

姜黄素对糖尿病大鼠疼痛过敏的影响

杨江河 张 蓉 李 华 修彬华 闫志强 刘绍明[△]

(兰州军区乌鲁木齐总医院 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的:神经病理性痛是糖尿病最常见的并发症之一,本课题旨在探讨姜黄素对糖尿病大鼠痛觉过敏的影响及其分子机制。
方法 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、糖尿病组和姜黄素治疗组,模型组和姜黄素治疗组利用腹腔注射链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)制备大鼠糖尿病模型,定期检测大鼠血糖、饮食、体重等变化,治疗组于 STZ 注射 2wk 后定期灌服姜黄素,分别在 2wk 和 4wk 后检测各组大鼠热痛敏和机械痛敏反应,在第 4 wk 利用 ELISA 分别检测各组大鼠脊髓背角 TNF- α 表达变化。结果:STZ 注射组大鼠 2 周后出现血糖 $>14\text{mol/L}$,并且该模型具有高血糖、体重增长缓慢、多饮多食多尿的特点,符合 I 型糖尿病特征,痛行为测试结果显示糖尿病大鼠出现痛觉过敏,经过给予姜黄素灌服治疗后,痛觉过敏有所减轻,ELISA 分析结果表明糖尿病大鼠脊髓背角 TNF- α 表达升高,经过姜黄素治疗后 TNF- α 表达有所下降。结论:成功制备 STZ- 型糖尿病大鼠模型,经过姜黄素治疗可以减轻糖尿病引起的疼痛过敏,姜黄素对糖尿病疼痛的治疗作用可能是通过降低大鼠脊髓背角 TNF- α 表达实现的。

关键词 姜黄素;糖尿病;疼痛过敏;TNF- α ;STZ

中图分类号 Q95-3 R587.2 R742.1 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)13-2419-04

Effect of Curcumin on Hyperalgesia of Diabetic Rats

YANG Jiang-he, ZHANG Rong, LI Hua, XIU Bin-hua, YAN Zhi-qiang, LIU Shao-ming[△]

(Urumchi Hospital of Lanzhou Military region, Urumchi 830000, China)

ABSTRACT Objective: The purpose of the study was to investigate the effects of curcumin on hyperalgesia of STZ-induced diabetic rats. **Methods:** 30 male SD rats were randomly divided into three groups: control group (CN), diabetic mellitus group (DM) and curcumin therapy group (DM+Cur). Streptozotocin (STZ) prepared in citrate buffer was injected intraperitoneally to induce DM. DM+Cur group were treated with 100 mg/kg curcumin everyday. Mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) of the rats were measured. The expression of TNF- α in the spinal dorsal horn of rats was tested by ELISA. **Results:** The DM group and DM+Cur group rats displayed hyperglycemia, weight loss, polyphagia, polydipsia and polyuria. The MWT and TWL of DM group rats decreased compared with CN group rats. After treated with curcumin, both MWT and TWL of DM+Cur group rats increased. The expression of TNF- α in the spinal dorsal horn of diabetic rats was higher than that of CN group. After treated with curcumin, the level of TNF- α was reduced. **Conclusions:** Curcumin can and relieve diabetic neuropathic pain and reduce the expression of TNF- α in spinal cord dorsal horn of STZ inducing diabetic rats. The expression of TNF- α in the spinal cord dorsal horn may participate diabetic pain.

Key words: Curcumin; Diabetes mellitus; Hyperalgesia; TNF- α ; STZ

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R587.2 R742.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)13-2419-04

前言

糖尿病神经病理性痛是糖尿病最常见的慢性并发症之一,其特点是自发性痛以及轻微刺激即可引起剧烈的疼痛,即痛觉过敏。既往研究报道痛觉过敏与高血糖及代谢紊乱导致的神经元丢失和神经递质改变有关^[1],但是痛觉过敏产生的确切分子机制尚不明确。当前对糖尿病神经病理性痛通常使用非甾体类抗炎药、抗抑郁药、抗惊厥药以及吗啡等药物治疗,但是这些药物多具有严重的副作用及潜在毒性^[2,3]。

