

# 郁金提取物对 CCI 大鼠脊髓 P-P38 表达的影响

胡娅娜<sup>1</sup>, 裘涛<sup>2</sup>, 厉飞<sup>3</sup>, 卢裕强<sup>3</sup>, 杨峰<sup>3</sup>, 陶水良<sup>4</sup>

1. 金华市中医医院(浙江中医药大学附属医院)脑病科, 浙江 金华 321017;

2. 浙江中医药大学附属第一医院神经内科, 浙江 杭州 310006;

3. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310053; 4. 浙江中医药大学基础医学院, 浙江 杭州 510053

**摘要:**目的 探讨不同剂量郁金提取物对神经病理性疼痛模型慢性压迫性神经损伤(chronic constriction injury, CCI)大鼠痛阈及脊髓早晚期因子 P-P38 表达的影响及调节作用,并讨论郁金提取物对神经病理性痛的影响机制。**方法** 选择成年健康雄性 SD 大鼠 36 只,体重 250~294 g,建立 CCI 大鼠模型,将 SD 大鼠随机分为:正常组,模型组,郁金提取物低、中、高剂量组,加巴喷汀组和溶媒组,每组 4 只,对各组大鼠进行热缩足潜伏期测定,用蛋白免疫印迹(Western blot)法检测大鼠 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 脊髓的中早晚期因子 P-P38 表达。**结果** ①与正常组相比,造模后大鼠热缩足潜伏期(TWL)值显著下降( $P<0.05$ ),说明神经病理性模型造模成功;与溶媒组相比,郁金提取物高剂量组能显著上调 CCI 模型大鼠(Thermal withdrawal latency, TWL)值( $P<0.01$ )。②造模后大鼠 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 脊髓的中早晚期因子 P-P38 表达灰度值与内参的比值成上升趋势,均较正常组显著增加( $P<0.01$ );与溶媒组相比,郁金提取物高剂量组和加巴喷汀组能显著降低 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 脊髓的中早晚期因子 P-P38 的表达( $P<0.01$ )。**结论** 高剂量郁金提取物可能通过降低神经病理性疼痛 CCI 模型大鼠脊髓的中早晚期因子 P-P38 的表达而发挥抑制神经病理性疼痛的产生和发展。

**关键词:**郁金提取物;神经病理性疼痛;慢性压迫性神经损伤大鼠;热缩足潜伏期;磷酸化 p38;蛋白免疫印迹

**中图分类号:** R745.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2016)06-0934-03

**DOI:** 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2016.06.016

**The effect of radix curcumae extract on expression of P-P38 in spinal cord of CCI rats** HU Ya-na, QIU Tao, LI Fei, et al. Department of Encephalopathy, Jinhua TCM Hospital, Jinhua, Zhejiang 321017, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of different doses of Radix curcumae extract on expression of P-P38 and pain threshold of CCI rats. **Methods** Thirty-six healthy adult male SD rats, weight 250–250 g, were chosen. To establish the CCI rat model, the SD rats were divided into normal group, model group, radix curcumae extract low, middle and high dose group, and gabapentin group and solvent group, and all of rats in each group were measured thermal paw withdrawal latency, using Western blot detection of rat L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> spinal cord of P-P38 expression. **Results** ① Compared with the normal group, rats TWL value decreased significantly ( $P<0.05$ ), indicating that neuropathic model was successfully built. Compared with the solvent group, Curcuma aromatica extract high dose group can significantly increased in CCI rats TWL value ( $P<0.01$ ). ② After modeling, L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> spinal cord in rats of P-P38 expression of gray value and the ratio of reference into an upward trend, compared with normal group increased significantly ( $P<0.01$ ); compared with the solvent group, curcuma aromatica extract high dose group and gabapentin group can significantly reduce the L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub> spinal cord of P-P38 expression ( $P<0.01$ ). **Conclusion** High dose of Radix curcumae extract may play a role in neuropathic pain through reducing the expression of P-P38 in spinal cord of CCI model rats.

