

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.03.003

大鼠伏核微量注射天麻素对神经病理性镇痛作用的研究*

赵 敏^{1,2}, 李崇阳^{3#}, 李新海¹, 钱 冉¹, 李 杨¹, 杨 扬¹, 徐世莲^{1△}

(1. 昆明医科大学基础医学院生理学系, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学基础医学院解剖学与组织胚胎学系, 昆明 650500; 3. 昆明医科大学第四附属医院肿瘤科, 昆明 650021)

[摘要] **目的** 构建神经病理性痛动物模型, 研究伏核注射天麻素对神经病理性痛的镇痛作用。**方法** 实验采用左侧坐骨神经干部分结扎致神经损伤制作神经痛动物模型, 观察伏核注射天麻素对伤害性热刺激和压力刺激诱发的大鼠后爪缩爪潜伏期的影响。**结果** 左侧坐骨神经干部分结扎, 引起双侧后爪缩爪潜伏期缩短, 尤以 10 d 后左侧明显(热板测试: $t_{\text{左}}=7.35, P<0.01$; $t_{\text{右}}=3.24, P<0.05$ 。Randall Selitto 测试: $t_{\text{左}}=5.05, P<0.01$; $t_{\text{右}}=3.32, P<0.05$)。神经病理性痛大鼠伏核注射 $40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 和 $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 天麻素引起双侧后爪缩爪潜伏期延长, 但注射 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的天麻素没有显著性影响。**结论** 天麻素在大鼠伏核对神经病理性痛具有镇痛作用。

[关键词] 天麻素; 疼痛; 神经节; 伏核; 后爪缩爪潜伏期; 神经病理性痛; 镇痛作用

[中图分类号] R338.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)03-0296-03

Involvement of gastrodin in antinociception in nucleus accumbens of rats with sciatic neuropathy*

Zhao Min^{1,2}, Li Chongyang^{3#}, Li Xinhai¹, Qian Ran¹, Li Yang¹, Yang Yang¹, Xu Shilian^{1△}

(1. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 2. Department of Anatomy and Histoembryology, School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650500, China; 3. Department of Tumor, the Fourth Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650021, China)

[Abstract] **Objective** To determine the antinociceptive role of gastrodin in nucleus accumbens (NAc) of rats with neuropathic pain. **Methods** The left sciatic nerve of rat was ligated to mimic neuropathic pain model, after which the present study observed the effect of intra-NAc injection of gastrodin on the hindpaw withdrawal latency (HWL) to noxious thermal and mechanical stimulation. **Results** The HWL in response to thermal and mechanical stimulation significantly decreased in bilateral hindpaws in the 10th day after left sciatic nerve ligation (thermal stimulation: $t_{\text{left}}=7.35, P<0.01$; $t_{\text{right}}=3.24, P<0.05$; mechanical stimulation: $t_{\text{left}}=5.50, P<0.01$; $t_{\text{right}}=3.32, P<0.05$). Intra-NAc injection of 40 or $20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, but not $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ of gastrodin markedly induced an increase in the HWL in rats with neuropathic pain. **Conclusion** Gastrodin contributes an important antinociceptive role to neuropathic pain in NAc of rats with mononeuropathy.

[Key words] gastrodin; pain; ganglia; nucleus accumbens; hindpaw withdrawal latencies; neuropathic pain; antinociceptive role

神经病理性痛(neuropathic pain)是慢性疼痛中较为常见的一种,以自发性疼痛、痛觉过敏和痛超敏为特征^[1]。国际疼痛研究会(IASP, 2011 年)将由躯体感觉神经系统的损伤或疾病而直接造成的疼痛定义为神经病理性痛。目前发现神经病理性疼痛与多种周围神经障碍疾病相关,如糖尿病、甲状腺功能低下、尿毒症、营养缺乏相关的神经障碍,加之带状疱疹后神经痛、缺血性神经病变和顽固性神经病理性癌痛等,致使神经病理性痛患者人数逐年增加。但由于神经病理性痛的发生、发展机制复杂,故尚缺乏有效的治疗措施^[2-4]。临床常用阿片类药物缓解各种急慢性疼痛,故在临床吗啡仍然是治疗神经病理性痛的首选药。但阿片类药物的长期应用可发生耐受、心理/生理依赖、戒断综合征和自身觅药行为等严重毒副作用,而神经病理性痛需要长期治疗,因此毒副作用小的新型镇痛药物及其机制的研究逐渐得以凸显。

