

绿原酸拮抗顺铂诱发的神经病理性疼痛的机制研究

李娜^{1*}, 张学会²

(1. 新乡市中心医院(新乡医学院第四临床学院)药学部, 河南 新乡 453000; 2. 南京医科大学附属江苏盛泽医院药学部, 江苏 苏州 215228)

摘要: 本研究评价绿原酸能否抑制顺铂所致的化疗痛, 并探讨其分子机制。实验方案遵循新乡市中心医院实验动物伦理委员会规定, 所有程序均按照动物使用和护理的伦理原则进行。实验采用 von Frey hair 和热辐仪测定大鼠的机械痛阈和热痛阈, 采用 Western blot 检测大鼠背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid type-1, TRPV1) 的表达, 采用膜片钳记录大鼠 DRG 神经元中 TRPV1 电流。实验结果表明, 顺铂可诱导大鼠产生机械痛和热痛反应, 而 TRPV1 受体拮抗剂 capsaizepine 和绿原酸均可抑制顺铂介导的痛觉敏化; Western blot 实验表明, 顺铂可上调大鼠 DRG 中 TRPV1 蛋白的表达, 而绿原酸则可以抑制顺铂对 TRPV1 蛋白的上调作用; 膜片钳实验结果显示, 顺铂可增加 TRPV1 电流密度, 绿原酸可显著逆转顺铂的这种作用。以上结果表明, 绿原酸可通过抑制 TRPV1 的表达和功能进而缓解顺铂诱发的化疗痛。

关键词: 绿原酸; 顺铂; 化疗痛; 背根神经节; 辣椒素受体

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0616-05

The mechanism of chlorogenic acid against neuropathic pain induced by cisplatin

LI Na^{1*}, ZHANG Xue-hui²

(1. Department of Pharmacy, Xinxiang Central Hospital (the Fourth Clinical College, Xinxiang Medical College), Xinxiang 453000, China; 2. Department of Pharmacy, the Affiliated Jiangsu Shengze Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215228, China)

Abstract: This study aimed to investigate the analgesic effect of chlorogenic acid on cisplatin-induced neuropathic pain and explored the underlying molecular mechanisms. The animal experimental protocol has been reviewed and approved by Laboratory Animal Ethics Committee of Xinxiang Central Hospital, in compliance with the Institutional Animal Care Guidelines. Von Frey hair and a radiant heat was employed to measure mechanical allodynia and thermal hyperalgesia; Western blot was used to examine transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) protein expression in the rat dorsal root ganglion (DRG); patch clamp was used to record TRPV1 currents in DRG neurons. The experimental results showed that chlorogenic acid could attenuate cisplatin-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats. The expression of TRPV1 protein in DRGs was increased in cisplatin-treated rats, while chlorogenic acid also could reverse cisplatin-induced the upregulation of TRPV1 protein. Furthermore, chlorogenic acid could attenuate cisplatin-mediated the upregulation of TRPV1 current density. These above results indicated that chlorogenic acid could alleviate cisplatin-induced pain hypersensitivity through inhibition of the expression and function of TRPV1 in rats.

Key words: chlorogenic acid; cisplatin; chemotherapy-induced pain; dorsal root ganglion; transient receptor potential vanilloid type-1

顺铂 (cisplatin) 是一种通过与细胞内 DNA 结合并抑制其复制, 进而诱导肿瘤细胞死亡的广谱抗癌药物, 临床上主要用于治疗肺癌、睾丸癌等多种恶性肿瘤^[1]。然而, 神经毒性是顺铂化疗最常见的不良反应, 也是临床上限制顺铂应用的主要因素^[2]。顺铂所致神经毒性以外周感觉神经症状为主, 主要表现为肢端的疼痛和麻木感, 目前临床上有一部分患者因为不能耐受疼痛而被迫停止治疗^[3]。辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid type-1, TRPV1) 是从外周初级感觉神经元中克隆出的一种非选择性的阳离子通道, 可介导炎症痛、神经痛和癌症痛的发生发展^[4]。尽管在顺铂诱发的小鼠神经病理痛模型中, 背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 上 TRPV1 的表达显著上调^[5], 但其功能是否发生变化尚不清楚。

绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 是一种广泛存在于杜仲、咖啡及金银花中的多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化、降血压、抗肿瘤等多种药理作用^[5,6]。此外, 绿原酸还可缓解糖尿病大鼠的神经病理痛及前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 诱发的炎症痛^[7,8]。目前的研究表明, 绿原酸可通过抑制酸敏感离子通道 (acid-sensing ion channels, ASICs) 的表达或激活电压依赖性钾通道发挥镇痛作用^[8,9], 但绿原酸是否能够拮抗化疗药物引起的神经病理痛尚不清楚, 因而本研究将采用顺铂诱发的化疗痛模型评价绿原酸的镇痛作用, 并探讨其分子机制。

材料与方法

实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠, 5~6 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证编号: SCXK (京) 2021-0011。大鼠 3~5 只分笼饲养在 (25 ± 2) °C SPF 级动物房内, 自由饮水和饮食。实验方案经新乡市中心医院实验动物伦理委员会审查通过, 所有程序均按照动物使用和护理的伦理原则进行。

实验材料 绿原酸 (C109404)、顺铂 (C295225) 均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 溶解于生理盐水中; 辣椒素 (capsaicin, CAP, 211275) 和辣椒平 (capsazepine, CPZ, 211280) 购于美国 Sigma 公司, 溶解于 DMSO 中。胎牛血清 (SV30087.02) 购于 Hyclone 公司; DMEM 培养基 (12800017) 购于 Gibco 公司; 兔抗 TRPV1 受体多克隆抗体 (SAB5700857) 购于美国 Sigma 公司, 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (TA09)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (ZB-2301)、辣根酶标记兔抗小鼠 IgG (ZB-5305) 均购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

仪器 热辐射测痛仪 Model 390G (上海玉研科学

仪器有限公司); von Frey hair 测痛丝 (美国 Stoelting 公司); 膜片钳放大器 EPC10 (德国 HEKA 公司); real time PCR 仪 ABI 7500 (美国 Applied Biosystems 公司); Western blot 凝胶成像系统 FluorChem M (美国 ProteinSimple 公司)。

动物造模及分组 大鼠适应性饲养 1 周后随机进行分组。为了考察顺铂能否诱发神经痛, 将大鼠随机分为溶剂组和顺铂组, 溶剂组大鼠每天按照 1 mL·kg⁻¹ 剂量腹腔注射生理盐水, 模型组大鼠每天腹腔注射 1 mg·kg⁻¹ 顺铂, 每天 1 次, 连续注射 7 天。为了考察 CPZ 的镇痛效果, 首先对大鼠腹腔注射 1 mg·kg⁻¹ 顺铂, 每天 1 次, 连续注射 7 天, 然后将其随机分为 DMSO 组和 CPZ 组, DMSO 组大鼠腹腔注射 0.1% DMSO, CPZ 组大鼠腹腔注射 30 mg·kg⁻¹ CPZ, 1 h 后检测大鼠的机械痛和热痛行为。为了考察绿原酸对顺铂诱导的大鼠神经痛的影响, 将大鼠随机分为溶剂组、绿原酸低、中、高剂量治疗组。溶剂组大鼠每天腹腔注射 1 mg·kg⁻¹ 顺铂前 1 h 先腹腔注射生理盐水, 绿原酸低、中、高剂量治疗组大鼠每天分别在腹腔注射 1 mg·kg⁻¹ 顺铂前 1 h 先腹腔注射 50、100 和 200 mg·kg⁻¹ 绿原酸, 上述大鼠连续给药 7 天。

大鼠痛行为的测定 机械痛测定: 大鼠置于透明 18 cm × 8 cm × 8 cm 有机玻璃罩内使其适应 15~30 min, 当其安静后测定大鼠机械痛或热痛行为。对于机械痛, 采用不同强度的 von Frey hair (0.4、0.6、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 15.0 g) 按照“up and down”法测定大鼠左后肢的机械痛阈 (paw withdrawal threshold, PWT)。热痛测定时, 首先将热辐射光源对准大鼠左后足垫, 开启光源, 当大鼠出现抬足反应后关闭光源, 记录该次大鼠的抬足潜伏期 (paw withdraw latency, PWL)。为了保证测试结果的准确性, 每只大鼠至少重复测量 3 次, 每次测量间隔至少 5 min, 然后取平均值记为大鼠的热辐射痛阈。