**Key words:** Radix curcumae extract; Neuropathic pain; CCI; TWL; P-P38; Western blot

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)最新定义为影响躯体感觉系统的疾病或病损所直接引发的疼痛<sup>[1]</sup>。它以自发性疼痛,痛觉过敏,异常疼痛和感觉异常为主要临床特征,可由手术、外伤、神经系统疾病或累及神经系统的全身性疾病、感染等引起。P38 MAPK(P38 mitogen-activated protein kinase)是有丝分裂原激活蛋白激酶家族的成员之一,神经病理性疼痛大鼠脊髓小胶质细胞存在 P38 MARK 的表达及活性明显增高<sup>[2-5]</sup>,提示 P38 MAPK 通路可能与神经病理性疼痛密切相关。本研究旨在探讨不同剂量郁金提取物对 CCI 大鼠抗神经病理性疼痛的效果及脊髓 P-P38 表达的影响。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性清洁级 SD 大鼠 36 只,体重 250~294 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物合格证号:SCXK(沪)2013-0016。保证 12 h 明暗交替光照,自由饮食和饮水,适应环境 1 周后,随机分为:应用随机数字表随机分为正常组,模型组,郁金提取物低、中、高剂量组,加巴喷汀组和溶媒组,每组 4 只。

1.2 主要药物 郁金提取物(含 β-榄香烯>80.0%):浙江中医药大学药学院提供;加巴喷汀:江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H20030662;无水乙醇:永华化学科技(江苏)有限公司,批号 20130921;DMSO:美国 AMRESCO 公司;Tween-80、Tween-20:北京索莱宝科技有限公司;10%水合氯醛:浙江省中医院自制。

1.3 主要仪器和试剂 电子天平:奥豪斯中国地区;

**基金项目:**浙江省中医药管理局课题(2013ZB031)

**通信作者:**陶水良, E-mail: lanethtao@163.com

热刺痛仪: Ugo Basil Biological Research Apparatus, Comerio (va) Italy; 一抗(P-P38): 购于北京中杉公司; 二抗: 购于北京中杉公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒: 碧云天产品; BSA: BBI 公司; ECL: PIERCE 公司; PVDF 膜: BIO-RAD 公司; TBS 液: 购于吉诺公司。

#### 1.4 实验方法

1.4.1 造模方法 参照 Bennett GJ 等<sup>[6]</sup>的方法建立 CCI 模型。大鼠禁食 12 h 后, 予 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g) 腹腔注射麻醉后, 消毒大鼠的右下肢, 备皮后于股后暴露右侧坐骨神经主干, 在接近其分叉之前用 4 根 320 的铬制羊肠线间隔 1 mm 进行松结扎, 要求不阻断神经血供, 然后逐层缝合切口。术后予青霉素 4 万 IU/只(80 万 IU 青霉素溶于 0.9% 生理盐水 2 ml) 腹腔注射, 连用 3 d 抗感染。

1.4.2 给药方法 造模后, 郁金提取物低、中、高给药组分别给予郁金提取物 60、120、180 mg/kg, 加巴喷丁组给予加巴喷 100 mg/kg, 溶媒组给予溶媒, 其配置方法为 DMSO 1.5 g 与无水乙醇 1.5 g 混合均匀后加 Tween-80 4.5 g 充分溶解, 临用前用纯净水稀释至 45 ml。用药各组在造模后第 1 天起按各组药物 0.2 ml/100 mg 灌胃给药, 1 次/d, 连续给药 14 d。正常组和 CCI 模型对照组造模后均予正常喂养, 不予任何药物干预。

1.5 热缩足潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL) 的测定 正常组、CCI 组、各给药组给药第 14 天测定, 测定时间为 8:00~14:00。将大鼠置于有机玻璃箱中(22 cm×12 cm×22 cm)中, 底为塑料隔板, 实验前适应 15 min, 用辐射热痛觉测试仪的聚光光源照射其右足底部, 记录由照射到大鼠缩脚的时间作为其热辐射缩爪反射潜伏期值(paw-withdrawal threshold, PWL), 单位为秒(s)。以 30.1 s 为最大阈值, 以防止局部烫伤, 每次照射取右侧足心处, 每侧测量 5 次, 每次测量间隔 5 min, 去掉 1 个最高值及 1 个最低值, 取平均值即为其 TWL。