天麻,甘平,归肝经,具有息风止痉、平肝潜阳、祛风通络之功。天麻素(gastrodin)是天麻的主要活性成分^[5],具有镇静、抗惊厥、抗癫痫、镇痛、改善脑供血不足、保护神经细胞、促进心

肌细胞能量代谢的功能。但天麻素对神经病理性疼痛的中枢镇痛作用及其机制的实验研究目前国内外尚较少报道。在脑内,存在着内源性的镇痛系统。近年来,越来越多的研究报道伏核在痛觉信息的产生和调制中是一个重要的中枢部位^[6-9]。因此,本实验研究大鼠伏核微量注射天麻素对神经病理性痛的镇痛作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)实验动物:本实验采用雄性 Sprague-Dawky 大鼠(180~250 g,昆明医科大学动物实验中心提供,批号 KM-MU2014004),实验期间分笼饲养,自然光照,自由取食和饮水。本实验采取各种措施最大程度减小对动物的伤害和使用数量,所有操作均依照国际疼痛协会的指导来完成,且均符合昆明医科大学动物伦理委员会的规定。(2)实验药品:天麻素(上海经科化学科技有限公司),使用 0.9% 的生理盐水配制。

1.2 方法

1.2.1 测量后爪缩爪潜伏期 实验前大鼠需进行 5 d 后爪缩爪潜伏期(hindpaw withdrawal latency, HWL)测试的训练,以

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360245);云南省应用基础研究计划项目基金(2011FZ111);云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合资金项目(2015FB012)。 作者简介:赵敏(1982—),讲师,硕士,主要从事解剖学与组织胚胎学科研与教学工作。 # 共同第一作者。 △ 通讯作者, E-mail: shilianxu@126.com。

使动物对伤害性刺激的 HWL 较为平稳,保持在 3~6 s。实验使用热板,温度维持在 $(52.0\pm0.2)^{\circ}\text{C}$,测试大鼠后爪对热刺激的缩爪潜伏期。将大鼠左或右侧后爪足底平放于热板,大鼠缩爪时间即为大鼠后爪对伤害性热刺激的缩爪潜伏期。使用 Randall Selitto(UGO Basile TYPE 37215)测试大鼠后爪对机械压力刺激的缩爪潜伏期。Randall Sellitto 的楔形压力阀压在鼠爪的爪背靠近脚趾处,踩住开关,步进马达推动砝码向前移动,此时施加在大鼠后爪上的压力以 30 g/s 的速度增加,大鼠后爪回缩时砝码所指的刻度即为大鼠后爪对伤害性机械压力刺激的缩爪潜伏期。实验时,先测量给药前大鼠的后爪缩爪潜伏期作为前对照(Basal HWL),再测量给药后 5、10、15、20、30、45 和 60 min 的 HWL。将给药后不同时间点的缩爪潜伏期换算成变化百分率(%),运算公式为:(给药后的值-给药前的值)/给药前的值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 构建神经病理性痛动物模型 腹腔注射戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉大鼠,在其左侧大腿中部暴露 8~10 mm 长的一段坐骨神经。用 4 号羊肠线每隔 1.0~1.5 mm 轻度结扎神经,共结扎 4 圈。结扎时看见后肢抽动、神经轻度凹陷即可。最后用 4 号丝线缝合皮肤。坐骨神经结扎 7~10 d 后测定大鼠双侧 HWL,产生痛敏后进行伏核内注射,观测 60 min。

