

# 和厚朴酚对小鼠背根神经节河豚毒素敏感型钠电流的影响

黄 云, 康子瑶, 张广钦\*

(中国药科大学临床药学教研室,南京 210009)

**摘要** 采用全细胞膜片钳技术,观察和厚朴酚(honokiol, Hnk)对急性分离的小鼠背根神经节上河豚毒素敏感型(TTX-S)钠电流及其通道动力学的影响,探讨Hnk可能的镇痛机制及作用靶点。结果显示:和厚朴酚浓度依赖性地抑制TTX-S钠电流,30 μmol/L 和厚朴酚可以使稳态激活曲线向较正电压方向偏移达10.2 mV,通道失活后恢复时间明显延长,但对稳态失活动力学特征无明显的影响。

**关键词** 和厚朴酚; 背根神经节; TTX-S 钠通道; 全细胞膜片钳; 镇痛药

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)05-0609-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160518

引用本文 黄云,康子瑶,张广钦. 和厚朴酚对小鼠背根神经节河豚毒素敏感型钠电流的影响[J]. 中国药科大学学报,2016,47(5):609–613.

Cite this article as: HUANG Yun, KANG Ziyao, ZHANG Guangqin. Effects of honokiol on TTX-S sodium current in mouse dorsal root ganglion neurons[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(5):609–613.

## Effects of honokiol on TTX-S sodium current in mouse dorsal root ganglion neurons

HUANG Yun, KANG Ziyao, ZHANG Guangqin \*

Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** To elucidate possible mechanisms and targets of honokiol (Hnk) for the treatment of pain, the effects of Hnk on tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium current ( $I_{Na}$ ) were studied in acutely dissociated mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons with whole-cell patch clamp technique. Hnk inhibited TTX-S  $I_{Na}$  currents in a concentration-dependent manner. At 30 μmol/L, Hnk obviously shifted the steady state activation of TTX-S  $I_{Na}$  toward more positive potentials by 10.2 mV and prolonged the time course of recovery of sodium current, yet with no significant difference on recovery from inactivation of TTX-S sodium channel.

**Key words** honokiol; dorsal root ganglion; tetrodotoxin-sensitive sodium currents; whole-cell patch clamp; analgesics

厚朴为木兰科植物厚朴或者凹叶厚朴地干燥的表皮、枝皮或者根皮<sup>[1]</sup>,其被《神农本草经》列为止上品,中医临床用作化湿药,具有燥湿消痰、下气除满之功效<sup>[2]</sup>。和厚朴酚(Hnk,图1)作为中药厚朴两个最主要的活性成分之一,具有抗菌、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抑制中枢神经和松弛中枢性肌肉,降低胆固醇等药理作用<sup>[3]</sup>。近来研究报道,和厚朴酚具有明显的镇痛作用,其作用机制还不清楚<sup>[3]</sup>。

疼痛是最常见的临床症状之一,根据疼痛的持续时间不同可将其分为急性疼痛和慢性疼痛<sup>[4]</sup>。

神经病理性疼痛是一种严重威胁人类健康的慢性疼痛,主要是由于外周或者中枢神经系统结构损伤或功能紊乱导致<sup>[5-6]</sup>。

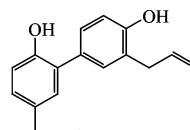


Figure 1 Chemical structure of honokiol (Hnk)

