DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20230312

·论　　著·

探究GIRK蛋白与小鼠三叉神经痛中疼痛行为的相关性

潘旭强[1]，韩靓[2]，石铁军[2]*

（1.宁波市第二医院，浙江 宁波 315010；
2.兰州大学口腔医学院，甘肃 兰州 730000）

【摘要】**目的** 三叉神经痛是最常见的颌面疼痛综合征，其病因尚未完全明确。本文主要研究G蛋白门控内向整流钾离子通道（G Protein-gated Inwardly Rectifying Potassium Channel，GIRK）蛋白在三叉神经痛中的作用及表达情况，为三叉神经痛的治疗提供新方向。**方法** 通过眶下神经横断手术建立小鼠的三叉神经痛动物模型，利用Von Frey测量其机械性异常性疼痛；记录其面部抓挠次数来测量其自发痛；使用Western Blot检测三叉神经节中GIRK蛋白的表达情况。**结果** 研究发现，小鼠三叉神经损伤后，与对照组相比，其机械性异常性疼痛和自发痛在术后3-21天均有显著性增强，而三叉神经节中GIRK1-3蛋白水平均下调。**结论** 本研究成功建立了小鼠的三叉神经痛模型，表明GIRK可能在神经损伤后的三叉神经痛中发挥重要作用。

【关键词】三叉神经痛；G蛋白门控内向整流钾离子通道；机械性异常性疼痛；自发痛

中图分类号：R745.1+1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2023）03-0080-06

Exploring the correlation between GIRK proteins and pain behavior in trigeminal neuralgia in mice

Pan Xuqiang[1], Han Liang[2], Shi Tiejun[2]*

(1. Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, Zhejiang, China;
2. School/Hospital of Stomatology, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

【**Abstract**】 **Objective** Trigeminal neuralgia is the most common maxillofacial pain syndrome, and its etiology has not been fully understood. In this paper, we focus on the role and expression of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel (GIRK) protein in trigeminal neuralgia to provide a new direction for the treatment of trigeminal neuralgia. **Methods** An animal model of trigeminal neuralgia in mice was established by infraorbital nerve transection surgery, and its mechanical abnormal pain was measured by using Von Frey; the number of facial scratches was recorded to measure its spontaneous pain; the expression of GIRK protein in trigeminal ganglion was detected by Western Blot. **Results** Our research discovered that after trigeminal nerve injury in mice, both mechanical abnormal pain and spontaneous pain were significantly enhanced at 3-21 days postoperatively compared to controls, while both GIRK1-3 protein levels were downregulated in the trigeminal

收稿日期：2023-09-04；**修回日期**：2023-09-15

通信作者：石铁军（1969–），男，黑龙江哈尔滨人，硕士生导师，主要从事初级感觉神经元的神经可塑性机制研究。
E-mail：Dantj20@lzu.edu.cn

ganglion. **Conclusion** Trigeminal neuralgia model in mice was successfully established， and suggesting that GIRK may play a significant role in trigeminal neuralgia after nerve injury.

【**Keywords**】Trigeminal neuralgia; G protein-gated inwardly rectifying potassium channel; Mechanical abnormal pain; Spontaneous pain

疼痛是一种与实际的或潜在的组织损伤相关的，不愉快的感官和情感体验。根据持续时间的长短可分为急性疼痛和慢性疼痛。一般认为疼痛时间持续或复发超过3个月为慢性疼痛[1]。在慢性疼痛中，三叉神经痛长期以来是世界范围内较为常见，且严重影响人们健康和生活质量的疾病之一，在男性和女性中的发生率分别为每年2.5/10万和5.7/10万[2]。

