辣椒素及其受体*

骆 昊 万 有 韩济生（北京大学神经科学研究所、神经生物学系，北京 100083）

摘要 可以感受痛觉刺激的初级感觉神经元的周围末梢被称为伤害性感受器。这些小直径神经元的末梢可将化学、机械和热刺激信号转化为动作电位，并将这些信息上传到中枢，最后使机体产生痛觉或不舒服的感受。但到目前为止，人们对这些可探测到伤害性刺激的分子所知甚少。1997 年成功克隆的辣椒素受体亚型 1（vanilloid receptor subtype 1，VR1）是近年来科学家们研究的“热点分子”，它是表达于伤害性感受器上的非选择性阳离子通道，已有诸多证据表明其可探测和整合诱发痛觉的化学和热刺激信号。基因敲除小鼠的研究分析也有力证明了该离子通道参与了疼痛及组织损伤后痛觉过敏的产生，而且是热诱发疼痛发生过程的关键分子。

关键词 伤害性感受器；辣椒素；辣椒素受体；背根神经节；疼痛

学科分类号 R338

Capsaicin and Its Receptor —— Vanilloid Receptor LUO Hao, WAN You, HAN Ji-Sheng (*Neuroscience Research Institute and Department of Neurobiology, Peking University*, Beijing 100083)

Abstract The detection of painful stimuli occurs primarily at the peripheral terminals of specialized sensory neurons called nociceptors. These small – diameter neurons transmit this information to the central nervous system, ultimately eliciting a perception of pain or discomfort. The capsaicin (vanilloid) receptor, an excitatory ion channel expressed at nociceptors, plays an important role in transducing thermal and inflammatory pain. Mice lacking the VR1 gene have deficits in thermal- or inflammation- induced hyperalgesia, which confirms the involvement of this channel in pain sensation, especially the sensation of heat-evoked pain.

Key words Nociceptor; Capsaicin; Vanilloid receptor; Dorsal root ganglion; Pain

在哺乳动物中，机体接受到伤害性化学、机械或者热刺激的过程称为伤害性感受。那些存在于背根神经节和三叉神经节中，感受和传递伤害性冲动的初级感觉神经元的外周部分则称为伤害性感受器，它们在形态学上是初级感觉神经元的神经末梢，广泛分布于皮肤、肌肉、关节和内脏器官，其中 80% 为多型伤害性感受器，即该感受器可感受多种刺激，如热、机械及化学性刺激，并可将这些伤害性信息传递给中枢，最终引起痛觉和不舒服的感觉，并产生适当的保护性反射。因此，通过研究伤害性感受器信息传导的细胞及分子机制将可以更好地理解疼痛的产生及维持过程中所出现的一系列的行为变化。1997 年克隆的辣椒素受体（vanilloid receptor subtype 1，VR1）广泛分布于这些伤害性感受器上，并证明它参与了急性炎症痛敏的形成[1]，且用基因敲除的方法也证明其是热痛觉敏感产生所必需的[2,3]。随着对 VR1 的不断深入地研究及其家族新成员的陆续发现，越来越多的证据表明 VR1 参与了疼痛的发生机制。

一、辣椒素（capsaicin）

辣椒素是辣椒中的主要辛辣成分。在 19 世纪中叶 Thresh 首次将其从辣椒粉中分离并命名为 capsaicin。在以后的很长一段时间里，都没有人将辣椒素与疼痛联系起来。直到 1919 年，Nelson 报道了辣椒素的结构，是一种酰基化的香草酸同源同系物高香草酸（homovanillic acid），这也是之所以把在以后发现的辣椒素受体命名为香草酸受体（vanilloid receptor，VR）的原因。在 20 世纪 50 年代，Jancso 提出了辣椒素参与了激活感知痛觉的神经元的活动。从此以后，有关辣椒素在疼痛中的研究愈来愈多，人们发现辣椒素不仅可用于研究伤害性感受器初级传入的神经生物学，而且通过辣椒素可以探讨新的研究慢性痛的方法。

* 国家自然科学基金（39830160 和 30170319）、国家重点基础研究计划“脑功能和脑重大疾病的基础研究”（G1999054000）资助课题

二、辣椒素受体(vanilloid receptor subtype 1, VR1)

