

芍药苷通过抑制脊髓 Akt-NF- κ B 信号通路及小胶质细胞 激活缓解炎症性疼痛

洪嘉琪, 史家欣, 敖欢, 章鉴东, 翁依佳, 朱佳*

(嘉兴学院医学院微生物学与免疫学教研室, 浙江嘉兴 314000)

摘要 芍药苷具有抑制炎症和镇痛的作用,在治疗炎症疼痛方面具有重要价值,但其作用机制尚不明确。本研究发现,弗氏完全佐剂诱导小鼠炎症疼痛模型,用 80 mg/kg 芍药苷腹腔注射能有效缓解疼痛。检测发现芍药苷治疗后,小鼠机械性痛阈与热板痛阈均明显升高(机械性痛阈值:由 6.38 ± 1.00 g 提高至 8.31 ± 0.81 g;热板痛阈值:由 5.78 ± 0.76 s 提高至 9.90 ± 1.58 s);同时抑制外周炎症因子 TNF- α 等的释放(由 708.71 ± 46.55 pg/mL 降低至 588.65 ± 16.02 pg/mL);免疫组织化学检测发现,芍药苷能有效抑制脊髓背角小胶质细胞的激活;NO 检测结果发现,脊髓部位 NO 合成降低(3.55 ± 0.28 μ mol/L \cdot g⁻¹Pro 降至 2.25 ± 0.71 μ mol/L \cdot g⁻¹Pro);Western 印迹检测证实,脊髓部位 iNOS 在使用芍药苷后,表达恢复正常水平。同时发现,Akt-NF- κ B 信号可能参与芍药苷的镇痛作用。上述结果提示,芍药苷缓解慢性炎症疼痛可通过抑制炎症因子释放,也通过抑制脊髓小胶质细胞的激活,而此过程依赖抑制 Akt-NF- κ B 信号的激活。

关键词 芍药苷;弗氏完全佐剂;疼痛;小胶质细胞;炎症;核因子 κ B

中图分类号 R392.11

Paeoniflorin Attenuates Inflammatory Pain via Blocking Akt-NF- κ B Signaling and Activation of Microglia in the Spinal Cord

HONG Jia-Qi, SHI Jia-Xin, AO Huan, ZHANG Jian-Dong, WENG Yi-Jia, ZHU Jia*

(Department of Microbiology and Immunology, Jiaxing College School of Medicine,
Jiaxing 314000, Zhejiang, China)

Abstract Anti-inflammatory and paregoric effects of paeoniflorin (PF) had great medical value in analgesia. This study aims to clarify the effect of PF on inflammation-induce pain, and its potential molecular mechanism. ICR mice intraplantar injected with 20 μ L Freund's adjuvant incomplete (CFA) were used as inflammatory pain models. PF attenuated mechanical and thermal pain scores (MPWT: Sham 12.43 ± 1.04 g, CFA 6.38 ± 1.00 g, CFA + PF 8.31 ± 0.81 g; TPWT: Sham 14.60 ± 1.80 s, CFA 5.78 ± 0.76 s, CFA + PF 9.90 ± 1.58 s), and inhibited the production of TNF- α (TNF- α : Sham 523.84 ± 57.59 pg/mL, CFA 708.71 ± 46.55 pg/mL, CFA + PF 588.65 ± 16.02 pg/mL). The activation of microglia and NO production was inhibited by PF. Western blotting results showed that iNOS decreased after PF treatment, which was involved in the Akt-NF- κ B signaling pathway. These results suggested that PF could efficiently attenuate inflammatory pain *in vivo*, and inhibited the increase of pro-inflammatory factors, the activation of microglia in the spinal cord, which was dependent on inhibiting the Akt-NF- κ B signaling pathway.

收稿日期: 2017-10-29; 修回日期: 2018-01-09; 接受日期: 2018-02-02

国家级大学生创新创业训练项目 (No. 201710354010) 和国家自然科学基金项目 (No. 81501043) 资助

* 通讯作者 Tel: 0573-83643870; E-mail: zhujia0322@163.com

Received: October 29, 2017; Revised: January 9, 2018; Accepted: February 2, 2018

Supported by National Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (No. 201710354010) and National Natural Science Foundation of China (No. 81501043)

* Corresponding author Tel: 0573-83643870; E-mail: zhujia0322@163.com

Key words paeoniflorin; Freund's adjuvant incomplete; pain; microglia; inflammation; NF- κ B

疼痛是临床多种疾病的并发症,严重影响患者生活质量的同时也给患者带来沉重负担。疼痛在普通人群中的发生率为 20% ~ 45%,在我国慢性疼痛约占疼痛门诊病人的 30% ~ 60%^[1-2]。疼痛作为一个症状综合征,其发病机制非常复杂。以往的研究认为,脊髓神经元的信号传入与传出、分子传递等是慢性疼痛的主要机制^[3]。随着研究的深入,发现除了神经元以外,小胶质细胞也是调节疼痛的重要细胞,在疼痛的产生和维持中发挥重要作用^[4-5]。

小胶质细胞作为中枢神经系统(central nervous system, CNS)的免疫细胞,是维持 CNS 环境稳态的主要细胞。小胶质细胞在静息状态下,胞体呈现高度分枝状。小胶质细胞一旦被激活,可迅速做出反应,变形、移动并聚集在病变局部,同时转变为体积较大、胞体变圆的阿米巴样细胞^[6-7]。在疼痛过程中,脊髓小胶质细胞参与神经性疼痛、炎症疼痛及癌性疼痛等慢性疼痛的信号传递^[8-10]。小胶质细胞首先大量激活并极化,同时通过释放细胞因子、炎症介质和神经活性物质,如 IL-1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、一氧化氮(nitric oxide, NO)和脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)等,进一步加重疼痛的范围和持续时间,表现为疼痛阈值降低及疼痛超敏反应的发生等^[11-13]。