三叉神经痛实际是一种以电击样疼痛为特征、反复发作的疾病。一般局限在单侧三叉神经支配区域内，有一个或者多个“扳机点”。轻触或刺激“扳机点”可激发疼痛发作，即使是无害刺激也可引发疼痛。随着时间推移和病情进展，疼痛发作时间越来越长，发作间隔越来越短[3]。但在疼痛发作之后，通常会有一个“不应期”，在此期间刺激“扳机点”疼痛不会被触发。当疼痛剧烈时，患者面部肌肉可呈痉挛状，皱眉咬牙，或用手掌揉搓疼痛部位，也可有其他轻微的自主神经症状，比如流泪或者眼睛发红等。除“扳机点”现象外，患者三叉神经面部区域常无其他异常体征，少数可能伴有面部感觉减退或者痛觉过敏。

三叉神经痛的治疗包括药物、手术和辅助方法。抗惊厥药和三环类抗抑郁药等药物是主要的药物选择，卡马西平则是三叉神经痛的一线治疗药物。同时，手术治疗（三叉神经撕脱术、射频消融术等）及保守治疗也是有效的方法。到目前为止，由于对三叉神经痛的发病机制缺乏足够的了解，该疾病的治疗方法仍然非常有限[4-6]。

G蛋白门控内向整流钾离子通道（G Protein-gated Inwardly Rectifying Potassium Channel，GIRK）是神经元细胞兴奋性调节相关的重要因子之一，在药理学和动物模型研究中，其在疼痛感知和记忆调节等领域发挥着重要作用[7,8]。作为G蛋白介导的信号通路的重要下游抑制因子，GIRK同时也与癫痫、心律失常、帕金森症、药物成瘾等多种人类疾病相关，可作为药物治疗的重要靶点之一，具有较好的医疗潜力以及改善相关靶向治疗药物的可能性[9,10]。

本研究拟通过建立小鼠的三叉神经痛动物模型，分析其GIRK1-3蛋白的表达，探究三叉神经痛与为治疗三叉神经痛提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

在本实验中采用的动物为兰州大学动物实验中心的昆明小鼠。选取6-8周的成年雄性小鼠，在清洁级条件下进行饲养。鼠房采用12 h光照/黑暗循环（从8∶00到20∶00开灯），每笼饲养4~6只，小鼠可自由获取食物和水。所有实验动物均已通过兰州大学口腔医学院伦理委员会的批准（审查编号：LZUKQ-2022-047）。

1.1.2 试剂与仪器

Von Frey纤维丝（上海玉研仪器有限公司）；水合氯醛（美国Thermo Fisher公司）；TDZ4-WS台式低速离心机（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；RT-6100酶标仪（美国Rayto公司）；D3024R台式高速冷冻离心机（北京DRAGONLAB）；KZ-Ⅲ-F研磨仪、DS-2S100脱色摇床（钟摆型）、SVE-2垂直电泳仪、SVT-2转印电泳仪、SPW-6S电泳电源、G9055-4抗体孵育盒、RIPA裂解液、50×Cocktail蛋白酶抑制剂、PMSF（100 mM）、5×蛋白还原型上样缓冲液、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒、PVDF膜0.45 μm、ECL化学发光试剂盒、TBS缓冲液（武汉Servicebio公司）；SPR80制冰机（中国SIMAG公司）。

1.2 三叉神经痛动物模型的建立

本实验中采用的手术方式为小鼠进行眶下神经部分横断术，以达到建立三叉神经痛动物模型的目的。被选用的小鼠的体重为（18~22）g。使用24只小鼠进行实验，分成2组，手术组和对照组各12只。

使用4%水合氯醛（0.1 mL/10 g）通过腹腔注射麻醉小鼠之后，固定小鼠为仰卧位，通过手术线打开小鼠口腔。使用锋利的镊子或者较细的针头在小鼠口腔右侧腭部黏膜处纵行打开一条约为（2~2.5）mm的切口。切开后，使用眼科镊钝性分离组织，通过该切口暴露眶下神经。暴露眶下神经主干

后，剪断并剪除1 mm神经组织以防止再生。将黏膜拉拢，无需做缝合及其他额外处理。术后将小鼠转移至温暖处，待其苏醒后每只转移至独立的鼠笼中，防止其因疼痛产生不适而发生争斗。对照组小鼠也在同样的手术位置划开相同长度伤口，但不对神经进行处理，其余处理同手术组小鼠。