姜黄素是从植物姜黄中提取的一种药用色素,具有抗肿

瘤、抗炎等多种作用,研究表明姜黄素可能通过抑制 NF- κ B 下游基因表达来抑制细胞增殖、细胞因子产生等^[4-6]。另有研究观察到 TNF- α 表达与 NF- κ B 相关^[7]。由于 TNF- α 在多种神经病理性痛模型中表达增加,其在疼痛发生过程中的作用日益受到重视^[8-13]。本实验旨在研究姜黄素对糖尿病神经病理性痛的影响,并探讨 TNF- α 在姜黄素镇痛过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠 30 只,体重 180~220g,由第四军医大学实验动物中心提供,姜黄素购自美国 Sigma 公司,用二甲基亚砜(DMSO)助溶后配制成 100 mg/kg 备用,ELISA 试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司,其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 模型制备 随机选取 20 只健康雄性 SD 大鼠,禁食 12h,按 65mg/kg 体重腹腔注射 STZ,注射时用柠檬酸缓冲液(pH 4.4, 0.1M)以 2%的浓度溶解 STZ,按空腹体重注射相应的

作者简介 杨江河(1967-)男,硕士,副主任医师,主要从事神经外科常见疾病的临床治疗与基础研究,联系电话: (0991) 4991779, Email: yangdanting@163.com

△通讯作者 刘绍明, Email: yanzhiq@fmmu.edu.cn;

电话: (0991)4991779

(收稿日期: 2011-03-06 接受日期: 2011-03-31)

STZ,在 30 min 内注射完毕。CN 组大鼠腹腔注射等量柠檬酸盐缓冲液,每日 1 次,连续 2 次。每个笼子放置 5 只大鼠,饮用自来水,自由摄食,给予普通饲料喂养,STZ 注射后每 72h 测定大鼠血糖,采用大鼠尾端取血,滴至血糖试纸反应 5s,使用血糖仪比色并记录数值,血糖>14.6 mol/L 者纳为糖尿病大鼠。每日观察大鼠体重、尿量、饮食量等指标^[14,15]。

1.2.2 药物处理与分组 实验动物分为三组:对照组(CN)为 10 只正常大鼠,模型组(DM)为 10 只糖尿病大鼠,姜黄素处理组(DM+Cur)为 10 只经姜黄素治疗的糖尿病大鼠,治疗方法为,从注射 STZ 后 2 wk 开始每天灌服姜黄素,剂量为 100 mg/kg,连续治疗 2 wk,对照组和模型组同时灌服含同等量 DMSO 的生理盐水。

1.2.3 机械痛敏实验 3 组大鼠分别于 STZ 注射后 2 wk 和术后第 4 wk 测定大鼠右足机械痛阈值 (mechanical withdrawal threshold,MWT)。将大鼠放置 10 cm×10 cm×20 cm 底部为金属网的有机玻璃箱内,盖顶避光,在实验开始前让其适应环境 30 min。采用机械刺激器(von-Frey)纤维垂直刺激大鼠右后肢足底中间部位 5 s,刺激力量以触丝弯曲为准,刺激强度由小到大,每个强度反复刺激 10 次,每次间隔 5s,将出现缩足反射 5 次以上的刺激其强度定为大鼠对机械刺激的反应阈值。如以 75.0 g von-Frey 纤维刺激大鼠足底不出现缩足反射,则认为大鼠无痛反应,MWT<0.1 g 时均以 0.1 g 计^[16,17]。

1.2.4 热痛敏实验 3 组大鼠分别于 STZ 注射后 2 wk 和术后第 4 wk 测定大鼠右足热刺激反应潜伏期(thermal withdrawal latency,TWL)。将大鼠放入底部厚度为 2 mm 的有机玻璃箱中,适

应 30 min 后应用 RTY-3 型热板测痛仪中,选择 100W 卤素投射灯,调节电压至 9.5 V,调节灯与玻璃板之间的距离,使落在大鼠足底的光圈直径为 5 mm,大鼠的足部受热刺激后会出现舔足反应,以大鼠从接触热板到出现添足的时间为热刺激潜伏期,记录该时间。每只大鼠重复测定 3 次,每次测定间隔时间 5 min,取其平均值为热刺激反应潜伏期并作为反应疼痛的定量指标^[16,17]。