蛋白提取及 Western blot 实验 将各组大鼠处死后, 立即分离出左侧 L4~L6 DRGs 置于 1.5 mL EP 管中, 然后加入 150 μ L RIPA 裂解液, 冰上超声破碎后裂解 1 h 提取组织总蛋白。在 4 °C、12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量。将 50 μ g 蛋白样品加入到 10% SDS-PAGE 凝胶泳道中进行电泳分离。采用电转移法将其转位到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶室温封闭 1 h 后, 分别以 1:1 000 和 1:2 000 的比例配制 TRPV1、 β -actin 抗体, 4 °C 孵育过夜, 经 TBST 洗涤 3 次后, 以 1:1 000 的比例在室温孵育辣根过氧化物酶标记的二抗 1 h, ECL 试剂盒显色, 置于 FluorChem E Alpha 化学发光凝胶成像系统中曝光、拍照。采用

Quantity One 软件分析光密度值。

电生理记录大鼠 DRG 神经元中 TRPV1 电流 急性分离 DRG 神经元: 大鼠处死后, 迅速取出左侧 L4~L6 DRG 置于培养皿中。经预冷的 DMEM 培养基洗涤后加入 $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胶原酶 1.5 mL , 37°C 消化上述 DRG 45 min , 然后再用 0.25% 胰酶 1.5 mL 继续消化 12 min 。使用 2 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化, 以 $1\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 5 min 后弃去上清, 加入新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 用巴斯德管吹打 DRG, 分离出 DRG 神经元。最后将神经元接种在 24 孔板中的圆形盖玻片 (直径 12 mm) 上, 盖玻片提前 1 天给予多聚赖氨酸进行包被。将接种有神经元的 24 孔板置于 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中培养 2 h 后进行膜片钳实验。

电生理记录 TRPV1 电流 选取直径小于 $25 \mu\text{m}$ 的 DRG 神经元, 在电压钳模式下, 将神经元的电压钳制在 -70 mV , 执行 TRPV1 受体激动剂 CAP 灌流给药步骤 (细胞外液 2 s , $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CAP 3 s , 细胞外液 20 s), 记录 TRPV1 电流。采用 EPC-10 膜片钳放大器和 Patch master 软件记录和分析 TRPV1 电流。

统计学分析 所有实验数据均以均值 \pm 标准误差 (mean \pm SEM) 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析, 两组间比较采用非配对 t 检验 (unpaired t -test), 单因素多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两因素多组间比较采用双因素方差分析 (two-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

结果

1 顺铂通过上调 TRPV1 受体的表达和功能介导大鼠的痛敏反应

实验结果显示大鼠在第 3 次注射顺铂后, 与对照

组相比出现显著的机械痛和热痛行为, 且随注射顺铂次数的增加其发生机械痛和热痛的强度也越强 (图 1A、B)。

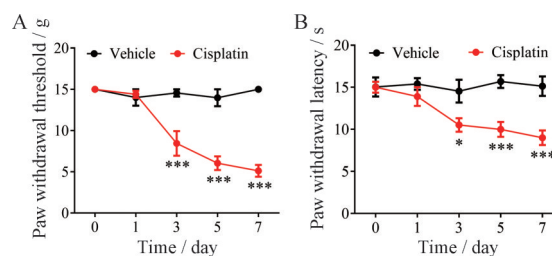


Figure 1 The threshold of mechanical allodynia (A) and thermal hyperalgesia (B) was decreased in cisplatin-treated rats after the third injection. $n = 7$, mean \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs vehicle (normal saline) group (two-way ANOVA)

TRPV1 是一种非选择性阳离子通道受体, 在炎症痛、神经痛中具有重要的作用^[4]。实验结果表明, 大鼠在第 3 次、第 7 次注射顺铂后, 其 DRG 中 TRPV1 蛋白的表达显著上调 (图 2A); 急性分离第 7 次注射顺铂后的大鼠 DRG 神经元, 采用膜片钳记录 TRPV1 电流, 实验结果显示顺铂组大鼠 TRPV1 电流密度较溶剂组显著上调 (图 2B)。

