

安络小皮伞醇提取物对神经病理性疼痛模型大鼠的镇痛作用研究

赵思思, 戴文玲, 刘吉华*

(中国药科大学, 江苏省中药评价与转化重点实验室, 江苏 南京 211198)

神经性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是中枢或周围神经系统损害或功能障碍引起的疼痛综合征, 以痛觉过敏、自发性疼痛和痛觉超敏为特征^[1-2]。安络小皮伞 *Marasmius androsaceus* (L.Fr.) Fr., 是我国传统的药用真菌, 属于担子菌纲、伞菌目、白蘑科、小皮伞属。安络痛是以安络小皮伞菌粉及醇提物制成的制剂, 已有 40 多年的临床应用历史, 对各类神经痛和风湿关节炎均有较好的疗效及安全性, 但是其具体镇痛机制并不明确。

研究表明, 脊髓水平中枢机制在神经病理性疼痛的发生及维持过程中发挥着重要的作用^[3]。神经损伤使脊髓水平 MAPK 家族蛋白 (p38、ERK、JNK) 的激活及表达增多^[4], 而 p38、ERK、JNK 抑制剂能明显阻断这种现象, 并能明显减弱伤害性刺激所导致的痛觉过敏^[5-7]。可见, MAPK 信号转导通路在疼痛敏化调控方面发挥着重要作用。此外, 促炎性细胞因子也是神经病理性疼痛产生与维持的重要原因^[8-12]。研究发现, 在坐骨神经损伤等神经病理性疼痛大鼠模型中均出现了肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 表达的增高, 鞘内给予正常大鼠外源性 TNF- α 或 IL-1 β 能引起机械痛超敏和热痛觉过敏, 而外周或鞘内给予 TNF- α 或 IL-1 β 拮抗剂均能有效地抑制痛觉敏化的产生^[13]。

安络小皮伞醇提取物是否通过对脊髓 MAPK 信号通路及促炎症因子的调节而缓解神经病理性疼痛, 目前还未见报道。因此, 本研究通过建立慢性坐骨神经结扎性损伤 (chronic constriction injury, CCI) 大鼠模

型, 研究安络小皮伞醇提取物 (*Marasmius androsaceus* ethanolic extract, MAEE) 对 CCI 模型大鼠机械痛超敏及热痛过敏的影响, 同时检测实验大鼠脊髓 L₄-L₆ 段 TNF- α 、IL-1 β 以及 MAPK 磷酸化蛋白表达水平, 探讨安络小皮伞对神经病理性疼痛的镇痛作用。

1 材料

1.1 动物

健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号 SCXX (京)2012-0001。动物饲养条件为: 温度 (25 \pm 1) $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%~50%, 光照与黑暗时间比为 1:1, 自由摄食饮水。

1.2 药品及主要试剂

安络小皮伞菌粉 (杭州众芝康菇生物技术有限公司, 生产批号 JC15110301); 水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司); 铬羊肠线 (上海浦东金环医疗用品有限公司); 大鼠 TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒 (上海科鉴生物科技有限公司); Trizol (南京诺唯赞生物科技有限公司); SYBR Green Master Mix (美国 Bio-Rad 公司); 大鼠 TNF- α 、IL-1 β 引物 (南京生兴生物技术有限公司); TransScript 1st-Strand cDNA Synthesis Super Mix (北京全式金生物技术有限公司); p-38、p-ERK、p-JNK 抗体、羊抗兔二抗 (美国 Cell Signaling 公司); GAPDH (美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.3 仪器

Von Frey 纤毛 (North Coast Medical

公司) ; PL-200 型全自动热痛刺激仪 (成都泰盟科技有限公司) ; PCR 仪、Quantitative Real-time PCR 仪器 (美国 Bio-Rad 公司) ; 冷冻干燥机(美国 Labconco 公司) 。

2 方 法

2.1 安络小皮伞醇提取物的制备

根据安络痛临床制剂的生产工艺制备 MAEE, 取安络小皮伞菌粉 (及其培养基) 加 5 倍量 80%乙醇, 70°C回流提取 1h, 滤过, 残渣重复上述操作, 连续 3 次至提取液无色, 合并提取液, 回收乙醇后冷冻干燥, 得 MAEE, 醇溶性浸出物 > 50%。将 MAEE 用生理盐水按给药剂量配制成不同浓度的溶液。

