

## Calpain 抑制剂 ALLN 对酵母多糖足底炎性疼痛 模型大鼠的镇痛作用及其对脊髓背角 环氧化酶-2 表达水平的影响

王静捷<sup>1</sup>, 陈广俊<sup>1</sup>, 陈雯<sup>1</sup>, 杜金<sup>2</sup>, 罗爱伦<sup>1</sup>, 黄宇光<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院麻醉科, 北京 100730

<sup>2</sup>江苏省苏北人民医院麻醉科, 江苏扬州 225001

通信作者: 黄宇光 电话: 010-65295580, 电子邮件: pumchhyg@yahoo.com.cn

**摘要:** 目的 评价 calpain 抑制剂 ALLN 对酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠的镇痛作用及其对脊髓背角环氧化酶-2 (COX-2) 表达水平的影响, 探讨 calpain 在炎性疼痛中的作用机制。方法 SD 大鼠 48 只, 随机分为对照组、假手术组和酵母多糖组, 按 Meller 方法制作酵母多糖足底炎性疼痛模型。分别于制模前和制模后 0.5、1、2、4、8、24 和 48 h 测定各组大鼠左侧后足机械刺激缩足阈值 (MWT) 和左侧后足最大厚度, 并在指定时间点处死取制模侧腰段脊髓背角, 采用 Western 印迹方法测定 calpain 的活性。另取 SD 大鼠 64 只, 随机分为假手术组、二甲基亚砜 (DMSO) 溶剂对照组和 ALLN 治疗组。分别于制模前和制模后 0.5、1、2、4、8、24 和 48 h 测定各组大鼠左侧后足 MWT 和左侧后足最大厚度, 并在指定时间点处死取制模侧腰段脊髓背角, 采用 Western 印迹方法测定 COX-2 的含量变化。结果 与对照组和假手术组相比, 酵母多糖组大鼠制模侧后足 MWT 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 最大厚度显著增加 ( $P < 0.01$ ), 制模后 4、24 和 48 h calpain 活化水平明显增强 ( $P < 0.01$ )。与 DMSO 溶剂对照组大鼠比较, ALLN 治疗组大鼠制模后相应时间点 MWT 显著增高 ( $P < 0.05$ ), 左足最大厚度显著减小 ( $P < 0.05$ ), 脊髓背角 COX-2 表达水平明显下降 ( $P < 0.01$ )。结论 酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠脊髓背角 calpain 活化增强。Calpain 抑制剂 ALLN 可以显著缓解酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠的炎性疼痛和炎性水肿, 并显著降低模型大鼠脊髓背角 COX-2 的表达水平, 提示 calpain 活化后可能通过促进脊髓水平 COX-2 表达增加, 参与炎性疼痛的形成。

**关键词:** 酵母多糖; 炎性疼痛; 环氧化酶-2; 脊髓背角; 钙离子依赖半胱氨酸蛋白酶; 抑制剂

中图分类号: R338.3 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2012)01-0025-07

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2012.01.005

## Analgesic Effect of Calpain Inhibitor ALLN on the Zymosan-induced Paw Inflammatory Pain and Its Effect on the Expression of Cyclooxygenase-2 in the Spinal Dorsal Horn

WANG Jing-jie<sup>1</sup>, CHEN Guang-jun<sup>1</sup>, CHEN Wen<sup>1</sup>, DU Jin<sup>2</sup>, LUO Ai-lun<sup>1</sup>, HUANG Yu-guang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anesthesiology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

<sup>2</sup>Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou, Jiangsu 225001, China

Corresponding author: HUANG Yu-guang Tel: 010-65295580, E-mail: pumchhyg@yahoo.com.cn

