

8-O-乙酰山栀子苷甲酸对慢性炎性痛模型大鼠的镇痛作用机制研究^Δ

张维^{1*},王健²,范博渊³,李梦颖⁴,樊婷婷¹,李锐莉¹,程艳^{5#}(1.空军军医大学第一附属医院药剂科,西安710032;2.中国人民解放军94750部队医院门诊部,福建连城366200;3.西安交通大学第二附属医院心血管内科,西安710004;4.空军军医大学第一附属医院内分泌代谢科,西安710032;5.中国人民解放军94816部队门诊部,福州350002)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)13-1583-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.13.08

摘要 目的:研究8-O-乙酰山栀子苷甲酸(8-OaS)对慢性炎性痛模型大鼠的镇痛作用机制。方法:将30只雄性SD大鼠分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和8-OaS低、中、高剂量组(3、10、30 μg/kg),每组6只。除假手术组外,其余各组大鼠足底注射弗氏完全佐剂复制慢性炎性痛模型。造模成功后,各组大鼠鞘内给予相应药物,每天1次,连续给药7 d后,采用Von-Frey细丝检测各组大鼠足底疼痛阈值,计算各组大鼠疼痛阈值曲线下面积和8-OaS的半数有效剂量(ED₅₀)。另取36只雄性SD大鼠分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和8-OaS组(给药剂量为ED₅₀),同法造模及给药,然后采用免疫荧光组织染色法观察各组大鼠脊髓背角内离子钙结合衔接分子1(Iba-1)、磷酸化p38丝裂原激活的蛋白激酶(p-p38 MAPK)的阳性表达情况,采用Western blotting法检测各组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6及肿瘤坏死因子α(TNF-α)的蛋白表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠足底疼痛阈值和曲线下面积均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,8-OaS低剂量组大鼠给药5、6、7 d后足底疼痛阈值显著升高($P<0.05$),8-OaS中、高剂量组大鼠足底疼痛阈值和曲线下面积均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);8-OaS各剂量组上述指标大部分有显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);8-OaS的ED₅₀为18.87 μg/kg。免疫荧光组织染色和Western blotting法结果显示,p-p38 MAPK主要表达在Iba-1阳性表达的细胞上;与假手术组比较,模型组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK的荧光密度和Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1β、TNF-α蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,8-OaS组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK的荧光密度和Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1β、TNF-α蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结论:鞘内给予8-OaS可有效缓解大鼠慢性炎性痛,其机制可能与抑制p38 MAPK的磷酸化和IL-6、IL-1β、TNF-α的表达有关。

关键词 8-O-乙酰山栀子苷甲酸;脊髓背角;p38丝裂原激活的蛋白激酶;炎性痛;大鼠;机制

- 药,2010,41(7):1215-1218.
- [16] 余霄,欧阳晓琴,姜宝霞,等.雷公藤多苷对特发性膜性肾病患者抗磷脂酶A2受体抗体的影响[J].世界中医药,2018,13(5):1168-1171.
- [17] 王吉耀.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2005:575-576.
- [18] 陈文彬,潘祥林.诊断学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2006:402-403.
- [19] 谢璇.特发性膜性肾病证素探讨及补气健脾益肾法治疗膜性肾病大鼠实验研究[D].北京:北京中医药大学,2015.
- [20] GARSEN M, ROPS AL, RABELINK TJ, et al. The role of heparanase and the endothelial glycocalyx in the development of proteinuria[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(1):49-55.
- [21] 吕喆,刘建华,秦晓松.乙酰肝素酶在膜性肾病中的研究进展[J].临床检验杂志,2018,36(6):444-445.
- [22] CASSINELLI G, ZAFFARONI N, LANZI C. The heparanase/heparan sulfate proteoglycan axis: a potential new therapeutic target in sarcomas[J]. *Cancer Lett*, 2016, 382(2):245-254.
- [23] 赵琛.从气血水论治特发性膜性肾病及乙酰肝素酶与IMN尿蛋白相关性的研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [24] 刘国菊,李丛丛,李睿坤,等.转化生长因子β₁在纤维化疾病发病中作用的研究进展[J].山东医药,2018,58(30):106-109.
- [25] 张倩,范华平,张秀侠,等.益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中乙酰肝素酶、转化生长因子β₁表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(3):228-229.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603320);西京医院学科助推计划项目(No.XJZT14M15)

