

白脉软膏调控神经活动配体-受体及 HIF-1 信号通路改善背根神经节慢性压迫大鼠慢性疼痛的作用及机制研究

周方婷^{1,2}, 宗璞¹, 侯吴琼¹, 李森森¹, 杨菲¹, 许丽婷^{1,2}, 毛霞¹, 刘毓东¹, 苏晓慧¹, 万红叶³, 欧阳竞锋⁴, 郭秋岩¹, 李玮婕¹, 王震⁵, 王超^{1*}, 林娜^{1,2*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 广州中医药大学 中药学院, 广东 广州 510405; 3. 中国中医科学院 针灸研究所, 北京 100700; 4. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700; 5. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 具“舒筋活络”核心功效的白脉软膏临床干预疼痛、痉挛、僵硬等症状的白脉病疗效显著,但其药效学特点及机制尚不明确。该研究建立模拟临床的腰椎间盘突出压迫神经的大鼠 L4 背根神经节慢性压迫 (chronic compression of dorsal root ganglion, CCD) 模型,采用行为学、副作用评估、网络分析、拮抗剂及分子生物学验证等方法初步探讨白脉软膏治疗 CCD 的药效及机制。药效学研究表明,白脉软膏能明显改善 CCD 模型大鼠的痛敏阈值 (机械痛敏、热痛敏、冷痛敏),改善步态行为,且无耐受性及明显的毒副作用;靶组织初筛结果显示白脉软膏能抑制小鼠福尔马林实验第二时相伤害性反应,升高正常小鼠的热板阈值,并降低脊髓炎症因子表达;网络分析发现白脉软膏治疗 CCD 具有协同性且与下行抑制/易化系统及神经炎症相关。实验进一步采用行为学、免疫印迹、免疫荧光等技术发现白脉软膏发挥 CCD 镇痛作用可能与其调节 CHRNA7、ADRA2A、ADRB2 等神经活动配体-受体 (神经配基) 以及降低脊髓小胶质细胞 HIF-1 信号通路核心调控元件 NOS2/p-ERK/PI3K 的表达相关。相关研究初步揭示了白脉软膏治疗白脉病的“舒筋活络”机制,并为其临床合理用药及深入研究提供了参考。

[关键词] 白脉软膏; 腰椎间盘突出症; 神经配基; 神经炎症; 舒筋活络

Baimai Ointment relieves chronic pain induced by chronic compression of dorsal root ganglion in rats by regulating neuroactive ligand-receptor interaction and HIF-1 signaling pathway

ZHOU Fang-ting^{1,2}, ZONG Ying¹, HOU Wu-qiong¹, LI Sen-sen¹, YANG Fei¹, XU Li-ting^{1,2}, MAO Xia¹, LIU Yu-dong¹, SU Xiao-hui¹, WAN Hong-ye³, OUYANG Jing-feng⁴, GUO Qiu-yan¹, LI Wei-jie¹, WANG Zhen⁵, WANG Chao^{1*}, LIN Na^{1,2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 5. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[收稿日期] 2023-06-27

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目 (C12021A03808); 中国中医科学院中药研究所技术研发项目 (20210701); 中国民族医药学会科研项目 (2021Z1214-080302, 2022M2122-070303, 2022M2123-070304)

[通信作者] * 王超, 博士, 副研究员/副主任医师, 主要从事中药药理与临床研究, E-mail: cwang@icmm.ac.cn; * 林娜, 博士, 研究员, 主要从事抗炎免疫中药药理研究, E-mail: nlin@icmm.ac.cn

[作者简介] 周方婷, 硕士研究生, E-mail: 18713807658@163.com

[Abstract] The Baimai Ointment with the effect of relaxing sinew and activating collaterals demonstrates a definite effect on Baimai disease with pain, spasm, stiffness and other symptoms, while the pharmacodynamic characteristics and mechanism of this agent remain unclear. In this study, a rat model of chronic compression of L4 dorsal root ganglion (CCD) was established by lumbar disc herniation, and the efficacy and mechanism of Baimai Ointment in the treatment of CCD were preliminarily explored by behavioral tests, side effect evaluation, network analysis, antagonist and molecular biology verification. The pharmacodynamic experiment indicated that Baimai Ointment significantly improved the pain thresholds (mechanical pain, thermal pain, and cold pain) and gait behavior of CCD model rats without causing tolerance or obvious toxic and side effects. Baimai Ointment inhibited the second-phase nociceptive response of mice in the formalin test, increased the hot plate threshold of normal mice, and down-regulated the expression of inflammatory cytokines in the spinal cord. Network analysis showed that Baimai Ointment had synergistic effect in the treatment of CCD and was related to descending inhibition/facilitation system and neuroinflammation. Furthermore, behavioral tests, Western blot, and immunofluorescence assay revealed that the pain-relieving effect of Baimai Ointment on CCD may be related to the regulation of the interaction between neuroactive ligand and receptors (neuroligands) such as CHRNA7, ADRA2A, and ADRB2, and the down-regulation of the expression of NOS2/pERK/PI3K, the core regulatory element of HIF-1 signaling pathway in spinal microglia. The findings preliminarily reveal the mechanism of relaxing sinew and activating collaterals of Baimai Ointment in the treatment of Baimai disease, providing a reference for the rational drug use and further research of this agent.

[Key words] Baimai Ointment; lumbar disc herniation; nerve ligands; neuroinflammation; relaxing sinew and activating collaterals

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230721.401

“舒筋活络”是白脉软膏的核心功效,临床干预具疼痛、痉挛、僵硬、麻木、活动受限、挛缩、关节强直等症状的白脉病疗效显著。用现代语言科学阐释白脉软膏“舒筋活络”的生物学内涵,具有重要现实意义。腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)是指由于腰椎的退行性病变或腰部外伤,致使椎间盘突出、脊椎韧带钙化或骨质增生,从而造成椎管和椎间孔狭窄,进而对背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)及其邻近神经根形成慢性压迫,导致神经组织水肿、变性,引起腰及下肢疼痛的疾病^[1],有神经、肌肉、微循环障碍的多重参与,兼具神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)“中枢敏化”及慢性炎症性疼痛“周围敏化”双重病理和白脉病核心症状,为阐述白脉病的理想模型。新近研究发现,胶质细胞活化介导的神经炎症是 NP 的重要发病机制, NP 发病早期以小胶质细胞活化为主^[2],抑制早期神经炎症对 NP 的治疗具有重要意义,同时下行抑制系统的激活产生内源性镇痛作用在 NP 治疗中具有重要作用,靶向下行抑制系统的药物也成为近年来药物研发的新亮点^[3],神经炎症、疼痛下行调控系统失衡均可导致神经支配区域组织的痛敏降低、肌肉紧张、微循环障碍,并形成恶性循环,而多靶标缓解神经炎症或调控疼痛下行调控系统可能是缓解白脉病临床症状的有效手段。

经典藏族药白脉软膏是由著名藏族医学家贡曼

贡确班达创制的外用膏剂^[4],由姜黄、肉豆蔻、甘松、人工麝香、碱花、干姜、花椒、藏茴香、藏菖蒲、阳起石、甘草 11 味药物组成,具缓急止痛、舒筋活络之功^[5],临床治疗神经根型颈椎病、中风后肢体痉挛疼痛、糖尿病周围神经病变等具有 NP 属性的白脉病疗效显著,但其镇痛的药效学特点及机制尚不明确。既往实验从周围敏化的角度发现白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的药效学及机制^[6],本研究拟在前期研究的基础上,进一步采用模拟临床椎间盘髓核突出压迫神经的背根神经节慢性压迫(chronic compression of dorsal root ganglion, CCD)模型,聚焦疼痛、痉挛、活动受限等白脉病核心症状,探讨白脉软膏治疗 CCD 的药效学特点及作用机制,以期临床合理用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SD 雄性大鼠 110 只,清洁级,体质量(250±10)g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0008;健康 ICR 雄性小鼠 48 只,清洁级,体质量(20±2)g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2019-0010。以上动物均饲养于中国中医科学院中药研究所实验动物中心,饲养条件为室温(23±1)℃,湿度 55%±5%,光照/黑暗周期各 12 h,自由摄食与饮水。所有动物实验获得中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理审查委员会审核和批