**ABSTRACT: Objective** To examine the analgesic effect of calpain inhibitor ALLN on the zymosan-induced paw inflammatory pain and its effect on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the spinal dorsal horn. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were equally divided into three groups: control group, sham-operated group, and zymosan group. According to Meller's method, zymosan (1.25 mg) was injected intra-

plantarily to induce paw inflammation in zymosan group; an equal volume of PBS was administered in the sham-operated group. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and maximum thickness of paw were tested or measured before and 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 hours after injection. All rats were killed at different occasions following surgery to examine calpain activity in the spinal dorsal horn with Western blot analysis. Another sixty-four Sprague-Dawley rats were divided into three groups: sham-operated group, zymosan-induced paw inflammation with intraperitoneal dimethyl sulphoxide (DMSO) treatment group, and zymosan-induced paw inflammation with intraperitoneal calpain inhibitor ALLN treatment group. MWT and maximum thickness of paw were tested or measured before and 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 hours after injection. All rats were killed at different occasions following surgery to examine the COX-2 expression in the spinal dorsal horn with Western blot analysis. **Results** MWT significantly decreased in the rats with zymosan-induced paw inflammation, while the maximum thickness of paw significantly increased, compared with control and sham-operated rats ( $P < 0.05$ ). Calpain in the ipsilateral spinal dorsal horn was dramatically activated after zymosan injection ( $P < 0.01$ ). Intraperitoneal ALLN injection significantly increased zymosan-induced MWT and decreased paw edema at the same time points after zymosan injection compared with DMSO treatment group ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, calpain inhibitor ALLN treatment significantly decreased the COX-2 expression in the spinal dorsal horn compared with DMSO treatment ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Administration of calpain inhibitor ALLN is effective to attenuate zymosan-induced paw inflammatory pain. Calpain activation may be one aspect of the signaling cascade that increases the COX-2 expression in the spinal cord and contributes to mechanical hyperalgesia after peripheral inflammatory injury.

**Key words:** zymosan; inflammatory pain; cyclooxygenase-2; dorsal horn; calpain; inhibitor

*Acta Acad Med Sin*, 2012,34(1):25-31

Calpain 是一类钙离子依赖半胱氨酸蛋白酶, 参与许多生理和病理过程, 包括神经塑形<sup>[1]</sup>和神经细胞死亡<sup>[2]</sup>。外周组织炎性损伤后会引发脊髓背角神经细胞内  $Ca^{2+}$  浓度增加, 进而可能引起 calpain 活化。活化后的 calpain 通过其限制性蛋白水解作用参与细胞内许多受钙离子调节的信号通路, 改变这些特异性底物蛋白的功能或促进其降解。有研究表明, 伤害性神经元敏化过程中 calpain 被活化<sup>[3]</sup>。本研究旨在采用酵母多糖足底炎性疼痛大鼠模型, 评价模型大鼠的疼痛行为学、炎性水肿程度以及脊髓背角 calpain 的活化情况; 并通过 calpain 抑制剂 ALLN 干预模型大鼠, 观察其镇痛作用和对脊髓背角环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达的影响, 探讨 calpain 在炎性疼痛中的作用机制。

## 材料和方法

### 动物及分组处理

疼痛模型的建立: SD 大鼠 48 只, 6 周龄, 雄性, 体重 160 ~ 200 g。随机分为 3 组: 对照组 ( $n = 8$ )、假手术组 ( $n = 16$ , 其中 8 只于制模后 4 h 处死

取腰段脊髓背角组织, 余下 8 只进行疼痛行为学测定及左侧后足最大厚度测量) 和酵母多糖组 ( $n = 24$ , 分别于制模后 4、24、48 h 进行疼痛行为学测定及左侧后足最大厚度测量, 每个时间点测量结束后处死 8 只)。按 Meller 等<sup>[4]</sup>方法, 通过在大鼠左侧后足足底皮下注射酵母多糖 1.25 mg 制作酵母多糖足底炎性疼痛模型。假手术组大鼠在左侧后足足底皮下注射同等容积的 PBS。各组大鼠在制模前及制模结束后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 进行机械刺激缩足阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和左侧后足足底最大厚度测量。并于上述相应时间点处死取腰段脊髓背角进行 Western 印迹分析, 测定 calpain 活化水平。

ALLN 干预实验: SD 大鼠 64 只, 6 周龄, 雄性, 体重 160 ~ 200 g, 随机分为 3 组。假手术组 ( $n = 16$ ): 足底注射 PBS 100  $\mu$ l。其中 8 只于假手术前、假手术后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 测定 MWT 和左侧后足足底最大厚度; 余下 8 只于假手术后 4 h 处死。二甲基亚砜 (dimethyl sulphoxide, DMSO) 溶剂对照组 (Z + V 组,  $n = 24$ ): 腹腔注射 2 ml/kg 的溶剂 DMSO (与 Z + A 组注射 ALLN 20mg/kg 所需 DMSO 的体积相同), 30 min 后足底注射酵母多糖 1.25 mg 制