1.2.3 伏核内微量注射方法 腹腔注射 45 mg/kg 的戊巴比妥钠麻醉大鼠,将大鼠固定于“脑立体定位仪”进行伏核内埋管(B, +1.7 mm; L or R, 1.6 mm; V, 7.0 mm)。将外径为 0.8 mm 的不锈钢套管垂直插入并用牙科水泥固定,作为脑内微量注射时所用的套管。术后动物恢复 2~3 d。注射时用外径为 0.4 mm 的不锈钢管作注射管,其尖端伸出套管 1.0~1.5 mm,实验时以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度均匀推进 1 μL 的药物,药物推注完毕后保留注射管在伏核内停留 1 min 以上。

1.2.4 注射位点的组织学鉴定 实验结束后,用腹腔注射过量戊巴比妥钠(80 mg/kg)处死大鼠,断头取脑并置于 -80°C 的冰箱冻存。之后切片,鉴定给药点是否位于伏核内。经组织切片鉴定给药点不在伏核内的动物则舍去,见图 1。

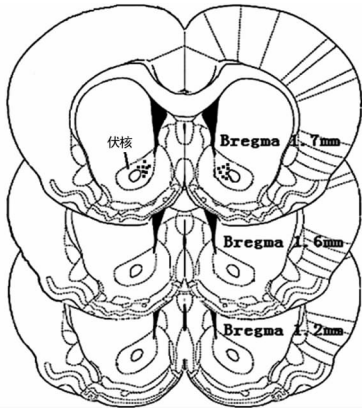


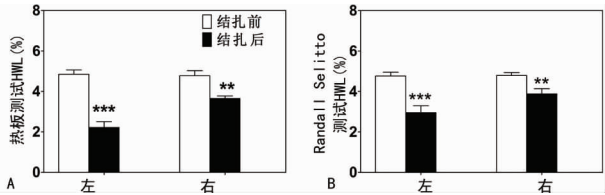
图 1 注射位点组织学鉴定图

1.3 统计学处理 采用 Prism5 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 的形式表示,实验组和对照组之间的差异采用双因素方差分析(ANOVA)或双尾 t -检验进行组间比较,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 左侧坐骨神经干结扎对大鼠后爪缩爪潜伏期的影响 坐骨神经结扎前左爪和右爪的 HWL 差异无统计学意义($n=12$;热板测试: $t_{\text{左}}=0.21, P=0.84$ 。Randall Selitto 测试: $t_{\text{左}}=0.12, P=0.91$)。结扎左侧坐骨神经干 10 d 后,测定结扎后双侧

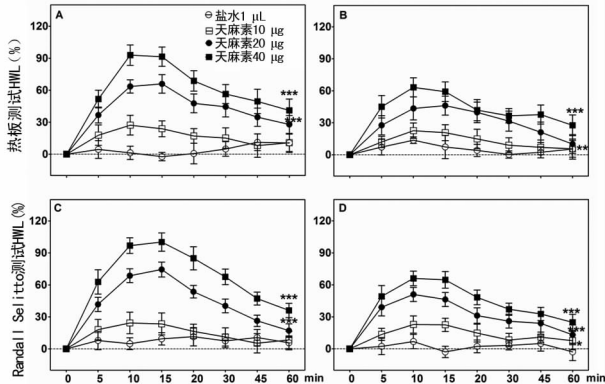
HWL。如图 2 所示,和结扎前比较,左侧坐骨神经干结扎后大鼠双侧 HWL 均缩短,并且结扎侧比对照侧明显($n=12$;热板测试: $t_{\text{左}}=7.35, P<0.01$; $t_{\text{右}}=3.24, P<0.05$ 。Randall Selitto 测试: $t_{\text{左}}=5.05, P<0.01$; $t_{\text{右}}=3.32, P<0.05$)。