准,编号 2022B089。

1.2 药物、试剂及仪器

白脉软膏(西藏奇正藏药股份有限公司,批号 Z20043178);普瑞巴林(辉瑞制药有限公司,批号 J20160022);戊巴比妥钠(北京华纳制药有限公司,批号 820219);丙酮(天津市大茂化学试剂厂,批号 20220801);大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒、大鼠白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β) 试剂盒、大鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS/NOS2) 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 ml002859、ml003057、ml403904);苏木素-伊红(HE) 试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1120);中性树胶(北京博奥拓达科技有限公司,批号 G6590);甲醛(天津市华东试剂厂,批号 2021828);阿司匹林(德国拜耳医药保健公司,批号 BJ57877);吗啡(沈阳第一制药厂,批号 047008);CHRNA7 拮抗剂 MLA(美国 MedChemExpress 公司,批号 154756);ADRA2A 拮抗剂 Yohimbine(美国 Selleck 公司,批号 S2373);ADRB2 拮抗剂 ICI 118551(Selleck 公司,批号 S8114);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0013B);蛋白酶抑制剂(瑞士 Roche 公司,批号 4693159001);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(普利莱基因技术有限公司,批号 B10345);预染蛋白质 marker(美国赛默飞世尔科技公司,批号 26616);GAPDH Rabbit mAb(美国 CST 公司,批号 #2118);HRP 山羊抗兔 IgG(美国 CST 公司,批号 7074s);山羊血清抗体封闭原液(北京索莱宝科技有限公司,批号 SL038);磷酸化细胞外调节蛋白激酶(phospho-extracellular regulated protein kinases, p-ERK) 抗体(rabbit)、NOS2 抗体(rabbit)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3 kinase, PI3K) 抗体(rabbit)、离子钙结合衔接分子 1(ionized calcium binding adaptor molecule 1, IBA-1) 抗体(mouse)、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体(mouse)、山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor® 488)、山羊抗小鼠 IgG H&L(Alexa Fluor® 594)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染色试剂(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab201015、ab178945、ab40776、ab283319、ab279290、ab150077、ab150116、ab228549)。

L 型不锈钢丝(定制);Von frey 疼痛测试包(美

国 Aesthesio 公司);足底红外热刺激仪(意大利 UGO Basile 公司);动物步态采集分析系统(荷兰 Noldus 公司, CatWalk XT 10.6);疲劳转棒仪(成都泰盟软件有限公司,型号 ZB-201);生化分析仪(迈瑞医疗国际有限公司,型号 BS200);摄像机(日本佳能公司);生物组织包埋机(常州派斯杰医疗设备有限公司);离心机、切片机、烤片机、冰冻切片机(美国赛默飞世尔科技公司);倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯公司,型号 CKX31);全自动酶标仪(美国 Thermo 公司,型号 MK3);凝胶成像仪(法国 Vilber 公司,型号 Fusion FX5)。

1.3 大鼠背根节慢性压迫模型的建立与药物、试剂配制

参照文献方法构建大鼠 L4 背根节慢性压迫(CCD)模型^[7],首先大鼠于造模前 12 h 背部剃毛,后使用脱毛膏进行脱毛以便于抹药。大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)麻醉,俯卧位放置,消毒皮肤,沿后背正中线剪开皮肤,于 L4~L5 脊椎左侧 0.5~0.7 cm 处纵向开口,钝性分离肌肉,暴露 L4/L5 乳状突与 L4/L5 横突,用显微镊小心剥离 L4 与 L3 中间的筋膜,暴露中间的 L4 椎间孔,然后用一根长约 4 mm,直径 0.6~0.7 mm 的 L 型不锈钢丝紧贴椎间孔上缘以与背部正中线成 30° ,以及与脊柱侧面水平线成 10° 向头背方向插入 L4 椎间孔,观察到同侧后肢肌肉轻轻颤动即为成功,表明针头触及 DRG 神经根,以此对 L4 DRG 及邻近神经根形成恒定的压迫,最后向伤口撒适量青霉素以防止伤口感染,小心缝合肌肉及皮肤,放于保温垫上待其苏醒再放回鼠笼,假手术组大鼠暴露椎间孔后便缝合肌肉和皮肤,其余操作同上。

大鼠造模 24 h 后开始给药,正常组大鼠背部涂抹适量生理盐水,白脉软膏组于大鼠背部涂抹各剂量药物(0.1、0.3、1.0 g/只),轻柔按摩数分钟使药物充分吸收;阳性药普瑞巴林(pregabalin, PGB)组按大鼠体重灌胃给药($0.003 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$);每日给药 3 次,持续 28 d,每日固定给药时间。普瑞巴林、阿司匹林均用生理盐水溶解;先配制 37%~40% 甲醛溶液作为福尔马林溶液,后用生理盐水稀释成 5% 福尔马林溶液;MLA(CHRNA7 拮抗剂)使用 DMSO、PEG-300、聚山梨酯 80 和生理盐水配制;Yohimbine(ADRA2A 拮抗剂)和 ICI 118551(ADRB2 拮抗剂)均用 10% DMSO 溶解。

1.4 CHRNA7/ADRA2A/ADRB2 验证实验动物分组及给药时间、剂量、方式

大鼠适应性饲养 2~3 d 后,将 54 只大鼠按体质量随机分为 9 组,即正常组、model 组、model+MLA ($0.5 \text{ nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, *it*) 组^[8]、model+Yohimbine ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *ip*) 组^[9]、model+ICI 118551 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *ip*) 组^[10]、model+MLA+白脉软膏(BMO)组、model+Yohimbine+BMO 组、model+ICI 118551+BMO 组、model+BMO 组,白脉软膏剂量 1.0 g/只 ,每组 6 只。

1.5 机械痛敏、热痛敏和冷痛敏阈值的检测

1.5.1 白脉软膏药效学观察 SD 大鼠分为正常组、model 组、BMO 组 (0.1 、 0.3 、 1.0 g/只)、阳性药 PGB 组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *po*),每组 8 只,每日给药 3 次。

1.5.2 机械痛敏阈值 检测前每日同一时间将大鼠放于树脂盒中适应 2 h,适应 2 d。检测当天适应约 30 min,待大鼠处于静息状态或探索行为明显减少时,使用 Von frey 纤维丝 ($2 \sim 26 \text{ g}$) 垂直刺激大鼠左后足足跖部,纤维丝轻微弯曲,持续 $6 \sim 7 \text{ s}$,若出现缩足、抖足、舔足即记为阳性,每只动物检测 3 次,每次间隔 5 min,采用 Dixon's up-and-down 方法^[11]计算 50% 机械缩足阈值 (paw withdrawal threshold, PWT),取 3 次的平均值。于给药第 1 天的 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、24 h 及给药第 4、8、12、16、20、24 天的最佳药效时间点检测大鼠的机械痛敏阈值,于第 25、26 天停药 2 d 检测第 27 天给药后各时间点的机械痛敏阈值。

1.5.3 热辐射痛敏阈值^[12] 检测前每日同一时间将大鼠放在有机玻璃上适应 2 h,适应 2 d。检测当天适应至大鼠安静,将足底红外热刺激仪光源聚焦于大鼠左后足足跖部,仪器自动记录从照射开始至大鼠缩足或舔足的时间作为观测时间,每只动物检测 3 次,每次间隔 5 min,取 3 次的平均值,调节光照强度,使正常组大鼠的基础热缩足潜伏时间 (paw withdrawal latency, PWL) 调整为 $15 \sim 20 \text{ s}$,设置最大潜伏时间为 25 s ,以免灼伤大鼠,并保持实验环境温度 (22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度 55%~65%。于给药第 2 天的 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、6、24 h 和第 5、11、18、23 天的最佳药效时间点检测大鼠的热缩足潜伏时间,第 25、26 天停药 2 d 检测第 28 天给药后各时间点的热缩足潜伏时间。

