良好, 见图 1A。荧光下, 视野清澈, 背景暗, DRG 神经细胞呈卵圆形镶嵌其中, 淡绿色荧光, 亮度均一, 周围突触连接成网, 状如星云。见图 1B。

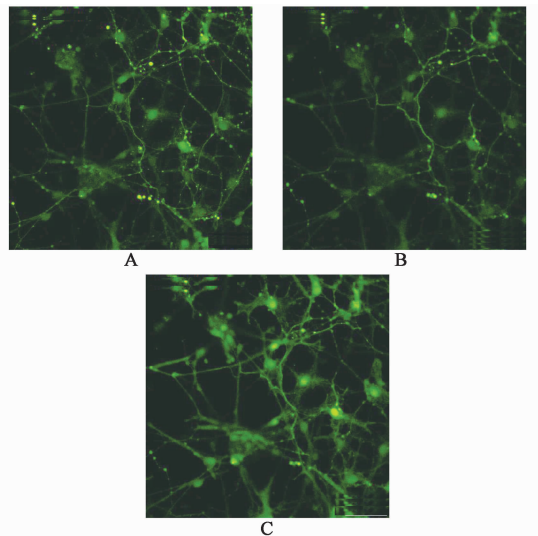


A. 白光场; B. 荧光场

图 1 DRG 神经细胞形态结构变化 (fluo-4^{AM} 染色, ×400)

Fig. 1 Changes in DRG nerve cell morphology (fluo-4^{AM}, ×400)

正常情况下, DRG 神经细胞荧光亮度稳定 (图 2A)。在冷应激状态 (滴入 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 培养液) 下, DRG 神经细胞变暗, 随着 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 培养液加入量的增加, 细胞逐渐变暗, 但结构仍然稳定, 细胞未见挛缩 (图 2B)。滴入 $0.14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛溶液, 局部细胞短暂闪亮, 之后恢复之前亮度; 加入 $1.4\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛溶液, 细胞反应同 $0.14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛组, 加入 $14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 肉桂醛液时, 细胞开始持续闪亮, 神经突触随之变亮 (图 2C)。



A. 正常组; B. 冷应激组; C. 肉桂醛 ($14\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组

图 2 冷应激和肉桂醛对 DRG 神经细胞荧光亮度的影响 (fluo-4^{AM} 染色, ×400)

Fig. 2 Effect of cold stress and cinnamaldehyde on DRG neuron fluorescence (fluo-4^{AM}, ×400)

3.3 冷应激和肉桂醛对 DRG 神经细胞荧光值的影响 在细胞视野中选取 12 个点记录荧光值, 冷应激前后细胞荧光值平均下降 24% ($P < 0.05$) (表 2)。肉桂醛处理后, 再选择 11 个点记录荧光值, 显示肉

桂醛可逆转冷应激后荧光值,平均增加 131.26% ($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 冷应激前 (F_0) 与冷应激后 (F) 荧光值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of fluorescence values before (F_0) and after (F) cold stress ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

视野	F_0	F	$\Delta[Ca^{2+}]_i/\%$	总增长率/%
1	48.27 ± 7.07	29.94 ± 7.55	-37.97	-24.88
2	73.56 ± 3.50	52.46 ± 5.99	-28.69	
3	60.92 ± 4.69	42.41 ± 3.78	-30.39	
4	58.37 ± 7.02	48.41 ± 5.02	-17.07	
5	56.03 ± 7.03	38.82 ± 4.25	-30.72	
6	89.14 ± 12.59	61.33 ± 7.41	-31.20	
7	57.17 ± 2.02	42.97 ± 4.65	-24.84	
8	35.19 ± 2.92	29.50 ± 2.67	-16.17	
9	43.56 ± 5.00	32.80 ± 7.38	-24.71	
10	33.82 ± 5.37	32.32 ± 4.74	-4.42	
11	27.54 ± 2.40	21.69 ± 2.04	-21.25	
12	50.69 ± 2.57	34.92 ± 4.80	-31.11	

注: F 组与 F_0 组比较 $P < 0.05$ 。

表 3 肉桂醛处理前 (F_0) 与肉桂醛处理后 (F) 荧光值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

