

治伤巴布剂的镇痛作用及对大鼠炎性疼痛模型背根神经节 Nav1.7 表达的影响*

李 前¹, 邵先舫^{1**}, 刘志军¹, 陈绍军¹, 贺渊哲², 严 望¹, 王 波²

(1. 湖南中医药大学附属常德医院 常德 410005; 2. 湖南中医药大学研究生院 长沙 410007)

摘 要:目的:研究治伤巴布剂对大鼠炎性疼痛是否有镇痛作用,探讨治伤巴布剂对福尔马林足底炎性疼痛大鼠模型背根神经节中 Nav1.7 水平的影响。方法:SD 大鼠 36 只,随机分为 3 组,即空白对照组、模型组、治疗组,每组 12 只,空白对照组大鼠不予任何处理,模型组左后足底注射 5%福尔马林 0.1 mL,治疗组大鼠造模前 1 天于左后足外敷治伤巴布剂,后左后足底注射 5%福尔马林 0.1 mL,观察造模后大鼠疼痛行为学反应,并以 Dubuisson 评分方法进行记录比较。各组大鼠在指定时间点取出 L3-6 节段背根神经节,运用实时荧光定量、蛋白质印迹检测 Nav1.7 在大鼠背根神经节中的表达水平。结果:治疗组大鼠疼痛反应积分低于模型组 ($P<0.05$);实时荧光定量结果示,模型组 Nav1.7mRNA 相对表达量大于治疗组,治疗组 Nav1.7mRNA 相对表达量大于空白组,3 组组间比较差异显著 ($P<0.05$),3 组组内 3 个时相点的相对表达量差异均无统计学意义;蛋白质印迹法灰度扫描示模型组 Nav1.7 相对表达量大于治疗组,治疗组 Nav1.7 相对表达量大于空白组,3 组组间比较差异显著 ($P<0.05$),3 组组内 3 个时相点的相对表达量差异均无统计学意义。结论:治伤巴布剂能缓解大鼠炎性疼痛反应,对大鼠炎性疼痛具有一定的镇痛作用,并对福尔马林足底炎性疼痛大鼠模型背根神经节中 Nav1.7 的表达水平有影响。

关键词: 治伤巴布剂 福尔马林炎性疼痛 Nav1.7 背根神经节

doi: 10.11842/wst.2013.08.021 中图分类号:R285.5 文献标识码:A

治伤巴布剂是由湖南中医药大学常德医院老中医祖传外用秘方“治伤散”改良剂型而来,主要由血壳、虎杖、见风消等中草药组成,具有活血祛瘀,通络止痛之功,临床将其外敷于局部治疗软组织损伤、关节扭伤、肩周炎、膝骨性关节炎、腰椎间盘突出症等疾病导致的疼痛。为了进一步评价其镇痛作用,探讨其可能的镇痛机理,我们进行了治伤巴布剂镇痛的实验研究。本实验从观察治伤巴布剂对福尔马林足底炎性疼痛大鼠模型^[1,2]疼痛行为学反应

的角度,论述治伤巴布剂的镇痛作用,并利用实时荧光定量(RT-PCR)和 Western blotting 方法观察治伤巴布剂对福尔马林足底炎性疼痛大鼠模型背根神经节中 Nav1.7 水平的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

健康雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 250~280 g,购于湖南中医药大学实验动物中心,动物许可证号:SYXK(湘):2009-0001。动物一般状态良好,皮毛光

收稿日期:2013-09-30

修回日期:2013-11-05

* 湖南常德科技局科研项目(2011sk13):治伤巴布剂干预大鼠背根神经节钠通道 Nav1.7 表达研究,负责人:邵先舫。

** 通讯作者:邵先舫,主任医师,教授,主要研究方向:骨伤科临床及科研。

泽,进食与活动正常。适应性喂养 5 天后进行实验。

1.1.2 试剂与仪器

治伤巴布剂(由常德市第一中医院提供),一抗(Anti-Nav1.7 antibody, mAbcam62758, ab62758),二抗[HRP-labeled Goat Anti-Mouse IgG (H+L)] Nav1.7 的扩增引物上游:5'-CTTTGCAGCTGCCCTGGA-3',引物下游:5'-CATGGCAATGAGCTGGACTTT-3'; actin 的扩增引物上游:5'-GTACCACTGGCATCGT-GATGGACT-3',引物下游:5'-CCGCTCATTGC-CAATGGTGAT-3'。垂直电泳仪(北京六一仪器厂 DYCZ-24DN 型),湿式转膜装置(北京六一仪器厂 DYCZ-40D 型)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

