

磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶在银杏叶提取物缓解神经病理性疼痛中的作用

邹锋 陈军 焦志华 曹译匀 钟文晖 王爱忠

上海市第六人民医院东院麻醉科 201306

通信作者: 王爱忠, Email: zoufengsh@126.com

【摘要】 目的 探讨磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK)在银杏叶提取物(Ginkgo biloba extract, EGb761)缓解神经病理性疼痛中的作用。方法 采用随机数字表法将 90 只雄性 SD 大鼠分成 5 组(每组 18 只):假手术组(Sham 组)、坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)组(CCI 组)、EGb761 50 mg/kg+CCI 组(EGb50 组)、EGb761 100 mg/kg+CCI 组(EGb100 组)、溶剂对照+CCI 组(SC 组)。CCI 组大鼠分离并结扎左侧坐骨神经, Sham 组大鼠只分离神经不结扎;其余各组于造模成功后第 3 天开始腹腔注射 EGb761 或者溶剂,持续到术后 14 d。分别于术前 2 d 和术后 1、3、5、7、10、14 d 测定机械刺激缩足反射阈值(paw mechanical withdrawal threshold, PMWT)和热刺激缩足反射潜伏期(paw withdraw thermal latency, PTWL),于术后 14 d 取同侧背根神经节,采用免疫组织化学和 Western blot 法检测背根神经节中 p-JNK 阳性细胞率及表达水平。结果 与 Sham 组比较, CCI 组和 SC 组术后各时间点 PMWT 和 PTWL 明显降低($P<0.05$), 术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率及表达水平明显升高($P<0.05$)。与 CCI 组比较, EGb50 组和 EGb100 组术后 7、10、14 d PMWT 和 PTWL 明显提高($P<0.05$), 术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率和表达水平明显降低($P<0.05$)。与 EGb50 组比较, EGb100 组术后 10、14 d PMWT、PTWL 明显升高($P<0.05$), 术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率和表达水平明显降低($P<0.05$)。结论 EGb761 可通过抑制背根神经节 p-JNK 的表达而缓解 CCI 大鼠神经病理性疼痛。

【关键词】 神经病理性疼痛; 银杏叶提取物; 磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.10.002

The role of phosphorylated c-Jun N-terminal kinase in Ginkgo biloba extract in ameliorating neuropathic pain

Zou Feng, Chen Jun, Jiao Zhihua, Cao Yiyun, Zhong Wenhui, Wang Aizhong

Department of Anesthesiology, Shanghai Sixth People's Eastern Hospital, Shanghai 201306, China

Corresponding author: Wang Aizhong, Email: zoufengsh@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) in Ginkgo biloba extract (EGb761) to alleviate neuropathic pain. **Methods** A total of 90 male SD rats were randomly divided into 5 groups ($n=18$): a sham operation group (group Sham), chronic constriction injury group (group CCI), EGb 50 mg/kg+CCI group (group EGb50), EGb 100 mg/kg+CCI group (group EGb100) and a solvent control+CCI group (group SC). Rats in group CCI were subjected to ligation of the left sciatic nerve, while those in group Sham underwent nerve separation without ligation. Other groups were intraperitoneally injected with EGb761 or solvent from day 3 after successful modeling to 14 d after surgery. Paw withdraw thermal latency (PTWL) and paw mechanical withdrawal threshold (PMWT) were measured 2 d before and 1, 3, 5, 7, 10 d and 14 d after surgery. Then, the ipsilateral dorsal root ganglion were collected on 14 d after surgery. The levels of p-JNK in the dorsal root ganglion and spinal dorsal horn were determined by immunochemistry and Western blot. **Results** Compared with group Sham, groups CCI and SC showed remarkable decreases in PMWT and PTWL at each time points ($P<0.05$), and marked increases in the positive rate and levels of p-JNK in the dorsal root ganglion 14 d after surgery ($P<0.05$). Compared with group CCI, groups EGb50 and EGb100 showed remarkable increases in PMWT and PTWL 7, 10 d and 14 d after surgery ($P<0.05$), and marked decreases in the positive rate and levels of p-JNK ($P<0.05$). Compared with group EGb50, group EGb100 showed remarkable increases in PMWT and PTWL 10 d and 14 d after surgery ($P<0.05$), and presented substantial decreases in the positive rate and levels of p-JNK in the dorsal root ganglion 14 d after surgery ($P<0.05$). **Conclusions** EGb761 may ameliorate neuropathic pain of rats with CCI through inhibiting the expression of p-JNK in the dorsal root ganglia.

