

大麻二酚对紫杉醇诱导的外周神经痛的镇痛效果及机制研究

Research on the Analgesic Effect and Mechanism of Cannabidiol on Paclitaxel-induced Peripheral Neuralgia

张嘉伟 王宇 丁梦姣 夏淑丽 张婉莹 范华英*

Jiawei Zhang Yu Wang Mengjiao Ding Shuli Xia Wanying Zhang Huaying Fan*

烟台大学新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心、分子药理和药物评价教育部重点实验室（烟台大学）
中国·山东烟台 264005

Collaborative Innovation Center of Shandong University, Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation,
Ministry of Education (Yantai University), Yantai, Shandong, 264005, China

摘要: **目的:** 大麻二酚治疗化疗药物紫杉醇诱导的外周神经痛作用及机制研究。**方法:** 建立紫杉醇致大鼠周围神经损伤疼痛模型, 使用 Von Frey 纤维丝, 测量 50% 机械缩足阈, 测定大麻二酚 (Cannabidiol, CBD) 的镇痛作用。通过 Western blot 免疫印迹测定脊髓组织中的高迁移率族蛋白 B1 (High Mobility Group Protein) HMGB1 表达情况, 通过炎症途径探索 CBD 可能的镇痛作用机制。**结果:** CBD 在治疗紫杉醇诱导的外周神经痛过程中表现出良好的镇痛效果; CBD 给药组能明显降低脊髓组织中 HMGB1 的表达和释放 ($P < 0.001$), 减轻炎症反应减轻神经损伤, 进而保护神经元细胞。**结论:** 大麻二酚可能通过 HMGB1 炎症机制发挥对化疗药物紫杉醇诱导的外周神经痛的镇痛作用。

Abstract: Objective: To study the effect and mechanism of cannabidiol on peripheral neuralgia induced by paclitaxel. **Methods:** The pain model of peripheral nerve injury induced by paclitaxel was established in rats. Von Frey filament was used to measure the threshold of 50% mechanical contraction, and the analgesic effect of Cannabidiol (CBD) was determined. The expression of high mobility group protein B1 (hmgb1) in spinal cord tissue was determined by Western blot western blot, and the possible analgesic mechanism of CBD was explored through inflammatory pathway. **Results:** CBD showed good analgesic effect in the treatment of paclitaxel-induced peripheral neuralgia CBD administration group can obviously reduce the expression and release of HMGB1 in spinal cord tissue ($P < 0.001$), alleviate inflammatory reaction, relieve nerve injury and protect neurons. **Conclusion:** Cannabidiol may exert its analgesic effect on peripheral neuralgia induced by paclitaxel through HMGB1 inflammatory mechanism.

关键词: 外周神经痛; 镇痛效果; 紫杉醇

Keywords: peripheral neuralgia; analgesic effect; paclitaxel

基金项目: 烟台大学省级大学生创新创业训练计划项目 (项目编号: S202011066019)。

DOI: 10.12346/pmr.v3i2.3430

1 引言

当今世界恶性肿瘤发病率不断上升, 紫杉醇 (paclitaxel, Taxol) 作为一种从紫杉中提取出来的抗癌药物的应用也日益增多。紫杉醇的抗癌效果是通过促进细胞内微管蛋白发生

聚合, 从而保持微管蛋白的稳定来抑制癌细胞的恶性增殖。使用紫杉醇类药物化疗后易出现外周神经痛等不良反应。由于使用紫杉醇类药物导致的疼痛的主要症状表现为外周感觉性的痛觉超敏、灼痛、刺痛、麻木等症状。

【作者简介】张嘉伟 (2000-), 男, 中国山东烟台人, 本科在读, 从事病理学研究。

【通讯作者】范华英 (1977-), 博士, 教授。

大麻二酚 (Cannabidiol, CBD) 是大麻植物中的非精神活性成分, 能够避免大麻物质引起的耐受性、精神依赖性副作用, 起到治疗疼痛的作用, 现已可利用化学合成方法合成 CBD。脊髓中小胶质细胞和 TLR4 通路相关的神经炎症参与了痛觉敏化, HMGB1 是 TLR4 内源性配体, 是多种促炎途径的触发条件。研究 HMGB1 是否参与疼痛的维持以及 CBD 是否可以通过减少 HMGB1 的表达发挥镇痛作用对 CBD 后期的开发具有重要意义。

