

## 左旋紫堇达明对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及机制研究

熊枫, 颜冰, 戴文玲, 余伯阳, 刘吉华\*

(中国药科大学江苏省中药评价与转化重点实验室, 南京 211198)

**摘要** 建立坐骨神经慢性压迫损伤诱导的大鼠神经病理性疼痛模型(CCI模型), 探讨左旋紫堇达明(*levo-corydalmine*, *l*-CDL)对神经病理性疼痛大鼠痛觉敏化和脊髓中枢敏化的影响。Von-frey法检测机械性缩足反射阈值; 热痛刺激仪检测热刺激缩足反射潜伏期; 免疫印迹法检测大鼠脊髓L4-L6段N-甲基-D-天冬氨酸受体NR1亚基磷酸化水平; 免疫荧光法检测脊髓背角降钙素基因相关肽(CGRP)蛋白表达以及*c-fos*阳性神经元数目。结果显示, *l*-CDL(7.5, 15, 30 mg/kg, ig)能够剂量依赖性地改善CCI模型大鼠机械超敏和热痛过敏。*l*-CDL[15 mg/(kg·d), 5 d, ig]能显著抑制CCI模型大鼠脊髓CGRP, p-NR1, *c-fos*的高表达, 且不发生镇痛耐受现象。表明*l*-CDL对CCI模型大鼠神经病理性疼痛具有良好的镇痛作用, 其镇痛机制与抑制大鼠脊髓中枢敏化相关。

**关键词** 左旋紫堇达明; 神经病理性疼痛; 镇痛; 中枢敏化

**中图分类号** R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)01-0070-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.2017011

**引用本文** 熊枫, 颜冰, 戴文玲, 等. 左旋紫堇达明对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及机制研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(1): 70-75.

**Cite this article as:** XIONG Feng, YAN Bing, DAI Wenling, et al. Analgesic effect of *levo-corydalmine* on neuropathic pain in rats and its mechanism[J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(1): 70-75.

Analgesic effect of *levo-corydalmine* on neuropathic pain in rats and its mechanism

XIONG Feng, YAN Bing, DAI Wenling, YU Boyang, LIU Jihua\*

Jiangsu Key Laboratory of TCM Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract** The aim of the present study was to investigate the effects of *levo-corydalmine* (*l*-CDL) on chronic constrictive injury (CCI)-induced neuropathic pain and central sensitization in spinal cord. The mechanical withdrawal threshold in rats was assessed by Von-Frey fibers and the thermal withdrawal latency was assessed by thermal stimulus apparatus. The level of phosphorylated N-methyl-D-aspartic acid receptor 1 (NR1) in L4-L6 spinal cord was analyzed by immunoblotting and the expression of calcitonin gene related peptide (CGRP) and *c-fos* in spinal cord dorsal horn were analyzed by immunofluorescence. Results showed that *l*-CDL (7.5, 15, 30 mg/kg, ig) inhibited CCI-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in a dose-dependent manner. *l*-CDL significantly inhibited the up-regulation of p-NR1, *c-fos* and CGRP in CCI rats without tolerance. In conclusion, *l*-CDL has a good relieving effect on central sensitization in spinal cord, thus generating outstanding analgesic activity on CCI-induced neuropathic pain.

**Key words** *levo-corydalmine*; neuropathic pain; analgesia; central sensitization

This study was supported by the National Science and Technology Major Project for New Drugs Development (No. 2012ZX09J12110-06B)

神经病理性疼痛是由中枢或外周神经系统原发性损害或功能障碍引起的一种慢性疼痛,常表现为自发痛、痛觉超敏和痛觉过敏<sup>[1-2]</sup>。目前对神经病理性疼痛的临床治疗手段主要有药物治疗、介入治疗等,但是疗效均不理想,因此研发疗效确切的神经病理性疼痛治疗药物一直是该领域的研究热点。中枢兴奋性神经元敏化在神经病理性疼痛的发生、发展和维持中发挥着重要的作用。神经病理性疼痛状态下,C纤维和A纤维在脊髓大量释放多种神经递质如谷氨酸(Glu),P物质(SP)和降钙素基因相关肽(CGRP)等作用于突触后膜,消除N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的 $Mg^{2+}$ 阻滞,活化的NMDA受体离子通道开放,大量 $Ca^{2+}$ 内流,细胞内钙超载引发下游的生化级联反应,脊髓中枢敏化最终引起痛觉敏化<sup>[3]</sup>。

