

姜黄素下调脊髓 Toll 样受体 4 及下游细胞因子 减弱大鼠神经病理性痛*

顾洪丰^{1, 2)**} 廖端芳³⁾ 唐小卿²⁾ 旷昕⁴⁾

¹⁾ 南华大学心血管病研究所, 湖南省动脉粥样硬化重点实验室, 衡阳 421001; ²⁾ 南华大学生理学教研室, 衡阳 421001;

³⁾ 湖南中医药大学干细胞中药调控与应用研究室, 长沙 410208; ⁴⁾ 南华附属第一医院麻醉科, 衡阳 421001)

摘要 观察鞘内注射姜黄素对坐骨神经慢性压迫性损伤(CCI)大鼠痛阈和脊髓组织 Toll 样受体 4(TLR4)及 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 表达的影响。鞘内置管的 120 只大鼠随机均分为 4 组: 假手术组(Sham), CCI 组, 溶剂对照组(SC), 姜黄素治疗组(Cur, 100 μ g/天), 建立 CCI 大鼠疼痛模型, 术后第 1、3、7、10 和 14 天鞘内给药并测定痛阈, 第 3、7 天取腰段脊髓第 4~6 节段(L4~L6)以 Real-time PCR 与 Western blotting 方法检测 TLR4、HMGB1 mRNA 和蛋白质的表达, ELISA 法观察脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 表达变化。与 Sham 组相比, CCI 组大鼠机械性痛阈与热痛阈显著降低(均 $P < 0.05$), 同时脊髓组织 TLR4、HMGB1 mRNA 和蛋白质的表达明显增加(均 $P < 0.05$), TNF- α 、IL-1 β 与 IL-10 的含量也明显升高(均 $P < 0.05$); 鞘内注射姜黄素明显降低脊髓 TLR4、高迁移率族蛋白 1(HMGB1), TNF- α 和 IL-1 β 的表达, 显著升高脊髓 IL-10 的表达, 同时明显改善 CCI 大鼠疼痛行为($P < 0.05$)。姜黄素减轻神经病理性疼痛可能与下调 TLR4 途径促炎症因子表达有关, 抑制 TLR4 途径有望成为治疗神经病理性疼痛的新策略。

关键词 姜黄素, Toll 样受体 4, 免疫应答, 神经病理性疼痛

学科分类号 R614

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00521

神经病理性痛(neuropathic pain, NPP)以痛觉过敏(hypergesia)、触诱发痛(allodynia)和自发性疼痛为特征, 通常由外周神经、背根神经节(DRG)、脊髓以及脑损伤所致^[1-2]。神经病理性痛是一个棘手的临床问题, 现有的疼痛治疗方法均无显著疗效, 给患者带来了极大的痛苦, 主要是对其确切病理学机制目前尚未明确。近年来, 人们开始关注神经胶质细胞/神经元的信号转导以及中枢神经系统对神经损伤的免疫应答在神经性痛中的作用与机制^[3-4]。研究发现, 中枢神经内致炎症因子(如 TNF- α , IL-1 β 与 IL-6 等)表达增加与神经性痛中的小胶质细胞激活、疼痛过敏以及神经免疫激活有关, 正是这些细胞因子级联反应导致了痛觉过敏的发生^[5]。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是一种与免疫性或炎症性疾病关系密切的模式识别受体, 内、外源性配体与其结合后, 通过激活 NF- κ B 等信号途径生成与释放大量的炎症因子^[6]。我们先前的研究表明, 坐骨神经结扎大鼠(chronic

constrictive injury, CCI)脊髓中的 TLR4 表达显著上调。这些资料提示 TLR4 在感染等所致的疼痛中可能有着重要作用。

姜黄素(curcumin)具有抗炎, 抑制肿瘤、抗氧化等作用。国内已有报道^[7]指出姜黄素能减轻 CCI 大鼠疼痛行为, 然而对其机制尚不清楚, 有待进一步研究阐明。本研究拟通过鞘内注射 TLR4 的阻断剂姜黄素, 观察其对 CCI 神经病理性痛模型大鼠疼痛行为学的变化, 对 TLR4 及 TNF- α , IL-1 β 与 IL-10 表达的影响, 以探讨姜黄素是否通过抑制 TLR4 途径的基因表达而减轻神经病理性疼痛, 为防治神经病理性疼痛提供新策略。

* 国家自然科学基金(30470720)和湖南省教育厅基金(09C835)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281389, E-mail: ghf513@sina.com

收稿日期: 2011-11-08, 接受日期: 2012-02-13

1 材料与amp;方法

1.1 实验动物

清洁级健康成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 250~300 g, 由南华大学实验动物中心提供. 动物脊髓取腰段第 4~6 节段(L4~L6).

