

血根碱对腰椎间盘突出症大鼠炎性疼痛的改善作用及机制^Δ

阮 祯^{1*}, 何生华^{1#}, 龚雪花², 乔 松¹, 王 超³ (1. 武汉市中医医院推拿科, 武汉 430000; 2. 武汉市第七医院中南路街第一社区卫生服务中心, 武汉 430060; 3. 湖北省中西医结合医院康复医学中心推拿科, 武汉 430010)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)09-1087-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.09.11



摘要 **目的** 研究血根碱(SG)对腰椎间盘突出症(LDH)大鼠炎性疼痛的改善作用及机制。**方法** 制备LDH模型大鼠,然后分为模型组和SG低、中、高剂量组(1.00、2.50、6.25 mg/kg)以及SG高剂量+Anisomycin[丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)激活剂]组(6.25 mg/kg SG+5 mg/kg Anisomycin),每组10只;另取10只大鼠作为对照组。各组大鼠腹腔注射相应药物,对照组和模型组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,每天1次,连续7 d。观察大鼠一般情况及神经功能变化;测定大鼠疼痛阈值[包括机械刺激缩足反射阈值(PWMT)和热刺激缩足反射潜伏期(PWTL)];观察大鼠背根神经节(DRG)组织病理变化;检测大鼠血清中炎症因子[肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)]和疼痛因子[神经肽Y(NPY)、5羟色胺(5-HT)]水平;观察脊髓小胶质细胞中离子钙接头蛋白1(Iba-1)和星形胶质细胞中胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)的阳性表达;检测大鼠DRG组织中MAPK/胞外信号调节激酶(ERK)/核因子 κ B(NF- κ B)信号通路相关蛋白和TNF- α 、IL-1 β 蛋白的表达。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠精神食欲不振,后肢运动障碍,DRG椎间盘神经元细胞排列紊乱;神经功能评分,血清中TNF- α 、IL-1 β 、NPY水平,Iba-1、GFAP阳性表达,DRG组织中p38 MAPK、ERK1/2、NF- κ B p65蛋白磷酸化水平和TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);PWMT、PWTL和血清中5-HT水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组相比,SG各剂量组大鼠精神食欲好转,后肢运动障碍缓解,DRG椎间盘神经元结构改善,上述定量指标水平均显著逆转($P<0.05$)。Anisomycin可逆转SG对LDH大鼠炎性疼痛的改善作用。**结论** SG可通过抑制LDH大鼠DRG组织中小胶质细胞活化,减少炎症因子释放,提高疼痛阈值,从而改善炎性疼痛;其作用机制可能与抑制MAPK/ERK/NF- κ B信号通路有关。

关键词 血根碱;腰椎间盘突出症;炎性疼痛;MAPK/ERK/NF- κ B信号通路

Improvement effect and mechanism of sanguinarine on inflammatory pain in rats with lumbar disc herniation

RUAN Zhen¹, HE Shenghua¹, GONG Xuehua², QIAO Song¹, WANG Chao³ (1. Dept. of Massage, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China; 2. The First Community Health Service Center, Zhongnan Road Street, Wuhan Seventh Hospital, Wuhan 430060, China; 3. Dept. of Massage, Rehabilitation Medicine Center, Hubei Province Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Wuhan 430010, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the improvement effect and mechanism of sanguinarine (SG) on inflammatory pain in rats with lumbar disc herniation (LDH) and its mechanism. **METHODS** LDH model rats were established and divided into model group, SG low-dose, medium-dose and high-dose groups (1.00, 2.50, 6.25 mg/kg), high-dose of SG+Anisomycin [mitogen-activated protein kinase (MAPK) activator] group (6.25 mg/kg SG+5 mg/kg Anisomycin), with 10 rats in each group. Another 10 rats were included as the control group. Each group was given corresponding drugs intraperitoneally, while the control group and model group were given an equal volume of normal saline intraperitoneally, once a day, for 7 consecutive days. The general situation and neurological changes of rats in each group were observed, and the pain threshold [including paw withdrawal mechanical threshold

(PWMT) and paw withdrawal thermal latency (PWTL)] of rats was determined; the histopathological changes of dorsal root ganglion (DRG) were observed in rats. The serum levels of inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β)] and pain factors [neuropeptide Y (NPY), 5-hydroxytryptamine (5-HT)] in rats were detected.