SD 雄性大鼠 36 只,随机分为 3 组,即空白对照组、治疗组、模型组,每组 12 只。

1.2.2 造模

在治疗组外敷治伤巴布剂 1 天后,轻柔地限制动物,用微量注射器抽取 5% 福尔马林 0.1 mL^[3] 注入治疗组及模型组大鼠左侧后足底皮下,空白对照组不予任何处理。操作完毕,立即将动物置于干净塑料箱内,与箱底成 45℃ 夹角放置一面镜子以便观察动物后肢的活动情况。

1.2.3 痛行为观察及分级评价

于注射福尔马林后 1、5、15、30、45、60、90、120 min 分别观察每只大鼠的疼痛反应^[4,5],并以 Dubuis-son^[6] 评分方法进行记录比较。0 分:注射福尔马林一侧后足与对侧后足均接触底面,行走自如;1 分:两侧后足均接触底面,但行走时注射侧轻微跛行;2 分:两侧后足均接触底面,但身体重心在健侧,行走时注射侧明显跛行;3 分:注射侧后足轻微接触底面,但不敢负重,行走时抬起;4 分:注射福尔马林一侧后足抬起,不接触任何表面;5 分:大鼠舔、咬、抖动注射福尔马林一侧后足。

1.2.4 样本采集

各组大鼠于造模后 24、48、72 h 3 个时相点腹腔注射水合氯醛麻醉,解剖暴露大鼠脊柱,定位 L3-6 椎体^[7,8],取出定位节段,纵向打开椎管,暴露背根神经节,依次取出,置入 2 mL 冻存管中,迅速保存于液氮中,后转入 -80℃ 冰箱中备用。

1.2.5 实时荧光定量(RT-PCR)检测

采用 RT-PCR 方法对背根神经节中 Nav1.7

mRNA 表达水平进行检测。常规提取背根神经节中总 RNA,并进行琼脂糖凝胶电泳检测提取质量以及紫外分光光度仪测定 RNA 浓度及样本 A_{260} 与 A_{280} 比值,逆转录成 cDNA 后采用 ABI 7500 Real time PCR 仪进行 PCR 扩增,本实验内参选用 β -actin,实验结果以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示,得出 $(\bar{x} \pm s)$ 进行统计分析。

1.2.6 蛋白质印迹(Western blot)检测

采用 Western blot 方法对背根神经节中 Nav1.7 表达水平进行检查。常规提取背根神经节中总蛋白,用 BCA 蛋白定量检查试剂盒检测蛋白含量,电泳分离目标蛋白,按阴极-吸水纸-滤纸-凝胶-硝酸纤维素膜(NC)膜-滤纸-吸水纸-阳极的顺序将凝胶装配于转移装置上,用 5% 脱脂奶粉溶液封闭,孵育一抗及二抗经 ECL 发光液显影,将显影后所得条带扫描并保存为电脑文件,用 Image J 图像分析软件对条带的灰度值进行分析。

1.2.7 统计分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, t 检验方法进行统计学分析。

2 结果

2.1 治伤巴布剂的镇痛作用

致痛后不同时间点各组疼痛分级评分情况见图 1。模型组及治疗组大鼠左侧后肢足底皮下注射 5% 福尔马林 0.1 mL 后呈典型的双相伤害性行为反应,出现躁动不安、不时尖叫、注射足抬起不着地、舔咬或抖动注射足等反应,治疗组大鼠疼痛反应积分低于模型组 ($P < 0.05$),治伤巴布剂能缓解

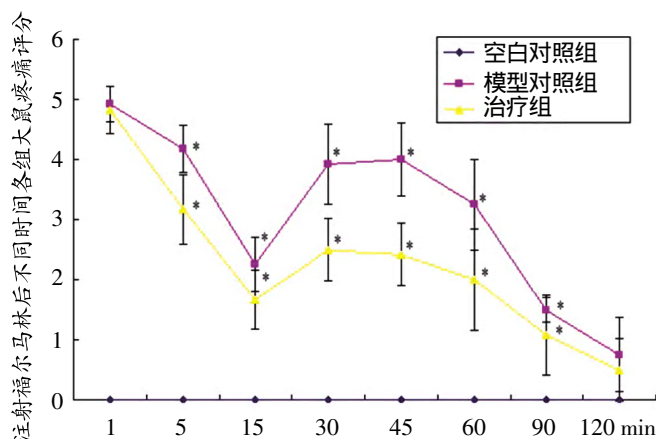


图 1 各组疼痛积分趋势图

大鼠炎性疼痛反应,对大鼠炎性疼痛具有一定的镇痛作用。

2.2 实时荧光定量(RT-PCR)检测结果

模型组、治疗组、空白对照组 3 组组间 Nav1.7 mRNA 表达量及 3 组组内 24、48、72 h Nav1.7 mRNA 表达量结果见图 2。模型组 Nav1.7 mRNA 相对表达量大于治疗组,治疗组 Nav1.7 mRNA 相对表达量大于空白组,3 组组间比较差异显著 ($P < 0.05$),3 组组内 3 个时相点的相对表达量差异均无统计学意义。