1.2 主要试剂

兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体(ab13556), HMGB1 多克隆抗体(ab18256)以及 IL-1 β , IL-10 与 TNF- α ELISA 试剂盒购自 Abcam 公司; 兔抗大鼠 NF- κ B (p65)抗体(CellSignaling 公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(北京中杉金桥公司); 琼脂糖(Sigma 公司); 姜黄素(纯度 \geq 98.5%, Alexis 公司); 10% 水合氯醛溶液(南华大学附属第一医院药剂科).

1.3 主要实验仪器

图像分析系统(武汉华海公司, HIPAS-1000 型); 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司, Elx800 型); 凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司, GOS7500 型); 垂直电泳仪与转膜系统(美国 BioRad 公司); 2390 型电子机械性痛敏仪(美国 IITC 公司); PE-10 导管(美国 BD 公司).

1.4 大鼠鞘内置管

10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠后, 按改良的 Bennett 等法^[9]鞘内置入 Microsnina 导管至脊髓腰段(置入长度约 8.5 cm). 固定好导管, 单笼饲养 3 天后选择没有任何运动障碍的大鼠往导管内注射 2%利多卡因 15 μ l, 观察 30 s, 利多卡因注入鞘内动物会出现双后肢麻痹现象, 如无此现象证明鞘内置管无效, 即淘汰不用, 将置管有效的大鼠第 2 天做 CCI 模型和假损伤模型.

1.5 实验动物分组与处理

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠随机均分为 4 组, 每组 30 只: 假手术组(Sham), CCI 组, 溶剂对照组(SC), 姜黄素治疗组(Cur, 100 μ g/天). 按照不同的处理, 分别在 CCI 疼痛模型和假手术组大鼠术前 1 天和术后 3 天开始蛛网膜下腔注射溶媒二甲基亚砜(DMSO)和姜黄素, 容量均为 10 μ l, 再用生理盐水 DMSO 10 μ l 冲管, 总容量 20 μ l, 每天 1 次, 共 4 天. 观察各组大鼠术前及术后 1 天、3 天、7 天、10 天、14 天疼痛行为学改变以及 CCI 术后 3 天、7 天时点脊髓 TLR4、HMGB1 mRNA 和蛋白质表达; ELISA 法检测 3 天、7 天时点脊髓组织 IL-10、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达.

1.6 CCI 模型的制备

鞘内置管后 3 天, 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(300 mg/kg), 麻醉后常规消毒右下肢, 切开皮肤及皮下组织, 钝性分离肌肉, 于股骨后找到坐骨神经主干, 在显微镜下用 4-0 铬制羊肠线松扎 4 处, 间距为 1 mm, 结扎强度以引起小腿肌肉轻度颤动为宜, 然后逐层缝合. 术后每日肌注青霉素 2 次, 每次 4 万单位. 假手术为仅暴露坐骨神经而不进行结扎.

1.7 痛阈测定

参照 Obata 等^[9]的方法, 采用电子自动爪触觉测试仪(Ugo basile, Comefio), 测机械刺激缩爪阈值(paw withdrawal threshold, PWT); 采用辐射热测痛仪(BME-410A 型, 中国医学科学院生物医学工程研究所)测辐射热刺激缩爪潜伏期(paw withdrawal latency, PWL).

1.8 ELISA 法检测大鼠腰段脊髓 IL-10、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白的表达

脊髓组织称重后置于匀浆缓冲液中匀浆, 样本在 4 $^{\circ}$ C 20 000 g 离心 30 min, 取上清液待用. 按 ELISA 试剂盒说明书操作, 即刻测量标本 A_{450} 值. 通过标准品吸光度 A 值绘出标准曲线, 并根据标准曲线查找其对应的浓度范围, 每组样品点 3 孔.