辣椒素之所以用途如此之大,其原因在于它具有非常明显的细胞特异性,即其可激活无髓鞘 C 纤维上的非特异性离子通道——辣椒素受体,从而产生生物学活性。该受体在 1997 年才被 Julius 及其同事运用表达克隆策略的方法成功克隆,命名为香草酸受体亚型 1 (vanilloid receptor subtype 1,VR1),并认为可能存在着亚型[1]。因此近几年来,人们的注意力逐渐由辣椒素转移到其受体上,对其进行了多方面的研究。

(一) VR1 的结构　VR1 是一个配体门控的非选择性阳离子通道,当其与配体结合后,通道开放,阳离子(尤其是钠离子和钙离子)从胞外进入胞内[4],引发了一系列生物学效应。通过 VR1 受体和电压依赖的钙离子通道引起的钙离子内流导致了神经末梢释放神经肽类和兴奋性氨基酸。亲水性分析(hydrophilicity analysis)显示它有 6 个跨膜区,其中在第 5 和第 6 个跨膜区之间有一个短的孔状疏水结构,此结构参与并调控了辣椒素激活 VR1 的过程,而与氢离子和温度的关系不大[5]。其氨基末端的亲水区(432 个氨基酸)包含了一个脯氨酸富集区(proline - rich region),其连接了三个钩状重复区域,据推测可能参与了受体蛋白之间的相互作用(图 1);羧基末端(154 个氨基酸)包含了一些不可识别的基序(motif),其功能尚不清楚。VR1 与瞬时感受器电位(transient receptor potential,TRP)家族的一些成员在氨基酸序列上有 23% 的同源性,TRP 家族的相关分子的核心跨膜结构类似于钾离子门控或环核苷酸门控通道。

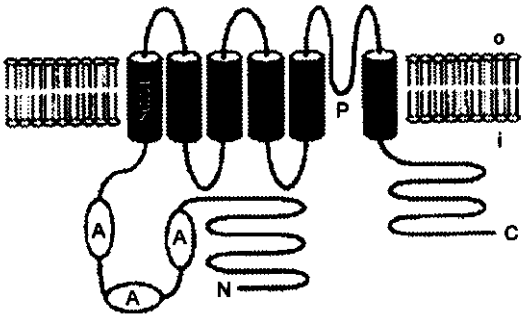

图 1　VR1 的膜拓扑和结构域的结构示意图

o:细胞膜外部;i:细胞膜内部。A:ankyrin repeats,钩状重复区;P:poreloop,孔环区;TMDs:transmembrane domains,跨膜区;N:氨基末端;C:羧基末端(修改自参考文献 1)

(二) VR1 在背根神经节的细胞学定位　VR1 广泛分布于背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)、三叉神经节和迷走神经节中的中等和小型神经元上,而正是这些神经元介导了伤害性信息的传入[6]。背根神经节神经元从体积上可粗略分为大($\Phi \geqslant 50\ \mu m$)、中($50 > \Phi\ 27\ \mu m$)和小($\Phi \leqslant 27\ \mu m$)三个细胞群。使用电生理方法发现,大部分小直径神经元与细的有髓鞘的 Aδ 纤维或无髓鞘的 C 纤维相连,因而认为其与痛觉传递关系密切。这些小直径神经元可通过免疫组织化学的方法分为肽能和非肽能两个亚群,前者含神经肽类物质,如 P 物质(substance P, SP)和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP),表达 trkA,它是神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的高亲和力受体,构成痛觉传递的肽能通路;后者的 trkA 在出生后三周消失,一般不含有神经肽,此群神经元可与一种植物凝集素 IB4 (isolectin B4)特异性结合。这两种神经元末梢位于脊髓的不同部位,trkA 阳性神经元的末梢主要终止于脊髓背角的浅层(Ⅰ层和Ⅱ层外侧);IB4 阳性神经元的末梢则终止于Ⅱ层内侧中有高水平蛋白激酶 Cγ(protein kinase Cγ, PKCγ)表达的一条狭长地带。利用膜片钳技术可在 IB4 阴性神经元上记录到大量的伤害性热刺激诱发的离子电流,提示此群神经元是伤害性热刺激的感受器[7]。采用同源重组技术制成小鼠 PKCγ 基因缺陷模型可阻断部分神经切除引起的神经病理性疼痛,实验性大鼠及小鼠的后爪炎症则可引起 trkA 阳性神经元表达高水平的 SP,提示慢性炎症痛主要由 trkA 阳性神经元介导;而外周神经损伤所导致的神经病理性痛则由 IB4 阳性神经元介导。为了确定哪些感觉神经元表达了 VR1 蛋白,研究者们运用免疫组织化学的方法发现 80% 的 trkA 和 IB4 阳性神经元表达了 VR1 蛋白样活性物质[8,9]。应用原位杂交的方法检测到 VR1 的 mRNA 在 trkA 阳性神经元上有广泛的分布,而在 IB4 阳性的神经元上则有相对少些的分布[9]。但在病理情况下 VR1 是如何变化的尚不清楚。最近用免疫组织化学的方法证实 VR1 在有髓鞘的 Aδ 纤维上也有表达[10]。