* 主管药师。研究方向:天然药物抗炎镇痛作用机制及药效物质基础。E-mail:1358359@qq.com

通信作者:主治医师。研究方向:中药镇痛机制。E-mail:961332878@qq.com

(收稿日期:2019-09-20 修回日期:2020-04-14)
(编辑:张元媛)

Study on Mechanism of Analgesic Effect of 8-O-acetyl-safalinoside on Chronic Inflammatory Pain Model Rats

ZHANG Wei¹, WANG Jian², FAN Boyuan³, LI Mengying⁴, FAN Tingting¹, LI Ruili¹, CHENG Yan⁵ (1. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Outpatient Clinic, No. 94750 Army Hospital of PLA, Fujian Liancheng 366200, China; 3. Dept. of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 4. Dept. of Endocrinology and Metabolism, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 5. Outpatient Department, No. 94816 People's Liberation Army, Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the mechanism of analgesic effect of 8-O-acetyl-safalinoside (8-OaS) on chronic inflammatory pain model rats. **METHODS:** Totally 30 male SD rats were divided into sham operation group (normal saline), model group (normal saline), 8-OaS low-dose, medium-dose and high-dose groups (3, 10, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), with 6 rats in each group. Except for sham operation group, other groups were given planter injection of Freund's complete adjuvant to induce chronic inflammatory pain model. After successful modeling, the rats in each group were given corresponding drugs intrathecally, once a day, for 7 consecutive days. Then Von-Frey filaments were used to detect the planter pain threshold of the rats in each group; the area under the planter pain threshold curve of each group and the half effective dose (ED_{50}) of 8-OaS were calculated. Another 36 male SD rats were divided into sham operation group (normal saline), model group (normal saline) and 8-OaS group (dose of ED_{50}), and the modeling method and administration route were the same as above. Immunofluorescence histochemical staining was used to observe the positive expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) and signal molecule phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK); Western blotting assay was used to determine the expression of Iba-1, p-p38 MAPK, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in spinal dorsal horn of rats. **RESULTS:** Compared with sham operation group, plantar pain threshold and area under the curve in model group were reduced significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, plantar pain threshold increased significantly after 5, 6, 7 days of administration in 8-OaS low-dose group ($P < 0.05$), plantar pain threshold and area under the curve in 8-OaS medium-dose and high-dose groups were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Most of above indexes in each dose group of 8-OaS were significantly different, and ED_{50} of 8-OaS was 18.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Results of immunohistochemistry staining and Western blotting showed that p-p38 MAPK was mainly expressed in Iba-1 positive cells. Compared with sham operation group, the fluorescence density of Iba-1 and p-p38 MAPK in spinal dorsal horn, the expression of Iba-1, p-p38 MAPK, IL-6, IL-1 β and TNF- α were significantly increased in model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model group, the fluorescence density of Iba-1 and p-p38 MAPK in spinal dorsal horn, the expression of Iba-1, p-p38 MAPK, IL-6, IL-1 β and TNF- α were decreased significantly in 8-OaS group ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Intrathecal administration of 8-OaS can effectively alleviate chronic inflammatory pain in rats. The mechanism may be related to the inhibition of the phosphorylation of p38 MAPK and the expression of IL-6, IL-1 β and TNF- α .

KEYWORDS 8-O-acetyl-safalinoside; Spinal dorsal horn; p38 mitogen-activated protein kinase; Inflammatory pain; Rat; Mechanism

炎性痛是临床疾病的常见并发症,如慢性胰腺炎、腰椎间盘突出症及慢性炎性损伤均可诱发炎性痛^[1-2]。近年来,随着人们生活节奏加快和生活习惯改变,慢性病发生率逐年升高,伴随而来的慢性炎性痛的发生率也逐渐升高,严重影响患者的生活质量和精神状态^[3]。当前对于慢性炎性痛的发生机制尚不明确,临床上治疗以药物镇痛为主、物理手段为辅的方式,但药物的副作用较大,如吗啡类镇痛药物具有成瘾性^[4],故对于慢性炎性痛发生机制的探索和治疗药物的更新显得尤为关键。