Δ 基金项目 湖北省中医药管理局中医药科研项目(No. ZY2023M026)

* 第一作者 住院医师, 硕士。研究方向: 腰椎间盘突出治疗。
E-mail: pemuto@163.com

通信作者 主任医师, 硕士。研究方向: 腰椎间盘突出治疗。
E-mail: xuncha0711@163.com

The positive expressions of ionized-calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1) in spinal cord microglia and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in astrocytes were observed. The expressions of proteins related to MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK)/nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway, TNF- α and IL-1 β proteins were detected in DRG tissue of rats. **RESULTS** Compared with the control group, the rats in the model group showed decreased appetite, hindlimb movement disorders, and disordered neuronal cell arrangement, the neurological score, the levels of TNF- α , IL-1 β , NPY, the positive expressions of Iba-1 and GFAP, the phosphorylations of p38 MAPK, ERK1/2 and NF- κ B p65, the protein expressions of TNF- α and IL-1 β were significantly increased ($P<0.05$); PWMT, PWTL and the levels of 5-HT were significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the model group, the rats of SG groups showed some relief in their mental appetite and hindlimb motor disorders, the intervertebral disc structure of DRG was restored, and the levels of the above quantitative indicators had significantly reversed ($P<0.05$). Anisomycin reversed the improvement effect of SG on inflammatory pain in LDH rats. **CONCLUSIONS** SG can improve inflammatory pain by inhibiting the activation of microglia in DRG tissue of LDH rats, reducing the release of inflammatory factors, and increasing pain threshold, and its mechanism of action may be related to the inhibition of MAPK/ERK/NF- κ B signaling pathway.

KEYWORDS sanguinarine; lumbar disc herniation; inflammatory pain; MAPK/ERK/NF- κ B signaling pathway

腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)是一种常见的临床脊柱疾病,是由于各种原因导致腰椎间盘突出纤维环部分或完全破裂,髓核组织从破裂口向后突出,刺激或压迫神经根和马尾神经的临床综合征^[1]。LDH具有腰痛、麻木、下肢疲劳等多种临床表现,严重影响患者的生活质量和工作能力。研究表明,LDH的发病机制与机械性神经根压迫和炎症有关,LDH髓核病变导致背根神经节(dorsal root ganglia, DRG)炎症反应增强,会引起持续性疼痛反应^[2]。目前,LDH的治疗方案主要是保守治疗和手术治疗,但是大多数保守治疗可能出现症状无改善的情况,而手术治疗存在一定副作用。因此,迫切需要治疗效果更好的新药来治疗LDH引起的神经性疼痛。

血根碱(sanguinarine, SG)是从血根草和其他罂粟蓝堇属植物的根中提取的生物碱,具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用^[3]。已有研究表明,SG可通过抑制小胶质细胞和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路的激活来减轻神经性疼痛^[4]。因此,本课题组推测SG对LDH大鼠炎性疼痛有改善作用。研究表明,各种炎症刺激会导致免疫细胞中MAPK、胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)和c-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinases, JNK)的磷酸化激活,激活的MAPK可促进核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的激活,进而促进肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的产生。有报道指出,激活LDH大鼠脊髓组织中MAPK/ERK/NF- κ B信号通路可促进炎症反应,进而导致神经性疼痛^[5]。此外,有研究表明,SG可通过抑制慢性缩窄损伤大鼠脊髓组织中p38 MAPK激活的神经炎症来减轻神经性疼痛^[6]。但SG是否可通过抑制MAPK/ERK/NF- κ B信号通

路激活,减轻LDH大鼠炎性疼痛尚不明确。基于此,本研究基于MAPK/ERK/NF- κ B信号通路,探讨SG对LDH大鼠炎性疼痛的改善作用及机制,旨在为SG应用于LDH的治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

本研究所用动物为SPF级SD雄性大鼠,共65只,8~10周龄,购自三峡大学实验动物中心,动物生产许可证为SCXK(鄂)2022-0012。大鼠在温度22℃、12 h光暗循环的环境中适应性喂养1周后进行实验。本研究经三峡大学实验动物中心伦理委员会审核批准,批号为2022-06-182。

1.2 主要试剂与仪器

SG标准品(批号230604,纯度 $\geq 98\%$)购自武汉艾美捷科技有限公司;Anisomycin(MAPK激活剂,批号221115,纯度 $\geq 99\%$)购自美国MCE公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号221209)购自上海一研生物科技有限公司;TNF- α 、神经肽Y(neuropeptide Y, NPY)的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(批号分别为230204、230412)均购自上海信裕生物科技有限公司;5羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、IL-1 β 的ELISA试剂盒(批号分别为220908、220814)均购自武汉菲恩生物科技有限公司;兔源离子钙接头蛋白1(ionized-calcium binding adaptor molecule-1, Iba-1)、胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)、磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK)、p38 MAPK、磷酸化ERK1/2(p-ERK1/2)、ERK1/2、磷酸化NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)、NF- κ B p65、TNF- α 、IL-1 β 和GAPDH抗体(批号分别为221103、221216、230105、230403、230212、230310、230306、221109、221004、230304、230211)均购

自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 230106)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 主要仪器