(三) VR1 是一种多型信号探测器及多种疼痛刺激的整合器　Caterina 等发现克隆的 VR1 可被多种伤害性刺激激活[1],目前研究最多的主要有三种:芳香草醛化合物(以辣椒素为代表)、热刺激(>43℃)和氢离子(proton)(图 2)。这些刺激可在在

体时共同调节 VR1 的活性,尤其在组织酸化和温度升高的病理情况下。而且,Zygmunt 等(1999)发现可能存在 VR1 的内源性配体(如膜源性的脂类物质)参与了在体通道活性的调制。目前尚不清楚 VR1 是如何探测或整合这些不同的刺激,考虑到是因为受体通道蛋白本身的内在特性决定的。

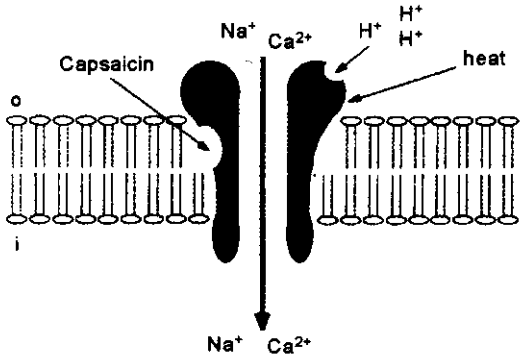

图 2 不同刺激激活 VR1 的模型

辣椒素、氢离子或热刺激可使通道打开,引起钙离子和钠离子内流。o:细胞膜外部;i:细胞膜内部(修改自 Jpn J Pharmacol, 2000, 83 : 20 ~ 24)

1. 辣椒素:辣椒素可以激活小直径的感觉神经元而引起痛觉,并呈剂量相关性地释放 SP 和 CGRP 等神经肽类物质和兴奋性氨基酸。辣椒素作用于其受体使 SP 释放的可能机制是:辣椒素结合并激活初级感觉神经元末梢的辣椒素受体,引起钙离子内流,胞质内的钙离子浓度增高可促使 SP 的释放[4]。此过程同时也可能有 cGMP 和 NO 的参与。长期持续应用辣椒素可引起感觉神经元的失敏,目前认为失敏的原因可能是源于钙和钙调蛋白依赖的去磷酸化[11],及电压依赖的钙离子通道的长时程阻断。Nicholas 等(1999)发现感觉神经元的末梢对辣椒素的敏感性依赖于 NGF 的存在。另外,细胞内钙离子浓度的蓄积也可导致一些钙离子依赖的酶被激活并且同时削弱了线粒体的功能[4],从而增强了脱敏性。

