

· 基础研究 ·

姜黄素对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 表达的影响

余相地,柯齐斌[△],汤和清,陈 春,陈明全,侯 俊,方 为

(三峡大学第一临床医学院/湖北省宜昌市中心人民医院麻醉科,湖北宜昌 443003)

摘要:目的 探讨姜黄素对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角和背根神经节皮质激素受体(GR)和 NMDAR-NR₁ 表达的影响。方法 将雄性 SD 大鼠 72 只(体质量 220~250 g),随机分成 4 组:假手术组(Sham 组)、慢性坐骨神经结扎损伤组(CCI 组)、CCI+溶剂组(SC 组)、CCI+姜黄素 100 mg/kg 组(Cur100 组)。SC 组和 Cur100 组大鼠在坐骨神经结扎后,分别腹腔注射溶剂或 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹姜黄素,至术后 14 d。于术前 2 d 和术后 1、3、5、7、10、14 d 测定机械缩足反射阈值(MWT)和热缩足反射潜伏期(TWL);术后 3、7、14 d 取大鼠术侧 L₄、L₅ 脊髓背角和背根神经节,用免疫组化法检测脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 表达情况。结果 与 Sham 组相比,CCI 组术后 TWL、MWT 明显降低($P<0.01$),术侧脊髓背角和背根神经节内 GR 和 NMDAR-NR₁ 表达明显增多($P<0.01$)。与 CCI 组相比,Cur100 组大鼠 TWL 和 MWT 明显提高($P<0.05$),脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 表达明显减少($P<0.05$)。结论 姜黄素可通过抑制脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 的表达而减轻 CCI 大鼠神经病理性疼痛。

关键词:疼痛;姜黄素;受体,糖皮质激素;D-天氨酸;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.36.030

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)36-3708-03

Effects of curcumin on expression of GR and NMDAR-NR₁ in posterior horn and dorsal root ganglia of rats with neuropathic pain

Yu Xiangdi, Ke Qibin[△], Tang Heqing, Chen Chun, Chen Mingquan, Hou Jun, Fang Wei

(Department of Anesthesiology, the First Clinical College of Medicine, China Three Gorges

University/Central People's Hospital of Yichang, Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: Objective To explore the effects of curcumin on expression of glucocorticoid receptor(GR) and NMDAR-NR₁ in posterior horn and dorsal root ganglia of rats with neuropathic pain. **Methods** 72 male SD rats, weighing 220-250 g, were randomly divided into four groups: sham operation group (sham group), chronic constriction injury (CCI) group, CCI+solvent group (SC group) and CCI+curcumin 100 mg/kg group (Cur100 group). After sciatic nerve ligation, rats in SC group and Cur100 group were subjected to intraperitoneal injection of solvent or curcumin 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, respectively, until 14 days after operation. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) of rats were measured 2 days before operation and 1, 3, 5, 7, 10 and 14 days after operation. L₄, L₅ posterior horn and dorsal root ganglia of rats on the operative side were chosen 3, 7 and 14 days after operation, and immunohistochemistry was used to detect the expression of GR and NMDAR-NR₁ in posterior horn and dorsal root ganglia of rats. **Results** Compared with the sham group, TWL and MWT decreased markedly ($P<0.01$), while expression of GR and NMDAR-NR₁ in posterior horn and dorsal root ganglia on the operative side increased significantly ($P<0.01$) after operation in CCI group. Compared with CCI group, TWL and MWT increased markedly ($P<0.05$), while expression of GR and NMDAR-NR₁ in posterior horn and dorsal root ganglia decreased significantly ($P<0.05$) in Cur100 group. **Conclusion** Curcumin may reduce neuropathic pain of rats with CCI via inhibition the expression of GR and NMDAR-NR₁ in posterior horn and dorsal root ganglia.

Key words: pain; curcumin; receptors, glucocorticoid; D-aspartic acid; rats

神经病理性疼痛是一种慢性应激^[1],因此神经病理性疼痛的患者常伴有下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能的紊乱,表现为血清中皮质醇浓度的异常^[2]。有活性的皮质激素包括氢化可的松和皮质酮等通过皮质激素受体(GR)起作用,有研究表明中枢 GR 通过参与和调节 NMDAR 在脊髓背角和背根神经节的表达和功能,对神经病理性疼痛的发生和维持起了重要的作用^[3]。有实验表明姜黄素能够减轻糖尿病所致热痛敏和机械痛敏^[4-5]。

