

鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛模型大鼠的镇痛作用

陈亚男¹, 刘汉福¹, 肖朝江¹, 姜 北¹, 沈 磊^{2*}

(1. 大理大学药物研究所, 云南 大理 671000; 2. 大理大学药学院, 云南 大理 671000)

摘要: **目的** 探讨鞍叶羊蹄甲乙醇提取物对三叉神经痛模型大鼠机械痛阈值以及相关炎症因子和疼痛介质的影响。**方法** 建立三叉神经痛大鼠模型, 于术后第14天开始灌胃鞍叶羊蹄甲, 每天1次, 连续14 d。术后每2 d测定大鼠机械痛阈值, 术后第28天用酶联免疫吸附法(ELISA)检测三叉神经痛大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、前列腺素E₂ (PGE₂)和P物质(SP)水平, 并观察眶下神经组织病理学变化。**结果** 鞍叶羊蹄甲能够提高三叉神经痛大鼠的机械痛阈值($P<0.05$), 降低血清中TNF- α 、PGE₂、SP水平($P<0.05$, $P<0.01$), 并减少眶下神经组织变性, 抑制施万细胞增生($P<0.01$)。**结论** 鞍叶羊蹄甲能够减轻大鼠三叉神经痛, 其机制可能与抑制TNF- α 、PGE₂等炎症因子和SP疼痛介质水平有关。

关键词: 鞍叶羊蹄甲; 三叉神经痛; 肿瘤坏死因子- α ; 前列腺素E₂; P物质

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1970-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.044

神经病理性疼痛属于慢性疼痛的一种, 其全球发病率约为5%^[1], 神经病理性疼痛患者多伴有睡眠障碍、焦虑、抑郁等症状, 从而导致生活质量严重下降^[2]。目前治疗神经病理性疼痛的药物临床疗效不明确, 副作用较多, 且缺乏针对性, 因此有必要寻找有效治疗神经病理性疼痛, 且副作用小的药物。治疗神经病理性疼痛的中药不良反应低且多为抗炎镇痛类药物。鞍叶羊蹄甲 *Bauhinia brachycarpa* Benth 属于豆科羊蹄甲属植物, 分布于四川、云南、甘肃、湖北等地, 其民间用药大都与炎症有关, 如彝族用药记载其根、叶治疗风湿疼痛, 跌打损伤; 白族用药记载其根用于安神、止痛、散结、筋骨疼痛^[3]。本课题组前期对鞍叶羊蹄甲的抗炎镇痛活性进行了研究, 发现鞍叶羊蹄甲总提取物可抑制醋酸诱导的外周炎性疼痛, 并减少热板引起的中枢性疼痛^[4]。因此本实验拟建立三叉神经痛模型, 探讨鞍叶羊蹄甲对大鼠的镇痛作用和可能机制, 为开发鞍叶羊蹄甲的药用价值提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠, SPF级, 雄性, 体质量180~220 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证号SCKY(湘)2019-0004。动物实验完全依照大理大学医学伦理委员会及大理大学药学院实验动物管理委员会的相关规定进行。

1.2 试剂与药物 鞍叶羊蹄甲于2019年8月采自云南大

理漾濞县, 由大理大学药学院张德全教授鉴定为豆科羊蹄甲属植物鞍叶羊蹄甲 *Bauhinia brachycarpa* Benth。卡马西平(江苏鹏鹞药业有限公司, 批号2005241)。TNF- α 、PGE₂、SP ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司, 批号20201128、20201128、2020122)。水合氯醛(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号Q/12HB 4218-2017)。

1.3 仪器 4-0铬制羊肠线(上海浦东金环医疗用品股份有限公司); RE-5205型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Von Frey疼痛测试棒(美国DanMic Global公司); Varioskan LUX功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司); BX53型生物显微镜(日本奥林巴斯公司); 0408-2型台式低速离心机[上海医疗器械(集团)有限公司]。

2 方法

2.1 鞍叶羊蹄甲提取物制备 取鞍叶羊蹄甲干燥地上部分19.5 kg, 粉碎后用95%乙醇冷浸提取5次, 每次24 h, 过滤后合并滤液, 用旋转蒸发仪减压回收乙醇后得总浸膏1 878.5 g, 用水分散、溶解, 经过冻干, 最后得到冻干粉1 519.5 g。使用时用0.5% CMC-Na溶液将冻干粉稀释至相应剂量。实验用剂量根据预实验结果确定。

