

## 柚皮苷抑制腰 5 脊神经结扎引起的神经病理性疼痛

王 静<sup>1</sup>, 魏绪红<sup>1</sup>, 苏薇薇<sup>2</sup>, 李沛波<sup>2</sup>, 刘先国<sup>1\*</sup>

(中山大学 1. 中山医学院疼痛研究中心, 广东 广州 510089; 2. 生命科学院, 广东 广州 510275)

**摘要:**【目的】观察不同剂量柚皮苷对腰 5 脊神经结扎加切断(L5 SNL)引起的神经病理性疼痛的抑制作用。【方法】利用行为学测试的方法,我们检测了口服柚皮苷对 L5 SNL 大鼠 50%机械刺激撤足阈值的影响。【结果】30, 90, 100 mg/kg 柚皮苷可显著提高 L5 SNL 大鼠的 50% 机械刺激撤足阈值, 10 mg/kg 无效。单次给药(30 或 90 mg/kg)对大鼠 50%机械刺激撤足阈值缓解作用可达 6 h 左右, 连续 7 天给予柚皮苷(30 mg/kg, 每天 1 次)其作用可持续至停药后 4 d。【结论】口服柚皮苷可缓解外周神经损伤引起的神经病理性疼痛。

**关键词:** 柚皮苷; 神经病理性疼痛; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 腰 5 脊神经结扎加切断

**中图分类号:** R338.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0055-04

## Naringin Inhibits Neuropathic Pain Produced by Lumbar 5 Spinal Nerve Ligation

WANG Jing<sup>1</sup>, WEI Xu-hong<sup>1</sup>, SU Wei-wei<sup>2</sup>, LI Pei-bo<sup>2</sup>, LIU Xian-guo<sup>1\*</sup>

(1. Pain Research Center, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China;

2. College of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of naringin at different doses on the neuropathic pain produced by lumbar 5 spinal nerve ligation (L5 SNL). 【Methods】 Using the method of behavioral test, we tested the 50% paw withdrawal threshold before and after intragastrical application of naringin in the rats with L5 SNL. 【Results】 Naringin at 30, 90, 100 mg/kg but not at 10 mg/kg increased the 50% paw withdrawal threshold of L5 SNL rats significantly. Single application of Naringin (at 30 or 90 mg/kg) inhibited mechanical allodynia for around 6 hours, and the inhibitory effect persisted for 4 days after the cessation of the drug when naringin (30 mg/kg, daily) was consecutively applied for 7 days. 【Conclusion】 Intragastrical of naringin could relieve the neuropathic pain produced by peripheral nerve injury.

**Key words:** naringin; neuropathic pain; tumour necrosis factor- $\alpha$ ; L5 SNL

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(1):55-58]

神经病理性疼痛是由各种原因(外伤、肿瘤和感染等)引起的神经损伤所致,主要表现为痛超敏(allodynia),即痛阈显著下降;痛敏(hyperalgesia),即痛反应增强和自发性疼痛<sup>[1-2]</sup>。神经损伤引起多种炎症因子的释放,它们可引起伤害性感受器敏化,即引起痛觉感受器兴奋性升高。目前认为, TNF- $\alpha$  是神经损伤后最先表达的炎症因子, TNF- $\alpha$  能够诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-8 等的产生。这些细胞因子级联最终导致环氧化酶-2 依赖的类前列

腺素和儿茶酚胺从交感神经纤维的释放,引起神经病理性疼痛<sup>[3]</sup>。神经病理性疼痛的显著特点是在损伤愈合后,痛觉异常依然存在数周、数月乃至数年,使患者痛苦不堪,甚至丧失劳动能力。为了寻找抑制病理性疼痛的中药有效成分,我们用腰 5 脊神经结扎病理性疼痛模型筛选了多种中药单体,发现柚皮苷(属二氢黄酮类化合物)对神经病理性疼痛有一定的抑制作用,现报道如下。