左旋紫堇达明(*levo-corydalmine*, *l*-CDL)是镇痛中药元胡(*Corydalis yanhusuo* W. T Wang)中痕量但高效的镇痛活性成分。本实验通过建立大鼠坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)模型,探讨*l*-CDL对神经病理性疼痛的镇痛作用及机制。

## 1 材料

### 1.1 试剂

左旋紫堇达明(*l*-CDL,纯度98%,本实验室自制,0.5%羧甲基纤维素钠配制为悬浮液供实验使用);BCA试剂盒、ECL显影液(美国Thermo公司);兔抗大鼠phospho-NR1(Ser896)抗体(1:1 000稀释),羊抗兔IgG(1:8 000稀释)(美国CST公司);兔抗大鼠GAPDH抗体(1:8 000稀释,美国Sigma公司);兔抗大鼠*c-fos*抗体(1:200稀释),兔抗大鼠CGRP抗体(美国Abcam公司);FITC荧光标记驴抗兔IgG(1:300稀释),488荧光标记驴抗兔IgG(1:300稀释)(美国Jackson ImmunoResearch公司);驴血清(美国Millipore公司);其他化学试剂均来源于上海沪试公司。

### 1.2 仪器

激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);Mini Protean 4电泳仪(美国Bio-Rad公司);Von-Frey测痛包(North Coast Medical公司);自动热痛刺激仪(意大利Ugo basile公司)。

## 1.3 动物

健康成年雄性Sprague-Dawley大鼠,SPF级,购自南通大学实验动物中心,体重180~220 g(动物生产许可证号:SCXK(苏)2014-0001)。

## 2 方法

### 2.1 CCI模型制备

参照Bennett等<sup>[4]</sup>的方法建立SD大鼠左后肢CCI模型。大鼠饲养环境安静,通风和空气质量良好,室温26℃左右,湿度50%左右,24 h明暗交替,自由取食,每日更新垫料和饮用水。动物适应环境5 d以后,腹腔注射4%水合氯醛(0.4 mL/kg)麻醉大鼠,观察缩腿反应以及角膜反射确定麻醉程度。将大鼠右侧俯卧位固定于鼠板上,剃除左侧股骨周围鼠毛并酒精消毒,自左大腿中部沿股骨后侧向外侧方向切开1 cm长皮肤,暴露股二头肌,钝性分离皮下组织,沿肌间隙钝性分离肌间筋膜,显露坐骨神经,用玻璃分针向坐骨神经主干方向游离,约3~4 cm。坐骨神经主干上用铬制羊肠线结扎4道间距为1 mm的正反结,结扎力度以刚好引起小腿肌肉轻微颤动且不影响坐骨神经外膜血运为宜。逐层缝合肌肉、筋骨和皮肤。术后每只大鼠肌肉注射青霉素 $8 \times 10^4$  U。

### 2.2 机械性缩足反射阈值(MWT)测定

大鼠置于底部为金属网的有机玻璃箱内,Von-Frey丝垂直刺激大鼠后肢足底5 s,刺激力量以触丝弯曲为准。采用up-down法,选择8根Von-Frey丝,标度分别为0.6、1、2、4、6、8、10和15 g,大鼠出现抬足或舔足行为则为阳性反应,记录标度。测定首先从0.6 g开始,当该力度刺激不能引起抬足或舔足行为,则给予大一级力度的刺激,测定3次取平均值。

### 2.3 热刺激缩足反射潜伏期(TWL)测定

大鼠置于底为3 mm厚的玻璃板上的有机玻璃箱内,适应环境15 min。调节刺激光源的强度为55℃,刺激大鼠后肢足底中部皮肤,同时开始计时,出现抬足、舔足、逃避等反应时读刺激仪上的时间,设置自动切断时间为25 s,测3次取平均值。

