

瞬时受体电位通道 M8 在冷刺激致骨关节炎中的作用

沙一帆 邓国英 王秋根 王谦

摘要 瞬时受体电位通道(TRP)M8 是一种非选择性阳离子通道蛋白,广泛分布于各种细胞组织中。该通道能被 22℃~27℃ 的冷刺激或冷却剂如薄荷醇激活,产生 Ca^{2+} 内流为主的跨膜电压变化,参与冷感觉形成,并具有调控疼痛及细胞增殖、分化、凋亡的作用。该文就 TRPM8 在冷刺激致骨关节炎中的作用作一综述。

关键词 冷刺激;瞬时受体电位通道 M8;骨关节炎;炎症因子;疼痛

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2016.06.010

瞬时受体电位通道(TRP)M8 作为首个被发现的冷敏感离子通道蛋白^[1],首次由 Tsavaler 等^[2]鉴别得出。该通道为非选择性阳离子通道,广泛分布于各种细胞组织如支配皮肤和黏膜的感觉神经元(背根神经、三叉神经的小直径神经元)、男性泌尿生殖道、肺上皮细胞及动脉平滑肌细胞等中^[3-4],在冷刺激信号的传导中发挥关键作用。研究表明,同源表达的 TRPM8 作为功能性 Ca^{2+} 通道,可被 22℃~27℃ 的冷刺激(18℃ 以下的冷刺激主要激活 TRPA1)或冷却剂如薄荷醇激活^[5],产生 Ca^{2+} 内流为主的跨膜电压变化,这种激活依赖于 4,5-二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2)的存在^[6]。而异源表达的 TRPM8 的电生理活动提示其可能是一种配体门控的非选择性阳离子通道,该通道对 Ca^{2+} 和 Na^{+} 的选择性比值($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$)为 1:3^[4]。有学者认为,TRPM8 是一种细胞膜去极化激活的电压门控通道蛋白,冷刺激通过使 TRPM8 激活曲线向负电位方向移动来增加其在生理膜电位下开放的概率。而冷却剂如薄荷醇则通过类似途径诱导 TRPM8 开放,同时它还能增加 PIP2 的效能,促进磷脂酰肌醇与通道蛋白的结合,从而促进通道激活^[6-7]。

1 TRPM8 结构

人类 TRPM8 基因位于 2 号染色体 2q37.1,全长 102 124 bp,含有 25 个外显子,转录成信使 RNA(mRNA)后,编码含有 1 104 个氨基酸的蛋白质^[8],

即 TRPM8。近年来 Bidaux 等^[9]在转移性前列腺癌细胞中发现了 TRPM8 2 个短链亚型,这些短链亚型作为蛋白质的 N-末端片段,能与蛋白质 C-末端区域相互作用。

2 TRPM8 病理生理功能

目前研究表明,TRPM8 参与细胞生长调控,与冷感觉及疼痛感觉的形成密切相关,甚至还与血管收缩舒张^[10]、细胞内钙释放^[4,11]、抗氧化损伤^[12]、增加眼表湿度^[13]、激活膀胱冷反射^[14]等有关。

2.1 冷感觉

目前参与温度感知过程的神经通路已较为明确^[15],即温度刺激兴奋初级传入神经元的感觉神经末梢后,产生动作电位,然后传至脊髓和大脑并将兴奋扩散至全身。而寻找在感觉神经末梢信号传导过程中起关键作用的分子是近年研究的热点^[16]。

TRPM8 作为一种通道蛋白,在冷感知中起重要作用^[17]。虽然 TRPM8 温度感知的具体机制尚未明确,但它参与冷感知已被大量实验证实。研究^[18]发现,TRPM8 基因敲除小鼠可表现出明显的冷反应(如冷痛)缺失。Andrews 等^[19]的临床研究显示,TRPM8 受体拮抗剂 pf-05105679 虽不会造成体温明显变化,但可使口中产生热感觉。目前对 TRPM8 在神经元外是否还有感知寒冷的作用尚不清楚^[20],但 TRPM8 在大量不含神经元的组织如泌尿生殖器官、舌上味觉乳头中被发现,提示 TRPM8 可能具有一些额外的生理功能^[21]。

2.2 疼痛感觉调控

目前广泛认为适度冷刺激具有镇痛作用,但过度冷刺激反而会加重疼痛(冷痛觉过敏)。适度冷刺激可增加 TRPM8 活性,使机体对冷的感知增加(冷

基金项目:上海市自然科学基金面上项目(13ZR1433300)、上海市科委引导项目(15411968800)