2. 热刺激(> 43℃):VR1 受温度控制,但只有当温度 >43℃时,该通道才会被激活,此温度阈值与热刺激在人和动物上诱发疼痛的阈值相似。用转染 VR1 的 HEK293 细胞和卵母细胞来检测 VR1 对辣椒素和热刺激的活性[1,8],结果显示 VR1 介导的热刺激诱发电流的主要成分是钙离子的大量内流,这与辣椒素激活 VR1 后所产生的电流类似。说明它们之间确实存在显著的相关性。而且,这两种伤害性刺激激活 VR1 产生的电流可被辣椒素受体的拮抗剂 capsazepine 和 ruthenium red 所削弱。VR1 的选择性点突变可以明显地改变其激活所需的辣椒素强度和热刺激阈值。用电生理的方法在组织培养的神经细胞上也证明了 VR1 可能组成了热激活的离子通道。而且,基因型为 VR1$^{-/-}$ 的基因敲除小鼠对角叉菜胶(carrageenan)诱发的热痛觉过敏反应能力丧失[2]。上述证据均表明 VR1 参与了热痛觉过敏的产生。但是否降低温度会抑制辣椒素诱发的电流呢?在体外培养的大鼠背根神经节细胞上得出的研究结果表明,当温度降低时(从 31℃ 下降到 14℃),的确可以抑制辣椒素诱发的电流,此现象可以解释当大幅度降低体表温度时,可缓解和减轻炎性痛的原因[12]。

3. 氢离子(H^+):在感觉神经元,由氢离子激发所产生的电流包含两种成分:一种是迅速失活的、选择性的钠离子线性电流;另一种则是较为持久的、非选择性阳离子介导的外向整合电流。Reeh 等认为后一种电流成分被认为是组织酸化后引起疼痛时所产生的电流,而 VR1 则是其中的关键组成[13]。在感觉神经元中,VR1 在一定的氢离子浓度范围内被激活,伴随着持续激发的电流,氢离子可使神经支配的组织和缺血及炎症造成损伤的组织释放神经肽。尽管如此,至今仍旧不清楚 VR1 是否可以完全代表在生理状态下氢离子激发的持续性疼痛。考虑到在组织损伤后,VR1 被激活所产生的效应可能是氢离子及温度的综合效应。在正常外界温度或室温的情况下,如果 pH 值明显降低(如 pH = 5.4)也可激活 VR1。这些相互作用使得在缺血或损伤的组织中,pH 值的轻微改变就可以明显加重疼痛并产生自主反射。其原因可能是组织损伤引起了组织的酸化,从而提高了组织对外界热刺激和化学刺激的反应性。事实上,氢离子加强 VR1 对热伤害性刺激的反应是炎症后伤害性感受器对热刺激敏感性增加的具体体现。

这三种激动剂使 VR1 激活的机制是否存在着相互关系呢?实验发现,辣椒素和氢离子引起的受体失敏是钙依赖性的,而热刺激则为非钙依赖性的[8]。它们可能并不是通过一种简单的模式,即作用于通道的同一位点而发挥作用。另一方面,VR1 的竞争性拮抗剂 capsazepine 可以阻断辣椒素、热刺激和氢离子激活 VR1 产生的电流,提示这三种伤害性刺激在某种程度上又存在着相同的机制。另外,辣椒素与 VR1 结合后可影响正常生理条件下热刺激和氢离子对离子通道的开放,此时,辣椒素不是作

为一种激动剂、而是调节剂来发挥作用，它降低了 VR1 对氢离子和热刺激反应的阈值。

（四）VR1 的选择性竞争性拮抗剂 capsazepine（CPZ）　Capsazepine 是一种合成的辣椒素的类似物，可特异地抑制辣椒素的作用。辣椒素作用于不同的辣椒素敏感的神经元标本所产生的效应均可被 capsazepine 阻断或削弱，包括钙离子的内流、组织培养神经元的全细胞电流、反射性的去极化和神经肽的释放。但当其它激动剂作用于辣椒素敏感的神经元时，所产生的生物学效应却不可被 capsazepine 所拮抗[14,15]。Oh 等（1996）用组织培养的感觉细胞进行实验发现，capsazepine 可阻断辣椒素激活的单通道电流，说明 capsazepine 是直接作用于辣椒素受体的。在体实验中也得出了 capsazepine 可阻断辣椒素产生的生物学效应。皮下给予 capsazepine 可抑制辣椒素引起的抗伤害性感受。但在体实验中 capsazepine 的有效剂量较离体实验大得多，皮下给予 19 ~ 75 mg/kg 的 capsazepine 才可阻断辣椒素产生的效应[16]。角叉菜胶诱发的痛觉过敏可被给予每只大鼠的单侧后足 > 0.6 mg 的 capsazepine 剂量依赖性削弱[17]。但是，Liu 等（1997）胞外给予 10μmol/L 的 capsazepine 时不仅可以阻断辣椒素所产生的生物学效应，同时可逆性地减低激活其受体所产生的电流幅度，Santicioli 等也指出当 capsazepine 的浓度大于 30 μmol/L 时，其会产生非特异性的反应。还有一点需要指出，在炎性痛中，capsazepine 对炎性反应无减轻作用[17]。上述这些证据表明，capsazepine 是一种辣椒素受体的特异性竞争性阻断剂。

