

## 川芎嗪对大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤 L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体表达的影响

高云<sup>1</sup>, 梁尚栋<sup>1\*</sup>, 穆松牛<sup>2</sup>, 刘征宇<sup>3</sup>, 姜建梅<sup>3</sup>, 徐昌水<sup>1</sup>, 张春平<sup>1</sup>

(南昌大学 1. 基础医学院生理学教研室, 2. 实验动物科学部, 3. 实验教学部, 江西 南昌 330006)

**摘要:** 目的 探讨川芎嗪抑制 P2X<sub>3</sub> 受体介导慢性神经病理痛的作用途径。方法 制备大鼠坐骨神经慢性压迫性损伤 (CCI) 神经病理痛模型, 于 d 2 起 ip 川芎嗪 100 mg·kg<sup>-1</sup>, 每天 1 次, 共 14 d。免疫组织化学法观察 CCI 大鼠 L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体的表达, 全细胞膜片钳技术测定新鲜分离的 L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节三磷酸腺苷 (ATP) 和  $\alpha, \beta$ -亚甲基三磷酸腺苷 ( $\alpha, \beta$ -meATP) 激活的电流。结果 与正常对照组比较, 正常大鼠 ip 川芎嗪 14 d, L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体表达、ATP 激活电流和  $\alpha, \beta$ -meATP 激活电流无明显变化, 假手术组亦无明显变化。与假手术组比较, CCI 模型组大鼠 L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体的表达、ATP 和  $\alpha, \beta$ -meATP 激活电流明显增强。CCI 大鼠 ip 川芎嗪 14 d, L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体表达、ATP 和  $\alpha, \beta$ -meATP 激活电流较 CCI 模型组明显降低。结论 川芎嗪可抑制 CCI 大鼠 L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体的表达, 从而对 P2X<sub>3</sub> 受体介导的神经病理痛产生抑制作用。

**关键词:** 川芎嗪; 神经痛; 神经节, 脊; 受体, 嘌呤 P2

**中图分类号:** R972.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-3002(2008)06-0412-07

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.06.003

三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 以及

收稿日期: 2008-01-16 接受日期: 2008-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30260030); 江西省自然科学基金项目 (2007GZY1002)

作者简介: 高云 (1973-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 神经生理学和药理学, Tel: (0791) 6360586, E-mail: gaoyun90@163.com; 梁尚栋 (1957-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经生理和神经药理学。

\* 联系作者 E-mail: liangsd@hotmail.com

代谢产物二磷酸腺苷、一磷酸腺苷和腺苷作用于嘌呤受体产生信息传递作用<sup>[1]</sup>。嘌呤受体分为 P1 和 P2 受体, P2 受体可分为 P2X 和 P2Y 受体。ATP 及其类似物兴奋 P2X 受体, 在外周传递痛觉信号<sup>[2-4]</sup>。由于神经病理痛持续时间长, 对身心健康危害较大, 成为疼痛领域的研究热点。神经病理痛刺激时, P2X<sub>3</sub> 受体蛋白和 mRNA 表达增加<sup>[5]</sup>, 表明 P2X<sub>3</sub> 受体介导神经病理痛的痛觉传递。

川芎嗪 (ligustrazine) 是中药川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 中提取的一种生物碱, 用于心脑血管疾病的治疗。据报道, 川芎嗪可抑制 ATP 兴奋交感神经节细胞 P2X 受体诱发的去极化电位, 拮抗 P2X<sub>3</sub> 受体激动剂在大鼠足底产生的伤害性反应<sup>[6]</sup>; 还可缓解坐骨神经慢性压迫性损伤 (chronic constriction injury, CCI) 大鼠的神经病理痛<sup>[7]</sup>, 表明川芎嗪对 P2X<sub>3</sub> 受体介导的痛觉具有抑制作用。但川芎嗪对 P2X<sub>3</sub> 受体介导慢性神经病理痛的作用途径尚不清楚。本研究观察川芎嗪对神经病理痛模型大鼠 L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> 段背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 神经元 P2X<sub>3</sub> 受体表达的影响, 探讨其对 P2X<sub>3</sub> 受体介导慢性神经病理痛的作用途径。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药物、主要试剂和仪器