#### 1.6 Western blot 法测定 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 脊髓中 P-P38 的表达

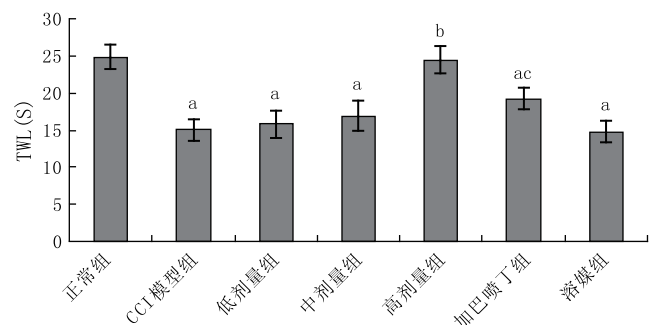
正常组、CCI 组、各给药组给药第 14 天测定。大鼠断头处死后, 迅速分离脊髓腰膨大部分(L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 节段)的脊髓, -80 °C 保存备用, 液氮碾磨组织, 加入 500 μl 蛋白裂解液, 吹散振荡器上震荡混匀, 然后置冰上 60 min, 期间振荡几次。然后在低温离心机中离心, 以 12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 6 cm), 取上清。加入等量 1X SDS 样品缓冲液, 煮沸 5~10 min。冷冻保存。严格按照碧云天产品(SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒)说明书配胶, 待凝固后, 蛋白上样, 开始电泳, 上胶采用 80 V 电压, 等跑至下胶位置时调电压至 100 V, 直至电泳完成。再转膜, 转膜以 350~380 mA 的电流

100~120 min。转膜后, 在 5% 的 BSA 中室温封闭 2 h 以上或 4 °C 冰箱过夜, 封闭后加一抗, 一抗以 1:500 稀释, 一抗在 4 °C 冰箱过夜, 然后用 TBS-T(TBS 内加 0.05% 的 Tween-20) 洗膜 3~5 次, 加入二抗, 二抗以 1:2 000 稀释, 室温放置 2 h, TBS-T 洗膜 3~5 次, 加入 ECL, 至于 BIO-RAD 显影成像分析系统中显影成像存于电脑中。蛋白表达水平以目的蛋白与内参灰度比值反应相应项目的表达。

1.7 统计学方法 使用 SPSS 13.0 统计学软件进行数据统计, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。各组用重复测量(repeated measures)或单因素方差分析, 多重比较(Post hoc Dunnett 分析)采用 LSD(方差齐时)或 Tamhane's T2(方差不齐时)法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠热痛行为学比较 正常组 TWL 数值的平均值均大于其他各组。溶媒与 CCI 模型组对照显示其基本不影响大鼠的 TWL( $P = 0.863$ )。低、中剂量郁金提取物组、溶媒组、CCI 模型组 TWL 比较中差异无统计学意义( $P = 0.319$ )。与溶媒组相比, 高剂量郁金提取物组、加巴喷丁组能明显延长热缩足潜伏期( $P < 0.01, P < 0.05$ ), 且高剂量郁金提取物组与正常组差异无统计学意义( $P = 0.808$ ), 见图 1。



注: 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与溶媒组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