背根神经节(DRG)是痛觉传入的第一级神经元,在痛觉的外周机制中起着极为重要的作用<sup>[7]</sup>,

这不仅与多种痛觉传递受体有关,更与离子通道关系密切。对 DRG 上离子通道的认识,对寻找疼痛治疗的新靶点有重要意义。电压门控钠离子通道(VGSC)是可兴奋细胞产生电冲动的特异性蛋白分子,位于心肌、骨骼肌和神经元等可兴奋细胞的细胞膜上<sup>[8]</sup>,在疼痛产生的机制中起到举足轻重的作用<sup>[9]</sup>。根据对河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)的敏感性不同,可分为TTX敏感(TTX-S)和不敏感(TTX-R)两类<sup>[10]</sup>。TTX-S 钠通道电流主要由 Nav1.1、Nav1.6 和 Nav1.7 介导<sup>[11]</sup>。在成熟的神经元细胞中,TTX-S 钠通道(如 Nav1.7)优先表达,并与生理和病理性疼痛有着密切联系<sup>[12]</sup>。本研究在小鼠急性分离的 DRG 细胞上观察 Hnk 对 TTX-S 钠电流变化特征,从而探讨 Hnk 可能的镇痛机制,为将来开发新药提供理论依据。

## 1 材 料

### 1.1 溶液和试剂

胶原酶Ⅱ、Hepes、胰蛋白酶、EGTA、尼非地平均购自美国 Sigma 公司,其他试剂均为市售分析纯。

Hnk 溶于 DMSO 中配成母液,实验时细胞外液中 DMSO 的最终浓度小于 0.1%,对钠电流无明显影响。

### 1.2 仪 器

BS 110s 电子天平、PB-21 pH 计(美国 Sartorius 公司);TE2000-U 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);EPC-10 膜片钳放大器(德国 Heka 公司);PCS-5000 三维操作手(美国 Berlegh 公司);P-97 微电极拉制仪(美国 Sutter 公司);MF-900 电极抛光仪(日本 Micro Forge 公司)。

### 1.3 动 物

昆明种小鼠,雌雄不限,体重(25~30)g,清洁级,由南京市青龙动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)2012-0008。

## 2 方 法

### 2.1 DRG 细胞分离

根据参考文献[7],使用 4% 的水合氯醛(0.03 mL/g)给小鼠腹腔注射麻醉后,分离脊柱,放入 4 °C 生理盐水中。沿椎孔将脊柱从正中央分为两半,去除脊髓,从椎间孔中取出 DRG,剪去 DRG 两端的神经干,并将 DRG 放入 1 mg/mL 胶原酶Ⅱ

中,尽量剪碎,恒温振荡(37 °C, 80 r/min),孵育 45~50 min。离心,去上清液,再加入 2.5 mg/mL 胰蛋白酶在相同条件下孵育 3~5 min。酶解结束后,离心,弃上清液,加入台式液洗 2~3 遍,再加入细胞外液反复吹打成细胞悬液,用 200 目筛网过滤,去除多余的组织,最后将过滤的细胞悬液分装于事先准备好的培养皿中,静置 1~1.5 h,待细胞贴壁后即可进行膜片钳实验。

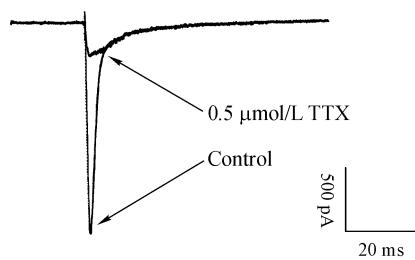
### 2.2 全细胞膜片钳记录

细胞贴壁后,小心吸出培养皿中的台式液,加入细胞外液 2 mL 静置 15 min,在显微镜下观察 DRG 细胞的大小、形态、状态等特征。选取细胞膜完整、透光性好的 DRG 细胞进行记录,采用全细胞膜片钳技术记录 DRG 细胞钠电流。玻璃微电极经水平微电极拉制仪拉制,充灌电极内液后入水电阻为 3~5 MΩ。电极尖端与细胞表面形成大于 1 GΩ 的高阻封接后,补偿快电容,并给予 -70 mV 锉制电压,以较大负压吸破细胞膜,补偿慢电容及串联电阻,形成全细胞记录模式,此时即可进行电压钳记录。信号经 Ag/AgCl 电极引导,由膜片钳放大器放大,通过 Pulse 软件收集并存储产生的电流信号于计算机中。室温保持 23~25 °C。观察 Hnk 对小鼠 DRG 细胞上 TTX-S 钠电流的影响。大直径 DRG 细胞中表达的大部分是 TTX-S 钠电流,因此本研究选取大直径细胞(39~50 μm)作为实验标本。