1.5.4 冷痛敏阈值 检测前每日同一时间将大鼠放于树脂盒中适应 2 h,适应 2 d。检测当天适应至

大鼠安静,用 1 mL 注射器吸取 $50 \mu\text{L}$ 丙酮,轻柔喷洒至大鼠左后足皮肤中间,观察丙酮喷洒 20 s 内大鼠左后足的行为反应,刺激 3 次,每次间隔 5 min。评分标准:0 分,静止不动;1 分,快速有力抬足 1 次;2 分,快速有力抬足多次;3 分,快速有力抬足并舔足,结果取 3 次反应评分的平均值。于给药后第 3、7、14、21 天的最佳药效时间点检测大鼠的冷痛敏阈值。

1.6 步态检测

参考文献方法^[13],采用动物步态采集分析系统测定各组大鼠的步态参数,先将大鼠放置于分析仪下方的鼠笼托架中适应 5 min,使大鼠熟悉实验环境。正式测试时将大鼠放置在仪器跑道上,记录大鼠的步态数据,记录标准为大鼠在无外界刺激的条件匀速且不停顿地行走至跑道末端,每只大鼠通过 ≥ 10 步,每组保证 4~5 只合格大鼠。于给药后 2.5 h 进行数据采集,用分析软件 CatWalk XT 10.6 分析各个数据指标,每只大鼠记录 3 次,结果取 3 次数据的平均值。由于 CCD 模型与下肢联系更为紧密,且左侧为大鼠的患侧,因此实验统计大鼠左后肢的步态数据。

1.7 取材

1.7.1 L4/L5 脊髓背角 戊巴比妥钠深度麻醉大鼠,剪开背皮后,从脊柱的第 2 胸椎和髂骨处剪断脊柱,剔除附着肌肉,确定脊柱 T1 段,取出 L4~L6 段腰膨大处,用显微镊小心剥去硬脊膜和蛛网膜后,用灭菌刀片切下 L4/L5 脊髓节段背角组织,取出的组织于 -80°C 保存,用于 Western blot 和 ELISA 实验。

1.7.2 L4/L5 脊髓节段 大鼠麻醉后,快速心脏灌注 37°C 生理盐水,待大鼠右心耳流出的液体澄清且肝脏变白后,继续灌注 4% 多聚甲醛/苦味酸固定液 (4°C),灌注结束后立即剪取 L3~L6 脊柱段,剔除附着肌肉,取出 L4/L5 脊髓节段,放于上述固定液中固定 24 h,使用 20%、30% 蔗糖溶液分别梯度脱水 48 h,收取组织,用滤纸吸干水分,于 -80°C 冰箱保存,用于免疫荧光实验。

1.7.3 皮肤 取材前取大鼠同一部位的皮肤组织 0.5 cm^2 ,于 4% 多聚甲醛/苦味酸固定液中固定 5~6 h,使用蔗糖溶液逐级脱水 1~2 d 后收取组织,用滤纸吸干水分,于 -80°C 冰箱保存,用于石蜡切片实验。

1.8 ELISA 检测

提取 CCD 大鼠 L4/L5 脊髓背角总蛋白,使用试

剂盒检测脊髓背角组织中 IL-1 β 、TNF- α 、NOS2 的表达。

1.9 副作用评估

1.9.1 大鼠体质量及一般情况监测 为检测白脉软膏用药是否具有毒副作用,实验记录各组大鼠在给药后第 0、5、10、15、21 天的体质量变化情况,同时观察大鼠的一般情况,包括动物的精神状态、活动情况、摄食量和饮水量的变化。

1.9.2 轮替实验 为排除白脉软膏通过血脑屏障对高级神经系统的影响,实验采用疲劳转棒仪监测白脉软膏对正常动物用药 2.5 h 后主轴停留时间,以明确其对动物协调功能的干预作用。小鼠适应性饲养 2~3 d 后,适应性训练小鼠 2 d,即将小鼠轻轻置于疲劳转棒仪各个通道的同一方向,转速设置为 30 r·min⁻¹,每只小鼠每天适应 3 次,每次 5 min,间隔 10 min,同时剔除跳跃、抱轴或掉落次数多的小鼠,选取 1 min 内不跌落的小鼠作为实验小鼠,将筛选出来的 32 只小鼠按体质量随机分为 4 组,即正常组以及白脉软膏低(30 mg/只)、中(90 mg/只)、高(300 mg/只)剂量组,每组 8 只。第 3 天进行正式实验,转速 30 r·min⁻¹,记录小鼠抹药 2.5 h 后在转棒上的停留时间,cut time off 为 5 min。

1.9.3 强迫游泳实验 将小鼠单独置于盛水的圆柱形玻璃容器内(高 20 cm,直径 18 cm,水深 12 cm),水温保持在 23~25 ℃,用相机记录小鼠 6 min 内的游泳行为,前 2 min 为适应时间,只记录后 4 min 内小鼠的累计不动时间。小鼠在水中完全静止不动或为避免溺水而做出向上的轻微幅度动作即不动行为,小鼠出现如沿着容器内壁向上攀爬的行为或在水面上游动的行为均不计算在内。测试完毕后将小鼠用擦手纸或毛巾擦干再放回鼠笼,实验分组和给药方式同 1.9.2 项。

1.9.4 皮肤组织 HE 染色 参考文献方法^[14]进行石蜡切片的 HE 染色,固定与脱水、透明、浸蜡和包埋、切片和展片、脱蜡和水化、苏木素染色、伊红染色和脱水,最后在光学显微镜下观察染色结果并拍照。

1.9.5 血常规及血生化指标检测 各组大鼠麻醉后腹主动脉取血,采用全自动血细胞分析仪检测全血中嗜酸细胞数(eosinophils, EOS)、嗜碱细胞数(basophilic cells, BAS)、白细胞数(white blood cell, WBC)等血常规指标,观察白脉软膏用药是否具有

潜在的过敏性;全血静置 30 min 后,4 ℃,3 500 r·min⁻¹离心 15 min,取上清,利用生化分析仪测定各组血清中肝功能指标丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST),以及肾功能指标肌酐(creatinine, CRE)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、尿酸(uric acid, UA),以评估白脉软膏长期用药对肝肾功能的影响。

1.10 靶组织初筛

1.10.1 福尔马林实验 设正常组,正常小鼠给予白脉软膏(30、90、300 mg/只),阳性对照组给予吗啡(10 mg·kg⁻¹, sc)和阿司匹林(400 mg·kg⁻¹, po),每组 8 只。使用 1 mL 注射器于小鼠左后足足趾部皮下注射 5%福尔马林 20 μ L,正常组予以等量的生理盐水,立即记录注射后 0~10 min(第一时相)和 10~60 min(第二时相)小鼠的舔足或抬足疼痛反应时间,用相机录像留底。白脉软膏组小鼠于测试前 2.5 h 给药,阳性对照组小鼠于测试前 0.5 h 给药。

1.10.2 热板实验 实验前先将小鼠置于恒温热板上,不接电源,盖上圆柱形玻璃柱,使小鼠适应 15 min。正式实验时将热板仪温度设至 52 ℃,测定小鼠的痛阈值,即小鼠出现前足或后足抖动、抬起或跳起或舔舐行为的时间。给药前筛选痛阈值在 5~20 s 的小鼠作为实验小鼠,以 2 次给药前痛阈值的平均值作为该小鼠的基础痛阈值。筛选出的小鼠按体质量进行分组, $t_{\text{cut time off}}=30$ s,超过 30 s 无反应的小鼠立即取出,痛阈值按 30 s 计算,实验动物分组及给药方式同 1.10.1 项。