1.2.5 组织中 TNF-α 分子检测 STZ 注射后 4 wk 检测各组大鼠脊髓背角 TNF-α 表达水平差异,麻醉动物时按照 10 mg/kg 腹腔注射戊巴比妥,迅速处死动物分离脊髓腰骶膨大,称重,每只动物取其一侧(另一侧用作下步实验)按比例加入组织裂解液(100 mg 组织加入 200μL 裂解液),在冰上操作将标本充分匀浆,4℃下离心,5 000 rpm 5 min,收集上清,严格按照 ELISA 试剂盒进行操作,检测各样本中 TNF-α 的含量。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件,应用 One-way ANOVA 方差分析法对两组以上的数据进行两两之间进行统计学比较,数据结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学差异设为 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功制备 型糖尿病(T1DM)大鼠模型

STZ 腹腔注射 2 wk 后 DM 组和 DM+Cur 组大鼠血糖平均值分别为 22.32 mmol/L 和 21.65 mmol/L(表 1),与对 CN 组相比血糖显著升高($P<0.05$),两组大鼠出现明显的多饮、多食、多尿、体重下降和毛色失去光泽等特点,与临床 型糖尿病吻合。

表 1 各组大鼠血糖浓度和体重变化
Table 1 Changes in blood glucose and body weight of each group rats

	Blood glucose(mmol/L)	Body weight(g)
CN	5.8± 2.4	310± 30
DM	22.32± 3.1	250± 50
DM+Cur	21.65± 3.5	280± 60

2.2 姜黄素治疗对糖尿病痛阈值的影响

对比 STZ 注射后 2 wk 和 4 wk 各组大鼠的机械痛敏和热痛敏反应发现,在 STZ 注射后 2 wk,DM 组与未给予姜黄素治疗的 DM+Cur 组大鼠和 CN 组大鼠相比痛阈值均显著下降

($P<0.05$),表明动物对疼痛的敏感性增强,即疼痛过敏。在 STZ 注射后 4 wk,DM 组大鼠痛阈值与 2 wk 时接近,DM+Cur 组大鼠经过给予 2 wk 姜黄素治疗,其痛阈值有显著升高($P<0.05$),见图 1 和图 2。

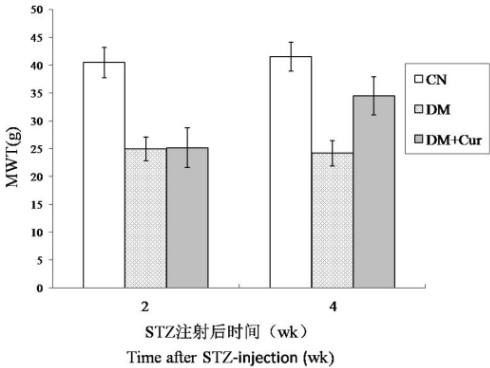


图 1 姜黄素治疗对糖尿病大鼠机械痛敏的影响

Fig. 1 Mechanical withdrawal threshold of rats in each group after treated with curcumin

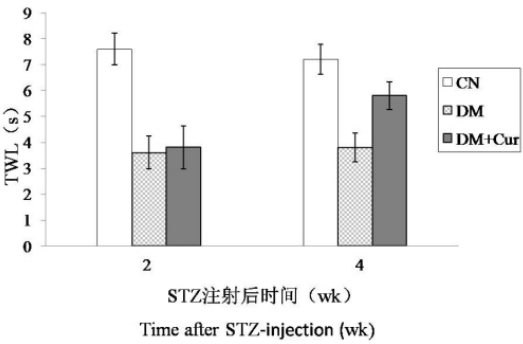


图 2 姜黄素治疗对糖尿病大鼠热痛敏的影响

Fig. 2 Thermal withdrawal latency of rats in each group after treated with curcumin

2.3 姜黄素治疗对糖尿病大鼠脊髓背角 TNF-α 水平的影响

经姜黄素治疗 2 wk 后,处死各组实验动物,手术分离脊髓腰骶膨大(L2-S3)裂解组织,用 ELISA 检测 TNF-α 含量变化。检测结果显示,与正常对照组相比糖尿病大鼠脊髓背角 TNF-α

含量明显高于正常对照组(P<0.05),在给予连续 2 wk 的姜黄素治疗后,大鼠脊髓背角 TNF-α 明显下降(P<0.05),但仍高于正常组(表 2)。姜黄素能够下调糖尿病引起的大鼠脊髓背角 TNF-α 分子水平。

