

枸杞多糖的抗炎镇痛作用研究

杜军霞*, 官彬彬, 宋 菲, 盖璐楠

邢台学院生物科学与工程学院, 邢台 054001

摘要:为研究枸杞多糖的抗炎镇痛效应及其潜在分子机制,采用小鼠热板实验、小鼠福尔马林炎症疼痛模型和原代培养的背根神经节神经元细胞对疼痛指标和炎症相关分子进行了检测。实验结果显示枸杞多糖能显著缓解后足注射福尔马林引起的动物 II 相痛表现 ($P < 0.05$),减少动物两后足重量差值 ($P < 0.001$)和血液 ($P < 0.001$)、脊髓 ($P < 0.05$)组织中白细胞介素 6 的含量,而对小鼠热板潜伏期无明显影响;枸杞多糖降低原代培养的 DRG 细胞膜上 TRPV1 介导的钙信号 ($P < 0.05$)。结果证明枸杞多糖具有良好的抗炎镇痛作用,其镇痛机制可能与降低炎症因子白细胞介素 6 表达及其引起的 TRPV1 活性增加有关。

关键词:枸杞多糖;炎症痛;福尔马林;白细胞介素 6;TRPV1

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0236-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.009

Anti-inflammatory and analgesic effects of *Lycium barbarum* polysaccharides

DU Jun-xia*, GONG Bin-bin, SONG Fei, GE Lu-nan

College of Biological Science and Engineering, Xingtai University, Xingtai 054001, China

Abstract: To study the anti-inflammatory and analgesic effects of *Lycium barbarum* polysaccharides and its potential molecular mechanism, pain index and inflammation related molecules were detected during hot plate test, formalin pain experiment and primary cultured dorsal root ganglia neuron cells in mice. The data showed that *Lycium barbarum* polysaccharides significantly alleviated the II phase pain ($P < 0.05$) caused by the injection of Formalin, reducing the weight difference of two hind feet ($P < 0.001$) and the content of interleukin 6 in the blood ($P < 0.001$) and spinal cord tissue ($P < 0.05$), while had no effect on the latent period of hot plate in mice; *Lycium barbarum* polysaccharide reduced the function of TRPV1 on the primary cultured DRG cell ($P < 0.05$). The result proved that *Lycium barbarum* polysaccharide has a good anti-inflammatory and analgesic effect, and its analgesic mechanism may be related to decreasing the expression of interleukin 6 and the followed increase of TRPV1 activity.

Key words: *Lycium barbarum* polysaccharides; inflammatory pain; formalin; IL-6; TRPV1

枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP)是枸杞中主要生物活性成分之一,具有抗辐射、抗肿瘤、降血糖等多种药理作用^[1,2]。研究显示 LBP 能够提高机体特异性免疫及机体自然杀伤细胞的杀伤力,提升白细胞水平,对脾脏和胸腺 T 细胞有刺激作用,还能增强机体的细胞免疫和体液免疫功能,同时也表现出显著的抗炎作用^[3,4],体外研究证明 LBP 能够降低致炎因子一氧化氮(NO)、前列腺素 E₂(PGE₂)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)等分子的含量,并且显著抑制

了炎症相关蛋白 ERK、p38、MAPK 等的基因表达,表现出良好的抗炎作用^[3]。炎症往往伴随着慢性疼痛出现,即炎症痛,其发生发展过程与外周致炎因子的含量有关,更重要的是发生在神经系统内部的敏化机制。有研究显示 LBP 能够明显缓解了坐骨神经损伤模型大鼠的自噬和疼痛现象,同时抑制了神经瘤的形成^[5],但关于 LBP 在体的抗炎和镇痛作用的报道少见。本文通过小鼠福尔马林炎症疼痛模型,观察 LBP 的抗炎镇痛作用并对其抗炎症痛作用的分子机制进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级昆明小鼠 20 ~ 22 g, 雄性 30 只, 雌性 20

收稿日期:2018-06-26

接受日期:2018-12-28

基金项目:邢台市科技人才资助计划(2016ZZ051);邢台学院校级重点课题(XTXYZD006)

* 通信作者 Tel:86-319-3650099; E-mail:dujunxiahxq@163.com

只,购于河北医科大学实验动物中心(许可证号:SCXK(冀)2018-004);出生后7~8天大鼠,购于北京大学医学部实验动物中心(许可证号:SCXK(京)2016-0010)。