本研究通过观察慢性坐骨神经结扎损伤(CCI)所引起的脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 表达的影响,探讨 GR 和 NMDAR-NR₁ 在神经病理性疼痛大鼠痛觉过敏中的

作用,并进一步探讨姜黄素的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠 72 只(体质量 220~250 g),由三峡大学实验动物中心提供。姜黄素购自 Sigma 公司。336 爪/尾刺激痛觉测试计以及 2390 ELECTROVONFREY 测痛计购自美国 II TC 公司。兔抗鼠 GR 抗体购自美国 Cell Signaling 公司,兔抗鼠 NMDAR-NR₁ 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,兔二步法试剂盒及 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 参照 Bennett 和 Xie^[6]的方法建立 CCI 模型。

[△] 通讯作者, Tel:13397209306; E-mail: keqibin@126.com。

1.2.2 动物分组 将 SD 大鼠随机分成 4 组:假手术组(Sham 组)、CCI 组、CCI+溶剂组(SC 组)、CCI+姜黄素 100 mg/kg 组(Cur100 组)。Sham 组只分离神经,不结扎。SC 组和 Cur100 组在坐骨神经结扎后,分别腹腔注射溶剂或 100 mg · kg⁻¹ · d⁻¹姜黄素,持续至术后 14 d。每组再根据处死时间点的不同分 3 个亚组(*n*=6)。姜黄素用二甲亚砜配置。注射时间为每日 15:00~17:00。

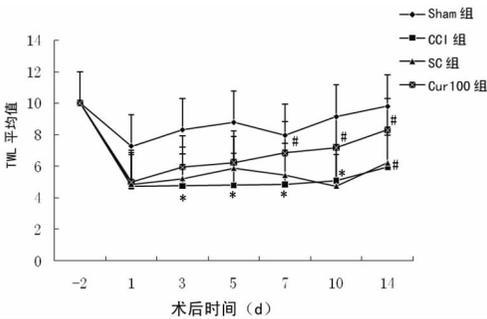
1.2.3 行为学测定 分别于术前 2 d 及术后 1、3、5、7、10、14 d 测定,测定时间恒定于每日 10:00~14:00,室温维持在(24±0.5)℃。测定热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL)和机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)。

1.2.4 免疫组化测定 术后 3、7、14 d 取大鼠术侧 L₄、L₅ 脊髓背角和背根神经节,用免疫组化的方法测定脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 的表达,顺序间隔 3 张选 1 张在光学显微镜下计数 GR 和 NMDAR-NR₁ 阳性神经元。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行数据处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,用最小显著差数法(LSD)进行两两比较。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

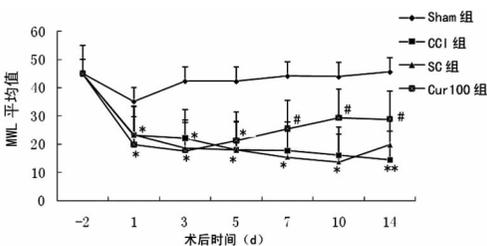
2 结 果

2.1 痛阈的比较 各组 TWL、MWT 基础值无差别。Sham 组 TWL、MWT 各时间点比较无差别。CCI 组与 Sham 组比较术后各时间点 TWL、MWT 明显降低(*P*<0.01)。SC 组与 CCI 组比较,术后各时间点 TWL、MWT 无差别。CCI 组从术后第 1 天开始下降,第 10 天降至最低值,与基础值比较,差异有统计学意义(*P*<0.01),在第 14 天有所回升,但仍低于基础值(*P*<0.01)。Cur100 组术后第 1 天 TWL、MWT 开始降低,第 5 天降至最低值,其后逐渐不同程度恢复。与 CCI 组比较,Cur100 组术后第 7、10、14 天 TWL、MWT 明显提高(*P*<0.05),见图 1、2。