小胶质细胞是中枢神经系统内的巨噬细胞,离子钙结合衔接分子1(Iba-1)是其特异性标记分子,相关研究表明,在L5脊神经结扎模型大鼠体内,Iba-1约在术后3

d表达增加,表明小胶质细胞被激活,进而增加如白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症介质的产生,促进脊髓背角内星形胶质细胞的活化,加重脊髓背角内的炎症反应^[5]。8-O-乙酰山栀子苷甲酸(8-OaS)是从中药独一味中提取的单体成分,相关研究表明,其可通过抑制星形胶质细胞内TNF- α /细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路的活化并特异性降低组蛋白去乙酰化酶5的表达,从而发挥镇痛作用^[6-7]。另有研究表明,p38丝裂原激活的蛋白激酶(p38 MAPK)的磷酸化主要发生于脊髓背角小胶质细胞内^[8],且在慢性炎性痛的发展窗口期会伴随小胶质细胞的激活而表达增加。基于此,本研究采用皮下注射弗氏完全佐剂复制大鼠慢

性炎性痛模型,重点研究8-OaS对慢性炎性痛模型大鼠脊髓背角内小胶质细胞激活的抑制作用,以及对磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)和相关炎症因子表达的影响,以期明确8-OaS对慢性炎性痛的镇痛作用机制,并为其治疗慢性炎性痛提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

CM1950型冷冻切片机(德国Leica公司);TL36-TYZD型摇床(北京中西远大科技有限公司);Microfuge 20R型低温离心机(美国Beckman公司);BX-60型共聚焦激光显微镜(日本Olympus株式会社);Tissuelyser-192型组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Chemi-Doc™ MP System全能型成像系统(美国Bio-Rad公司);Von-Frey细丝(上海玉研科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

8-OaS(批号:766720,纯度:≥97%)、弗氏完全佐剂(批号:344289)、小鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号:A1978)均购自美国Sigma公司;小鼠抗Iba-1单克隆抗体(批号:ab15690)、兔抗TNF- α 多克隆抗体(批号:ab92324)均购自美国Abcam公司;兔抗p38 MAPK单克隆抗体(批号:4511s)、兔抗p-p38 MAPK单克隆抗体(批号:8690s)均购自美国Cell Signaling Technology公司;小鼠抗IL-6多克隆抗体(批号:sc-57315)、小鼠抗IL- β 多克隆抗体(批号:sc-12742)均购自美国Santa Cruz生物科技有限公司;Alexa Fluor® 594标记的驴抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(批号:211-165-109)、Alexa Fluor® 488标记的驴抗兔IgG(批号:211-545-109)均购自美国Jackson Immuno-Research公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗小鼠IgG(批号:ZDR-5307)、HRP标记的驴抗兔IgG(批号:ZDR-5308)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;10%十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)(美国Bio-Rad公司);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司);组织裂解液(北京百奥莱博科技有限公司);ECL化学发光液(北京拜尔迪诊断技术有限公司);其他试剂均为实验室常用试剂;水为纯净水。

1.3 动物

健康的雄性SD大鼠,体质量200~220 g,购自空军军医大学动物实验中心,实验动物生产许可证号:SCXK(军)2019-001。所有大鼠均饲养于22~25℃的恒温环境中,白昼黑夜更替,正常饮食饮水。本实验在空军军医大学动物研究伦理委员会批准下进行。

2 方法与结果

2.1 分组、造模与给药

参考相关文献方法^[6],将所有大鼠置于行为检测室适应15 min后,再置于镂空的行为检测钢丝网上适应5 min,然后序贯采用1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0、26.0

g的Von Frey细丝垂直检测各组大鼠足底疼痛阈值,若出现缩足、舔足、抬足等行为,则表明该Von Frey细丝对应规格为此时大鼠足底疼痛阈值。获取大鼠疼痛阈值数据后,剔除疼痛阈值异常(疼痛阈值过高或过低)的大鼠后分成两批,第一批分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和8-OaS低、中、高剂量组(3、10、30 μ g/kg,给药剂量参考本课题组前期研究^[7],临用时用生理盐水配制药液),每组6只,进行疼痛阈值检测,并计算8-OaS的半数有效剂量(ED_{50})值。第二批分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、8-OaS组(给药剂量为 ED_{50}),每组12只,并采用免疫荧光组织染色法和Western blotting法进行后续试验。