为了证明 TRPV1 介导了顺铂所致的痛觉敏化, 连续注射顺铂造模后腹腔注射 TRPV1 受体拮抗剂 CPZ ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 或 0.1% DMSO 溶剂, 实验结果显示, 与 DMSO 相比, CPZ 可显著上调顺铂处理后的大鼠的机械痛阈和热痛阈 (图 3A、B)。

2 绿原酸通过抑制 TRPV1 的表达和功能缓解顺铂介导的痛敏反应

实验结果显示, 绿原酸可显著抑制顺铂诱发的机械痛和热痛, 并呈剂量依赖性 (图 4A、B)。

大鼠连续注射顺铂 1 周后, 其 DRG 中 TRPV1 受体

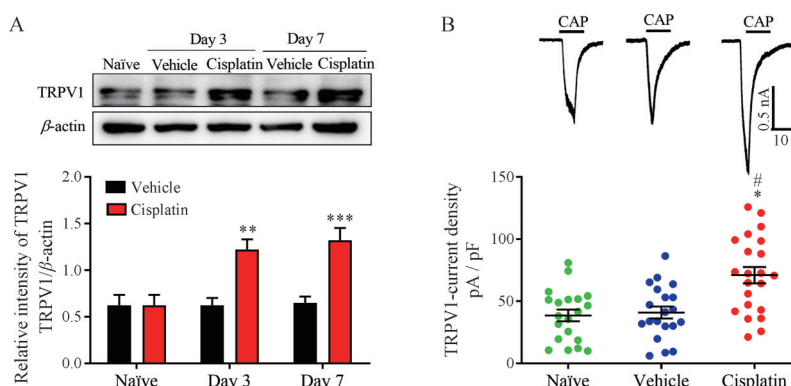


Figure 2 Effects of cisplatin on the expression and function of transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) protein in rat dorsal root ganglion (DRG). A: The protein expression of TRPV1 was upregulated in cisplatin-treated rats. $n = 5$, mean \pm SEM. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs vehicle-treated rats (two-way ANOVA); B: The current density of TRPV1 was increased in cisplatin-treated rats. $n = 20-22$, mean \pm SEM. # $P < 0.05$ vs naive group; * $P < 0.05$ vs vehicle (normal saline) group (one-way ANOVA). CAP: Capsaicin

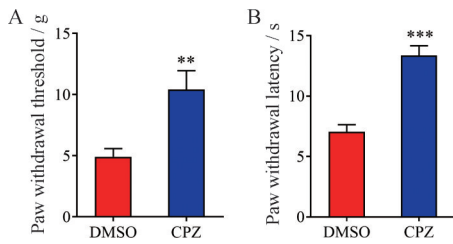


Figure 3 Intraperitoneal administration of capsazepine (CPZ, 30 mg·kg⁻¹) into cisplatin-treated rats increased the threshold of mechanical allodynia (A) and thermal hyperalgesia (B). *n* = 6, mean ± SEM. ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs DMSO group (two-tailed unpaired *t*-test)

蛋白的表达显著上调,而绿原酸则可显著抑制顺铂诱导的 TRPV1 蛋白表达的上调(图 5A)。此外,膜片钳实验结果也显示绿原酸可抑制顺铂介导的 TRPV1 电流密度的上调(图 5B)。

讨论

本研究发现,顺铂可上调大鼠 DRG 中 TRPV1 蛋白的表达,而绿原酸可通过抑制 TRPV1 的表达进而缓解顺铂所致的神经痛。作为一种非选择性配体门控离子通道受体,TRPV1 参与了多种慢性痛的发生、发展^[4]。如在骨癌痛和神经痛动物模型中,TRPV1 在

DRG 中的表达均显著上调,抑制 TRPV1 的功能则可显著缓解动物的痛敏反应^[10,11]。本实验发现在顺铂诱导的化疗痛中,大鼠 DRG 上 TRPV1 的表达及功能均显著增强,TRPV1 受体拮抗剂则可显著缓解大鼠的痛敏反应,提示 TRPV1 介导了顺铂所致的化疗痛。

