

TRPV1/TRPA1 对小鼠子宫内膜异位症 炎症及疼痛的作用

朱海^{1,4} 王一³ 贺奕博⁴ 俞卫锋^{1,2△}

(¹海军军医大学附属东方肝胆外科医院麻醉科 上海 200438; ²上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科 上海 200127;

³上海市普陀区妇婴保健院病理科, ⁴麻醉科 上海 200062)

【摘要】 目的 探讨瞬时受体电位锚定蛋白1(transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1)和瞬时受体电位香草酸1(transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TRPV1)异聚体在子宫内膜异位症(简称内异症)小鼠子宫内膜组织中的表达及其与内异症缩宫素介导的疼痛的相关性,同时研究 TRPA1 和 TRPV1 对炎症因子的影响。**方法** 建立小鼠内异症模型,予以 TRPA1 激动剂肉桂醛和 TRPA1 拮抗剂 HC-030031 给药干预。疼痛行为学实验检测内异症小鼠扭体次数;ELISA 检测血液及腹腔灌洗液炎症因子含量;实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测 TRPV1/TRPA1 基因和蛋白表达;免疫荧光检测 TRPV1/TRPA1 共定位。**结果** 在内异症模型小鼠中,TRPV1/TRPA1 基因和蛋白表达上调,TRPA1 激动剂肉桂醛上调 TRPV1 表达,TRPA1 抑制剂 HC030031 抑制 TRPA1 的表达。肉桂醛对缓解小鼠内异症疼痛的作用较小,HC030031 对疼痛的缓解作用显著。内异症小鼠血清及腹腔灌洗液 IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和前列腺素(prostaglandin E2, PGE2)的含量显著升高,肉桂醛进一步促进这种作用,而 HC030031 显著抑制内异症小鼠血清及腹腔灌洗液炎症因子的含量。**结论** TRPV1、TRPA1 为内异症中感知炎症并进行传导的通道;TRPV1/TRPA1 异聚体可能有利于响应炎症微环境,进行信号传导,增强疼痛感。

【关键词】 子宫内膜异位症; TRPV1/TRPA1 异聚体; 疼痛; 炎症

【中图分类号】 R711.32 **【文献标志码】** A **doi:** 10.3969/j.issn.1672-8467.2022.06.013

TRPV1/TRPA1 correlated with inflammation and pain in mice with endometriosis

ZHU Hai^{1,4}, WANG Yi³, HE Yi-bo⁴, YU Wei-feng^{1,2△}

(¹Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200438, China;

²Department of Anesthesiology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200127, China;

³Department of Pathology, ⁴Department of Anesthesiology, Shanghai Putuo Maternity and
Infant Health Hospital, Shanghai 200062, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation between the expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) isomer in endometrial tissues of mice with endometriosis mediated pain, and to investigate the effect of TRPA1 and TRPV1 on inflammatory factors. **Methods** Mice endometrium model was

上海市浦东新区卫生系统重点学科建设项目(PWZxq2017-06);上海市临床重点专科建设项目(shslczdsk03601);上海市普陀区临床重点专科建设项目(PW-2-14-02);上海市教委科技创新项目(2019-01-07-00-01-E00074);上海围术期器官支持与功能保护工程技术研究中心项目(20DZ2254200)

[△]Corresponding author E-mail: ywf808@yeah.net

网络首发时间:2022-11-23 10:36:19 网络首发地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20221122.1147.002.html

established by implantation, TRPA1 agonist cinnamaldehyde and TRPA1 antagonist HC-030031 were administered. Behavior test was carried out to detect the number of writhing; ELISA was used to detect inflammatory factors in blood and peritoneal lavage fluid; TRPV1/TRPA1 gene and protein expression were evaluated by qPCR and Western blot; immunofluorescence detection of TRPV1/TRPA1 co-location were performed. **Results** The expression of TRPV1/TRPA1 gene and protein in ectopic endometrial tissue was up-regulated. The expression of TRPA1 was up-regulated by cinnamaldehyde, and the expression of TRPA1 was inhibited by HC030031. TRPA1 agonist cinnamaldehyde induced endometriosis in mice less pain relief. The TRPA1 inhibitor HC030031 was more effective in reducing the pain induced by endometriosis. The levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 in serum and peritoneal lavage fluid of endometriosis mice were significantly increased. Cinnamaldehyde further promoted and HC-030031 significantly inhibited the increasing of inflammatory factors. **Conclusion** TRPV1 and TRPA1 are signaling paths for sensing and conducting inflammation. TRPV1/TRPA1 may be more conducive to signal transduction in response to the inflammatory microenvironment and enhance pain sensation.

