

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.004

• 基础研究 •

天麻素对化疗痛模型大鼠脊髓IL-1β和TNFα表达的影响



张金芝¹, 江永祥², 郑卫红¹, 宫登辉¹, 罗 妮¹

Effects of Gastrodin on Expression of IL-1β and TNFα of Spinal Cord in Chemotherapy-induced Neuropathic Pain

ZHANG Jinzhi¹, JIANG Yongxiang², ZHENG Weihong¹, GONG Denghui¹, LUO Ni¹

1. China Three Gorges University, Three Level Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology Research Department of Medical Science College, Yichang 443002, China; 2. Xiling Substation Judicial Authentication Center of Public Security Bureau of Yichang
Corresponding Author: ZHENG Weihong, E-mail: zwh20110606@163.com

Abstract: Objective To observe the treatment action of gastrodin on chemotherapy-induced neuropathic pain in rats, and the changes of IL-1 β and TNFα expression in spinal cord, and to study the mechanism in the spinal cord level. **Methods** Vincristine was administered intravenously on alternate days to establish the model of chemotherapy-induced neuropathic pain, after the model was established successfully, gastrodin was administered intravenously, mechanical allodynia was measured using electronic Von Frey, heat hyperalgesia was measured by electronic heatingplaten instrument; The expression of IL-1β and TNFα was detected using ELISA technique. **Results** Vincristine-induced neuropathic pain model was established successfully on the eighth day, after one week treatment with different doses of gastrodin, mechanical pain and heat pain threshold were differently improved in different dose treatment groups compared with the model group ($P<0.01$, $P<0.05$); In model group, the expression of IL-1β and TNFα was enhanced significantly in spinal cord ($P<0.01$). **Conclusion** Gastrodin could relieve the response to vincristine-induced pain. The mechanism of action may be related to inhibiting the expression of IL-1β and TNFα in spinal cord level.

Key words: Gastrodin; Chemotherapy-induced neuropathic pain; IL-1β; TNFα; Vincristine

摘 要: 目的 观察天麻素对长春新碱致大鼠神经病理性疼痛的治疗作用, 观察大鼠脊髓腰段IL-1β和TNF α表达的变化, 探讨其在脊髓水平的作用机制。**方法** 用长春新碱隔日腹腔注射制作大鼠化疗痛模型, 模型成功制备后腹腔注射天麻素治疗, 用电子Von Frey测痛仪测定大鼠机械性痛阈, 热辐射仪测定大鼠热刺激痛阈值; 采用ELISA方法检测脊髓腰段IL-1β和TNFα表达情况。**结果** 实验第8天化疗痛大鼠模型成功建立, 用不同剂量天麻素治疗模型大鼠1周后, 治疗组大鼠的机械和热刺激痛阈值与模型组比较均有不同程度的提高 ($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 治疗组大鼠的IL-1β和TNFα的表达明显降低 ($P<0.01$)。**结论** 天麻素可减轻长春新碱诱导的大鼠化疗痛反应, 其机制可能与抑制化疗痛大鼠脊髓IL-1β和TNFα的表达有关。

关键词: 天麻素; 化疗痛; 白细胞介素-1β; 肿瘤坏死因子α; 长春新碱

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A

0 引言

临床报道, 某些化疗药物 (如长春新碱、紫杉醇类、铂类等) 在抗肿瘤同时可引起患者痛觉过

敏, 导致神经病理性疼痛, 简称化疗痛^[1]。近年来, 有研究发现在一些疼痛模型中作为细胞间信号传递分子的细胞因子不仅参与了外周痛觉信息的传递和调制, 而且还可能在脊髓中枢参与对痛觉信息的调制^[2-3]。在长春新碱致神经病理性疼痛模型中, 前炎性细胞因子IL-1β和TNFα的表达增加, 提示其在化疗痛的产生与维持中发挥作用^[4]。有研究表明, 传统中药天麻的主要有效成分天麻素(gastrodin, Gas), 有镇痛、镇静及神经保护作用^[5], 但其对化疗痛的防治作用及其机制未见报道。本文主要研究天麻素对长春新碱诱导大鼠化疗痛模型的治疗