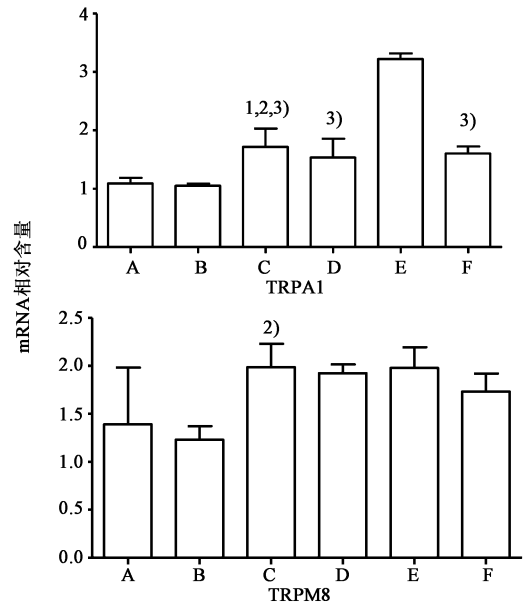
Table 3 Comparison of fluorescence values before (F_0) and after (F) treatment with cinnamaldehyde ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

视野	F_0	F	$\Delta[Ca^{2+}]_i/\%$	总增长率/%
1	40.74 ± 8.42	91.83 ± 9.64	125.4	131.2
2	60.70 ± 10.43	135.97 ± 21.20	124	
3	48.11 ± 5.84	117.93 ± 22.74	145.15	
4	34.05 ± 6.45	76.92 ± 7.06	125.9	
5	42.03 ± 6.67	100.38 ± 26.30	138.81	
6	102.69 ± 20.80	142.94 ± 25.42	39.2	
7	26.01 ± 4.09	59.40 ± 5.21	128.38	
8	31.22 ± 5.67	70.99 ± 16.15	127.42	
9	36.26 ± 5.48	107.22 ± 30.45	195.7	
10	23.27 ± 4.98	48.48 ± 4.29	108.36	
11	34.57 ± 7.29	98.71 ± 21.15	185.54	

注: F 组与 F_0 组比较 $P < 0.01$ 。

3.4 冷应激和肉桂醛对 DRG 神经细胞 TRPA1/TRPM8 mRNA 表达的影响 与正常组比较,冷应激 2 组 TRPA1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与冷应激 1 组比较,冷应激 2 组 TRPA1, TRPM8 mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$); 与冷应激 2 组、肉桂醛 1 组和肉桂醛 3 组比较,肉桂醛 2 组 TRPA1 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。肉桂醛各组对 TRPM8

mRNA 表达无明显影响。见图 3。



A. 正常组; B. 冷应激 1 组; C. 冷应激 2 组; D. 肉桂醛 1 组; E. 肉桂醛 2 组; F. 肉桂醛 3 组。与 A 组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 B 组比较²⁾ $P < 0.05$; 与 E 组比较³⁾ $P < 0.01$

图 3 冷应激和肉桂醛对各组 DRG 神经细胞 TRPA1, TRPM8 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of cold stress and cinnamaldehyde on TRPA1, TRPM8 mRNA expressions of each DRG neuron group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

DRG 神经能够接受外周初级感觉信息的传入,进而将信息传入脊髓等高级中枢,是机体内外环境与脊髓神经连接的纽带,是生物信息传递的中间站。同时 DRG 感觉神经元富集,结构简单,密度均一,功能与神经系统其他组织相近,并且其分布沿脊髓自上而下,能够反应相应区段脏器组织功能。因此,DRG 已经成为研究神经系统病理生理反应的良好样本。

Ca^{2+} 广泛存在于各类细胞中。在细胞体系中, Ca^{2+} 分布于细胞外、细胞浆、钙库 3 个层面中^[13]。在静息状态下,细胞浆内游离 Ca^{2+} 浓度最低,在细胞外、钙库较高^[14],明显高于细胞浆。这一巨大浓度差异的维持有赖于质膜和内膜上各类 Ca^{2+} 通道和 Ca^{2+} -ATPase 泵的精密切协同运作。如电压门控通道 (voltage-gated calcium channels, VGCC)^[15], 配体门控的钙通道 (ligand-gated calcium channels, LGCC), 钙库调控的钙通道 (store-operated calcium channels, SOCs)^[16], 花生四烯酸调控的钙通道 (arachidonate-regulated Ca^{2+} entry channel, ARC)^[17] 能使 Ca^{2+} 透过生物膜,由细胞外或钙库进入细胞浆。而 Na^+ - Ca^{2+} -ATPase, Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 则能