川芎嗪注射液, 广东南国药业有限公司, 批号: 050104, 纯度 99.9%, 浓度为 146.84 mol·L<sup>-1</sup>, 给药前用生理盐水稀释; ATP 和  $\alpha, \beta$ -亚甲基三磷酸腺苷 ( $\alpha, \beta$ -methylene-ATP,  $\alpha, \beta$ -meATP), Sigma 公司; 兔抗大鼠 P2X<sub>3</sub> 单克隆抗体, 美国 Chemicon International 公司; 链霉抗生物素蛋白-过氧化物酶 (SP) 试剂盒和二氨基联苯胺试剂盒, 北京中山生物技术有限公司; 硫喷妥钠, 上海新亚药业有限公司。HMIAS-2000 高清晰彩色医学图文分析系统, 武汉天平影像技术有限公司; CEZ-2400 型膜片钳放大器,

日本Nihon-Kohden公司;BME-403 Von Frey 细丝,中国医学科学院生物医学工程研究所;BME-410C 型全自动热痛刺激仪,中国医学科学院生物医学工程研究所。

### 1.2 动物分组及慢性神经病理痛模型制备<sup>[8]</sup>

雄性SD大鼠,220~250 g,南昌大学医学院实验动物科学部提供,动物许可证号:SCXK(赣)2005-0001。将大鼠随机分为5组,即正常对照、川芎嗪、假手术、CCI模型和CCI+川芎嗪组,每组12只(测定背根神经节P2X<sub>3</sub>受体表达和ATP或 $\alpha$ 、 $\beta$ -meATP激活电流各6只,手术当天为d1)。假手术组切开皮肤暴露坐骨神经,不结扎即缝合皮肤;CCI模型和CCI+川芎嗪组用硫喷妥钠(30 mg·kg<sup>-1</sup>,ip)麻醉大鼠,无菌条件下于大鼠右后肢外侧切开皮肤,钝性分离坐骨神经,以4-0 含铬肠线轻度结扎坐骨神经,共结扎4道,每个结之间间隔约1 mm。结扎过程中可见坐骨神经被结扎处直径略减小,并伴有右后肢一过性抽动,注意不能结扎太紧,防止完全阻断神经外周的血流。结扎后将创口缝合,单笼饲养。大鼠术后均未见肢体运动障碍和自残现象。正常对照、假手术和CCI模型组于术后d2开始,每天ip等体积生理盐水;川芎嗪和CCI+川芎嗪组于术后d2开始每天ip川芎嗪100 mg·kg<sup>-1</sup>,共14 d。

### 1.3 大鼠术后机械缩足反射阈值和热缩足反射潜伏期测定

大鼠术后单笼饲养,分别于术前(d0)及术后d2,4,6,8,10,12和15测量机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT)和热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL),测定时间固定于每天10:00-14:00,室温维持在21.5~22.5℃。用BME-403 Von Frey 细丝测定MWT。用BME-410C 型全自动热痛刺激仪测定TWL。

### 1.4 免疫组织化学法测定背根神经节P2X<sub>3</sub>受体的表达

各组大鼠于术后d15用硫喷妥钠麻醉,直接断头后分离并取出右侧L<sub>4</sub>和L<sub>5</sub>段DRG,4%多聚甲醛固定2 h,20%蔗糖脱水,用恒冷箱切片机进行冰冻切片,厚度为15  $\mu$ m,于4%多聚甲醛保存。切片置0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>中作用5 min,常规PBS(pH 7.4)冲洗。放入SP试剂盒的封闭液中孵育30 min,弃去封闭液,加入1:2500稀释的兔抗大鼠P2X<sub>3</sub>抗体,4℃过夜。次日,经PBS常规冲洗后放入生物素化羊抗兔IgG作用30 min,PBS冲洗后加入辣根过氧化物酶

标记的链霉抗生物素工作液30 min,PBS冲洗后二氨基联苯胺显色5 min,放入PBS中终止显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。结果用图像分析系统软件分析神经元P2X<sub>3</sub>表达。每组6只大鼠,每只大鼠DRG做4~5张切片,每张切片观察4个视野,测定每个视野P2X<sub>3</sub>表达积分吸光度(integrated absorbance, IA)值,每组共有96~120个IA值,求出各组IA值的均数和标准差并进行分析。