2.2 模型的制备

根据 Bennett 等^[14]的方法制备坐骨神经慢性结扎损伤 (CCI)模型。大鼠在 10%水合氯醛麻醉下, 于左侧大腿中部切开皮肤, 钝性分离肌肉, 暴露 10mm 坐骨神经, 于神经起始处上方 2mm 处, 用 4.0 铬制羊肠线结扎 4 道, 每道间隔约 1mm, 强度以小腿肌肉微颤为准, 逐层缝合; 假手术组只暴露坐骨神经, 不做结扎。

2.3 动物分组及给药

40 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、MAEE 高、中、低剂量 (800、400、200mg/kg)组, 每组 8 只。CCI 术后 14d, MAEE 组 ig 给予 200、400、800mg/kg 的 MAEE, 假手术组和模型组给予等体积的生理盐水, 连续给药 7d。于 1、3、5、7d 给药后 2h 测定大鼠机械痛阈 (MWT)值和热痛阈 (TWL)值, 并在停药后连续测定 3d。

2.4 大鼠痛阈值的测定

2.4.1 MWT 值检测

将大鼠放置于升高透明的金属网格笼中, 测定前适应 10min, 探觅行为停止后开始测量。以不同折力的 Von-Fery 纤毛对大鼠左侧足底足心进行机械性刺激, 逐渐加压至细丝弯

曲, 维持 5s^[15]。从 1.0g 开始, 逐渐增加纤毛折力, 引起大鼠撤足反射时读取力度的大小, 间隔一段时间, 重复测量 5 次, 去掉最大值及最小值后计算 3 次平均值即为 MWT。

2.4.2 TWL 值检测

参照 Hargreaves K 方法^[16], 实验前让大鼠适应环境 10 min, 待大鼠安静后, 使用热刺痛仪刺激大鼠术侧后足足底, 热刺激强度设定为 35%, 自动切断时间为 20 s, 以防止时间过长造成损伤, 记录大鼠从开始刺激到出现撤足反应的时间, 每次测定间隔一段时间, 重复测定 3 次, 取平均值为大鼠 TWL。

2.5 ELISA 法检测脊髓 L₄-L₆ 节段 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白水平

给药 7d 后, 大鼠深度麻醉, 取脊髓腰膨大 L₄-L₆ 节段, 将组织块称取适量, 加入预冷的 PBS (0.01mol/L, pH 值为 7.4, 临用前加入蛋白酶抑制剂) 匀浆, 4°C、8000r/min 离心 10min。吸取上清液采用双抗体夹心法按 ELISA 试剂盒说明书操作, 制作标准曲线并计算 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达。

2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)法检测脊髓 L₄-L₆ 节段 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 水平

取脊髓 L₄-L₆ 节段组织块破碎后 (冰上操作), 加入 500 μ l Trizol 匀浆 2min, 冰上裂解 10min, 加氯仿 100 μ l, 颠倒混匀, 冰上静置 15min, 4°C、12000r/min 离心 15min; 取上清液于另一 1.5ml EP 管中, 等体积加入异丙醇, 颠倒混匀, 室温静置 10min, 4°C、12000r/min 离心 10min; 弃上清液, 加冰预冷的 DEPC 水配制的 75%乙醇 1ml, 4°C、7500 r/min 离心 5min; 弃上清液, 空气干燥 5~10min 后, 用 RNA 溶解液将沉淀溶解。

取各样本 RNA 5 μ l, 按 *TransScript*[®] cDNA 试剂盒说明书操作, 依次添加 Anchored Oligo (dT)₁₈ Primer 1 μ l, *TransScript*[®] KT/RI Enzyme Mix 1 μ l, 2 \times TS