除假手术组大鼠同法注射等体积的生理盐水外,其余各组大鼠左侧足底注射50 μ L弗氏完全佐剂,复制慢性炎性痛模型大鼠。造模成功后将大鼠进行鞘内置管:先腹腔注射7%水合氯醛(0.4 mL/kg)麻醉,然后置于动物手术台上,取L2~S1节段备皮消毒;然后沿后背正中线垂直切开皮肤,依次分离筋膜和肌肉,暴露L5脊椎和L4、L5脊椎间隙,首尾牵拉暴露硬脊膜,采用消毒玻璃细针于硬脊膜处开一点状入口,取预先注入2%利多卡因的PE管置入硬脊膜,并停止牵拉L4和L5脊椎,将多余的PE管沿皮下从项部穿出并固定,再以红霉素软膏均匀涂抹伤口,待大鼠恢复正常活动时,向PE管内注入10 μ L生理盐水或8-OaS药液,管口外端用火封闭,当大鼠双下肢行动不便时则证明PE管置管成功^[8]。每日向大鼠鞘内PE管内注入10 μ L生理盐水或8-OaS药液1次,连续给药7 d。

2.2 大鼠足底疼痛阈值检测

将“2.1”项下第一批大鼠于给药后连续检测7 d,每天于同一时间进行检测;若大鼠用15.0 g或26.0 g Von Frey细丝检测时,其行为仍未改变,则停止检测。记录各组大鼠足底疼痛阈值,并用GraphPad Prism 5软件对数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义;采用量效曲线计算各组大鼠足底疼痛阈值曲线下面积和8-OaS的 ED_{50} 。各组大鼠足底疼痛阈值测定结果见表1,各组大鼠疼痛阈值曲线下面积测定结果见图1。

由表1和图1可知,与假手术组比较,模型组大鼠足底疼痛阈值和曲线下面积均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,8-OaS低剂量组大鼠在给药5、6、7 d后足底疼痛阈值显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),8-OaS中、高剂量组大鼠在给药1~7 d后足底疼痛阈值和曲线下面积均显著升高($P < 0.01$);与8-OaS低剂量组比较,8-OaS中、高剂量组大鼠在给药2~7 d后足底疼痛阈值和曲线下面积均显著降低($P < 0.01$);与8-OaS中剂量组比较,

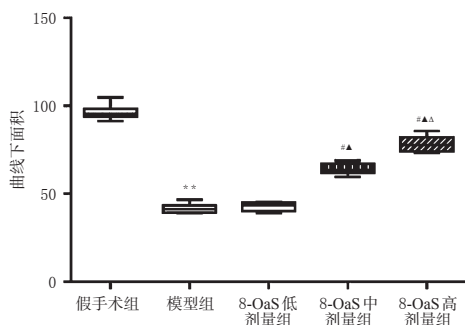
表1 各组大鼠足底疼痛阈值测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Plantar pain threshold of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
假手术组	13.92 ± 0.67	13.49 ± 0.80	14.51 ± 1.04	14.70 ± 0.58	13.21 ± 0.76	12.98 ± 0.91	14.13 ± 0.81
模型组	6.12 ± 0.62**	6.33 ± 0.55**	6.39 ± 0.63**	6.08 ± 0.34**	4.36 ± 0.55**	4.79 ± 0.48**	6.06 ± 0.15**
8-OaS 低剂量组	5.34 ± 0.61	5.16 ± 0.58 [#]	5.81 ± 0.24	6.11 ± 0.39	6.59 ± 0.39 [#]	6.06 ± 0.47 [#]	5.76 ± 0.48 [#]
8-OaS 中剂量组	7.64 ± 0.48 ^{#▲▲}	8.04 ± 0.57 ^{#▲▲▲}	9.12 ± 0.43 ^{#▲▲▲}	10.70 ± 1.19 ^{#▲▲▲}	8.24 ± 1.00 ^{#▲▲}	10.72 ± 1.10 ^{#▲▲}	10.61 ± 0.67 ^{#▲▲▲}
8-OaS 高剂量组	12.35 ± 0.82 ^{#▲▲▲▲}	10.00 ± 0.30 ^{#▲▲▲▲}	10.82 ± 1.18 ^{#▲▲▲▲}	10.44 ± 0.64 ^{#▲▲▲}	11.65 ± 0.87 ^{#▲▲▲▲}	11.83 ± 0.83 ^{#▲▲}	14.26 ± 0.95 ^{#▲▲▲▲}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$;与8-OaS低剂量组比较,^{▲▲} $P < 0.01$;与8-OaS中剂量组比较,^{▲▲} $P < 0.01$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$; vs. 8-OaS low-dose group, ^{▲▲} $P < 0.01$; vs. 8-OaS medium-dose group, ^{▲▲} $P < 0.01$