1.2 主要实验材料和试剂

枸杞多糖(LBP)(北京源叶生物公司),小鼠IL-6ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,1706H),38%甲醛溶液,Neurobasal试剂(Invitrogen),Fura-2AM(Biotium),辣椒素(Enzo Life Sciences),2.5 M KCl(Sigma),PBS(NaCl 8 g,Na₂HPO₄·PO₂O 2.08 g,KCl 0.2 g,KH₂PO₄ 0.2 g溶于800 mL ddH₂O中,调pH值至7.2~7.4,定容至1 L),ES液(NaCl 7.6 g,KCl 0.37 g,KH₂PO₄0.272 g,CaCl₂0.277 5,MgCl₂0.095 g,HEPES 2.383 1 g,glucose 1.8 g,溶于900 mL dd H₂O中,溶解完全后调pH值至7.2,定容至1 L,用蔗糖调节渗透压至295~300 mOsm)。

1.3 动物行为学实验

1.3.1 小鼠热板实验

雌性昆明小鼠20只,随机分为对照组(Ctr)和实验组(LBP),灌胃给药前分别将小鼠放入52℃恒温水浴板上,以小鼠舔足为指标,观察记录小鼠热板潜伏期作为基值,之后两组分别灌胃给予生理盐水(2 mL/kg体重)或LBP(20 mg/kg体重)溶液,连续7天,1次/天,于最后一次灌胃30 min后进行热板实验,记录小鼠热板潜伏期,并与基值作比值来反映LBP对热板反应潜伏期的影响。

1.3.2 小鼠福尔马林炎症模型实验

雄性昆明小鼠30只随机分为对照组(Ctr)、模型组(FM)、实验组(LBP)三组。模型组和实验组分别灌胃生理盐水(2 mL/kg体重)和LBP(20 mg/kg体重)连续7天,1次/天,于最后一次灌胃后在右后足皮下注射1%福尔马林20 μL,观察并记录小鼠的I相和II相自发痛行为。

1.4 IL-6的检测

福尔马林痛模型4 h后迅速摘眼球取血,将血液室温静置40 min,取上层血清备用。取血后小鼠经断头处死,迅速用手术剪纵向剪开背部皮肤,取下颈椎至尾椎部位的脊柱,用灌有4℃预冷生理盐水的20 mL注射器将脊髓从椎管中推出,取其腰膨大处约1.5 cm长度的组织,用预冷PBS溶液进行冰上研磨20 min,4℃10 000 rpm离心5 min,并取上清备用。采用小鼠IL-6分子ELISA试剂盒对血清和脊髓裂解液中的IL-6进行检测。

1.5 钙成像实验

原代培养出生后7~8天的大鼠DRG组织细胞,正常培养2~3天后换用LBP(80 μg/mL)(LBP组)或生理盐水(Ctr组)进行预处理6 h,用ES液轻洗细胞两次,加入适量稀释于ES液的终浓度5 M Fura2-AM,室温孵育40 min,换为ES液,室温恢复1 h后,于钙成像试验平台进行实验记录基础钙离子信号状况,信号稳定后加入1 μM辣椒素刺激,同时观察钙离子信号变化。以F₃₄₀/F₃₈₀比值变化代表细胞内钙离子浓度变化。利用2.5 M KCl对神经元进行刺激,以排除整体活性低和状态较差的细胞。

1.6 数据统计

数据处理采用t检验(t-tests)和多因素方差分析(Two-way ANOVA),数据分析及作图用Graph Pad Prism 5软件进行。

2 结果

2.1 LBP对生理性热痛觉影响

为检测LBP对生理性痛觉的影响,进行热板实验,结果显示,LBP处理前后,小鼠的热板反应潜伏期变化不明显,热板反应潜伏期与基值的百分比与对照组(Ctr)小鼠相比并无显著性差异(图1),说明LBP对于小鼠的正常生理性热痛觉感受功能没有明显影响。

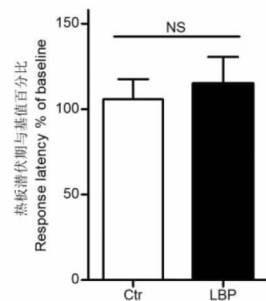


图1 LBP对小鼠热板实验潜伏期的影响

Fig. 1 The effect of LBP on latent period of hot plate test
注:NS代表LBP组和对照组比较,无显著性差异。

Note: NS showed no significant difference between LBP group and saline control group.