2.3 蛋白质印迹(Western blot)检测结果

模型组、治疗组、空白对照组 3 组组间及 3 组组内 24、48、72 h 每个时相点随机取 3 个样本进行蛋白质印迹检测,其 Nav1.7 表达量条带灰度分析结果示,模型组 Nav1.7 相对表达量大于

治疗组,治疗组 Nav1.7 相对表达量大于空白组,3 组组间比较差异显著 ($P < 0.05$),3 组组内 3 个时相点的相对表达量差异均无统计学意义。结果见图 3。

3 讨论

本实验通过建立福尔马林足底炎性疼痛大鼠模型,并通过观察治伤巴布剂干预模型后其疼痛行为学反应的变化,证实了治伤巴布剂能缓解大鼠炎性疼痛反应,对大鼠炎性疼痛具有一定的镇痛作用。

Nav1.7 作为电压门控性钠离子通道的一个亚型,广泛的分布于脊髓背根神经节、交感神经元、施万细胞和神经内分泌细胞的细胞膜上,对于细胞膜兴奋性的维持及其传导起重要作用。近年来研究表明 Nav1.7 与炎性疼痛、神经病理性疼痛及癌性痛有密切的联系^[9,10],并参与疼痛信号传导,在疼痛发生机制中扮演重要角色。

本实验通过采用蛋白质印迹及实时荧光定量观察治伤巴布剂干预后对大鼠炎性疼痛模型背根神经节 Nav1.7 表达的影响,表明了治伤巴布剂可减少大鼠炎性疼痛模型背根神经节 Nav1.7 表达,但因模型组、治疗组及空白组内 3 个时相点表达量差异不大,故尚不能厘清治伤巴布剂影响大鼠炎性疼痛模型背根神经节 Nav1.7 表达量与用药时间长短有何关联,分析组内无明显差异,其原因可能有两点:一是可能与动物实验过程中巴布剂外敷偶有脱落,且发现不及时有关;二是选择时相点的跨度不到,不足以表明其表达量的发展趋势,通过增加时相点可能发现经过干预时间的增加,在某些时间段可能出现表达量的差异,因此,要明确治伤巴布剂的镇痛机制是否与干预 Nav1.7 表达有关,尚需进一步增加时相