2.2 动物分组、造模及给药 实验前适应性训练大鼠, 用Von Frey疼痛测试棒连续刺激大鼠两侧须垫部3次, 每次间隔时间30 s, 直至大鼠对刺激反应转为平静状态, 连续3 d。选取3 d痛阈值均大于15 g的大鼠共48只, 随机分

收稿日期: 2021-02-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(81641187); 云南省科技厅高校联合面上项目(2018FH001-096); 大理大学滇西特色药用植物与白族药开发利用创新团队项目(ZKLX2019106)

作者简介: 陈亚男(1996—), 女, 硕士生, 研究方向为神经药理学。Tel: 15650599253, E-mail: 982388990@qq.com

***通信作者:** 沈 磊(1981—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为神经药理学。Tel: 18608858817, E-mail: shenlei@dali.edu.cn

网络出版日期: 2021-07-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210716.1354.004.html>

为假手术组和手术组。手术组大鼠建立三叉神经痛模型^[5], 具体为腹腔注射 10% 水合氯醛 (4 mL/kg) 麻醉大鼠, 仰卧位固定后, 于口腔内左侧软腭第 1 个皱褶水平, 做 1 个长约 1 cm 切口暴露眶下神经, 依次用 2 根 4-0 铬制羊肠线结扎眶下神经 (2 根线相距约 2 mm), 结扎松紧度要求仅改变神经直径而不影响神经血液循环, 缝合伤口完成模型; 假手术组只暴露眶下神经不结扎。将造模成功的大鼠随机分为 5 组, 分别为模型组、卡马西平组 (阳性对照, 150 mg/kg) 和鞍叶羊蹄甲高、中、低剂量组 (500、250、125 mg/kg)。手术第 14 天开始灌胃给予相应药物, 假手术组、模型组灌胃给予 0.5% CMC-Na, 给药容量均为 1.5 mL/kg, 每天给药 1 次, 连续 14 d, 整个实验周期共 28 d。

2.3 指标检测

2.3.1 机械痛阈值 各组大鼠均于手术前、手术当天、手术后测定痛阈值。在疼痛行为学测试前, 将大鼠放置于网状金属笼子里, 适应周围环境 10 min。用 Von Frey 疼痛测试棒对大鼠的手术同侧须垫部进行刺激, 刺激从 0.008 g 开始逐渐增加, 3 次/侧, 每次刺激连续 2 下, 每次刺激至少间隔 30 s, 直到出现阳性反应, 记录所采用的刺激强度。大鼠在最大刺激强度 26 g 时仍未出现阳性反应, 则将痛阈值记为 26 g, 上述刺激连续测定 3 次, 每次间隔 10 min, 取 3 次测定的平均值为大鼠三叉神经痛阈值。大鼠阳性反应包括退缩反应, 表现为刺激时头部退缩, 有时伴有刺激同侧面部的洗脸行为; 逃跑或攻击行为, 表现为避免继续接触刺激物, 身体移动远离刺激物或主动咬抓刺激物; 非对称性的洗脸, 表现为对侧面部至少大于 3 次的间断性

洗脸行为。

2.3.2 血清中 TNF- α 、PGE₂、SP 水平 末次给药后禁食 24 h, 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 室温放置 20 min, 2 000 r/min 离心 20 min 取血清。ELISA 试剂盒检测血清 TNF- α 、PGE₂ 和 SP 水平。

2.3.3 眶下神经组织病理学观察 取血后暴露心脏, 注射生理盐水进行心脏灌流, 直至右心耳流出清亮生理盐水, 再从心脏注入 4% 多聚甲醛固定组织, 然后暴露眶下神经, 切取包含缩窄环在内约长 0.5 cm 的眶下神经组织, 放入 4% 多聚甲醛中固定。常规脱水、包埋、进行 HE 染色, 观察组织病理学变化。根据施万细胞的数量对眶下神经组织病理变化进行分析, 每张病理切片选择施万细胞数量较多的 6 条神经纤维, 计数每条纤维中 3 cm $\times$ 3 cm 正方形区域内的施万细胞核数量, 统计 6 条纤维总的细胞核数目记为该切片所含细胞数。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 20.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间差异采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠机械痛阈值的影响 如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠的机械痛阈值先升高, 并于术后第 8 天开始下降, 术后第 14 天手术各组大鼠的机械痛阈值下降至最低值 ($P<0.01$)。术后第 14 天开始给药, 给药 14 d 后, 与模型组比较, 卡马西平和鞍叶羊蹄甲高剂量组均能增加三叉神经痛大鼠的机械痛阈值 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 1 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠机械痛阈值的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg $\cdot$ kg ⁻¹)	机械痛阈值/g		
		0 d	14 d	28 d
假手术组	—	17.44 $\pm$ 4.34	17.44 $\pm$ 4.34	16.22 $\pm$ 3.28
模型组	—	18.11 $\pm$ 4.65	0.07 $\pm$ 0.00 ^{##}	0.05 $\pm$ 0.02 ^{##}
卡马西平组	150	18.67 $\pm$ 4.92	0.07 $\pm$ 0.00	4.45 $\pm$ 2.14 ^{**}
鞍叶羊蹄甲高剂量组	500	17.83 $\pm$ 5.59	0.07 $\pm$ 0.00	2.13 $\pm$ 0.81 [*]
鞍叶羊蹄甲中剂量组	250	17.63 $\pm$ 6.51	0.07 $\pm$ 0.00	0.31 $\pm$ 0.11
鞍叶羊蹄甲低剂量组	125	21.29 $\pm$ 4.40	0.07 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00