有研究表明绿原酸可通过激活 GABA 受体抑制大鼠神经病理痛^[12],但目前尚无绿原酸可调控 TRPV1 受体的报道,本研究发现绿原酸可以抑制 TRPV1 受体的表达和功能,但是对于绿原酸是如何抑制 TRPV1 蛋白的表达尚不清楚。炎症因子 IL-6 和 PGE2 等均可以促进 DRG 中 TRPV1 蛋白的表达^[11],并且顺铂可促进 DRG 中的胶质细胞释放 IL-6、PGE2 等炎症因子进而介导疼痛的发生^[13];而绿原酸则具有显著的抗炎活性,可抑制机体产生 IL-6、PGE2 等因子^[14]。因此,提示绿原酸可能通过抑制 IL-6、PGE2 的产生进而下调 TRPV1 的表达。

绿原酸属于一种苯丙素类物质,也是双黄连注射液、清开灵注射液等中药注射液的活性成分之一^[15]。近年的研究表明,绿原酸可通过调节机体的免疫系统或直接促进肿瘤细胞凋亡进而发挥抗肿瘤作用,尤其对肺癌、脑胶质瘤、卵巢癌等恶性肿瘤具有显著的疗效^[16,17]。此外,绿原酸还可增强顺铂、多柔比星、5-氟尿嘧啶等化疗药物的抗肿瘤活性^[18-20]。考虑到绿原酸现

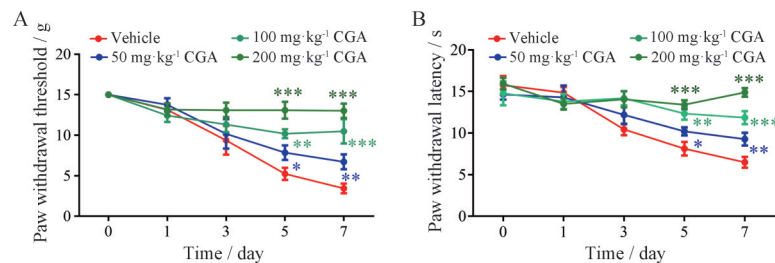


Figure 4 Intraperitoneal injection of chlorogenic acid (CGA) into cisplatin-treated rats increased the threshold of mechanical allodynia (A) and thermal hyperalgesia (B). *n* = 6, mean ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs vehicle (normal saline) group (two-way ANOVA)

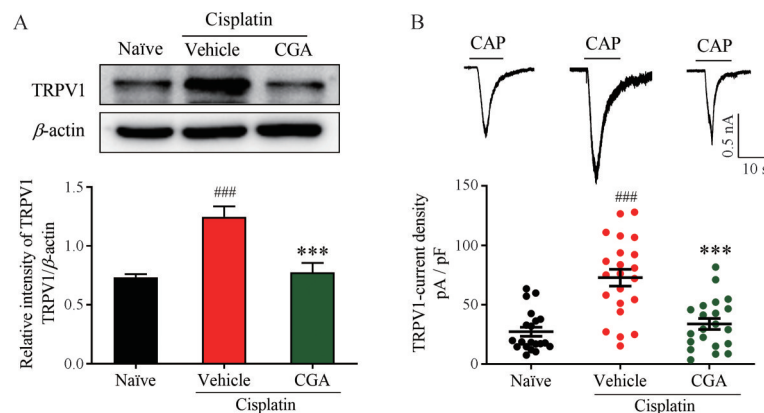


Figure 5 Effects of CGA on the expression and function of TRPV1 protein in cisplatin-treated rat DRGs. A: CGA could reverse cisplatin-induced the upregulation of TRPV1 protein in DRGs (*n* = 5); B: CGA could inhibit cisplatin-induced the upregulation of TRPV1 current density in DRG neurons (*n* = 20–22). Mean ± SEM. ###*P* < 0.001 vs naïve group; ****P* < 0.001 vs vehicle group (one-way ANOVA)