1.3 动物行为学相关测试

1.3.1 机械性异常性疼痛测试

通过Von Frey细丝刺激小鼠触须垫的方式来确定其机械性异常性疼痛。实验中，我们借鉴了之前的研究[11]方法，设计了一个方盒子（8×8×8）cm来作为测试场所。该盒子的五面均用不透光的材料盖上，只留观察的一面透光，而在观察面的最底部与盒子底部之间有着0.5 mm的缝隙，这个缝隙可供小鼠的吻部探出，并能够阻止小鼠通过缝隙逃出盒子。

在术后的1周内，每隔1天对小鼠进行1次测试，在术后第10、14、21、28天时分别对小鼠进行机械性异常性疼痛测试。每次测试前需让小鼠在环境中适应1 h。测试期间，场所需进行酒精消毒。开始测试后，观察小鼠，待小鼠将头探出，平稳呼吸且无其他动作时，使用0.2 g的Von Frey细丝触碰小鼠触须垫及其周围皮肤，记录其反应。Von Frey细丝在触碰触须垫时必须完全垂直小鼠皮肤，加力直到细丝弯曲，保持弯曲状态（2-5）s，在此过程中要避免与其发生刮蹭。测试在小鼠的双侧触须垫随机进行，每次触碰之间必须间隔30 s以上，每一侧触须垫重复测试至少5次。测试结束后，统计损伤侧所有分数。通过对小鼠的刺激后行为进行分类，可以得到以下刺激分数的分级（见表1）：

表1 小鼠Von Frey机械刺激评分表

分数	机械刺激后反应
0	无反应
1	小鼠感受到刺激，将头转向刺激物体
2	小鼠快速的后撤，伴或者不伴一次面部的擦拭行为（在受刺激侧）
3	小鼠主动攻击刺激物，或有两次快速的面部擦拭行为
4	小鼠有三次及以上的快速的面部擦拭行为

资料来源：Evoked and spontaneous pain assessment during tooth pulp injury[11]

1.3.2 自发性疼痛测试

在疼痛动物模型中，通过外来刺激产生的疼痛仅能评价动物的诱发性疼痛，而在实际临床中，自发性疼痛的产生是一个相对普遍的症状。在临床上，研究者可以通过问卷或描述的方式获得自发性疼痛的程度以及频率，但在动物实验中无法做到。因此，需通过观察动物行为，按照其规律制定合适的评分制度[12]。在本实验中，我们通过录像的方式记录小鼠在笼中的面部修饰行为，后期进行该时间段的人工计数与统计，以此来评估小鼠模型的自发痛。

将小鼠放入观察场地中，使其提前适应1 h。适应完毕后，将录像仪器安装在观察装置底部，通过录像可以较为清晰地观察小鼠的面部修饰行为。使用录像仪器记录其45 min内与自发性疼痛表现相关的面部修饰动作。之后对录像进行分析，记录小鼠使用前爪修饰面部的时间，其面部修饰的部位包括触须垫区域，面颊区域和耳朵。

1.4 三叉神经节组织提取

将小鼠按照对照组、手术组术后3、10、28天进行分组，每组3只，分批进行三叉神经节的提取：用10%水合氯醛将小鼠深度麻醉至濒死状态，尽快打开小鼠胸腔，固定好心脏灌流装置，分三次灌入PBS溶液共30 mL，每次10 mL；灌流完毕后，剪开小鼠背颈部皮肤，使用镊子刺穿后脑，掀开小鼠颅骨，去除多余脑组织，暴露颅骨底部的两条平行颅骨的三叉神经节；取出小鼠三叉神经节，使用PBS溶液再次进行冲洗，冲洗后将组织放入冻存管中；将组织在液氮中冻存后，转移至-80℃冰箱保存。