1.11 网络分析

根据白脉软膏基原药材主要成分含量(主要成分或挥发油成分占药材提取物的 1%左右),结合药效分子药理作用、TCMSP^[15]数据库 ADME 参数(DL、OB、BBB)等筛选白脉软膏各药物的药效分子,Binding DB^[16]、TCMSP、ChemMapper^[17]等数据库收集白脉软膏各药物药效分子靶标,以“neuropathic pain”和“peripheral neuropathic pain”为检索词,GeneCards^[18]等数据库收集 NP 疾病靶标, relevance score>1,DAVID 工具对交集靶标进行 GO 和 KEGG 分析,结合 KEGG 分析结果、NP 发病机制、白脉软膏治疗神经损伤性疾病的药效特点等,计算白脉软膏干预 NP 核心通路中所有靶基因对应的候选药效活性分子数,筛选白脉软膏药效活性分子靶向较多

的靶基因,并结合靶基因功能确定相关靶标作为后续实验重点关注的对象。

1.12 大鼠鞘内注射

鞘内注射参照文献方法进行^[19]。使用异氟烷气体麻醉机麻醉大鼠,确保大鼠固定牢固,大鼠口鼻放进麻醉面罩,背部剃毛并消毒,将其俯卧于手术台上,左手拇指、中指固定大鼠两侧髂嵴,食指置于两侧髂嵴前缘连线正中处,定位 L5~L6 椎体间隙为进针点,右手持 100 μ L 微量进样器于棘突间隙进针,针头斜面朝上,进针方向与脊柱上方呈 20°,通过椎体间隙有落空感触到骨质感后减成 10°缓慢进针,当鼠尾突然出现侧摆运动或后腿突然抽动或回抽出现脑脊液时,表示进针成功,后将针头斜面朝下,缓慢注入药物,轻轻拔出针头,注射部位碘酒消毒。

1.13 拮抗剂的机械痛敏及热辐射痛敏检测

白脉软膏通过神经配基发挥镇痛作用的机制尚不明确,实验采用通路核心靶标特异性拮抗剂的方法对白脉软膏可能的镇痛靶标进行行为学验证。大鼠造模后,恢复 2~3 d,待机械痛敏和热辐射痛敏基础阈值趋于稳定,分别于造模后第 4、5 天检测抑制剂注射后动物的机械痛敏及热辐射痛敏阈值变化情况。前期研究得到白脉软膏发挥最佳镇痛效应的时间为给药后 2.5 h,故在白脉软膏发挥最佳药效的前 10 min 注射 MLA 和 Yohimbine,前 30 min 注射 ICI 118551,注射后立即检测大鼠的机械痛敏阈值的时序性变化。

1.14 脊髓背角组织的 Western blot 实验

从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出大鼠脊髓背角,加入含有适量蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,在冰上充分裂解 1 h,在此期间进行超声和振荡,于 4 $^{\circ}$ C,15 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min,取上清,Bradford 法检测蛋白总浓度,经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜、封闭、4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜(兔抗 p-ERK、兔抗 PI3K、兔抗 NOS2 1:1 000;GAPDH 1:5 000)、洗涤、室温孵育二抗(1:5 000)、洗涤、Fusion FX5 化学发光凝胶成像系统成像,最后用 ImageJ 软件分析蛋白条带并计算灰度值。

1.15 脊髓节段冰冻切片的免疫荧光实验

包埋大鼠 L4/L5 脊髓节段,对脊髓进行冠状面冰冻切片(30 μ m),用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 漂洗 3 次,用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 室温孵育

1 h,5% 山羊血清抗体封闭液(含 0.5% Triton X-100)室温封闭 2 h,4 $^{\circ}$ C 孵育一抗过夜,一抗两两混合配制,即 NOS2(1:250)/PI3K(1:100)/p-ERK(1:250)分别与 GFAP(1:200)/IBA1(1:100)混合配制,脊髓切片室温平衡 30 min,PBS 漂洗(含 0.1% 聚山梨酯 20),室温下避光孵育二抗[山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor[®] 488)(1:250)和山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor[®] 594)(1:250)]2 h,PBS 漂洗,室温下避光孵育 DAPI 5 min,PBS 漂洗,避光裱片,封片,荧光显微镜拍片。

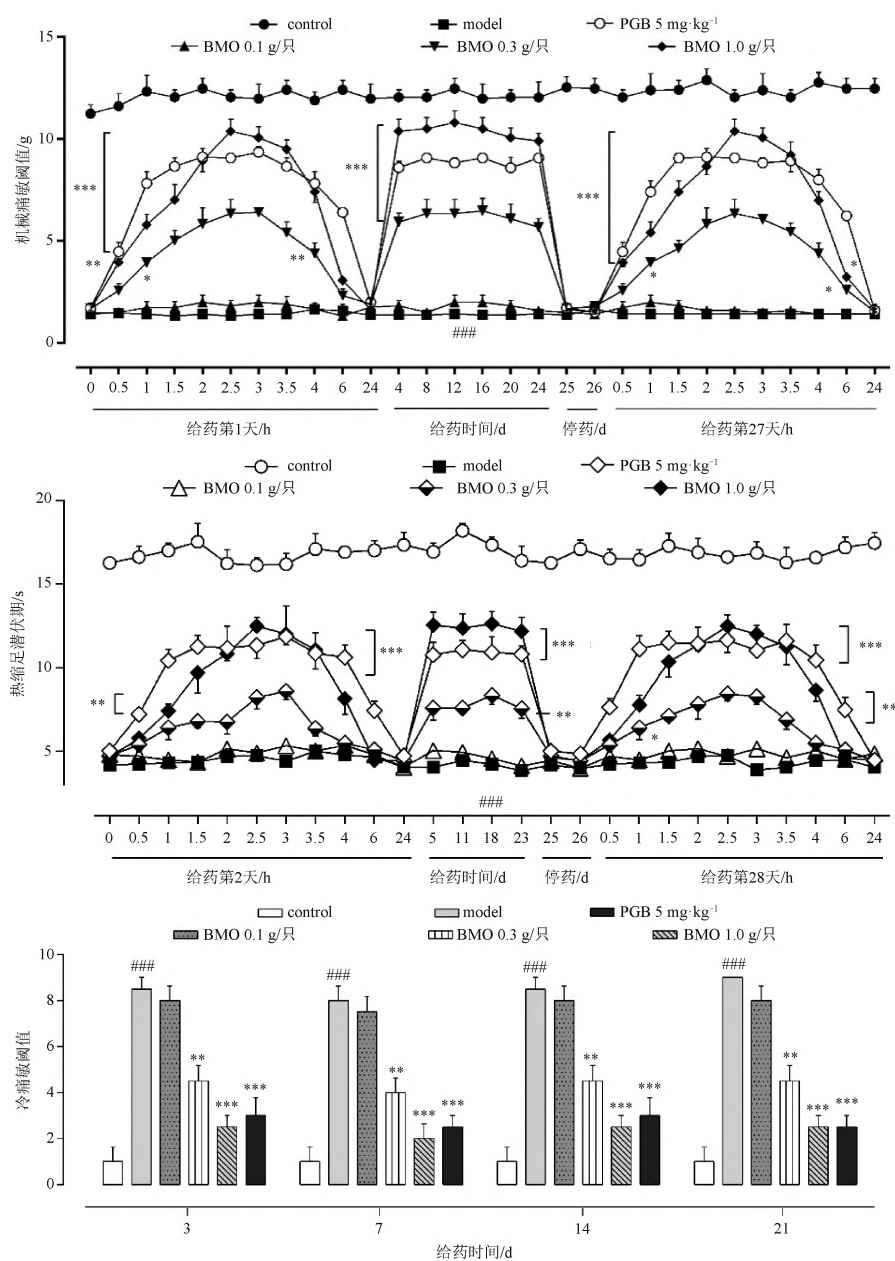
1.16 统计学分析

数据用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示,采用 *t* 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白脉软膏治疗 CCD 的药效学研究