1.9 实时荧光定量 PCR 检测大鼠腰段脊髓 TLR4 和 HMGB1 mRNA 的表达

在 NCBI 数据库中查询 β -actin、TLR4 和 HMGB1 cDNA 序列, 应用 Perkin- Elmer Applied Biosystems 提供的 PrimerExpress software 设计引物, 交上海生物工程有限公司合成. TLR4 上游引物为 5' GGATGATGCCTCTCTTGCA 3', 下游引物为 5' TGATCCATGCATTGGTAGGTAA 3', 扩增后片段长度为 127 bp; HMGB1 上游引物为 5' AAGCCCTACACCATCTTCCA 3', 下游引物为 5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG 3'; 扩增后片段长度为 582 bp; β -actin 上游引物为 5' GACGATA-TCGCTGCGCTG 3', 下游引物为 5' GTACGACC-AGAGGCATACAGG 3', 产物 348 bp. 取 100 mg 大鼠腰段脊髓组织, 按 E.Z.N.A Total RNA Kit 说明书提取总 RNA, 测定总 RNA 的浓度及纯度, 并根据 RNA 电泳结果鉴定 RNA 的完整性. 以提取的总 RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒(MBI 公司)说明书进行逆转录反应, 合成 cDNA 第一链, -20 $^{\circ}$ C 保存. 以制备的 cDNA 为模板, 分别扩增

β -actin、TLR4 和 HMGB1. 取 cDNA 样品进行 10 倍梯度稀释, 分别进行实时荧光定量 PCR 扩增 (25 μ l 体系), 采用荧光染料法(SYBR Green)实时监测 PCR 产物量, 得出荧光曲线, 通过 cDNA 浓度梯度的对数值对 ΔCT 值作图比较两基因扩增效率. 反应体系为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 进行 45 个循环. 样品设置相同的阈值线, 应用 SPSS13.0 计算重复样品间 CT 均值及标准偏差, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法处理数据.

1.10 Western blotting 检测大鼠腰段脊髓 TLR4 和 HMGB1 蛋白的表达

收集脊髓组织, 经 PBS 洗涤 3 次, 加入含蛋白酶抑制剂的组织裂解液裂解细胞后, 于 4 $^{\circ}$ C, 12 000 g 离心 7 min, 小心吸出上清液, 用 BCA 法进行蛋白质定量. 取 50 μ g 蛋白质 / 泳道加入等体积 5 \times SDS 凝胶加样缓冲液, 煮沸使蛋白质变性. 60 V 积层胶, 120 V 分离胶, 电泳分离细胞蛋白质, 60~100 mA 1h 将蛋白质用半干转膜仪转移至 PDVF 膜上. 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 6~12 h; TBST 洗膜 5~10 min \times 3 次; 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 4~8 h; TBST 洗膜 5~10 min \times 3 次. 然后用 Western blotting 荧光检测试剂激发荧光, 显示于 X 光片, 显影, 定影后进行图像分析.

1.11 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间差异性检验采用小样本 t 检验; 多组之间比较采用 One-Way ANOVA 方差分析, 由 SPSS 13.0 统计软件完成. 统计结果以 $P < 0.05$ 为有显著意义.

2 结 果

2.1 鞘内注射姜黄素对 CCI 大鼠痛敏的影响

Sham 组大鼠术前、术后 PWT 未见明显变化 (图 1), CCI 大鼠于术后 1 天后右肢出现机械异常痛敏与热异常痛敏, 痛阈值减低. 术后第 3 天产生明显异常疼痛, 术后肢机械触压痛阈值与 Sham 组相比下降 50.3% ($P < 0.05$); CCI 术后 7 天, 触压痛阈值和热痛敏阈值分别为 (21.27 ± 2.68) g 和 (8.83 ± 1.46) s, 与 Sham 组相比分别下降 56.2% 和 61.7% (均 $P < 0.05$). 与 CCI 相比较, Cur 组大鼠术后各时点痛阈值明显增加, 这表明姜黄素能显著减轻 CCI 大鼠异常痛敏进程.