模。于制模前、制模后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 测定 MWT 和左侧后足最大厚度，并分别于制模后 4、24、48 h，每个时间点处死 8 只。ALLN 治疗组 (Z + A 组,  $n = 24$ ): 腹腔注射剂量为 20 mg/kg 的 ALLN 注射液, 30 min 后足底注射酵母多糖 1.25 mg 制模。于制模前、制模后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 测定 MWT 和左侧后足最大厚度, 并分别于制模后 4、24、48 h 处死大鼠, 每个时间点处死 8 只。各组于上述相应时间点处死的大鼠均取腰段脊髓背角进行 Western 印迹分析, 测定 COX-2 表达水平。

**酵母多糖及 ALLN 注射液配制** 1.25 mg 酵母多糖 (Sigma) 溶解于 100  $\mu$ l PBS 中, 配制酵母多糖注射液。10 mg ALLN (Calbiochem) 溶解于 1 ml 的有机溶液 DMSO 中, 配制 ALLN 注射液, 使其浓度为 10  $\mu$ g/ $\mu$ l,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

**MWT 测定** 在安静的环境, 将大鼠放在金属丝网眼垫上, 用透明塑料鼠笼约束大鼠, 适应 15 min 后, 采用电子 von Fray 压力测痛仪 (Life Science) 轻轻触压大鼠左侧后足第 3、4 趾间的皮肤, 缓慢增加压力, 直至大鼠左侧后足抬起, 记录抬足时的压力数值。如此重复测量 3 次, 取平均值为其 MWT。

**左侧后足足底最大厚度测量** 在 MWT 测量完毕之后, 将大鼠置于塑料瓶中, 待其安静后, 固定其左足, 使用电子数显卡尺 (0 ~ 100 mm) 测量左侧后足足底最大厚度 (腹侧至背侧), 以评价其炎性水肿程度。

**Western 印迹方法测定腰段脊髓背角 calpain 活化和 COX-2 表达水平** 大鼠分别在上述指定时间点经乙醚麻醉、断头处死后, 提取腰段脊髓背角。大鼠采取俯卧位, 剪去背部毛发, 常规消毒, 铺巾, 沿棘突切开皮肤及皮下组织, 用咬骨钳分别咬去棘

突、椎板, 暴露脊髓, 小心取出 L<sub>4-6</sub> 脊髓, 冰上操作 (并保持无菌), 迅速切除制模侧腰段脊髓背角, 立即放入液氮保存。提取总蛋白时将脊髓背角放在匀浆器中, 在裂解液中充分匀浆 (始终在冰浴中进行)。匀浆好的标本取出放入离心管中  $4^{\circ}\text{C}$  摇床 60 min。然后将匀浆好的标本经低温高速 ( $4^{\circ}\text{C}$ ,  $12\ 000 \times g$ ) 离心 30 min, 取上清液。分装标本  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。使用 Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate 进行蛋白定量, 通过 Western 印迹方法分别检测 spectrin  $\alpha$  II 降解产物 (breakdown products, BDP) 的含量变化 (calpain 活化后会降解 spectrin  $\alpha$  II, 生成相对分子质量为 145 000 和 150 000 的片段, 通过对该条带的检测可以反映 calpain 的活化程度) 及 COX-2 表达水平变化。抗体使用鼠抗 spectrin  $\alpha$  II 抗体 (Millipore)、兔抗 COX-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 和鼠抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma)。采用 BandsScan 软件对 Western 印迹条带进行灰度分析。

**统计学处理** 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。计量资料以均数  $\pm$  标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析和 Post Hoc 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**对照组、假手术组和酵母多糖组大鼠 MWT 组间 MWT 基础值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。** 对照组和假手术组大鼠制模侧后足均未出现明显的机械痛敏。酵母多糖组大鼠在制模后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 制模侧后足对机械性刺激的敏感性增强, 与对照组和假手术组相比 MWT 明显降低 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 制模后各时间点对照组、假手术组和酵母多糖组大鼠机械刺激缩足阈值比较 ( $\bar{x} \pm s$ , g)

