

氧化苦参碱镇痛作用与钙离子通道相关性的研究

吴世星 杨 丽 吕晓强

摘要 **目的** 研究氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)镇痛作用是否与电压门控钙离子通道(voltage-gated calcium channels, VGCCs) N-型有关。**方法** 45 只小鼠按随机数字表法分为假手术组、部分坐骨神经结扎(partial sciatic nerve ligation, PSNL)疼痛模型组(模型组)和 OMT 给药组, 每组 15 只。采用结扎部分坐骨神经的方法建立部分坐骨神经结扎疼痛模型。分离小鼠背根神经节(dorsal root ganglia, DRG), 培养 DRG 神经元细胞。利用 Fluo-3 荧光探针检测各组 DRG 细胞内钙离子浓度的变化; 采用 Western blot 免疫印迹技术检测小鼠大脑及 DRG 组织中电压门控钙离子通道的 N-型(Cav2.2)和 L-型(Cav1.3)蛋白水平表达的差异。**结果** 与假手术组比较, 模型组 DRG 神经元细胞内钙离子浓度升高($P < 0.05$), 大脑组织中 Cav2.2 蛋白表达量升高($P < 0.05$), DRG 组织中 Cav2.2 蛋白表达量降低($P < 0.01$); 与模型组比较, OMT 给药组 DRG 神经元细胞内钙离子浓度降低($P < 0.05$), 大脑组织中 Cav2.2 蛋白表达量降低($P < 0.01$), DRG 组织中 Cav2.2 蛋白表达量升高($P < 0.01$)。而各组间大脑和 DRG 组织中 Cav1.3 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** OMT 的镇痛机制可能与 Cav2.2 通道介导的钙离子流动有关。

关键词 氧化苦参碱; 镇痛; 钙离子; 电压门控钙离子通道

Study on Analgesia of Oxymatrine and Its Relation to Calcium Channels WU Shi-xing, YANG Li, and LU Xiao-qiang Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera Theory and Applications, Ministry of Education of China (Province-Ministry Co-construct), Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110847), China

ABSTRACT **Objective** To study whether the analgesis of oxymatrine (OMT) affects N-type voltage-gated calcium channels (VGCCs). **Methods** Totally 45 mice were randomly divided into the sham-operation group, the model group [established by partial sciatic nerve ligation (PSNL)], and the OMT treatment group according to random digit table, 15 in each group. The dorsal root ganglions (DRG) were separated in PSNL pain model mice. Intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was determined with Fluo-3 AM immunofluorescent probe in cultured DRG neurons. Different protein expression levels of N-type (Cav2.2) and L-type (Cav1.3) among VGCCs from brain and DRG tissues were detected with Western blot. **Results** Compared with the sham-operation group, $[Ca^{2+}]_i$ increased in cultured DRG neurons ($P < 0.05$), protein expression levels of Cav2.2 in the brain tissue increased ($P < 0.05$), protein expression levels of Cav2.2 in DRG tissues decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, $[Ca^{2+}]_i$ decreased in cultured DRG neurons ($P < 0.05$), protein expression levels of Cav2.2 in the brain tissue decreased ($P < 0.01$), protein expression levels of Cav2.2 in DRG tissues increased in the OMT treatment group ($P < 0.01$). There was no statistical difference in Cav1.3 expressions in cultured DRG neurons and the brain ($P > 0.05$). **Conclusion** Analgesic effect of OMT might be related to Cav2.2 channel mediated calcium ion flux.

KEYWORDS oxymatrine; analgesia; Ca^{2+} ; voltage-gated calcium channels

基金项目: 国家自然科学基金(青年科学基金)资助项目(No. 81102901); 留学回国人员科研启动基金(教外司留[2012] 940 号); 辽宁省自然科学基金资助项目(No. 201102151)

作者单位: 辽宁中医药大学基础医学院药理教研室, 辽宁中医药大学省部共建中医脏象理论及应用教育部重点实验室(沈阳 110847)

通讯作者: 杨 丽, Tel: 024-31207194, E-mail: yanglidyo@hotmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.04.0461