*: *P*<0.01, 与 Sham 组比较; #: *P*<0.05, 与 CCI 组比较。

图 1 各组大鼠 TWL 比较

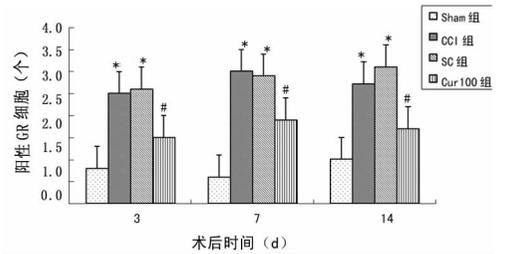


*: *P*<0.01, 与 Sham 组比较; #: *P*<0.05, 与 CCI 组比较。

图 2 各组大鼠 MWT 比较

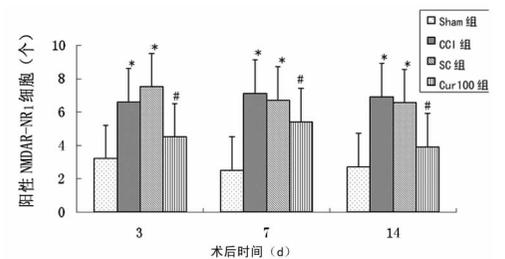
2.2 背根神经节 GR、NMDAR-NR₁ 的表达 CCI 组和 SC 组

L₄、L₅ 背根神经节 GR、NMDAR-NR₁ 阳性表达率 (GR、NMDAR-NR₁ 阳性神经元占总神经元数的百分比) 差异无统计学意义(*P*>0.05), 术后 3、7、14 d CCI 组结扎侧 L₄、L₅ 背根神经节 GR、NMDAR-NR₁ 阳性表达率明显高于 Sham 组(*P*<0.01), 腹腔注射姜黄素明显抑制 CCI 诱导的 GR、NMDAR-NR₁ 表达, 见图 3、4。



*: *P*<0.01, 与 Sham 组比较; #: *P*<0.05, 与 CCI 组比较。

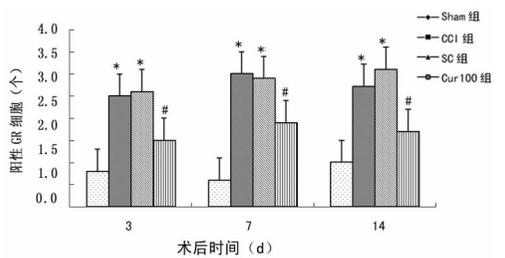
图 3 各组大鼠背根神经节 GR 表达比较



*: *P*<0.01, 与 Sham 组比较; #: *P*<0.05, 与 CCI 组比较。

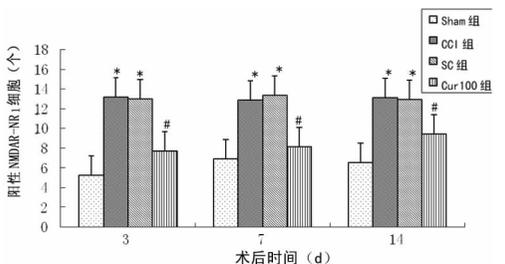
图 4 各组大鼠背根神经节 NMDAR-NR₁ 表达比较

2.3 脊髓背角 GR、NMDAR-NR₁ 的表达 GR、NMDAR-NR₁ 阳性细胞主要分布于脊髓背角浅层, CCI 组脊髓背角 GR、NMDAR-NR₁ 阳性细胞数于术后 3、7 d 明显多于 Sham 组(*P*<0.01), 腹腔注射姜黄素明显抑制 CCI 诱导的脊髓背角 GR、NMDAR-NR₁ 的表达, 见图 5、6。



*: *P*<0.01, 与 Sham 组比较; #: *P*<0.05, 与 CCI 组比较。

图 5 各组大鼠脊髓背角 GR 表达比较



*: *P*<0.01, 与 Sham 组比较; #: *P*<0.05, 与 CCI 组比较。

图 6 各组大鼠脊髓背角 NMDAR-NR₁ 表达比较

3 讨 论

本研究结果表明, CCI 大鼠 MWL 和 TWL 术后明显降低。

CCI 所致神经病理性疼痛引起术侧脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 阳性神经元明显增多。CCI 大鼠术后腹腔注射姜黄素能减轻神经病理性疼痛大鼠痛行为,脊髓背角和背根神经节 GR 和 NMDAR-NR₁ 阳性神经元的表达受到抑制。

有研究发现中枢的 GR 在周围神经损伤后表达上调,并且在神经病理性疼痛中起重要的作用,用 GR 拮抗剂 RU486 可以减轻神经病理性疼痛中出现的异常性疼痛和痛觉增敏^[7]。这与本研究结果一致。