2.2 LBP对福尔马林炎症痛模型具有镇痛作用

给小鼠右后足底注射1%福尔马林20 μL,模型组(FM)小鼠出现明显的两相疼痛,与空白对照组小鼠相比出现典型的自发痛行为表现。LBP组的小鼠I相痛和模型组相比没有出现差异,但在II相痛15~25 min期间,每5 min舔足和抬足时间显著降低,与模型组相比,具有显著性差异($P < 0.05$)(图2),证明枸杞多糖对于福尔马林炎症痛引起的II相痛

的确具有良好的缓解作用。对照组 (Ctr) 小鼠未进行任何处理,用于证明福尔马林模型的稳定性。

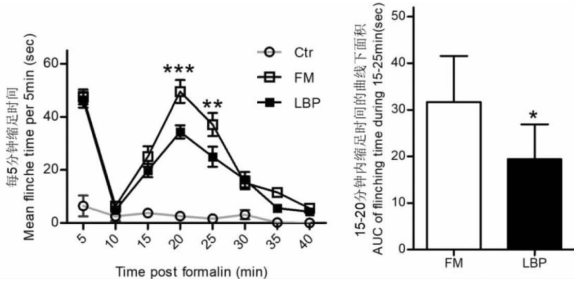


图2 LBP对福尔马林炎症痛模型小鼠的镇痛作用

Fig.2 Analgesic effect of LBP on formalin induced inflammatory pain in mice

注:*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ LBP组与模型组比较。

Note:*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ LBP group was compared with model control group.

2.3 LBP缓解福尔马林诱发的炎症表现

注射福尔马林4h后将小鼠脱臼处死,称取其两侧后足重量并进行比较,结果显示,三组小鼠左后

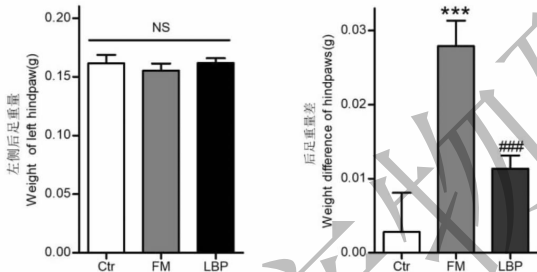


图3 LBP对福尔马林注射足重量的影响

Fig.3 Effect of LBP on foot weight of formalin injected mice 注:NS代表三组相比无显著性差异;*** $P < 0.001$ 模型组和空白对照组相比;### $P < 0.001$ LBP组与模型组比较。

Note: NS showed no significant difference between the three groups;*** $P < 0.001$ model control group and blank control group were compared;### $P < 0.001$ LBP group and model control group were compared.

足质量均无差异,而模型组小鼠的两后足重量差与正常对照组相比增加,具有显著性差异($P < 0.001$),LBP组小鼠的两后足重量差与模型组相比有所减少,具有显著性差异($P < 0.001$)(图3)。

2.4 LBP降低福尔马林引起的炎症因子释放

注射福尔马林4h后,取外周血液及脊髓组织并检测其中的IL-6含量。结果显示模型组小鼠的血清中和脊髓组织中的IL-6的含量均显著增加,与空白对照组相比具有统计学差异($P < 0.001$),而

LBP组小鼠的血清及脊髓组织IL-6含量升高程度明显受到抑制,与模型组相比,具有统计学差异($P < 0.001$ 、 $P < 0.05$)(图4),提示LBP能够同时降低外周和神经中枢内的炎症因子释放。

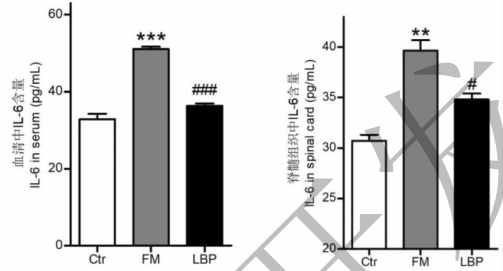


图4 LBP对小鼠组织中IL-6含量的影响

Fig.4 Effect of LBP on the content of IL-6 in mouse tissues 注:*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ 模型组与空白对照组相比;### $P < 0.001$,# $P < 0.05$ LBP组与模型组相比。

Note:*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ model control group was compared with blank control group;### $P < 0.001$ and # $P < 0.05$ LBP group was compared with model control group.

2.5 LBP降低TRPV1的功能活性

LBP 80 $\mu\text{g/mL}$ 预处理原代培养的DRG神经元6h,进行钙成像实验,结果显示,LBP显著降低了1 μM 辣椒素刺激所引起的钙信号增加现象,加入辣椒素后0~1min内钙信号具有统计学差异,说明LBP减弱了离子通道TRPV1的功能活性(图5)。

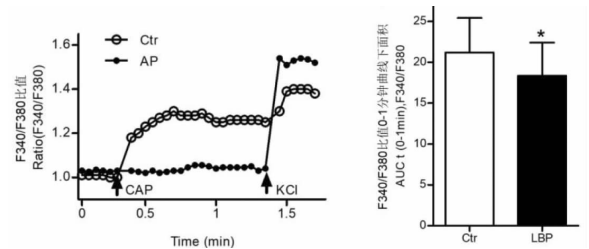


图5 LBP降低DRG神经元上TRPV1功能活性

Fig.5 LBP reduces TRPV1 functional activity on DRG neurons 注:* $P < 0.05$ LBP组与生理盐水对照组比较。

Note:* $P < 0.05$ LBP group was compared with saline control group.