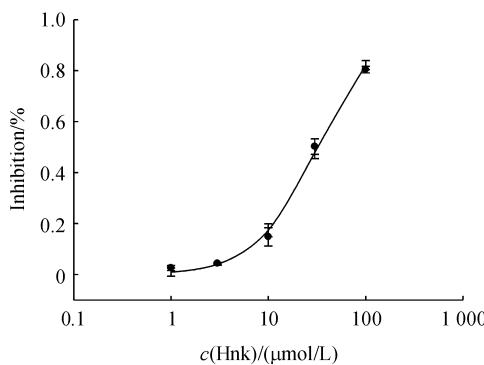
## 3 结 果

### 3.1 Hnk 对 TTX-S 钠电流的影响

在 -70 mV 的锉制电压下,从 -50 mV 开始,以 5 mV 步阶去极化,持续 200 ms,激活 TTX-S 钠电流。结果显示:此电流能被 0.5 μmol/L TTX 明显抑制,表明所激发电流为 TTX-S 钠电流(图 2),且 Hnk 对 TTX-S 钠电流呈现浓度依赖性的抑制作用(图 3)。采用 Hill 方程进行数据拟合: $y = 1 + [1 + (IC_{50}/c)^n]$ ,其中 c 是药物浓度,y 和 n 分别是最大抑制率和 Hill 系数。拟合曲线显示  $IC_{50} = 32.01 \mu\text{mol/L}$ ,Hill 系数为 1.34。Hnk 浓度为 1,3,10,30,100 μmol/L 时对 TTX-S 钠电流的最大抑制率(%)分别为(2.58 ± 0.010)、(4.37 ± 0.004)、(14.83 ± 3.57)、(50.21 ± 3.08)和(80.38 ± 1.26)。为进一步研究 Hnk 对 TTX-S 钠电流的作用,选择 30 μmol/L Hnk 进行实验。



**Figure 2** Identification of tetrodotoxin-sensitive (TTX-S) sodium currents in mouse DRG neurons. The current was elicited by 200 ms depolarization from holding potential of  $-70$  mV to  $-10$  mV



**Figure 3** Concentration-dependent curve of Hnk on TTX-S sodium currents in mouse DRG neurons ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

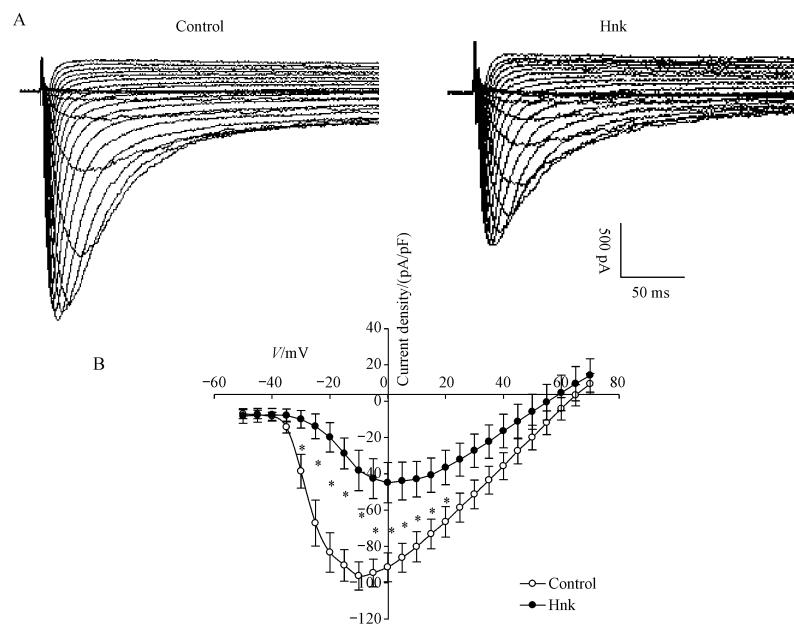
### 3.2 Hnk 对 TTX-S 钠电流电流-电压的影响

在  $-70$  mV 的钳制电压下,从  $-50$  mV 开始,以  $5$  mV 步阶去极化,持续  $200$  ms,激活 TTX-S 钠电流。以电压(mV)为横轴,TTX-S 钠电流密度(pA/pF)为