【Key words】 endometriosis; TRPV1/TRPA1 dimer; inflammation; pain

* This work was supported by the Construction Project of Key Subject Group in Health System of Pudong New Area, Shanghai (PWZxq2017-06), Shanghai Municipal Construction Project of Key Clinical Specialty (shslczdk03601), the Construction Project of Key Clinical Specialty in Putuo District, Shanghai (PW-2-14-02), the Scientific and Technological Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (2019-01-07-00-01-E00074) and Shanghai Engineering Research Center of Perioperative Organ Support and Functional Protection (20DZ2254200).

子宫内膜异位症(以下简称内异症)是一种常见的、以疼痛为典型症状的妇科临床疾病,通常伴有不孕症。子宫内膜异位病变组织和腹膜液中存在由一系列炎症细胞、细胞因子和趋化因子的异常改变而形成的炎症微环境^[1-2]。内异症引起的疼痛可能与内异症病灶周期性出血引起的局部炎症反应、病灶异常生长导致的外周神经和中枢神经敏感引起的疼痛敏化以及腹腔内慢性炎症相关^[3]。多项研究显示,来自炎症性子官内膜病变的持续伤害导致了感觉传入的持久中枢敏化^[4-5]。目前,内异症引起疼痛的具体机制尚不清楚。瞬时受体电位香草酸 1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1, TRPV1)在结构上与有毒热感和电压门控钙、钠、钾通道有关^[6]。瞬时受体电位锚定蛋白 1 (transient receptor potential ankyrin 1, TRPA1)为 TRPV1 的受体,在结构上与非选择性阳离子通道相关,主要位于辣椒素敏感的肽感觉神经元上^[7]。TRPA1 作为细胞损伤信号的传感器,参与炎症和免疫反应,在刺激(痒)或疼痛的感觉中介导物理和化学刺激的转换^[8]。TRPV1 与类风湿关节炎、骨关节炎和肠易激综合征(irritable bowel

syndrome, IBS)等导致的慢性疼痛疾病相关^[9],可增强和整合对疼痛诱导刺激的反应,如酸中毒、氧化应激或炎症介质^[10]。TRPV1/TRPA1 异构体在感知环境危害以及增强炎症疼痛感方面发挥重要作用,可以促进持续性疼痛^[11]。Fattori 等^[12]研究显示,内异症疼痛模型小鼠的病变组织中存在降钙素基因相关肽、TRPA1 和 TRPV1 表达的神经纤维。内异症还可激活表达 TRPA1 和 TRPV1 的背根神经节神经元(nuclear factor kappa B subunit 1, NF- κ B)中的信号通路。

本研究拟通过植入的方法建立小鼠内异症模型,联合 TRPA1 激动剂肉桂醛(cinnamaldehyde)和 TRPA1 拮抗剂 HC-030031,探讨 TRPA1/TRPV1 异聚体在小鼠内异症子宫内膜组织中的表达情况,分析 TRPA1/TRPV1 异聚体与内异症缩宫素介导疼痛的相关性,同时验证 TRPA1 和 TRPV1 对炎症因子的影响作用。

材 料 和 方 法

试剂及仪器 戊酸雌二醇、缩宫素[阿拉丁试

剂(上海)有限公司], Cinnamaldehyde、HC030031(美国 Sigma-Aldrich 公司), TRPV1、TRPA1 多克隆抗体(德国 Novus 公司), β -actin 抗体(英国 Abcam 公司), 反转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司), HiScript Reverse Transcriptase (RNase H) 和 SYBR Green Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司), RIPA 裂解液和蛋白酶磷酸酶抑制剂(美国 Thermo 公司), 小鼠 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE2 ELISA 检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司)。实时荧光定量 PCR 仪(型号: QuantStudio 6, 美国 ABI 公司), 正置荧光显微镜(型号: Eclipse C1, 日本 Nikon 公司), 水平电泳仪(型号: JY300, 北京君意东方电泳设备有限公司)。

内异症模型建立及动物分组 28 只 BALB/c 雌性小鼠(8 周龄, 18~21 g)购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证: SCXK(沪)2017-0005。所有动物实验经上海市普陀区妇婴保健院伦理委员会批准, 批准号: 2016 伦审第(1)号。实验时间为 2017 年 10 月至 2018 年 10 月, 动物均在 SPF 级环境饲养, 12 h/12 h 光暗周期。将 28 只小鼠随机选取 8 只作为供体组, 造模前 1 周供体组皮下注射戊酸雌二醇(0.2 mg/只), 1 周后对小鼠实施安乐死后将小鼠以仰卧位固定于手术台, 沿正中中线剖开腹腔, 分离双侧子宫系膜, 除去浆膜和子宫肌层, 生理盐水反复漂洗, 去除子宫表面的血迹, 分离子宫系膜, 在生理盐水中切碎子宫内膜(碎片 ≤ 1 mm³), 全程保持无菌操作, 将切碎的子宫内膜经 18 号针头注射到实验组小鼠腹腔内。取脐下偏正中中线处的左下腹为进针点(0.5 mL/只), 1 只供体小鼠对应 2 只受体小鼠, 构建内异症小鼠模型, 每个模型操作时间限制为 5 min^[13]。