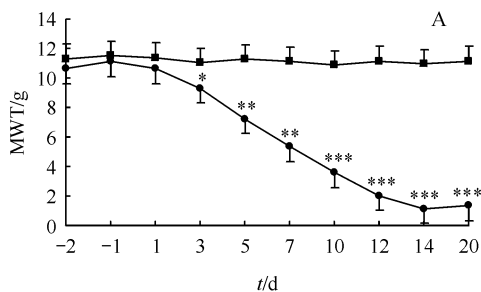
### 2.4 免疫印迹

取大鼠脊髓L4-L6段,加新鲜配置的细胞裂解液600  $\mu$ L匀浆处理3次,冰上裂解20 min;4℃,

12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 加上样缓冲液 100 ℃ 加热变性 5 min。每孔以总蛋白量 50 μg 上样, 电泳并转印到 0.22 μm PVDF 膜上。带有目标蛋白的 PVDF 膜, 室温下在 BSA: TBS (1:10) 中封闭 2 h, 4 ℃ 下分别在 p-NMDAR1, GAPDH 孵育 16 h, TBST 洗涤 10 min × 3 次, 室温下在羊抗兔 IgG 中孵育 2 h, TBST 洗涤 10 min × 3 次, 通过 ECL 显色在 BIO-RAD 凝胶成像仪下采集图像, 并在 Quantity One 软件中分析相应条带的灰度值。

## 2.5 免疫荧光

实验大鼠以 4% 多聚甲醛灌注, 取脊髓 L4-L6 段, 蔗糖溶液梯度脱水, 包埋并冰冻切片, 片厚 25 μm。PBS 洗涤 10 min × 3 次, 室温下在 PBS (含 0.3% 的 TritonX-100 + 10% 驴血清) 中封闭 2 h, 4 ℃ 下分别在 p-NMDAR1, GAPDH 孵育 19 h, PBS 洗涤 10 min × 3 次, 室温避光, 驴抗兔 IgG 中孵育 2 h, PBS 洗涤 10 min × 3 次, 贴片于载玻片上, 晾干并封片。激光共聚焦显微镜观察照相并以 Zen 软件对荧光强度进行分析。



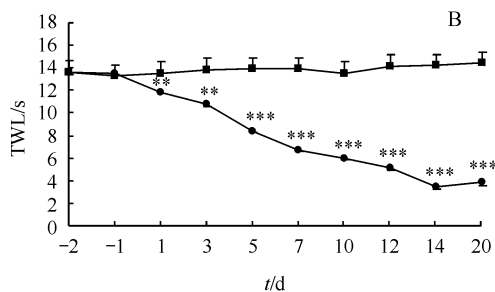
## 2.6 统计学分析

所有正态计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用 SPSS11.5 分析进行双因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 CCI 模型大鼠疼痛行为学观察

CCI 模型大鼠出现跛行、舔舐伤口、悬空、自卫、避免伤侧肢体负重等行为学改变。术前 1、2 d 和术后第 1、3、5、7、10、12、14、20 d 测量大鼠 MWT 和 TWL。在术后 3 d, 大鼠手术肢 MWT ( $P < 0.05$  vs -1 d) 和 TWL ( $P < 0.01$  vs -1 d) 均出现显著降低, 随着时间的推移降低幅度变大; 对机械和热刺激的痛敏高峰在 14 d 开始出现并持续至 20 d ( $P < 0.001$  vs -1 d); 非手术肢的 MWT 和 TWL 均保持术前正常水平, 没有显著变化 ( $P > 0.05$  vs -1 d) (图 1)。上述现象与文献报道一致, 表明 CCI 模型复制成功。



—●— Ipsilateral-CCI; —■— Ipsilateral-sham

**Figure 1** Pain behavior of rat after chronic constrictive injury (CCI) operation ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

A: Changes of mechanical withdrawal threshold (MWT) in CCI rats; B: Changes of thermal withdrawal latency (TWL) in CCI rats