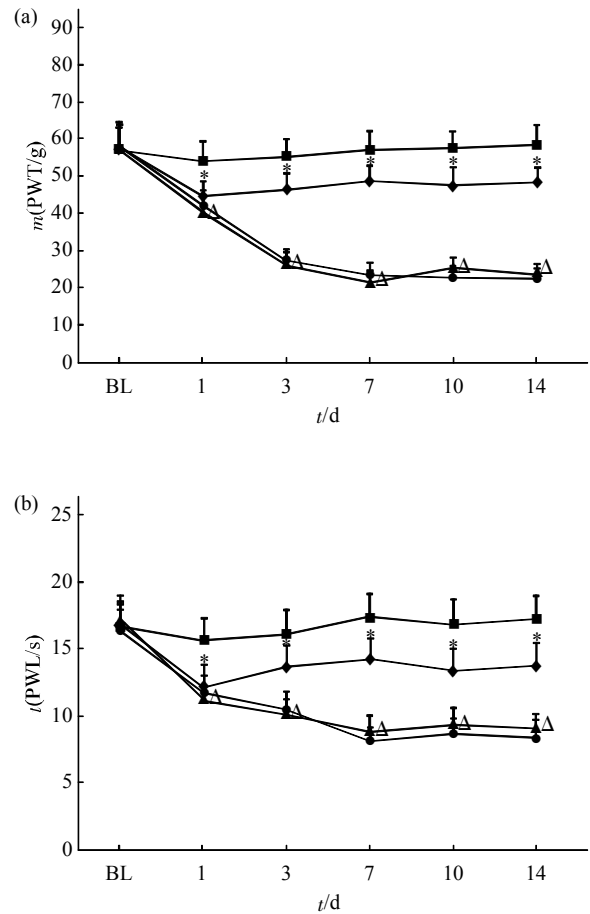


Fig. 1 Effects of curcumin intrathecal administration on PWT and PWL in CCI rats

Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia were assessed after curcumin treatment respectively. Student t -test was performed and significant differences were observed on 1, 3, 7, 10, 14 d between the Cur group and CCI group. Data are $\bar{x} \pm s$, $n=6$, * $P < 0.05$ vs CCI group; $\Delta P < 0.05$ vs Sham group. ■—■: Sham; ▲—▲: CCI; ●—●: SC; ◆—◆: Cur.

2.2 鞘内注射姜黄素对 CCI 大鼠腰段脊髓 IL-10, IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达的影响

ELISA 法检测结果表明 (图 2), Sham 组脊髓组织中 IL-10, IL-1 β 和 TNF- α 蛋白有少量表达, 与 Sham 组相比较, CCI 术后 IL-10、IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达均显著升高. Cur 组则明显抑制 IL-1 β 和 TNF- α 蛋白表达, 与 CCI 组相比较有统计学意义 ($P < 0.05$). Cur 组 IL-10 蛋白的表达则显著增加, 其 IL-10 蛋白表达在 7 天明显升高, 3 天、7 天脊髓中的 IL-10 的蛋白表达与对照组相比差异也均有统计学意义 ($P < 0.05$). CCI 组与 SC 组各检测结果相比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$).

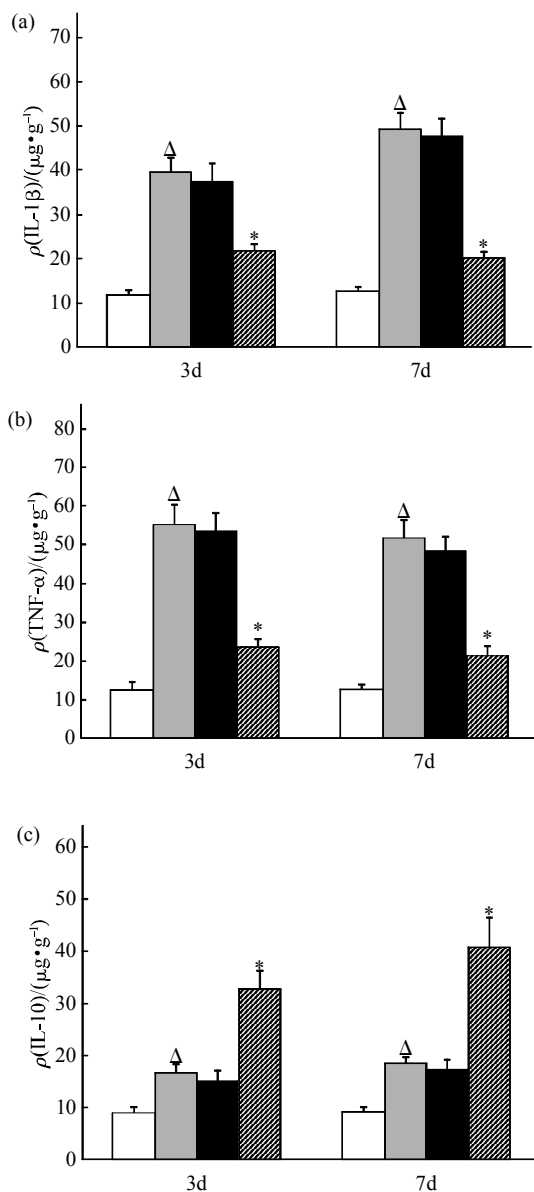


Fig. 2 Effects of curcumin intrathecal administration on the expression of IL-1β (a), TNF-α (b) and IL-10 (c) in lumbar spinal cord of CCI rats