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)为豆科槐属植物苦参中的有效生物碱成分之一。近年来研究表明,氧化苦参碱对于化学刺激、物理性热刺激、炎性、神经性、肿瘤转移性疼痛等方面具有明显的镇痛作用^[1-9]。疼痛信号处理从激活外周伤害性感受器开始,引起动作电位沿着初级传入神经纤维进入背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)的感觉神经元。进而引起膜去极化,激活电压门控钙离子通道(voltage-gated calcium channels, VGCCs),引起钙离子的内流促发突触囊泡胞裂外排释放神经递质,包括谷氨酸、多肽类如 P 物质和降钙素基因相关肽(CGRP)等^[10]。VGCCs 介导的疼痛信号传递是当前疼痛治疗研究的热点之一。利用药理学工具药阻断钙离子通道的研究中发现,电压门控钙离子通道的 N-型(Cav2.2)阻断剂可以明显改变疼痛行为^[11],因此 Cav2.2 也成为疼痛治疗研究的靶点^[12]。其中,Cav2.2 三种拮抗剂加巴喷丁、普瑞巴林和齐考诺肽已经被美国食品药品监督管理局批准用于治疗慢性疼痛^[13]。

本研究利用部分坐骨神经结扎(partial sciatic nerve ligation, PSNL)小鼠疼痛模型,考察 OMT 对 PSNL 小鼠大脑和 DRG 中 Cav2.2 和电压门控钙离子通道的 L-型(Cav1.3)蛋白水平表达的影响,及 OMT 在 DRG 神经元内钙离子浓度的变化中的作用,进而探讨 OMT 镇痛作用与钙离子的相关性。

材料与方法

1 动物 45 只 C57BL/6 小鼠,SPF 级,体重(20~25)g,雄鼠 24 只,雌鼠 21 只,购于辽宁长生生物技术有限公司,所有动物实验均按照辽宁中医药大学实验动物管理条例施行,合格证号:SCXK(辽)2010-0001。

2 药物 OMT(纯度 99.2%,陕西森弗生物技术,批号:SF110806)。

3 主要试剂及仪器 乙醚(分析纯,天津市凯信化学工业,批号:20140519);氯化钠(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);甲醇(分析纯,天津市大茂化学试剂厂,批号:20140114);Cav2.2 抗体(美国 MIL-LIPORE);Cav1.3 抗体(北京博奥森);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物);胶原酶、脱氧核糖核酸酶 I(北京鼎国昌盛);中性蛋白酶(北京奥博星);多聚鸟氨酸(Sigma, Poole, UK);胎牛血清(GIBCO);DMEM/F12(Hyclon);lonomycin(Sigma);Fluo-3 AM(碧云天生物技术有限公司)。Beckman 超速离心机(Beckman Optima L-

100xp);凯元公司(CAVOY)的电泳设备一套(Mini P-4 型);激光扫描共聚焦显微镜(德国徕卡公司,Leica Tcs Sp5)。

4 动物分组、模型制备及给药方法 将 45 只小鼠按随机数字表方法完全随机分为假手术组、模型组、氧化苦参碱给药组,每组 15 只。参照文献[5,14],建立坐骨神经结扎疼痛模型。将模型组和 OMT 给药组小鼠麻醉后,从左(右)股骨中部作纵向切口,剥离股二头肌,暴露坐骨神经,用带 5.0 的硅处理线的 1/2 弧度反向切头的细针结扎神经背端的 1/2~2/3 处后复位,缝合皮肤,分笼饲养并连续观察 7 天。通过检测造模前后小鼠后足的机械缩足反应阈值明显降低,说明成功建立部分坐骨神经结扎疼痛模型^[5]。假手术组操作与 PSNL 组相同,但不结扎坐骨神经。各组小鼠均造模成功。建模后第 7 天,OMT 给药组小鼠腹腔注射 150 mg/kg OMT^[5]。假手术组与模型组腹腔注射等剂量的 0.9%氯化钠溶液。各组均给药 3 h 后处死。

5 原代 DRG 神经元培养 参照文献[15]。将各处理组小鼠断颈猝死,分离小鼠背根神经节,加入消化酶(2 mg/mL 胶原酶、1 000 u/mL 脱氧核糖核酸酶 I、5 mg/mL 中性蛋白酶 3 种酶,各加 200 μ L),37 $^{\circ}$ C 消化 10~12 min,期间偶尔吹打分散组织细胞。然后加入 5 mL 含血清的培养液停止消化,静置 2 min,取上清,室温离心(1 000 r/min,6 min)。弃上清,吹打分散清洗含细胞的沉淀部分使其悬浊,离心(1 000 r/min,6 min),重复以上操作 3 次。将细胞分散于培养液(10% 胎牛血清,2 mmol/L 谷氨酰胺,0.6% 葡萄糖,100 unit/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素于 DMEM/F12 中),播种在多聚鸟氨酸包被的激光共聚焦皿中,培养(37 $^{\circ}$ C,5%CO₂)数日待用。