作者单位:201620, 上海交通大学附属第一人民医院创伤骨科、上海市创伤急救中心

通信作者:王谦 E-mail: drwangqian23@163.com

敏感),从而减轻疼痛。相反,过度冷刺激可导致 TRPM8 高表达,引起炎性因子释放,通过“炎症瀑布效应”产生缓激肽、前列腺素^[22-23]等物质,增强机体对有害性冷刺激的敏感性(痛觉过敏),从而加重疼痛^[24]。Proudfoot 等^[25]研究发现,皮肤、鞘内注射特定的药物或适度降温可激活 TRPM8 而使其高表达,在大鼠神经病理性疼痛和慢性疼痛模型中产生镇痛作用,从而抑制脊髓背角神经元的特征性感觉和反射行为。然而 Todaka 等^[26]研究发现,在炎症反应中出现的冷痛觉过敏与 TRPM8 密切相关,敲除 TRPM8 基因小鼠无冷痛觉过敏。Colburn 等^[27]构建了小鼠神经病理性疼痛模型和炎症性疼痛模型来评估 TRPM8 的作用,结果显示野生型小鼠在受到冷刺激后可产生下肢震颤等冷痛反应,而 TRPM8 基因敲除小鼠则反应不明显。由此可见,TRPM8 同时参与了冷刺激的镇痛和致痛机制,而采用 TRPM8 拮抗剂治疗神经病理性疼痛和炎症性疼痛成为近年研究的热点。

3 冷刺激经 TRPM8 途径所致作用

3.1 导致炎症性疼痛

TRPM8 在伤害性冷刺激传导过程中起重要作用。机体受到伤害性冷刺激时,通过初级神经元中的伤害感受器将伤害性冷刺激转换为电信号,并传输到脊髓、丘脑、大脑皮层,最终产生疼痛感受。TRPM8、TRPA1 及 TRPV1~4 均在伤害感受器中表达,来自热刺激、物理刺激、机械性刺激的信号直接通过其传导,它们在疼痛感受形成和发展机制中起着至关重要的作用^[28]。实验研究^[29]证实,含有 TRPM8 的神经元是伤害性冷刺激反应产生的必要条件。

冷刺激经 TRPM8 途径可致炎症性疼痛。Park 等^[24]采用 TRPM8、TRPA1 基因转染人支气管上皮细胞株(BEAS-2B)和人类胚胎肾细胞株(HEK293)并使细胞株接受冷刺激,结果在这些细胞中线粒体膜电位和三磷酸腺苷(ATP)水平显著升高,而野生株细胞接受冷刺激后则未有明显变化,表明寒冷刺激后 TRPM8 表达增高,进而细胞生理能耗降低,线粒体产热增加(生物氧化、呼吸链、递氢体、氧化磷酸化、ATP 产生)。细胞高代谢带来的结果是代谢废物增多、局部微环境改变,导致炎性因子释放增加,而炎症组织中大量炎症介质如炎性因子、趋化因子、活性氧、蛋白激酶、血管活性胺、脂类、ATP、酸等释放均可导致阈电位下降和感受神经元反应性增高,

并通过疼痛感受通路产生炎症性疼痛。在此过程中,TRPM8 通道的激活和致敏起着至关重要的作用^[28]。

3.2 镇痛作用

TRPM8 可以作为疼痛治疗的分子靶点,但其在药物化学方面的发展仍处于起步阶段^[30]。由于 TRPM8 的复杂性,其拮抗剂和激动剂均具有治疗疼痛的潜能,而 TRPM8 参与了致痛过程还是止痛过程,仍有争议^[31]。

作为 TRPM8 激动剂,薄荷醇的镇痛效果已得到广泛认可,而加用纳洛酮会削弱其镇痛作用,这表明 TRPM8 的镇痛机制可能类似于阿片类药物^[32]。Proudfoot 等^[25]研究神经病理性疼痛模型认为,适度寒冷刺激下动物在受到伤害性刺激时反应时间(上肢回撤时间)明显延长,而适度寒冷的保护效应可因 TRPM8 基因敲除而消失。Dhaka 等^[33]研究发现,在适度低温条件下,后腿注射福尔马林(产生炎症反应)的野生型小鼠疼痛行为(舔或抬起后腿)显著减少,而 TRPM8 基因敲除小鼠则无此变化。以上实验表明,适度冷刺激可经 TRPM8 途径缓解伤害性疼痛,TRPM8 对早期炎症性疼痛和慢性神经性疼痛均有镇痛作用。