本研究所用主要仪器有 Multiskan GO 型全自动酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、CX23 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)、DM IL LED 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)、Ugo Basile 型足底热痛仪(上海玉研科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

随机选取 10 只大鼠作为对照组,剩余大鼠参照文献[7]构建 LDH 模型,具体操作如下:麻醉大鼠,将背部和腹部脱毛,在距肛门约 1 cm 的尾根处切一个 3~3.5 cm 长的切口,从第二和第三椎骨之间的尾椎间盘中取出髓核。在背侧切开内侧纵切口,依次剥离皮肤、皮下组织和腰背筋膜,沿旋突左侧将骶棘肌剥离并分离,切断左侧 L4 至 L5 椎板、关节突和部分椎弓根,暴露左侧神经根以及 L4、L5 相应的 DRG,将自体髓核放入硬膜外腔,缝合伤口。对照组大鼠暴露神经根,切除尾椎髓核,不进行移植。术后 3 d 静脉注射青霉素防止感染。当造模大鼠出现精神萎靡、行走缓慢、后肢跛行等行为时表明造模成功^[8]。将造模成功的大鼠分为模型组和 SG 低、中、高剂量组以及 SG 高剂量+Anisomycin 组,每组 10 只。SG 低、中、高剂量组大鼠分别于腹腔注射 1.00、2.50、6.25 mg/kg SG^[3],SG 高剂量+Anisomycin 组大鼠在腹腔注射 6.25 mg/kg SG 的同时腹腔注射 Anisomycin 5 mg/kg^[9],对照组和模型组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。

2.2 大鼠一般情况及神经功能变化观察

末次给药结束后,观察各组大鼠一般情况,包括毛发、饮食、体重、运动情况等,并参考文献[10]对其神经功能进行评分:0 级(2 分),正常;1 级(4 分),步态基本正常,足趾异常;2 级(6 分),左后肢无力,轻度跛行;3 级(8 分),左后肢无力,跛行明显;4 级(10 分),站立不稳,左后肢活动;5 级(12 分),左后肢瘫痪,不能自主活动。

2.3 大鼠疼痛阈值检测

机械性痛觉过敏测定:“2.2”项下实验结束后通过 Von Frey 纤维丝测试大鼠右足机械痛阈。将大鼠固定于安静环境,施加足够的力将 Von Frey 纤维丝垂直刺激大鼠后爪表面 6~8 s,若出现爪子迅速缩回、舔爪子或嚎叫即为阳性反应,将该力记为机械刺激缩足反射阈值

(paw withdrawal mechanical threshold, PWMT)。每次测试间隔时间大约 2 min,重复 3 次,取平均值。

热痛觉过敏测定:上述实验结束后采用热痛仪测试大鼠后爪足底的热敏感性,若大鼠出现缩足情况即为阳性反应,将开始刺激到出现阳性反应的时间记为热刺激缩足反射潜伏期(paw withdrawal thermal latency, PWTL)。热刺激时间为 10~15 s,上限为 20 s,以防止组织损伤。每次测试间隔 5 min,重复 3 次,取平均值。

2.4 样本取材

痛觉实验结束后,麻醉处死大鼠,心脏取血,离心取上清,保存于 -20 °C 用于 TNF- α 、IL-1 β 、5-HT、NPY 检测。取血完成后,解剖大鼠,将椎旁肌与腰椎节段分离,切除椎间盘纤维环,暴露 L4~L6 节段髓核组织;收集 DRG 组织,一部分固定于 4% 多聚甲醛中,其余部分冷冻并保存在 -80 °C。

2.5 大鼠 DRG 组织的病理学形态观察

将 DRG 组织于 4 °C 条件下固定于 4% 多聚甲醛中 48 h,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,切成 4 μ m 薄片;取部分切片(剩余部分用于免疫荧光实验)进行 HE 染色后,置于显微镜下观察 DRG 组织的病理变化。

2.6 大鼠血清中炎症因子和疼痛因子水平的检测

采用 ELISA 法进行检测。取 -20 °C 保存的大鼠血清,按照 ELISA 试剂盒说明书,检测炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和疼痛因子 5-HT、NPY 的水平。

2.7 大鼠脊髓小胶质细胞和星形胶质细胞活化情况的观察

采用免疫荧光法进行观察。取“2.5”项下剩余切片,以 PBS 洗涤后,透化 30 min;以 7% 驴血清封闭 1 h 后,与一抗 Iba-1(稀释度为 1:500)、GFAP(稀释度为 1:500)在 4 °C 孵育过夜;洗涤后与二抗(稀释度为 1:400)在室温下孵育 45 min,以 DAPI 处理切片后,在荧光显微镜下观察切片并采集图像,采用 Image Pro Plus 软件分析 Iba-1、GFAP 蛋白(镜下均呈绿色荧光)的荧光强度。Iba-1 蛋白荧光强度越高,表明脊髓小胶质细胞活化程度越高;GFAP 蛋白荧光强度越高,表明星形胶质细胞活化程度越高。