2 实验材料

①相关药品及制剂见表 1。

②仪器设备及耗材见表 2。

③实验动物;

A. 动物种属及品系: Sprague Dawley (SD) 大鼠, SPF 级。

B. 性别、体重: 雄性, 180~220g。

C. 动物来源: 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 生产许可证号为 SCXK (鲁) 20190003。

D. 动物检疫和标识: 所有动物到达后, 适应期至少 3 天, 进行检疫观察, 观察动物的活动、饮食等表现, 动物在实验前需检查合格, 合格的动物方可用于实验。动物检疫合格分组后, 给每只动物指定一个单一的动物号, 在动物被毛上用颜色加以标记。笼卡上标明专题编号、动物号、笼号、性别、组别、实验起止日期和专题负责人。

E. 实验动物饲养管理的环境条件: 室温 20~26℃, 日温差 ≤4℃, 相对湿度 40~70%, 明暗交替时间为 12/12h。动物饲养于标准鼠笼中, 每笼 5~6 只。

F. 动物饲料、饮水: 自由摄食、饮水。饲料为 SPF 级大鼠生长繁育饲料, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司生产。饮用水是经过高温消毒的城市自来水。

3 实验方法

3.1 构建紫杉醇致大鼠神经病理性疼痛模型

采用腹腔隔天注射紫杉醇 (2mg/kg, 共四次) 的方法制备紫杉醇诱导的外周神经痛模型。

表 1 实验材料相关信息

药品名称	规格	提供厂商	生产批号
普瑞巴林	75 mg	辉瑞制药有限公司	DA45 20
水合氯醛	250 g	源叶生物科技有限公司	Z08S11Y123916
紫杉醇注射液	5mL : 30mg	海口市制药厂有限公司	12200208
青霉素钾	50 × 160 万单位	四川积善之家药业有限公司	20200501
生理盐水	250 mL	山东科伦药业有限公司	国药准字 H37022918
多聚甲醛	500 ml : 2.25 g	广州赛国生物科技有限公司	69070900
吐温 -80	100 mL	北京索莱宝科技有限公司	9005-65-6

表 2 实验设备相关信息

设备	提供厂商
Touch Text Sensory Evaluator	DanMic Global
SC-15 数显恒温水浴锅	宁波新芝生物科技有限公司
KQ-500DE 数控超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司
AE224C 电子天平	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
SpectraMax iD3 型酶标仪	美谷分子仪器 (上海) 有限公司
Powerpac Basic 型电泳仪	Bio-Rad
脱色微型圆周摇床 BETS-M1	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
Centrifuge 5424R 台式离心机	艾本德生命科学公司
ST16 型离心机	赛默飞世尔科技公司
ImageQuant LAS 4000 型超灵敏化学发光成像分析仪	GE Healthcare
MS-H-Pro 磁力搅拌器	大龙兴创实验仪器 (北京) 有限公司
VORTEX-5 漩涡混合器	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
96 孔板、75% 酒精、台灯、牵开器、棉球、注射器	

3.2 动物分组及给药

3.2.1 动物分组

造模成功后将大鼠按照体重随机分组,分为对照组、模型组、阳性药普瑞巴林组、口服 CBD 纳米晶低剂量组、口服 CBD 纳米晶高剂量组,实验过程中保证每组实验数据量 $n \geq 6$ 只。于造模成功后,每天按剂量给药一次,为保证科学的严谨性,分批次分时间给药,给药顺序与测定机械痛顺序保持一致,连续给药至机械痛敏降低维持在一定水平上(大于 10 天)。

3.2.2 给药剂量

溶媒选用无菌饮用水。关于给药的具体情况见表 3。

3.3 行为学测定

分别于给药前 2 天及给药后第 2、4、8 天对各组大鼠进行行为学测试,以评估术后机械痛及药物治疗效果。每次行为学测试均在给药后两小时测定内进行,放置老鼠与测试分别由不同实验人员进行,保证测试结果的准确性。使用 Von Frey 纤维丝进行测量,初始刺激力为 2.0g,若无反应则逐渐递加至 4.0g、6.0g、8.0g、15.0g。若有刺激反应,则使用刺激力更小的纤维丝来测量;若无刺激反应则继续逐渐增大纤维丝刺激力。若测量使用纤维丝的刺激力一直在两个相邻等级内反复,则在四次测量后停止。