芍药属毛茛科植物,单萜糖苷芍药苷(paeoniflorin, PF)是芍药中主要的药物活性成分^[14]。芍药苷能改善中枢神经系统性疾病,如认知障碍、抑郁及帕金森等^[15-17];芍药苷还具有解疼止痛、抗炎止痛和镇静止痛等多方面作用^[18-19]。同时将芍药苷与阿片类止痛药联合使用治疗癌性疼痛,对比单独使用阿片类止痛药具有更好的镇痛效果^[20]。研究还发现,芍药苷能够抑制脊髓小胶质细胞的激活并发挥抗炎作用^[21]。本研究利用小鼠炎症疼痛模型并注射芍药苷治疗,通过检测其炎症抑制作用、镇痛作用,以及脊髓小胶质细胞与 Akt-NF- κ B 信号通路激活的改变,为临床使用芍药苷抑制炎症与镇痛作用提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

GAPDH 抗体(#ab181602) 一氧化碳合成酶抗体(inducible nitric oxide synthase, iNOS, #ab15323)、

NeuN 抗体(ab177487)、核层蛋白 B2 抗体(Lamin B2, ab8983) 兔抗鼠二抗(ab6728)、羊抗兔二抗(ab6789) 购自美国 Abcam 公司, Iba-1 抗体(#01919741) 购自日本 Osaka 公司, Akt 抗体(40D4), p-Akt 抗体(244F9), NF- κ B p65 抗体(D14E12), IkB α 抗体(L35A5) 购自美国 CST 公司; 弗氏完全佐剂(F5881) 购自美国 Sigma 公司; 芍药苷(JOT-10063) 购自成都普菲德生物技术公司; NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 小鼠-TNF- α (bsk00164)、小鼠-IL-6(bsk00041)、小鼠-IL-1 β (bsk00028) ELISA 试剂盒均购买自北京博奥森生物技术有限公司; 细胞核组分提取试剂盒(#78833) 购买自美国 Thermo 公司。Bio-Red 蛋白电泳仪型号 FE-22, Olympus 共聚焦显微镜型号 CKX41-A329H, IITC 电子测痛仪型号 von Frey, 智能热板仪型号 YLS-6B, Leica 恒冷箱切片机型号 1800。

1.2 疼痛模型造模及给药

本研究采用的实验动物均严格按照嘉兴学院动物实验伦理委员会管理条例管理实验,饲养条件为恒温、恒湿的光照控制环境,并优化流程以达到最少动物使用目的。成年健康雄性 8 周龄 ICR 小鼠分为 3 组:①假手术组(Sham 组) 10 只,右后足底皮下注射生理盐水 20 μ L;②弗氏完全佐剂组(CFA 组) 10 只;③芍药苷组(CFA + PF 组) 10 只。CFA 组和 CFA + PF 组小鼠在其右后足底皮下注射 CFA 20 μ L 1 次,以此建立炎症疼痛模型;小鼠炎症疼痛模型建立当天为第 0 d, CFA + PF 组小鼠在第 1 d, 开始腹腔注射 80 mg/kg 芍药苷连续 8 d, 每天各 1 次(上午 10 ~ 12 点为给药时间), Sham 组和 CFA 组同时注射同体积生理盐水;各实验组小鼠分别在 0、1、2、3、7 和 8 d 实施行为学实验,并且行为学检测需在每天小鼠给药后 1 ~ 2 h 内完成;8 d 行为学检测结束后,处死留取样本进行相关检测。

1.3 热缩足反射潜伏期

智能热板仪温度调至 55 $^{\circ}$ C, 检测前将未做任何处理的小鼠放置于热板上,观察并记录小鼠自接触热板到舔舐后足的时间,挑选舔舐时间为 10 ~ 20 s 之间的小鼠为实验小鼠。每组小鼠热板检测重复 3 次,间隔 15 min, 3 次检测结果的平均值作为热板痛阈值(thermal paw withdrawal threshold, TPWT)。

1.4 机械缩足反射阈值

利用电子测痛仪,测定各组实验动物右后足机

机械痛阈。将小鼠放入透明塑料箱中,适应 20 ~ 30 min,待小鼠安静后用探针垂直刺激其右后足底皮肤,小鼠出现抬足或缩足反应后,仪器自动记录的数值即为机械痛阈 (mechanical paw withdrawal threshold, MPWT)。每只小鼠测量 5 次,每次间隔 10 min。

1.5 足趾肿胀检测

造模前后,利用足趾肿胀测量仪检测各组小鼠的足趾肿胀程度^[22]。将小鼠右后足浸入液体 (0.1% NaCl,液体中含有 0.02% Triton X-100)至皮肤与毛皮交界处测得足趾容积。当小鼠疼痛行为学检测结束,开始检测各组动物的足趾容积。

1.6 外周血 ELISA 检测

各组动物在行为学检测结束后,采用小鼠心脏取血法收集各组小鼠的外周血,保留血清,用于检测外周血中各细胞因子的含量。首先,将所有试剂及标本均平衡至室温,并根据实验要求设置标准孔、空白孔和实验孔,并设置复孔;在标准孔内加入 100 μL 不同浓度标准品,空白孔加入标准品稀释液 100 μL,实验孔加入样本各 100 μL; 37℃ 孵育 2 h,弃去液体甩干后,加入检测液 100 μL, 37℃ 孵育 1 h;甩去液体后,用清洗液反复洗板 5 次;再加入底物溶液 100 μL,酶标板盖上覆膜,37℃ 避光显色 30 min;最后加入终止液 50 μL。此时蓝色转变为黄色,利用酶标仪检测各孔 A_{450 nm} 值。各复孔取平均值,并计算标准曲线。根据标准曲线测得各样本细胞因子浓度。

1.7 组织内 NO 检测

行为学检测结束后,收集各组动物脊髓腰膨大段 (L4-5) 组织样本, PBS 清洗 3 次并匀浆后收集组织裂解液。采用硝酸盐还原酶 (nitrate reductase) 还原硝酸盐为亚硝酸盐,通过经典的 Griess reagent 检测亚硝酸盐,从而测定出总一氧化氮 (NO)。实验前平衡各液体,根据实验要求设置标准品、空白孔及实验孔,并设置复孔;在标准品孔中加入 100 μmol/L 标准品 100 μL,空白孔中加入双蒸水 100 μL,样本 100 μL;按照说明书要求加入反应试剂, 37℃ 操作,反应结束后充分混匀反应物, 3 500 ~ 4 000 r/min 离心 10 min,取上清,利用分光光度计 (550 nm) 检测各管吸光度。组织中 NO 含量计算公式为:

$$\text{NO 含量} = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{\text{待测样本蛋白质浓度}}$$