注: 与假手术组比较, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

3.2 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠血清中 TNF- α 、PGE₂、SP 水平的影响 如表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 TNF- α 、PGE₂、SP 水平均升高 ($P<0.01$); 与模

型组比较, 卡马西平和鞍叶羊蹄甲高、中剂量均能降低血清中 TNF- α 、PGE₂ 水平 ($P<0.05$, $P<0.01$), 鞍叶羊蹄甲中剂量降低血清中 SP 水平 ($P<0.01$)。

表 2 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠血清中 TNF- α 、PGE₂、SP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(mg $\cdot$ kg ⁻¹)	TNF- α /(ng $\cdot$ L ⁻¹)	PGE ₂ /(ng $\cdot$ L ⁻¹)	SP/(ng $\cdot$ L ⁻¹)
假手术组	—	105.68 $\pm$ 11.41	249.1 $\pm$ 32.44	73.46 $\pm$ 12.61
模型组	—	168.64 $\pm$ 18.56 ^{##}	384.22 $\pm$ 44.57 ^{##}	115.66 $\pm$ 11.66 ^{##}
卡马西平组	150	146.64 $\pm$ 23.71 [*]	273.38 $\pm$ 73.38 ^{**}	138.86 $\pm$ 11.09 [*]
鞍叶羊蹄甲高剂量组	500	131.89 $\pm$ 17.86 ^{**}	278.77 $\pm$ 44.82 ^{**}	107.67 $\pm$ 32.51
鞍叶羊蹄甲中剂量组	250	135.71 $\pm$ 13.49 ^{**}	296.36 $\pm$ 44.55 [*]	75.00 $\pm$ 17.48 ^{**}
鞍叶羊蹄甲低剂量组	125	149.31 $\pm$ 28.48	334.29 $\pm$ 99.05	104.15 $\pm$ 22.46

注: 与假手术组比较, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

3.3 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠眶下神经组织病理学改变的影响 如图 1 所示,假手术组大鼠眶下神经纤维分布均匀,施万细胞核呈紫色,未见病理变化;模型组大鼠眶下,神经纤维排列紊乱,施万细胞增生,神经变性;各剂量鞍叶羊蹄甲与卡马西平均能不同程度的改善神经纤维变性,减轻炎症反应。如表 3 所示,与假手术组比较,模型组大鼠眶下神经组织中施万细胞数量增加 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组施万细胞数量均减少 ($P<0.01$),说明鞍叶羊蹄甲可抑制施万细胞增生。

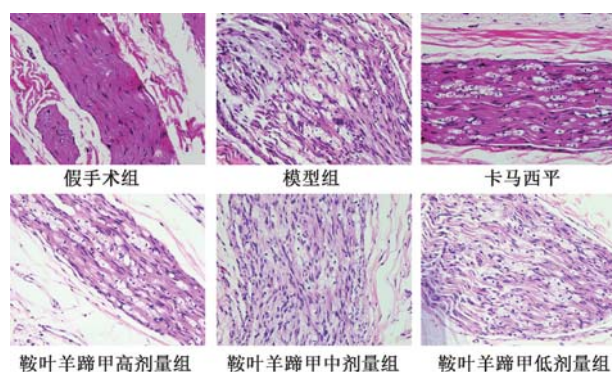


图 1 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠眶下神经病理组织学的影响 ($\times 400$)

表 3 鞍叶羊蹄甲对三叉神经痛大鼠眶下神经组织施万细胞数目的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	施万细胞/个
假手术组	—	117.33 $\pm$ 20.33
模型组	—	329.67 $\pm$ 25.32 ^{##}
卡马西平组	150	223.83 $\pm$ 41.31 ^{**}
鞍叶羊蹄甲高剂量组	500	249.83 $\pm$ 40.99 ^{**}
鞍叶羊蹄甲中剂量组	250	251.83 $\pm$ 39.75 ^{**}
鞍叶羊蹄甲低剂量组	125	246.67 $\pm$ 22.19 ^{**}