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs -1 d

### 3.2 l-CDL 对 CCI 模型大鼠痛觉敏化的影响

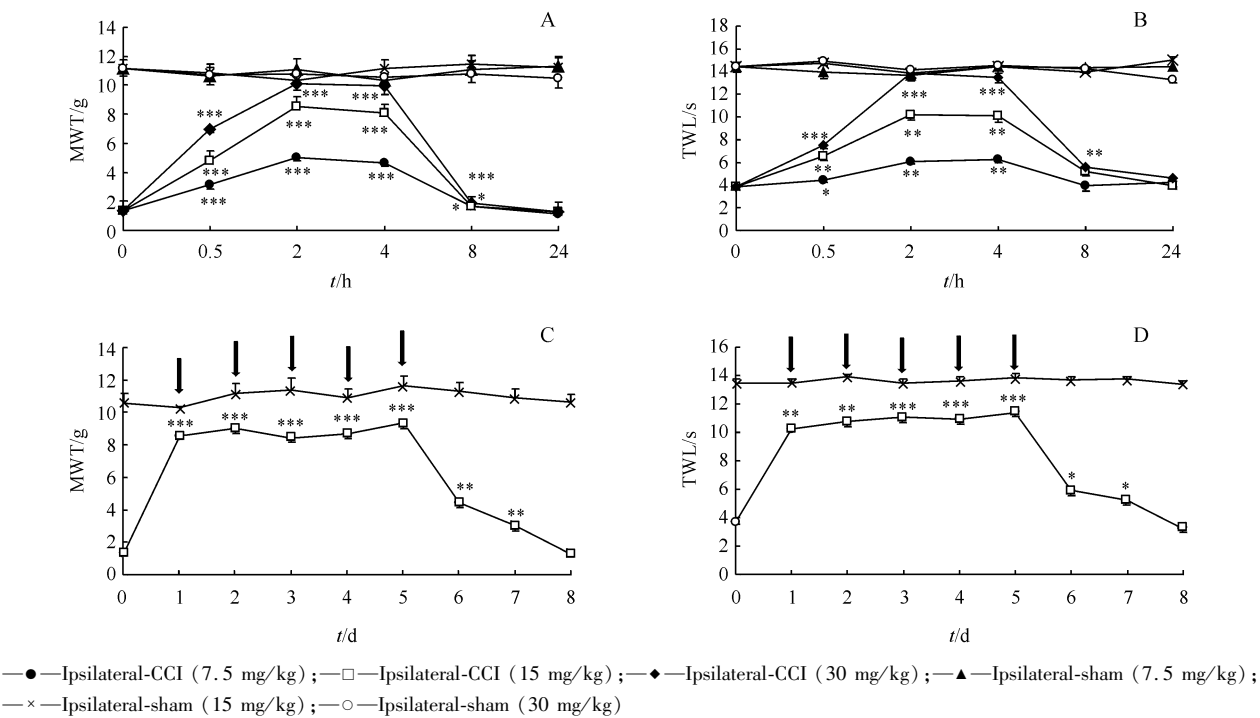
CCI 手术后第 15 d, 分别灌胃给予各组 CCI 模型大鼠 7.5, 15, 30 mg/kg (0.1 mL/100 g) 的 l-CDL, 于给药 0, 0.5, 2, 4, 8, 24 h 测定大鼠 MWT 和 TWL (图 2-A, B)。不同给药组 CCI 模型大鼠手术肢 MWT 和 TWL 均在给药后 30 min 显著增高; 给药后 2~4 h 达到最强镇痛作用, 且镇痛效果持续至给药后 8 h。其对痛觉敏化的改善作用呈剂量依赖性, 其中高剂量的 l-CDL (30 mg/kg, ig) 改善效果最为显著, 几乎完全逆转了 CCI 模型大鼠的痛觉敏化。选择中剂量组进行镇痛耐受现象炎症, CCI 模型大鼠连续 5 d 灌胃给予 15 mg/(kg·d) l-CDL, 每

次给药后 2 h 以及最后一次给药后 24, 48, 72 h 检测大鼠 MWT 和 TWL (图 2-C, D)。连续 5 d 给药过程中, l-CDL 保持对 MWT 和 TWL 良好的提升作用, 其显著镇痛活性维持 7 d; 实验过程中非手术侧的 MWT 和 TWL 没有显著变化。