### 1.5 全细胞膜片钳技术记录背根神经节ATP和 $\alpha$ 、 $\beta$ -meATP激活电流

大鼠DRG神经元分离方法参见文献[9]。处死大鼠,取出胸腰段脊柱,置于O<sub>2</sub>饱和的DMEM培养液(pH 7.4)中,取出L<sub>4</sub>和L<sub>5</sub>段神经节及相连的神经根和脊神经,在解剖显微镜下剪除相连的神经和周围结缔组织被膜,将手术侧即右侧DRG剪碎,置培养瓶内并加入胰蛋白酶0.5 g·L<sup>-1</sup>和胶原酶1.0 g·L<sup>-1</sup>,在恒温振荡水浴器(35℃,每分钟振荡80次)中孵育20~30 min,加入0.5 g·L<sup>-1</sup>胰蛋白酶抑制剂终止酶的消化作用。将上述酶和机械分离的DRG神经元转移至35 mm培养皿内,置于倒置显微镜的载物台上换液,静置30 min[细胞外液成分(mmol·L<sup>-1</sup>):NaCl 150, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, D-葡萄糖 10],选择圆形或椭圆形、胞体直径在25~40  $\mu$ m之间的细胞,应用全细胞膜片钳技术记录ATP激活电流( $I_{ATP}$ )或 $\alpha$ 、 $\beta$ -meATP激活电流,通过微操纵器移动快速换药装置的排管给药,每管直径为0.2 mm,管口距记录的细胞约100  $\mu$ m。给药时间<1 s,在每2次给药期间,间隔时间 $\geq$ 5 min(ATP浓度分别为1,3,10,30,100,300和1000  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, $\alpha$ 、 $\beta$ -meATP浓度为10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)。在电极与细胞膜之间形成高阻(1~10 G $\Omega$ )封接后进一步将膜吸穿,调节电容和串联电阻补偿[电极内液成分(mmol·L<sup>-1</sup>):KCl 140, CaCl<sub>2</sub> 1, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10, EGTA 11, ATP 4]。置保持电压于-60 mV,膜电流应用低通滤波(1 kHz, -3 dB)。由Cytoview软件记录电流的变化。 $I_{ATP}$ 以CCI模型组ATP 100  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>神经元激活电流为1进行标准化。ATP浓度-效应曲线按照下列公式绘制, $I_{ATP} = I_{max} / [1 + (EC_{50}/c)^n]$ ,式中 $I_{ATP}$ 为标准化后的ATP激活电流, $I_{max}$ 为标准化后的ATP激活电流最大值, $c$ 为ATP浓度, $EC_{50}$ 为ATP产生50%最大效应的浓度, $n$ 为Hill系数。实验在

20 ~ 30℃ 进行。

1.6 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较用单因素方差分析,继以 LSD 法进行两两比较。用 SPSS11.0 软件包进行数据处理。

2 结果

2.1 川芎嗪对 CCI 大鼠机械缩足反射阈值和热缩足反射潜伏期的影响

术后 d 2, CCI 模型组与假手术组比较, MWT 和 TWL 明显降低, 术后 d 6 ~ 15 更为明显, 表明 CCI 大鼠模型造模成功。CCI + 川芎嗪组与 CCI 模型组比较, MWT 和 TWL 明显增加, 接近假手术组水平(表 1, 表 2)。各组术后均未见大鼠肢体运动障碍和自残现象。

2.2 川芎嗪对 CCI 大鼠背根神经节 P2X<sub>3</sub> 受体表达的影响

术后 d 15 正常对照、川芎嗪和假手术组 DRG 神经元 P2X<sub>3</sub> 受体的表达无明显变化; CCI 模型组较假手术组明显增强; CCI + 川芎嗪组较 CCI 模型组降低, 但仍高于假手术组; 假手术和单独使用川芎嗪对正常大鼠 P2X<sub>3</sub> 受体的表达无明显影响(表 3, 图 1)。

2.3 川芎嗪对 CCI 大鼠背根神经节 ATP 或  $\alpha, \beta$ -meATP 激活电流的影响

正常对照、川芎嗪、假手术、CCI 模型和 CCI + 川芎嗪组分别检测 34, 38, 39, 42 和 40 个细胞, 分别有 85.2%, 89.5%, 84.6%, 90.5% 和 87.5% DRG 神经元对外加 ATP 敏感,  $I_{ATP}$  显示快失敏和慢失敏 2 种形式的内向电流(图 2)。但相同浓度 ATP

Tab 1. Effect of ligustrazine (Lig) on mechanical withdrawal threshold of chronic constriction injury (CCI) rats