3.4 组织取材

给药后第 9 天进行取材。大鼠深度麻醉后,手沿着大鼠的正中线从咽喉部位向下触摸,至剑突软骨所在位置,在剑突软骨下约一横指处,用手术剪贴着皮下剪开其胸腔,将皮肤翻向两侧,用止血钳夹住胸骨翻向外侧,充分暴露心脏。然后在左心尖位置,将灌注针沿着主动脉口走向插入 3~5mm。进针后心脏膨胀,迅速剪断大鼠后腔静脉,进行心脏灌注排气。灌注完成后,使用组织剪清除周围肌肉组织充分暴露脊柱,用咬骨钳清除椎板后暴露脊髓,剪断腰 4~6 段神经损伤侧的脊髓,使用 2.5mL 注射器吸取生理盐水将脊髓吹出,收集于 EP 管中,放入 -80℃ 中冷冻备用。

3.5 Western blot 法检测 HMGB1 表达情况

脊髓背角组织中加入 RIPA 裂解液(含 PMSF 液)充分裂解后,震荡均匀,取少量样品根据 BCA 蛋白定量试剂盒说明测定蛋白浓度。剩余蛋白加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲

液(4:1), 100℃ 煮 5min, $13000 \times g$, 4℃ 离心 5min, 取上清。-80℃ 保存备用。分别配制 12% 和 8% 的 SDS-PAGE 胶后开始加样。15 μ g 样品缓慢加入样品孔中, 80V 进行浓缩胶电泳 15min, 120V 在分离胶中电泳 45min。结束后开始转膜, 0.2A 转膜 120min 后将膜浸在封闭液中室温封闭 1h 后, 取出放入一抗孵育(HMGB1 为 1:8000、HO-1 为 1:1500、NRF2 为 1:500、 β -actin 为 1:5000), 4℃ 反应过夜; TBST 洗膜, 10min \times 3 次; 将膜转入二抗(1:4000)中, 室温反应 1h; TBST 洗膜, 10min \times 3 次; 用化学发光法显影。

4 实验结果及数据分析

4.1 大麻二酚对 SNI 模型大鼠产生明显镇痛效果

在紫杉醇致大鼠外周神经痛模型建立成功 48~72h 后, 使用 Von Frey 纤维丝对其进行痛敏测试, 模型鼠基本出现机械痛觉超敏的临床症状。在连续 8 天给药后, 结果如图 1 所示。给药第 2、4、8 天, 各个给药组 PMWT 值与模型组比较, 有明显的统计学差异(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ◆◆◆ $P < 0.001$; # $P < 0.05$, #### $P < 0.001$), 其中高剂量口服大麻二酚纳米晶组效果较好。

4.2 大麻二酚利用 HMGB1 发挥镇痛作用

大麻二酚通过降低脊髓背角组织中 HMGB1 的表达减轻炎症反应, 发挥镇痛作用, 具体如图 2、图 3 所示。

5 结论与讨论

紫杉醇致大鼠神经病理性疼痛模型的建立后, 使用 Von Frey 纤维丝对其进行痛敏测定, 可通过大鼠对机械痛敏感程度进行检测来判断模型的建立是否成功以及药物对模型鼠是否具有镇痛作用。通过给予药物干预及痛敏测定, 结果表明 20mg/kg/d 给药大麻二酚纳米晶具有较好的镇痛作用。给药过程中, 给药组大鼠皮毛光泽、体态活泼、反应敏捷、体重正常、食量正常, 连续给药过程中未出现呕吐、腹泻、眼睛分泌物等明显异常现象。

用 Western blot 方法检测脊髓(L4-L6)中 HMGB1 在治疗前后的变化。本实验中, 实验组 HMGB1 含量较对照组低, 说明大麻二酚可能抑制炎症因子 HMGB1 的表达, 从而起到

表 3 给药剂量相关信息

组别	给药剂量 mg/kg/d	给药浓度 mg/mL	给药体积 mL/kg	给药方式	给药周期
对照组	0	0	0	-	-
模型组	0	0	0	-	-
阳性药组(PGB)	30	6	5	i.g.	24h
CBD-NS 低剂量组	10	2	5	i.g.	24h
CBD-NS 高剂量组	20	4	5	i.g.	24h