1.8 冰冻切片及免疫染色

各组动物在行为学检测结束后,注射 4% 水合氯醛麻醉, PBS 灌流小鼠,并使用相同浓度水合氯醛固定组织;立即取出脊髓腰膨大段 (L4-5),将其置于 4℃ 新鲜固定液中进行后固定, 2 ~ 4 h 后转移至 30% 蔗糖溶液中脱水;使用包埋剂 (OCT, CA, USA) 冷冻固定组织,恒冷箱切片机灌装冰冻切片。如用于 HE 染色,则每张脊髓片厚 5 μm。如用于免疫染色,则脊髓片厚度为 10 μm。脊髓切片用 PBS 漂洗 3 次后裱片,并利用 HE 染色试剂盒,按照说明书依次使用苏木精和伊红染料,脱水并封片后保存。在进行免疫荧光染色前,脊髓切片用 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min,再用 0.3% TritonX-100、10% 胎牛血清、10% 马血清的 PBS,室温封闭 60 min;结束后,加入含有 Iba-1 (1:500) 和 Neu-N (1:800) 抗体, 4℃ 孵育过夜;一抗标记结束后,脊髓切片用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min;并用含有 Alexa 488 标记的驴抗兔 IgG (1:500) 和 Alexa 594 标记的驴抗小鼠 IgG (1:500) 的二抗室温孵育 1 h;二抗漂洗干净后裱片,用荧光封片剂封片保存,并置于共聚焦荧光显微镜下观察。

1.9 Western 免疫印迹分析

样本在进行免疫印迹检测前,100℃ 加热 5 min。保持总蛋白质质量一致的条件下,将各组样本加入 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,电泳结束后,将蛋白质转移至 PVDF 膜;5% 脱脂牛奶封闭 30 min,一抗 4℃ 孵育过夜 (兔多克隆抗体 iNOS 1:1 000;小鼠单克隆抗体 Akt 1:1 000;兔多克隆抗体 p-Akt 1:1 000;兔多克隆抗体 NF-κB p65 1:500;小鼠单克隆抗体 IκBα 1:500;兔单克隆抗体 GAPDH 1:5 000;小鼠单克隆抗体 Lamin B2 1:1 000); TBST 清洗 3 × 10 min,用对应二抗 (兔抗鼠二抗 1:10 000;羊抗鼠二抗 1:10 000) 室温孵育 1 h,最后 ECL 显色试剂显示目的条带。

1.10 统计学方法

各实验均重复 3 次以上,“n”代表实验次数。图像数据利用 Image-J 11.0 软件分析。采用 SPSS 16.0 统计软件,数据采用 one-way ANOVA (Dunnett T3 test) 分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷抑制 CFA 诱导的疼痛行为反应

各组小鼠在手术前,机械性痛阈与热板痛阈无明显差异。与假手术组 (Sham 组) 相比,足底注射

CFA 从第 1 d 开始,即可有效降低机械性痛阈与热板痛阈的数值。说明炎症反应能提高小鼠对痛觉的敏感度。Fig. 1 中,CFA + PF 组与 CFA 组相比,腹腔注射 80 mg/kg 芍药苷小鼠的机械性痛阈与热板痛阈数值明显提高(MPWT: Sham 组 12.43 ± 1.04 g,

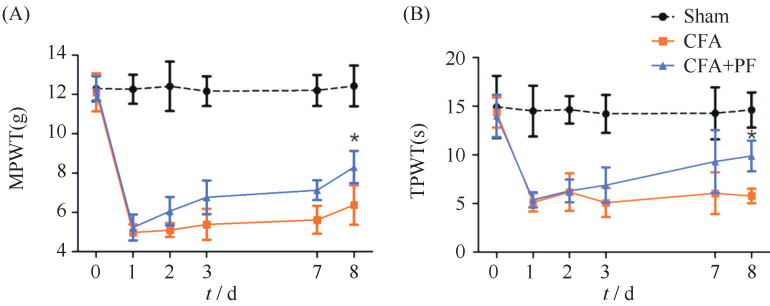


Fig. 1 The Effects of PF on MPWT and TPWT (A) Mechanical PWT was determined by the von Frey filament test. (B) Thermal PW was measured by thermal pain stimulators. Each point and vertical line represent the mean \pm SEM of the values obtained ($n = 8 - 10$ per group). Statistical difference was determined using one-way ANOVA (Dunnett T3 test). * $P < 0.05$ vs. CFA

2.2 注射芍药苷抑制局部炎症

在炎症性疼痛过程中,炎症持续存在是疼痛产生的主要原因。研究表明芍药苷具有抗炎作用^[16]。为了检测芍药苷是否通过抑制炎症从而缓解疼痛,实验分析给药前后小鼠足肿胀度的变化。Fig. 2 CFA 组小鼠的足肿胀度从注射 CFA 第 1 d 开始即明显增加(Fig. 2A)。连续注射 8 d 芍药苷,小鼠足肿胀度的改变不具有统计学差异。CFA + PF 组小鼠外周血中 TNF- α (Fig. 2B)、IL-6(Fig. 2C)和 IL-1 β (Fig. 2D)与 CFA 组相比较,CFA 组明显增加。在 Fig. 2B, C, D 中,可见 TNF- α : Sham 组 523.84 ± 57.59 pg/mL,CFA 组 708.71 ± 46.55 pg/mL,CFA + PF 组 588.65 ± 16.02 pg/mL;IL-6:Sham 组 1208.34 ± 72.11 pg/mL,CFA 组 1425.64 ± 23.90 pg/mL,1303.34 \pm 131.97 pg/mL;IL-1 β :Sham 组 1273.45 ± 69.40 pg/mL,CFA 组 1516.74 ± 77.49 pg/mL,1281.64 \pm 41.35 pg/mL)。结果提示,芍药苷能抑制炎症过程中炎症因子的释放,但不影响局部水肿。

