

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.25.006

三七总皂苷预处理对急性内脏痛大鼠星形胶质细胞的影响*

杨帆¹ 刘文国² 刘红¹ 田野³ 张仁丽¹ 万炜^{1△}

(1 南华大学人体解剖学教研室 湖南 衡阳 421001; 2 佛山科学技术学院人体解剖学教研室 广东 佛山 528000;

3 攀枝花钢铁集团总医院麻醉科 四川 攀枝花 617000)

摘要 目的:探讨三七总皂苷预处理对急性内脏痛大鼠的影响,初步阐述三七总皂苷对急性内脏痛的影响机制。**方法:**成年雌性SD大鼠54只随机分为正常组(n=6),生理盐水预处理组(n=24),三七总皂苷预处理组(n=24)。正常组常规条件饲养,不做干预及建立急性内脏痛模型;生理盐水预处理组和三七总皂苷预处理组大鼠分别预先腹腔注射生理盐水(2.86 ml/kg)或7 mg/ml的三七总皂苷(2.86 ml/kg),每12 h一次,连续7 d,第8天腹腔注射1%乙酸(10 mg/kg),建立急性内脏痛模型,立即观测SD大鼠扭体反应。按(30、60、90、180 min)不同存活时间处死动物,免疫组化法观测脊髓背角GFAP的表达变化。**结果:**VPI评分显示,三七总皂苷能显著下调内脏痛模型VPI评分,减轻疼痛。免疫组化显示在相同时间点,三七总皂苷预处理组大鼠GFAP表达弱于生理盐水预处理组,尤其在30、60、90 min存活组。**结论:**对SD大鼠急性内脏痛模型预先腹腔注射三七总皂苷可以抑制脊髓胶质细胞激活,从而减轻急性内脏痛。

关键词:三七总皂苷;急性内脏痛;扭体反应;星形胶质细胞;胶质纤维酸性蛋白

中图分类号:Q95-3;R614 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)25-4822-04

The Effect of TSPN Preconditioning on Astrocytes in Rats of Visceral Pain*

YANG Fan¹, LIU Wen-guo², LIU Hong¹, TIAN Ye³, ZHANG Ren-li¹, WAN Wei^{1△}

(1 Dept. of Anatomy, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China;

2 Dept. of Anatomy, Foshan University, Foshan, Guangdong, 528000, China;

3 Department of Anesthesiology, Panzhihua Steel Corporation General Hospital, Panzhihua, Sichuan, 617000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of TSPN preconditioning on acute visceral pain rats and expound correlated mechanism. **Methods:** 54 female adult SD rats were randomly divided into normal group (n=6), NS preconditioning group (n=24), TSPN preconditioning group (n=24). The normal group rats were fed routinely, proceed without drug intervention and intraperitoneal injection of acetic acid; The NS group and the TSPN group rats received an intraperitoneal injection of 1% 10mg/kg acetic acid (10 ml/kg) after intraperitoneal preadministration of normal saline(2.86 ml/kg) or 7 mg/ml TSPN(2.86 ml/kg) twice a day for 7d. On the eighth day, the rats of preconditioning groups were sacrificed at different intervals (30, 60, 90, 180 min), randomly. The writhing test was measured immediately after the acetic acid injected and the expression of GFAP in spinal cord was compared. **Results:** VPI scores showed that compared with the NS preconditioning, TSPN preconditioning can significantly decrease VPI scores of the acute visceral pain rats, immunohistochemistry showed that the GFAP expression of the TSPN preconditioning group rats was in the same trend with the NS preconditioning group rats, but was weaker than the NS preconditioning group at the same time point, in particular, at 30, 60, 90 min survival group. **Conclusion:** Intraperitoneal preadministration of TSPN is able to inhibit the activation of astrocytes in the Superficial Laminae of spinal dorsal horn of SD rats, attenuating acute visceral pain.