表 2 各组大鼠脊髓背角 TNF-α 含量
Table 2 Effect of curcumin on TNF-α level in each group of rats

	n	TNF-α (pg/mg)
CN	10	15± 4
DM	10	160± 8
DM+Cur	10	70± 11

3 讨论

STZ 诱导大鼠糖尿病模型具有高血糖、体重明显减轻以及疼痛过敏等特点,符合临床糖尿病病人症状,因此是研究糖尿病神经病理性痛的常用模型,深入研究 STZ-糖尿病大鼠模型疼痛的分子机制有助于加深对糖尿病性痛的认识。糖尿病神经病理性痛是由糖尿病患者常见的症状,主要特点包括:持久自发性痛、触诱发疼痛以及痛觉过敏。中枢敏化是目前解释神经糖尿病疼痛出现触诱发痛症状的主要理论,也是当前研究的热点,虽然中枢敏化可以发生在中枢的不同水平,目前研究较多的是作为伤害性传递第一中继站的脊髓背角水平。研究证实在糖尿病性痛动物模型脊髓背角有神经递质及受体、细胞因子等水平改变^[18-20]。

TNF-α 是由活化的单核巨噬细胞分泌产生的多肽,具有广泛的生物活性,参与炎症反应、抗肿瘤及调节机体免疫功能,在中枢神经系统,胶质细胞受到伤害性刺激活化也可以产生包括 TNF-α 在内的细胞因子^[6,7]。近年来大量的研究表明 TNF-α 在神经病理性痛的发生和维持中有重要的作用。研究证实,在脊髓胶状质神经元应用外源性 TNF-α 后,自发性小兴奋性突触后电流和自发性抑制性突触后电流的频率明显升高,TNF-α 都 Aδ/C 纤维诱发的单突触和突触后电流或自发性突触后电流的这种影响在给予 5μM 的抗体后即被阻滞,提示 TNF-α 影响突触传递可能是其参与中枢敏化的作用方式之一^[18]。

在本实验中,我们首先观察到经过姜黄素治疗后,糖尿病大鼠痛阈值升高,表明糖尿病大鼠疼痛过敏得到缓解,为了深入探讨姜黄素缓解疼痛的分子机制,我们检测了参与脊髓水平中枢敏化的 TNF-α 水平变化,结果显示在糖尿病大鼠的脊髓背角中 TNF-α 水平升高,经过 2 wk 的姜黄素治疗,大鼠脊髓背角 TNF-α 水平下降,这一趋势与痛阈值升高时间上相一致,提示姜黄素缓解糖尿病性疼痛过敏的机制之一可能是通过下调 TNF-α 实现的。

参考文献(References)

[1] Toth C, Brussee V, Cheng C, Zochodne DW. Diabetes mellitus and the sensory neuron[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2004, 63(6):561-573
[2] Tomlinson DR, Gardiner NJ. Glucose neurotoxicity [J]. Nat Rev Neurosci, 2008, 9(1):36-45
[3] James JL, Michael FJ, Elizabeth AK. An adenosine kinase inhibitor attenuates tactile allodynia in rats model of diabetic neuropathy [J].

Eur J Pharmacol,1999, 364:141-146
[4] Sharma S, Kulkarni SK, Agrewala JN, et al . Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 536(3):256-261
[5] Jain SK, Rains J, Croad J, et al. Curcumin supplementation lowers TNF-alpha, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion in high glucose-treated cultured monocytes and blood levels of TNF-alpha, IL-6, MCP-1, glucose, and glycosylated hemoglobin in diabetic rats [J].Antioxid Redox Signal, 2009, 11(2):241-249
[6] Gao X, Kuo J, Juang H, et al. Immunomodulatory activity of curcumin; suppression of lymphocyte proliferation, levels of cell mediated cytotoxicity and cytokine production in vitro [J]. Biochem Pharmacol, 2004, 68, 51-61
[7] Mao TY, Iwamoto GK, Hoa NT, et al. TNF-alpha increase in intestinal epithelial tight junction permeability regulates NF-kappa B activation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286, G367-G376
[8] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas[J]. Physiol Res 2001 50(6) 537- 546
[9] Sacerdote P, Franchi S, Trovato AE, et al. Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy [J]. Neurosci Lett 2008 436: 210-213
[10] 梁真,冼苏,林健,等.树鼩糖尿病模型肝脏功能及形态学变化与 TNF-α 的关系[J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(5): 639-641
Liang Zhen, Xian Su, Lin Jian, et al. Relationship between TNF-α and tupaia's diabetic hepatopathy [J]. Journal of Guangxi Medical University, 2003, 20(5): 639-641(In Chinese)
[11] 张鹏,孟春梅,李德强,等.RT-PCR 法研究糖尿病大鼠视网膜上 TNFα mRNA 的表达[J]. 天津医药, 2007, 35(8): 603-605
Zhang Peng, Meng Chun-mei, Li De-qiang, et al. Study on Expression of TNF mRNA in Retina of Diabetic Rats [J]. Tianjin Medical Journal. 2007, 35(8): 603-605(In Chinese)
[12] 孙玉娥,申文,唐元章,等.脊髓 IL-1β 和 TNF-α 在胶质细胞活化诱发小鼠骨痛中的作用[J].中华麻醉学杂志, 2010, 30(4): 433-436
Sun Yu-e, Shen Wen, Tang Yuan-zhang, et al. Role of IL-1β and TNF-α in the spinal cord in a murine model of bone cancer pain induced by activation of glial cells [J]. Chin J Anesthesiol, 2010, 30 (4): 433-436(In Chinese)
[13] 陈海冰,贾伟平. 糖尿病与免疫 [J]. 临床内科杂志 2007, 24(3): 159-161
Chen Hai-bing, Jia Wei-ping. Diabetic mellitus and immune [J]. J