Group	Mechanical withdrawal threshold/g							
	d 0	d 2	d 4	d 6	d 8	d 10	d 12	d 15
Normal	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1
Lig	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1
Sham	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1	≥20.1
CCI model	≥20.1	13.8 ± 5.7 *	15.2 ± 4.7 *	10.5 ± 5.2 **	7.6 ± 1.9 **	4.2 ± 3.2 **	4.5 ± 3.4 **	3.7 ± 0.4 **
CCI + Lig	≥20.1	15.0 ± 5.8 *	15.1 ± 5.4 *	16.2 ± 4.3 #	17.4 ± 5.3 #	17.8 ± 4.3 #	16.0 ± 4.9 #	16.6 ± 3.3 #

The rats in CCI + Lig and Lig groups were given ip Lig 100 mg·kg<sup>-1</sup> once daily for 14 d from d 2 after the CCI rat model was prepared, while those in normal, sham and CCI model groups were given ip normal saline 5 mL·kg<sup>-1</sup>. The upper limit of mechanical withdrawal threshold detection was 20.1 g. d 0; the day before CCI rat model was prepared.  $\bar{x} \pm s$ , n = 6. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with sham group; # P < 0.05, compared with CCI model group.

Tab 2. Effect of ligustrazine on thermal withdrawal latency of CCI rats

Group	Thermal withdrawal latency/s							
	d 0	d 2	d 4	d 6	d 8	d 10	d 12	d 15
Normal	8.7 ± 0.4	8.0 ± 0.6	8.2 ± 0.5	8.8 ± 1.2	8.8 ± 0.9	8.3 ± 0.6	8.4 ± 0.8	8.7 ± 0.9
Lig	8.4 ± 0.7	8.1 ± 0.3	8.0 ± 1.2	8.4 ± 1.3	8.4 ± 0.6	8.2 ± 1.6	8.6 ± 0.4	8.2 ± 1.0
Sham	8.2 ± 0.7	8.6 ± 0.6	8.8 ± 1.5	8.4 ± 1.3	8.3 ± 0.7	8.2 ± 1.0	8.1 ± 0.9	8.7 ± 1.0
CCI model	8.4 ± 0.8	6.2 ± 1.4 **	4.4 ± 1.1 **	5.4 ± 1.2 **	3.6 ± 1.2 **	4.9 ± 1.0 **	3.3 ± 1.4 **	3.7 ± 1.4 **
CCI + Lig	8.6 ± 0.8	7.2 ± 0.5 **	6.6 ± 0.5 **	7.7 ± 0.9 ##	7.9 ± 1.4 ##	7.3 ± 0.9 ##	7.9 ± 0.5 ##	8.2 ± 0.7 ##

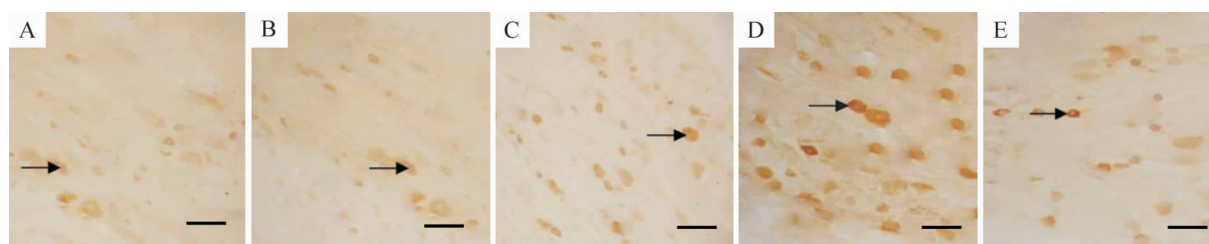
See Tab 1 for the rat treatments.  $\bar{x} \pm s$ , n = 6. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, compared with sham group; # P < 0.05, ## P < 0.01, compared with CCI model group.