纵轴,绘制给药前后  $I-V$  曲线。结果显示: $30\text{ }\mu\text{mol/L}$  Hnk 明显抑制钠电流的幅度(图 4-A)。由  $I-V$  曲线可见(图 4-B),TTX-S 钠通道在  $-35$  mV 左右开始激活,在  $-10$  mV 达到最大激活,反转电位大约在  $+65$  mV。给予  $30\text{ }\mu\text{mol/L}$  Hnk 后,在  $-30$  mV 开始激活,最大激活电压右移到  $0$  mV ( $P < 0.05, n = 7$ ),反转电位左移至  $+60$  mV 左右(无统计学差异)。Hnk 能显著降低 TTX-S 钠通道的电流密度,对照组的最大电流密度为  $-(96.3 \pm 7.7)$  pA/pF,给予 Hnk 后最大电流密度减小到  $-(44.9 \pm 11.06)$  pA/pF,抑制幅度达  $(51.3 \pm 3.5)\%$  ( $P < 0.05, n = 7$ )。因此,Hnk 能明显抑制 TTX-S 钠电流的电流密度,改变 TTX-S 钠电流的  $I-V$  曲线。

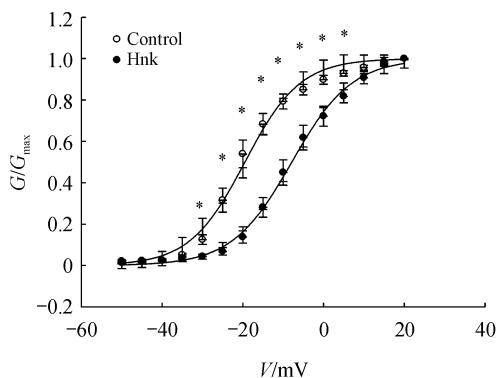
### 3.3 Hnk 对 TTX-S 钠电流稳态激活动力学的影响

稳态激活曲线由  $I-V$  曲线数据中获得,采用 Boltzmann 方程对数据进行拟合:  $G/G_{\max} = 1/\{1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]\}$ ,  $G$  为去极化电压  $V$  时的电导,  $G_{\max}$  为最大电导,  $V_{1/2}$  为半激活电压,  $k$  为斜率因子,  $I$  为去极化电流。 $30\text{ }\mu\text{mol/L}$  Hnk 使 TTX-S 钠电流的稳态激活曲线明显右移,给药前后 TTX-S 钠电流的  $V_{1/2}$  分别为  $-(19.4 \pm 1.5)$  和  $-(9.2 \pm 1.2)$  mV ( $P < 0.05$ ),但斜率因子无明显变化,分别为  $(6.3 \pm 0.6)$  和  $(6.8 \pm 0.4)$ (图 5)。因此,Hnk 能明显影响 TTX-S 钠通道的激活。



**Figure 4** Effects of  $30\text{ }\mu\text{mol/L}$  Hnk on the TTX-S sodium current. The currents were activated by 200 ms depolarizing pulses ranging from  $-50$  mV to  $+70$  mV in 5 mV increment at  $0.25$  Hz, with a holding potential of  $-70$  mV

A: Representative TTX-S sodium currents traces recorded in DRG neurons; B:  $I-V$  relationship of TTX-S sodium currents before and after application of  $30\text{ }\mu\text{mol/L}$  Hnk ( $\bar{x} \pm s, n=7$ ). \*  $P < 0.05$  vs control group