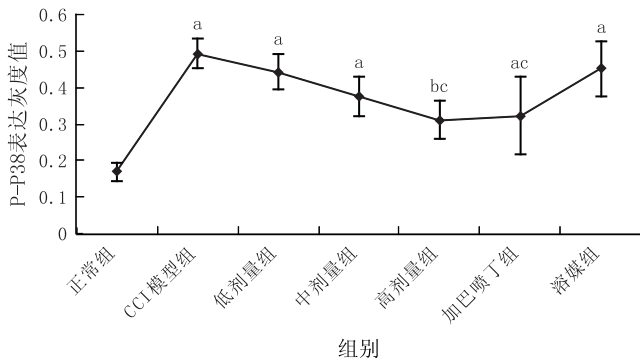
图1 郁金提取物对 CCI 模型大鼠 TWL 的影响

2.2 Western blot 法比较各组大鼠 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 段脊髓 P-P38 表达 6 组比较时发现: 正常组 P-P38 表达灰度值明显低于其余各组, 且均有统计学意义( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); CCI 模型组和溶媒组无明显区别( $P = 0.387$ )。CCI 模型组、溶媒组与郁金提取物低剂量组 P-P38 表达无明显区别( $P = 0.473$ )。郁金提取物高剂量组、加巴喷丁组 P-P38 表达灰度值明显低于溶媒组( $P < 0.01$ ), 但两者之间差异无统计学意义( $P = 0.800$ ), 见图 2。

## 3 讨论

目前有多种动物模型来模拟神经病理性疼痛, CCI 模型是其中最为经典的模型之一, 它可以产生单侧为

主的对冷热刺激和机械刺激的痛觉过敏现象,这种状态与人的外周神经损伤,如肿瘤压迫、重金属离子中毒、缺氧或代谢异常等诱发的神经病理性疼痛的症状和行为表现极其相似<sup>[7-9]</sup>。本实验中所有 CCI 大鼠在术后第 1 天时均产生痛反应,大鼠出现右侧后足舔爪、跛行、安静状态下足趾并拢并保持防御姿势等现象,且在术后 14 d 时仍表现为热痛敏,并较正常组显著降低,说明本实验 CCI 模型制作成功。各用药组与溶媒组比较,郁金提取物高剂量组和加巴喷丁组 TWL 值显著增高,提示二者均有抗神经病理性疼痛的作用。



注:与正常对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与溶媒组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

图2 郁金提取物对 CCI 模型大鼠 P2X4R 的影响

胶质细胞广泛分布于大脑和脊髓,占中枢神经细胞的 70% 以上。胶质细胞的两种类型即小胶质细胞和星型胶质细胞在 NeP 的发生和发展中发挥着重要作用<sup>[10-12]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶是细胞内重要的信号传递者,它参与了多种生理过程的调节。P38 MAPK 信号途径是 MAPK 家族中重要的组成部分,它在凋亡、细胞因子产生、转录调节及缺血再灌注损伤中起重要作用。P38 MAPK 信号转导途径是磷酸化的级联反应,MEKK $\rightarrow$ MEK3/6 $\rightarrow$ P38 MAPK。P38 MAPK 上游激酶有 MKK3、MKK6,它们能直接磷酸化酪氨酸、丝氨酸/苏氨酸残基从而激活 P38MAPK<sup>[13-15]</sup>。

本实验用 Western blot 法检测大鼠 L<sub>4</sub>~L<sub>6</sub> 脊髓中 P-P38 表达灰度值发现:坐骨神经损伤会导致脊髓中 P-P38 表达显著增加。既往实验<sup>[10]</sup>也发现外周神经受损将诱导脊髓 ATP 的生成增加,产生的 ATP 随后作用于小胶质细胞上的特异性受体 P2X<sub>4</sub>,这种作用一方面可以激活 P2X<sub>4</sub>,而另一方面还诱导了 P2X<sub>4</sub> 的蛋白表达增加从而强化 ATP 和 P2X<sub>4</sub> 的相互作用,两者的结合可激活有丝分裂原激活的蛋白激酶 P38 MAPK,该激酶再通过激活下游特定的转录因子而使 BDNF 在小胶质细胞中的表达增加,使用特异的抑制剂使 P2X<sub>4</sub>、P38 MAPK 或 BDNF 的活性下降,阻断 ATP 的信号传递则可明显减弱疼痛感觉的程度。