**Tab 3. Effect of ligustrazine on expression of P2X<sub>3</sub> receptor in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> dorsal root ganglion (DRG) of CCI rats**

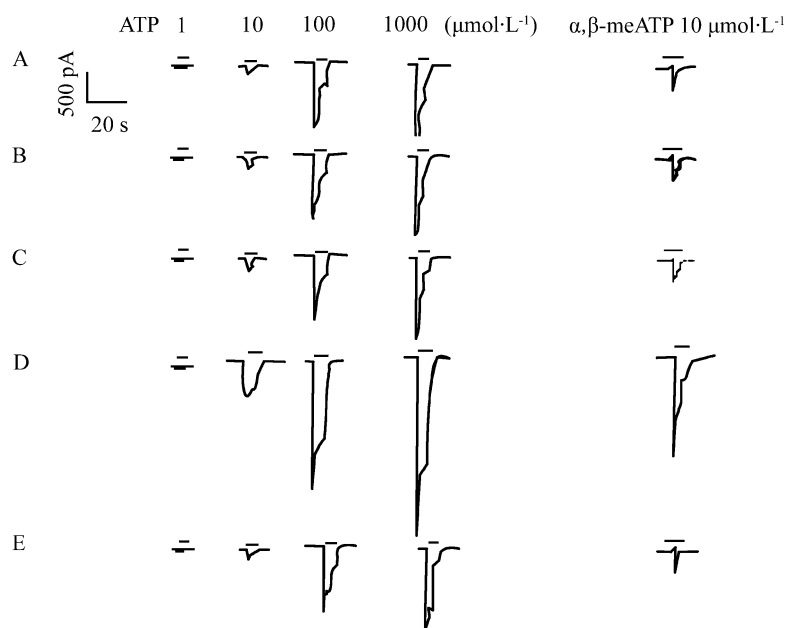
Group	P2X <sub>3</sub> receptor expression (IA)
Normal	129 ± 9
Lig	128 ± 7
Sham	122 ± 10
CCI model	188 ± 8 **
CCI + Lig	161 ± 5 ** <sup>#</sup>

See Tab 1 for the rat treatments. Expression of P2X<sub>3</sub> receptor was measured by immunohistochemistry on d 15 with an image analysis system. There were 6 rats in every group and 4 - 5 slides were selected per rat. Integrated absorbance (IA) of 4 fields in a slide was measured.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 96 - 120$  fields. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with sham group; <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , compared with CCI model group.

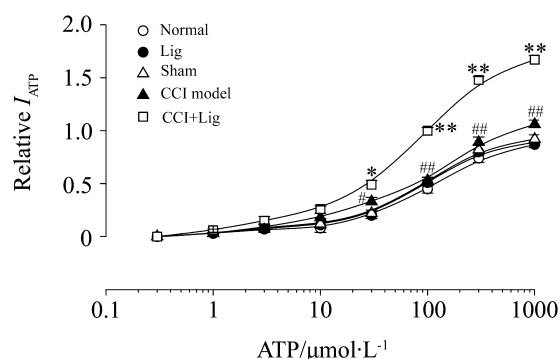
条件下, CCI模型组较其他4组 DRG神经元的  $I_{ATP}$  明显增加, 且随着 ATP 浓度增加  $I_{ATP}$  增加更为明显, 其他4组之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。各组 DRG 神经元  $I_{ATP}$  的完全恢复时间均为 4 ~ 6 min。α, β-meATP 在正常对照、川芎嗪、假手术和 CCI + 川芎嗪组产生极小的内向电流, 而在 CCI 模型组为一具有明显去敏感的内向电流。以 ATP 浓度和  $I_{ATP}$  作图可见 (图 3), 正常对照、川芎嗪和假手术组之间各 ATP 浓度激活电流无显著性差异; 与假手术组比较, CCI 模型组明显增加, CCI + 川芎嗪组较 CCI 模型组明显降低。正常对照、川芎嗪、假手术、CCI 模型和 CCI + 川芎嗪组 ATP 的  $EC_{50}$  分别为 63, 65, 68, 59 和 71  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



**Fig 1. Representative expression of P2X<sub>3</sub> receptor in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> DRG.** See Tab 1 for the rat treatments. A: normal; B: Lig; C: sham; D: CCI model; E: CCI + Lig. Arrows indicate the immunostained neurons. Scale bars: 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig 2. P2X receptor agonists-activated currents in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> DRG neurons of CCI rats.** See Tab 1 for the rat treatments. The current traces were obtained from the same cell in the same group. A: normal; B: Lig; C: sham; D: CCI model; E: CCI + Lig.