3.3 促进细胞坏死和凋亡

近期研究^[7]发现,薄荷醇激活 TRPM8 可促进滑膜成纤维细胞坏死和凋亡。有学者通过胶原诱导大鼠膝关节炎并分离出滑膜成纤维细胞,经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测证实 TRPM8 在滑膜细胞中有表达。薄荷醇作为冷却剂,激活 TRPM8 后可引起细胞内 Ca^{2+} 过载(Ca^{2+} 内流)、细胞内活性氧产生增加、线粒体膜电位去极化,并最终导致滑膜细胞坏死和凋亡。这一过程可被 TRPM8 拮抗剂抑制,可见其与 TRPM8 激活密切相关。

冷刺激激活 TRPM8 后,很可能通过类似途径引起软骨细胞坏死、凋亡增加,但相关文献甚少。实验研究^[12]发现,寒冷刺激后生殖细胞凋亡率增加,该过程由 TRPM8 调控冷休克蛋白、热休克蛋白启动。此外,在生殖细胞中 TRPM8 还能表达抗氧化酶,从而保护生殖细胞免受低温损伤。

4 TRPM8 与骨关节炎

骨关节炎是中老年人中最常见的骨关节慢性疾病^[34],多发于膝关节,表现为关节软骨进行性软化、瓦解,伴有骨赘、囊肿形成及软骨下骨硬化,可导致关节慢性疼痛,影响下肢功能(上下楼梯、行走等),

甚至影响日常生活,极大地降低了生活质量。随着人类寿命的延长,骨关节炎的发病率呈增长趋势^[35]。美国 65 岁以上人群中约 80% 患有骨关节炎^[36],超过一半的骨关节炎患者年龄相对年轻化(65 岁以下)。我国作为人口大国,患骨关节炎者亦不在少数。目前骨关节炎尚缺乏有效的治愈手段,其主要治疗手段只能缓解疼痛症状,改善关节活动度,延缓其进展。关节置换术虽能明显缓解疼痛和改善关节功能,但费用昂贵。因此,新的骨关节炎治疗靶点的探索显得尤为重要。

喻斌等^[37]经临床实验证实,TRPM8 在人类软骨组织中有表达,且表达在软骨细胞膜上。他们^[38]进一步研究发现,骨关节炎患者 TRPM8 表达量明显高于正常人。这些均提示 TRPM8 与骨关节炎相关,但目前尚无其在骨关节炎中具体作用及机制的报道。上文提及的寒冷激活 TRPM8 引起 Ca^{2+} 过载、细胞内活性氧产生增加、线粒体膜电位去极化而导致细胞坏死、凋亡增加,可能是其机制之一。

5 寒冷刺激经 TRPM8 途径参与骨关节炎形成的假说

许多学者认为,寒冷引起血管收缩而加重骨关节炎症状,因此寒冷不是引起骨关节炎发病的危险因素。但也有研究提示,寒冷可能经 TRPM8 途径直接参与骨关节炎的发生发展。有统计学研究^[39]显示,高寒地区人群膝关节骨关节炎患病率明显高于温暖地区,且以 65~75 岁为最高,其患病率与姿势、烟酒和日常饮食习惯无关。刘杰等^[40]在动物实验中成功应用冷刺激建立了小鼠骨关节炎模型,即利用冷水对小鼠膝关节进行直接刺激,破坏正常软骨和滑膜细胞生长环境,对膝关节造成渐进性破坏,从而成功造模。寒冷造成骨关节炎的可能机制有:①细胞内外环境失衡引起变性、溶解、凋亡的细胞及代谢废物增多,从而导致炎症因子如白细胞介素(IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 及趋化因子释放增加,造成关节疼痛、肿胀,并使软骨细胞产生大量基质金属蛋白酶(MMP),MMP 与其特异性组织抑制剂(TIMP)平衡失调,进而破坏软骨细胞及其基质;②冷刺激可减缓末梢血液循环,使软骨细胞缺氧,无氧呼吸增多,局部内环境 pH 值下降,加剧骨素乱及骨增生^[41-44];③寒冷可经 TRPM8 途径导致炎症性疼痛及软骨细胞骨关节炎相关指标升高,而在 TRPM8 基因敲除小鼠软骨细胞中则无相关变化;④寒冷激活 TRPM8,引起 Ca^{2+} 过载、细胞内活