已进入临床试验用于肿瘤的治疗, 因此提示顺铂联用绿原酸有可能在肿瘤的化疗中发挥增效减毒的作用。

作者贡献: 李娜负责实验设计、实验完成、数据分析和论文撰写; 张学会协助实验完成和论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Leo M, Schmitt LI, Kutritz A, et al. Cisplatin-induced activation and functional modulation of satellite glial cells lead to cytokine-mediated modulation of sensory neuron excitability [J]. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113695.
- [2] Dewaeles E, Carvalho K, Fellah S, et al. Istradefylline protects from cisplatin-induced nephrotoxicity and peripheral neuropathy while preserving cisplatin antitumor effects [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132: e152924.
- [3] Ta LE, Bieber AJ, Carlton SM, et al. Transient receptor potential vanilloid 1 is essential for cisplatin-induced heat hyperalgesia in mice [J]. *Mol Pain*, 2010, 6: 15.
- [4] Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A. TRPV1 in chronic pruritus and pain: soft modulation as a therapeutic strategy [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 930946.
- [5] Clifford MN, Jaganath IB, Ludwig IA, et al. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity [J]. *Nat Prod Rep*, 2017, 34: 1391-1421.
- [6] Naveed M, Hejazi V, Abbas M, et al. Chlorogenic acid (CGA): a pharmacological review and call for further research [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 67-74.
- [7] Bagdas D, Ozboluk HY, Cinkilic N, et al. Antinociceptive effect of chlorogenic acid in rats with painful diabetic neuropathy [J]. *J Med Food*, 2014, 17: 730-732.
- [8] Liu F, Lu XW, Zhang YJ, et al. Effects of chlorogenic acid on voltage-gated potassium channels of trigeminal ganglion neurons in an inflammatory environment [J]. *Brain Res Bull*, 2016, 127: 119-125.
- [9] Qu ZW, Liu TT, Qiu CY, et al. Inhibition of acid-sensing ion channels by chlorogenic acid in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *Neurosci Lett*, 2014, 567: 35-39.
- [10] Liu BL, Cao QL, Zhao X, et al. Inhibition of TRPV1 by SHP-1 in nociceptive primary sensory neurons is critical in PD-L1 analgesia [J]. *JCI Insight*, 2020, 5: e137386.
- [11] Fang D, Kong LY, Cai J, et al. Interleukin-6-mediated functional upregulation of TRPV1 receptors in dorsal root ganglion neurons through the activation of JAK/PI3K signaling pathway: roles in the development of bone cancer pain in a rat model [J]. *Pain*, 2015, 156: 1124-1144.
- [12] Hara K, Haranishi Y, Kataoka K, et al. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 723: 459-464.
- [13] Kuai CP, Ju LJ, Hu PP, et al. Alkaloids attenuate cisplatin-induced neuropathic pain by reducing loss of IENF and blocking TRPV1 activation [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48: 407-428.
- [14] Zhang L, Fan Y, Su HW, et al. Chlorogenic acid methyl ester exerts strong anti-inflammatory effects inhibiting the COX-2/NLRP3/NF- κ B pathway [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 6156-6165.
- [15] Liu S, Wang ZZ, Xie YQ, et al. Evaluation of interaction of chlorogenic acid and cefotaxime sodium based on sequential analysis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1471-1476.
- [16] Wang QH, Du TT, Zhang ZH, et al. Advances in research on the pharmacological effects and mechanism of action of chlorogenic acid [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2273-2280.
- [17] Wang L, Du HW, Chen P. Chlorogenic acid inhibits the proliferation of human lung cancer A549 cell lines by targeting annexin A2 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110673.
- [18] Catanzaro D, Filippini R, Vianello C, et al. Chlorogenic acid interaction with cisplatin and oxaliplatin: studies in cervical carcinoma cells [J]. *Nat Prod Commun*, 2016, 11: 499-502.
- [19] Zhu SY, Li XX, Luo ZY, et al. Combined immunochemotherapy achieving targeted co-delivery of chlorogenic acid and doxorubicin by sialic acid-modified liposomes enhances anti-cancer efficacy [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2023. DOI: 10.1007/s13346-023-01426-4.
- [20] Yan Y, Li J, Han J, et al. Chlorogenic acid enhances the effects of 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of extracellular signal-regulated kinases [J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26: 540-546.