**Fig 3. Curves for ATP concentration-ATP activated currents ( $I_{ATP}$ ).** All  $I_{ATP}$  were normalized to  $I_{ATP}$  induced by  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ATP on neurons of CCI model group (as 1.0). Holding potential was set at  $-60 \text{ mV}$ . The curve shows a good fit of data to logistic equation  $I_{ATP} = I_{\text{max}} / [1 + (\text{EC}_{50}/c)^n]$ , where  $c$  is ATP concentration,  $I_{ATP}$  is the normalized ATP-activated currents,  $\text{EC}_{50}$  is ATP concentration producing 50% of the maximal response current. The curve was drawn according to the equation described above assuming Hill coefficients ( $n$ ) = 1.0.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6 - 10$  cells. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , compared with CCI model group.

### 3 讨论

疼痛分为急性痛(生理性痛)和慢性痛(炎症痛、神经病理痛和癌症痛)。由于慢性痛持续时间长,恢复慢,临床上难以控制,对身心健康危害更大。慢性痛的产生和发展包括脊髓和脑内的变化,但首先表现在痛信号起源部位如初级感觉神经元(伤害性感受器)水平的调节。脊髓为初级感觉中枢,DRG神经元是感觉传入的初级神经元,属于假单极神经元,其外周突伸向外周组织,感受外周刺激;中枢突将外周信息传至脊髓背角,完成初级感觉信息的传递。因此,DRG神经元在痛觉传递中具有重要作用,有必要对DRG进行相关研究,观察DRG的变化和痛觉传递之间的关系。已有大量研究表明,在神经病理痛状态下,DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体的表达明显升高,提示DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体表达的变化可影响痛觉的传递<sup>[5]</sup>。本研究室以往研究表明,川芎嗪可抑制  $\text{P2X}_3$  受体激动剂在大鼠足底引起的急性伤害性反应及在大鼠脊髓背根神经元的激活电流<sup>[7]</sup>。此外,川芎嗪可抑制慢性神经病理痛大鼠的痛行为表现并使CCI大鼠脊髓  $\text{P2X}_3$  受体表达下降<sup>[8-10]</sup>,提示川芎嗪对  $\text{P2X}_3$  受体介导的痛觉具有抑制作用。本研究着重观察川芎嗪在神经病理痛状

态下对DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体表达的影响。

应用大鼠CCI神经病理痛模型研究发现,CCI+TMP组机械和热痛阈与CCI模型组比较明显增加,表明川芎嗪可以抑制CCI大鼠的机械痛敏和热痛敏,与文献报道一致<sup>[8]</sup>。术后d15正常对照、川芎嗪和假手术组DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体表达无明显变化,CCI模型组  $\text{P2X}_3$  受体表达明显增加,CCI+TMP组较CCI模型组降低,单独使用川芎嗪不影响大鼠DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体的表达,该结果与文献报道相似<sup>[11]</sup>,提示川芎嗪可抑制DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体介导的神经病理痛信号传递。

应用全细胞膜片钳技术进一步观察发现,DRG神经元对细胞外加ATP( $1 \sim 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )敏感,能产生内向电流,提示ATP可通过DRG神经元发挥作用,与文献<sup>[11]</sup>报道40%~90% DRG神经元对外加ATP敏感的结果相似。 $\text{P2X}$ 受体激动剂在大鼠DRG神经元可引起3种内向电流:快速脱敏感反应、慢性脱敏感反应及先快后慢的双向电流<sup>[12]</sup>。本研究观察到2种电流,分别是快速脱敏感反应和慢性脱敏感反应电流,但以快速脱敏感反应为主。正常对照、川芎嗪和假手术组之间各ATP浓度激活的  $I_{ATP}$  无显著性差异;与假手术组比较,CCI模型组  $I_{ATP}$  明显增加,CCI+川芎嗪组较CCI模型组明显降低;提示川芎嗪是通过作用于  $\text{P2X}$  受体发挥作用。ATP是  $\text{P2X}$  激动剂,作为伤害性传递递质,可引起DRG神经元的电流变化,进行伤害性信息传递,但ATP可激活  $\text{P2X}$  受体的各种亚型。为了确定是哪一种  $\text{P2X}$  受体亚型产生作用,本研究观察了川芎嗪对选择性  $\text{P2X}_3$  受体激动剂  $\alpha, \beta\text{-meATP}$  激活电流的影响。通常观察浓度效应关系曲线至少要选择5个浓度,但  $\alpha, \beta\text{-meATP}$  浓度较低时在CCI模型大鼠DRG神经元激活电流太小,而浓度稍大时则容易失敏感,因此观察药物对  $\alpha, \beta\text{-meATP}$  的抑制作用时常选用  $\alpha, \beta\text{-meATP}$  的有效浓度。本研究参考Tsuzuki等<sup>[13]</sup>报道选定  $\alpha, \beta\text{-meATP}$  浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明,  $\alpha, \beta\text{-meATP}$  在正常对照、川芎嗪、假手术和CCI+川芎嗪组产生极小的内向电流,而在CCI模型组为一具有明显去敏感的内向电流,表明神经病理痛大鼠DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体表达增加,敏感性也增强,提示川芎嗪可抑制  $\text{P2X}_3$  受体介导的神经病理痛。