2.3 芍药苷抑制脊髓小胶质细胞激活

上述结果显示,虽然炎症因子的释放得到抑制,但 CFA 注射局部的水肿依然存在,说明芍药苷在外周对炎症因子释放的抑制作用可能并不是其发挥缓解疼痛的全部作用机制。同时我们早期研究也发现,芍药苷可抑制 LPS 诱导的小胶质细胞激活^[21]。为了检测芍药苷是否通过中枢神经系统发挥镇痛作用,本文利用免疫组化检测脊髓背角小胶质细胞的激活。Fig. 3 表明,在脊髓背角部位,与 Sham 组相

CFA 组 6.38 ± 1.00 g,CFA + PF 组 8.31 ± 0.81 g; TPWT:Sham 组 14.60 ± 1.80 s,CFA 组 5.78 ± 0.76 s,CFA + PF 组 9.90 ± 1.58 s; $P < 0.05$, Fig. 1),说明芍药苷能有效提高小鼠对机械性与热感性痛觉的疼痛阈值。

比,CFA 组小胶质细胞被 Iba-1 标记的程度明显增加,注射芍药苷后小胶质细胞的激活明显降低(Fig. 3B,Iba-1);与此同时,3 组实验小鼠的神经元无明显改变(Fig. 3A,3B Neu-N)。结合之前研究结果,提示芍药苷在 CFA 疼痛模型中,可通过抑制脊髓小胶质细胞激活发挥疼痛抑制作用。

2.4 芍药苷抑制脊髓组织中 NO 和 iNOS 表达

小胶质细胞激活后能促进环境中 NO 的合成大量增加,同时 NO 也是参与疼痛的主要分子。利用 NO 试剂盒检测发现,脊髓组织中 NO 的浓度在 CFA 组明显增加,与 CFA 组相比 CFA + PF 组的 NO 合成显著下降(Sham 组 2.31 ± 0.28 ; CFA 组 3.55 ± 0.28 ;CFA + PF 组 2.25 ± 0.71 $\mu\text{mol/L} \cdot \text{g}^{-1}$ Pro, Fig. 4A)。同时检测了脊髓中诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxides synthase, iNOS)的表达。Fig. 4B结果显示,CFA 能促进 iNOS 表达的增加而芍药苷的使用则可使 iNOS 的表达恢复至正常水平(CFA 组 iNOS 分子表达是 Sham 组的 $272.75 \pm 39.81\%$;CFA + PF 组 iNOS 分子表达是 Sham 组的 $94.24 \pm 5.45\%$, Fig. 4C);与此同时芍药苷处理使脊髓部位 NO 合成显著下降。

2.5 Akt-NF- κ B 信号通路可能参与芍药苷的镇痛作用

核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)是多种疼痛模型中的重要信号分子,在疼痛过程中磷酸化 NF- κ B-p65 的表达及其核转位增加。我们研究发现,CFA 诱导的炎症模型小鼠脊髓部位 NF- κ B-p65

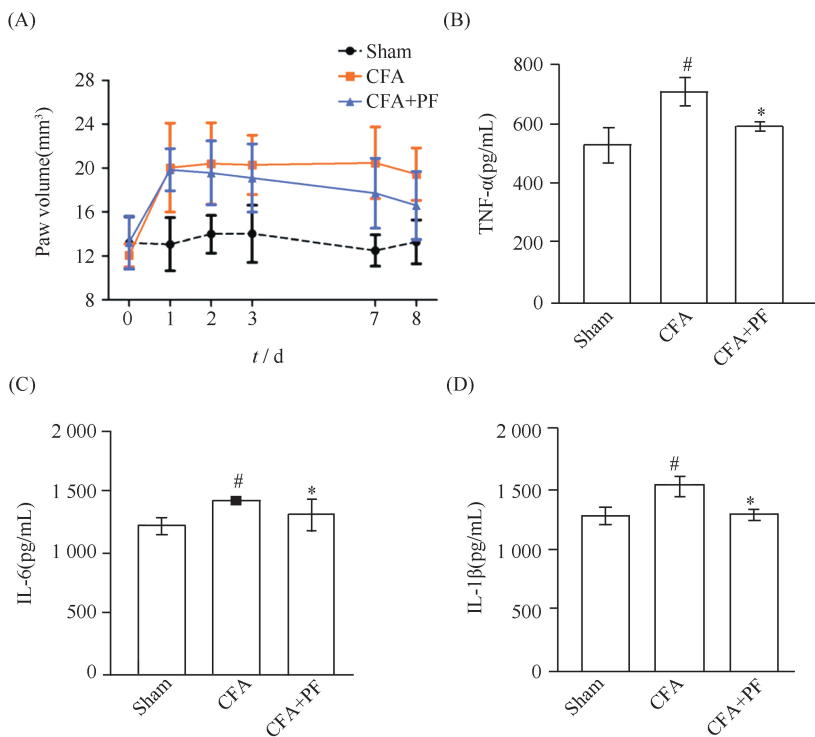


Fig. 2 The effects of PF on the inflammation induced by CFA (A) Time-course of the paw volume was determined using a plethysmometer. (B) The expression of TNF- α , (C) the expression of IL-6 and (D) the expression of IL-1 β decreased in three groups. # $P < 0.05$ vs. Sham; * $P < 0.05$ vs. CFA