注:与假手术组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

4 讨论

神经病理性疼痛为神经系统损伤或功能障碍引起的疼痛,其发生机制分为中枢敏化、外周敏化以及中枢下行抑制性调控改变。对于神经病理性疼痛的治疗是非特异性的,目前治疗的一线药物有抗惊厥药^[6]、三环类抗抑郁药、选择性 NA 和 5-HT 再摄取抑制药,但是这些药物普遍具有疗效不明确,缺乏针对性或长期使用伴有严重副作用和成瘾性等问题。

治疗神经病理性疼痛的中药不良反应低,且大多为抗炎镇痛类药物。本实验数据表明鞍叶羊蹄甲可提高三叉神经痛大鼠的机械痛阈值,其机制可能与抑制神经病理性疼痛中产生的过多炎症因子有关。有研究表明,人类神经组织中炎症细胞聚集和炎症因子过度表达的严重程度与神经病理性疼痛的程度有关。大量炎症介质的释放不仅会诱导和维持中枢敏化,还会进一步的促进外周敏化^[7]。TNF- α 广泛存在于包括神经组织在内的各种组织中,在神经病理性疼痛模型中,TNF- α 在激活其他信号通路方面起着主导

作用^[8]。SP 是一种兴奋性神经递质,属速激肽族,由感觉神经元产生,当伤害性刺激激活感觉神经元时,SP 会在外周神经组织以及脊髓中释放,会促进痛觉过敏的产生,从而介导疼痛信号传递^[9-11]。PGE₂ 对周围组织和脊髓中的疼痛信号有很大的影响,并且参与了神经病理性疼痛的诱导与维持^[12]。本实验结果显示,鞍叶羊蹄甲高、中剂量均能降低三叉神经痛模型大鼠血清中 TNF- α 、PGE₂、SP 水平,尤其是中剂量效果最好,并优于阳性药卡马西平,表明鞍叶羊蹄甲可通过抑制过度表达的炎症因子,对三叉神经痛大鼠产生镇痛作用。

施万细胞是周围神经系统中的神经胶质细胞。激活的施万细胞和巨噬细胞被认为是神经损伤早期产生 TNF 的关键。施万细胞的 TRPA1 激活后诱导并维持巨噬细胞对受损神经的浸润,从而维持机械痛觉的超敏状态^[13]。在神经损伤的条件下,激活的施万细胞能产生生长因子、细胞因子和趋化因子等大分子,又能产生活性小分子(如 ATP),这些炎症因子在神经病理性疼痛中均起到了关键作用^[14]。本实验结果显示,鞍叶羊蹄甲能降低眶下神经组织中的施万细胞数量,表明鞍叶羊蹄甲可抑制施万细胞增生来降低神经病理性疼痛中产生的炎症因子。

综上所述,鞍叶羊蹄甲对于神经病理性疼痛具有镇痛作用,其机制可能与抑制炎症因子的产生有关。下一步本课题组将针对相关的炎症级联反应,继续探讨鞍叶羊蹄甲对神经病理性疼痛的镇痛作用机制。

参考文献:

- [1] Bannister K, Sachau J, Baron R, et al. Neuropathic pain: mechanism-based therapeutics [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 257-274.
- [2] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17002.
- [3] 中国科学院《中国植物志》编委委员会. 中国植物志(第 39 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [4] 单 华. 滇西药用植物镇痛活性筛选及鞍叶羊蹄甲镇痛活性研究[D]. 大理: 大理大学, 2017.
- [5] Maegawa H, Usami N, Kudo C H, et al. Dopaminergic modulation of orofacial mechanical hypersensitivity induced by infraorbital nerve injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21 (6): 1945.
- [6] Sommer C, Cruccu G. Topical treatment of peripheral neuropathic pain: applying the evidence [J]. *J Pain Symptom Manage*, 2017, 53(3): 614-629.
- [7] 宋佳男, 于海波, 刘玉梅. 神经病理性疼痛的治疗和药物发现现状[J]. *药学报*, 2021, 56(3): 679-688.
- [8] Li C R, Deng T R, Shang Z, et al. Blocking TRPA1 and TNF- α signal improves bortezomib-induced neuropathic pain [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(5): 2098-2110.
- [9] Chiba T, Kambe T, Yamamoto K, et al. Vincristine increased spinal cord substance P levels in a peripheral neuropathy rat model [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2022, 45(1): 393-397.