IL-1β, TNF-α, and IL-10 levels in lumbar spinal cord of rats were analyzed by ELISA according to the manufacturer's instructions. Data are $\bar{x} \pm s, n=6, *P < 0.05$ vs CCI and SC group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs Sham group. □: Sham; ■: CCI; ■: SC; ▨: Cur.

2.3 鞘内注射姜黄素对 CCI 大鼠腰段脊髓 TLR4 和 HMGB1 mRNA 表达的影响

分别在 CCI 术后 3 天、7 天时点以 Real-time PCR 方法检测大鼠脊髓 TLR4 和 HMGB1 mRNA 表达水平。结果表明(图 3), CCI 组大鼠脊髓 TLR4 和 HMGB1 mRNA 表达水平显著升高, 3 天时表达

量达最高, 是 Sham 组的 4 倍以上, 与 Sham 组相比, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与 CCI 组相比, Cur 组大鼠脊髓 TLR4 和 HMGB1 mRNA 表达水平显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

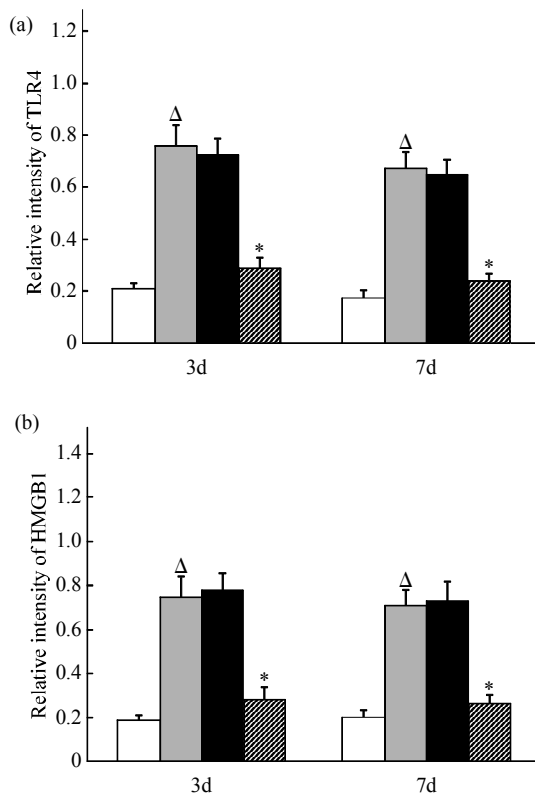


Fig. 3 Effects of curcumin intrathecal administration on the expression of TLR4 (a) and HMGB1 (b) mRNA in lumbar spinal cord of CCI rats

TLR4 and HMGB1 mRNA expression were analyzed by Real-time PCR. y axis represents expression folds of target gene compared to β-actin. Data are $\bar{x} \pm s, n=6, *P < 0.05$ vs CCI and SC group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs Sham group. □: Sham; ■: CCI; ■: SC; ▨: Cur.

2.4 鞘内注射姜黄素对 CCI 大鼠腰段脊髓 TLR4 和 HMGB1 蛋白表达的影响

分别在 CCI 术后 3 天、7 天时点以 Western blotting 方法检测大鼠脊髓 TLR4 和 HMGB1 蛋白表达水平。结果显示(图 4), CCI 组大鼠脊髓 TLR4 和 HMGB1 蛋白表达水平显著增加, 3 天时表达量达最高, 上述 2 种蛋白质表达水平分别与 Sham 组相比, 差异均有统计学意义(分别为: 0.76 ± 0.08 vs $0.21 \pm 0.03, P < 0.05$; 0.75 ± 0.09 vs $0.19 \pm 0.02, P < 0.05$)。与 CCI 组相比, Cur 组大鼠脊髓 TLR4

和 HMGB1 蛋白表达水平显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。以上结果提示, CCI 大鼠痛阈变化可能与 TLR4、HMGB1 高表达有关。