Key words: TSPN; Visceral Pain; Writhing model; Astrocytes; GFAP

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)25-4822-04

前言

近几十年来,神经科学的突破性进展是认识到星形胶质细胞(Astrocyte, AST)并不只是起辅助作用。最新研究表明,AST与疼痛关系密切^[1-3],神经胶质细胞的激活可致脊髓疼痛信号的中枢敏化,其中AST在神经病理性痛的产生传导过程中起

关键作用。AST激活后,可以释放多种促炎性因子、神经营养因子等参与疼痛产生和调节。内脏痛(Visceral Pain, VP)是临床最常见的疼痛之一,是指伤害性刺激激活内脏器官痛感受器而产生的疼痛,特点是感觉模糊,定位不明确,目前对于内脏痛的产生和传导机制仍不是很清楚。AST在内脏痛中所起的作用及其机制对于阐明内脏痛产生和传导机制有深远意义。

* 基金项目:湖南省自然科学基金项目(10JJ3046);佛山科学技术学院基金项目(2011X036)

作者简介:杨帆(1983-),男,硕士研究生,执业医师,主要研究方向:神经损伤修复再生

△通讯作者:万炜,男,副教授,主要从事神经损伤与修复研究,E-mail:david-wan@163.com

(收稿日期:2014-02-26 接受日期:2014-03-20)

三七总皂苷(Total Saponins of *Panax notoginseng*, TSPN)是中药三七的主要成分,主要具有活血化瘀的作用。对神经元损伤再生具有促进作用;也有研究发现其对AST的激活有调节作用^[4,5],但其对急性内脏痛的影响尚不清楚,那么TSPN是否是通过抑制AST激活,减少促炎性因子及神经营养因子等释放而发挥作用,尚不清楚。本研究拟对SD大鼠腹腔注射TSPN或NS预处理7天,然后建立急性内脏痛模型,立即观测不同时间段SD大鼠内脏痛指数(Visceral Pain Index, VPI)评分,以及不同组别大鼠脊髓背角浅层AST激活特征性标志物胶质纤维酸性蛋白(Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP)表达差异,探讨TSPN预处理对内脏痛觉影响的机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与器材

三七总皂苷(丽珠集团利民制药厂/中国);鼠/兔通用型IHC试剂盒(Auragene/China);GFAP抗体(中杉金桥/中国);DAB显色试剂盒(博士德/中国);光学显微镜(Olympus BX51/Japan);戊巴比妥钠(Sigma/USA);冰冻切片机(Leica CM 1850/Germany)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 选取SPF级健康雌性SD大鼠54只,200-220 g/只,由南华大学动物实验中心提供,所有大鼠在20-25℃环境温度,自然光照下分笼饲养,自由饮食水。大鼠随机分成正常组(n=6)、生理盐水预处理组(n=24)、三七总皂苷预处理组(n=24)。正常组常规条件饲养,不做干预及建立VP模型。各预处理组预先腹腔给药7天,每12小时一次(TSPN预处理组每只大鼠注射7 mg/ml的TSPN 2.86 ml/kg,NS预处理组每只大鼠注射2.86 ml/kg生理盐水)。第8天早8点,NS预处理组和TSPN预处理组大鼠腹腔注射1%乙酸20 mg/kg建立急性内脏痛模型,然后按30、60、90、180 min不同存活时间处死大鼠。

1.2.2 扭体模型制作 文献报告^[6-12],0.6-9%的乙酸腹腔注射均可诱发扭体反应。我们在预实验阶段发现以生理盐水将乙酸稀释至1%,10 ml/kg腹腔注射产生的内脏痛模型较为稳定,均可诱发扭体反应,故采用此浓度剂量制作扭体模型。

1.2.3 VPI测试 按Schmauss等^[13-17]的方法计算VPI,把动物的扭体行为分成4个等级,A.正常姿势为0分;B.身体斜向一边为1分;C.后肢伸展、后爪频繁后摆为2分;D.腹部肌肉收缩、后肢外伸为3分。乙酸注射后立即计数每15 min出现的扭体反应次数,各等级扭体反应次数乘以相应分值的总和作为该时间段VPI,公式为 $VPI=B+2C+3D$ 。