1.5 Western Blot实验

将提取完毕的组织进行蛋白提取以及Western Blot实验。

1.5.1 组织总蛋白提取

组织块用预冷的PBS洗去血污，剪成小块置于匀浆管中，加入2颗4 mm的匀浆珠，加入10倍组织体积的裂解液和蛋白酶抑制剂，进行匀浆；匀浆完成后，将匀浆管放置冰上裂解液30 min，每隔5 min震荡一次，确保组织完全裂解；裂解完全后，进行离心。12 000 rpm（每分钟转速），4℃，离心10 min，收集上清，即为总蛋白溶液。

1.5.2 蛋白变性

将蛋白溶液按照4∶1的比例加入5倍还原型蛋白上样缓冲液，沸水浴变性15 min，完成变性。

1.5.3 SDS-PAGE电泳

清洗玻璃板并晾干后，放入制胶器。固定好板子后，检查其底部是否存在漏胶；根据实验需求配制分离胶和浓缩胶，浓缩胶凝固完毕后，取下板

子，准备电泳；将制胶器放入电泳槽，上样。浓缩胶电压用90 V，分离胶用150 V。电泳至胶板底部时停止电泳，进行转膜；准备六块海绵和一张PVDF膜，将PVDF膜用甲醇活化2 min；将转膜用夹子放入装了转膜液的盘子中，打开，黑上白下，依次放置两块海绵；剥下分离胶，将胶贴于膜上，盖上海绵，将夹子合上放入转膜仪器中。转膜条件：300 mA恒流，30 min，全程装置处于冰浴中。

1.5.4 抗体孵育

将转完后的膜放入装有TBST的孵育槽中，涮洗一次，在室温下，用含0.1% Tween-20的5%脱脂奶粉在摇床上慢摇封闭膜1 h；按照抗体说明书，进行一抗稀释，配置好后，倒掉封闭液，加入配置好的一抗，4℃孵育摇床慢摇过夜；回收一抗，用TBST洗膜3次，然后加入TBST，放置脱色摇床上快速洗脱，每次5 min，洗3次；将二抗用TBST按比例稀释后，加入孵育槽中，放置摇床上慢摇，室温下孵育30 min；用TBST洗膜3次，然后加入TBST，放置脱色摇床上快速洗脱，每次5 min，洗3次。

1.5.5 化学发光

将ECL A和B液按照1∶1比例混合，备用。将洗脱完的PVDF膜取出放在吸水纸上，稍微吸干膜上的液体，加入混合好的ECL发光液，让液体完全浸没膜，待反应1 min之后，用吸水纸吸干多余液体，放入化学发光仪中，按照预设程序开始化学发光，曝光完成之后，保存原始图为TIFF格式。

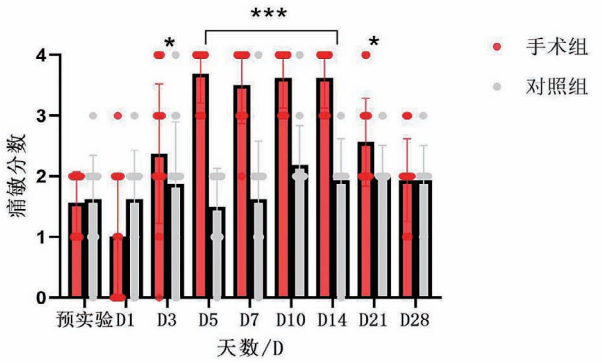
1.6 统计学分析

所有数据采用SPSS 26.0软件统计分析。数据均以平均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用单因素方差分析和Kruskal-Wallis ANOVA检验，$P < 0.05$表示有统计学意义。

2 结果

2.1 机械性异常性疼痛测试

在机械性异常性疼痛测试中，手术前的预实验中手术组小鼠和对照组小鼠的测试得分均在1.7左右，无明显差异。在术后第1天，手术组小鼠分数出现显著下滑至0.9左右。从术后第3天开始，手术组的分数开始上升，逐步上升至第5天并达到峰值。此后，该峰值维持至术后第14天。之后，手术组分数开始下降，到术后28天时已接近术前分数。对照组分数在全期均处于稳定的1.8上下。在术后第3天开始，手术组和对照组已出现显著性差异，而在术后第5天到14天时，显著性差异达到最大。在第28天时，两组已无显著性差异，但手术组分数仍高于对照组（见图1）。