收稿日期: 2009-10-27

基金项目: 国家自然科学基金(30570599);广州市科技计划项目(2007Z3-E5071)

作者简介: 王静,硕士研究生,专业方向:痛觉的病理生理; \*通信作者:刘先国,博士生导师,教授,研究方向:痛觉的病理生理, E-mail: liuxg@mail.sysu.edu.cn

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

实验共使用 58 只雄性 SD 大鼠, 体质量 150 ~ 170 g, 清洁级标准, 由中山大学动物实验中心提供。动物分笼饲养, 自由饮食, 隔日更换垫料。室温保持在 20 ~ 25 °C, 湿度 50% ~ 80%, 12:12 h 白天-黑夜循环照明。所有实验步骤都尽量减轻动物的痛苦并按照有关实验动物的使用原则操作。所有大鼠分为 7 组, 前 4 组分别给予 10, 30, 90, 100 mg/kg 柚皮苷, 第 5 组为对照组, 给予溶剂, 第 6 组为 30 mg/kg 柚皮苷连续给药组, 第 7 组为溶剂对照组。

### 1.2 药品

柚皮苷由中山大学生命科学院广州现代中药质量研究开发中心提供, 溶于 PEG400 与生理盐水体积比 1:1 配制成的溶剂中, 灌胃给药。阳性对照药加巴喷丁由台州市中荣化工有限公司生产。取加巴喷丁粉末溶于 PEG400 与生理盐水体积比 1:1 配制成的溶液中, 给药剂量 100 mg/kg, 灌胃给药。

### 1.3 实验方法

采用经典的腰 5 脊神经结扎加切断模型, 具体方法如下。给予 100 mL/L 水合氯醛 (3.5 mL/kg, i.p.) 麻醉后, 实验大鼠经备皮、消毒, 分离左侧 L5 脊神经, 用 3-0 医缝合线结扎并切断, 逐层缝合切口。

采用 50% 机械刺激撤足阈值检测病理性疼痛是否出现。为了消除心理因素对测试结果的影响, 在撤足阈值的基础值测定前 1 周, 每日将大鼠放置于测试装置内不少于 20 min, 直至大鼠搔抓、直立、行走等活动完全停止, 处于安静状态时为止。监测装置为透明有机玻璃箱 (18 × 25 × 18 cm), 箱底由金属网制成 (网格为 0.8 × 0.8 cm), 通过网孔用 von Frey hair 可以对大鼠足底部皮肤施加机械性刺激。至大鼠体质量在 (230 ± 20) g 时开始采用 Up-Down 方法, 每天检测 1 次 50% 机械性撤足阈值 (g), 以获得基础值。2 ~ 3 天后行腰 5 脊神经切断术, 术后第 4 天开始新的测试, 50% 机械刺激撤足阈值显著下降者为模型成功。

将成功模型鼠分柚皮苷组与溶剂对照组, 柚皮苷组连续 7 d 于每天早上 9:00 灌胃给予柚皮

苷 30 mg/kg, 溶剂对照灌胃给予 PEG400 与生理盐水体积比 1:1 配制成的溶剂。给药后 1 h 测试 50% 机械刺激撤足阈值, 测试于停药后继续进行, 直至大鼠 50% 机械刺激撤足阈值恢复至术后水平。

撤足阳性反应的判定: ①测试时 Hair 垂直, 微弯, 在大鼠足心部停留的 6 ~ 8 s 内, 出现快速撤足为阳性反应; ②撤离 Hair 刺激作用的瞬间大鼠出现撤足, 亦为阳性反应; ③在刺激期间大鼠行走, 为可疑反应, 待大鼠安静后重新检测。

### 1.4 统计方法

所有行为学测试结果均采用非参数检验进行分析。同一组大鼠不同测试时间点的数据先用 Friedman ANOVA 检验差异, 然后再用两组相关数据的秩和检验分析。用 SPSS 10.0 (SPSS Inc, USA) 进行统计学分析, 所有数据用均数 ± 标准误 (Mean ± SE) 表示,  $P < 0.05$  认为有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一次性口服柚皮苷对机械性痛超敏的抑制作用