将 20 只实验组小鼠分为 4 组: 假手术组(Sham)、模型组(Model)、肉桂醛+模型组(Model+Cinnamaldehyde)和 TRPA1 拮抗剂+模型组(Model+HC030031), 每组 5 只。内异症小鼠模型建立 1 天后, 模型组给予灌胃溶剂; 肉桂醛+模型组给予灌胃肉桂醛(10 mg/kg), 每 3 天 1 次; TRPA1 拮抗剂+模型组给予灌胃 HC-030031(2.5 μ g/kg), 每天 1 次。给药 2 周, 继续饲养 2 周。称重、处死并解剖小鼠, 取异位子宫内膜病灶, 收集血清和腹腔灌洗液。

疼痛行为学 建模(给药)后 7、14、21 和 28 天腹腔注射缩宫素 20 IU/kg, 观察 30 min 内出现的扭体

反应, 记录扭体次数。

实时荧光定量 PCR 检测小鼠子宫内膜组织中 TRPV1/TRPA1 的基因表达 取 100~200 mg 组织块, 研钵里磨碎(加液氮辅助), 磨碎的组织放入 1.5 mL 无 RNA 酶 EP 管中, 加入 1 mL Trizol 浸泡, 混合均匀, 用于抽提或 -20 °C 冻存。按照 Trizol 提取试剂使用说明抽提组织中的总 RNA, 根据操作说明书 RNA 反转录成 cDNA。根据目的基因序列信息设计并合成 qPCR 检测引物(表 1)。

表 1 RT-PCR 检测引物信息表

Tab 1 Primer sequence for RT-PCR

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Products
mmu ACTB-2F	CTGGTCGTACCACAGGCATT	537 bp
mmu ACTB-2R	TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA	
mmu TRPA1-F4	CTCCCCGAGTGCATGAAAGT	543 bp
mmu TRPA1-R4	CGCTATTGCTCCACATTGCC	
mmu TRPV1-F3	GGGCGAGACTGTCAACAAGA	558 bp
mmu TRPV1-R3	CGGCTCTATTGCTCCCTGAG	

以反转录的 cDNA 为模板, 用目的基因特异性引物和内参引物扩增待检测的目的基因片段和看家基因, 将样品放入 IQ5 荧光定量 PCR 仪, SYBR Green 法荧光定量 PCR 以分析各基因的表达, 用 $\Delta\Delta C_t$ 法定量各基因的相对表达。

免疫荧光检测小鼠子宫内膜组织中 TRPV1/TRPA1 蛋白表达和定位 小鼠子宫内膜组织经多聚甲醛固定、脱水和石蜡包埋后切片(5 μ m)。切片脱蜡后进行抗原修复, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。切片上滴加 BSA, 室温孵育 1 h。去除封闭液, 切片上滴加 PBS 配备的一抗, 分别孵育抗体 TRPA1(1:500)和 TRPV1(1:500)。切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。次日, 置于 PBS(pH=7.4)中脱色, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min。切片干燥后在圈内滴加与一抗相应种属的荧光标记二抗覆盖组织, 室温孵育 1 h。于 PBS 中脱色, 洗涤 3 次, 每次 5 min。切片干燥后在圈内滴加 DAPI 染液, 避光室温孵育 10 min。用抗荧光淬灭封片剂封片, 于荧光显微镜下观察切片并采集图像。

ELISA 检测小鼠血清及腹腔灌洗液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE2 的表达 称取标本, 加入 PBS, 用液氮迅速冷冻, 保存备用。标本融化后保持 2~8 °C, 加入 PBS, 匀浆充分, 2 000~3 000 $\times g$ 离心 20 min, 收集上清。按 ELISA 试剂盒说明书进行样

品检测,计算细胞因子浓度。

Western blot 检测小鼠子宫内膜中 TRPV1/TRPA1 的蛋白表达 用 PBS 清洗小鼠子宫内膜组织,加适量液氮研磨,充分研磨后将组织匀浆转移至离心管;加入 RIPA 蛋白裂解液和蛋白酶磷酸酶抑制剂 200 μ L 裂解蛋白,混匀冰浴 40~60 min;4 $^{\circ}$ C 下 11 000 $\times g$ 离心 15 min,提取蛋白裂解液上清;采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白质浓度;根据浓度测定结果对蛋白浓度进行调整,保证不同组别间蛋白浓度一致;用样品将 6 \times 上样缓冲液稀释成 1 \times 上样缓冲液,煮沸 5 min,于 -80 $^{\circ}$ C 保存;蛋白用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 12% 分离胶(5% 浓缩胶)电泳分离,电泳,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜转膜,一抗孵育,增强型化学发光剂(enhanced chemiluminescence, ECL)显色,凝胶电泳仪成像,用