性氧产生增加、线粒体膜电位去极化,从而导致软骨细胞坏死、凋亡增加。由此可见,寒冷、TRPM8、炎症因子、活性氧、骨关节炎之间存在有待探索的联系。

6 展望

目前 TRPM8 在神经病理性疼痛及细胞生长调控中的作用已得到广泛认知,其拮抗剂缓解神经病理性疼痛和治疗癌症一度成为各学科研究的热点^[5]。TRPM8 还参与了很多疾病(如癌症、泌尿生殖道疾病、偏头痛、淀粉样变性多神经病、气道和血管病变等^[8])的病理生理过程以及冷痛觉形成、泪液形成等,为其发病机制及治疗的探索提供了新方向。国内外关于寒冷引起疼痛的机制及寒冷与骨关节炎关系的研究相对较少,而 TRPM8 与骨关节炎的研究则更少。对其进行探索将会为 TRPM8 拮抗剂缓解慢性炎症性疼痛,甚至治疗骨关节炎提供理论基础。

参考文献

- [1] Jordt SE, McKemy DD, Julius D. Lessons from peppers and peppermint: the molecular logic of thermosensation[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, 13(4):487-492.
- [2] Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, et al. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(9):3760-3769.
- [3] McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation[J]. *Nature*, 2002, 416(6876):52-58.
- [4] Zhang L, Barritt GJ. Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(22):8365-8373.
- [5] Perez de Vega MJ, Gomez-Monterrey I, Ferrer-Montiel A, et al. Transient receptor potential melastatin 8 channel (TRPM8) modulation: cool entryway for treating pain and cancer[J]. *J Med Chem*, 2016, [Epub ahead of print].
- [6] 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.
- [7] Zhu S, Wang Y, Pan L, et al. Involvement of transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) in menthol-induced calcium entry, reactive oxygen species production and cell death in rheumatoid arthritis rat synovial fibroblasts[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 725:1-9.
- [8] Almaraz L, Manenschijn JA, de la Pena E, et al. TRPM8[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, 222:547-579.