Table 1 Mechanical withdrawal threshold of zymosan-induced inflammatory pain rats compared with control and sham-operated groups at different time points after the surgery ( $\bar{x} \pm s$ , g)

组别 Group	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
对照组 Control group	54.95 $\pm$ 3.18	51.98 $\pm$ 6.35	54.00 $\pm$ 0.85	54.30 $\pm$ 3.11	52.95 $\pm$ 0.78	50.05 $\pm$ 0.64	52.75 $\pm$ 1.20	53.10 $\pm$ 4.24
假手术组 Sham-operated group	53.20 $\pm$ 1.56	47.93 $\pm$ 8.73	48.13 $\pm$ 4.07	49.68 $\pm$ 2.83	55.53 $\pm$ 10.25	49.85 $\pm$ 9.47	50.10 $\pm$ 10.75	56.03 $\pm$ 4.29
酵母多糖组 Zymosan group	55.00 $\pm$ 3.11	37.48 $\pm$ 4.99 <sup>bc</sup>	39.78 $\pm$ 5.56 <sup>bc</sup>	31.08 $\pm$ 5.07 <sup>bd</sup>	16.45 $\pm$ 9.74 <sup>bd</sup>	29.10 $\pm$ 6.71 <sup>ad</sup>	29.53 $\pm$ 3.80 <sup>bd</sup>	33.55 $\pm$ 3.51 <sup>bd</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与假手术组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with control group; <sup>c</sup> $P < 0.05$ , <sup>d</sup> $P < 0.01$  compared with sham-operated group

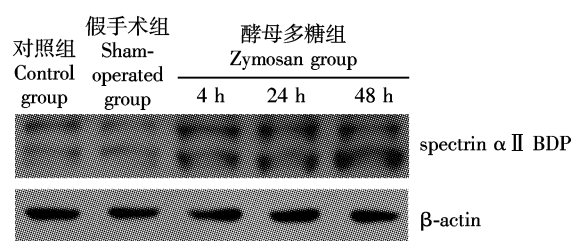
对照组、假手术组和酵母多糖组大鼠左侧后足足底最大厚度 组间左侧后足足底最大厚度基础值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对照组和假手术组大鼠左侧后足足底最大厚度均未发生明显变化。酵母多糖组大鼠在制模后 0.5、1、2、4、8、24、48 h 左侧后足足底最大厚度明显增加, 与对照组和假手术组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

对照组、假手术组和酵母多糖组大鼠腰段脊髓背角 calpain 活化水平 酵母多糖组大鼠制模后 4、24、48 h 腰段脊髓背角内 spectrin  $\alpha$  II BDP 的相对含量分别为  $265.33 \pm 52.11$ 、 $272.26 \pm 44.89$ 、 $301.65 \pm 56.34$ , 与对照组 (100) 和假手术组 ( $96.23 \pm 15.61$ ) 相比均显著增加 ( $P < 0.01$ ), 提示酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠腰段脊髓背角内 calpain 活性增强 (图 1)。

假手术组、Z + V 组和 Z + A 组大鼠 MWT 假手术组大鼠制模后各时间点 MWT 与第一部分实验结果差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与假手术组大鼠制模后相同时间点比较, Z + V 组大鼠各时间点 MWT 均显著降低 ( $P < 0.05$ ); Z + A 组大鼠制模后 0.5、1、2、4、48 h MWT 显著下降 ( $P < 0.05$ ), 而 8 h 和 24 h MWT 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 Z + V 组大鼠相同时间点比较, Z + A 组大鼠制模后

4、8、24、48 h MWT 明显增高 ( $P < 0.05$ ) (表 3)。

假手术组、Z + V 组和 Z + A 组大鼠左侧后足足底最大厚度 假手术组大鼠制模后各时间点左侧后足足底最大厚度与第一部分实验结果差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与假手术组大鼠制模后相同时间点比较, Z + V 组大鼠各时间点左侧后足足底最大厚度均显著增加 ( $P < 0.01$ ), Z + A 组大鼠在制模后各时间点左侧后足足底最大厚度亦显著增加 ( $P < 0.05$ )。但与 Z + V 组大鼠相同时间点比较, Z + A 组大鼠在制模后 4、8、24、48 h 左侧后足足底最大厚度显著减小 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。