Reaction Mix 10 μ l, Rnase-free ddH₂O 3 μ l, 轻轻混匀, 25 $^{\circ}$ C, 10 min; 50 $^{\circ}$ C, 30min; 85 $^{\circ}$ C, 5min; 15 $^{\circ}$ C, + ∞ 。逆转录后进行 qRT-PCR, 使用 SYBR GREEN 染料进行实时荧光定量 PCR, 程序设置为 95 $^{\circ}$ C, 30s, 然后 95 $^{\circ}$ C, 5s; 60 $^{\circ}$ C, 30s; 50 个循环。每个样本 3 次重复。使用相对定量方法, 应用 2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析。引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 中目的基因的引物序列

组别	剂量/ (g/kg)	引物序列 (5' -3')
IL-1 β	0.000	TGACCCATGTGAGCTGAAAG
	0.000	AGGGATTTTGTGCGTTGCTTG
TNF- α	0.000	CATGATCCGAGATGTGGAAGTGGC
	0.000	CTGGCTCAGCCACTCCAGC
GAPDH	0.000	CAGGGCTGCCTTCTCTTGTG
	0.000	GATGGTGATGGGTTTCCCGT

2.7 Western blotting 法检测脊髓 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达

取大鼠脊髓 L₄-L₆ 节段组织块破碎后 (冰上操作), 按一定比例加入 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂) 匀浆。使用 BCA 法测定蛋白浓度。经 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PDVF 膜上, 6% BSA 封闭液室温封闭 3h, 分别加入 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 MAPK 等一抗 (1:1000) 室温孵育 3h, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST

洗 5min \times 3 次, 加入羊抗兔二抗 (1:1000), 室温下孵育 3h, TBST 洗 5min \times 3 次。Bio-Rad 凝胶成像仪显影后采用 Quantity One-4.6.5 软件对各组数据图像灰度进行统计与分析。

2.8 统计学分析

结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 19.0 分析软件进行组间 *t* 检验。

3 结果

3.1 对 CCI 诱导的大鼠 MWT 及 TWL 的影响

结果表明, 各组大鼠术前 MWT 及 TWL 无显著性差异; CCI 大鼠术后 14d, 与假手术组比较, MWT 及 TWL 显著降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 第 1 天给药后 MWT 及 TWL 显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果提示, 单次给予不同剂量的 MAEE 能剂量相关性的降低 CCI 诱导的机械学超敏及热痛学过敏。

连续 7d 给予不同剂量的 MAEE 也能剂量相关性的缓解 CCI 诱导的神经病理性疼痛且没有耐受性, 并且随着 MAEE 给药次数的增加, 疼痛症状改善更为显著。在停药 1、2d 后, MAEE 中、高剂量组与模型组比较仍差异显著 ($P<0.01$), MAEE 高剂量组停药后 3d 仍能缓解 CCI 诱导的神经病理性疼痛 ($P<0.05$)。这与安络小皮伞的临床用药特点相符合。结果见表 2、3。

表 2 各组大鼠不同时间点 MWT 的变化 ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	剂量/ (mg \cdot kg $^{-1}$)	MWT/g								
		术前	给药前	给药 1 d	给药 3 d	给药 5 d	给药 7 d	停药 1 d	停药 2 d	停药 3 d
假手术	-	10.43 \pm 0.8	10.33 \pm 0.93	10.17 \pm 0.95**	10.46 \pm	11.21 \pm 1.27**	10.23 \pm	10.67 \pm	9.88 \pm 1.01**	9.96 \pm 0.90**
模型	-	10.48 \pm	2.25 \pm 0.39	2.13 \pm 0.30	2.87 \pm 0.28	2.84 \pm 0.34	2.50 \pm 0.39	2.73 \pm 0.32	2.57 \pm 0.26	2.72 \pm 0.45
MAEE	200	10.28 \pm	2.18 \pm 0.36	3.17 \pm 0.17	4.75 \pm 0.27**	5.08 \pm 0.31**	5.25 \pm 0.23**	4.17 \pm 0.27**	3.42 \pm 0.27**	2.92 \pm 0.22
	400	9.90 \pm 0.79	1.93 \pm 0.19	6.08 \pm 0.66**	6.83 \pm 0.72**	7.38 \pm 1.22**	7.83 \pm 1.00**	5.58 \pm 0.69**	4.25 \pm 0.69**	3.34 \pm 0.43
	800	9.98 \pm 0.79	2.27 \pm 0.24	7.08 \pm 0.79**	8.08 \pm 0.46**	7.88 \pm 0.78**	9.46 \pm 1.09**	6.92 \pm 0.22**	5.75 \pm 0.38**	4.42 \pm 0.38**