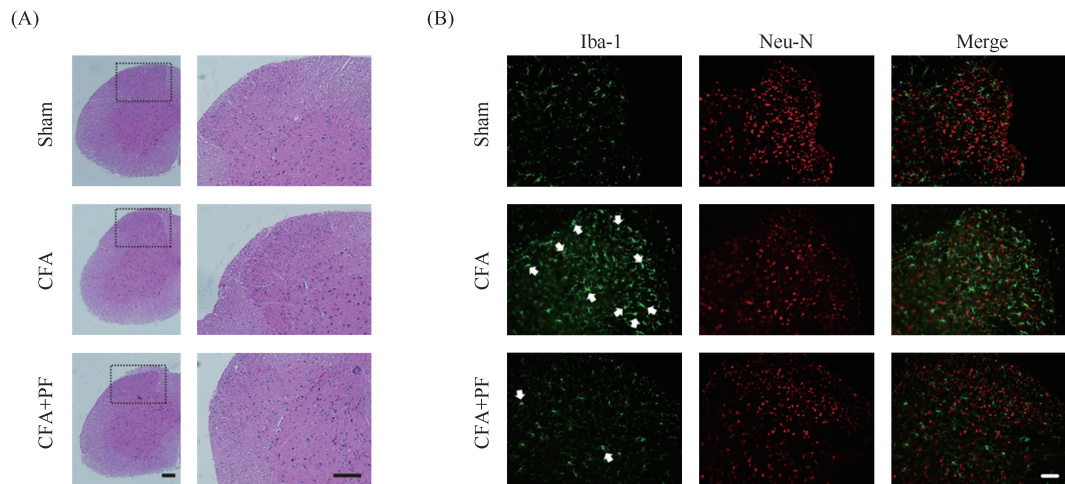


Fig. 3 The effects of PF on the activation of microglia (A) Hematoxylin-Eosin staining was used to show the dorsal horn of the spinal cord. For each image, a higher magnification shows the spinal cord dorsal horn sections (enclosed in black box). Scale bar; 200 μ m. (B) The spinal microglia and neuron were observed by immunohistochemistry using the microglia marker Iba-1 and neuronal marker Neu-N, respectively. The white arrow shows the hypertrophied type of microglia after the treatment of CFA or CFA + PF. Scale bar; 200 μ m

表达显著增加(CFA 组 NF- κ B-p65 分子表达是 Sham 组的 $269.48 \pm 23.25\%$, Fig. 5A, B);同时利用细胞核组分提取试剂盒并结合密度梯度离心法获得脊髓组织核组分,检测发现 NF- κ B-p65 分子在细胞核内表达也进一步增加(核组分内 CFA 组 NF- κ B-p65 分

子是 Sham 组的 $182.62 \pm 27.48\%$, Fig. 5C, D),结果提示 NF- κ B-p65 分子的核转位增加;而 CFA + PF 组脊髓组织内 NF- κ B-p65 分子的表达及核转位均恢复至正常水平(CFA + PF 组 NF- κ B-p65 分子表达是 Sham 组的 $84.27 \pm 6.74\%$,核组分内 NF- κ B-p65 分

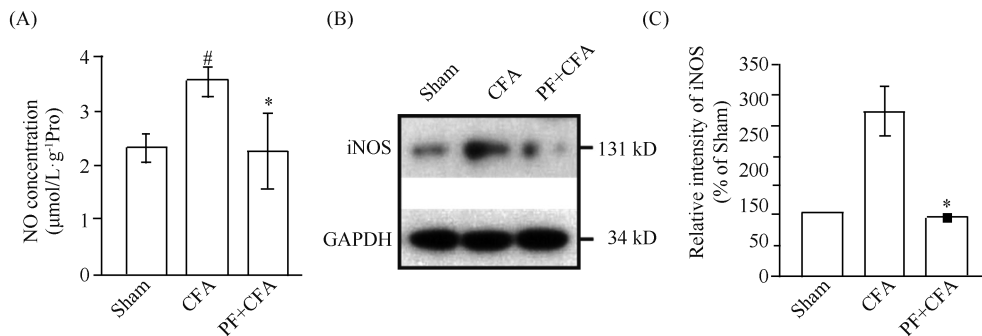


Fig. 4 The effects of PF Decrease the Production of NO and expression of iNOS. (A) The production of NO decreased after the treatment of PF. (B) Western blotting analysis used to test the expression of iNOS in the spinal cord. The proteins from Sham, CFA and CFA + PF groups were separated by SDS-PAGE and transferred to the PVDF membrane and blotted with specific antibodies, respectively. GAPDH was used as loading control. (C) Graphic representation of relative expression of iNOS normalized to GAPDH. The data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. Statistical difference was determined using one-way ANOVA (Dunnett T3 test). $^* P < 0.05$ vs. CFA

子表达是 Sham 组的 $106.57 \pm 12.56\%$ (Fig. 5C,D)。

I κ B α 分子是 NF- κ B 信号分子的重要调节蛋白,在胞浆内 I κ B α 与 NF- κ B 分子结合抑制 NF- κ B 分子的激活与核转位,因此 NF- κ B-p65 分子的产生通常伴随 I κ B α 分子的降解。我们检测脊髓中 I κ B α 分子的表达发现,CFA 刺激能诱导 I κ B α 分子表达降低,而小鼠芍药苷治疗后 I κ B α 分子表达明显增加(CFA 组 I κ B α 分子表达是 Sham 组的 $33.40 \pm 8.10\%$;CFA + PF 组是 Sham 组的 $80.03 \pm 5.47\%$, Fig. 5A)。该结果进一步提示 NF- κ B 信号参与芍药苷的镇痛作用。

在相同的实验条件下,脊髓中磷酸化 Akt 分子的表达在 CFA 模型小鼠中显著增加,芍药苷则抑制 p-Akt 的增加;与此同时组织内 Akt 总量没有发生明显改变(CFA 组 p-Akt 分子是 Sham 组的 $149.67 \pm 11.36\%$;CFA + PF 组是 Sham 组的 $104.33 \pm 8.88\%$, Fig. 5E,F)。这一结果提示,NF- κ B 与 Akt 信号通路可能参与芍药苷的镇痛作用。

3 讨论

疼痛是临床常见的症状之一,可分为急性疼痛和慢性疼痛。炎症疼痛是慢性疼痛中最常见的一种类型,多见于由创伤、细菌感染等组织损伤感染导致的炎症引起^[2]。临床上常用的抗炎镇痛药物主要有非甾体类抗炎药、糖皮质激素类药物,但这类药物长期服用会产生胃肠道等副作用,因此找副作用小而镇痛疗效明显的药物是治疗这类疾病的重点。研究表明芍药苷具有抑制炎症和镇痛的作用,临床上芍药苷联合吗啡治疗慢性疼痛比单纯使用吗啡疗效更好并且吗啡用量更低^[20]。目前关于芍药苷的镇