1.2.4 取材切片和免疫组化 预处理各组大鼠VP建模后按30、60、90、180 min不同的存活时间处死动物。2%戊巴比妥钠45 mg/kg腹腔麻醉,剪开胸腔,暴露心脏,将针头由左心室插入升主动脉并固定,同时剪开右心耳,先速灌生理盐水250 ml,继以冷的(4℃)4%多聚甲醛溶液先快后慢灌流固定2小时,取L4-6段脊髓,4%多聚甲醛固定24 h,剥去脊髓,置入15%蔗糖直至沉底,继置入30%蔗糖直至沉底,作连续冠状切片,片厚15 μm,贴于防脱片玻片。切片浸于0.01 M pH7.4 PBS洗涤3次,每次5 min。然后用0.1% Triton X-100覆盖组织浸润15

min,PBS洗涤2次,每次5 min。浸于30% H₂O₂ 1份+蒸馏水10份混合液,室温5-10 min,蒸馏水洗3次。滴加5%BSA封闭液,室温20 min,甩去多余液体,不洗。滴加一抗(GFAP多克隆抗体1:100),4℃24 h湿盒孵育,PBS洗2 min×3次。滴加适量生物素标记羊抗鼠/兔二抗工作液(约50 ul),室温孵育10 min,PBS洗2 min×3次。滴加适量HRP标记链霉亲和素(约50 ul),室温孵育10 min,PBS洗5 min×4次。滴加DAB显色工作液,显微镜下观察,达到满意显色效果,蒸馏水洗涤,终止反应。常规脱水、透明、封片。

1.3 图像处理

在每只大鼠L4-6处取6张切片,每张切片取脊髓背角浅层在光学显微镜物镜40x下拍照,然后经ImageJ软件对图像计算分析,得出相对灰度值,以6张切片相对灰度值的平均值作为GFAP测定值。

1.4 统计分析

采用SPSS18.0统计软件进行统计处理。计量数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验及单因素方差分析(one-way ANOVA)分析组内及组间数据的差异。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 行为学结果

在本实验中,NS预处理组与TSPN预处理组大鼠均出现扭体反应。乙酸腹腔注射后5 min左右开始出现行为学反应,NS预处理组在15-30 min时达到反应高峰,TSPN预处理组在30-45 min时达到反应高峰。TSPN预处理组与NS预处理组比较,0-15、15-30、45-60、60-75、120-135 min VPI显著下调,差异有统计学意义(* $P < 0.05$,** $P < 0.01$)。数据表明TSPN预处理组大鼠VPI高峰持续时间减少,同等程度VPI出现时间延迟(见图1)。

2.2 免疫组化结果

NS预处理组与TSPN预处理组大鼠脊髓背角浅层GFAP表达均在60 min达高峰。在相同时间点,TSPN预处理组与NS预处理组比较,GFAP表达在30、60、90 min组显著下调($P < 0.01$)。NS预处理30、60、90、180 min存活组与正常组比较,GFAP表达显著上调($P < 0.01$),TSPN预处理60、90、180 min存活组与正常组比较,GFAP表达显著上调($P < 0.01$)。

3 讨论

目前,内脏痛的发生机制尚不完全清楚。但是,越来越多的证据表明,AST参与内脏痛及其调节过程,并且发挥重要作用。研究表明,在福尔马林灌胃诱发大鼠内脏痛模型的脑中,GFAP表达明显升高且AST可塑性反应早于神经元,也从侧面证明了AST在内脏痛中发挥重要作用^[18]。本研究中VP模型的GFAP表达呈时间依赖性,同时与VPI密切相关。一定程度上也反映了AST的这一作用。目前,临床治疗疼痛的药物主要作用于神经元,随着AST在疼痛机制中的作用逐渐被阐明,AST的重要性越来越受到重视,针对性开发调节AST的药物,将为疼痛治疗提供一系列全新的策略。