（五）VR1 与急性痛　VR1 广泛分布于介导伤害性信息传入的初级感觉神经元上[6]。其特异性竞争性拮抗剂 capsazepine 可抑制角叉菜胶诱导的急性关节炎模型上出现的痛敏[17]，且 VR1 基因敲除的小鼠对角叉菜胶诱发的热痛觉过敏反应能力丧失[2]。但这种基因缺陷小鼠的其它一些疼痛的主要感觉没有变化。它们对伤害性机械及冷刺激有正常的反应[3]，表明 VR1 可能在外周局部参与炎症性痛敏的形成；在中枢，VR1 的 mRNA 在下丘脑分布特别丰富[18]，脑室应用它的拮抗剂 capsazepine 和 ruthenium red 则可对抗皮下注射辣椒素所造成的急性痛觉过敏[19]，提示中枢的 VR1 可能也参与痛觉过敏的形成过程。这些事实说明，VR1 及其内源性配体可能从外周到中枢的多个水平上参与急性病理性疼痛的产生过程。至于 VR1 在急性炎症（外周给予角叉菜胶诱发的炎症）的过程中是如何变化的，Tohda 及其同事得到了下面的结论：急性外周炎症减少了背根神经节中 VR1 的 mRNA 水平，增加了 VR1 mRNA 经轴突向周围和中枢末梢的转运。急性炎症引起了 VR1 在神经末梢的表达上调，至少是由于 VR1 的 mRNA 的轴浆运输增加实现的；且在急性炎症中，背根神经节的中枢端对辣椒素的敏感性增加。上述 Tohda（2001）等得出的结果显示 VR1 可能参与了初级传入对辣椒素的高敏感性和炎性痛敏的产生[20]。

三、结语

辣椒素受体仍是研究的热点之一。VR1 对温度的感受范围是 > 43℃ 的热刺激，它和新近克隆成功的同一家族成员辣椒素受体样受体（VRL1）（Nature，1999，398：436 ~ 441）、冷和薄荷醇敏感受体（cold- and menthol-sensitive receptor 1，CMR1）（Nature，2002，416：52 ~ 58）又称 TRPM8（Cell，2002，108：705 ~ 715）一起，大大推进了人们对生理温度觉与痛觉的认识。同时，可以预期，VR1 受体等在慢性痛，尤其是慢性炎性痛中作用的阐明将加深人们对慢性痛发生机制的了解。

参　考　文　献

1　Caterina MJ，Schumacher MA，Tominaga M，et al. The capsaicin receptor：a heat - activated ion channel in the pain pathway. Nature，1997，398：816 ~ 824.

2　John BD，Julie G，Martin J，et al. Vanilloid receptor - 1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. Nature，2000，405：183 ~ 187.

3　Caterina MJ，Leffler A，Malmberg AB，et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. Science，2000，288：306 ~ 313.

4　Bevan S，Szolcsanyi J. Sensory neuron - specific actions of capsaicin：mechanisms and applications. Trends in Neurosci，1990，11：330 ~ 333.

5　Welch JM，Simon SA，Reinhart PH. The activation mechanism of rat vanlloid receptor，by capsaicin involves the pore domain and differs from the activation by either acid or heat. Proc Natl Acad Sci USA，2000，97：13889 ~ 13894.

6　Helliwell RJA，McLatchie LM，Clarke M，et al. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid（capsaicin）receptor（VR1）mRNA in adult rat sensory ganglia. Neurosci Lett，1998，250：177 ~ 180.

7　Cheryl LS，Gary RL. Isolectin B4 - positive and negative nociceptors are functionally distinct.　J Neurosci，1999，

19 : 6405 ~ 6497.

8 Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain – producing stimuli. Neuron, 1998, 21 : 531 ~ 543.