【Key words】 Neuropathic pain; Ginkgo biloba extract; Phosphorylated c-Jun N-terminal kinase

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.10.002

银杏叶提取物 (Ginkgo biloba extract, EGb761) 是从银杏叶中提取的有效药用成分, 主要包括黄酮类、萜类、酚类、氨基酸类等多种化学成分^[1]。研究表明 EGb761 能有效缓解甲醛足底炎性疼痛大鼠模型的舔足次数, 能够缓解神经病理性疼痛的机械痛敏和冷痛敏, 能够增加间歇性跛行患者无痛行走距离^[2], 但其缓解疼痛的机制有待进一步探讨。研究显示, c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号通路的激活与神经病理性疼痛有密切关系^[3]。本研究将探讨磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun N-terminal kinase, p-JNK) 在 EGb761 缓解神经病理性疼痛的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠 90 只 (体重 220~250 g), 由上海交通大学医学院实验动物中心提供。本实验组研究操作程序均经上海交通大学动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 坐骨神经慢性压迫损伤 (chronic constriction injury, CCI) 模型建立

参照 Bennett 和 Xie^[4]的研究方法建立 CCI 模型。在戊巴比妥钠 (生产批号: 57-33-0, 上海市容创生物技术有限公司) 麻醉下, 于左侧大腿中部逐层切开皮肤肌肉, 暴露坐骨神经, 在接近分叉处用 4-0 铬制肠线结扎 4 道, 两道之间间隔 1 mm, 然后逐层缝合切口。

1.2.2 动物分组

采用随机数字表法将 SD 大鼠分成 5 组 (每组 18 只): 假手术组 (Sham 组)、慢性坐骨神经结扎损伤组 (CCI 组)、EGb761 50 mg/kg+CCI 组 (EGb50 组)、EGb761 100 mg/kg+CCI 组 (EGb100 组)、溶剂对照+CCI 组 (SC 组)。CCI 组大鼠分离并结扎左侧坐骨神经, Sham 组大鼠只分离神经不结扎; 其余各组于造模成功后第 3 天开始腹腔注射 EGb761 (生产批号: ST-1101, 桂林思特新技术公司天然植物制品厂) 50、100 mg/kg 或者等体积溶剂, 持续到术后 14 d。

1.2.3 行为学测定

分别于术前 2 d 及术后 1、3、5、7、10、14 d 测定机械刺激缩足反射阈值 (paw mechanical withdrawal threshold, PMWT) 和热刺激缩足反射潜伏期 (paw withdraw thermal latency, PWTL)。测定时间固定于

每日 10:00~14:00, 室温维持在 (24.0±0.5) °C。

1.2.4 免疫组织化学法测定

术后 14 d 取大鼠术侧 L₄、L₅ 背根神经节, 用免疫组织化学法测定背根神经节 p-JNK 的表达, 顺序间隔 3 张选 1 张在光学显微镜下计数 p-JNK 阳性神经元, 并计算 p-JNK 阳性细胞率 (p-JNK 阳性神经元占总神经元数的百分比)。

1.2.5 Western blot

术后 14 d 取大鼠术侧 L₄、L₅ 背根神经节, 采用 Western blot 法检测 p-JNK [p-JNK 抗体 (SC-293137, Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国)] 的表达水平。使用 Image J 图像分析软件测定蛋白条带灰度值, 以 p-JNK/α-tubulin 灰度值的比值反映 p-JNK 表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}±s$) 表示, 数据用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验, 用 Leven 法进行方差齐性检验。组内不同时间点比较采用重复测量数据的方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