近期研究表明,TSPN能够通过拮抗大鼠局灶脑缺血再灌

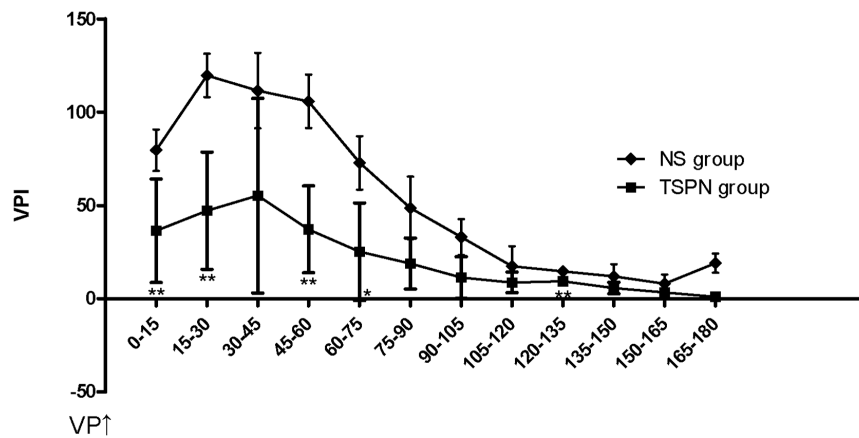


图1 扭体模型 VPI 评分

Fig.1 VPI scores of writhing model

注：“VP↑”表示扭体模型建立时间 *p<0.05 与 NS 预处理组比较, **p<0.01 与 NS 预处理组比较

Note: Upward arrow marked “VP” indicates the time of writhing model establish *p<0.05 vs NS group, **p<0.01 vs NS group