2.1.1 白脉软膏升高 CCD 大鼠机械痛敏、热痛敏及冷痛敏阈值 与正常组相比,CCD 模型显著降低大鼠的机械痛敏、热辐射痛敏,显著升高冷痛敏阈值($P < 0.001$),提示造模成功,造模给药第 1 天,与模型组相比,白脉软膏低剂量组几乎无效,中、高剂量组可以改善 CCD 模型大鼠的机械痛敏,镇痛效果于给药后 2.5 h 达到峰值($P < 0.001$),高剂量组效果最为明显,药效持续时间约为 3 h,给药后 24 h 各组与模型组无明显差异;阳性对照普瑞巴林组(5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)发挥药效时间较白脉软膏早,能够维持 6 h 左右,但最佳药效弱于白脉软膏,见图 1。第 4、8、12、16、20、24 天各组最佳药效时间点镇痛效果与第 1 天相似。为验证白脉软膏是否具有耐受性,实验停药 2 d 后再给药,结果表明,停药后大鼠的机械痛敏阈值和热辐射痛敏阈值回到基线,给药后 0~24 h 的镇痛效果和特点与第 1 天相似,提示白脉软膏并无耐受性;给药第 2 天,白脉软膏及普瑞巴林缓解 CCD 大鼠热辐射痛敏的药效时程和最佳药效时间点与机械痛敏的结果相似,第 5、11、18、23 天的最佳药效点检测热辐射痛敏,药物升高痛阈的效果与第 1 天类似;给药第 3 天,白脉软膏可剂量依赖性缓解 CCD 大鼠的冷痛敏行为($P < 0.01$, $P < 0.001$),给药第 3、7、14、21 天的镇痛效果相似;阳性对照普瑞巴林的镇痛效果和与白脉软膏高剂量组的镇痛效果相当($P < 0.001$),见图 1。



control. 正常组; sham. 假手术组; model. 模型组; BMO. 白脉软膏; PGB. 普瑞巴林(图 2~7、10、11、13~15, 表 1、2 同)。与 control/sham 组相比[#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$; 与 model 组相比^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$, ^{***} $P < 0.001$ (图 2~4、6、7、13~15 同)。

图 1 白脉软膏对 CCD 大鼠机械痛敏、热辐射痛敏及冷痛敏阈值的影响($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 8$)

Fig. 1 Effect of BaiMai Ointment on mechanical pain threshold, thermal pain threshold, and cold pain threshold in CCD rats ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 8$)

2.1.2 白脉软膏改善 CCD 大鼠步态行为 患侧后足的足印相关指标即站立时间、最大接触时间的足印面积、最大接触时间的最大强度、足印长度、足印宽度、足印面积、完整足印的平均强度、单足接触时间 8 项指标中,与 sham 组相比,模型组各项指标均

显著下调($P < 0.01$, $P < 0.001$),说明 CCD 模型建立成功,影响了大鼠正常的步态行为;与模型组相比,白脉软膏高剂量组各指标均显著上调($P < 0.01$, $P < 0.001$),说明白脉软膏对 CCD 大鼠手术侧后足的足印相关指标具有改善作用,见图 2。

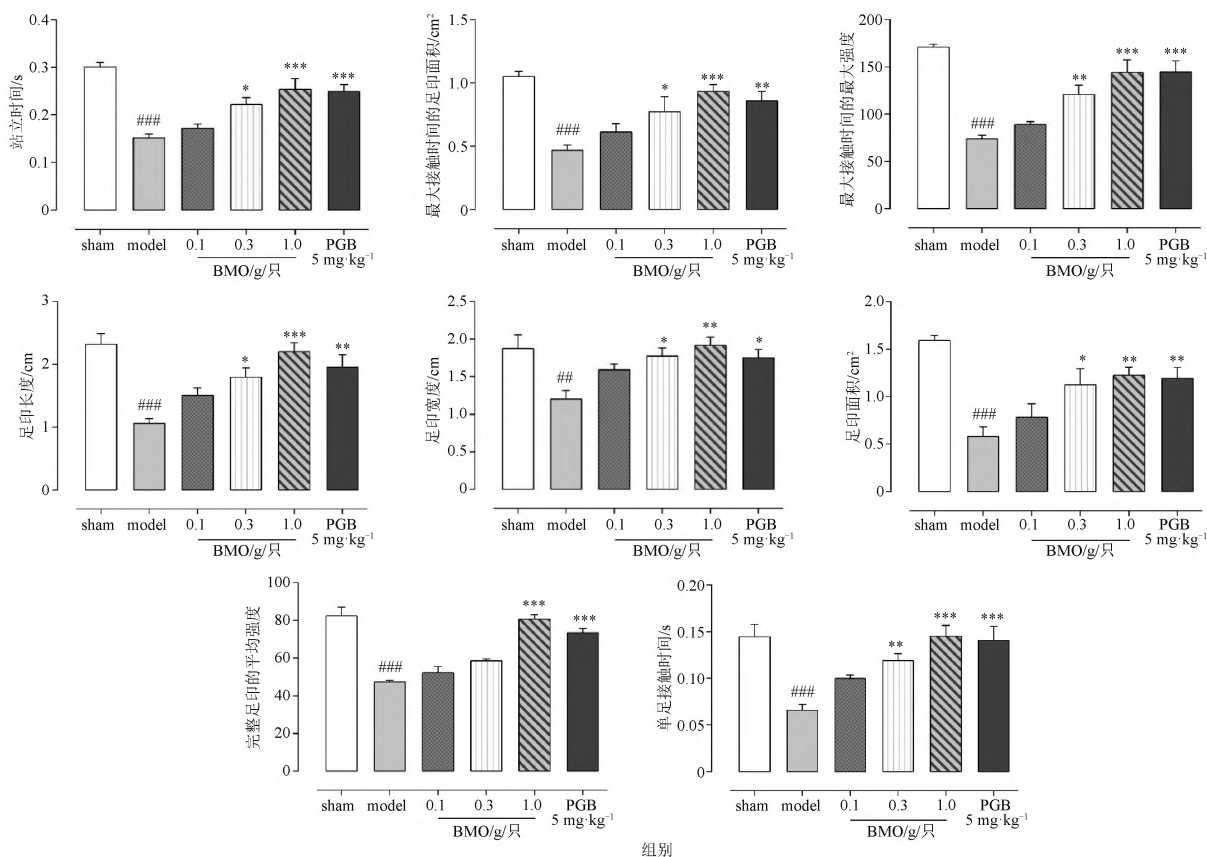


图 2 白脉软膏对 CCD 模型大鼠手术侧后足足印相关指标的影响($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=8$)

Fig. 2 Effect of Baimai Ointment on the footprint-related indexes of the hind paw in CCD rats ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=8$)

2.1.3 白脉软膏降低 CCD 大鼠 L4/L5 脊髓背角炎症介质的表达 炎症介质 IL-1 β 、TNF- α 、NOS2 可由活化的小胶质细胞分泌,三者共同介导中枢炎症^[20-21]。实验采用 ELISA 检测 CCD 大鼠 L4/L5 脊髓背角炎症因子的表达,以明确白脉软膏镇痛过程中可能参与的靶细胞,结果显示,CCD 大鼠患侧病变脊髓组织 IL-1 β 、TNF- α 、NOS2 含量显著高于正常组($P<0.01$, $P<0.001$);白脉软膏中、高剂量可降低 IL-1 β 的含量($P<0.05$, $P<0.001$),同时可剂量依赖性降低 TNF- α 的含量($P<0.05$, $P<0.01$),高剂量可降低 NOS2 的含量($P<0.05$);阳性对照普瑞巴林亦明显降低 IL-1 β 、TNF- α 、NOS2 的含量($P<0.05$, $P<0.01$),见图 3。IL-1 β 、TNF- α 和 NOS2 为小胶质细胞激活后分泌的炎症介质,提示白脉软膏可能通过抑制小胶质细胞释放炎症介质发挥抑制中枢敏化的作用。

2.2 白脉软膏治疗 CCD 无毒副作用

与 sham 组、模型组相比,白脉软膏连续给药 21

d 对 CCD 大鼠的体质量无影响,动物饮水和摄食正常,精神状态和活动正常;与正常组相比,白脉软膏给药 2.5 h 后对各组小鼠运动协调能力及游泳不动时间无明显影响,见图 4。