6 观察指标及检测方法

6.1 DRG 神经元内钙离子浓度 在 0~200 μ g/mL 范围内 OMT 通过抑制巨噬细胞活性而抗炎的作用随药物浓度增加而增强^[16]。本研究通过初探量效关系,确定 100 μ g/mL 的 OMT 对 DRG 细胞无损伤且有良好药效。选取培养成熟的 DRG 神经细胞,给予 100 μ g/mL 的 OMT,孵育 2 h,弃去培养液,用 PBS 清洗两遍,在避光条件下加入终浓度为 5 μ mol/L 的 Fluo-3 AM 和 D-Hank's (无钙离子)混合液,每个共聚焦皿加入 200 μ L,放入 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中孵育 45 min,使得染料均匀进入细胞内。待染色结束后,洗去多余的染料,加入含 2% 钙离子和 0.1% 葡萄糖的台氏液,测定 F 值。加入终浓度为

5 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ionomycin, 测定 F_{max} 。最后加入终浓度为 2 mmol/L 的 MnCl_2 , 测定 F_{min} , 实验重复 8 次。通过如下公式^[17] 计算细胞内 Ca^{2+} 浓度:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [(F - F_{\text{min}})/(F_{\text{max}} - F)], K_d$$
 (450 nmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$) 为荧光探针的解离常数。

6.2 不同组织中 Cav2.2 及 Cav1.3 蛋白表达水平 采用 Western blot 检测法。取组织放入玻璃匀浆器中, 加适量组织匀浆缓冲液 [20 mmol/L HEPES/KOH (pH 7.5), 2 mmol/L EDTA/Tris (pH 7.5), 10 000 $\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶抑制剂, 1 mmol/L PMSF, 4 mg/mL 亮抑酶肽] 研磨组织, 研磨后转移到 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 (1 700 r/min, 15 min), 取上清液于快封管中高速离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 20 000 r/min, 60 min), 取下层沉淀, 加适量缓冲液 [(50 mmol/L HEPES/KOH (pH 7.5), 2 mmol/L EDTA/Tris (pH 7.5), 10 000 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin, 1 mmol/L PMSF, 4 mg/mL Leupeptin] 悬浮。以 BCA 法测定蛋白浓度。制备 8% 的分离胶, 蛋白上样量为 30 μg , 电泳, 湿法转膜至孔径 0.2 μm 的 PVDF 膜。将转印后的 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加一次抗体孵化 (Cav2.2 浓度为 1:400, Cav1.3 浓度为 1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 TBS/T 洗膜, 10 min/次, 二抗 (1:4 000) 室温孵化 1 h 后, 用 TBS/T 洗膜, 5 min/次, 30 min, 再用 TBS 洗 5 min, 最后加 ECL 发光液, 曝光于 X 光胶片。实验重复 3 次, 条带灰度用 Image J2x 软件分析。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 DRG 神经元内钙离子浓度比较 (表 1, 图 1) Fluo-3 探针在细胞内能与游离的钙离子结合产生绿色荧光。细胞内游离钙离子浓度越高, 与 Fluo-3 结合的就越多, 产生的荧光越强。与假手术组比较, 模型组钙离子浓度升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, OMT 给药组钙离子浓度降低 ($P < 0.05$)。

表 1 各组 DRG 神经元内钙离子浓度比较 (nmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	钙离子浓度
假手术	8	325.271 $\pm$ 47.146
模型	8	556.589 $\pm$ 90.837 *
OMT 给药	8	316.779 $\pm$ 35.468 Δ