将细胞浆内的 Ca^{2+} 逆离子浓度差转运至细胞外, Ca^{2+} -ATPase 将细胞浆内 Ca^{2+} 逆离子浓度差转运至钙库内^[18]。当细胞兴奋的时候, Ca^{2+} 分布均衡状态被打破, 即以上钙通道被打开或抑制, 导致细胞浆内 Ca^{2+} 浓度升高。它与钙调蛋白 (CaM) 结合, 在细胞内调控细胞的功能。如肌肉收缩、神经传递、酶和激素分泌、细胞周期调控以及细胞凋亡等。

本实验中, 在静息状态下, 细胞维持细胞浆低 Ca^{2+} , 细胞外、钙库高 Ca^{2+} 的平衡状态, 共聚焦显微镜检测显示细胞荧光亮度一般。当 DRG 神经细胞置于 0 °C 冷应激状态后, 荧光变弱, 表明细胞浆内 Ca^{2+} 浓度降低; 提示细胞浆的 Ca^{2+} 外流大于内流, 说明低温抑制了 Ca^{2+} 内流通道, Ca^{2+} 在细胞浆内参与的生化反应减少, 细胞功能呈现抑制状态。当给予一定浓度肉桂醛治疗之后, 细胞荧光值开始升高, 表明细胞浆内 Ca^{2+} 浓度明显升高, 提示其 Ca^{2+} 内流大于外流, 说明肉桂醛在此激活了 Ca^{2+} 内流通道, 进而引发一系列生化反应, 细胞呈现兴奋状态。由于本实验采用的是无 Ca^{2+} , Mg^{2+} 培养液, 可排除外部 Ca^{2+} , Mg^{2+} 离子干扰引发的 Ca^{2+} 转移, 与 fluo-4^{AM} 结合的 Ca^{2+} 均来自细胞本身。冷应激及肉桂醛能够打破静息状态下细胞内外 Ca^{2+} 的平衡, 引发细胞 Ca^{2+} 向胞外和钙库的重新分布。而根据激光共聚焦显微镜观察结果, 肉桂醛处理之后的细胞荧光值远高于静息状态的细胞荧光值, 因此可以推测肉桂醛同时促进了细胞内钙库释放 Ca^{2+} 与细胞外 Ca^{2+} 回流。

参照共聚焦显微镜检查循序滴加肉桂醛确定其工作浓度界限, 进一步行 Real-time PCR 检测, 结果显示冷应激对冷敏 TRP 通道的影响较复杂, 在短时冷应激状态中, TRPA1 mRNA 表达无变化; 而长时冷应激状态, TRPA1 mRNA 表达上调; 同时冷应激对 TRPM8 的影响尚不确定, 但是长时冷应激 TRPM8 mRNA 的表达高于短时的冷应激。此结果符合寒冷状态下机体产生的缓慢自我升温调控。肉桂醛对冷敏 TRP 的影响并非单向线性的表现, 本实验发现适当浓度的肉桂醛能使冷应激大鼠 DRG 神经细胞 TRPA1 mRNA 表达上调, 该结果与共聚焦显微镜观察一致, 同时肉桂醛浓度偏高或偏低, 其效应都将降低。肉桂醛对 TRPM8 的影响尚不明显。另外中浓度肉桂醛组的 TRPA1 mRNA 表达比同时长冷应激组明显升高, 说明加入肉桂醛状态下细胞升温效果比自我升温修复效果更强, 符合肉桂临床温阳作用的实际。本实验结果表明肉桂醛能促进细胞的

升温调控过程, 而对于具体冷应激时间及肉桂醛剂量与冷敏 thermo-TRP 的关系需要更确切的实验验证。

MTT 检测结果表明, 不同时间的冷应激对 DRG 细胞存活无明显影响, 与实验摘取原代细胞操作需置冰上操作的情况相符。由于本实验冷应激温度低于两个冷敏通道的无条件激活温度, 因此涉及的冷敏通道应该处于活动状态。本实验结果也表明 0 °C 的冷应激状态下, 细胞 TRP 通道及 Ca^{2+} 离子分布亦具有显著的差异性。而对于不同低温状态下细胞冷敏 TRP 通道的效应则需要后续实验验证。