Image J 软件进行条带灰度分析。

统计学分析 各组样本 qPCR 检测至少重复 3 次,数据用 Graphpad Prism 8.0 软件分析;免疫荧光相对定量用 Image-Pro Plus 软件分析。Western blot 结果用 Image J(USA)软件分析。两组间差异分析用非配对 *t* 检验;3 组及以上的组间差异比较用单因素方差分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

内异症小鼠疼痛行为学实验 建立小鼠内异症模型,探讨 TRPV1/TRPA1 异构体在内异症疼痛中的作用,并在小鼠体内进行催产素诱导的扭体实验(表 2)。催产素诱导的内异症小鼠扭动频率相比对照组显著增加,肉桂醛进一步放大了这一现象,HC-030031 则减弱了内异症小鼠的扭动频率。

表 2 子宫内膜异位症小鼠扭体实验数据

Tab 2 Number of body-twisting frequency in mice with endometriosis

($\bar{x} \pm s$)

Group	0 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Sham	5.6 \pm 1.1	4.8 \pm 1.3	6.2 \pm 1.6	4.6 \pm 1.1	4.8 \pm 2.2
Model	22.8 \pm 4.9 ⁽¹⁾	23.6 \pm 3.5 ⁽¹⁾	25.2 \pm 3.3 ⁽¹⁾	25.8 \pm 2.3 ⁽¹⁾	26.0 \pm 2.1 ⁽¹⁾
Model+Cinnamaldehyde	23.0 \pm 1.2 ⁽¹⁾	30.0 \pm 3.5 ⁽¹⁾⁽²⁾	31.2 \pm 3.7 ⁽¹⁾⁽²⁾	34.2 \pm 5.8 ⁽¹⁾⁽²⁾	35.2 \pm 6.2 ⁽¹⁾⁽²⁾
Model+HC-030031	20.8 \pm 3.7 ⁽¹⁾	21.0 \pm 2.2 ⁽¹⁾	16.4 \pm 2.7 ⁽¹⁾⁽³⁾	17.0 \pm 4.2 ⁽¹⁾⁽²⁾	17.2 \pm 5.3 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾ vs. Sham group, $P < 0.01$; vs. Model group, ⁽²⁾ $P < 0.05$, ⁽³⁾ $P < 0.01$.

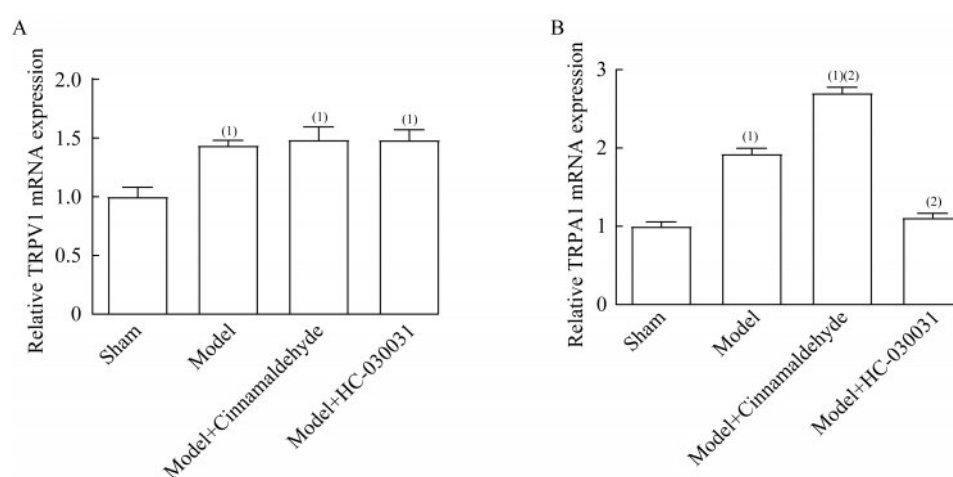
qPCR 检测小鼠子宫内膜 TRPV1/TRPA1 mRNA 表达 qPCR 检测小鼠子宫内膜组织中 TRPV1/TRPA1 mRNA 表达结果如图 1 所示。与假手术组相比,模型组,肉桂醛+模型组以及 TRPA1 拮抗剂+模型组的 TRPV1 mRNA 表达显著上调;肉桂醛和 HC-030031 对模型组 TRPV1 mRNA 表达的作用不显著(图 1A)。与假手术组相比,模型组、肉桂醛+模型组的 TRPA1 mRNA 表达显著上调;肉桂醛显著上调模型组的 TRPA1 mRNA 表达,而 HC-030031 显著抑制模型组的 TRPA1 mRNA 表达(图 1B)。

Western blot 检测小鼠子宫内膜组织中 TRPV1/TRPA1 蛋白表达 与假手术组相比,模型组、肉桂醛+模型组和 TRPA1 拮抗剂+模型组的 TRPV1 蛋白表达显著上调;肉桂醛和 HC-030031 对模型组