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下同

表 3 各组大鼠不同时间点 TWL 的变化 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

组别	剂量/ (mg- kg)	术前	给药前	TWL/s						
				1 d	3 d	5 d	7 d	8 d	9 d	10 d
假手术	-	13.51±1.17	13.47± 0.97**	13.02± 0.81**	13.76±0.76**	13.42± 0.85**	13.69± 1.09**	13.79± 0.75**	13.84± 0.98**	13.31± 1.16**
模型	-	12.90±0.58	5.98±0.15	6.27±0.20	6.24±0.19	6.90±0.31	6.82±0.16	6.60±0.25	6.23±0.30	6.64±0.38
MAEE	200	13.67±1.17	5.92±0.36	7.51±0.60	8.18±0.54**	8.22±0.26**	8.53±0.50**	7.22±0.14**	6.57±0.12	6.80±0.27
	400	14.07±0.38	6.19±0.19	9.21±0.23**	10.23±0.60**	10.24± 0.42**	10.27± 0.44**	8.17±0.23**	7.43±0.23**	7.07±0.36
	800	13.47±0.38	6.04±0.24	10.77± 0.72**	11.28± 0.46**	11.88± 0.55**	11.95± 0.47**	9.82±0.20**	7.87±0.28**	7.24±0.17**

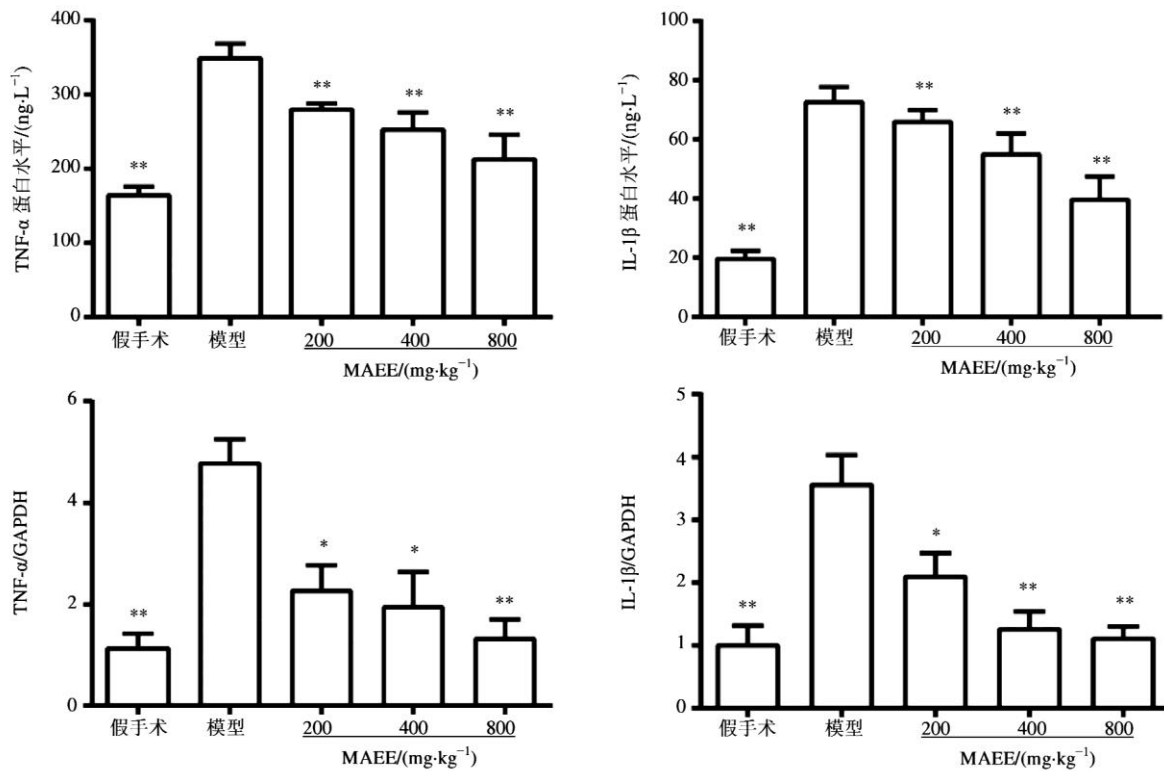


图 2 CCI 大鼠给予 MAEE 后下调 TNF- α 和 IL-1 β 的表达 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

3.2 对 CCI 大鼠脊髓 L₄-L₆ 节段 TNF- α 及 IL-1 β 水平的影响