量效实验结果显示, 3.75 mg/kg、7.5 mg/kg、15 mg/kg、30 mg/kg 和 60 mg/kg 实验组中, 30 mg/kg 剂量组开始有显著效果。本实验以 30 mg/kg 为中间剂量, 将模型成功大鼠随机分为柚皮苷不同剂量组 (10 mg/kg、30 mg/kg 和 90 mg/kg)、溶剂对照组和阳性对照组, 每组 8~9 只。采用灌胃给药, 给药后分别于 1 h、3 h、6 h 和 9 h 测试大鼠 50% 机械刺激撤足阈值。

一次性口服 10 mg/kg 柚皮苷不能抑制机械性痛超敏, 它与对照组没有差异, 大鼠的机械刺激撤足阈值一直维持术后状态 (图 1A)。30 mg/kg 柚皮苷于给药后 1 h 已经有显著效果 (Mann-Whitney U test,  $P < 0.05$ ), 作用维持 6 h 以上, 到 9 h 基本恢复至术后水平 (图 1B)。90 mg/kg 柚皮苷作用与 30 mg/kg 柚皮苷作用相似 (图 1C)。阳性药加巴喷丁 100 mg/kg 作用在 1 h 时已经起效, 药效能维持 6 h 以上 (图 1D)。一次性口服柚皮苷大于 30 mg/kg 时, 可部分缓解机械性痛超敏, 30 mg/kg 与 90 mg/kg 作用没有明显差异, 且这种作用与加巴喷丁对机械性痛超敏的作用不同。