BDP: 降解产物

BDP: breakdown products

图 1 对照组、假手术组、酵母多糖组大鼠制模侧脊髓背角 spectrin  $\alpha$  II BDP (calpain 活化) 水平

Fig 1 Western blot analysis of spectrin  $\alpha$  II BDP (calpain activity) level in the ipsilateral lumbar spinal dorsal horn of rats after surgery

表 2 制模后各时间点对照组、假手术组、酵母多糖组大鼠左侧后足足底最大厚度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

Table 2 Maximum thickness of the left hind paw of zymosan-induced inflammatory pain rats compared with control and sham-operated groups at different time points after the surgery ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

组别 Group	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
对照组 Control group	5.07 $\pm$ 0.20	5.04 $\pm$ 0.15	5.01 $\pm$ 0.17	4.99 $\pm$ 0.16	5.17 $\pm$ 0.20	5.00 $\pm$ 0.18	5.07 $\pm$ 0.15	5.05 $\pm$ 0.22
假手术组 Sham-operated group	4.99 $\pm$ 0.40	5.72 $\pm$ 0.20	5.50 $\pm$ 0.25	5.25 $\pm$ 0.31	5.24 $\pm$ 0.18	5.18 $\pm$ 0.11	5.14 $\pm$ 0.12	5.49 $\pm$ 0.42
酵母多糖组 Zymosan group	5.02 $\pm$ 0.41	10.84 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	10.13 $\pm$ 0.50 <sup>ab</sup>	9.88 $\pm$ 0.54 <sup>ab</sup>	10.39 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>	8.89 $\pm$ 0.75 <sup>ab</sup>	7.86 $\pm$ 0.84 <sup>ab</sup>	7.72 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>

与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与假手术组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

<sup>a</sup> $P < 0.01$  compared with control group; <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with sham-operated group

表 3 制模后各时间点假手术组、Z + V 组、Z + A 组大鼠机械刺激缩足阈值比较 ( $\bar{x} \pm s$ , g)

Table 3 Mechanical withdrawal threshold of ALLN treated rats compared with sham-operated rats and DMSO treated rats at different time points after the surgery ( $\bar{x} \pm s$ , g)

组别 Group	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
假手术组 Sham-operated group	52.25 $\pm$ 1.34	43.95 $\pm$ 6.05	48.40 $\pm$ 3.22	50.36 $\pm$ 2.44	50.88 $\pm$ 7.82	50.08 $\pm$ 9.86	47.65 $\pm$ 7.67	53.85 $\pm$ 3.45
Z + V 组 Z + V group	55.00 $\pm$ 3.11	31.09 $\pm$ 9.41 <sup>a</sup>	25.21 $\pm$ 7.14 <sup>b</sup>	25.21 $\pm$ 7.14 <sup>b</sup>	13.69 $\pm$ 4.85 <sup>b</sup>	23.00 $\pm$ 15.03 <sup>a</sup>	27.56 $\pm$ 6.68 <sup>b</sup>	30.31 $\pm$ 7.44 <sup>b</sup>
Z + A 组 Z + A group	56.15 $\pm$ 0.78	29.24 $\pm$ 10.01 <sup>a</sup>	26.21 $\pm$ 11.20 <sup>b</sup>	25.35 $\pm$ 10.28 <sup>b</sup>	20.85 $\pm$ 6.25 <sup>bc</sup>	49.55 $\pm$ 11.78 <sup>c</sup>	42.22 $\pm$ 15.36 <sup>c</sup>	40.10 $\pm$ 2.93 <sup>bc</sup>

DMSO: 二甲基亚砷; Z + V; DMSO 溶剂对照组; Z + A; ALLN 治疗组; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 Z + V 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

DMSO: dimethyl sulphoxide; Z + V; zymosan rats with DMSO treatment; Z + A; zymosan rats with ALLN treatment; <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with sham-operated group; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with Z + V group

表 4 制模后各时间点假手术组、Z + V 组、Z + A 组大鼠左侧后足足底最大厚度比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