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

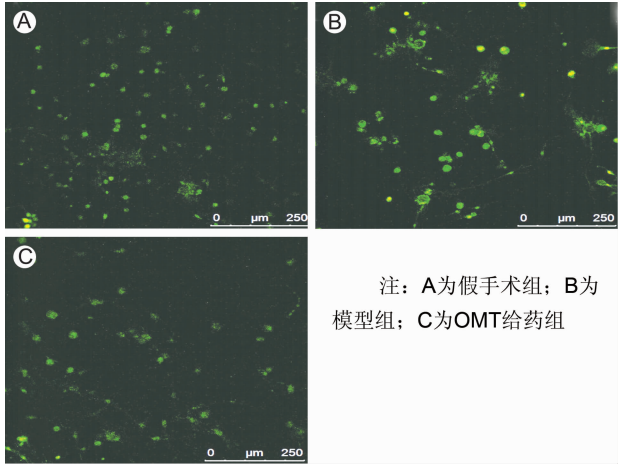


图 1 各组 DRG 神经元内 Fluo-3- Ca^{2+} 的荧光图

2 各组不同组织中 Cav2.2 及 Cav1.3 蛋白表达水平比较 (表 2, 图 2) 与假手术组比较, 模型组脑组织中 Cav2.2 表达水平增高 ($P < 0.05$), 而 DRG 组织中 Cav2.2 表达水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, OMT 给药组脑组织中 Cav2.2 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), 而 DRG 组织中 Cav2.2 蛋白的表达水平升高 ($P < 0.01$)。各组间比较, 脑组织和 DRG 组织中 Cav1.3 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

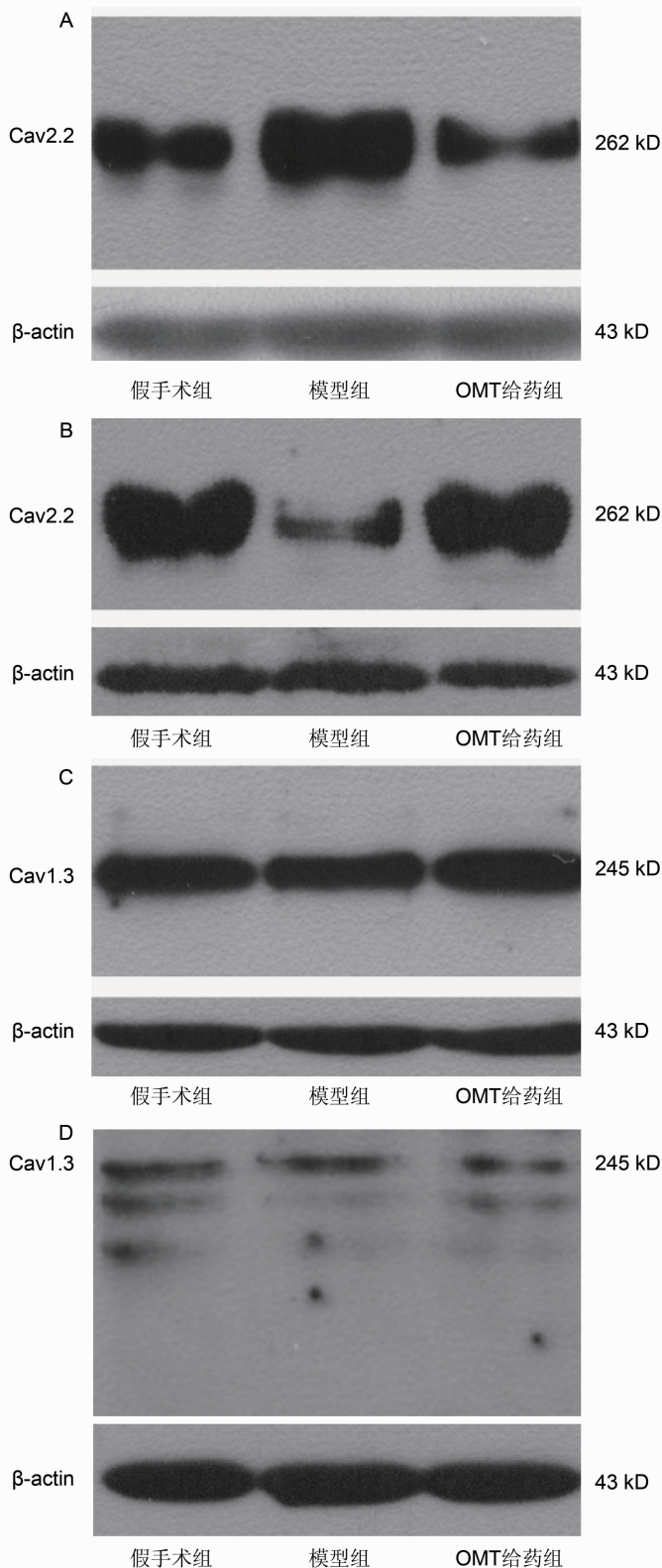
表 2 各组不同组织中 Cav2.2 和 Cav1.3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Cav2.2 蛋白表达		Cav1.3 蛋白表达	
		脑组织	DRG 组织	脑组织	DRG 组织
假手术	3	1.00 $\pm$ 0.15	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.12
模型	3	1.61 $\pm$ 0.22 *	0.32 $\pm$ 0.04 **	1.04 $\pm$ 0.14	0.72 $\pm$ 0.06
OMT 给药	3	0.75 $\pm$ 0.16 Δ	1.08 $\pm$ 0.13 Δ	1.19 $\pm$ 0.13	0.70 $\pm$ 0.03