2.8 大鼠 DRG 组织中 MAPK/ERK/NF- κ B 信号通路相关蛋白和炎症相关蛋白表达检测

采用 Western blot 法进行检测。取各组大鼠 DRG 组织适量,经裂解液裂解后,取 30 μ g 蛋白样品进行变性处理,然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转

膜;以5%脱脂牛奶封闭,在4℃条件下加入p-p38 MAPK、p38 MAPK、p-ERK1/2、ERK1/2、p-NF-κB p65、NF-κB p65、TNF-α、IL-1β、GAPDH(稀释度均为1:1 000)一抗孵育过夜;洗膜后,在室温下加入二抗(稀释度为1:2 000)孵育60 min。采用凝胶成像仪显影,并使用ImagePro Plus软件分析蛋白条带灰度值,以p-p38 MAPK与p38 MAPK、p-ERK1/2与ERK1/2、p-NF-κB p65与NF-κB p65的灰度比值表示p38 MAPK、ERK1/2、NF-κB p65蛋白的磷酸化水平,以TNF-α、IL-1β与内参蛋白(GAPDH)的灰度比值表示两者的表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用SNK-*q*检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 SG对大鼠一般情况及神经功能的影响

对照组大鼠行为正常,毛发光滑,饮食与行为状态良好;模型组大鼠精神萎靡,毛发杂乱,食欲不振,体重下降,后肢运动障碍;SG各剂量组大鼠精神、食欲好转以及后肢运动障碍缓解,体重升高;SG高剂量+Anisomycin组大鼠的精神、运动状况较SG高剂量组下降。对照组、模型组、SG低剂量组、SG中剂量组、SG高剂量组、SG高剂量+Anisomycin组大鼠神经功能评分分别为(2.01±0.24)、(9.03±1.08)、(5.93±0.62)、(4.75±0.49)、(2.84±0.31)、(6.55±0.68)分。与对照组相比,模型组大鼠神经功能评分显著升高($P<0.05$);与模型组相比,SG各剂量组大鼠神经功能评分均显著降低($P<0.05$);与SG高剂量组相比,SG高剂量+Anisomycin组大鼠神经功能评分显著升高($P<0.05$)。

3.2 SG对大鼠疼痛阈值的影响

与对照组相比,模型组大鼠PWMT、PWTL均显著降低($P<0.05$);与模型组相比,SG低、中、高剂量组PWMT、PWTL均显著升高($P<0.05$);与SG高剂量组相比,SG高剂量+Anisomycin组PWMT、PWTL均显著降低($P<0.05$)。结果见表1。

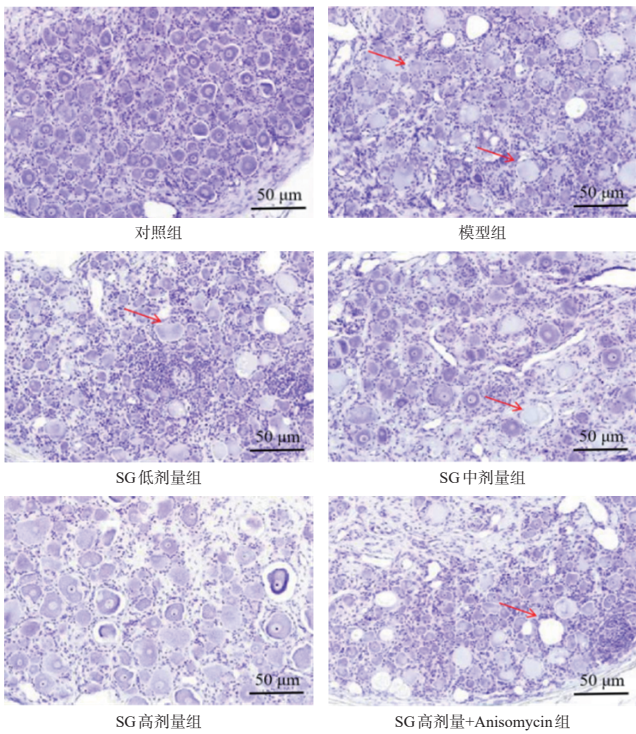
表1 各组大鼠疼痛阈值比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	PWMT/g	PWTL/s
对照组	32.65±3.48	14.83±1.52
模型组	10.86±1.27 ^a	6.94±0.72 ^a
SG低剂量组	18.04±2.15 ^b	8.25±0.88 ^b
SG中剂量组	24.28±2.63 ^b	10.43±1.52 ^b
SG高剂量组	29.07±3.15 ^b	12.47±1.35 ^b
SG高剂量+Anisomycin组	15.74±1.61 ^c	7.29±0.83 ^c