**Figure 5** Effects of  $30 \mu\text{mol/L}$  Hnk on the steady-state activation of TTX-S sodium currents in mouse DRG neurons ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

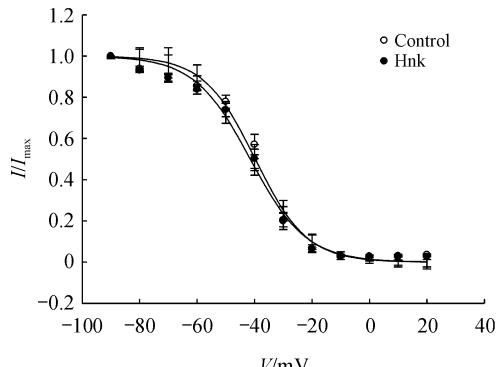
\*  $P < 0.05$  vs control group

### 3.4 Hnk 对 TTX-S 钠电流稳态失活动力学的影响

采用双脉冲刺激,在  $-70 \text{ mV}$  钳制电压下,先给予条件脉冲从  $-90 \text{ mV}$  每隔  $10 \text{ mV}$  连续去极化至  $+20 \text{ mV}$ ,持续时间  $100 \text{ ms}$ ,每一条件脉冲后给予一固定的去极化至  $-10 \text{ mV}$ ,持续时间  $100 \text{ ms}$  的测试脉冲。

采用 Boltzmann 方程对数据进行拟合: $I/I_{\max} = 1/\{1 + \exp[(V - V_{1/2})/k]\}$ ,  $I$  为去极化电压  $V$  时的电流,  $I_{\max}$  为最大电流,  $V$  和  $V_{1/2}$  分别为不同的条件脉冲电压和通道失活 50% 时的条件脉冲电压,  $k$  为斜率因子。

如图 6 所示,给  $30 \mu\text{mol/L}$  Hnk 前后 TTX-S 钠电流的  $V_{1/2}$  分别为  $-(39.4 \pm 1.2)$  和  $-(41.4 \pm 1.3) \text{ mV}$  ( $P > 0.05$ );  $k$  分别为  $(8.6 \pm 1.3)$  和  $(9.3 \pm 1.1)$  ( $P > 0.05$ )。结果显示,  $30 \mu\text{mol/L}$  Hnk 对 TTX-S 钠通道的稳态失活动力学特征无明显影响。



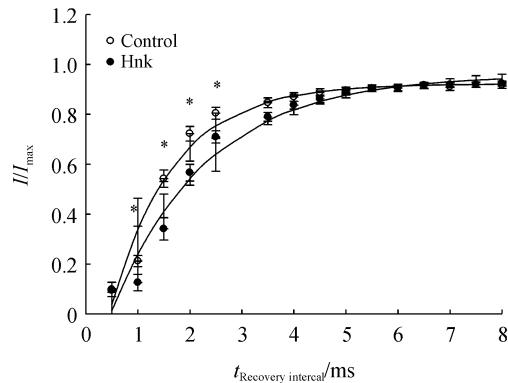
**Figure 6** Effects of  $30 \mu\text{mol/L}$  Hnk on the steady-state inactivation of TTX-S sodium currents in mouse DRG neurons. The steady state inactivation curves of sodium current were obtained by means of double pulse protocol, a  $100 \text{ ms}$  conditioning prepulse depolarized to various potentials (from  $-90 \text{ mV}$  to  $+20 \text{ mV}$ , holding potential at  $-70 \text{ mV}$ ) was followed by a  $100 \text{ ms}$  test pulse to  $-10 \text{ mV}$  ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

### 3.5 Hnk 对 TTX-S 钠电流稳态失活后恢复动力学的影响

采用双脉冲刺激,在  $-70 \text{ mV}$  钳制电压下,先给予去极化至  $-10 \text{ mV}$ ,持续时间  $100 \text{ ms}$  的条件脉冲,再给一同样的刺激脉冲,两脉冲的间隔时间以  $0.5 \text{ ms}$  步阶增加,共 15 次脉冲。