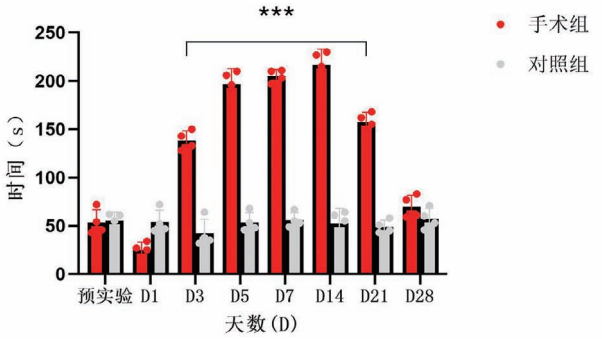


红色为眶下神经截断组小鼠，灰色为假手术组小鼠（* $P < 0.05$，*** $P < 0.001$）。

图1 Von Frey测试结果

2.2 自发性疼痛测试

自发性疼痛测试结果见图2，相比对照组小鼠，术后第1天，手术组小鼠的面部修饰时间有所下降。而在术后3天其面部修饰时间显著上升，术后第14天达到峰值。14天之后，手术组小鼠面部修饰时间开始下降，在术后28天时已降至术前水平。总体曲线趋势与机械诱发痛曲线相似，均在术后3天开始有异常性疼痛发生，而在术后2周后开始下降。



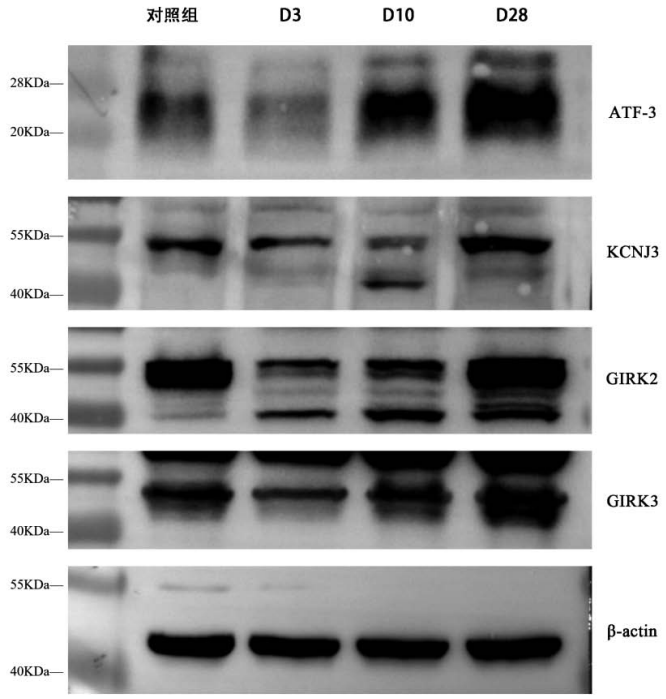
红色为眶下神经截断组小鼠，灰色为假手术组小鼠（*** $P < 0.001$）。