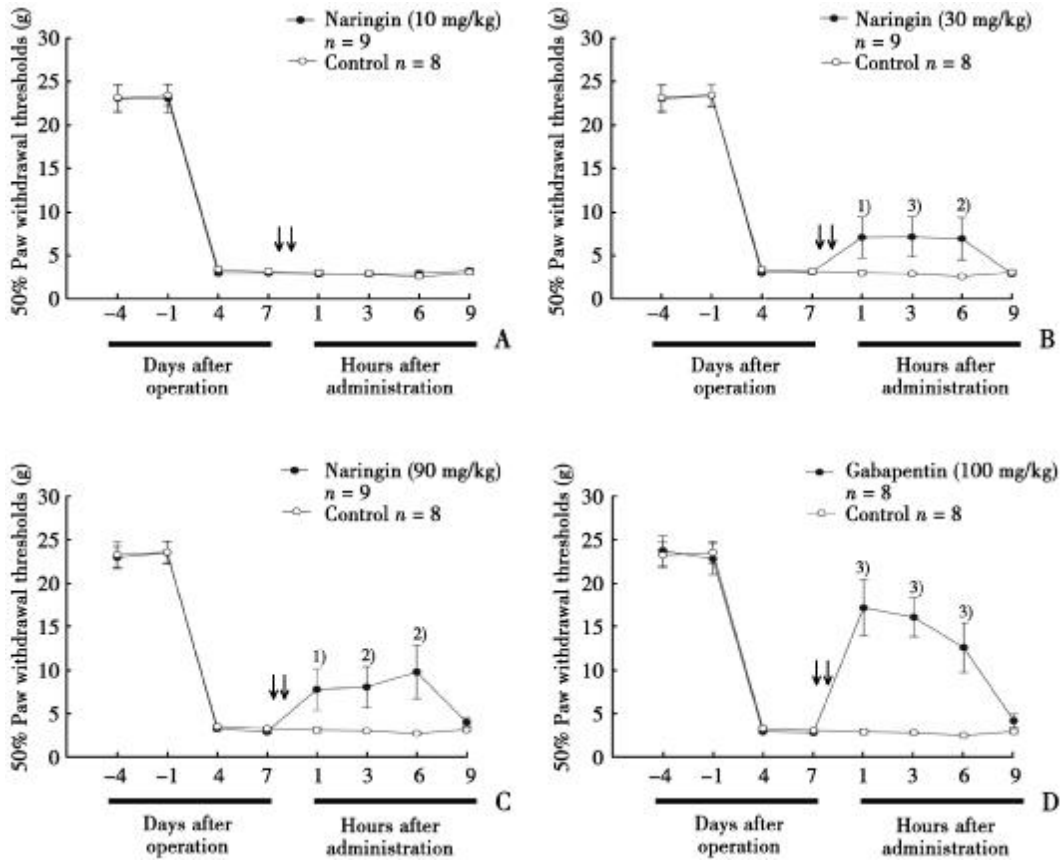


图 1 不同剂量柚皮苷及阳性药加巴喷丁对模型鼠 50% 机械刺激撤足阈值的影响

Fig.1 Effect of naringin at different doses and gabapentin on the 50% paw withdrawal threshold

“↓ ↓” indicate the time of intragastrical administration of drug. Significant difference of 50% paw withdrawal threshold before and after naringin applied, 1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ , 3)  $P < 0.001$

### 2.2 连续 7 天柚皮苷灌胃对痛超敏的作用

连续 7 天灌胃给予柚皮苷与对照组相比有明显的抑制机械性痛超敏的作用 (Mann-Whitney U test,  $P < 0.05$ ), 这种作用可维持到给药后 4 d. 说明药物作用有一定的累积效应, 但每次给药后柚皮苷对大鼠机械性痛超敏的抑制作用相互之间没有明显统计学差异 (Wilcoxon test,  $P > 0.05$ ), 停药后这种趋势消失, 体现出药物在体内自然消退的过程 (图 2)。

### 3 讨 论

大量研究表明, 病理性疼痛由外周敏感化和中枢敏感化介导<sup>[4-6]</sup>, 损伤的组织向细胞外液中释放一些致痛物质, 如  $K^+$ ,  $H^+$ , 5-羟色胺, 缓激肽, 前列腺素和 P 物质等。这些致痛物质除能直接兴奋伤害性感受器外, 还能通过改变局部微环境, 间接

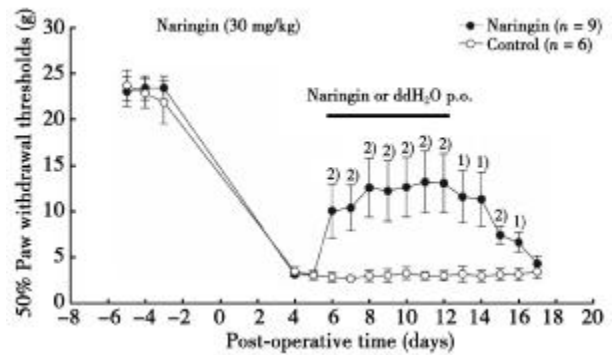


图 2 连续 7 天给予柚皮苷 30 mg/kg 对机械性痛超敏的作用

Fig.2 Effect of naringin (30 mg/kg) applied once daily for 7 days on the 50% paw withdrawal threshold