收稿日期: 2013-03-01; 修回日期: 2013-05-31
基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(2013CFC066); 湖北省教育厅科技研究重点资助项目(D20101208); 三峡大学研究生科研创新基金资助项目(2011CX060); 宜昌市科学研究与开发资助项目(A13301-57)
作者单位: 1. 443002 湖北宜昌, 三峡大学医学院国家中药药理科研三级实验室; 2. 宜昌市公安局西陵分局司法鉴定中心
通信作者: 郑卫红, E-mail: zwh20110606@163.com
作者简介: 张金芝(1987-), 女, 硕士, 主要从事神经药理学研究工作

作用及其对脊髓IL-1 β 和TNF α 表达的影响,探讨其在脊髓水平中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SPF级SD雄性大鼠,200~260 g,由华中科技大学实验动物中心提供(生产许可证号:SCXK(鄂)2010-0009);长春新碱(购自浙江海正药业股份有限公司,批号:H20042326)用0.9%氯化钠溶液配制成0.0125%浓度;天麻素(购自广东邦民制药厂有限公司,批号:101004)用0.9%氯化钠溶液分别配制成0.6%、1.2%、2.4%三种不同的浓度;ELISA试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司);电子Von Frey测痛仪为意大利瑞沃德公司出品;PL-200热辐射仪(购自成都泰盟科技有限公司);全波长酶标仪(美国,TYPE1500-458)。

1.2 方法

1.2.1 分组 SD大鼠按随机区组法分为5组,每组6只,分别为:对照组、模型组、天麻素小、中、大剂量组(30、60、120 mg/kg)。测机械痛阈和热痛耐受时间。以第1次注射长春新碱当天为第1天,除对照组用0.9%氯化钠溶液对照外,其他四组大鼠隔日上午均腹腔注射长春新碱125 μ g/kg,共4次,建立化疗痛模型,模型成功建立后,即于第9天开始,继续腹腔注射长春新碱,给药方案和剂量同上,同日下午3个天麻素组分别腹腔注射不同剂量的天麻素,对照组和模型组同步注射0.9%氯化钠溶液作为对照(0.5 ml/100 g),于使用天麻素1周后测定一次机械刺激、热刺激痛阈。

1.2.2 机械痛阈检测记录方法^[6] 采用电子Von Frey测痛仪测定大鼠对机械刺激的反应,分别于给药前和给药后第8天、第16天测定大鼠的机械痛阈。用细针接触刺激大鼠的后趾足底,每次刺激间隔15 min,左右足各五次,记录大鼠出现撤足反应时的力度。以大鼠撤足的力度反映大鼠机械刺激痛阈。

1.2.3 热刺激痛阈检测方法 用热辐射法进行热痛阈值的测定,测定时间同上。环境保持安静,室温恒定于(22 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C,将大鼠放在玻璃板上,用有机玻璃观察框将其罩住,待其适应环境20 min后,应用热痛觉测试仪测试热痛阈。设定刺激强度为35%的光强度刺激,聚光光源从下方直接照射左、右侧后爪足底,记录由照射到大鼠缩脚的时间作为热痛阈值,单位为s,重复测定三次,每次间隔15 min,单次光照射时间不超过20 s,以免造成

热辐射损伤。以3次测定结果的平均值作为大鼠热痛阈值。

1.2.4 IL-1 β 和TNF α 的测定 于末次治疗第2天,大鼠用20%乌拉坦深麻醉下断头处死。取出脊髓腰膨大处,加入预冷的0.9%氯化钠溶液,用匀浆器按1:9(W/V)的比例制成10%的组织匀浆,于4 $^{\circ}$ C,3 500 r/min离心10 min,提取上清液于-20 $^{\circ}$ C冻存待测。细胞因子IL-1 β 和TNF α 的测定采用ELISA法,严格按照试剂盒要求操作。

1.3 统计学方法

采用SPSS13.0统计软件包进行统计分析,按照随机分组的方差分析和两两比较对数据进行统计处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 机械痛阈的变化