本研究结果表明,川芎嗪不能使CCI大鼠DRG神经元  $\text{P2X}_3$  受体的表达量下降到正常,但可使ATP

和 $\alpha, \beta$ -meATP对DRG神经元激活的电流恢复至正常水平。这可能是因为免疫组化的实验结果为半定量,而全细胞膜片钳技术直接观察ATP和 $\alpha, \beta$ -meATP作用于DRG神经元P2X<sub>3</sub>受体的激活电流变化,通过计算机软件采集数据,定量分析。比较而言,全细胞膜片钳实验结果比较可靠。此外,川芎嗪是否可能通过其他P2X受体亚型对神经病理痛产生影响,尚需要进一步研究。

综上所述,神经病理痛可增强大鼠DRG神经元P2X<sub>3</sub>受体表达,川芎嗪可抑制神经病理痛诱发的DRG神经元P2X<sub>3</sub>受体表达,并可减小神经病理痛引起的DRG神经元P2X<sub>3</sub>受体增敏的激活电流,但不影响正常大鼠的P2X<sub>3</sub>受体表达。因此,在慢性病理痛状态下,川芎嗪可能通过抑制DRG神经元P2X<sub>3</sub>受体表达而缓解神经病理痛。

#### 4 参考文献:

- [1] Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules [J]. *Neuropharmacology*, 1997, **36**(9):1127-1139.
- [2] Chizh BA, Illes P. P2X receptors and nociception [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, **53**(4):553-568.
- [3] Kennedy C, Assis TS, Currie AJ, Rowan EG. Crossing the pain barrier: P2 receptors as targets for novel analgesics [J]. *J Physiol*, 2003, **553**(Pt 3):683-694.
- [4] Gao Y, Liang SD. Animal model of neuropathic pain and its application to research on pain mediated by P2X receptors [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2006, **22**(11):1310-1314.
- [5] Novakovic SD, Kassotakis LC, Oglesby IB, Smith JA, Eglén RM, Ford AP, et al. Immunocytochemical localization of P2X<sub>3</sub> purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury [J]. *Pain*, 1999, **80**(1-2):273-282.
- [6] Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, et al. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X<sub>3</sub> receptors [J]. *Nature*, 2000, **407**(6807):1015-1017.
- [7] Liang SD, Gao Y, Xu CS, Xu BH, Mu SN. Effect of tetramethylpyrazine on acute nociception mediated by signaling of P2X receptor activation in rat [J]. *Brain Res*, 2004, **995**(2):247-252.
- [8] Gao Y, Liang SD, Shao LJ, Mu SN, Xu CS, Zhang CP. Effect of TMP on neuropathic pain mediated by P2X<sub>3</sub> receptor [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2007, **23**(4):458-462.
- [9] Liang SD, Xu CS, Zhou T, Liu HQ, Gao Y, Li GL. Tetramethylpyrazine inhibits ATP-activated currents in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Brain Res*, 2005, **1040**(1-2):92-97.
- [10] Xu CS, Xu WY, Liang SD. Effect of TMP on the responses mediated by P2X receptors in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2005, **21**(11):1319-1323.
- [11] Bean BP, Friel DD. ATP-activated channels in excitable cells [J]. *Ion Channels*, 1990, **2**:169-203.
- [12] Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JG, Cooper BY. Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents [J]. *J Neurophysiol*, 2000, **84**(5):2365-2379.
- [13] Tsuzuki K, Ase A, Séguéla P, Nakatsuka T, Wang CY, She JX, et al. TNP-ATP-resistant P2X ionic current on the central terminals and somata of rat primary sensory neurons [J]. *J Neurophysiol*, 2003, **89**(6):3235-3242.