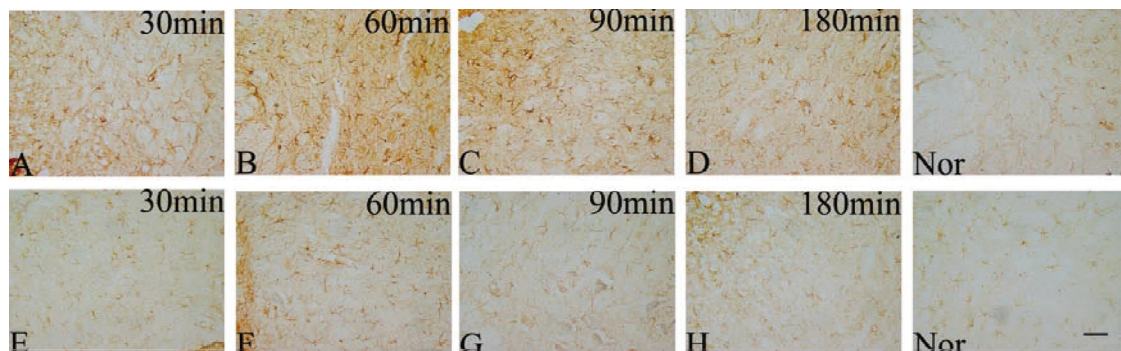


图2 各组脊髓背角浅层 GFAP 表达结果 Bar=100 μm

A-D:生理盐水预处理组;E-H:三七总皂苷预处理组;Nor:正常组

Fig.2 GFAP expression in the Superficial Laminae of spinal dorsal horn

A-D:NS group; E-H:TSPN group; Nor: Normal group Bar=100 μm

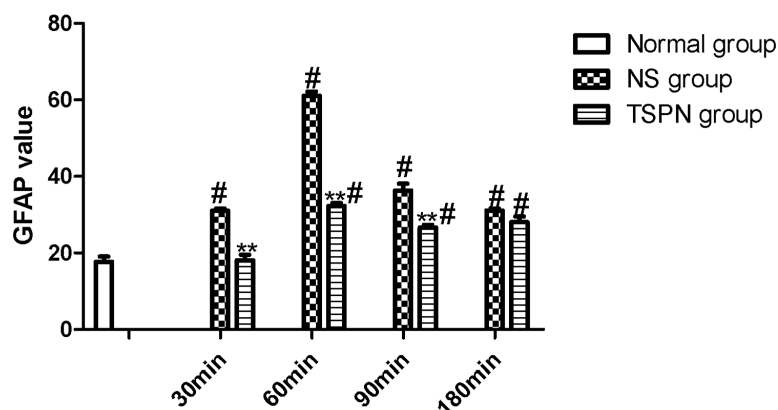


图3 各组脊髓背角浅层 GFAP 测定值比较图

Fig.3 Comparison of GFAP value in the Superficial Laminae of spinal dorsal horn

注:**p<0.01 与 NS 预处理组比较 #p<0.01 与正常组比较

Note: **p<0.01 vs NS group #p<0.01 vs Normal group

注损伤发挥神经保护作用^[19]。TSPN 能够抑制脊髓半横断损伤后 AST 的激活,促进脊髓损伤后运动功能的恢复^[20]。TSPN 能够显著减少大脑中动脉闭塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)模型老鼠 Nogo-A, NgR 以及 P75 的表达,促进神经功

能的恢复,对脑梗塞后大脑功能恢复发挥重要作用^[21]。以上研究表明,TSPN 对神经元具有直接或间接保护作用。TSPN 的神经保护作用可能是通过抑制 AST 激活,减少神经活性物质释放,调节神经元的功能,同时抑制中枢敏化和痛觉过敏。这可能

也是本实验中 TSPN 预处理组 VPI 评分显著低于 NS 预处理组的可能原因, VPI 反映了内脏痛的剧烈程度, TSPN 预处理能够有效抑制痛觉过敏和中枢敏化, 从而减轻内脏痛。