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与8-OaS低剂量组比较,[▲] $P < 0.05$;与8-OaS中剂量组比较,[▲] $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. 8-OaS low-dose group, [▲] $P < 0.05$; vs. 8-OaS medium-dose group, [▲] $P < 0.05$

图1 各组大鼠足底疼痛阈值曲线下面积测定结果

Fig 1 Area under the planter pain threshold curve of rats in each group

8-OaS高剂量组大鼠给药1~7 d后足底疼痛阈值和曲线下面积均显著升高($P < 0.01$)。经量效曲线计算得8-OaS的ED₅₀为18.87 μg/kg。

2.3 各组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK的表达情况检测

采用免疫荧光组织染色法检测。第二批大鼠末次给药后,各组取6只大鼠腹腔注射7%水合氯醛(0.4 mL/kg)麻醉,迅速开胸,沿心尖位置扎入灌注针,打开灌注阀门用0.01 mol/L的PBS迅速冲出大鼠体内血液,待其肝脏发白时加入4%多聚甲醛固定。取出固定好的大鼠脊髓L4~L6节段,继续固定2 h后取出,置于30%蔗糖溶液中脱水48 h,在冷冻切片机中切成25 μm薄片,再用PBS漂洗10 min×3次,以5%山羊血清封闭2 h;加入单克隆小鼠抗Iba-1抗体和单克隆兔抗p-p38 MAPK抗体,于4℃孵育48 h;用PBS漂洗10 min×3次,滴加Alexa Flour[®] 594标记的驴抗小鼠IgG和Alexa Flour[®] 488标记的驴抗兔IgG,置于室温孵育4 h;用PBS漂洗10 min×3次,在暗光条件下将切片转移至载玻片上,并置于暗盒中,待表面水分自然晾干后使用荧光封片剂封片。采用多通道共聚焦显微镜观察切片中表达Iba-1、p-p38 MAPK的阳性细胞,以出现红色和绿色颗粒为其阳性表

达,黄色为两者双重标记的阳性表达;采用Image Pro Plus 6.0软件分析黄色区域的荧光密度,荧光密度越大则蛋白表达越强。各组大鼠脊髓背角内Iba-1和p-p38 MAPK蛋白表达的免疫荧光组织染色图见图2,荧光密度测定结果见表2。

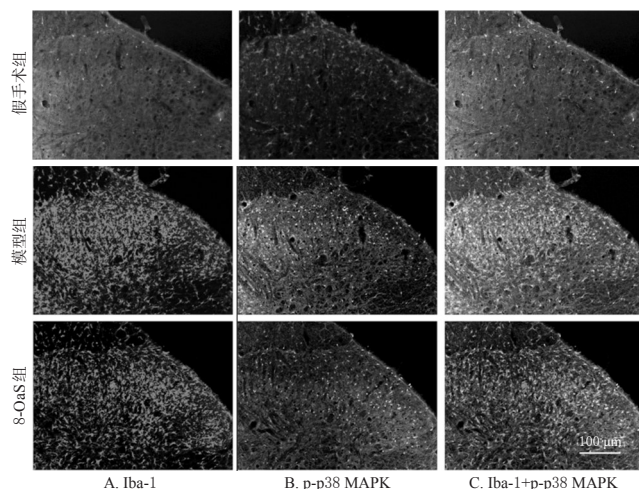


图2 各组大鼠脊髓背角内Iba-1和p-p38 MAPK蛋白表达的免疫荧光组织染色图(×20)