ELISA 检测结果显示, 假手术组 IL-1 β 及 TNF- α 水平较低; 与假手术组比较, CCI 大鼠 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 而给予不同剂量的 MAEE 能够降低 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平 ($P < 0.01$), 其中高剂量组抑制作用最为显著。

qRT-PCR 检测结果与 ELISA 的结果相一致, MAEE 能够剂量依赖性的降低 CCI 大鼠脊髓 L₄-L₆ 节段中上调的 IL-1 β 以及 TNF- α mRNA 水平。见图 2。

3.3 对 CCI 大鼠脊髓 L₄-L₆ 节段 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 MAPK 蛋白水平的影响

结果表明, 在 CCI 诱发的神经病理性疼痛模型大鼠中, 与假手术组比较, p-ERK、p-JNK、

p-p38 的表达水平显著上升 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, CCI 大鼠在 MAEE 不同剂量给药 7d 后, 脊髓 L₄-L₆ 节段 MAPK 磷酸化蛋白

水平降低, 其中高剂量组差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 3。

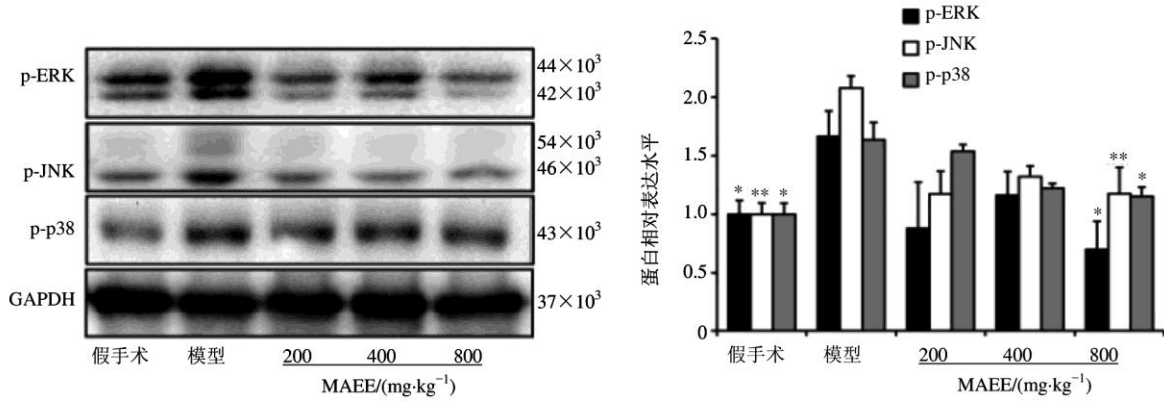


图 3 Western blotting 法检测脊髓 L₄-L₆ 节段 p-ERK、pJNK 和 p-p38 MAPK 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

4 讨论

安络小皮伞已被临床证实对多种类型神经痛和神经炎痛均有很好的疗效, 但其作用机制仍不明确。本课题研究结果表明, CCI 大鼠模型能够诱发大鼠机械痛觉超敏及热痛觉过敏, 同时伴有脊髓 MAPK 家族磷酸化蛋白水平上调以及促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 表达增高, 连续给予 MAEE 可显著持久性改善 CCI 大鼠机械痛觉超敏及热痛觉过敏症状, 下调脊髓促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达, 降低 ERK、JNK 和 p38 MAPK 磷酸化蛋白水平。