与模型组相比,白脉软膏各剂量组大鼠皮肤全层结构特点与正常组皮肤相比无明显差异:在电镜下观察皮肤组织染色均匀,色泽鲜艳,组织完整,无明显碎裂现象,各层次结构分明,透明性好,细胞结构清晰,无重叠现象;表皮与真皮不分离,真皮与皮下组织不分离;表皮中颗粒层、棘细胞层及基底层结构规整,见图 5。

各组大鼠给药 28 d 后,白脉软膏各组的 WBC、EOS 和 BAS 与正常组相比差异无统计学意义,说明白脉软膏用药无明显过敏性,见表 1;血生化的肝功能指标 ALT、AST 以及肾功能指标 CRE、BUN、UA 与正常组相比差异均无统计学意义,说明白脉软膏并不影响大鼠肝肾功能,见表 2。

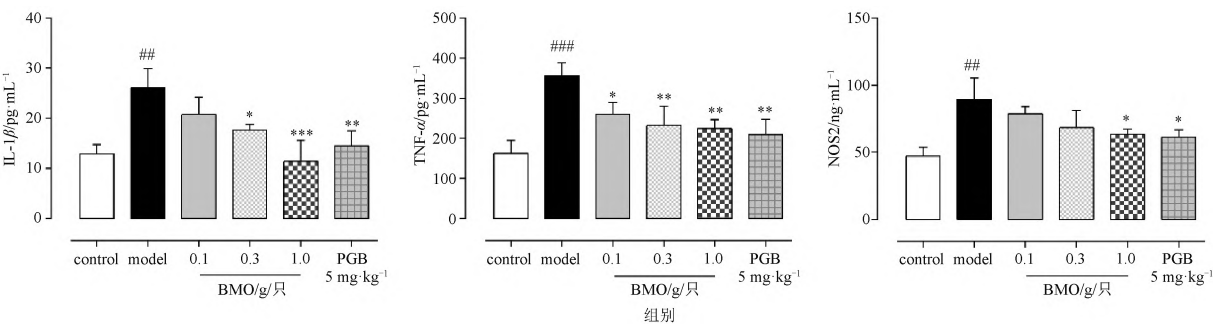


图 3 白脉软膏对 CCD 大鼠脊髓背角组织 IL-1 β 、TNF- α 、NOS2 含量的影响($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=3$)
Fig. 3 Effect of Baimai Ointment on the contents of IL-1 β , TNF- α , and NOS2 in the spinal dorsal horn of CCD rats ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=3$)

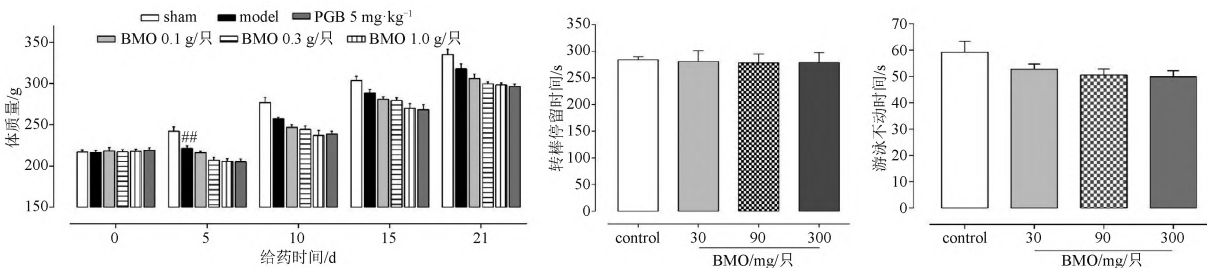


图 4 白脉软膏对 CCD 大鼠体质量、对正常小鼠协调功能及游泳行为的影响($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=8$)
Fig. 4 Effect of Baimai Ointment on the body weight of CCD rats, and the coordination function and swimming behavior of normal mice ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=8$)

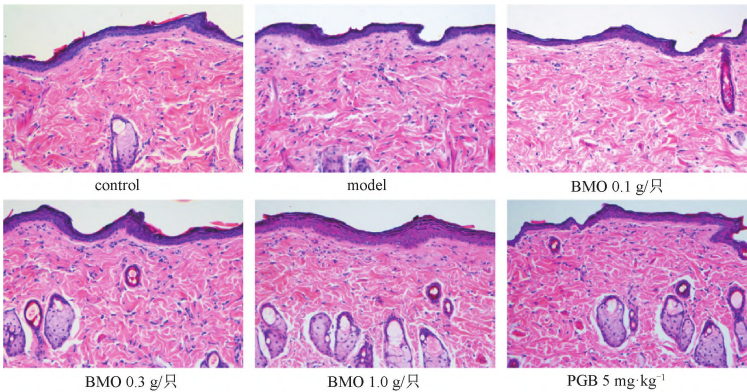


图 5 白脉软膏对 CCD 大鼠皮肤表皮及部分真皮的影响(HE 染色, $\times 200$)
Fig. 5 Effect of Baimai Ointment on the skin epidermis and partial dermis of CCD rats (HE staining, $\times 200$)

表 1 CCD 大鼠血常规指标水平的检测($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=5$)

Table 1 Detection of levels of blood routine indexes in CCD rats($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=5$)

组别	剂量/g/只	WBC/ $\times 10^9$ 个/L	EOS/%	BAS/%
control	—	3.09 $\pm$ 1.77	1.82 $\pm$ 0.43	2.29 $\pm$ 1.12
model	—	5.43 $\pm$ 1.40	1.60 $\pm$ 0.70	1.40 $\pm$ 0.81
BMO	0.1	5.72 $\pm$ 1.91	1.58 $\pm$ 0.54	1.73 $\pm$ 0.71
	0.3	6.50 $\pm$ 3.24	1.56 $\pm$ 0.51	1.22 $\pm$ 0.48
	1.0	4.71 $\pm$ 0.95	1.36 $\pm$ 0.24	1.52 $\pm$ 1.02

2.3 白脉软膏治疗 CCD 的靶组织初筛

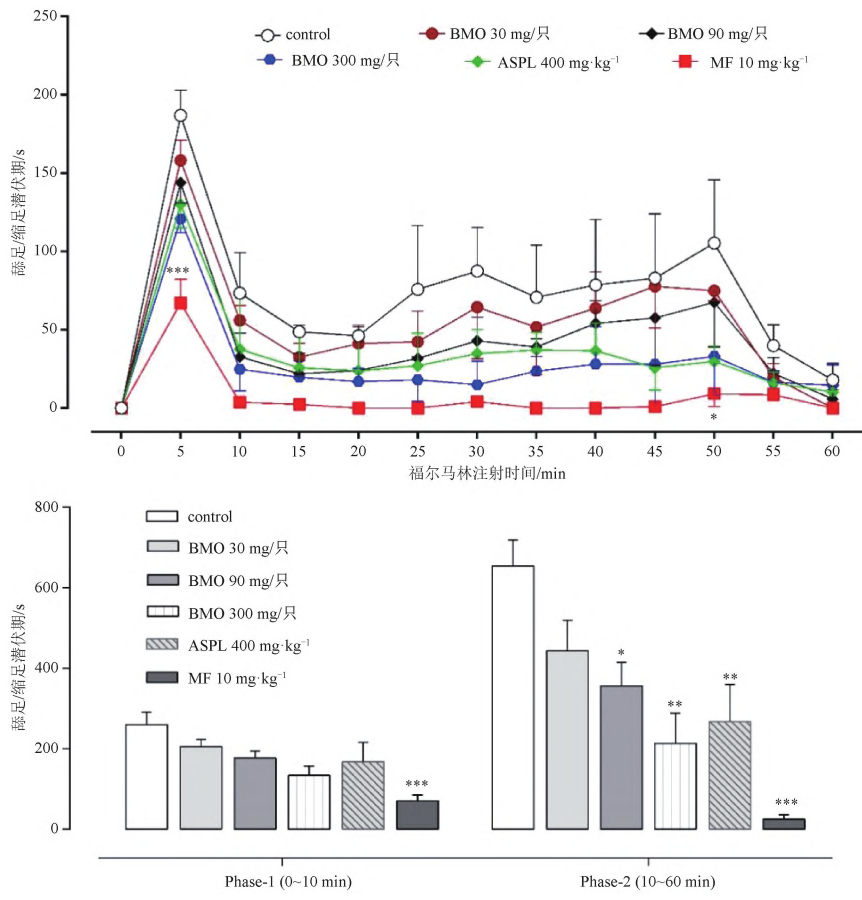
基于药效特点,本研究采用福尔马林实验诱导小鼠发生双相的伤害性反应行为进行白脉软膏镇痛靶组织初筛。白脉软膏中、高剂量能够明显降低福尔马林诱导的第二时相舔足抬足时间($P<0.05$, $P<0.01$),而对第一时相疼痛反应无影响;阳性对照阿司匹林对第一时相反应无影响,对第二时相反应具有明显抑制作用($P<0.01$);吗啡对双相疼痛反应均