*: $P<0.05$,与结扎前比较。

图 2 坐骨神经结扎对后爪缩爪潜伏期的影响

2.2 左侧坐骨神经干结扎大鼠伏核注射天麻素对后爪缩爪潜伏期的影响 和伏核内注射盐水组($n=8$)比较,伏核内注射 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($n=8$;热板测试: $F_{\text{左}}=67.98, P<0.01$; $F_{\text{右}}=37.90, P<0.01$ 。Randall Selitto 测试: $F_{\text{左}}=93.03, P<0.01$; $F_{\text{右}}=52.48, P<0.01$); 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($n=8$;热板测试: $F_{\text{左}}=45.21, P<0.01$; $F_{\text{右}}=17.88, P<0.05$ 。Randall Selitto 测试: $F_{\text{左}}=41.38, P<0.01$; $F_{\text{右}}=39.42, P<0.01$)的天麻素后双侧后爪对热刺激和压力刺激诱发的缩爪潜伏期均明显延长,以给药后 10~15 min 最明显,持续约 60 min。但注射 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的天麻素后没有显著影响($n=8$;热板测试: $F_{\text{左}}=3.82, P=0.07$; $F_{\text{右}}=2.01, P=0.18$ 。Randall Selitto 测试: $F_{\text{左}}=0.38, P=0.55$; $F_{\text{右}}=8.54, P<0.05$),见图 3。



*: $P<0.05$,与盐水组比较。

图 3 坐骨神经结扎大鼠伏核注射天麻素对后爪缩爪潜伏期的影响

3 讨 论

大鼠单侧坐骨神经干的轻度结扎,是目前公认的一种造成外周神经损伤、并导致慢性痛的常用方法。坐骨神经干结扎后,神经水肿引起血液供应障碍和外周轴突损伤,包括有髓神经纤维和无髓神经纤维,尤其是有髓神经纤维。结扎 7~10 d 后出现疼痛综合征,其特点是对热刺激和压力刺激的痛敏和感觉异常,对热刺激和压力刺激的痛敏高峰在 14~28 d。本研究采用结扎左侧坐骨神经干来构建神经痛动物模型,结果显示大鼠左侧坐骨神经干结扎 10 d 后双侧后爪对伤害性热刺激和压力刺激的缩爪潜伏期缩短,提示坐骨神经结扎后产生自发性痛和痛敏。

在国内,天麻素注射液目前已被广泛运用于临床。我国中医临床上长期使用天麻来治疗头昏目晕、癫痫抽搐和偏头痛等疾病,且疗效显著^[10]。郭学廷等^[11]研究显示,天麻素能显著改善偏头痛症状,缩短疗程,并且没有明显的不良反应。但与

临床应用相比,目前关于天麻素的镇痛作用及其机制的实验研究不多。张怡评等^[12]研究表明小鼠灌胃给药,不同剂量天麻素和天麻苷元能显著提高热伤害刺激致痛小鼠的痛阈,明显抑制醋酸引起的小鼠扭体反应,提示天麻素和天麻苷元有镇痛作用。郑卫红等^[13]研究显示天麻素可以减轻长春新碱诱导的大鼠化疗疼痛反应,使其痛阈明显增高,且镇痛效果与天麻素的剂量有关,大剂量时效果更明显。最近有研究报道腹腔注射不同剂量天麻素对神经痛具有镇痛作用^[14]。在培养的大鼠三叉神经节细胞上,中浓度的天麻素(5、10 mmol/L)可能通过 ERK1/2 途径降低痛觉信息的传入和整合^[15]。

有关天麻素对神经痛的中枢镇痛作用的实验研究迄今为止尚较少报道。本实验研究结果表明左侧坐骨神经结扎大鼠伏核注射天麻素引起双侧后爪缩爪潜伏期延长,提示天麻素在大鼠伏核对神经痛具有重要的镇痛作用,但有关天麻素对神经痛的中枢镇痛机制目前仍不清楚,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 429(1/3): 23-37.
- [2] Finnerup NB, Jensen TS. Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain—a critical analysis[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2(2): 107-115.
- [3] Baron R. Mechanisms of disease: neuropathic pain—a clinical perspective[J]. Nat Clin Pract Neurol, 2006, 2(2): 95-106.
- [4] Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence based recommendations[J]. Pain, 2007, 132(3): 237-251.
- [5] Yang XD, Zhu J, Yang R, et al. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*[J]. Nat Prod Res, 2007, 21(2): 180-186.
- [6] Gu XL, Yu LC. Involvement of opioid receptors in oxyto-

cin-induced antinociception in the nucleus accumbens of rats[J]. J Pain, 2007, 8(1): 85-90.