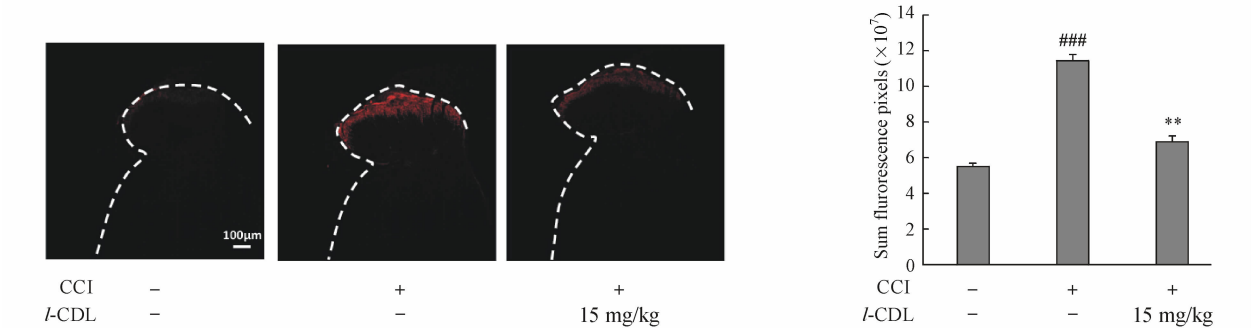
### 3.3 l-CDL 对 CCI 模型大鼠脊髓背角 CGRP 的影响

以 488 红色荧光抗体标记大鼠脊髓 L4-L6 冰冻切片中 CGRP 蛋白, 与正常组相比, CCI 神经损伤大鼠脊髓背角浅层的 CGRP 荧光强度显著增强 ( $P < 0.001$  vs sham group); 连续 5 d 灌胃给予 15 mg/kg l-CDL 能显著降低 CGRP 的荧光强度 ( $P < 0.01$  vs CCI group), 表明 l-CDL 可抑制 CCI 模

型大鼠脊髓中 CGRP 蛋白的表达。



**Figure 2** *levo*-Corydalmine (*l*-CDL) prevented the mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in CCI rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
A: Effect of single *l*-CDL administration on the MWt of CCI rats; B: Effect of single *l*-CDL administration on the TWL of CCI rats; C: Effect of multiple *l*-CDL administration on the MWt of CCI rats; D: Effect of multiple *l*-CDL administration on the TWL of CCI rats  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs 0 h (Base)



**Figure 3** *l*-CDL inhibited CCI-induced over-expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in spinal cord dorsal horn ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )  
###  $P < 0.001$  vs sham group; \*  $P < 0.01$  vs CCI group

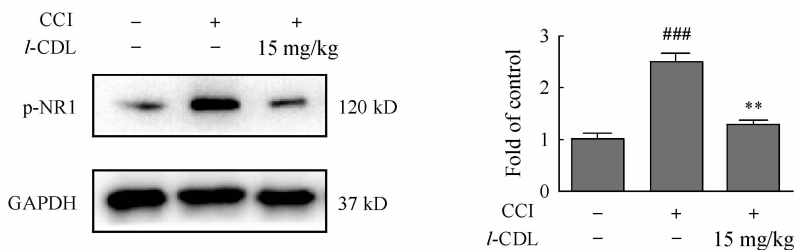
### 3.4 *l*-CDL 对 CCI 模型大鼠脊髓中磷酸化 NR1 的影响

免疫印迹检测 NR1 磷酸化水平发现, CCI 模型大鼠脊髓 L4-L6 段中磷酸化 NR1 水平显著上调 ( $P < 0.001$  vs sham group), 连续 5 d 灌胃给予 15 mg/kg *l*-CDL 能显著逆转上述变化 ( $P < 0.01$  vs CCI group), 表明 *l*-CDL 抑制 CCI 模型大鼠脊髓 NR1 磷酸化水平。