9 Michael GJ, Priestly JV. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. J Neurosci, 1999, 19 : 1844 ~ 1854.

10 Ma QP. Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. Neurosci Lett, 2002, 319 : 87 ~ 90.

11 Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. J Neurosci, 1997, 17 : 3525 ~ 3537.

12 Alexandru B, Bogdan A, Ulrich K, Andreas S. Cooling inhibits capsaicin – induced currents in culrured rat dorsal root ganglion neurons. Neurosci Lett, 2002, 317 : 131 ~ 134.

13 Reeh PW, Kress M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. Curr Opin in Pharmacol, 2001, 1 (1) : 45 ~ 51.

14 Bevan S, Hothi S, Hughes G, et al. Capaszepine : a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. Br J Pharmacol, 1992, 107 : 522 ~ 544.

15 Dickenson AH, Dray A. Seletive antagonism of capsaicin by capsazepine : evidence for a spinal receptor site in capsaicin – induced antinociception. Br J Pharmacol, 1999, 104 : 1045 ~ 1049.

16 Perkins MN, Campbell EA. Capsazepine reversal of the antinociceptive action of capsaicin in vivo. Br J Pharmacol, 1992, 107 : 329 ~ 333.

17 Kwak JY, Jung JY, Hwang SW, et al. A capsaicin – receptor antagonist, capsazepine, reduces inflammation – induced hyperalgesic responses in the rat : Evidence for an endogenous capsaicin – like substance. Neuroscience, 1998, 86 : 619 ~ 626.

18 Sasamura T, Sasaki M, Tohda C, et al. Existence of capsaicin – sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. NeuroReport, 1998, 9 : 2045 ~ 2048.

19 Santos AR, Calixto JB. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neurosci Lett, 1997, 235 : 73 ~ 76.

20 Tohda C, Sasaki MKT, Sasamura T, et al. Axonl transport of VR1 capsaicin receptor mRNA in primary afferents and its participation in inflammation – induced increase in capsaicin sensitivity. J Neurochem, 2001, 76 : 1628 ~ 1635.

蛋白质结构分析方法赢得诺贝尔化学奖

要了解生物分子的形状和结构相当困难，象蛋白质这样大而复杂的分子正是最难分析的。因此，发现研究大分子关键工具的三位研究者获得了 2002 年诺贝尔化学奖。一半奖金由瑞士的 Kut Wuthrich 获得，他利用核磁共振(NMR)光谱法测定生物大分子三维结构。另一半授予佛吉尼亚国家大学的 Jone Fenn 和日本 Shimadzu Corporation 的 Koichi Tanaka，他们发明了用质谱分析以及鉴定蛋白质等大分子结构的技术。Tanaka，43 岁，是自 1967 年以来获此桂冠的最年轻的化学家；也是今年继物理学奖获得者 Masatoshi Koshiba 之后第二位获诺贝尔奖的日本科学家。

诺贝尔基金会成员说："精确分析蛋白质将促进对生命过程的了解，现在研究者们可以简便快速地了解样品蛋白质组成和蛋白质在溶解状态下是什么样"。

几十年来，化学家们应用核磁共振(NMR)和质谱(MS)技术研究小分子，但生物学家难以采用同样的技术研究结构复杂的蛋白质大分子。NMR 可以分析原子在强大的磁场中吸收射线的方式。蛋白质含有成千上万的原子，能产生令人眼花瞭乱的 NMR 谱。20 世纪 80 年代，Wuthrich 提出应用 NMR 研究蛋白质是可能的，通过"序列分配"(sequential assignment)确定分子中任意两个氢原子的距离，然后将每个射电吸收峰与蛋白质中氢核配对。这样，不必结晶，就可以直接采用蛋白质在体内存在的形式，即溶解形式确定其结构。

质谱是依据分子大小不同而分离物质的一种高效灵敏的分析工具。Fenn 和 Tanaka 利用电场促使蛋白质转变成带电荷蒸汽，再以质谱检测。Tanaka 以软性激光解吸附作用，用激光脉冲攻击固性或粘性样本。Fenn 用另一方法，即电喷雾离子化，利用电场使蛋白质溶液产生细微喷雾。

(Nature, 2002, 419 : 659)(潘　燕　李学军)