痛作用机制仍不明确,尤其是芍药苷对于慢性炎症疼痛中的作用机制更是知之甚少。我们的研究发现,在外周腹腔注射芍药苷能降低 CFA 引起的炎症因子释放,但对于水肿没有明显改变;同时芍药苷也能抑制脊髓小胶质细胞的激活。

本课题发现 CFA 注射足底诱导的慢性炎症疼痛模型中,CFA 注射后第 1 d 小鼠即出现明显的疼痛阈值降低疼痛敏感性提高的特征,注射的右后肢水肿明显(Fig. 1,2);使用芍药苷可使小鼠对机械痛与热痛的阈值显著提高,炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放明显降低;与此同时 CFA 注射后小鼠脊髓小胶质细胞激活明显,而芍药苷则可抑制小胶质细胞的激活及 NO 的合成,并同时抑制 Akt-NF- κ B 信号通路激活。这些结果提示,芍药苷能通过抑制脊髓小胶质细胞发挥镇痛作用。

炎症性疼痛中炎症是诱发疼痛的一个重要原因,因此在研究芍药苷镇痛作用的同时其炎症抑制作用尤其受到关注。在外周芍药苷能通过阻断 Toll 样受体 4/5 信号通路抑制树突状细胞减轻炎症反应^[23],芍药苷抑制单核巨噬细胞系统合成 TNF- α 、NO、前列腺素 E2 等促炎因子从而达到缓解炎症的作用^[24]。在中枢神经系统芍药苷也具备炎症抑制作用,研究发现 A β 1-42 诱导小胶质细胞炎症反应能被芍药苷有效抑制;同时体内实验也证实,在阿尔兹海默模型小鼠中脑内炎症因子 TNF- α 、NO 的释放可被芍药苷抑制,同时小鼠记忆及学习功能获得改善^[25]。我们在早期体外实验中证实,芍药苷能抑制小胶质细胞的激活、细胞因子合成以及吞噬等功能。本研究则进一步在体内实验中发现,炎症诱导疼痛模型中,芍药苷能抑制外周血中促炎因子的释

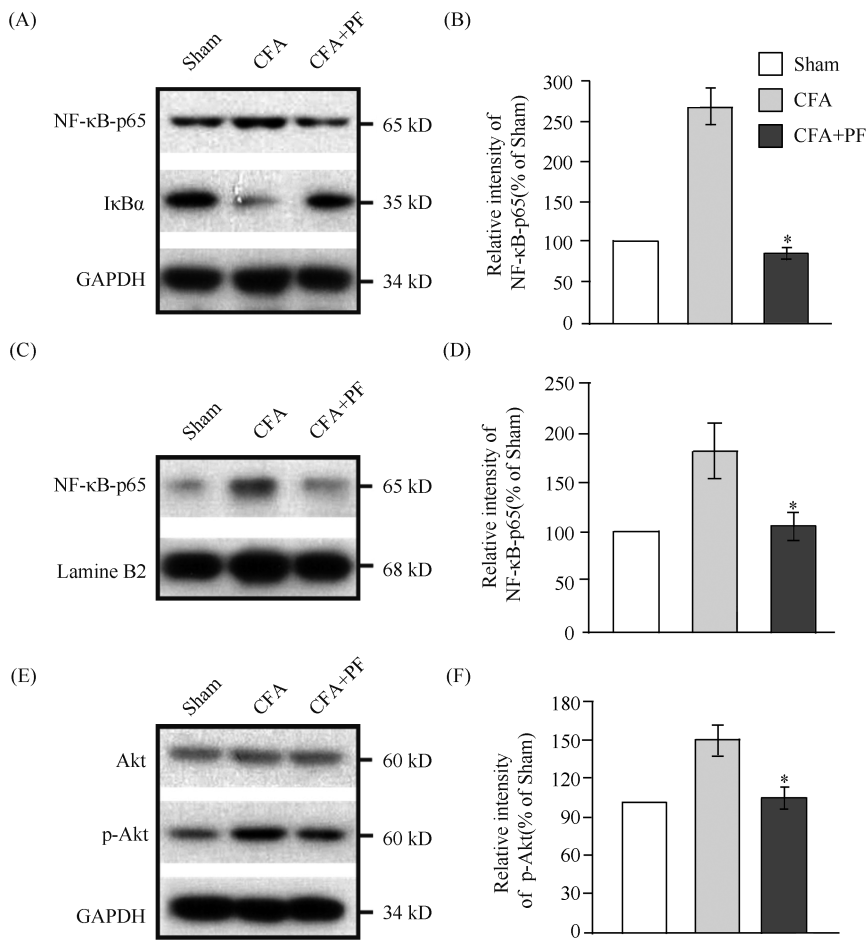


Fig. 5 The Akt-NF- κ B signaling pathway is involved in the anti-inflammation response (A) Western blotting analysis for the expression of NF- κ B-p65 and I κ B α in the spinal cord. The proteins from Sham, CFA and CFA + PF groups were separated by SDS-PAGE and transferred to the PVDF membrane and blotted with specific antibodies, respectively. GAPDH was used as loading control. (B) Graphic representation of relative expression of NF- κ B-p65 normalized to GAPDH. (C) Nuclear extracts from Sham, CFA and CFA + PF groups were tested in Western blotting. Lamina B2 was used as loading control. (D) Graphic representation of relative expression of NF- κ B-p65 normalized to Lamina B2. (E) Total expression of Akt and p-Akt was tested in Western blotting. (F) Graphic representation of relative expression of p-Akt normalized to GAPDH. The data represent the mean \pm SEM of four independent experiments. Statistical difference was determined using one-way ANOVA (Dunnett T3 test). * $P < 0.05$ vs. CFA