Table 4 Maximum thickness of the left hind paw of ALLN treated rats compared with sham-operated rats and DMSO treated rats at different time points after the surgery ( $\bar{x} \pm s$ , mm)

组别 Group	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
假手术组 Sham-operated group	5.09 ± 0.24	5.93 ± 0.30	5.55 ± 0.24	5.06 ± 0.65	5.14 ± 0.23	5.02 ± 0.12	5.18 ± 0.33	5.11 ± 0.24
Z + V 组 Z + V group	4.98 ± 0.24	10.11 ± 0.29 <sup>b</sup>	10.28 ± 0.47 <sup>b</sup>	10.22 ± 0.38 <sup>b</sup>	10.44 ± 0.36 <sup>b</sup>	9.22 ± 0.47 <sup>b</sup>	8.06 ± 0.91 <sup>b</sup>	8.02 ± 0.47 <sup>b</sup>
Z + A 组 Z + A group	5.02 ± 0.33	9.99 ± 0.25 <sup>b</sup>	10.17 ± 0.73 <sup>b</sup>	9.82 ± 0.25 <sup>b</sup>	7.51 ± 0.49 <sup>bc</sup>	6.97 ± 0.57 <sup>bc</sup>	5.99 ± 0.68 <sup>ac</sup>	6.05 ± 0.58 <sup>bc</sup>

与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 Z + V 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with sham-operated group; <sup>c</sup> $P < 0.05$  compared with Z + V group

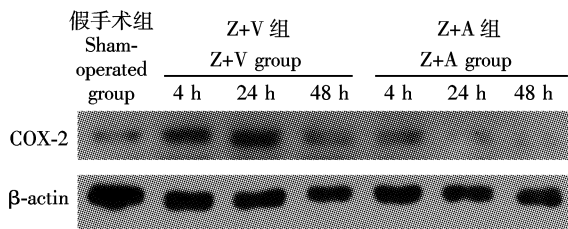
假手术组、Z + V 组、Z + A 组大鼠腰段脊髓背角 COX-2 表达水平 Z + V 组大鼠制模后 4、24、48 h 与假手术组相比, COX-2 表达水平明显增加 ( $P < 0.01$ ); Z + A 组大鼠制模后 4 h 与假手术组比较, COX-2 表达水平明显增加 ( $P < 0.01$ ), 24 h 和 48 h 与假手术组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); Z + A 组大鼠制模后 4、24 和 48 h 与 Z + V 组相同时间点比, COX-2 表达水平明显下降 ( $P < 0.01$ ) (图 2, 表 5)。

## 讨 论

本研究首先通过在大鼠足底皮下注射酵母多糖 1.25 mg 制作酵母多糖足底炎性疼痛大鼠模型。结果显示, 制模后 0.5 h 开始, 制模侧后足对机械刺激的敏感性增强; 制模后 1、2、4、8、24、48 h 各时间点机械痛敏仍然存在。炎性水肿特点表现为制模后 0.5 h 左右开始迅速出现的足部水肿, 并且持续超过 48 h。这些特点与文献报道基本一致<sup>[4-5]</sup>, 证实制模成功。酵母多糖组大鼠制模后 4、24、48 h 腰段脊髓背角内 spectrin  $\alpha$  II BDP 含量显著增加, 提示酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠外周组织炎性损伤发生后腰段脊髓背角内 calpain 活性增强。

基于疼痛模型建立的结果, 本研究随后采用腹腔注射 calpain 抑制剂 ALLN 干预酵母多糖模型大鼠, 观察 ALLN 的镇痛作用; 同时观察 ALLN 干预后模型大鼠腰段脊髓背角 COX-2 表达水平的变化。结果显示, ALLN 可以显著缓解酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠制模后 4、8、24、48 h 的炎性疼痛和炎性水肿, 并显著降低脊髓背角 COX-2 的表达, 提示 calpain 抑制剂 ALLN 可在缓解炎性疼痛和炎性反应方面发挥重要作用。