TRPV1 蛋白表达的作用不显著(图 2A、2B)。与假手术组相比,模型组、肉桂醛+模型组的 TRPA1 蛋白表达显著上调,肉桂醛显著上调模型组的 TRPA1 蛋白表达,而 HC-030031 显著抑制模型组 TRPV1 蛋白表达(图 2A、2C)。

ELISA 检测各组小鼠血清及腹腔冲洗液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE2 的含量 与假手术组相比,模型组小鼠血清(图 3A~3D)以及腹腔冲洗液(图 3E~3H)中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE2 的含量显著升高;肉桂醛进一步促进上述作用,而 HC-030031 显著抑制模型组小鼠血清以及腹腔冲洗液中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE2 的含量升高。

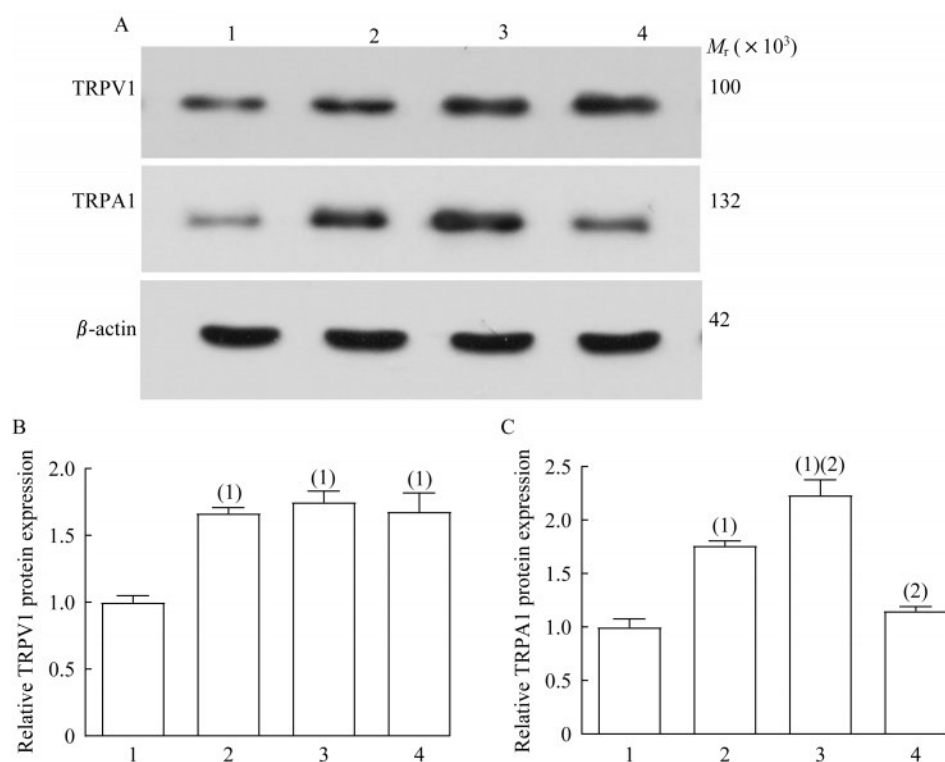
免疫荧光检测各组小鼠子宫内膜组织中 TRPV1/TRPA1 蛋白表达共定位 如图 4 所示,肉桂醛+模型组小鼠内异症组织中 TRPV1 伴 TRPA1 蛋



⁽¹⁾ vs. Sham group, $P < 0.01$; ⁽²⁾ vs. Model group, $P < 0.01$.

图1 各组小鼠子宫内膜组织中TRPV1/TRPA1 mRNA表达

Fig 1 Expression of TRPV1/TRPA1 mRNA in endometrial tissues of mice in each group



A: TRPV1/TRPA1 protein expression was detected by Western blot; B and C: Quantitative analysis of TRPV1 and TRPA1 protein expression ($n=3$). ⁽¹⁾ vs. Sham group, $P < 0.01$; ⁽²⁾ vs. Model group, $P < 0.01$. 1: Sham group; 2: Model group; 3: Model+ Cinnamaldehyde group; 4: Model+ HC-030031 group.