放,也能在脊髓中抑制小胶质细胞的激活以及 NO 的合成。这一结果提示,芍药苷的抗炎作用是其发挥镇痛作用的重要机制。

疼痛过程常伴随中枢神经系统 NF- κ B 信号通路的激活,基础以及临床研究发现,使用 NF- κ B 抑制剂可有效缓解疼痛的持续。正常生理条件下, NF- κ B 与它的抑制蛋白(I κ B) 相互结合在胞浆内以无活性形式存在;当外界环境发生变化时,Akt 作为其重要的上游分子,可通过磷酸化 I κ B 激酶促使后者降解 I κ B,使 NF- κ B 与 I κ B 分离病活化最终转移至细胞核调节转录,进而调节多种分子的表

达^[26-27]。而在我们的研究中发现,使用芍药苷的小鼠脊髓部位的 p-Akt 和 NF- κ B 的表达与 CFA 组小鼠相比明显下降,与此同时组织内 iNOS 的表达和 NO 的产生也相应减少。由此推测芍药苷在中枢神经系统中的作用,可能主要通过 Akt-NF- κ B 信号通路发挥作用。

疼痛作为持续性病理改变必然伴随中枢神经系统神经元功能性改变,脊髓背角部位以及前扣带回皮质神经元与疼痛密切相关。通过对这些区域神经元的观察发现,传入神经元的长时程可塑性改变是疼痛发生的主要原因之一。在神经性疼痛过程中,

由 NMDA 受体尤其是含有 NR2B 亚基的 NMDA 受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDAR) 所诱导的 LTP(long-term potentiation, LTP) 被认为是脊髓背角神经元感觉反应增强的主要原因^[28]。在炎症性疼痛时,前扣带回皮质区域神经元上 NR2B 受体表达也增强^[29]。由 NMDA 受体调节的神经元功能改变与胶质细胞之间的相互作用也是疼痛发生、发展的重要机制。疼痛过程中神经元细胞通过 NMDA 受体后激活释放多种物质,如 P 物质,谷氨酸,ATP 等,其中 ATP 是嘌呤受体 (purinoceptor2, P2 receptor) 的主要激活剂,而在中枢神经系统中小胶质细胞上高表达嘌呤受体。研究已发现,在疼痛过程中小胶质细胞表面 P2X4、P2X7、P2Y12 等受体表达增强,其中研究较为透彻的是 P2X4 与 P2X7 等离子型嘌呤受体,这些受体开放后能使细胞产生内向电流,其中钙离子的大量内流又能进一步调节细胞功能,并可间接调节 BDNF 分子、IL1 β 以及 CXCL2 (chemokine (C-X-C motif) ligand 2) 的表达,这些由小胶质细胞所产生的分子在疼痛开始以及持续过程中均发挥作用^[30]。因此,在疼痛时神经元与小胶质细胞之间由受体参与的相互作用,以及由此产生的电生理现象、细胞功能的调节以及神经元与小胶质细胞之间的网络型调节,均是研究疼痛的重要方向。目前我们实验发现芍药苷能抑制小胶质细胞的激活,同时 Akt-NF- κ B 信号通路参与其中。我们在之后的研究中将进一步探讨芍药苷在中枢镇痛中的作用,尤其是对小胶质细胞的抑制作用,为研究芍药苷镇痛作用的机制研究提供基础。

参考文献 (References)

[1] Chen B, Li L, Donovan C, *et al.* Prevalence and characteristics of chronic body pain in China; a national study [J]. Springerplus, 2016, **5**(1): 938

[2] Schneiderhan J, Orizondo C. Chronic pain: How to approach these 3 common conditions [J]. J Fam Pract, 2017, **66**(3): 145-157

[3] Bráz JM, Sharif-Naeini R, Vogt D, *et al.* Forebrain GABAergic neuron precursors integrate into adult spinal cord and reduce injury-induced neuropathic pain [J]. Neuron, 2012, **74**(4): 663-675

[4] Zhao P, Waxman SG, Hains BC. Extracellular signal-regulated kinase-regulated microglia- neuron signaling by prostaglandin E2 contributes to pain after spinal cord injury [J]. J Neurosci, 2007, **27**(9): 2357-2368

[5] Segal JP, Tresidder KA, Bhatt C, *et al.* Circadian control of pain and neuroinflammation [J]. J Neurosci Res, 2017 Sep 2. doi: 10.1002/jnr.24150

[6] Aloisi, F. Immune function of microglia [J]. Glia, 2001, **36**(2): 165-179

[7] Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain [J]. Nat Neurosci, 2007, **10**(11): 1387-1394

[8] Peng J, Gu N, Zhou L, *et al.* Microglia and monocytes synergistically promote the transition from acute to chronic pain after nerve injury [J]. Nat Commun, 2016, **7**: 12029

[9] Echeverry S, Shi XQ, Yang M, *et al.* Spinal microglia are required for long-term maintenance of neuropathic pain [J]. Pain, 2017, **158**(9): 1792-1801

[10] Tsuda M, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, *et al.* Microglial regulation of neuropathic pain [J]. J Pharmacol Sci, 2013, **121**(2): 89-94

[11] Liu Y, Zhou LJ, Wang J, *et al.* TNF- α Differentially Regulates Synaptic Plasticity in the Hippocampus and Spinal Cord by Microglia-Dependent Mechanisms after Peripheral Nerve Injury [J]. J Neurosci, 2017, **37**(4): 871-881

[12] Coull JA, Beggs S, Boudreau D, *et al.* BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain [J]. Nature, 2005, **438**(7070): 1017-1021

[13] Subedi, L., R. Venkatesan, SY. Kim. Neuroprotective and Anti-Inflammatory Activities of Allyl Isothiocyanate through Attenuation of JNK/NF- κ B/TNF- α Signaling [J]. Int J Mol Sci, 2017, **18**(7). pii: E1423

[14] Wu SH, Wu DG, Chen YW. Chemical constituents and bioactivities of plants from the genus Paeonia [J]. Chem Biodivers, 2010, **7**(1): 90-104