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

讨 论

在外周神经系统, 钙离子通道与神经冲动沿 A δ 和 C 纤维的传导以及伤害性感受器的兴奋性有关, 抑制钙离子内流使得伤害性感受器兴奋性阈值提高, 并且能有效降低神经冲动的传导^[18]。PSNL 模型能充分表现神经病理性疼痛症状^[19], 因此本研究选择 PSNL 模型。本研究通过检测 DRG 神经元内钙离子浓度的结果显示, OMT 给药后使 PSNL 组神经元的细胞内钙离子浓度明显降低, 基本回复至正常水平, 说明 OMT 的镇痛作用可能是通过抑制 PSNL 细胞内钙离子浓度升高而产生。产生这种现象的原因可能之一



注:A 为大脑组织 Cav2.2 蛋白表达;B 为 DRG 组织 Cav2.2 蛋白表达;C 为大脑组织 Cav1.3 蛋白表达;D 为 DRG 组织 Cav1.3 蛋白表达

图 2 各组不同组织中 Cav2.2 及 Cav1.3 蛋白表达图

是 OMT 对细胞外钙离子内流的调节作用,包括对阳离子通道通透性和钙离子通道的影响。

有文献报道 OMT 可以降低离子型谷氨酸受体亚单位 NR2B 的表达而产生镇痛作用^[9]。研究发现高电压激活钙离子通道阻断剂均有不同程度的镇痛作用,其中 Cav2.2 阻断剂的镇痛效果最为明显^[20]。电压门控钙离子通道是由多种亚基构成的跨膜蛋白复合体。其通道可分为 Cav1 家族、Cav2 家族和 Cav3 家族。其中 Cav1 家族和 Cav2 家族为高电压门控性钙离子通道, Cav3 家族为低电压门控性钙离子通道^[21]。Cav2.2 阻断剂如齐考诺肽等已被用于治疗慢性和神经病理性疼痛^[22]。本研究为进一步探讨 OMT 的镇痛作用是否与 Cav2.2 拮抗剂有相似性,可能机制是否与影响细胞膜上 Cav2.2 钙离子通道功能、从而调节细胞内钙离子浓度有关。

蛋白表达水平和通道开关状态是影响该通道功能的主要因素,因此,本研究中进一步探讨了 Cav2.2 通道蛋白的表达水平,研究发现,大脑和 DRG 组织中的 Cav2.2 通道蛋白表达水平在 PSNL 组和 OMT 组的小鼠间均有明显反向变化,OMT 逆转了 PSNL 对 Cav2.2 通道蛋白表达水平的影响。同时 OMT 及 PSNL 对 Cav1.3 通道蛋白表达无影响,提示 OMT 的镇痛作用与 Cav2.2 通道的蛋白表达有关,而与 Cav1.3 的蛋白表达无关。这与目前临床将 Cav2.2 阻断药用于神经病理性疼痛治疗相符^[20]。部分 PSNL 模型中 Cav2.2 通道蛋白在 DRG 与大脑的表达变化正好相反,说明 PSNL 所造成的疼痛确实与 Cav2.2 通道蛋白表达有关,但对感觉神经元与中枢神经系统的 Cav2.2 蛋白表达影响差异原因尚且不明,有待进一步研究。

本研究通过测定细胞内钙离子浓度和检测 Cav2.2 及 Cav1.3 钙离子通道蛋白表达水平,揭示了 OMT 对 PSNL 镇痛作用的另一个可能机制:OMT 可能通过影响 Cav2.2 通道调节细胞内钙离子浓度而产生镇痛作用。