脊髓的 GR 可以调控 NMDA 受体 NR1 的表达,进而影响疼痛,最近研究显示给予 CCI 大鼠鞘内注射 GR 拮抗剂 RU38486,可以明显降低 NR1 的表达,同时可明显减弱疼痛;另外给予 PKC γ 基因剔除的 CCI 大鼠鞘内注射 IL-6 抗血清,也可降低 NR1 的表达,表明 CCI 后 IL-6 和 PKC γ 作为细胞调质,影响 GR 介导的 NMDA 受体亚基的表达,这些结果预示 GR 和 NMDA 受体的相互作用对神经病理性疼痛的产生和维持起重要作用^[8]。本研究也发现在 CCI 组中,NMDAR-NR₁ 表达伴随着 GR 的表达增加而增加,进一步证实了 GR 和 NMDAR-NR₁ 之间存在着密切的关系。

在其他的一些研究中也发现 GR 与 NMDAR 之间有密切的联系,GR 能够:(1)诱导腹侧被盖区多巴胺神经元中的 NMDAR 的激活和调节 Ca²⁺ 通道的开放频率^[9-10];(2)调节由 NMDAR 所介导的长期抑郁症状和提高海马神经元中 Ca²⁺ 的浓度^[11];(3)调节由 NMDA 诱导的大鼠基底核大细胞神经元的变性^[12];(4)在腹侧被盖区的多巴胺敏感神经元中,中枢 GR 激活可引起 NMDA 所诱导的反应,而且可以调节由 NMDAR 所介导的长期抑制作用^[13]。

本研究发现神经病理性疼痛引起脊髓背角和背根神经节 GR 与 NMDAR-NR₁ 表达增加;腹腔注射姜黄素能够抑制 GR 与 NMDAR-NR₁ 表达。表明姜黄素减轻大鼠神经病理性疼痛与降低脊髓背角和背根神经节 GR 与 NMDAR-NR₁ 的表达有关。姜黄素及其衍生物脱甲氧基姜黄素、双脱甲氧基姜黄素是从姜科植物姜黄中提取的天然有效成分,具有多种药理活性。在本实验中,姜黄素通过抑制脊髓背角和背根神经节 GR 与 NMDAR-NR₁ 的表达,使疼痛减轻。已往研究表明姜黄素减轻大鼠神经病理性疼痛与降低脊髓背角和背根神经节 p-JNK 和 c-jun 的表达有关^[5],以及它对糖尿病神经病理性疼痛的减轻作用与抑制血清中 TNF- α 和 NO 的表达有关^[4]。由此可推测,姜黄素减轻神经病理性疼痛的作用与多种分子机制有关。

神经病理性疼痛发病机制复杂,是当前疼痛研究的热点和难点。姜黄素药理作用广泛。本研究发现给予神经病理性疼痛大鼠一定剂量的姜黄素,其机械痛敏和热痛敏均被显著抑制,这可能与姜黄素抑制神经病理性疼痛大鼠脊髓背角和背根神经节中 GR 与 NMDAR-NR₁ 的表达有关。

参考文献:

[1] Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro RE. Chronic pain,

chronic stress and depression; coincidence or consequence [J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13(12): 1009-1023.

[2] Herman JP, Prewitt CM, Cullinan WE. Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis [J]. *Crit Rev Neurobiol*, 1996, 10(3/4): 371-394.

[3] Wang S, Lim G, Zeng Q, et al. Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(2): 488-495.

[4] Sharma S, Kulkarni SK, Agrewala JN, et al. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 536(3): 256-261.

[5] 何伶俐,曹红,贺端端.姜黄素对大鼠神经病理性痛的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2008, 28(1): 790-793.

[6] Bennett GJ, 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] Wang S, Lim G, Zeng Q, et al. Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(2): 488-495.

[8] Blumer D, Zorick F, Heilbronn M, et al. Biological markers for depression in chronic pain [J]. *J Nerv Ment Dis*, 1982, 170(7): 425-428.

[9] Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, et al. Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(6): 1441-1451.

[10] Woolf CJ. Pain [J]. *Neurobiol Dis*, 2000, 7(5): 504-510.

[11] Coussens CM, Kerr DS, Abraham WC. Glucocorticoid receptor activation lowers the threshold for NMDA-receptor-dependent homosynaptic long-term depression in the hippocampus through activation of voltage-dependent calcium channels [J]. *J Neurophysiol*, 1997, 78(1): 1-9.

[12] Abrahám I, Harkany T, Horvath KM, et al. Chronic corticosterone administration dose-dependently modulates Abeta(1-42)- and NMDA-induced neurodegeneration in rat magnocellular nucleus basalis [J]. *J Neuroendocrinol*, 2000, 12(6): 486-494.

[13] Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, et al. Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(6): 1441-1451.

(收稿日期:2011-03-09 修回日期:2011-07-12)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!