目前有关 calpain 在炎性疼痛方面的研究尚少。已有研究表明, calpain 可能通过降解神经微丝蛋白和 p35 参与炎性疼痛。Kunz 等<sup>[3]</sup> 研究显示, 外周炎性损伤发生后, 损伤局部和脊髓水平的 calpain 活化水平增强, 后者通过降解神经微丝蛋白参与疼痛形成; 使用 calpain 抑制剂 MDL 28170 可以显著缓解炎性疼痛。Pareek 等<sup>[6]</sup> 研究显示, 伤害性神经元内表达有 Cdk5 和其激活因子 p35。当外周炎症发生后, 感觉神经元内的 calpain 活性增强, 进而降解 p35 为 p25, 后者与 Cdk5 形成更稳定的复合体, 使 Cdk5 活性增加, 痛觉过敏加剧; 通过抑制 calpain 活性可以



COX-2: 还氧化酶-2

COX-2: cyclooxygenase-2

图 2 假手术组、Z + V 组、Z + V 组大鼠制模侧脊髓背角 COX-2 表达水平

Fig 2 Western blot analysis of COX-2 level in the ipsilateral lumbar spinal dorsal horn of rats in sham-operated, Z + V, and Z + A groups

表 5 假手术组、Z + V 组、Z + A 组大鼠制模侧脊髓背角 COX-2 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 COX-2 level in the ipsilateral lumbar spinal dorsal horn in sham-operated, Z + V, and Z + A groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	4 h	24 h	48 h
假手术组 Sham-operated group	100		
Z + V 组 Z + V group	321.34 ± 32.15 <sup>a</sup>	450.65 ± 40.23 <sup>a</sup>	165.78 ± 20.18 <sup>a</sup>
Z + A 组 Z + A group	149.43 ± 27.95 <sup>ab</sup>	112.33 ± 18.50 <sup>b</sup>	130.46 ± 22.65 <sup>b</sup>

与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 Z + V 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

<sup>a</sup> $P < 0.01$  compared with sham-operated group; <sup>b</sup> $P < 0.01$  compared with Z + V group

有效缓解痛觉过敏。

除参与缓解炎性疼痛外, calpain 抑制剂在抑制炎症反应、改善缺血性损伤和脊髓损伤等方面的作用也已被大量文献证实。有研究表明, calpain 抑制剂在抑制急慢性炎症反应方面具有显著效果<sup>[7]</sup>。在内毒素诱发的循环衰竭和多器官功能障碍大鼠模型中, 使用 calpain 抑制剂 ALLN 可以有效缓解循环衰竭, 并改善肝脏、胰腺功能, 缓解乳酸酸中毒和低血糖; 同时降低内毒素休克大鼠诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和 COX-2 蛋白的表达和活性<sup>[8]</sup>。Calpain 抑制剂可以有效缓解脊髓缺血模型大鼠的运动功能<sup>[9]</sup>。Calpain 抑制剂还可以通过抑制核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) 活化改善缺血性休克引起的器官功能障碍, 同时抑制 NF- $\kappa$ B 下游 iNOS 和 COX-2 的表达<sup>[10]</sup>。

给药方式和给药剂量对疼痛模型的药物干预效果有很大影响。有研究显示, 腹腔注射较大剂量 calpain 抑制剂可以取得与硬膜外腔注射较小剂量 calpain 抑制剂相同的镇痛效果, 提示 calpain 抑制剂经外周给药和中枢给药具有同样的镇痛作用, 但因为经中枢给药的剂量远远小于经外周给药的剂量, 提示 calpain 抑制剂的镇痛效果主要是通过抑制脊髓和背根神经节内 calpain 的活性来实现的<sup>[3]</sup>。本研究选择腹腔注射的方式给予 ALLN, 剂量选择了文献 [7] 中报道的可以有效缓解急慢性炎症反应的 ALLN 剂量, 获得了一定的抗炎镇痛效果。

本研究选择观察腰段脊髓背角 COX-2 的表达变化主要基于 COX-2 是外周炎症发生后引起脊髓前列腺素 E<sub>2</sub> 升高, 进而扩大伤害性感受的主要物质<sup>[11]</sup>。炎症反应诱导 COX-2 表达后使前列腺素合成释放增加, 后者通过促进伤害性神经纤维释放神经递质, 以及直接激活位于背角神经元上的前列腺素类受体, 引起外周伤害性神经末梢敏化, 炎症局部出现痛觉过敏。同时, 由于脊髓神经元兴奋性升高, 还会引起其周围未损伤组织的痛觉过敏 (继发敏化)。因此测定脊髓 COX-2 的表达水平可以反映痛觉过敏的程度<sup>[12]</sup>。