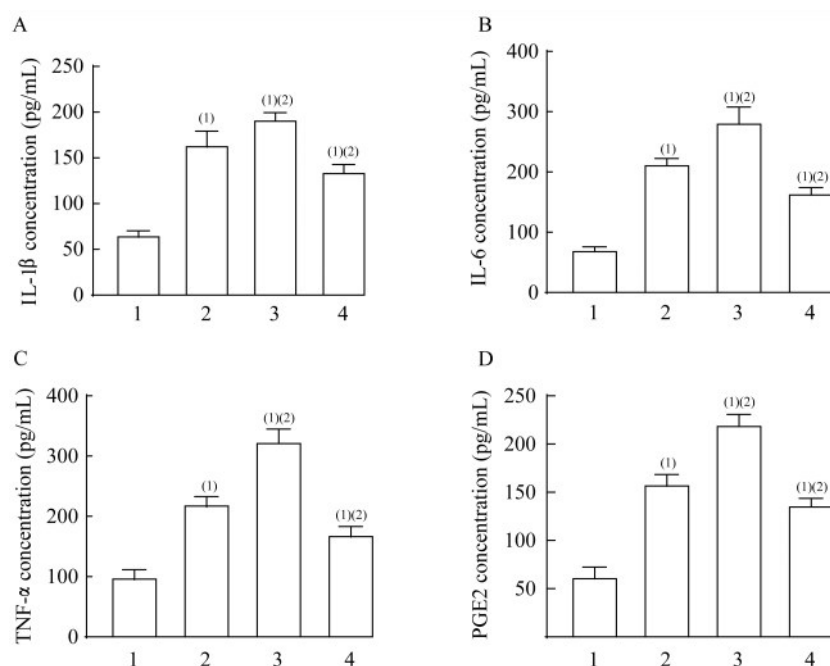
图2 各组小鼠子宫内膜组织中TRPV1/TRPA1蛋白表达

Fig 2 Protein level of TRPV1/TRPA1 in endometrial tissues of mice in each group

白含量最高;与假手术组相比,模型组小鼠的TRPV1/TRPA1共表达显著上调;TRPA1拮抗剂+模型组及假手术组小鼠的TRPV1/TRPA1蛋白表达最低,这提示TRPV1/TRPA1异构体可能与小鼠内异症疼痛呈正相关。

讨 论

内异症是一种雌激素依赖性炎症性疾病,疼痛为内异症患者主要的临床症状之一,即使经过治



A-D: Concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2 in peripheral blood; E-H: Concentration of IL-1 β , IL-6, TNF- α and pGE2 in abdominal rinse solution. 1: Sham group; 2: Model group; 3: Model+ Cinnamaldehyde group; 4: Model+ HC-030031 group. ⁽¹⁾ vs. Sham group, $P < 0.01$; ⁽²⁾ vs. Model group, $P < 0.01$.

图3 ELISA检测各组小鼠外周血和腹腔灌洗液的炎症因子含量

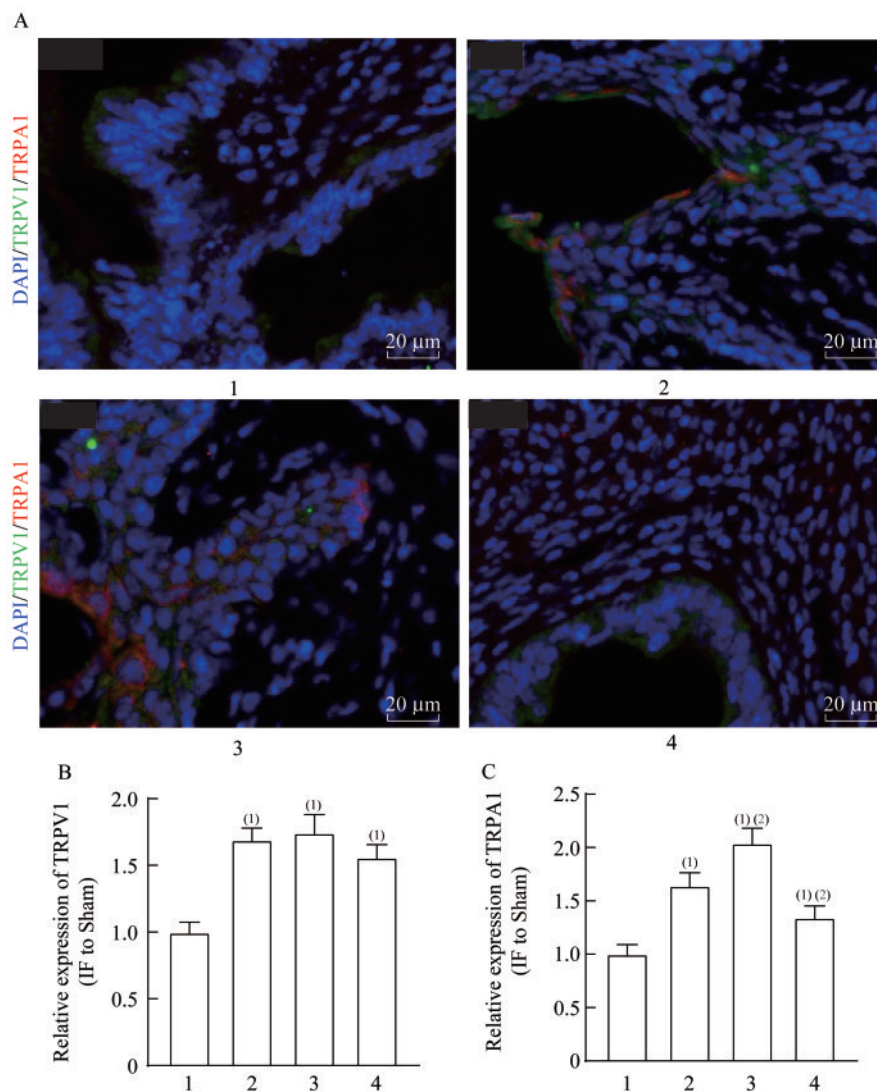
Fig 3 Concentrations of inflammatory cytokines in serum and peritoneal irrigation fluid of mice in each group