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与SG高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.3 SG对大鼠DRG组织病理变化的影响

对照组大鼠DRG椎间盘神经元细胞结构正常,细胞核完整。模型组大鼠DRG椎间盘神经元细胞排列紊乱,细胞肿胀,界限模糊,核仁染色不均。与模型组比较,SG各剂量组大鼠DRG椎间盘神经元细胞结构改善,细胞肿胀减轻,界限清晰,核仁染色均匀。与SG高剂量组比较,SG高剂量+Anisomycin组大鼠DRG椎间盘神经元细胞结构紊乱。结果见图1。



注:箭头所指为神经元丢失或空泡化。

图1 各组大鼠DRG组织病理变化情况(HE染色)

3.4 SG对大鼠血清中炎症因子和疼痛因子水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠血清中TNF-α、IL-1β、NPY水平均显著升高,5-HT水平显著降低($P<0.05$);与模型组相比,SG各剂量组大鼠血清中TNF-α、IL-1β、NPY水平均显著降低,5-HT水平均显著升高($P<0.05$);与SG高剂量组相比,SG高剂量+Anisomycin组大鼠血清中TNF-α、IL-1β、NPY水平均显著升高,5-HT水平显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠炎症因子和疼痛因子水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	TNF-α/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	5-HT/(ng/L)	NPY/(ng/L)
对照组	57.23±6.07	32.54±3.48	7.09±0.84	108.36±11.42
模型组	182.47±19.36 ^a	91.05±9.32 ^a	4.29±0.46 ^a	186.25±19.38 ^a
SG低剂量组	131.57±13.27 ^b	72.88±7.46 ^b	4.98±0.52 ^b	168.33±17.46 ^b
SG中剂量组	98.64±10.57 ^b	54.27±5.58 ^b	5.73±0.59 ^b	142.29±15.71 ^b
SG高剂量组	69.48±7.39 ^b	39.41±4.06 ^b	6.59±0.57 ^b	119.08±12.84 ^b
SG高剂量+Anisomycin组	142.38±15.83 ^c	85.73±8.72 ^c	4.71±0.48 ^c	171.46±18.63 ^c

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$;c:与SG高剂量组比较, $P<0.05$ 。

3.5 SG对大鼠脊髓小胶质细胞和星形胶质细胞活化的影响

与对照组相比,模型组大鼠脊髓小胶质细胞中Iba-1、星形胶质细胞中GFAP的阳性表达均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,SG各剂量组大鼠Iba-1、GFAP的阳性表达均显著降低($P<0.05$);与SG高剂量组相比,SG高剂量+Anisomycin组大鼠Iba-1、GFAP的阳性表达均显著升高($P<0.05$)。结果见图2(SG低剂量组图略)、表3。

3.6 SG对大鼠DRG组织中MAPK/ERK/NF- κ B信号通路相关蛋白及炎症相关蛋白表达的影响

与对照组相比,模型组大鼠DRG组织中p38 MAPK、ERK1/2、NF- κ B p65蛋白磷酸化水平和TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,SG各剂量组大鼠DRG组织中上述指标水平均显著降低($P<0.05$);与SG高剂量组相比,SG高剂量+Anisomycin组大鼠DRG组织中上述指标水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图3、表4。