Fig 2 Immunofluorescence staining of Iba-1 and p-p38 MAPK protein expression in the spinal dorsal horn of rats in each group (×20)

表2 各组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK蛋白表达的荧光密度测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Fluorescence density of Iba-1 and p-p38 MAPK in spinal dorsal horn of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Iba-1	p-p38 MAPK	Iba-1+p-p38 MAPK
假手术组	358.83 ± 152.73	129.31 ± 52.39	92.95 ± 21.18
模型组	2 899.77 ± 728.60**	1 858.27 ± 517.33**	1 645.93 ± 485.22**
8-OaS组	2 027.83 ± 638.19 [#]	1 408.29 ± 557.45 [#]	1 225.31 ± 406.65 [#]

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$, vs. model group, [#] $P < 0.05$

由图2和表2可知,p-p38 MAPK表达阳性的细胞主要与Iba-1表达阳性的细胞(即小胶质细胞)重合。与假手术组比较,模型组大鼠脊髓背角内Iba-1和p-p38

MAPK 蛋白表达的荧光密度显著升高($P < 0.01$),表明小胶质细胞被激活;与模型组比较,8-OaS 组大鼠脊髓背角内 Iba-1 和 p-p38 MAPK 蛋白表达的荧光密度显著降低($P < 0.05$),表明 8-OaS 可抑制小胶质细胞的活化。

2.4 各组大鼠脊髓背角内相关蛋白的表达水平检测

采用 Western blotting 法检测。第二批大鼠末次给药后,各组取剩余 6 只大鼠腹腔注射 7% 水合氯醛(0.4 mL/kg)麻醉,迅速开胸,沿心尖位置扎入灌注针,打开灌注阀门用 0.01 mol/L 的 PBS 迅速冲出大鼠体内血液。待其肝脏发白时,于冰上迅速取出脊髓 L4~L6 节段,迅速分离脊髓背角,置于事先溶解有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的强效裂解液中,静置 10 min 后采用超声组织裂解仪将组织裂解,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行蛋白定量。取蛋白进行变性处理,然后进行 SDS-PAGE 电泳分离目的蛋白条带,以 PVDF 转膜后采用 5% 脱脂奶粉封闭 10 min,再依次加入小鼠抗 Iba-1 单克隆抗体、兔抗 p38 MAPK 单克隆抗体、兔抗 p-p38 MAPK 单克隆抗体、小鼠抗 IL-6 多克隆抗体、小鼠抗 IL- β 多克隆抗体、兔抗 TNF- α 多克隆抗体及小鼠抗 β -actin 抗体(稀释比例为 1:500),封袋后摇床振荡 4 h;用 TBST 漂洗 10 min \times 3 次,对应加入 HRP 标记的驴抗小鼠 IgG 和 HRP 标记的驴抗兔 IgG(稀释比例为 1:1 000),室温振荡 1 h;用 TBST 漂洗 10 min \times 3 次,加入 ECL 液进行反应。采用全能型成像系统扫描条带,以 β -actin 或 p38 MAPK 为内参,采用 Image Pro Plus 6.0 软件分析各条带相对灰度值,用来表示目标蛋白的表达水平。各组大鼠脊髓背角内 Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 蛋白表达的电泳图见图 3,蛋白表达水平测定结果见表 3。

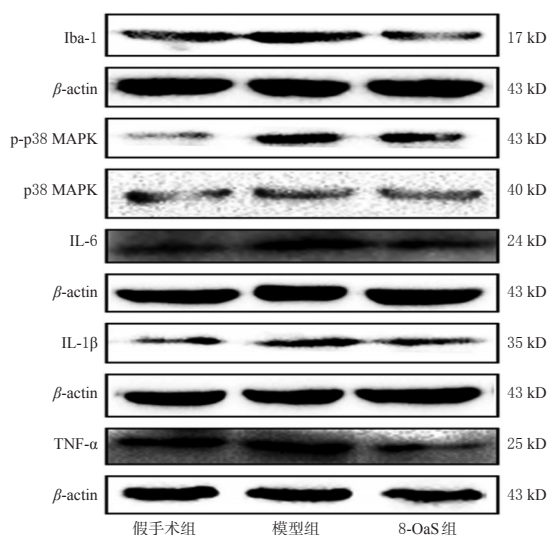


图 3 各组大鼠脊髓背角内 Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoregrams of protein expressions of Iba-1, p-p38 MAPK, IL-6, IL-1 β and TNF- α in the spinal dorsal horn of rats in each group