- [7] Xu SL, Li J, Zhang JJ, et al. Antinociceptive effects of galanin in the nucleus accumbens of rats[J]. Neurosci Lett, 2012, 520(1): 43-46.
- [8] Yang Y, Zhang Y, Li XH, et al. Involvements of galanin and its receptors in antinociception in nucleus accumbens of rats with inflammatory pain[J]. Neurosci Res, 2015, 97(8): 20-25.
- [9] Duan H, Zhang Y, Zhang XM, et al. Antinociceptive roles of galanin receptor1 in nucleus accumbens of rats in a model of neuropathic pain[J]. J Neurosci Res, 2015, 93(10): 1542-1551.
- [10] 吕国平, 王春芹, 蔡中琴. 天麻素注射液的药理及临床研究[J]. 中草药, 2002, 33(5): U003-U004.
- [11] 郭学廷, 聂永霞. 天麻素治疗偏头痛的近期疗效[J]. 实用全科医学, 2011, 9(4): 579, 591.
- [12] 张怡评, 林丽聪, 吴春敏. 天麻素与天麻苷元的镇痛作用研究[J]. 福建中医学院学报, 2006, 16(6): 30-31.
- [13] 郑卫红, 张金芝, 郑世玲. 天麻素对化疗痛大鼠的作用及其在脊髓水平的作用机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2012, 6(3): 444-446.
- [14] 徐敏, 刘勇军, 闵闯, 等. 天麻素对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及其机制研究[J]. 临床医学工程, 2014, 21(7): 837-839.
- [15] Luo GG, Fan WJ, Yuan XY, et al. The pharmacological mechanism of gastrodin on calcitonin gene-related peptide of cultured rat trigeminal ganglion[J]. Yao Xue Xue Bao, 2011, 46(12): 1451-1456.

(收稿日期: 2015-08-08 修回日期: 2015-10-16)

(上接第 295 页)

- and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2006, 8(3): R58.
- [8] Williams JC, Maitra S, Anderson MJ, et al. BMP-7 and bone regeneration: evaluation of dose-response in a rodent segmental defect model[J]. J Orthop Trauma, 2015, 29(9): e336-341.
- [9] Lories RJ, Matthys P, de Vlam K, et al. Ankylosing enthesitis, dactylitis, and onychoprositis in male DBA/1 mice: a model of psoriatic arthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2004, 63(5): 595-598.
- [10] Wang XQ, Peng YP, Liu Z, et al. Roles of tyrosine hydroxylase expressed by CD4+ T cell subsets in collagen type II-induced arthritis[J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2014, 30(5): 390-394.
- [11] Lu L, Ma J, Wang X, et al. Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(1): 142-152.
- [12] Mellado U, Martinez-Muñoz L, Cascio G, et al. T cell mi-

gration in rheumatoid arthritis[J]. Front Immunol, 2015, 6: 384.

- [13] Kanakaris NK, Calori GM, Verdonk R, et al. Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience[J]. Injury, 2008, 39(Suppl 2): S83-90.
- [14] Vaccaro AR, Whang PG, Patel T, et al. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study[J]. Spine J, 2008, 8(3): 457-465.
- [15] Li XL, Liu YB, Ma EG, et al. Synergistic effect of BMP9 and TGF-β in the proliferation and differentiation of osteoblasts[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3): 7605-7615.
- [16] Lories RJ, Daans M, Matthys P, et al. Noggin haploinsufficiency differentially affects tissue responses in destructive and remodeling arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(6): 1736-1746.

(收稿日期: 2015-08-08 修回日期: 2015-10-16)