图2 手术组小鼠45 min内进行面部修饰时间

2.3 Western Blot实验结果

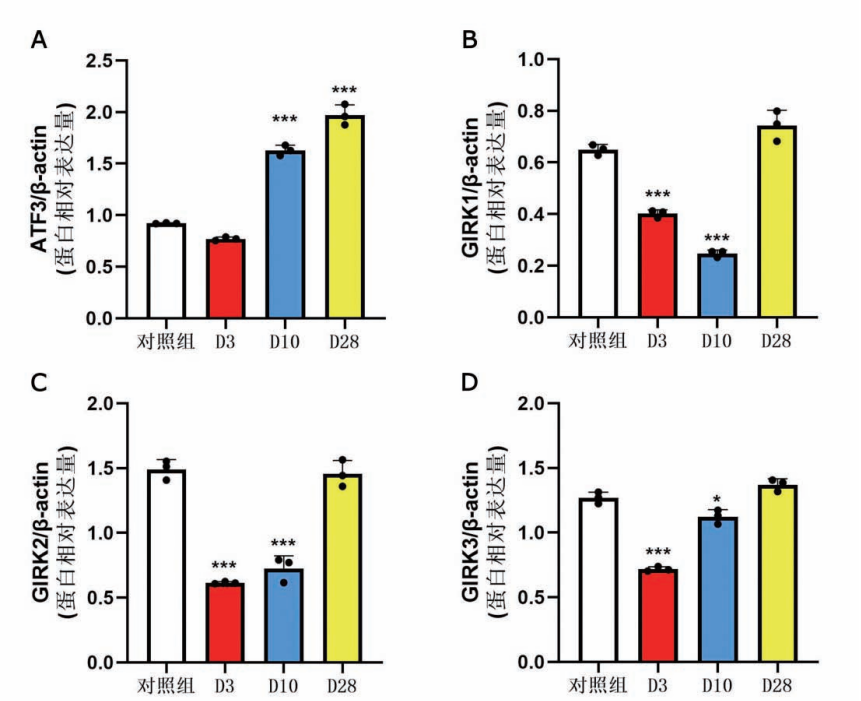
在Western Blot实验中，本研究使用了对照组小鼠和手术组术后第3、10、28天的小鼠来进行对比实验（见图3、图4）。结果显示，在手术组小鼠的三叉神经节中，ATF3蛋白水平在术后3天无明显变化，在术后10-28天出现显著性提升。GIRK1蛋白水平在术后出现下降，在术后3-10天均有显著性下降，在术后28天上调回到初始水

平。GIRK2、GIRK3蛋白水平在术后均出现下降，在术后3-10天均有显著性下降，在术后第28天上调回到初始水平，术后第3天为蛋白水平下降的最低点。



条带从左到右组别分别为对照组、手术组术后3、10、28天。

图3　眶下神经横断术后三叉神经节中ATF3、GIRK1-3蛋白的表达



*P < 0.05，*** P < 0.001。

图4　GIRK1-3和ATF3蛋白灰度值相对定量结果

3　讨论

本实验中使用的动物模型为口内入路的眶下神经横断模型。该模型的主要优点为：通过口内入路，避免了面神经的损伤；口内眶下神经较为表浅，较容易达到手术位置；口内黏膜的强恢复能力避免了缝合所造成的二次损伤；而口内的环境也能较好地避免感染，造成不必要的损害。

在机械性异常性疼痛的检测中，本实验采用了Von Frey进行检测。在术后的第1天，手术组产生了分数减少的趋势，这可能是因为手术损伤的神经为眶下神经的主干，而眶下神经支配着小鼠触须垫部分主要的感觉。在神经横断之后，小鼠触须垫部分因为主要神经通路被截断而出现了“麻痹”的效果，但眶下神经仍有一些神经分支和末梢能够感知相关信息，所以疼痛分数并没有降为0，这说明局部依然存在一定的感觉。

在术后第3天及之后，手术组和对照组的痛敏分数出现显著性差异，并且差距逐渐增大。这一表现符合之前研究所展现的结果，证明了实验模型的有效性。在术后14天之后，两组的显著性差异开始降低，这点与其他文献产生差异，一些文献中该模型的痛敏分数可维持21天甚至更久[13]。一方面，这可能是小鼠已逐步适应测试过程，学会了规避Von Frey细针和隐藏自己的行为，在测试过程中减少了高痛敏分数的动作。另一方面，作为该模型的实验动物载体一般为C57BL/6J小鼠，以昆明小鼠作为该模型的载体的研究较少，种属的差异性可能也是其原因之一。

在自发痛的检测中，本实验通过录像记录小鼠自由活动时的面部抓挠影像，后期再观察记录，量化后得到相关数据。在术后第1天，面部的修饰行为同样因为“麻痹”效果而减少。而在术后的3-14天，小鼠面部修饰时间均有显著性差异，其曲线趋势与该组小鼠Von Frey细针所测的机械性异常性疼痛曲线类似。