[15] Xiao L, Wang YZ, Liu J, *et al.* Effects of paeoniflorin on the cerebral infarction, behavioral and cognitive impairments at the chronic stage of transient middle cerebral artery occlusion in rats [J]. Life Sci, 2005, **78**(4): 413-420

[16] Gu X, Cai Z, Cai M, *et al.* Protective effect of paeoniflorin on inflammation and apoptosis in the cerebral cortex of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. Mol Med Rep, 2016, **13**(3): 2247-2252

[17] Zheng M, Liu C, Fan Y, *et al.* Neuroprotection by Paeoniflorin in the MPTP mouse model of Parkinson's disease [J]. Neuropharmacology, 2017, 116: 412-420

[18] Zhou J, Wang L, Wang J, *et al.* Paeoniflorin and Albiflorin Attenuate Neuropathic Pain via MAPK Pathway in Chronic Constriction Injury Rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, **2016**: 8082753

[19] Yin D, Liu YY, Wang TX, *et al.* Paeoniflorin exerts analgesic and hypnotic effects via adenosine A1 receptors in a mouse neuropathic pain model [J]. Psychopharmacology (Berl), 2016, **233**(2): 281-293

[20] 宋超, 高超, 韩国. 芍药苷联合吗啡治疗中晚期癌性疼痛的临床观察 [J]. 药学与临床研究 (Song C, Gao C, Han Y. Clinical observation of paeoniflorin combined with morphine in the treatment of moderate and advanced cancer pain [J]. Pharm Clin Res), 2015, **10**(5): 447-449

[21] 徐洁虹, 熬欢, 洪嘉琪. 芍药苷通过 IL-10-STAT3 信号通路抑制脂多糖诱导 BV2 细胞炎症与吞噬作用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Xu JH, Ao H, Hong JQ. Paeoniflorin inhibits LPS-induced microglia inflammation and phagocytosis through IL-10-STAT3 signaling pathway [J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2017, **33**(2): 169-175

[22] Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, *et al.* Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice; a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia [J]. Pain, 2012, **153**(4): 876-884

[23] Zhou Z, Lin J, Huo R, *et al.* Total glucosides of paeony attenuated functional maturation of dendritic cells via blocking TLR4/5 signaling in vivo [J]. Int Immunopharmacol, 2012, **14**(3): 275-282

[24] Sun Y, Dong Y, Jiang HJ, *et al.* Dissection of the role of paeoniflorin in the traditional Chinese medicinal formula Si-Ni-San against contact dermatitis in mice [J]. Life Sci, 2009, **84**(11-12): 337-344

[25] 刘华岩, 王军. 芍药苷对 $\text{A}\beta$ 1-42 诱导的小胶质细胞炎症反应和趋化性的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志 (Liu HY, Wang J. Effect of paeoniflorin on the $\text{A}\beta$ 1-42-induced inflammation and chemotaxis of microglia [J]. Chin J

[26]

Neuroimmunol Neurol), 2017, **24**(7): 276-280,289

Popiolek-Barczyk K, Mika J. Targeting the Microglial Signaling Pathways; New Insights in the Modulation of Neuropathic Pain [J]. Curr Med Chem, 2016, **23**(26): 2908-2928

[27]

Chu LW, Chen JY, Wu PC, *et al.* Atorvastatin prevents neuroinflammation in chronic constriction injury rats through nuclear NFκB downregulation in the dorsal root ganglion and spinal cord [J]. ACS Chem Neurosci, 2015, **6**(6): 889-898

[28]

Ji RR, Kohno T, Moore KA, *et al.* Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms ? [J]. Trends Neurosci, 2003, **26**(12): 696-705

[29]

Wu LJ, Toyoda H, Zhao MG, *et al.* Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation [J]. J Neurosci, 2005, **25**(48): 11107-11116

[30]

Zhuo M, Wu G, Wu LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain[J]. Mol Brain, 2011, **4**: 31

上接 284 页

中国生物化学与分子生物学会 2018 年省市生化学会学术会议(续)

会议名称	内容	时间	规模	地点	联系人	联系方式
泛环渤海地区九省市生						
1 物化学与分子生物学会 年会		2018.07			乔明强	022-23503692
2018 年河南省生物化学						
2 与分子生物学会学术年 会	河南省生化学术会议	2018.08	300-400	郑州	翟文杰	13783620350
3 河北省生化与分子生物 学学会年会暨学术研讨 会	本次会议将围绕检验技术、基因科技、生化与分子生物学的基础与临床研究等生命科学学术前沿和技术进展展开交流与研讨。	2018.08	200	保定	聂磊	15100313798
4 检验专业生物化学年度 教学研讨会	生化检验教学研讨,青年教师教学比赛	2018.08	210	遵义	钱士匀	13907578972
5 第四届磷脂信号分子专 题研讨会	本项目拟通过学术交流来促进学科发展,为磷脂信号分子研究提供沟通交流的平台,	2018.08	50	北京	陈曦	88398584
6 上海市生化与分子生物 学学会 2018 年学术报告 会	大会报告,青年报告/实验室参观 大会将邀请国内外专家就本领域热点和前沿问题作综述和专题报告,以加强本地区脂代谢与	2018.09.21	200	上海	王一倩	021-54922818
7 第三届京津冀脂代谢与 血管生物医学前沿论坛	血管生物医学科研工作者之间的交流与合作,促进成果转化与应用,推动基础研究和临床研究	2018.10	250	石家庄	聂磊	15100313798
8 第十届海南省生命科学 联合学术会议	及相关学科的发展。生命科学研究进展	2018.10	250	海口	李孟森	1315896966
9 生物化学与分子生物学 专业术语定义准确性研 讨会	制定出第一批需要定义的专业术语目录	2018.10	30	北京	周春燕	010-82802417
10 单细胞测序技术在细胞 图谱解析中应用交流会	了解和掌握单细胞测序技术的最新进展和应用领域;促成相关领域研究人员达成合作意向。	2018.11	40	北京	余佳	010-65105098
11 北京市生物化学与分子 生物学学会 2018 年学术 年会	邀请当年突出科研学者做学术报告,介绍新成果、新方法	2018.11	200	北京	蒋澄宇	010-65105067