中医学认为, 寒性凝滞, 寒性收引, 寒能使机体的功能低下; 肉桂属温热性药物, 其味辛、甘、大热, 具有补火助阳、引火归源、散寒止痛等作用, 主要用于阳痿、宫冷、腰膝冷痛、心腹冷痛、虚寒吐泻、寒疝等寒性病证。本实验中, 细胞在冷应激情况下, 细胞浆 Ca^{2+} 浓度降低, 同时冷敏 TRP 通道中的 TRPA1 活化, 使细胞开始产生抗寒反应, 给予一定浓度肉桂醛时能促进 TRPA1 通道兴奋, 使 Ca^{2+} 返回至细胞浆内, 提升 Ca^{2+} 浓度, 以实现细胞功能的活化。因此, 低温能影响 TRPA1, TRPM8 的活性, 降低胞浆内 Ca^{2+} 浓度, 而肉桂醛能通过冷敏 TRP 通道改变 Ca^{2+} 在细胞内外的转运, 升高细胞浆内 Ca^{2+} 浓度。

综合本次实验, 一方面冷应激状态下, 细胞浆内 Ca^{2+} 浓度降低, 同时冷敏 thermo-TRP 通道打开, 而肉桂醛具有进一步促进冷敏 thermo-TRP 通道打开的功能, 使外流的 Ca^{2+} 返回细胞浆。而肉桂醛对钙库内 Ca^{2+} 释放的机制则需要进一步实验验证。同时, 中医学中的大部分温性药物是否具有类似的作用, 亦可以进行同样的实验来验证。据此, 通过调控冷敏 thermo-TRP 通道以实现 Ca^{2+} 转运进行调控的功能可能是寒性病证以及肉桂温阳作用的内在机制之一。

[参考文献]

- [1] Patapoutian A, Peier A M, Story G M, et al. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(7): 529-539.
- [2] CHEN J, KANG D, XU J, et al. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity[J]. Nat Commun, 2011, 4(9): 2501.
- [3] Zakharian E, CAO C, Rohacs T. Gating of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers [J]. J Neurosci, 2010, 30(37): 12526-12534.
- [4] Story G M, Peier A M, Reeve A J, et al. ANKTM1, a

- TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures [J]. *Cell*, 2003, 112(6):819-829.
- [5] Mc Kemy D D, Neuhausser W M, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in therm osensation [J]. *Nature*, 2002, 416(6876):52-58.
- [6] Ferrer-Montiel A, Fernández-Carvajal A, Planells-Cases R, et al. Advances in modulating thermosensory TRP channels [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2012, 22(9):999-1017.
- [7] JIANG N, ZHANG Z M, LIU L, et al. Effects of Ca^{2+} channel blockers on store-operated Ca^{2+} channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(29):4694-4698.
- [8] Islam S. Transient receptor potential channels [M]. Netherlands Dordrecht: Springer Science Business Media BV, 2011:517, doi:10.1007/978-94-007-0265-3.
- [9] 唐宗湘. 温度敏感的 TRP 通道与中药药性四气理论 [J]. *南京中医药大学学报*, 2015, 31(4):301-304.
- [10] 隋峰, 姜廷良. 从机体 TRP 寒热感受环节挖掘中药四气的现代科学内涵 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16):2501-2504.
- [11] 隋峰, 张畅斌, 杜新亮, 等. 寒热性中药的成分对薄荷醇受体离子通道蛋白功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(2):68-70.
- [12] 隋峰, 戴丽, 李倩, 等. TRPV1 通道介导的热生成是辛热(温)中药药性表征的重要模式 [J]. *药学学报*, 2015, 50(7):836-841.
- [13] Patterson E, Lazzara R, Szabo B, et al. Sodium-calcium exchange initiated by the Ca^{2+} transient: an arrhythmia trigger within pulmonary veins [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 47(6):1196-1206.
- [14] 谢丽, 张铭. ATP 对胞内钙信号的调控机制研究 [J]. *华中师范大学学报: 自然科学版*, 2006, 40(2):244-247.
- [15] Fossat P, Dobremez E, Bouali-Benazzouz R, et al. Knockdown of L calcium channel subtypes: differential effects in neuropathic pain [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(3):1073-1085.
- [16] Puteney J W Jr. A model for receptor-regulated calcium entry [J]. *Cell Calcium*, 1986, 7(1):1-12.
- [17] Mignen O, Shuttleworth T J. I-ARC, a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca^{2+} entry channel [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(13):9114-9119.
- [18] Krause E, Schmid A, Gonzalez A, et al. Low cytoplasmic [Ca^{2+}] activates I (CRAC) independently of global Ca^{2+} store depletion in RBL-1 cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(274):36957-36962.

[责任编辑 张丰丰]