### 3.5 *l*-CDL 对 CCI 模型大鼠脊髓背角 *c-fos* 的影响

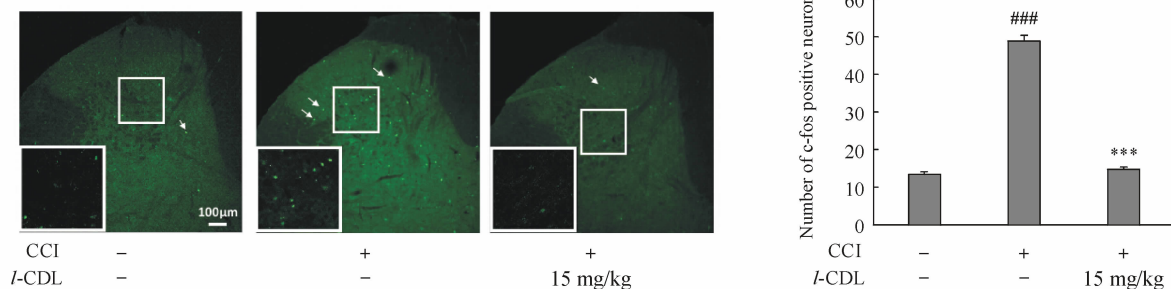
FITC 荧光抗体标记大鼠脊髓 L4-L6 切片中

*c-fos* 蛋白, 激光共聚焦显微镜观察 *c-fos* 呈圆形或椭圆形的绿色亮点, 其数目代表 *c-fos* 阳性神经元个数。按照 Rexed 脊髓分层法, 对 I-V 层 *c-fos* 阳性神经元进行计数发现, CCI 模型大鼠脊髓背角 *c-fos* 阳性神经元数目增多 ( $P < 0.001$  vs sham group), 连续 5 d 灌胃给予 15 mg/kg *l*-CDL 可显著减少 *c-fos* 阳性神经元数目 ( $P < 0.001$  vs CCI group), 表明 *l*-CDL 可抑制 CCI 模型大鼠脊髓中 *c-fos* 的表达。



**Figure 4** *l*-CDL inhibited CCI-induced increased level of p-NR1 in spinal cord ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

###  $P < 0.001$  vs sham group; \*\*  $P < 0.01$  vs CCI group



**Figure 5** *l*-CDL inhibited CCI-induced increased c-fos positive neuron in spinal cord dorsal horn ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

###  $P < 0.001$  vs sham group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs CCI group

## 4 讨论

流行病学显示,世界范围内神经病理性疼痛发生率约为 3.3% ~ 8.2%。镇痛药物市场需求巨大,但目前临床主要使用抗惊厥药、抗癫痫药和局部麻醉药等镇痛,常产生不必要的不良反应。因此,寻找治疗神经病理性疼痛的新型药物一直是该领域的研究热点。CCI 大鼠模型不仅表现出自发性疼痛、冷痛觉超敏、机械超敏、热痛过敏、机械过敏等与神经病理性疼痛患者相似的临床症状,且上述症状持续 2 月以上,因此该模型被广泛用于神经病理性疼痛的基础研究。本研究评价了 *l*-CDL 对 CCI 诱导的大鼠慢性神经病理性疼痛的镇痛作用,并探索其可能的作用机制。研究结果表明,*l*-CDL 对 CCI 模型大鼠机械超敏和热痛过敏有良好的抑制作用,并呈现一定剂量依赖性;连续给予 *l*-CDL,则保持对 CCI 模型大鼠的高效镇痛活性,无耐受现象且干扰正常生理性痛阈值。此外,*l*-CDL 能显著抑制 CCI 模型大鼠脊髓中 CGRP 的表达、降低 NR1 磷酸化水平、减少 *c-fos* 阳性神经元数目。

脊髓是疼痛信息传递和整合的初级中枢,脊髓部位的神经元敏化直接通过易化疼痛信号到大脑的传递途径而产生临床痛觉敏化的现象。因此,抑

制脊髓中枢敏化是治疗神经病理性疼痛的重要策略之一。脊髓 NMDA 受体活化,开放离子通道使大量  $\text{Ca}^{2+}$  内流,细胞内钙超载引发一系列下游的生化级联反应,最终导致脊髓中枢敏化<sup>[5]</sup>。NMDA 受体功能性亚基 NR1 磷酸化则是判断 NMDA 受体被激活的重要标志<sup>[6]</sup>,研究表明,在神经病理性疼痛的动物中,大鼠脊髓背角神经元中 p-NR1 含量显著增加<sup>[7-8]</sup>,抑制 NR1 磷酸化水平,可治疗大鼠神经病理性疼痛<sup>[9]</sup>。当外周神经损伤时,背根神经节中感觉神经元合成的 CGRP 增加并在脊髓背角浅层大量释放<sup>[10-12]</sup>,与 SP、ATP 等神经递质一同诱导出缓慢的兴奋性突触后电位,继而去除 NMDA 受体上的电压依赖性  $\text{Mg}^{2+}$  的阻断作用,活化 NMDA 受体<sup>[2]</sup>。给予 CGRP 拮抗剂 MK-8825 可明显缓解大鼠神经病理疼痛<sup>[13]</sup>,表明抑制 CGRP 可缓解中枢敏化现象。不同类型的伤害性刺激(如热、机械和化学等)均能诱导 *c-fos* 在脊髓中的表达,*c-fos* 的表达可作为神经元激活的标志<sup>[14-15]</sup>。神经元内 *c-fos* 的表达原因主要与细胞内钙超载相关,NMDA 受体活化后, $\text{Ca}^{2+}$  大量内流与钙调素结合,导致 *c-fos* 基因转录和表达被触发<sup>[16]</sup>。阻断 NMDA 受体可抑制多种刺激诱发的 *c-fos* 表达。本研究结果显示 *l*-CDL 对 CCI 模型大鼠脊髓中 p-