本研究选择与临床内脏痛致痛机制较为相似的扭体模型作为实验对象。研究表明, NS 预处理组和 TSPN 预处理组在急性内脏痛模型建立后 5 min 左右均出现扭体反应, NS 预处理组在 15-30 min 时达到反应高峰, TSPN 预处理组在 30-45 min 时达到反应高峰, 随后扭体反应逐渐减轻。TSPN 预处理组与 NS 预处理组比较, 在相同时间段 VPI 评分显著下调, 内脏痛显著减轻。免疫组化结果显示, 预处理各组 GFAP 表达在 30 min 上升, 60 min 达高峰, 随后逐渐下调, GFAP 测定值表达趋势相同, TSPN 预处理组表达程度弱于 NS 预处理组, 尤其在 30、60、90 min 存活组, 提示 TSPN 能显著下调 GFAP 表达。TSPN 对 VPI 影响与对 GFAP 表达的影响趋势基本一致, 提示 TSPN 抑制 AST 激活可能是其减轻急性内脏痛机制之一, TSPN 抑制 AST 激活的具体机制尚待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] L X Zhao, B C, Jiang, X B. Wu, et al. Ligustilide attenuates inflammatory pain via inhibition of NF κ B-mediated chemokines production in spinal astrocytes[J]. Eur J Neurosci, 2014, 2: 14
- [2] M Sakakiyama, S Maeda, K Isami, et al. Preventive and Alleviative Effect of Tramadol on Neuropathic Pain in Rats: Roles of alpha2-Adrenoceptors and Spinal Astrocytes[J]. J Pharmacol Sci, 2014, 124(2): 244-257
- [3] R R Ji, T Berta, M Nedergaard. Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?[J]. Pain, 2013 154(Suppl 1): s10-28
- [4] D. H. Chow, A. Lai, F. H. Tang, et al. Effects of Panax ginseng-containing herbal plasters on compressed intervertebral discs in an in vivo rat tail model[J]. Chin Med, 2013, 8(1): 4
- [5] S. Chula, L. Hang, B. Yinying, et al. The effects of notoginsenoside R (1) on the intestinal absorption of geniposide by the everted rat gut sac model[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142(1): 136-143
- [6] C. Matera, L. Flammini, M. Quadri, et al. Bis(ammonio)alkane-type agonists of muscarinic acetylcholine receptors: Synthesis, in vitro functional characterization, and in vivo evaluation of their analgesic activity[J]. Eur J Med Chem, 2014, 75C: 222-232
- [7] F. M. Hughes, Jr., B. E. Shaner, J. O. Brower, et al. Development of a Peptide-derived orally-active kappa-opioid receptor agonist targeting peripheral pain[J]. Open Med Chem J, 2013, 7: 16-22
- [8] Y. A. Andreev, S. A. Kozlov, Y. V. Korolkova, et al. Polypeptide modulators of TRPV1 produce analgesia without hyperthermia [J]. Mar Drugs, 2013, 11(12): 5100-5115
- [9] E. Munoz-Islas, G. C. Vidal-Cantu, M. Bravo-Hernandez, et al. Spinal 5-HT receptors mediate 5-HT-induced antinociception in several pain models in rats[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2014, 120: 25-32
- [10] Q. Xu, Y. Wang, S. Guo, et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of Flos populi [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 28, 152(3): 540-545
- [11] H. Imam, N. U. Mahbub, M. F. Khan, et al. Alpha amylase enzyme inhibitory and anti-inflammatory effect of Lawsonia inermis[J]. Pak J Biol Sci, 2013, 16(23): 1796-1800
- [12] R. Zahan, L. Nahar, M. L. Nesa. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of flower (Alangium salvifolium) extract[J]. Pak J Biol Sci, 2013, 16(19): 1040-1045
- [13] C. Schmauss, Y. Shimohigashi, T. S. Jensen, et al. Studies on spinal opiate receptor pharmacology. III. Analgetic effects of enkephalin dimers as measured by cutaneous-thermal and visceral-chemical evoked responses[J]. Brain Res, 1985, 337(2): 209-215
- [14] C. Schmauss, T. L. Yaksh In vivo studies on spinal opiate receptor systems mediating antinociception. II. Pharmacological profiles suggesting a differential association of mu, delta and kappa receptors with visceral chemical and cutaneous thermal stimuli in the rat [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1984, 228(1): 1-12
- [15] C. Schmauss, T. L. Yaksh, Y. Shimohigashi, et al. Differential association of spinal mu, delta and kappa opioid receptors with cutaneous thermal and visceral chemical nociceptive stimuli in the rat [J]. Life Sci, 1983, 33(Suppl 1): 653-656
- [16] C Schmauss, C Doherty, T L. Yaksh. The analgetic effects of an intrathecally administered partial opiate agonist, nalbuphine hydrochloride[J]. Eur J Pharmacol, 1982, 86(1): 1-7
- [17] C Schmauss, T L, Yaksh Y. Shimohigashi, et al. Differential association of spinal mu, delta and kappa opioid receptors with cutaneous thermal and visceral chemical nociceptive stimuli in the rat [J]. Life Sci, 1983, 33(Suppl 1): 653-656
- [18] 王颖, 邱建勇, 段丽, 等. 胃伤害性刺激诱导大鼠脑干星形胶质细胞 GFAP 蛋白表达及其与神经元的关系[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2001, (2): 212-216+237
Wang Ying, Qiu Jian-yong, Duan Li, et al. Expression of GFAP in RAT brain stem astrocytes induced by stomachic nociception and relationship to neurons[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2001, (2): 212-216+237
- [19] D. Jia, Y. Deng, J. Gao, et al. Neuroprotective effect of Panax notoginseng polysaccharides against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 63: 177-180
- [20] 李花, 赵子进, 潘丁, 等. 三七总皂苷对脊髓损伤后的保护作用及 GFAP 相关机制[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10: 1825-1827+1835
Li Hua, Zhao Zi-jin, Pan Ding, et al. Protective effect of TSPN on spinal cord injury and its GFAP relative mechanism [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10: 1825-1827+1835
- [21] L Liu, L. Zhu, Y. Zou, et al. Panax Notoginseng Saponins Promotes Stroke Recovery by Influencing Expression of Nogo-A, NgR and p75NGF, in vitro and in vivo [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 1, 37(4): 560-568