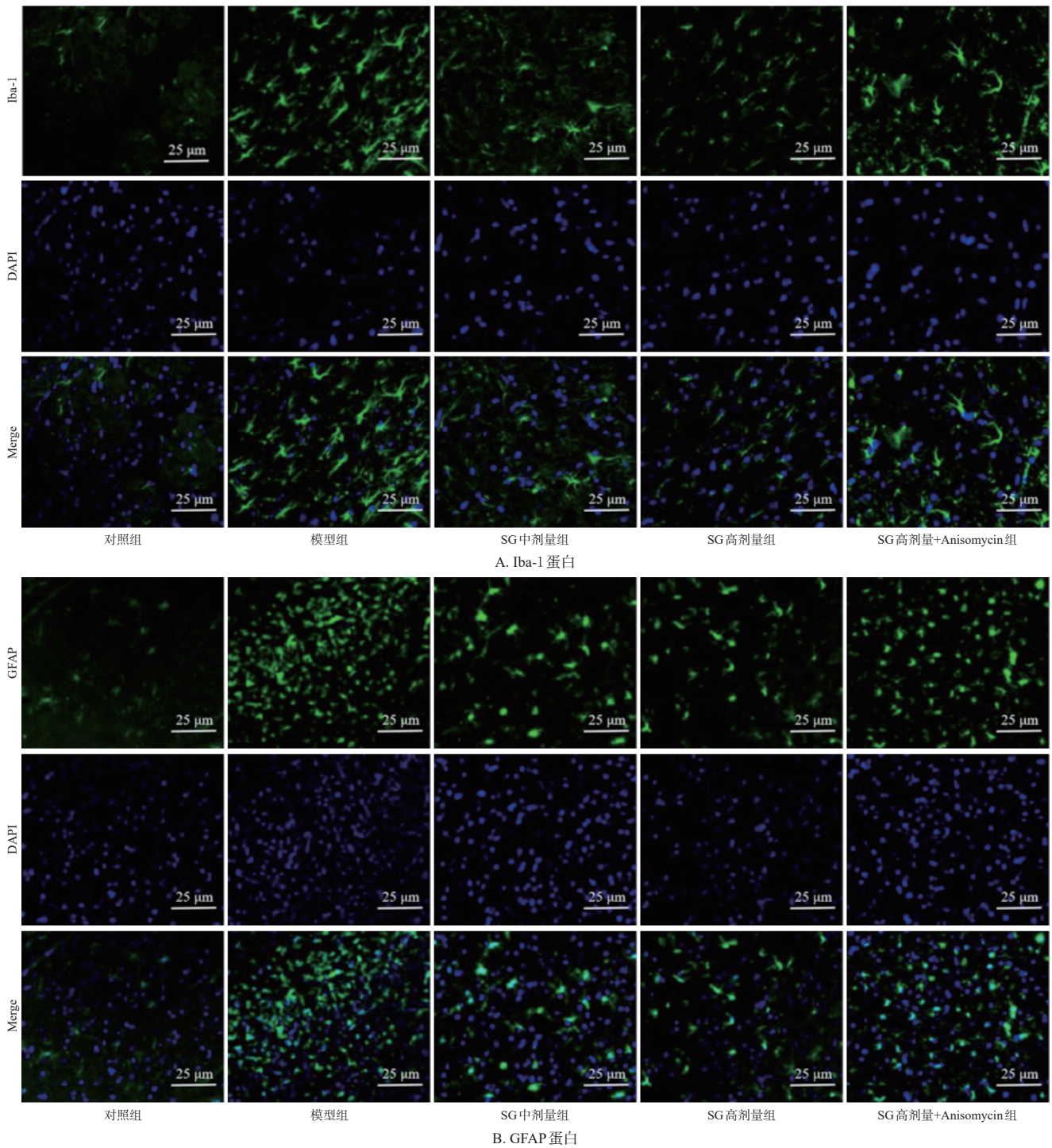
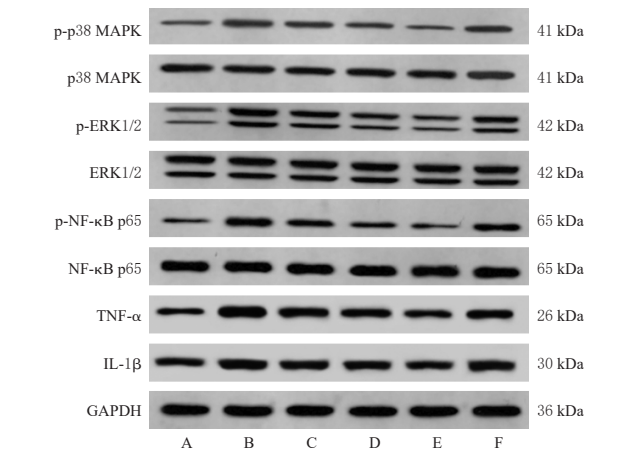


图2 各组大鼠Iba-1、GFAP蛋白荧光染色结果

表3 各组大鼠DRG组织中Iba-1、GFAP蛋白荧光强度比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	Iba-1 荧光强度	GFAP 荧光强度
对照组	1.00 ± 0.10	1.08 ± 0.12
模型组	3.72 ± 0.38 ^a	4.37 ± 0.46 ^a
SG 低剂量组	2.97 ± 0.32 ^b	3.37 ± 0.39 ^b
SG 中剂量组	2.25 ± 0.27 ^b	2.43 ± 0.29 ^b
SG 高剂量组	1.58 ± 0.17 ^b	1.56 ± 0.21 ^b
SG 高剂量+Anisomycin组	3.08 ± 0.32 ^c	3.85 ± 0.39 ^c