参 考 文 献

- [1] 刘芬,刘洁,陈霞,等.氧化苦参碱的镇痛作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2005,31(6):883-885.
- [2] 陈霞,刘芬,吕文伟,等.氧化苦参碱的镇痛作用及其机制研究[J].中草药,2006,37(2):255-257.
- [3] 张娟,肖鲁伟,戴体俊,等.氧化苦参碱对脊髓 c-fos 表达和对阿片受体的作用研究[J].中华中医药学刊,2009,27(5):1077-1079.
- [4] 姜静,冯建伟,陈靖,等.氧化苦参碱的镇痛作用[J].中药药理与临床,2012,28(6):50-52.
- [5] 吕晓强,邓扬鸥,杨丽,等.氧化苦参碱镇痛作用及其阿片受体非相关性[J].中华中医药杂志,2014,29

- (2): 564 - 567.
- [6] Zhou JJ, Yang G, Jin SJ, et al. Oxymatrine-carbenoxolone Sodium Inclusion Compound induces antinociception and increases the expression of GABAA α 1 receptors in mice[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 626(2): 244 - 249.
- [7] 周俊俊. 甘珀酸钠苦参素包合物镇痛作用及相关机制的研究[D]. 银川: 宁夏医学院, 2008.
- [8] Liu HY, Li YX, Hao YJ, et al. Effects of oxymatrine on the neuropathic pain induced by chronic constriction injury in mice[J]. CNS Neurosci Therapeutics, 2012, 18(12): 1030 - 1032.
- [9] Wang H, Li Y, Dun L, et al. Antinociceptive effects of oxymatrine from *Sophora flavescens*, through regulation of NR2B-containing NMDA receptor-ERK/CREB signaling in a mice model of neuropathic pain[J]. Phytomedicine, 2013, 20(11): 1039 - 1045.
- [10] John P, David LZ. Calcium channel functions in pain processing[J]. Channels (Austin), 2010, 4(6): 510 - 517.
- [11] Yaksh TL. Calcium channels as therapeutic targets in neuropathic pain[J]. J Pain, 2006, 7(1): S13-S30.
- [12] Vink S, Alewood PF. Targeting voltage-gated calcium channels: developments in peptide and small-molecule inhibitors for the treatment of neuropathic pain[J]. Br J Pharmacol, 2012, 167(5): 970 - 989.
- [13] Seungkyu L. Pharmacological inhibition of voltage-gated Ca $^{2+}$ channels for chronic pain relief[J]. Curr Neuropharmacol, 2013, 11(6): 606 - 620.
- [14] Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury[J]. Pain, 1990, 43(2): 205 - 218.
- [15] Yang L, Stephens GJ. Effects of neuropathy on high-voltage-activated Ca $^{2+}$ current in sensory neurones[J]. Cell Calcium, 2009, 46(4): 248 - 256.
- [16] 刘太华, 刘德芳, 王骏, 等. 苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱对巨噬细胞活性及分泌肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(3): 31 - 33.
- [17] 王水云, 晏芳, 彭贺新, 等. 荧光定量法测量平滑肌细胞内钙离子浓度的探讨[J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(4): 450 - 452.
- [18] 刘艳红, 徐龙河, 张宏. 疼痛相关受体及电压门控离子通道学说的理论与应用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(21): 186 - 188.
- [19] 毛庆祥, 杨天德. 神经病理性疼痛动物模型[J]. 中国医药指南, 2008, 6(6): 13 - 14.
- [20] 文磊, 杨胜, 周文霞, 等. N 型钙通道与疼痛. 生理科学进展[J]. 2005, 36(1): 23 - 28.
- [21] Minor DL, Findeisen F. Progress in the structural understanding of voltage-gated calcium channel (CaV) function and modulation[J]. Channels (Austin), 2010, 4(6): 459 - 474.
- [22] Snutch TP. Targeting chronic and neuropathic pain: The N-type calcium channel comes of age[J]. NeuroRX, 2005, 2(4): 662 - 670.

(收稿:2014-09-01 修回:2014-12-25)

中国中西医结合杂志社微信公共账号已开通

近日,中国中西医结合杂志社已经开通微信公共账号,可通过扫描右方二维码或者搜索微信订阅号“中国中西医结合杂志社”加关注。本杂志社将通过微信不定期发送《中国中西医结合杂志》、《Chinese Journal of Integrative Medicine》的热点文章信息,同时可查看两本期刊的全文信息,欢迎广大读者订阅。