通道失活后恢复,采用单指数方程对实验数据进行拟合: $I/I_{\max} = A + B * \exp(-t/\tau)$ ,  $I/I_{\max}$  为第二个脉冲电流与第一个脉冲电流比值,  $t$  为两次脉冲之间的间隔时间,  $\tau$  为灭活后再激活的时间常数。

如图 7 所示,给药前后恢复的时间常数  $\tau$  分别为  $(1.2 \pm 0.10)$  和  $(1.8 \pm 0.12) \text{ ms}$  ( $P < 0.05, n = 7$ )。因此,给予  $30 \mu\text{mol/L}$  Hnk 后明显延长钠电流的恢复时间常数。



**Figure 7** Effects of  $30 \mu\text{mol/L}$  Hnk on the recovery from inactivation of TTX-S sodium currents in mouse DRG neurons. The time course of recovery of sodium current was studied by using a double pulse protocol. A  $100 \text{ ms}$  prepulse to  $-10 \text{ mV}$  from holding potential of  $-70 \text{ mV}$  was followed by various recovery durations and then a test pulse to  $-10 \text{ mV}$  for  $100 \text{ ms}$  ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

\*  $P < 0.05$  vs control group

## 4 讨论

DRG 受损导致相应的感觉神经元胞体大量持久地产生放电,引起脊髓和高位中枢的敏化,进而出现自发疼痛、痛觉过敏及感觉异常等慢性神经病理性疼痛症状,成为神经病理性疼痛的信号源<sup>[14]</sup>。钠通道在神经损伤过程中对神经兴奋性起着重要的调控作用。钠通道的开放能够使钠离子内流进入细胞内,引起神经细胞的去极化从而触发动作电位。神经损伤增加钠离子内流导致异常动作电位引起神经病理性疼痛<sup>[15]</sup>。

本研究结果显示,Hnk 能够有效地抑制背根神

经节细胞TTX-S钠电流,并且具有明显的浓度依赖性,且最大激活电压也由-10 mV右移为0 mV,稳态激活曲线明显右移,表明TTX-S钠通道在较正的膜电压下才能被激活,使通道不易开放,从而抑制电流幅度<sup>[16]</sup>。30 μmol/L Hnk可以显著影响TTX-S钠通道的稳态激活动力学特征和失活后恢复动力学特征,但不影响TTX-S钠通道的稳态失活动力学特征。因此,Hnk主要通过改变TTX-S钠通道的激活和失活后恢复特征,降低动作电位的幅度和频率,抑制神经的兴奋性来缓解疼痛<sup>[17]</sup>。众多的研究结果都表明,Hnk具有缓解炎性疼痛的作用<sup>[18]</sup>,但是目前对于其机制还没有完全阐明。因此推测,Hnk对于炎症性疼痛的治疗作用可能是通过抑制背根神经节细胞的TTX-S钠电流,降低背根神经节细胞的兴奋性,从而达到镇痛的作用。