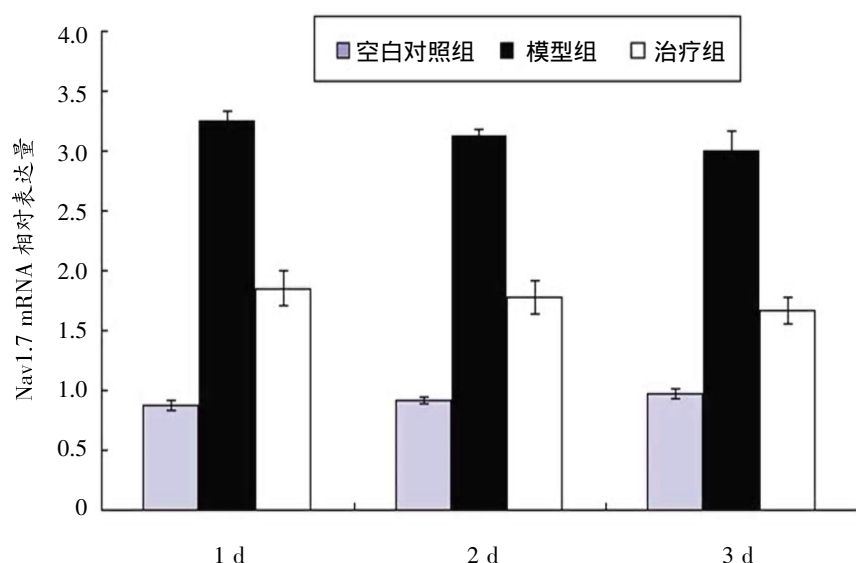


图2 不同时相点 Nav1.7mRNA 在各组大鼠背根神经节中的表达

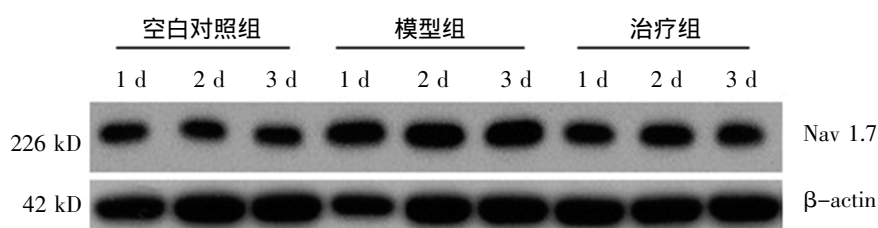


图3 Nav1.7 在各组大鼠背根神经节中的表达

点,且减少诸如巴布剂脱落等干扰因数,探明随着巴布剂的干预时间的增加,Nav1.7的表达量是否也有明确的变化趋势,来证实治伤巴布剂的镇痛作用机制可能与减少Nav1.7的表达量相关。

参考文献

- Dubuisson D, Dennis S G. The formalin test, a quantitative study of the analgesic effect of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. *Pain*, 1977, 4(2):161~174
- Hunskar S, Fasmer O B, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*, 1985, 14(1):69~76.
- Fertleman C R, Baker M D, Parker K A, et al. SCN9A mutations in paroxysmal extreme pain disorder: Allelic variants underlie distinct channel defects and phenotypes. *Neuron*, 2006, 52 (5):767~747.
- Ahmad S, Dahllund L, Eriksson A B, et al. A stop codon mutation in SCN9A causes lack of pain sensation. *Hum Mol Genet*, 2007, 16 (17):2114~2121.
- Black J A, Liu S, Tanaka M, et al. Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, 2004,108(3):237~247.
- Clavelou P, Dalle R, Orliaguet T, et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. *Pain*, 1995, 62(3):295~301.
- 杨安峰,王平.大鼠的解剖和组织.北京:科学出版社,1985:159~189.
- Kim W Y, Horbinski C, Sigurdson W, et al. Proteasome inhibitors suppress formation of polyglutamine induced nuclear inclusions in cultured postmitotic neurons. *J Neurochem*, 2004, 91(5):1044~1056.
- Nassar M A, Stirling L C, Forlani G, et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,101(34):12706~12711.
- Khasabov S G, Hamamoto D T, Harding-Rose C, et al. Tumor-evoked hyperalgesia and sensitization of nociceptive dorsal horn neurons in a murine model of cancer pain. *Brain Res*, 2007,1180:7~19.

Effect of Curing-injury Cataplasma on Analgesia and Expression of Nav1.7 in Model Rats with Formaldehyde-induced Inflammatory Pain

Li Qian¹, Shao Xianfang¹, Liu Zhijun¹, Chen Shaojun¹, He Yuanzhe², Yan Wang¹, Wang Bo²

(1. Changde Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changde 410005, China;

2. Graduate School, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

Abstract: This study was aimed to observe the analgesia of curing-injury Cataplasma and discuss the Nav1.7 expression in dorsal root ganglion(DRG) in model rats with formaldehyde-induced inflammatory pain. A total of 36 Sprague-Dawley rats were divided into three groups, which were the blank control group (n = 12), model group (n = 12), and treatment group (n = 12). The blank control group was without any treatment. The model group was injected with 0.1 mL 5% saline formalin on the left rear foot. The treatment group was applied with curing-injury Cataplasma on the left rear foot 24 h before the injection of 0.1 mL 5% saline formalin in the establishment of animal model. The behavior reactions to pain of model rats were observed. Dubuisson score was recorded and compared. Meanwhile, L3-6 DRG was collected from rats in each group. The expression of Nav1.7 was detected by real-time quantitative PCR and western blot. The results showed that the pain reaction integral in the treatment group was lower than the model group ($P < 0.05$). Results from the real-time quantitative PCR showed that the relative expression of Nav1.7 mRNA in the model group was more than the treatment group. And the relative expression of Nav1.7 mRNA in the treatment group was more than the blank control group. There was significant difference among three groups ($P < 0.05$). There was no statistical difference at the three time points within three groups. Results from the western blot showed that the relative expression of Nav1.7 in the model group was more than the treatment group. And the expression of Nav1.7 in

the treatment group was more than the blank control group. There was significant difference among three groups ($P < 0.05$). There was no statistical difference at the three time points within three groups. It was concluded that the curing-injury Cataplasma can alleviate inflammatory pain response in rats, and have certain analgesia effect. Meanwhile, it can influence Nav1.7 expression in DRG in model rats with formaldehyde-induced inflammatory pain.

Keywords: Curing-injury Cataplasma, formalin inflammatory pain, Nav1.7, dorsal root ganglion

(责任编辑 李沙沙 张志华, 责任译审 王 晶)