表 3 各组大鼠脊髓背角内 Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 蛋白表达水平的测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab 3 Protein expressions of Iba-1, p-p38 MAPK, IL-6, IL-1 β and TNF- α in the spinal dorsal horn of rats in each group($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	Iba-1/ β -actin	p-p38 MAPK/p38 MAPK	IL-6/ β -actin	IL-1 β / β -actin	TNF- α / β -actin
假手术组	0.62 \pm 0.25	0.93 \pm 0.21	0.71 \pm 0.35	0.88 \pm 0.38	1.04 \pm 0.42
模型组	1.82 \pm 0.73*	2.35 \pm 1.02*	1.92 \pm 0.69*	1.68 \pm 0.66*	1.98 \pm 0.82*
8-OaS 组	0.94 \pm 0.33#	1.62 \pm 0.85#	1.05 \pm 0.42#	1.13 \pm 0.37#	1.01 \pm 0.46#

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$, vs. model group, # $P < 0.05$

由图 3 和表 3 可知,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓背角内 Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,8-OaS 组大鼠脊髓背角内 Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论

慢性炎性痛的发生机制尚不明确,目前被学者们较为认可的是炎症机制和代谢机制^[9-11]。其中炎症机制主要涉及到脊髓背角内的小胶质细胞和星形胶质细胞,两者在慢性炎性痛的发生和发展过程中扮演着重要的角色。

相关研究表明,在慢性炎性痛模型大鼠中,脊髓背角内小胶质细胞和星形胶质细胞会依次被激活,小胶质细胞犹如星形胶质细胞激活的“阀门”,一旦开启便是疼痛慢性化的开始^[12-13],因此,小胶质细胞又被称为慢性炎性痛的“先锋”。p-p38 MAPK 信号通路是激活小胶质细胞的重要通路,相关研究表明,慢性炎性痛模型大鼠或小鼠脊髓背角内小胶质细胞中的 p-p38 MAPK 水平显著增加,而给予 p38 MAPK 抑制剂可显著降低 p-p38 MAPK 的表达水平进而抑制小胶质细胞的活化^[14-18]。在慢性炎性痛过程中,活化的小胶质细胞会进一步分泌大量的促炎因子如 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等,从而加重炎症反应^[5]。

8-OaS 是从中药独一味中分离的单体成分,前期研究已证实其具有一定的镇痛作用^[6-7]。基于此,采用足底皮下注射完全弗氏佐剂复制大鼠慢性炎性痛模型,考察 8-OaS 对大鼠足底疼痛阈值的影响,以及小胶质细胞中 p-p38 MAPK 的表达情况和脊髓背角内 Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 蛋白的相对表达水平。结果显示,鞘内给予 8-OaS 可有效降低弗氏完全佐剂诱导的慢性炎性痛,且呈剂量依赖趋势,其 ED₅₀ 为 18.87 μ g/kg; p-p38 MAPK 主要表达在 Iba-1 阳性表达的细胞(即胶质细胞)中,并且随着小胶质细胞的活化其表达呈升高趋势;在给予 8-OaS 后,可降低小胶质细胞的活性,且可显

著降低脊髓背角内 Iba-1、p-p38MAPK、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 蛋白的表达水平。

综上所述,鞘内给予 8-OaS 可有效缓解大鼠慢性炎性痛,其机制可能与抑制 p38 MAPK 磷酸化和 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的表达有关。