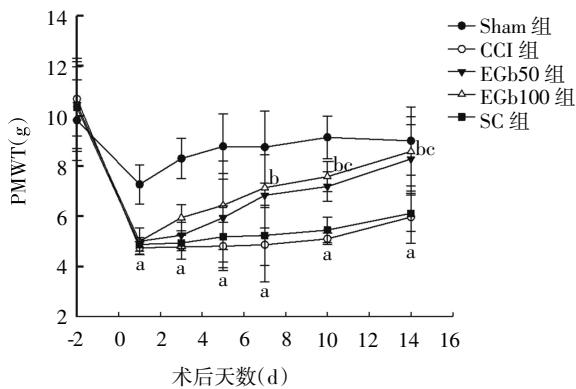
2 结果

2.1 EGb761 对各组大鼠 PMWT 和 PTWL 的影响

各组大鼠术前 2 d PMWT、PTWL (基础值) 差异无统计学意义 (P>0.05)。Sham 组术后各时点 PMWT、PTWL 比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。与 Sham 组比较, CCI 组和 SC 组术后各时间点 PMWT、PTWL 明显降低 (P<0.05)。与 CCI 组比较, EGb50 组和 EGb100 组术后 7、10、14 d PMWT、PTWL 明显升高 (P<0.05); 与 EGb50 组比较, EGb100 组术后 10、14 d PMWT、PTWL 明显升高 (P<0.05)。SC 组与 CCI 组各时点 PMWT 和 PTWL 比较, 差异无统计学意义 (P>0.05, 图 1、图 2)。

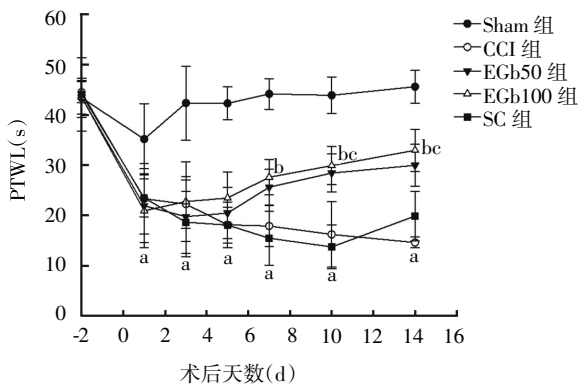
2.2 术后 14 d, EGb761 对背根神经节 p-JNK 表达的影响

与 Sham 组比较, CCI 组和 SC 组术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率及表达水平明显升高 (P<0.05); 与 CCI 组比较, EGb50 组和 EGb100 组术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率和表达水平明显降低 (P<0.05); 与 EGb50 组比较, EGb100 组术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率和表达水平明显降低 (P<0.05, 图 3、图 4、图 5)。



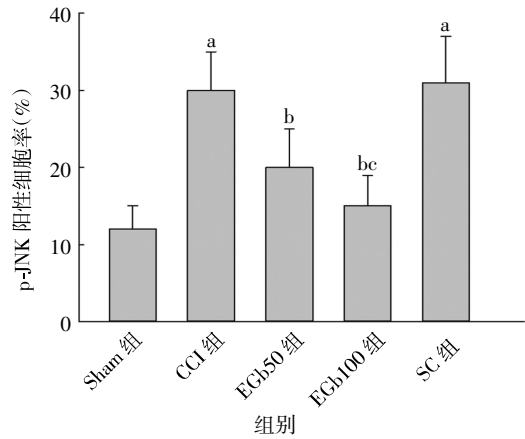
注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CCI 组比较, ^b*P*<0.05;与 EGb50 组比较, ^c*P*<0.05; Sham 组:假手术组;CCI 组:坐骨神经慢性压迫损伤组;EGb50 组:EGb761 50 mg/kg+CCI 组;EGb100 组:EGb761 100 mg/kg+CCI 组;SC 组:溶剂对照+CCI 组;EGb761:银杏叶提取物;CCI:坐骨神经慢性压迫损伤;PMWT:机械刺激缩足反射阈值