ALLN 治疗组大鼠 MWT 与溶剂对照组大鼠比较显著升高, 炎性疼痛得到显著缓解, 但仍未恢复到正常水平, 说明 ALLN 干预只能部分缓解炎性疼痛。外周炎性损伤引起脊髓背角 calpain 显著活化后, 使用 calpain 特异性抑制剂 ALLN 只能部分缓解炎性疼痛可能与以下机制有关: (1) 炎性疼痛的形成和发

展与许多信号通路密切相关, 除已经研究证实的信号通路外, 还存在许多未知信号网络, 它们均可能对炎性疼痛的形成和发展产生影响。因此, 单纯干预 calpain 一条信号通路并不能完全抑制炎性疼痛; (2) ALLN 穿透细胞膜的能力不十分理想。目前大部分 calpain 抑制剂都存在细胞膜通透性相对较差的问题, 因此不能完全作用于靶点, 充分发挥抑制作用<sup>[13]</sup>。对细胞膜通透性强的特异性 calpain 抑制剂的进一步研发将可能解决这一问题; (3) ALLN 的剂量选择可能会影响作用效果, 本研究采用的 ALLN 剂量是根据文献中 ALLN 抑制急慢性炎症反应所使用的剂量, 也可能存在进一步加大剂量会取得更好效果的可能性。

综上所述, 酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠腰段脊髓背角 calpain 活化水平显著增强, 通过腹腔注射 calpain 抑制剂 ALLN 可以显著缓解酵母多糖足底炎性疼痛模型大鼠的炎性疼痛和炎性水肿, 同时显著降低脊髓背角 COX-2 的表达水平。提示 calpain 活化后可能通过促进脊髓水平 COX-2 表达增加, 参与炎性疼痛的形成, 通过抑制 calpain 活性可以有效缓解炎性反应及炎性疼痛。

## 参 考 文 献

- [1] Vanderklish PW, Krushel LA, Holst BH, et al. Marking synaptic activity in dendritic spines with a calpain substrate exhibiting fluorescence resonance energy transfer [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(5):2253-2258.
- [2] Chera B, Schaefer KE, Rocchini A, et al. Calpain upregulation and neuron death in spinal cord of MPTP-induced parkinsonism in mice [J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 965: 274-280.
- [3] Kunz S, Niederberger E, Ehnert C, et al. The calpain inhibitor MDL 28170 prevents inflammation-induced neurofilament light chain breakdown in the spinal cord and reduces thermal hyperalgesia [J]. Pain, 2004, 110(1-2):409-418.
- [4] Meller ST, Gebhart GF. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat [J]. Eur J Pain, 1997, 1(1):43-52.
- [5] Clark AK, Gentry C, Bradbury EJ, et al. Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation [J]. Eur J Pain, 2007, 11(2):223-230.
- [6] Pareek TK, Keller J, Kesavapany S, et al. Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling [J]. Proc Natl

- Acad Sci USA, 2006, 103(3):791-796.
- [7] Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, et al. Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(6):2065-2079.
- [8] Ruetten H, Thiemermann C. Effect of calpain inhibitor I, an inhibitor of the proteolysis of I $\kappa$ B, on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 121(4):695-704.
- [9] Arataki S, Tomizawa K, Moriwaki A, et al. Calpain inhibitors prevent neuronal cell death and ameliorate motor disturbances after compression-induced spinal cord injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(3):398-406.
- [10] McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, et al. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor- $\kappa$ B and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock [J]. *FASEB J*, 2001, 15(1):171-186.
- [11] Vanegas H, Schaible HG. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord [J]. *Prog Neurobiol*, 2001, 64(4):327-363.
- [12] Samad TA, Moore KA, Sapirstein A, et al. Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of COX-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity [J]. *Nature*, 2001, 410(6827):471-475.
- [13] Ray SK, Hogan EL, Banik NL. Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors [J]. *Brain Research Review*, 2003, 42(2):169-185.

(收稿日期: 2011-05-11)