在本研究中，我们对对照组和手术组术后3、10、28天小鼠的三叉神经节进行Western Blot实验，对比研究了ATF3和GIRK1-3蛋白在三叉神经节中蛋白水平的表达。我们选用了ATF3作为神经损伤的标志物。ATF3是ATF/CREB转录因子家族的一员，其已被证实在多种组织中会被多种应激信号所影响。如在肝脏中毒和肝切除术、心脏缺血和缺血–再灌注、肾脏缺血-再灌注等相关研究中，ATF3均会在相关疾病中被诱导并发挥重要作用[14]。而在神经痛相关领域，ATF3也被作为一个神经损伤的标志物：在由坐骨神经损伤诱发的神经病理性疼痛等手术模型中，ATF3的表达显著上升[15]。在本实验中，眶下神经横断手术后，手术组小鼠三叉神经节中ATF3蛋白水平在术后10天之后发生显著性上调，这也与之前的研究一致，证明了动物模型的成功建立，神经损伤已经发生[16]。

在手术后，手术组小鼠三叉神经节中的GIRK1-3蛋白水平在术后3-10天显著性下调，其中GIRK1蛋白水平最低点为术后第10天，而GIRK2、GIRK3蛋白水平最低点为术后第3天。在术后第28天，GIRK1-3蛋白水平均上调恢复至对照组蛋白水平。该趋势也与实验中小鼠的机械性异常性疼痛和自发性疼痛一致，说明GIRK蛋白与三叉神经损伤后的疼痛表达具有相关性。

慢性疼痛的特征通常是离子通道活动发生了中长期变化（如翻译后修饰、离子通道基因表达的转录和表观遗传调控等发生改变），从而导致外周伤害性感受器的持续过度兴奋。而钾离子通道可通过调控生理状态下的静息膜电位而控制神经元的兴奋性[17]。在之前的研究中，已有学者做过汇总，各种类型的钾通道在各种神经损伤之后会产生表达以及活性的下调，这可能作为钾离子通道家族的一种普遍现象存在[18]。而在本研究中，我们发现了在外周神经损伤后的3-10天，GIRK1-3通道蛋白水平在三叉神经节中显著下调，这与之前的研究结果相一致。

本研究通过眶下神经横断术建立了小鼠的三叉神经痛动物模型，通过Von Frey细丝测量了其机械性异常疼痛，通过计算面部抓挠时间测量了其自发痛，研究结果证实了GIRK1-3蛋白与三叉神经痛小鼠的机械性异常疼痛和自发痛具有相关性，提示GIRK可能作为相关靶点发挥作用，为三叉神经痛的治疗提供了新的思路和研究方向。

参考文献

[1] CHEN Q, YI D I, PEREZ J N J, et al. The molecular basis and pathophysiology of trigeminal neuralgia[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3604.

[2] ALSHUKRY A, SALBURGO F, JALOUX L, et al. Trigeminal neuralgia (TN): a descriptive literature analysis on the diagnosis and management modalities[J]. J Stomatol Oral Maxillofac Surg, 2017, 118(4): 251-254.

[3] International Classification of Orofacial Pain, 1st edition (ICOP)[J]. Cephalalgia, 2020, 40(2): 129-221.

[4] JONES M R, URITS I, EHRHARDT K P, et al. A comprehensive review of trigeminal neuralgia[J]. Current Pain and Headache Reports, 2019, 23(10): 74.

[5] 丁永忠, 张建生. 显微神经血管减压术治疗三叉神经痛和面肌痉挛[J]. 兰州医学院学报, 1996, 22(3): 47-48.

[6] 郗瑞生, 魏兴国. 大脑皮质与三叉神经脊束核的下行联系—针刺镇痛的下行作用途径探讨之二[J]. 兰州医学院学报, 1980(2): 31-36.

（下转第96页）