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与SG高剂量组比较, $P < 0.05$ 。



A: 对照组; B: 模型组; C: SG低剂量组; D: SG中剂量组; E: SG高剂量组; F: SG高剂量+Anisomycin组。

图3 各组大鼠DRG组织中相关蛋白表达的电泳图
表4 各组大鼠DRG组织中相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	p-p38 MAPK/ p38 MAPK	p-ERK1/2/ ERK1/2	p-NF-κB p65/ NF-κB p65	TNF-α	IL-1β
对照组	0.42 ± 0.05	0.31 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.38 ± 0.06	0.58 ± 0.06
模型组	0.93 ± 0.10 ^a	0.96 ± 0.10 ^a	0.89 ± 0.09 ^a	1.07 ± 0.10 ^a	0.92 ± 0.11 ^a
SG 低剂量组	0.78 ± 0.08 ^b	0.71 ± 0.07 ^b	0.69 ± 0.07 ^b	0.72 ± 0.08 ^b	0.80 ± 0.08 ^b
SG 中剂量组	0.60 ± 0.07 ^b	0.58 ± 0.06 ^b	0.48 ± 0.06 ^b	0.64 ± 0.05 ^b	0.75 ± 0.09 ^b
SG 高剂量组	0.49 ± 0.05 ^b	0.42 ± 0.05 ^b	0.31 ± 0.04 ^b	0.44 ± 0.08 ^b	0.61 ± 0.09 ^b
SG 高剂量+Anisomycin组	0.81 ± 0.09 ^c	0.81 ± 0.09 ^c	0.72 ± 0.08 ^c	0.82 ± 0.10 ^c	0.88 ± 0.11 ^c

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与SG高剂量组比较, $P < 0.05$ 。

4 讨论

LDH是一种常见的慢性疾病,是引起下腰痛和神经痛的主要原因。学者普遍认为机械压迫神经根是慢性疼痛的主要原因,但近期有研究表明,髓核引起的促炎因子释放是引起神经疼痛的重要病理机制^[11]。LDH的治疗选择包括保守治疗和手术,但仅有10%~20%的患者适合手术治疗,因此,非手术治疗仍是大多数LDH患者的最佳选择^[12]。目前,临床治疗LDH的药物易引起不良反应,且效果不佳,因此寻找新的治疗方法对改善LDH的炎性疼痛至关重要。

DRG作为感觉传入的初级神经元,在疼痛的产生和传递中起重要作用。本研究通过自体髓核抑制构建

LDH大鼠模型,发现模型大鼠出现后肢运动障碍、椎间盘变性以及DRG组织中神经元细胞损伤,PWMT、PWTL显著降低,表明LDH模型构建成功,大鼠疼痛阈值降低,出现痛觉反应。小胶质细胞作为中枢神经系统的常驻巨噬细胞,在免疫反应中起着重要作用,活化的小胶质细胞可释放TNF-α、IL-1β,从而加重疼痛^[13]。小胶质细胞和星形胶质细胞分别在疼痛发展的早期和中期被激活,Iba-1、GFAP分别为小胶质细胞和星形胶质细胞的特异性细胞标志物^[14]。5-HT、NPY为疼痛因子,其中5-HT存在于神经系统,具有镇痛作用;抑制血清中NPY的表达,可减轻LDH患者的疼痛反应^[15]。本研究发现,模型大鼠血清中TNF-α、IL-1β、NPY水平和Iba-1、GFAP阳性表达均升高,5-HT水平降低,表明模型大鼠出现炎性疼痛反应。经SG干预后,大鼠一般情况及神经功能改善,血清中TNF-α、IL-1β、NPY水平和Iba-1、GFAP阳性表达均降低,PWMT、PWTL、5-HT水平均升高,表明SG可能通过抑制DRG组织中小胶质细胞活化,减少炎症因子释放,提高大鼠疼痛阈值,进而减轻LDH大鼠炎性疼痛。

神经损伤引起的异常疼痛取决于MAPK信号通路的激活,在小胶质细胞活化的早期阶段,MAPK在促炎因子下启动,激活其信号分子p38 MAPK、ERK等,其中ERK主要分布在星形胶质细胞和神经元中,p38 MAPK主要分布在小胶质细胞中^[16]。NF-κB是MAPK的另一个下游转录因子,其发生磷酸化后,导致核转位增加,进一步促进TNF-α、IL-1β等炎症因子的释放^[17]。因此,抑制小胶质细胞的活化和MAPK/ERK/NF-κB信号通路的激活可以缓解周围神经损伤引起的痛觉过敏。本研究成果显示,经SG干预后,大鼠DRG组织中p38 MAPK、ERK1/2、NF-κB p65蛋白磷酸化水平和TNF-α、IL-1β蛋白表达水平均降低,表明SG可能具有抑制MAPK/ERK/NF-κB信号通路的作用。为了进一步验证SG是否通过抑制MAPK/ERK/NF-κB信号通路发挥作用,本研究在SG干预的基础上同时加入MAPK激活剂Anisomycin,结果发现,SG对模型大鼠的改善作用受到抑制,提示SG可能通过抑制MAPK/ERK/NF-κB信号通路,改善模型大鼠炎性疼痛。

综上所述,SG可通过抑制LDH大鼠DRG组织中小胶质细胞活化,减少炎症因子释放,提高疼痛阈值,从而改善炎性疼痛,其作用机制可能与抑制MAPK/ERK/NF-κB信号通路有关。