Clin Intern Med, 2007, 24(3): 159-161(In Chinese)

[14] 黄琛,顾志峰,曹晓蕾,等.1 型糖尿病大鼠模型建立及稳定性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(3): 49-51
Huang Chen, Gu Zhi-feng, Cao Xiao-lei, et al. The establishment and identification of T1DM rat model [J]. J Mod Lab Med, 2007, 22(3): 49-51(In Chinese)

[15] Ahlgreen SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats [J]. Neuroscience, 1993, 52:1049-1055

[16] 丁正华,严宏,郭勇,等.链脲佐菌素致大鼠糖尿病性白内障的发病机制[J].第四军医大学学报, 2006, 27(13): 1208-1210
Ding Zheng-hua, Yan Hong, Guo Yong, et al. Pathogenesis of diabetic cataract in rats induced by streptozotocin [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2006, 27 (13):1208-1210(In Chinese)

[17] 彭小莉,高喜玲,陈军,等.白芷水煎剂和冻干粉对大鼠外周组织损伤所致的持续性自发性痛、热和机械痛敏作用的比较研究[J].中国中西医结合杂志 2004, 24(S1): 243-247
Peng Xiao-li, Gao Xi-ling, Chen Jun, et al. Comparative study on the anti-ceptive effects of Radix dahuricae decoction and its lyophilized powder [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2004, 24(S1): 243-247(In Chinese)

[18] Fischer TZ, Waxman SG. Neuropathic pain in diabetes--evidence for a central mechanism [J].Nat Rev Neurol, 2010, 6(8):462-466

[19] 江伟.神经病理性疼痛中枢敏化重要参与者:胶质细胞[J].上海医学,2010, 33(4): 295-295
Jiang Wei. The important participant in neuropathic pain central sensitization: glial cell [J]. Shanghai Medical Journal, 2010, 33 (4): 295-295(In Chinese)

[20] García-Samartino C, Delpino MV, Pott Godoy C, et al. Brucella abortus induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis [J].Am J Pathol, 2010, 176(3): 1323-1338

封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕 2010 年 ,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展 ① 封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中 ,偏下) ,这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。② 封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿) ,最强壮晶胚的筛选技术 ,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上 ,右 ,中 ,左) ,这些不仅为不孕不育患者带来了福音 ,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③ 封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长 ,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图 ,右) ,由干细胞培育出的肺脏(六边形图 ,左)等最新研究成果。④ 封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机 ,关于艾滋病的研究取得了很多成就 ,但我们还没有攻克艾滋病 ,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现 ,让无数人感到前所未有的恐慌 (六边形 ,中)。⑤ 生命科学的一切研究成果 ,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花 ,因此图片采用波浪形设计 ,如河流奔涌向前 ,如画卷色彩缤纷 ,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过 ,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展 ,需要有准备的大脑 ,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域 ,我们如图中的小孩一样 睁大纯真的眼睛 好奇的观察、了解 ,我们也需要运用一系列的技术手段 面对未知的一个个 " 黑箱 " 问题 ,需要细心大胆的研究、推断 ,同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机 ,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信 《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台 ,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷 ,让我们与你们共同分享灵感与喜悦 ,成功与辉煌 !