- [9] Bidaux G, Beck B, Zholos A, et al. Regulation of activity of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel by its short isoforms[J]. J Biol Chem, 2012, 287(5):2948-2962.
- [10] Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, et al. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(6):H1868-H1877.
- [11] Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, et al. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2005, 280(47):39423-39435.
- [12] Borowiec AS, Sion B, Chalmel F, et al. Cold/menthol TRPM8 receptors initiate the cold-shock response and protect germ cells from cold-shock-induced oxidation[J]. FASEB J, 2016, 30(9):3155-3170.
- [13] Chen GL, Lei M, Zhou LP, et al. Borneol is a TRPM8 agonist that increases ocular surface wetness[J]. PLoS One, 2016, 11(7):e0158868.
- [14] Abe J, Hosokawa H, Sawada Y, et al. Ca^{2+} -dependent PKC activation mediates menthol-induced desensitization of transient receptor potential M8[J]. Neurosci Lett, 2006, 397(1-2):140-144.
- [15] Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals[J]. Nat Rev Neurosci, 2014, 15(9):573-589.
- [16] Carrasquel-Ursulaez W, Moldenhauer H, Castillo JP, et al. Biophysical analysis of thermosensitive TRP channels with a special focus on the cold receptor TRPM8[J]. Temperature (Austin), 2015, 2(2):188-200.
- [17] McCoy DD, Knowlton WM, McKemy DD. Scraping through the ice: uncovering the role of TRPM8 in cold transduction[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 300(6):R1278-R1287.
- [18] Vetter I, Kym PR, Szallasi A. Feeling hot, feeling cold: TRP channels. A great story unfolds[J]. Temperature (Austin), 2015, 2(2):150-151.
- [19] Andrews MD, Forselles K, Beaumont K, et al. Discovery of a selective TRPM8 antagonist with clinical efficacy in cold-related pain[J]. ACS Med Chem Lett, 2015, 6(4):419-424.
- [20] Sabnis AS, Reilly CA, Veranth JM, et al. Increased transcription of cytokine genes in human lung epithelial cells through activation of a TRPM8 variant by cold temperatures[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295(1):L194-L200.
- [21] Du S, Araki I, Kobayashi H, et al. Differential expression profile of cold (TRPA1) and cool (TRPM8) receptors in human urogenital organs[J]. Urology, 2008, 72(2):450-455.
- [22] Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception[J]. Nature, 2001, 413(6852):203-210.
- [23] Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain[J]. J Neurobiol, 2004, 61(1):3-12.
- [24] Park S, Chun S, Kim D. Cold exposure lowers energy expenditure at the cellular level[J]. Cell Biol Int, 2013, 37(6):638-642.
- [25] Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain[J]. Curr Biol, 2006, 16(16):1591-1605.
- [26] Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, et al. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia[J]. J Biol Chem, 2004, 279(34):35133-35138.
- [27] Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, et al. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice[J]. Neuron, 2007, 54(3):379-386.
- [28] Dai Y. TRPs and pain[J]. Semin Immunopathol, 2016, 38(3):277-291.
- [29] Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. The cellular code for mammalian thermosensation[J]. J Neurosci, 2013, 33(13):5533-5541.
- [30] DeFalco J, Duncion MA, Emerling D. TRPM8 biology and medicinal chemistry[J]. Curr Top Med Chem, 2011, 11(17):2237-2252.
- [31] Brederson JD, Kym PR, Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 716(1-3):61-76.
- [32] Laing RJ, Dhaka A. ThermoTRPs and pain[J]. Neuroscientist, 2016, 22(2):171-187.
- [33] Dhaka A, Murray AN, Mathur J, et al. TRPM8 is required for cold sensation in mice[J]. Neuron, 2007, 54(3):371-378.
- [34] 沈晓桦,崔屹. 膝关节关节炎的中西医治疗和护理研究进展[J]. 全科护理, 2015, 13(16):1497-1499.
- [35] Ondresik M, Azevedo-Maia FR, da Silva-Morais A, et al. Management of knee osteoarthritis. Current status and future trends[J]. Biotechnol Bioeng, 2016, [Epub ahead of print].
- [36] Raeissadat SA, Rayegani SM, Hassanabadi H, et al. Knee osteoarthritis injection choices: platelet-rich plasma (PRP) versus hyaluronic acid (a one-year randomized clinical trial)[J]. Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disorder, 2015, 8:1-8.
- [37] 喻斌,聂博渊,杨朝晖. 瞬时感受电位 M8 在人类膝关节软骨组织中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(20):3117-3121.
- [38] 喻斌. 温度敏感性离子通道 TRPM8 在人类膝关节软骨组织中的表达[D]. 山西:山西医科大学, 2014.
- [39] 吴鹏,夏伊明,单新平,等. 昭苏高寒高海拔地区人群膝骨性关节炎情况调查[J]. 兵团医学, 2016, 47(1):44-47.
- [40] 刘杰,王晓黎,郭俊生. 冷应激诱发小鼠骨关节炎模型的建立[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(5):289-292.
- [41] Ainola M, Li TF, Mandelin J, et al. Involvement of a

disintegrin and a metalloproteinase 8 (ADAM8) in osteoclastogenesis and pathological bone destruction[J]. Ann Rheum Dis, 2009, 68(3):427-434.

[42] Dekker J, van Dijk GM, Veenhof C. Risk factors for functional decline in osteoarthritis of the hip or knee[J]. Curr Opin Rheumatol, 2009, 21(5):520-524.

[43] Masuko K, Murata M, Suematsu N, et al. A metabolic aspect of osteoarthritis: lipid as a possible contributor to the pathogenesis of cartilage degradation[J]. Clin Exp Rheumatol, 2009, 27(2):347-353.

[44] Takahashi D, Iwasaki N, Kon S, et al. Down-regulation of cathepsin K in synovium leads to progression of osteoarthritis in rabbits[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(8):2372-2380.

(收稿:2016-08-16; 修回:2016-09-28)

(本文编辑:卢千语)

(上接第 382 页)

[50] Kranz LM, Diken M, Haas H, et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy[J]. Nature, 2016, 534(7607):396-401.

[51] James R, Manoukian OS, Kumbar SG. Poly(lactic acid) for delivery of bioactive macromolecules[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2016, [Epub ahead of print].

[52] Xing D, Liang JQ, Li Y, et al. Identification of long noncoding RNA associated with osteoarthritis in humans[J]. Orthop Surg, 2014, 6(4):288-293.

(收稿:2016-08-22; 修回:2016-10-07)

(本文编辑:卢千语)

《国际骨科学杂志》可办理邮购,请汇款至上海市建国西路 602 号《国际骨科学杂志》编辑部。每期 12.00 元,全年 6 期 72.00 元
联系电话:021-33262069 E-mail: intjorthop@163.com