参考文献

- [1] ZHANG A S, XU A, ANSARI K, et al. Lumbar disc herniation: diagnosis and management[J]. *Am J Med*, 2023, 136(7):645-651.
- [2] KIM H, HONG J Y, LEE J, et al. IL-1 β promotes disc degeneration and inflammation through direct injection of intervertebral disc in a rat lumbar disc herniation model[J]. *Spine J*, 2021, 21(6):1031-1041.
- [3] LAINES-HIDALGO J I, MUÑOZ-SÁNCHEZ J A, LOZA-MÜLLER L, et al. An update of the sanguinarine and benzophenanthridine alkaloids' biosynthesis and their applications[J]. *Molecules*, 2022, 27(4):1378.
- [4] LI P, WANG Y X, YANG G, et al. Sanguinarine attenuates neuropathic pain in a rat model of chronic constriction injury[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021:3689829.
- [5] HUANG S J, YAN J Q, LUO H, et al. IL-33/ST2 signaling contributes to radicular pain by modulating MAPK and NF- κ B activation and inflammatory mediator expression in the spinal cord in rat models of non-compressive lumbar disk herniation[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1):12.
- [6] YU C, LI P, WANG Y X, et al. Sanguinarine attenuates neuropathic pain by inhibiting p38 MAPK-activated neuroinflammation in rat models[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14:4725-4733.
- [7] 郑丽娅, 贾松涛, 乔兆辉, 等. 调督理筋针法联合揞针对腰椎间盘突出症大鼠 Akt/GSK3 β 通路及痛觉过敏的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(8):1259-1263.
- ZHENG L Y, JIA S T, QIAO Z H, et al. Effects of Tiaodulijin acupuncture combined with pressing needle on Akt/GSK3 β pathway and hyperalgesia in rats with lumbar disc herniation[J]. *J Basic Chin Med*, 2022, 28(8):1259-1263.
- [8] 牛辉, 鲍朝辉, 张文明, 等. 基于 c-JNK/CXCL1 信号通路研究椎间盘丸对腰椎间盘突出症大鼠脊髓炎症的抑制作用[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(5):655-660.
- NIU H, BAO C H, ZHANG W M, et al. The inhibitory effect of Zhuijianpan pills on spinal cord inflammation in rats with lumbar disc herniation based on c-JNK/CXCL1 signaling pathway[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2021, 32(5):655-660.
- [9] LI J Y, SUN Q, ZHENG C Y, et al. Lipoxin A4-mediated p38 MAPK signaling pathway protects mice against collagen-induced arthritis[J]. *Biochem Genet*, 2021, 59(1):346-365.
- [10] LI X S, LI S Q, ZANG Z W, et al. Yaobishu regulates inflammatory, metabolic, autophagic, and apoptosis pathways to attenuate lumbar disc herniation[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:3861380.
- [11] COSAMALÓN-GAN I, COSAMALÓN-GAN T, MATTOS-PIAGGIO G, et al. Inflammation in the intervertebral disc herniation[J]. *Neurocirugia (Astur: Engl Ed)*, 2021, 32(1):21-35.
- [12] MA Z J, YU P F, JIANG H, et al. Conservative treatment for giant lumbar disc herniation: clinical study in 409 cases[J]. *Pain Physician*, 2021, 24(5):E639-E648.
- [13] ZHU L R, HUANG Y L, HU Y M, et al. Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in radicular pain by encouraging spinal microglia activation and inflammatory response in a rat model of lumbar disc herniation[J]. *Korean J Pain*, 2021, 34(1):47-57.
- [14] LU X, CHEN L H, JIANG C, et al. Microglia and macrophages contribute to the development and maintenance of sciatica in lumbar disc herniation[J]. *Pain*, 2023, 164(2):362-374.
- [15] 施星臣, 贺彦珍, 滕月鹏. 金骨莲胶囊联合甲钴胺对腰椎间盘突出症血清疼痛递质及腰椎功能的影响研究[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(1):209-213.
- SHI X C, HE Y F, TENG Y P. Effect of Jingulian capsules combined with mecobalamin on serum pain-related transmitters and lumbar function in patients with lumbar disc herniation[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2023, 41(1):209-213.
- [16] ZHAO L, TAO X S, SONG T. Astaxanthin alleviates neuropathic pain by inhibiting the MAPKs and NF- κ B pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 912:174575.
- [17] DING S L, PANG Z Y, CHEN X M, et al. Urolithin attenuates IL-1 β -induced inflammatory responses and cartilage degradation via inhibiting the MAPK/NF- κ B signaling pathways in rat articular chondrocytes[J]. *J Inflamm*, 2020, 17:13.

(收稿日期:2023-11-29 修回日期:2024-03-21)

(编辑:唐晓莲)