3 讨论

疼痛不仅是一个世界范畴的医学问题,也是目前在人群中普遍存在的健康问题之一。疼痛的研究机制不明,现有药物有各自的副作用或欠佳的疗效,迄今为止临床上并无有效特异的治疗方法。多种生物的活性物质都有减轻炎症甚至缓解炎症痛的效果,但相关分子机制研究却少之又少,很大程度限制了天然消炎镇痛药物的临床应用。本实验结果一方

面通过在体实验中大鼠足部肿胀程度和血清中 IL-6 含量两种指标进一步验证了 LBP 的外周抗炎作用。另一方面值得注意的是, LBP 显著降低了福尔马林诱导的 II 相痛, 但对于 I 相痛没有明显影响, 用在体实验证明了 LBP 在此模型中的直接镇痛作用。由于 II 相痛与痛觉传导途径中的外周敏化和中枢敏化机制关系密切, 即痛觉传入神经元的外周端和脊髓水平的神经元可塑性有关, 多种痛觉相关信号分子都参与其中, 据此, LBP 对 II 相痛的抑制很可能通过影响神经系统痛觉敏化信号通路来实现。

组织损伤后多种炎症因子、致炎物质等参与到痛觉敏化过程中, 其中 IL-6 是一类前炎症因子, 据报道通过增强感觉神经元反应而与痛觉可塑性有密切联系^[6], 并且参与到痛觉敏化和中枢敏化的过程中^[7]。瞬时电压感受器阳离子通道, 子类 V, 成员 1 (Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1, TRPV1) 是痛觉敏化过程中重要的离子通道, 在骨癌痛模型中, 外周或中枢的 IL-6 均能够通过 JAK/PI3K 信号途径增强外周神经元 DRG 细胞膜上 TRPV1 的功能活性^[8]。因此, 本实验中 LBP 的抗炎症痛机制可能与降低 IL-6, 进一步降低了 IL-6 引起的 TRPV1 功能上调有关。我们的钙成像实验结果表明, 在原代培养的混有胶质细胞的 DRG 细胞中, LBP 预处理的确降低了 TRPV1 介导的钙离子信号(图 5), 与上述结论相符。目前, 枸杞多糖的抗炎作用已被公认, 但多数停留在体外实验, 并且关于 LBP 是否具有直接的镇痛作用尚无明确实验证实, 本论文通过福尔马林炎症实验模型证明 LBP 的确具有一定的抗炎和镇痛作用, 并初步发现该镇痛作用机制除了与外周抗炎途径有关之外, 也可能通过直接影响疼痛的神经传导通路来实现。由于炎症痛分子机制十分复杂, 有关 LBP 进一步的抗炎症痛效应和机制仍需要更进一步的研究。

致谢:感谢北京大学医学部王韵教授课题组及北京大学医学部神经科学研究所为本研究提供原代神经元培养实验及钙成像实验平台。

参考文献

- 1 Nan YY, Yong XF, Wang LX, et al. Advances in pharmacology of *Lycium barbarum* polysaccharides [J]. Tianjin Med J, 2014, 31: 763-765.
- 2 Li GL, Liu YJ, Suo YR. Advance in Study on *Lyceum barbarum* polysaccharides [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2010, 22: 245-250.
- 3 YC Oh, WK Cho, GY Im, et al. Anti-inflammatory effect of Lycium fruit water extract in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264. 7 macrophage cells [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 13: 181-189.
- 4 Song MY, Jung HW, Kang SY, et al. Anti-Inflammatory Effect of Lycii radices in LPS-Stimulated RAW 264. 7 Macrophages [J]. Am J Chinese Med, 2014, 42: 891-904.
- 5 Fan HW, Deng CR, Fu J, et al. Effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on traumatic neuroma formation and pain after sciatic nerve rupture in rats [J]. Chin J Reparative Reconstructive Surg, 2010, 11: 1298-1301.
- 6 Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, et al. IL-6-and NGF-induced rapid control of protein synthesis and nociceptive plasticity via convergent signaling to the eIF4F complex [J]. J Neurosci, 2010, 30: 15113-23.
- 7 Li QY, Xu HY, Yang HJ. Effect of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6 on neuropathic pain [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42: 3709-3712.
- 8 Fang D, Kong LY, Cai J, et al. Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model [J]. Pain, 2015, 156: 1124-44.