给药前5组大鼠的基础痛阈差异无统计学意义($P>0.05$)。注射长春新碱7天后,在机械力刺激下,各组与对照组比较,机械痛阈值明显降低($P<0.01$),表明长春新碱诱导的大鼠机械痛觉过敏模型成功建立;随后腹腔注射天麻素7天后,天麻素小、中、大剂量组与模型组比较机械痛阈值显著升高($P<0.01$),见表1,提示天麻素对机械痛有缓解作用。

表1 天麻素对化疗痛大鼠机械痛阈变化的影响[($\bar{x}\pm s$)/g]
Table1 Effect of gastrodin on mechanical pain threshold in chemotherapy-induced neuropathic pain rats[($\bar{x}\pm s$)/g]

Groups	D ₀	D ₈	D ₁₆
NS	25.0 $\pm$ 0.87	23.0 $\pm$ 0.67	22.1 $\pm$ 0.75
VCR(125 μ g/kg)	23.4 $\pm$ 0.87	11.8 $\pm$ 0.67**	13.3 $\pm$ 0.75**
Gas(30 mg/kg)	24.4 $\pm$ 0.87	11.4 $\pm$ 0.67**	19.8 $\pm$ 0.75 [#]
Gas(60 mg/kg)	24.3 $\pm$ 1.00	12.3 $\pm$ 0.77**	20.8 $\pm$ 0.86 [#]
Gas(120 mg/kg)	25.0 $\pm$ 0.87	11.3 $\pm$ 0.67**	21.6 $\pm$ 0.86 [#]

Notes:Gas:Gastrodin;compared with NS group, **:P<0.01; compared with VCR model group, [#]:P<0.01

2.2 热刺激痛阈的变化

给药前各组大鼠的热痛阈值差异无统计学意义($P>0.05$)。腹腔注射长春新碱7天后,各组与0.9%氯化钠溶液对照组比较热痛阈值明显降低,且差异有统计学意义($P<0.01$),表明长春新碱诱导的大鼠热痛觉过敏模型建立成功;用天麻素腹腔注射治疗7天后,天麻素各剂量组与模型组比较热痛阈值显著提高($P<0.05$),见表2,提示天麻素能提高化疗痛大鼠的热痛阈值。

2.3 脊髓IL-1 β 和TNF α 的变化

与对照组比较,模型组脊髓IL-1 β 和TNF α 的表达

增加 ($P<0.01$) ; 与模型组比较, 3个天麻素治疗组脊髓IL-1 β 和TNF α 的表达减少 ($P<0.01$) , 见表3。

表2 天麻素对化疗痛大鼠热痛阈值的影响 [($\bar{x}\pm s$) / s]
Table2 Effect of gastrodin on thermal pain threshold in chemotherapy-induced neuropathic pain rats [($\bar{x}\pm s$) / s]

Groups	D ₀	D ₈	D ₁₆
NS	9.9±0.18	13.1±0.40	13.0±0.64
VCR(125 μ g/kg)	10.0±0.18	11.0±0.40**	11.4±0.75*
Gas(30 mg/kg)	10.1±0.18	10.9±0.40**	13.4±0.64 [#]
Gas(60 mg/kg)	9.9±0.18	11.0±0.45**	13.7±0.75 [#]
Gas(120 mg/kg)	10.0±0.18	11.1±0.40**	14.0±0.75 [#]

Notes:compared with NS control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$;compared with VCR model group, [#]: $P<0.05$

表3 脊髓IL-1 β 和TNF α 含量的变化
Table3 The change of contents of IL-1 β and TNF α in spinal cord

Groups	IL-1 β (pg/mg)	TNF α (pg/mg)
NS	1.32±0.10	10.15±0.27
VCR(125 μ g/kg)	2.42±0.11**	15.68±0.42**
Gas(30 mg/kg)	1.70±0.16 ^{##}	12.08±1.11
Gas(60 mg/kg)	0.98±0.13 ^{##}	9.87±0.61 ^{##}
Gas(120 mg/kg)	1.14±0.24 ^{##}	10.93±0.10 ^{##}

Notes:**:compared with NS control group, $P<0.01$,^{##}:compared with VCR model group, $P<0.01$