图 1 EGb761 对各组大鼠各时点 PMWT 的影响比较



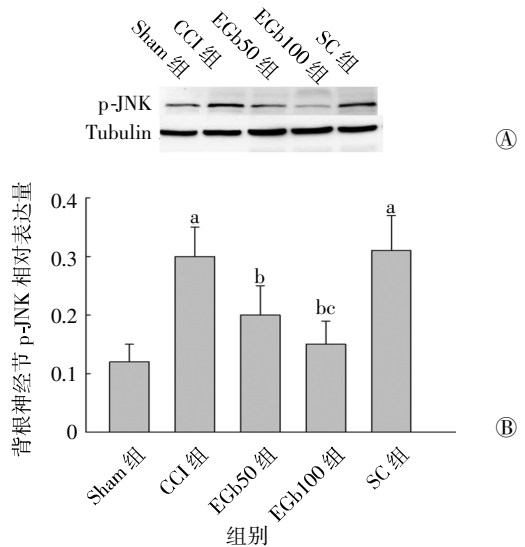
注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CCI 组比较, ^b*P*<0.05;与 EGb50 组比较, ^c*P*<0.05; Sham 组:假手术组;CCI 组:坐骨神经慢性压迫损伤组;EGb50 组:EGb761 50 mg/kg+CCI 组;EGb100 组:EGb761 100 mg/kg+CCI 组;SC 组:溶剂对照+CCI 组;EGb761:银杏叶提取物;CCI:坐骨神经慢性压迫损伤;PTWL:热刺激缩足反射潜伏期

图 2 EGb761 对各组大鼠各时点 PTWL 的影响比较



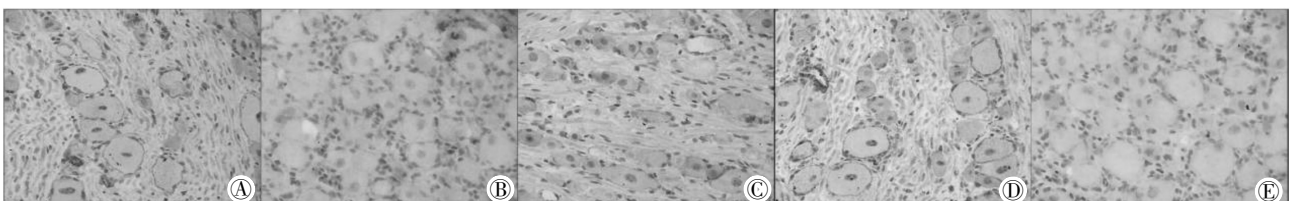
注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CCI 组比较, ^b*P*<0.05;与 EGb50 组比较, ^c*P*<0.05; Sham 组:假手术组;CCI 组:坐骨神经慢性压迫损伤组;EGb50 组:EGb761 50 mg/kg+CCI 组;EGb100 组:EGb761 100 mg/kg+CCI 组;SC 组:溶剂对照+CCI 组;EGb761:银杏叶提取物;CCI:坐骨神经慢性压迫损伤;p-JNK:磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶

图 4 各组大鼠术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性细胞率比较



注:与 Sham 组比较, ^a*P*<0.05;与 CCI 组比较, ^b*P*<0.05;与 EGb50 组比较, ^c*P*<0.05; Sham 组:假手术组;CCI 组:坐骨神经慢性压迫损伤组;EGb50 组:EGb761 50 mg/kg+CCI 组;EGb100 组:EGb761 100 mg/kg+CCI 组;SC 组:溶剂对照+CCI 组;EGb761:银杏叶提取物;CCI:坐骨神经慢性压迫损伤;p-JNK:磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶

图 5 各组大鼠术后 14 d 背根神经节 p-JNK 表达情况比较 A: Western blot 检测中的电泳图;B: 各组大鼠 p-JNK 表达水平比较



注:EGb761:银杏叶提取物;CCI:坐骨神经慢性压迫损伤;p-JNK:磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶

图 3 各组大鼠术后 14 d 背根神经节 p-JNK 阳性神经元表达情况 (×200) A: Sham 组(假手术组);B: CCI 组(坐骨神经慢性压迫损伤组);C: EGb50 组(EGb761 50 mg/kg+CCI 组);D: EGb100 组(EGb761 100 mg/kg+CCI 组);E: SC 组(溶剂对照+CCI 组)

3 讨论

本研究发现 EGb761 能明显缓解大鼠 CCI 所致的神经病理性疼痛,且 EGb 100 mg/kg 的效果优于 EGb 50 mg/kg;进一步研究发现其缓解神经病理性疼痛作用的机制可能与抑制背根神经节中的 p-JNK 表达有关。

银杏是世界上最古老的植物之一,被称为植物“活化石”。标准的银杏叶提取物(Ginkgo biloba extract)被国际通称为 EGb761,一般含有 24%的黄酮苷类及 5%~7%的银杏叶中独一无二的萜烯类^[1]。Zhu 等^[5]研究发现 EGb761 腹腔注射可以缓解神经病理性疼痛所致的痛觉过敏,且作用呈剂量相关性;最近又有研究表明氧自由基的活化是参与神经病理性疼痛发病和维持的主要机制之一,EGb761 可以通过清除氧自由基缓解神经病理性疼痛^[2]。神经损伤后引起氧自由基过量产生,氧自由基具有广泛的酶激活作用,可激活 JNK 通路所介导神经病理性疼痛的发生和发展过程^[6]。

JNK 是丝裂原活化蛋白激酶家族成员之一,被激活之后从细胞质转移至细胞核调控相关基因来控制细胞因子的表达^[7]。研究发现,大鼠在正常情况下脊髓背角和背根神经节中 p-JNK 表达很少,但在外周神经损伤后,大鼠脊髓背角和背根神经节中 p-JNK 表达明显升高,说明 p-JNK 在神经病理性疼痛的发生和发展过程中发挥了重要的作用^[8]。本研究发现 EGb761 能够抑制 p-JNK 在脊髓背角和背根神经节中的表达并逆转 CCI 所诱发的痛觉过敏。

因此,本研究推测神经损伤后引起氧自由基大量产生,氧自由基激活 JNK 信号通路参与神经病理

性疼痛的产生和维持。EGb761 通过清除氧自由基,抑制 p-JNK 在脊髓背角和背根神经节中的表达,最终达到缓解神经病理性疼痛的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李思佳,耿剑亮,张悦,等.银杏药理作用研究进展[J].药物评价研究,2017,40(6):731-741. DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2017.06.002.
- [2] Yu X, Chen C, Ke Q, et al. EGb761 ameliorates neuropathic pain by scavenging reactive oxygen species[J]. Pharmacology, 2015, 95(5-6): 293-299. DOI:10.1159/000430769.
- [3] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain[J/OL]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17002. DOI:10.1038/nrdp.2017.2.
- [4] Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33(1): 87-107. DOI:10.1016/0304-3959(88)90209-6.
- [5] Zhu C, Li W, Xu F, et al. Effects of ginkgo biloba extract EGb-761 on neuropathic pain in mice: involvement of opioid system[J]. Phytother Res, 2016, 30(11): 1809-1816. DOI:10.1002/ptr.5685.
- [6] Choi DC, Lee JY, Lim EJ, et al. Inhibition of ROS-induced p38MAPK and ERK activation in microglia by acupuncture relieves neuropathic pain after spinal cord injury in rats [J]. Exp Neurol, 2012, 236(2): 268-282. DOI:10.1016/j.expneurol.2012.05.014.
- [7] Kasuya Y, Umezawa H, Hatano M. Stress-activated protein kinases in spinal cord injury: focus on roles of p38 [J/OL]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): E867. DOI:10.3390/ijms19030867.
- [8] 郑昌建,胡涵,曹红,等. JNK/MCP-1 信号通路在姜黄素抗糖尿病神经病理性疼痛中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(11): 1941-1945. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2014.11.004.

(本文编辑:张丽)