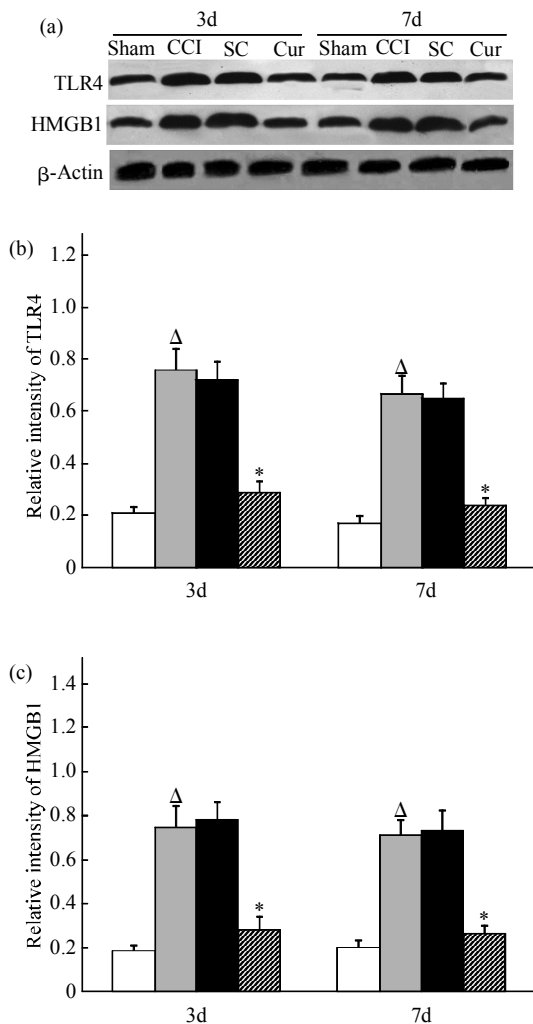


Fig. 4 Effects of curcumin intrathecal administration on the expression of TLR4 (a) and HMGB1 protein in lumbar spinal cord of CCI rats

(a) Western blotting shows changes in expression levels of TLR4 (80 ku) and HMGB1 (30 ku) in lumbar spinal cord. (b, c) The expression of TLR4 (b) and HMGB1 (c) were determined by densitometric analysis respectively. Data are $\bar{x} \pm s$, $n=6$, $*P < 0.05$ vs CCI and SC group; $^{\wedge}P < 0.05$ vs sham group. □: Sham; ■: CCI; ■: SC; ▨: Cur.

3 讨 论

有研究提示, 在外周神经损伤后, TLRs在慢性神经病理性痛中有重要作用^[10]。TLR4 作为重要的模式识别受体, 可以识别众多的病原体相关分子

模式, 如脂多糖、高迁移率族蛋白等激活机体的免疫与炎症应答。啮齿类动物中枢神经系统中表达 TLR4, 尤其在小胶质细胞中大量表达^[5]。TLR4 激活后, 主要通过 Myd88 依赖和 / 或非 Myd88 依赖两条信号转导途径调控相关基因的表达^[11]。脊髓是调节痛觉信号转导的重要中枢, 最近, 脊髓水平 TLR4 及其内源性配体在神经病理性疼痛中作用的研究备受关注^[12-13]。本研究结果显示, CCI 大鼠出现热诱发的痛觉过敏和机械性的痛觉超敏反应, 且脊髓 TLR4 mRNA 及蛋白质的表达均明显升高。姜黄素是中药姜黄中的重要活性成分, 离体和在体实验证实: 它能抑制 TLR4 激活, 降低炎症因子、黏附分子以及趋化因子的表达^[14]。在本研究中值得注意的是, 与 CCI 组相比较, Cur 组大鼠脊髓组织中 TLR4 的表达明显减少, 且该组大鼠的 PWT 和 PWL 同时显著减轻。这提示 CCI 大鼠 TLR4 表达的上调可能与外周神经损伤后脊髓内细胞的损害有关, 是外周神经损伤后神经病理性疼痛发生的关键因素。