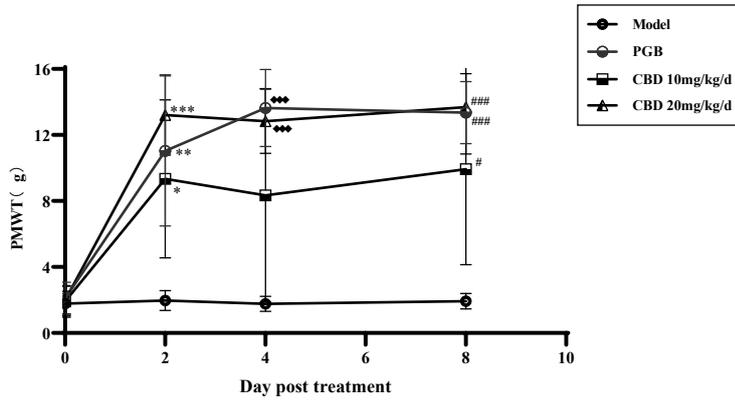


图1 各给药组给药后药效比较

注: 数据均用平均值 ± 标准差表示。与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;
◆◆◆ $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ 。

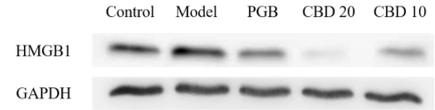


图2 不同组大鼠 HMGB1 蛋白表达水平

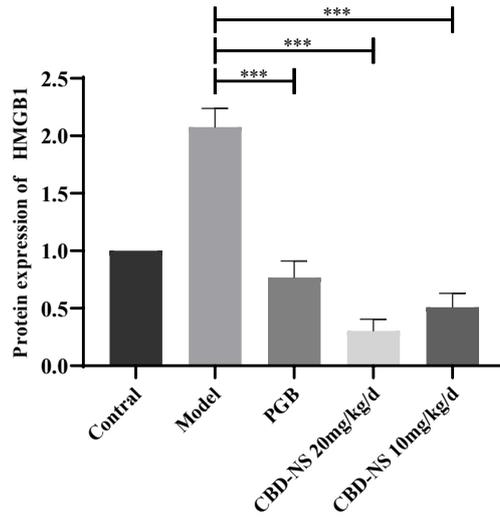


图3 CBD 对 HMGB1 表达的影响

注: 数据均用平均值 ± 标准差表示。与模型组比较, *** $P < 0.001$ 。

镇痛作用。然而, HMGB1 具体在哪个环节参与疼痛的形成和维持还需要进一步探索。

参考文献

- [1] 银联飞. 紫杉醇诱导大鼠病理性疼痛模型的建立[J]. 右江民族医学院学报, 2015(37):357-359.
- [2] Sisignano M, Angioni C, Park CK, et al. Targeting CYP2J to reduce paclitaxel-induced peripheral neuropathic pain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016,113(44):12544-12549.
- [3] 徐旭然, 王柳清, 王虹. 化疗药物诱导性周围神经病变研究进展[J]. 世界临床药物, 2019,40(3):205-209+214.
- [4] Burstein S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation[J]. Bioorg Med Chem, 2015,23(7):1377-1385.
- [5] Fan H, Tang HB, Chen Z, et al. Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury[J].

Neuroinflammation, 2020,17(1):295.

- [6] Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018,22(3):263-277.
- [7] Coleman LG Jr, Zou J, Crews FT. Microglial-derived miRNA let-7 and HMGB1 contribute to ethanol-induced neurotoxicity via TLR7[J]. Neuroinflammation, 2017,14(1):22.
- [8] 宋莉. 慢性疼痛的研究模型、外周和脊髓机制及临床治疗进展[J]. 中国疼痛医学杂志, 2015(1):2-7.
- [9] 王洪蓉, 汤晶晶. 新生儿缺氧缺血性脑病血清高迁移率族蛋白 B1 水平及与炎症反应和神经损伤的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2020,30(8):119-123.
- [10] Sun X, Zeng H, Wang Q, et al. Glycyrrhizin ameliorates inflammatory pain by inhibiting microglial activation-mediated inflammatory response via blockage of the HMGB1-TLR4-NF- κ B pathway[J]. Exp Cell Res, 2018,369(1):112-119.