一些经典的TTX-S钠通道阻断剂(如局麻药、抗惊厥药及抗心律失常药)已广泛应用于治疗神经性疼痛,特别在与传统的镇痛药合用后产生较好的临床疗效<sup>[19]</sup>。近年来,不同亚型的钠通道特异选择性阻断剂不断出现,这些药物具有通道选择性高、作用强、不良反应小等特点,具备开发为新药的潜力<sup>[20]</sup>。因此,本实验研究了Hnk对TTX-S钠电流的影响,为开发治疗神经病理性疼痛药物提供了新的靶点,也为钠通道阻断剂的临床应用提供了理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Woodbury A, Yu SP, Chen D, et al. Honokiol for the treatment of neonatal pain and prevention of consequent neurobehavioral disorders [J]. *J Nat Prod*, 2015, **78**(11): 2531–2536.
- [2] Amorati R, Zotova J, Baschieri A, et al. Antioxidant activity of magnolol and honokiol: kinetic and mechanistic investigations of their reaction with peroxy radicals [J]. *J Org Chem*, 2015, **80**(21): 10651–10659.
- [3] Fang CY, Chen SJ, Wu HN, et al. Honokiol, a lignan biphenol derived from the magnolia tree, inhibits dengue virus type 2 infection [J]. *Viruses*, 2015, **7**(9): 4894–4910.
- [4] Blackman P. Shin pain in athletes-assessment and management [J]. *Aust Fam Physician*, 2010, **39**(1/2): 24–29.
- [5] Cerutis DR, Weston MD, Ogunleye AO, et al. Lysophosphatidic acid (LPA) 18:1 transcriptional regulation of primary human gingival fibroblasts [J]. *Genom Data*, 2014, **2**: 375–377.
- [6] da Silva KA, Paszczuk AF, Passos GF, et al. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha, beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice [J]. *Pain*, 2011, **152**(8): 1872–1887.
- [7] Hou B, Chen H, Qu X, et al. Characteristics of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in dorsal root ganglion neurons at different ages and sizes [J]. *Neuroreport*, 2015, **26**(16): 981–987.
- [8] Nakamura M, Jang IS. pH-dependent inhibition of tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> channels by diclofenac in rat nociceptive neurons [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016, **64**: 35–43.
- [9] Zhu H, Yu Y, Zheng L, et al. Chronic inflammatory pain upregulates expression of P2Y2 receptor in small-diameter sensory neurons [J]. *Metab Brain Dis*, 2015, **30**(6): 1349–1358.
- [10] Ho C, O'leary ME. Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, **46**(1): 159–166.
- [11] Chahine M, O'Leary ME. Regulation/modulation of sensory neuron sodium channels [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2014, **221**: 111–135.
- [12] Takahashi I, Yoshion M. Functional coupling between sodium-activated potassium channels and voltage-dependent persistent sodium currents in cricket Kenyon cells [J]. *J Neurophysiol*, 2015, **114**(4): 2450–2459.
- [13] Kao DJ, Li AH, Chen JC, et al. CC chemokine ligand 2 upregulates the current density and expression of TRPV1 channels and Nav1.8 sodium channels in dorsal root ganglion neurons [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, **9**: 189.
- [14] Przewlocki R, Przewlocka B. Opioids in chronic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, **429**(1): 79–91.
- [15] Hon HK, Lee BH, Park MH, et al. Block of hERG K<sup>+</sup> channel and prolongation of action potential duration by fluphenazine at submicromolar concentration [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, **702**(1/2/3): 165–173.
- [16] Zou Z, Lu Y, Dong M, et al. Effect of homocysteine on voltage-gated sodium channel currents in primary cultured rat caudate nucleus neurons and its modulation by 2-arachidonylglycerol [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, **57**(4): 477–485.
- [17] Christidis N, Kang I, Cairns BE, et al. Expression of 5-HT<sub>3</sub> receptors and TTX resistant sodium channels (Na(V)1.8) on muscle nerve fibers in pain-free humans and patients with chronic myofascial temporomandibular disorders [J]. *J Headache Pain*, 2014, **15**: 63.
- [18] Lin YR, Chen HH, Lin YC, et al. Antinociceptive actions of honokiol and magnolol on glutamatergic and inflammatory pain [J]. *J Biomed Sci*, 2009, **16**: 94.
- [19] Ghelardini C, Desaphy JF, Muraglia M, et al. Effects of a new potent analog of tocainide on hNav1.7 sodium channels and *in vivo* neuropathic pain models [J]. *Neuroscience*, 2010, **169**(2): 863–873.
- [20] Scanio MJ, Shi L, Drizin I, et al. Discovery and biological evaluation of potent, selective, orally bioavailable, pyrazine-based blockers of the Na(v)1.8 sodium channel with efficacy in a model of neuropathic pain [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, **18**(22): 7816–7825.