参考文献

- [1] TURUNEN A, KUULIALA A, PENTTILA A, et al. Time course of signaling profiles of blood leukocytes in acute pancreatitis and sepsis[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2020, 80(2):114-123.
- [2] MCWILLIAMS DF, RAHMAN S, JAMES RJE, et al. Disease activity flares and pain flares in an early rheumatoid arthritis inception cohort; characteristics, antecedents and sequelae[J]. *BMC Rheumatol*, 2019. DOI: 10.1186/s41927-019-0100-9.
- [3] BARROS LL, FARIAS AQ, REZAIE A. Gastrointestinal motility and absorptive disorders in patients with inflammatory bowel diseases: prevalence, diagnosis and treatment[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(31):4414-4426.
- [4] EIDSON LN, MURPHY AZ. Inflammatory mediators of opioid tolerance: implications for dependency and addiction[J]. *Peptides*, 2019. DOI: 10.1016/j.peptides.2019.01.003.
- [5] WANG J, QIAO Y, YANG RS, et al. The synergistic effect of treatment with triptolide and MK-801 in the rat neuropathic pain model[J]. *Mol Pain*, 2017. DOI:10.1177/1744806917746564.
- [6] 王健,肖小莉,崔佳,等. 8-O-乙酰山栀子苷甲酸对慢性炎性痛模型大鼠脊髓背角内 HDAC1~5 表达的影响及与 JAK2-STAT3 信号通路的关系研究[J]. *中国药房*, 2019,30(5):38-43.
- [7] ZHANG W, BAI Y, QIAO Y, et al. 8-O-acetyl shanzhisi methylester from *lamioiphomis rotata* reduces neuropathic pain by inhibiting the ERK/TNF- α pathway in spinal astrocytes[J]. *Front Cell Neurosci*, 2018. DOI: 10.3389/fncel.2018.00054.
- [8] SHUAI S, HUAN X, MIN H, et al. Isotalatizidine, a C19-diterpenoid alkaloid, attenuates chronic neuropathic pain through stimulating ERK/CREB signaling pathway-mediated microglial dynorphin a expression[J]. *J Neuroinflammation*, 2020. DOI:10.1186/s12974-019-1696-9.
- [9] WANG A, TIE M, GUO D, et al. A novel mechanism of BAM8-22 inhibiting microglia activation: represses CX3CR1 expression via upregulating miR-184[J]. *J Mol Neurosci*, 2019. DOI:10.1007/s12031-019-01455-0.
- [10] YAZDZNI J, KHAVI RK, GHAVIMI MA, et al. Calcitonin as an analgesic agent: review of mechanisms of action and clinical applications[J]. *Rev Bras Anesthesiol*, 2019. DOI:10.1016/j.bjan.2019.08.004.
- [11] HE JH, YU L, WANG ZY, et al. Inhibition of monocarboxylate transporter 1 in spinal cord horn significantly reverses chronic inflammatory pain[J]. *J Pain Res*, 2019, 12(5):2981-2990.
- [12] SHINODA M, KUBO A, HAYASHI Y, et al. Peripheral and central mechanisms of persistent orofacial pain [J]. *Front Neurosci*, 2019. DOI:10.3389/fnins.2019.01227.
- [13] DU HX, CHEN XG, ZHANG L, et al. Microglial activation and neurobiological alterations in experimental autoimmune prostatitis-induced depressive-like behavior in mice[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15(6):2231-2245.
- [14] QIN B, LI Y, LIU X, et al. Notch activation enhances microglial CX3CR1/P38 MAPK pathway in rats model of vincristine-induced peripheral neuropathy[J]. *Neurosci Lett*, 2019. DOI:10.1016/j.neulet.2019.134624.
- [15] PAIGE C, MARUTHY GB, MEJIA G, et al. Spinal inhibition of P2XR or p38 signaling disrupts hyperalgesic priming in male, but not female, mice[J]. *Neuroscience*, 2018, 385(10):133-142.
- [16] FUJITA M, TAMANO R, YONEDA S, et al. Ibutilast produces anti-allodynic effects at the persistent phase of peripheral or central neuropathic pain in rats: different inhibitory mechanism on spinal microglia from minocycline and propentofylline[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833(15):263-274.
- [17] CHENG H, ZHANG Y, LU W, et al. Caffeic acid phenethyl ester attenuates neuropathic pain by suppressing the p38/NF- κ B signal pathway in microglia[J]. *J Pain Res*, 2018, 11(1):2709-2719.
- [18] JIN GL, HE SD, LIN SM, et al. Koumine attenuates neuroglia activation and inflammatory response to neuropathic pain[J]. *Neural Plast*, 2018. DOI:10.1155/2018/9347696.

(收稿日期:2020-03-27 修回日期:2020-04-16)

(编辑:唐晓莲)