## Effect of ligustrazine on expression of P2X<sub>3</sub> receptors in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> dorsal root ganglion of rats with chronic constriction injury

GAO Yun<sup>1</sup>, LIANG Shang-Dong<sup>1\*</sup>, MU Song-Niu<sup>2</sup>, LIU Zheng-Yu<sup>3</sup>,  
JIANG Jian-Mei<sup>3</sup>, XU Chang-Shui<sup>1</sup>, ZHANG Chun-Ping<sup>1</sup>

(1. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, 2. Faculty of Laboratory Animal Science, 3. Department of Experimental Science, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate the pathway of ligustrazine to alleviate neuropathic pain induced by P2X<sub>3</sub> receptor. **METHODS** Chron-

ic constriction injury (CCI) rat model with neuropathic pain was prepared. From d 2, ligustrazine 100 mg·kg<sup>-1</sup> was given ip once daily

for 14 d. The P2X<sub>3</sub> receptor expression in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> dorsal root ganglion (DRG) neurons was detected with immunohistochemistry assay. Whole-cell patch-clamp technique was used to measure adenosine triphosphate (ATP) and  $\alpha, \beta$ -methylene-ATP ( $\alpha, \beta$ -meATP) activated currents in freshly isolated DRG neurons of CCI rats. **RESULTS** Compared with normal control, the expression of P2X<sub>3</sub> receptors and ATP-activated currents ( $I_{ATP}$ ) and  $\alpha, \beta$ -meATP-activated currents ( $I_{\alpha, \beta\text{-meATP}}$ ) in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> DRG neurons did not change after ligustrazine was given to normal rats for 14 d. There was also no significant difference between sham and normal control groups. The expression of P2X<sub>3</sub> receptor,  $I_{ATP}$  and  $I_{\alpha, \beta\text{-meATP}}$  in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> DRG neurons of CCI model rats significantly increased compared

with sham group. After ligustrazine was given ip to CCI model rats for 14 d, the expression of P2X<sub>3</sub> receptor,  $I_{ATP}$  and  $I_{\alpha, \beta\text{-meATP}}$  in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> DRG neurons decreased significantly. **CONCLUSION** Ligustrazine can alleviate neuropathic pain induced by P2X<sub>3</sub> receptor, which may be related to its inhibitory effect on the expression of P2X<sub>3</sub> receptor in L<sub>4</sub>/L<sub>5</sub> DRG of CCI rats.

**Key words:** ligustrazine; neuralgia; ganglia, spinal; receptors, purinergic P2

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30260030); Natural Science Foundation of Jiangxi Province (2007GZY1002)

\* Corresponding author.

(本文编辑 齐春会)

## 《中南药学》杂志征订征稿启事

《中南药学》杂志是由湖南省药学会主办,国内外公开发行的药学综合性学术期刊。国际刊号:ISSN1672-2981;国内刊号:CN43-1408/R。《中南药学》是中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊,被美国 CA 和波兰 IC 等国外知名数据库收录,被中国核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊光盘版、万方数据库和解放军医学图书馆数据库等收录。

本刊内容涵盖药剂、药理、药物分析、药物化学、生化药物、中药及天然药物和医院药学等。主要栏目有综述、研究论文、中药与天然药物、新药之窗、药物与临床、合理用药与临床药学、药物不良反应、中药指纹图谱专题、临床药师在临床专题、医院药学和科技简报等。本刊办刊的特点是普及与提高相结合,以提高为主;理论与实践相结合,以实践为主,面向全国高、中及基层医药工作者,欢迎广大医药工作者投稿和订阅。

本刊为单月刊,大 16 开本,80 页码,印刷装帧精美,每月 20 日出版,定价每册 10.00 元。如需订阅,可到当地邮局(邮发代号为 42-290)或直接汇款至杂志社订购,全年订价 120 元。

本刊来稿要求具有科学性、逻辑性和先进性,并有理论和实践意义,请作者按本刊投稿须知书写稿件。本刊对于省部级以上基金资助课题类稿件优先发表,并且给予一定的奖励。

地址:湖南省长沙市人民中路 139 号中南大学湘雅二医院内《中南药学》杂志社

邮编:410011 电话:(0731)4895602 传真:(0731)2258487

E-mail: hnyxh@public.cs.hn.cn 或 znyxzz@tom.com

开户行:兴业银行长沙韶山路支行 银行帐号:368150100100034745