疗,疼痛仍然持续。内异症相关疼痛的多种机制包括痛觉敏化、炎症和外周和中枢神经系统疼痛处理的改变。免疫细胞分泌的细胞因子(如IL-1 β 、IL-6和TNF α 等)分布在腹膜液中可能对内异症起到促痛剂的作用,直接引起TRPV1通道的兴奋性改变,使得周围神经敏感,或引发复杂的反馈作用,放大微环境炎症反应和疼痛的产生^[14]。TRPV1和TRPA1是在炎症信号通路中起关键作用的阳离子通道,在内异症相关疼痛中的作用机制尚未可知。我们通过构建内异症小鼠模型,结合TRPA1抑制剂和激动剂,分析TRPA1/TRPV1异聚体对内异症小鼠疼痛和炎症因子的影响,为内异症相关疼痛的治疗提供科学依据。

本研究结果显示,TRPV1/TRPA1异构体在内异症小鼠中表达上调;TRPA1激动剂肉桂醛对内异症引起的小鼠疼痛的减轻作用较小;TRPA1抑制剂HC-030031对内异症引起的小鼠疼痛的减轻作用更为显著,说明TRPV1/TRPA1异构体的形成可能与内异症小鼠缩宫素诱导的疼痛有关。肉桂醛进一步促进内异症小鼠血清及腹腔灌洗液炎症因子含量,而HC-030031则对其有显著抑制作用,提示TRPV1/TRPA1异聚体可能有利于感知响应

炎症微环境,进行信号传导,增强疼痛感。

研究表明,抑制TRPV1和TRPA1通道可通过线粒体裂变/融合蛋白抑制Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)/NF- κ B和NLR家族Pyrin域蛋白3(NLR family pyrin domain containing 3, NLRP3)/caspase-1通路起到抗肺部炎症的作用^[15]。另一项研究得出类似结果,即TRPV1和TRPA1通道抑制剂能够减少脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤^[16]。TRPA1以及TRPV1在结构上与非选择性阳离子通道相关,主要位于辣椒素敏感肽能感觉神经元^[7]。TRPV1和TRPA1通道可以响应炎症因子、热刺激物等,被激活后可将外周信号传输到中枢等多通道,从而诱导启动慢性炎症疾病的免疫系统反应^[17]。TRPV1和TRPA1在感知环境危害以及增强炎症疼痛感方面发挥重要作用。研究证实TRPV1-TRPA1相互作用可能形成主要依赖于钙离子的异质通道^[18]。跨膜蛋白100与TRPA1和TRPV1共表达并形成复合物,选择性增强TRPA1活性,并削弱TRPA1和TRPV1的关联,而TRPA1和TRPV1是关键疼痛介质^[11]。包括TRPV1和TRPA1在内的瞬时感受器电位通道已成为炎症性疼痛的潜在传感器和



A: TRPV1/TRPA1 in endometrial tissues by immunofluorescence staining, showing merged fields with TRPV1 (green), TRPA1 (red) and DAPI (blue); B-C: Fluorescence intensity of TRPV1 and TRPA1. ⁽¹⁾ vs. Sham group, $P < 0.01$; ⁽²⁾ vs. Model group, $P < 0.01$. 1: Sham group; 2: Model group; 3: Model+ Cinnamaldehyde group; 4: Model+ HC-030031 group.

图4 免疫荧光检测各组小鼠子宫内膜组织中TRPV1/TRPA1蛋白表达共定位

Fig 4 Co-localization of TRPV1/TRPA1 protein expression in endometrial tissues of mice in each group

转导器。TRPV1/TRPA 异聚体调节内异症疼痛的潜在机制需进一步体内外研究证明^[19]。

研究显示,内异症可分为免疫优势期和激素优势期两个阶段。内异症的早期起始阶段(72 h以内)在很大程度上受到先天免疫系统的调控。在内异症早期的动物模型中,炎症因子和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的mRNA和蛋白水平均升高,但这种变化与雌二醇治疗无关。同时炎症细胞通过非内质网依赖的方式被招募到腹腔。子宫内膜异位早期阶段免疫系统信号主导雌二醇介导的信号,随后可能出现激素占