在本实验中, CCI 组大鼠在坐骨神经结扎后的第 7 天, 术侧后肢的 PWT 和 PWL 异常表现最为明显, 14 天时痛觉异常仍然存在。目前研究发现慢性神经病理性痛的发生与早期炎症介质释放有关, 但是慢性神经病理性痛的症状维持时间长久, 单用早期炎症介质的释放难以解释其机制^[15]。本实验发现在 Sham 组脊髓组织中表达极少的 HMGB1 mRNA 及蛋白质, CCI 术后 3 天时表达开始明显增强, CCI 术后 7 天大鼠脊髓中表达仍然很高, 这提示 HMGB1 可能参与慢性神经痛的维持。本实验进一步发现, 鞘内注射 TLR4 抑制剂姜黄素后产生明显镇痛效应的同时, 也可抑制脊髓组织中 HMGB1 mRNA 及蛋白质的表达, 这提示下调 HMGB1 的表达可能是姜黄素的镇痛机制之一。作为 TLR4 的内源性配体^[16], HMGB1 蛋白与 TLR4 结合后可以激活 TLR4 信号途径, 进而促成炎症因子的生成与释放。本研究提示, HMGB1 的表达受 TLR4 调节, 反过来它又可以激活 TLR4 途径放大与维持炎症应答来影响神经病理性痛。要进一步证实 HMGB1 是否直接参与了慢性神经性痛的维持及其致病机制还有待深入研究。

TNF- α 与 IL-1 β 等是 TLR4 信号通路下游的炎症因子。本研究发现, 伴随 CCI 大鼠损伤侧痛阈显著降低, 脊髓组织中的 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达明显增加, 这表明神经损伤后这些细胞因子大

量表达, 可能通过级联反应放大疼痛信号, 从而诱发痛觉过敏发生. 本研究中 TNF- α 的表达在神经损伤后 3 天达到峰值, 7 天后已经显著降低, 这种短暂的、一过性增高表明 TNF- α 在神经病理性痛的起始中有着重要作用. 而 IL-1 β 的表达在 CCI 术后 7 天最为明显, 这与 PWT 异常和 PWL 异常表现最为严重的时间点相一致, 这提示 IL-1 β 在神经病理性痛的维持中有着重要作用. 本研究证实, 抑制 TLR4 在显著减轻 CCI 大鼠 PWT 过敏和 PWL 的同时, 且明显降低促炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达. 因此, 我们推测 IL-1 β 、TNF- α 在调节 CCI 大鼠的疼痛过敏中有着重要作用. 但单一抑制 CCI 大鼠 NF- κ B 或者 IL-1 β 、TNF- α 的表达是否能与抑制 TLR4 一样减轻 CCI 大鼠的痛敏有待进一步的研究证实. IL-10 是抗炎细胞因子, 它在神经损伤后表现为缓慢地、持续性地表达增高, 这可能是机体为抗衡那些大量表达的炎性细胞因子而启动的代偿机制, 是机体的一个保护性机制^[17]. 本研究结果显示, 姜黄素在降低 IL-1 β 、TNF- α 的同时, 显著上调 CCI 大鼠脊髓组织中 IL-10 蛋白的表达, 表明姜黄素具有免疫调节功能. 姜黄素升高 IL-10 的表达可能是其抑制 CCI 大鼠炎症应答与减轻痛觉过敏的机制之一.

综上所述, 本研究观察了鞘内注射姜黄素对 CCI 神经病理性痛模型大鼠疼痛行为学的变化及 TLR4/NF- κ B 和 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 蛋白表达的影响, 研究结果证实, 姜黄素能显著减少 CCI 大鼠 TLR4 与促炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的表达, 并且与 CCI 大鼠疼痛行为改善相一致, 这提示抑制 TLR4 途径促炎症因子的表达可能是其减轻神经病理性痛机制之一.