3 讨论

目前, 关于化疗药物致神经病理性疼痛的机制尚存在争议, 主要有以下几种可能的机制: 化疗药物可引起表皮内神经纤维减少和朗格汉斯细胞活化^[7]; 导致细胞Ca²⁺平衡的调节异常^[8]; 化疗药物致外周神经损伤后, 兴奋性氨基酸在脊髓背角释放增多, 进而引起脊髓背角神经元突触后膜上NMDA受体活化, 钙离子内流增加, 反馈性的使NMDA受体功能上调放大疼痛刺激^[9]; 脊髓胶质细胞 (主要是星型胶质细胞和小胶质细胞) 在神经病理性疼痛的产生和维持中起重要作用^[10]。近年来, 研究表明, 炎性细胞因子IL-1 β 和TNF α 与神经病理性疼痛关系密切, 其可能机制涉及: (1) 激活炎症细胞, 加重炎症反应; (2) 促进兴奋性氨基酸、P物质、缓激肽、一氧化氮、氧自由基等的释放, 敏化脊髓背角神经元等^[11]。

本实验采用长春新碱建立化疗痛大鼠模型, 观察天麻素对化疗痛大鼠模型脊髓IL-1 β 和TNF α 表达变化的影响。通过行为学结果发现, 隔日腹腔注射长春新碱4次后, 可以制作稳定的大鼠化疗痛模型, 在继续使用长春新碱的同时, 加用天麻素治疗, 连续给药7天后, 化疗痛大鼠机械痛阈值明显升高, 热痛阈值也明显提高。提示天麻素可抑

制长春新碱诱导的大鼠化疗痛反应。

双抗体夹心ELISA法结果显示, 使用天麻素治疗1周后, 模型组脊髓IL-1 β 和TNF α 含量上升, 而天麻素治疗后, 各组脊髓IL-1 β 和TNF α 含量明显少于模型组, 说明天麻素可抑制化疗痛大鼠脊髓IL-1 β 和TNF α 的表达。由此可见, 天麻素减轻大鼠化疗痛反应可能与抑制大鼠脊髓IL-1 β 和TNF α 表达有关。

有研究报道^[12-14], 脊髓中的促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6、TNF α 等通过与特异性受体结合激活胶质细胞和神经元, 可诱发疼痛产生; 另有研究报道^[4], 胶质细胞参与了长春新碱致神经病理性疼痛的产生。长春新碱可能通过活化脊髓胶质细胞, 促使其释放炎性因子IL-1 β 和TNF α , 引起脊髓中枢敏化, 导致痛觉过敏或超敏反应, 诱发化疗痛。天麻素可减少其炎性因子释放, 抑制脊髓中枢敏化反应, 从而提高模型组大鼠的痛阈值, 减轻大鼠化疗痛反应。由此推测, 天麻素可能是通过抑制胶质细胞的活化, 减少炎性因子的释放而发挥治疗作用。

目前, 有研究证实^[15-16], 天麻素对缺血再灌注损伤的脑细胞、星型胶质细胞以及对谷氨酸致培养皮层神经细胞损伤均有保护作用。所以, 天麻素减轻化疗痛的作用机制也可能还与其他因素有关, 如可能通过增加谷氨酸转运体的作用、减少兴奋性氨基酸在脊髓背角的释放以及调节Ca²⁺的平衡等有关。这些将有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] Brouwers EE, Huitema AD, Boogerd W, *et al.* Persistent neuropathy after treatment with cisplatin and oxaliplatin [J]. Acta Oncol, 2009,48(6): 831-41.

[2] Dubový P, Klusáková I, Svízenská I, *et al.* Satellite glial cells express IL- 6 and corresponding signal transducing receptors in the dorsal root ganglia of rat neuropathic pain model[J]. Neuron Glia Biol,2010,6(1): 73-83.

[3] Loram LC, H ar rison JA, Sloane EM , *et al.* Enduring reversal of neuropathic pain by a single in trathecal injection of adenosine 2A receptor agonists: a novel therapy for neuropathic pain[J]. J Neurosci,2009, 29(44):14015-25.

[4] Li DP, Yu SY. Activation of glial cells and expression change of IL-1 β , GDNF in vincristine-induced neuropathic pain[J].Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2007,34(2):93-5. [李大鹏,于世英. 长春新碱致神经病理性疼痛模型中胶质细胞及IL-1 β 、GDNF表达的变化[J].肿瘤防治研究,2007, 34(2):93-5.]