- [10] Chung E, Yoon T G, Kim S, *et al.* Intravenous administration of substance P attenuates mechanical allodynia following nerve injury by regulating neuropathic pain-related factors[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2017, 25(3): 259-265.
- [11] Wang J A, Niu S N, Luo F. Pulsed radiofrequency alleviated neuropathic pain by down-regulating the expression of substance P in chronic constriction injury rat model[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133(2): 190-197.
- [12] Kanda H, Kobayashi K, Yamanaka H, *et al.* Localization of prostaglandin E2 synthases and E-prostanoid receptors in the spinal cord in a rat model of neuropathic pain[J]. *Brain Res*, 2021, 1750: 147153.
- [13] De Logu F, Nassini R, Materazzi S, *et al.* Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1887.
- [14] Wei Z Y, Fei Y, Su W F, *et al.* Emerging role of schwann cells in neuropathic pain: receptors, glial mediators and myelination [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 116.

灵芝提取物对帕金森病模型细胞凋亡的保护作用

黄 茜¹, 任志丽^{2*}

(1. 重庆城市管理职业学院智慧康养学院, 重庆 401331; 2. 首都医科大学宣武医院, 国家老年疾病临床医学研究中心, 北京 100053)

摘要:目的 研究灵芝提取物对帕金森病模型细胞凋亡的保护作用。方法 采用 CCK-8 法检测细胞活性, JC-1 染色倒置显微镜检测细胞线粒体膜电位, 试剂盒检测细胞 ROS 水平, 细胞免疫荧光双重染色方法观察细胞色素 C 的表达与定位情况, Western blot 法检测 caspase-3、caspase-9 活化和前体形式蛋白表达。结果 灵芝提取物不影响 neuro-2a 细胞的生长与增殖。采用 1 mmol/L MPP⁺ 损伤作用持续 48 h, 当灵芝提取物浓度为 800 μg/mL 时, 细胞活性增加 ($P < 0.05$)。MPP⁺ 可造成 neuro-2a 细胞线粒体膜电位下降, 而灵芝提取物可以改善 MPP⁺ 对 neuro-2a 细胞线粒体膜电位造成的影响, 并抑制 ROS 的聚集。与模型组比较, 灵芝提取物能抑制 MPP⁺ 诱导的细胞色素 C 从线粒体的释放, 降低相同时间段内 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 比值。结论 灵芝提取物能抑制 MPP⁺ 诱导的 neuro-2a 细胞凋亡, 其作用机制可能与维持线粒体正常膜电位, 稳定线粒体功能, 降低 cleaved-caspase-3/pro-caspase-3、cleaved-caspase-9/pro-caspase-9 比值有关。

关键词: 灵芝; 帕金森病; 细胞凋亡; 神经保护

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-1973-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.045

帕金森病是中老年人常见的神经退行性疾病之一,也是中老年人最常见的运动功能障碍性疾病,其主要病理特点为黑质纹状体通路的多巴胺能神经元发生退行性病变减少和死亡,使神经递质多巴胺水平下降,主要临床表现为运动功能障碍,包括静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高和姿势不稳等^[1]。目前治疗帕金森病的药物大多通过增加脑内多巴胺水平或模拟多巴胺效应来控制症状,但长期服用存在较大的不良反应,并在使用一定时间后会出现疗效减退及远期副作用。

我国传统中药灵芝,被历代医药家尊为“滋补强壮、扶正固本”的神奇珍品,对人体具有双向调节作用,涉及

心脑血管、消化、神经、内分泌、呼吸、运动等系统,尤其对肿瘤、肝脏病变、失眠、衰老的防治作用最为显著^[2-4]。研究发现,灵芝多糖的抗氧化作用,可以减轻神经毒素对多巴胺能神经元的损伤^[5-6]。

本研究将采用小鼠神经瘤细胞 neuro-2a,通过多巴胺能特异性神经毒素 MPP⁺ 损伤,抑制线粒体复合物 I,观察灵芝提取物对 MPP⁺ 损伤线粒体功能的影响,并从细胞凋亡的角度探究灵芝可能发挥的作用机制。

1 材料

1.1 细胞 neuro-2a 小鼠脑神经瘤细胞,购于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

收稿日期: 2021-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903822)

作者简介: 黄 茜 (1982—),女,博士,讲师,从事血发生及其调控、老年医学基础研究。Tel: 13388984450, E-mail: 474488100@qq.com

* 通信作者: 任志丽 (1983—),女,博士,助理研究员,从事神经药理学研究。Tel: 18911628881, E-mail: renzhili2011@163.com