参 考 文 献

- [1] Campbell J N, Meyer R A. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron*, 2006, **52**(2): 77-92
- [2] Orza F, Boswell M V, Rosenberg S K. Neuropathic pain: Review of mechanisms and pharmacologic management. *Neurohabilitation*, 2000, **14**(1): 15-23
- [3] Valleio R, Tilley D M, Vogel L, *et al.* The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Practice*, 2010, **10**(3): 167-184
- [4] 孙 珊, 高俊鹏, 吕 宁, 等. 胶质细胞与病理性疼痛. *细胞生物学杂志*, 2007, **29**(6): 826-830
- Sun S, Gao J P, Lü N, *et al.* *Chin J Cell Biol*, 2007, **29**(6): 826-830
- [5] Kawasaki Y, Zhang L, Cheng J K, *et al.* Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord. *Neuroscience*, 2008, **28**(20): 5189-5194
- [6] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, **124**(4): 783-801
- [7] 何伶俐, 李 旭, 曹 红. 姜黄素对坐骨神经结扎大鼠神经病理性疼痛的影响. *医药导报*, 2009, **28**(4): 457-460
- He L L, Li X, Cao H. *Herald of Medicine*, 2009, **28**(4): 457-460
- [8] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, **33**(1): 87-107
- [9] Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *Neuroscience*, 2004, **24**(45): 10211-10222
- [10] Buchanan M M, Hutchinson M, Watkins L R, *et al.* Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. *J Neurochemistry*, 2010, **114**(1): 13-27
- [11] Denkers E Y, Butcher B A, Del Rio L, *et al.* Manipulation of mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB-signaling cascades during intracellular toxoplasma gondii infection. *Immunol Rev*, 2004, **201**(1): 191-205
- [12] Wu F X, Bian J J, Miao X R, *et al.* Intrathecal siRNA against Toll-like receptor 4 reduces nociception in a rat model of neuropathic pain. *Int J Med Sci*, 2010, **7**(5): 251-259
- [13] Sorge R E, LaCroix-Fralish M L, Tuttle A H, *et al.* Spinal cord Toll-like receptor 4 mediates inflammatory and neuropathic hypersensitivity in male but not female mice. *J Neurosci*, 2011, **31**(43): 15450-15454
- [14] Youn H S, Lee J Y, Saitoh S I, *et al.* Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of toll-like receptor by epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharm*, 2006, **72**(7): 850-859
- [15] Jasmin L, Vit J P, Bhargava A, *et al.* Can satellite glial cells be therapeutic targets for pain control?. *Neuron Glia Biology*, 2010, **6**(1): 63-71
- [16] Yu M, Wang H, Ding A, *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, 2006, **26**(2): 174-179
- [17] Yu C G, Fairbanks C A, Wilcox G L. Effects of agmatine, interleukin-10, and cyclosporin on spontaneous pain behavior after excitotoxic spinal cord injury in rats. *Pain*, 2003, **4**(3): 129-140

Curcumin Alleviates Neuropathic Pain Through Decreasing The Expressions of Proinflammatory Cytokines Produced by TLR4 Pathway in The Spinal Cord of Rats*

GU Hong-Feng^{1,2)**}, LIAO Duan-Fang³⁾, TANG Xiao-Qing²⁾, KUANG Xin⁴⁾

¹⁾ Institute of Cardiovascular Disease, Key Laboratory for Artherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Department of Physiology, Hengyang 421001, China;

³⁾ Division of Stem Cell Regulation and Application, State Key Laboratory of Chinese Medicine

Powder and Medicine Innovation in Hunan (Incubation), Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

⁴⁾ The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract In this study, we investigate the effects of curcumin intrathecal injection on pain threshold and the expressions of TLR4, TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the spinal cord of rats with chronic constrictive injury (CCI). 120 males Sprague-Dawley (SD) rats fitted with intrathecal catheters were randomly divided into four groups: sham group (Sham), CCI group (CCI), solvent control group (SC), and curcumin treated group (Cur, 100 μ g/d). Neuropathic pain was produced by CCI of right sciatic nerve as described previously. On the 1st, 3rd, 7th, 10th, and 14th day after surgery, 100 μ g curcumin dissolved in DMSO 10 μ l was administered intrathecally once daily, and then pain threshold was measured. The expressions of TLR4, HMGB1 mRNA, and protein in lumbar spinal cord 4~6(L4~L6) were assessed by RT-PCR and Western blotting, respectively. The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the spinal cord were detected by ELISA. We found that the paw withdrawal threshold (PWT) and paw withdrawal latency (PWL) were significantly decreased after CCI ($P < 0.05$), and the expressions of TLR4, HMGB1 mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$); the levels of TNF- α and IL-1 β in the spinal cord were also significantly increased after CCI compared with those in the sham group ($P < 0.05$). Curcumin markedly attenuated CCI-induced mechanical allodynia and thermal hyperalgesia through inhibiting the activation of TLR4 pathway and production of inflammatory cytokines. These results demonstrated that curcumin alleviated neuropathic pain may be by decreasing the expression inflammatory cytokines produced by TLR4 pathway.

Key words curcumin, Toll-like receptor 4, immune responses, neuropathic pain

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00521

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30470720) and Hunan Province Department of Education Fund (09C835).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281389, E-mail: ghf513@sina.com

Received: November 8, 2011 Accepted: February 13, 2012