Yan Xiaodi 等<sup>[16]</sup>研究发现给 CCI 大鼠腰部鞘内注射米诺环素或 TNP-ATP 或 SB203580 通过显著抑制增

加 CCI 引起的脊髓 P2X<sub>4</sub> 受体和 BDNF 的表达,减弱 CCI 引起的机械性痛觉过敏。得出结论:P2X<sub>4</sub> 受体、BDNF 通路的激活有助于 CCI 大鼠神经病理性疼痛,激活的 P38 MAPK 信号通路参与 P2X<sub>4</sub> 受体诱导的神经病理性疼痛。本实验结合行为学检测,郁金提取物抗神经病理性疼痛可能与抑制 P38 MAPK 信号通路相关,且与剂量相关,高剂量(180 mg/kg)郁金提取物抗神经病理性疼痛效果与加巴喷丁相当。

## 参考文献

- [1] Haanpaa M, Attal N, Backonja M, et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment[J]. Pain, 2011, 152(1): 14-27.
- [2] 史艳燕, 吴明富, 张雅琴, 等. 神经病理性疼痛大鼠脊髓背角小胶质细胞 P2X<sub>4</sub> 受体的表达及意义[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010, 39(3): 355-357.
- [3] 王新梅, 杨莹, 薛霞. 神经病理性疼痛的小胶质细胞机制[J]. 科技创新导报, 2012(19): 233-234.
- [4] 卢奎, 吴文军, 周敏, 等. 他莫昔芬介导小胶质细胞 LRRK-2 表达对炎症刺激 PC12 细胞的影响[J]. 广西医学, 2014, 36(7): 861-864.
- [5] 底妍, 李伟彦. 小胶质细胞表面受体在神经病理性疼痛中的作用研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(6): 1108-1111.
- [6] Bennett CJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33(1): 87-107.
- [7] Attal N, Jazat F, Kayser V. Further evidence for "pain-related" behaviors in a model of unilateral peripheral mononeuropathy[J]. Pain, 1990, 14(2): 235-251.
- [8] 邹晓琴, 黄诚. 胶质细胞在神经病理性痛中的作用[J]. 赣南医学院学报, 2013, 33(1): 144-146.
- [9] 尹小虎, 蒋永亮, 赵晓芸, 等. 神经病理性疼痛的临床治疗进展[J]. 广西中医药大学学报, 2013, 16(4): 71-73.
- [10] 王海宝, 刘曾旭, 马学强, 等. 雪旺细胞-海藻酸钠凝胶移植大鼠脊髓损伤修复实验研究[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(9): 1155-1157.
- [11] 张雪梅, 柯开富, 邱一华, 等. 细胞因子在阿尔兹海默病的发生和发展中的作用[J]. 交通医学, 2011, 25(2): 140-144.
- [12] 王丽春. 普瑞巴林治疗脊髓损伤后神经病理性疼痛的临床观察[J]. 中国临床研究, 2015, 28(5): 619-621.
- [13] Zhou TT, Wu JR, Chen ZY, et al. Effects of dexmedetomidine on P2X<sub>4</sub>Rs, p38-MAPK and BDNF in spinal microglia in rats with spared nerve injury[J]. Brain Research, 2014, 1568: 21-30.
- [14] Song YX, Liu J, Zhang F, et al. Antioxidant effect of quercetin against acute spinal cord injury in rats and its correlation with the p38MAPK/iNOS signaling pathway[J]. Life Sciences, 2013, 92(24-26): 1215-1221.
- [15] 张田, 魏子峰, 张作风, 等. p38MAPK 通路参与调控 iNOS 活化及其介导的帕金森病小鼠多巴胺能神经元丢失[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2009, 12(3): 457-459.
- [16] Yan XD, Zhou SQ, Chen QB, et al. P2X<sub>4</sub> receptor and brain-derived neurotrophic factor in neuropathic pain[J]. Journal of Medical Colleges of PLA, 2010, 25(5): 275-284.

(本文编辑:季群)

收稿日期:2015-08-15