研究显示, MAPK 信号传导通路及促炎性细胞因子是神经性疼痛产生与维持的重要因素。神经损伤产生的伤害性刺激使脊髓背角中 MAPK 特异性激活和表达增多, MAPK 是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者, 当 MAPK 激活后通过一系列激酶的磷酸化级联反应影响细胞核内基因的转录和调控, 最终导致痛觉过敏及中枢敏化, 而这种现象能被 MAPK 特异性抑制剂明显阻断; 神经损伤引起炎性细胞激活, 从而释放促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 等, 导致神经源性炎症, 使周围的伤害性感受器进一步敏化。阻断脊髓

MAPK 信号蛋白的磷酸化及降低促炎性细胞因子的表达是抑制神经病理性疼痛的途径之一。

本研究表明, MAEE 可能通过抑制 MAPK 信号蛋白的磷酸化、抑制促炎性细胞因子的释放而发挥抑制神经病理性疼痛作用。

参考文献

- [1] Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population [J]. Pain, 2008, 136(3): 380-387.
- [2] Toth C, Lander J, Wiebe S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population [J]. Pain Med, 2009, 10(5): 918-929.
- [3] Fairbanks C A, Goracke-Postle C J. Neurobiological studies of chronic pain and analgesia: Rationale and refinements [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 759: 169-181.
- [4] Milligan E, Watkins L. Pathological and protective roles of glia in chronic pain [J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(1): 23-36.
- [5] Anand P, Shenoy R, Palmer J E, et al. Clinical trial of the p38 MAP kinase inhibitor diltapimod in neuropathic pain following nerve injury [J]. Eur J Pain, 2011, 15(10): 1040-1048.
- [6] Iriana G A, Gerardo A M, Agueda F D, et al. Oral administration of the p38a MAPK inhibitor,

- UR13870, inhibits affective pain behavior after spinal cord injury [J]. *Pain*, 2014, 155(10): 2188-2198.
- [7] Park JY, Park JJ, Jeon S, et al. From peripheral to central: the role of ERK signaling pathway in a cupuncture analgesia [J]. *J Pain*, 2014, 15(5): 535-549.
- [8] Li ZY, Zhang YP, Jie Z, et al. The possible involvement of JNK activation in the spinal dorsal horn in bortezomib-induced allodynia: the role of TNF- α and IL-1P [J]. *J Anesth*, 2015, 30(1): 55-63.
- [9] Yang KY, Bae WS, Min JK, et al. Participation of the central p38 and ERK1/2 pathways in IL-1p-induced sensitization of nociception in rats [J]. *Prog NeuroPsycho*, 2013, 46(4): 98-104.
- [10] Reyes-Gibby C C, Wang J, Silvas M R T, et al. MAPK1/ERK2 as novel target genes for pain in head and neck cancer patients [J]. *Bmc Ge et*, 2016, 17(1): 1-13.
- [11] Roberts J, Ossipov MH, Porreca F. Glial activation in the rostroventromedial medulla promotes descending facilitation to mediate inflammatory hypersensitivity [J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 30(30): 229-241.
- [12] Hu XM, Liu YN, Zhang HL, et al. CXCL12/CXCR4 chemokine signaling in spinal glia induces pain hypersensitivity through MAPKs-mediated neuroinflammation in bone cancer rats [J]. *J Neurochem*, 2015, 132(4): 452-463.
- [13] Byung-Sang L, In-Gu J, Sung-Hoon K, et al. Intrathecal gabapentin increases interleukin-10 expression and inhibits pro-inflammatory cytokine in a rat model of neuropathic pain [J]. *J Korean Med Sci*, 2013, 28(2): 308-314.
- [14] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33(1): 87-107.
- [15] Austin P J, Wu A, Moalem-Taylor G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats [J]. *Jove-J Vis Exp*, 2012, doi: 10.3791/3393.
- [16] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia [J]. *Pain*, 1988, 32(1): 77-88.