表 2 CCD 大鼠血清中肝肾功能指标水平的检测($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6\sim7$)

Table 2 Detection of serum levels of liver and kidney function indicators in CCD rats($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6-7$)		U·L ⁻¹				
组别	剂量	ALT	AST	CRE	BUN	UA
control	—	27.74±6.42	42.64±7.12	93.96±15.64	5.77±1.02	262.50±52.98
model	—	28.17±4.75	36.60±7.16	103.20±9.97	7.74±1.80	318.20±59.17
BMO	0.1 g/只	28.86±7.22	37.44±5.22	95.43±14.85	6.40±1.72	312.20±65.50
	0.3 g/只	29.97±4.30	36.13±7.97	101.70±11.86	6.91±1.32	339.50±23.55
	1.0 g/只	27.81±4.73	34.34±5.83	105.20±6.31	6.35±0.97	321.20±31.58
PGB	5 mg·kg ⁻¹	27.77±5.00	40.37±8.58	105.40±13.88	5.99±1.00	303.10±44.08

有显著的抑制作用($P<0.001$),说明白脉软膏能够通过抑制中枢敏化发挥镇痛作用,其镇痛部位可能

位于脊髓部位,见图 6。
热板实验结果显示,白脉软膏高剂量给药 2.5 h



ASPL. 阿司匹林;MF. 吗啡(图 7 同)。
图 6 白脉软膏对小鼠福尔马林所致两相疼痛反应行为的影响($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=8$)
Fig. 6 Effect of Baimai Ointment on two-phase pain response induced by formalin in mice ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=8$)

后可使小鼠的痛反应潜伏期延长($P<0.01$),低、中剂量以及阿司匹林对热板痛阈值无显著影响,吗啡能够显著升高热板痛阈值($P<0.001$),说明白脉软膏发挥对 CCD 大鼠镇痛作用的部位可能位于脊髓以上水平,见图 7。

2.4 白脉软膏治疗神经病理性疼痛的机制验证
2.4.1 网络分析表明白脉软膏干预 NP 与神经配基及神经炎症密切相关 根据 1.11 项下筛选原则共获取白脉软膏药效活性分子 40 个(见中国知网本文增强出版附加材料),药物候选靶标共 1 220 个

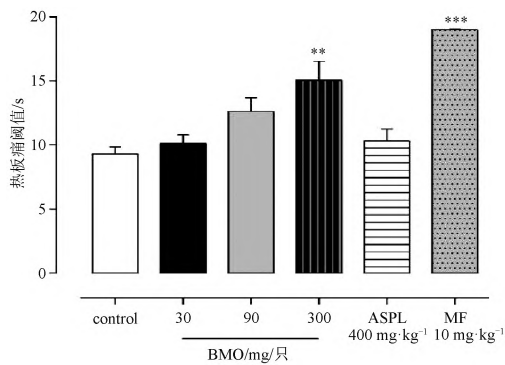


图 7 白脉软膏对热板致小鼠疼痛反应的影响 ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=8$)

Fig. 7 Effect of Baimai Ointment on pain response induced by hot plate in mice ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=8$)

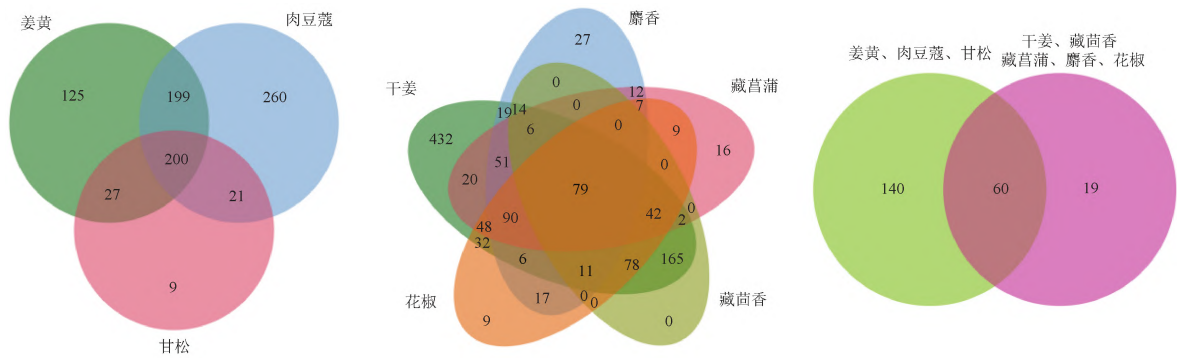


图 8 白脉软膏各药物候选药效分子靶标的韦恩图

Fig. 8 Venn diagram of candidate targets of different herbs in Baimai Ointment

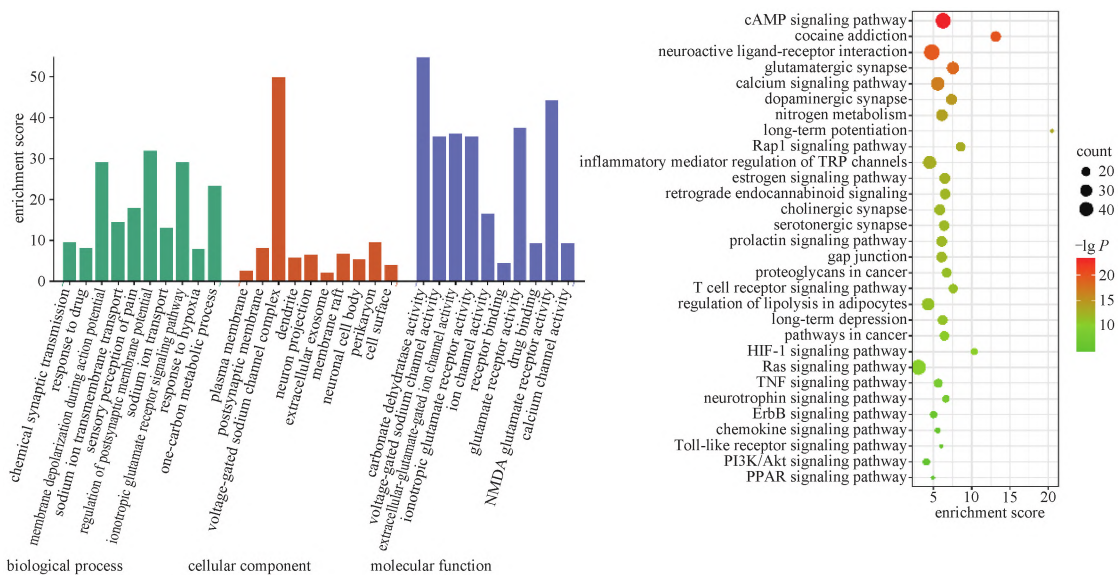


图 9 交集靶标的 GO 和 KEGG 分析

Fig. 9 GO and KEGG analysis of common targets

(见中国知网本文增强出版附加材料), 韦恩图结果表明, 君药姜黄与臣药肉豆蔻、甘松有 200 个共同靶标, 干姜、藏菖蒲、藏茴香、花椒、麝香有 79 个共同靶标, 白脉软膏各药物候选药效分子共同靶标 60 个, 表明白脉软膏配方药物分子干预疾病靶标具有较强的协同性, 见图 8。收集 NP 靶标 1 147 个(见中国知网本文增强出版附加材料)。取交集得到白脉软膏治疗 NP 靶标 276 个(见中国知网本文增强出版附加材料), DAVID 工具对 276 个靶标进行 GO 功能分析及 KEGG 分析发现以上靶标与疼痛信号密切相关, 见图 9。