主导地位的发展阶段^[20]。Krisztina等^[20]研究发现,雌激素可能通过调节炎症细胞因子巨噬细胞迁移抑制因子而上调大鼠子宫内膜组织中TRPA1和TRPV1的表达。本研究表明内异症小鼠外周血和腹腔灌洗液炎症因子IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和PGE2的含量增加,TRPA1抑制剂HC-030031显著抑制炎症因子的表达,尚缺乏TRPA1和TRPV1在临床内异症样本中的表达数据以及细胞功能验证。因此,需要进一步的体外研究证实TRPA1/TPPV1异聚体和炎症因子在内异症疼痛发展的相互作用关系。

综上所述,本研究初步探讨了小鼠内异症模型中 TRPV1/TRPA1 在内异症相关疼痛中的作用,TRPV1/TRPA1 表达水平可以作为评估内异症相关疼痛程度的参考,靶向 TRPV1/TRPA1 异聚体可能成为治疗内异症疼痛的选择之一。

作者贡献声明 朱海 实验操作,数据收集,论文撰写。王一,贺奕博 数据统计和分析,论文修订。俞卫锋 研究设计和指导,论文修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] BULUN SE, YILMAZ BD, SISON C, *et al.* Endometriosis [J]. *Endocr Rev*, 2019, 40(4): 1048-1079.
- [2] WANG Y, NICHOLS K, SHIH IM. The origin and pathogenesis of endometriosis [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2020, 15: 71-95.
- [3] LIANG Y, LIU D, YANG F, *et al.* Perineural invasion in endometriotic lesions contributes to endometriosis-associated pain [J]. *J Pain Res*, 2018, 11: 1999-2009.
- [4] ORR NL, WAHL KJ, LISONEK M, *et al.* Central sensitization inventory in endometriosis [J]. *Pain*, 2022, 163(2): e234-e245.
- [5] ZHENG P, ZHANG W, LENG J, *et al.* Research on central sensitization of endometriosis-associated pain: a systematic review of the literature [J]. *J Pain Res*, 2019, 12: 1447-1456.
- [6] CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 816-824.
- [7] BOHONYI N, POHÓCZKY K, SZALONTAI B, *et al.* Local upregulation of transient receptor potential ankyrin 1 and transient receptor potential vanilloid 1 ion channels in rectosigmoid deep infiltrating endometriosis [J]. *Mol Pain*, 2017, 13: 1744806917705564.
- [8] DE ARAUJO DSM, NASSINI R, GEPPETTI P, *et al.* TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2020, 24(10): 997-1008.
- [9] SADEGHI M, ERICKSON A, CASTRO J, *et al.* Contribution of membrane receptor signalling to chronic visceral pain [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 98: 10-23.
- [10] TOMINAGA M, JULIUS D. Capsaicin receptor in the pain pathway [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2000, 83(1): 20-24.
- [11] WENG HJ, PATEL KN, JESKE N A, *et al.* Tmem100 is a regulator of TRPA1-TRPV1 complex and contributes to persistent pain [J]. *Neuron*, 2015, 85(4): 833-846.
- [12] FATTORI V, FRANKLIN NS, GONZALEZ-CANO R, *et al.* Nonsurgical mouse model of endometriosis-associated pain that responds to clinically active drugs [J]. *Pain*, 2020, 161(6): 1321-1331.
- [13] DING J, MEI S, CHENG W, *et al.* Curcumin treats endometriosis in mice by the HIF signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(4): 2184-2198.
- [14] MCKINNON BD, BERTSCHI D, BERSINGER NA, *et al.* Inflammation and nerve fiber interaction in endometriotic pain [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(1): 1-10.
- [15] XU M, ZHANG Y, WANG M, *et al.* TRPV1 and TRPA1 in lung inflammation and airway hyperresponsiveness induced by fine particulate matter (PM_{2.5}) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7450151.
- [16] LIU Z, WANG P, LU S, *et al.* Liquiritin, a novel inhibitor of TRPV1 and TRPA1, protects against LPS-induced acute lung injury [J]. *Cell Calcium*, 2020, 88: 102198.
- [17] STRAUB RH. TRPV1, TRPA1, and TRPM8 channels in inflammation, energy redirection, and water retention: role in chronic inflammatory diseases with an evolutionary perspective [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2014, 92(9): 925-937.
- [18] FISCHER MJ, BALASURIYA D, JEGGLE P, *et al.* Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers [J]. *Pflugers Arch*, 2014, 466(12): 2229-2241.
- [19] POHÓCZKY K, KUN J, SZALONTAI B, *et al.* Estrogen-dependent up-regulation of TRPA1 and TRPV1 receptor proteins in the rat endometrium [J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 56(2): 135-149.
- [20] BURNS KA, THOMAS SY, HAMILTON KJ, *et al.* Early endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor α and IL-6 cross-talk [J]. *Endocrinology*, 2018, 159(1): 103-118.

(收稿日期:2021-09-14; 编辑:段佳)