NR1, CGRP, *c-fos* 的高表达均有显著的抑制作用,表明 *l*-CDL 可能通过抑制 CGRP 的表达来调控 NMDA 受体活性,导致其下游效应子 *c-fos* 表达水平下调,抑制伤害性刺激的传递途径,从而抑制脊髓中枢敏化,其具体的作用靶点还有待进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications[J]. *BMJ*, 2014, **348**(3):17656.
- [2] Huang Y, Kang ZY, Zhang GQ. Effect of honokiol on TTX-S sodium current in mouse dorsal root ganglion neurons[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2016, **47**(5):609–613.
- [3] Toda K. Central sensitization pain should be included in (central) neuropathic pain[J]. *Pain Physician*, 2014, **17**(6):E783.
- [4] 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.
- [5] Havelin J, Imbert I, Cormier J, et al. Central sensitization and neuropathic features of ongoing pain in a rat model of advanced osteoarthritis[J]. *Pain*, 2016, **17**(3):374–382.
- [6] Da Silva LF, Walder RY, Davidson BL, et al. Changes in expression of NMDA-NR1 receptor subunits in the rostral ventromedial medulla modulate pain behaviors[J]. *Pain*, 2010, **151**(1):155–161.
- [7] Yan X, Jiang E, Gao M, et al. Endogenous activation of presynaptic NMDA receptors enhances glutamate release from the primary afferents in the spinal dorsal horn in a rat model of neuropathic pain[J]. *J Physiol*, 2013, **591**(7):2001–2019.
- [8] Pu S, Xu Y, Du D, et al. Minocycline attenuates mechanical allodynia and expression of spinal NMDA receptor 1 subunit in rat neuropathic pain model[J]. *J Physiol Biochem*, 2013, **69**(3):349–357.
- [9] Kang SY, Roh DH, Yoon SY, et al. Repetitive treatment with diluted bee venom reduces neuropathic pain via potentiation of locus coeruleus noradrenergic neuronal activity and modulation of spinal NR1 phosphorylation in rats[J]. *Pain*, 2012, **13**(2):155–166.
- [10] Nitzan-Luques A, Minert A, Devor M, et al. Dynamic genotype-selective “phenotypic switching” of CGRP expression contributes to differential neuropathic pain phenotype[J]. *Exp Neurol*, 2013, **250**:194–204.
- [11] Wang Y, Guo Q, Wang M, et al. Effect of intrathecal sufentanil and protein kinase C inhibitor on pain threshold and the expression of NMDA receptor/CGRP in spinal dorsal horn in rats with neuropathic pain[J]. *J Central South Univ(Med Sci)*(中南大学学报 医学版), 2012, **37**(8):783–789.
- [12] Yu D, Liu F, Liu M, et al. The inhibition of subchondral bone lesions significantly reversed the weight-bearing deficit and the overexpression of CGRP in DRG neurons, GFAP and Iba-1 in the spinal dorsal horn in the monosodium iodoacetate induced model of osteoarthritis pain[J]. *PLoS ONE*, 2013, **8**(10):e77824.
- [13] Romero-Reyes M, Pardi V, Akerman S. A potent and selective calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist, MK-8825, inhibits responses to nociceptive trigeminal activation: Role of CGRP in orofacial pain[J]. *Exp Neurol*, 2015, **271**:95–103.
- [14] Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rubio-Beltrán E, et al. Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation enhances c-Fos expression in spinal and supraspinal structures related to pain modulation[J]. *Neurosci Res*, 2015, **98**:59–63.
- [15] Liu YJ, Song GH, Zhang C, et al. Prostatic inflammation-induced chronic pelvic pain: roles of substance P and c-fos in the spinal cord[J]. *Natl J Androl*(中华男科学杂志), 2015, **21**(8):681–686.
- [16] Inta I, Domonkos E, Pfeiffer N, et al. Puberty marks major changes in the hippocampal and cortical c-Fos activation pattern induced by NMDA receptor antagonists[J]. *Neuropharmacology*, 2016, **112**(Pt A):181–187.