[5] Gong QH,Shi JS,Yang DL, *et al.* Pharmacological actions and its mechanisms of gastrodin in central nervous system[J].Zhongguo Xin Yao Yu Lin Chuang Za Zhi,2011,30(3):176-9. [龚其海,石京山,杨丹莉,等.天麻素在中枢神经系统的药理作用及其机制[J].中国新药与临床杂志,2011,30(3):176-9.]

[6]

Pan YD, Guo QL, Wang E, *et al.* NF- κ b up-regulates spinal CX3CR1 expression in neuropathic pain rats[J]. *Di Si Jun Yi Da Xue Xue Bao*,2009, 30(7):595-8.[潘韞丹,郭曲练,王镔,等. NF- κ B上调神经病理性疼痛大鼠脊髓CX3CR1表达[J].*第四军医大学学报*, 2009, 30(7):595-8.]

[7]

Qureshi AA, Hosoi J, Xu S, *et al.* Langerhans cells express inducible nitric oxide synthase and produce nitric oxide[J]. *J Invest Dermatol*,1996,107(6):815-21.

[8]

Montero M, Alonso MT, Carnicero E, *et al.* Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca^{2+} transients that modulate secretion[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2(2):57-61.

[9]

Bleakman D,Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2006,17(5):592-604.

[10]

Wang JW,Zhang XW. Effects of microglia on neuropathic pain[J]. *Shi Yong Teng Tong Xue Za Zhi*,2007,3(2):133-6. [王建伟, 张咸伟.小胶质细胞在神经病理性疼痛中的作用[J].*实用疼痛学杂志*,2007,3(2):133-6.]

[11]

Narita M, Shimamura M, Imai S, *et al.* Role of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha dependent expression of cyclooxygenase-2 mRNA in thermal hyperalgesia induced by chronic inflammation in mice [J]. *Neuroscience*,2008,152(2):477-86.

[12]

Smith TE,Chong MS.Neuropathic pain[J].*Hosp Med*, 2000, 61(11):760-6.

[13]

De la O-Arciniega M, Godnez-Chaparro B, Guevara-Lpez U, *et al.* Anti-hyperalgesic effect of one combination of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rat[J].*Cir Cir*,2007,75(5):363-9.

[14]

Udeyler N, Sommer C. Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases[J]. *Neurosci Lett*,2008,437(3):194-8.

[15]

Xue LH,Tang YP,Hong QT, *et al.* Protective effects of gastrodine on injured cortical neurons by glutamic acid[J].*Beijing Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*,1999,22(1):39-40. [薛柳华,唐一鹏,洪庆涛,等.天麻素对谷氨酸致培养皮层神经细胞损伤的保护作用[J]. *北京中医药大学学报*,1999,22(1):39-40.]

[16]

Hu JJ,Hong QT, Tang YP, *et al.* Protective effects of gastrodine against lesions in cultured astrocytes caused by simulated cerebral ischemia and reperfusion, and its influence on the activity of nitric oxide synthase[J]. *Beijing Zhong Yi Yao Da Xue Xue Bao*,2001, 24(5):11-5. [胡建军,洪庆涛,唐一鹏,等.天麻素对缺血再灌注损伤星形胶质细胞的保护作用及其对一氧化氮合成酶活性的影响[J].*北京中医药大学学报*,2001,24(5):11-5.]

[编辑：安 凤；校对：刘红武]

• 消息会讯 •

癌症靶向治疗和免疫治疗的新进展学习班（第一轮通知）

湖北省肿瘤医院生物治疗中心联合湖北省抗癌协会，拟定于2014年6月12—15日在武汉召开癌症靶向治疗和免疫治疗的新进展学习班（国家级继续教育项目[2014-04-08-122]），欢迎各位同仁及相关专业人员参加。

学习参与者将授予国家级医学继续教育 I 类学分10分。

学习班注册网址：<http://www.bioccn.com>

联 系 人：钟易
联系方式：E-mail：iriszhong@126.com
电 话：13476227011

湖北省肿瘤医院生物治疗中心
湖北省抗癌协会