1)  $P < 0.05$ , 2)  $P < 0.01$ , 3)  $P < 0.001$

地提高伤害性感受器的兴奋性, 降低兴奋阈值, 使伤害性感受器敏感化<sup>[7-8]</sup>。

柚皮苷是 5,7,4'-三羟基二氢黄酮的衍生

物,是在其 7 位上结合一双糖形成的苷,是橘红、骨碎补、枳实、枳壳等多种中药的主要有效成分。具有抗氧化、抗溃疡、抑制乳腺增生以及延迟乳房肿瘤的形成、治疗血管性疾病等方面的作用。本研究表明,单次口服柚皮苷能够显著抑制神经病理性疼痛,这种作用能够维持 6 h 以上,而连续 7 d 给予柚皮苷可延长其作用时间,提示柚皮苷在体内有一定蓄积作用。柚皮苷能显著抑制高  $K^+$  引起的动脉平滑肌收缩<sup>[9]</sup>,并可通过抑制前列腺素  $E_2$  和 NO 的产生来改善局部炎症反应<sup>[10]</sup>,有效降低致痛物质对外周伤害性感受器的兴奋作用,防止外周敏感化形成。有报道,柚皮苷在降低脂多糖对肝脏的损害过程中,可降低肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 的释放<sup>[11]</sup>,而肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 是神经损伤后最早释放的致炎细胞因子,在病理性疼痛的形成中起重要作用<sup>[12]</sup>。因此,柚皮苷也可能通过抑制 TNF- $\alpha$  的释放,而缓解病理性疼痛。另外有研究表明,柚皮苷可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号转导途径<sup>[13]</sup>发挥作用。

本研究显示与加巴喷丁相比,柚皮苷抑制神经病理性疼痛的作用要差一些。加巴喷丁对神经病理性疼痛作用机制包括:通过增加 GABA 介导通路的抑制性输入发挥中枢效应;拮抗 NMDA 受体;以及拮抗 CNS 的钙离子通道和抑制周围神经的传导<sup>[14]</sup>。本实验室提取出的柚皮苷不能通过血脑屏障,因此其可能是通过外周机制起作用,至于具体的作用机制尚需进一步实验探讨。

结论:①一次性口服柚皮苷可以抑制神经病理性疼痛,这种作用可持续 6 h 以上。②连续 7 d 给予柚皮苷可以延长对神经病理性疼痛的作用。

#### 参考文献:

- [1] Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain [J]. *Science*, 2000, 288(45):1765-1769.
- [2] Zimmermann M. Pathobiology of neuropathic pain [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 429(56):23-37.
- [3] Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines, in: L.R. Watkins, S.F. Maier (Eds.), *Cytokines and Pain* [J]. Birkhauser Basel, 1999, 54(8):59-87.
- [4] Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? [J]. *Nat Neurosci*, 2002, Suppl (5):1062-1067.
- [5] Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception [J]. *Nature*, 2001, 413(56):203-210.
- [6] 钟敏,曾因明,杨进辉,等. 己酮可可碱对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及机制 [J]. *中华神经医学杂志*, 2007, 6(3):293-296.
- [7] Monnikes H, Ruter J, Konig M, et al. Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and non-noxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5-HT<sub>3</sub> receptors [J]. *Brain Res*, 2003, 966(45):253-264.
- [8] Anseloni VC, Ennis M, Lidow MS. Optimization of the mechanical nociceptive threshold testing with the Randall-Selitto assay [J]. *J Neurosci Methods*, 2003, 131(56):93-97.
- [9] Machha Ajaya. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta [J]. *Life Sciences*, 2003, 74(9):603-612.
- [10] Kenj I, Shirator I. The Effects of Naringin and naringenin on endotoxin induced uveitis in rats [J]. *J Ocu Pharmac Therap*, 2005, 21(4):298-304.
- [11] Kiichiro Kawaguchi. Supp ression of lipopolysaccha ride induced tumor necrosis factor release and liver injury in mice by naringin [J]. *Eur J Pharm*, 1999, 368(9):245-250.
- [12] Ji-Tian Xu, Wen-Jun Xin, Ying Zang, et al. The role of tumor necrosis factor-alpha in the neuropathic pain nduced by Lumbar 5 ventral root transection in rat [J]. *Pain*, 2006, 123(7):306-321.
- [13] Shu-Huei Tsa. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NF $\kappa$ B in macrophages by resveratrol [J]. *Br J Pharmac*, 1999, 25(6):29-31.
- [14] Bennett MI, Simpson KH. Gabapentin in the treatment of neuropathic pain [J]. *Palliat Med*, 2004, 18(1):5-11.

(编辑 孙慧兰)