根据 1.11 项下筛选原则发现, 白脉软膏候选药效活性成分主要靶向于神经配基通路的胆碱能受体

[CHRNA7(35)等]、肾上腺素能受体[ADRB2(33)、ADRA2A(33)等]、氨基酸类受体、胺类受体等(小括号中的数字表示40个白脉软膏候选药效分子作用于该靶基因的数目)。CHRNA7^[22]、ADRA2A^[23]、ADRB2^[24]靶基因与NP病理演化密切相关,见表3。

表3 白脉软膏候选药效分子作用于神经活动配体-受体相互作用通路核心靶标的相关信息
Table 3 Related information on the core targets of the neuroactive ligand-receptor interaction pathway acting on candidate pharmacological molecules of Baimai Ointment

基因名	全称	作用于该靶标的成分数	介绍
CHRNA7	烟碱型乙酰胆碱受体亚基 $\alpha 7$ (neuronal acetylcholine receptor subunit $\alpha 7$)	35	系统性给药 CHRNA7 激动剂可能通过减少神经元损伤和外周免疫细胞激活来有效治疗神经性疼痛 ^[22]
ADRA2A	$\alpha 2A$ 肾上腺素能受体($\alpha 2A$ adrenergic receptor)	33	ADRA2A 激动剂可促进星形胶质细胞中 ERK1/2 的磷酸化发挥神经保护作用,或激动 EGF 受体,释放神经营养因子 ^[23]
ADRB2	$\beta 2$ 肾上腺素能受体($\beta 2$ adrenergic receptor)	33	ADRB2 激动剂慢性治疗能够有效缓解触诱发痛 ^[24]

根据 1.11 项下筛选方法发现,白脉软膏候选药效活性分子主要靶向于神经炎症通路,如 HIF-1 信号通路中的 NOS2(36)、ERK2(23)、PIK3R1(13)、PIK3R2(13)等(小括号中的数字表示40个白脉软膏候选药效分子作用于该靶基因的数目),相关研究报道 HIF-1 信号通路及其调控元件与神经炎症密切相关,如调控免疫细胞存活和促炎因子表达,参与 IL-1 β 的合成^[25]。

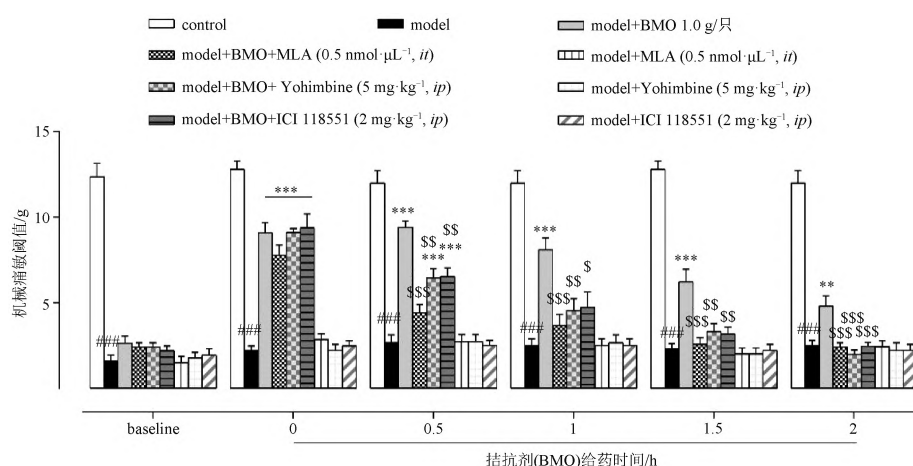
综上,白脉软膏治疗 NP 可能通过调控神经配基中的胆碱能类受体、肾上腺素能类受体、氨基酸类受体、胺类受体等发挥瞬时镇痛效应,同时通过调控 HIF-1 信号通路中的核心调控元件 NOS2、ERK2、PI3K 发挥神经炎症的抑制作用。

2.4.2 MLA、Yohimbine 及 ICI 118551 降低白脉软膏对 CCD 大鼠的镇痛作用 实验采用拮抗剂注射的方法观察 CHRNA7、ADRA2A 及 ADRB2 对 CCD 大鼠病理性表征的影响,明确 CHRNA7、ADRA2A 及 ADRB2 受体在 CCD 大鼠发病过程中的作用及白脉软膏的镇痛机制。结果发现,与正常组相比,CCD 造模后,机械痛敏阈值显著降低($P<0.001$);与 CCD 模型组相比,白脉软膏给药后 2.5 h,即 MLA($1\text{ nmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、Yohimbine($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和 ICI 118551($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)注射的 0 h,白脉软膏能够升高 CCD 大鼠的机械痛敏阈值($P<0.001$);MLA、Yohimbine、ICI118551 注射 0.5、1、1.5、2 h 后,机械痛敏阈值较 BMO 组均显著下降($P<0.01$, $P<0.001$),说明 MLA、Yohimbine 及 ICI 118551 能够部分降低白脉软膏对 CCD 大鼠的镇痛作用;热辐射痛敏结果与机械痛敏结果大致相似,见图 10、11。

2.4.3 白脉软膏作用机制的靶细胞定位 脊髓星形胶质细胞与小胶质细胞均可时序性介导中枢神经炎症,为明确 CCD 模型下神经炎症的靶细胞,实验进行了核心靶标的胶质细胞定位检测,免疫荧光结果显示,脊髓背角组织表达 NOS2、PERK、PI3K,与星形胶质细胞标志物 GFAP 仅少量重合,见图 12,而多与小胶质细胞标志物 IBA1 共标,见图 13~15,同时 NOS2、PERK、PI3K 与 GFAP 共标细胞数在各个组中无明显差异(见中国知网本文增强出版附件加料),表明在 CCD 模型中小胶质细胞是神经炎症的主要“扮演者”,于是实验将小胶质细胞作为后续研究的重点。

2.4.4 白脉软膏对 CCD 大鼠 L4/L5 脊髓背角组织 NOS2 表达的影响 结果表明,与正常组相比,CCD 大鼠脊髓背角 NOS2 表达显著增高($P<0.001$),白脉软膏不同剂量可显著降低病变脊髓背角 NOS2 的表达($P<0.05$, $P<0.001$),阳性药普瑞巴林亦能明显降低脊髓背角 NOS2 的表达($P<0.001$),见图 13。在此基础上,实验采用免疫荧光的方法,用小胶质细胞标志物 IBA1 观测 NOS2 的细胞定位,结果表明,CCD 大鼠造模第 28 天,NOS2 均与小胶质细胞共标,白脉软膏高剂量能显著降低 NOS2/IBA1 共标细胞数目($P<0.001$);与模型组相比,阳性药物普瑞巴林降低 NOS2/IBA1 共标细胞数目与白脉软膏高剂量效果相似,说明 NOS2 亦可能是白脉软膏发挥 CCD 大鼠镇痛作用的靶标之一,见图 13。

2.4.5 白脉软膏对 CCD 大鼠 L4/L5 脊髓背角组织 p-ERK 表达的影响 实验进一步观测白脉软膏给药 28 d 大鼠患侧 L4/L5 脊髓背角 p-ERK 的表达水平,



与正常组相比 $###P<0.001$;与 model 组相比 $**P<0.01$, $***P<0.001$;与 model+BMO (1.0 g/只) 组相比 $\$P<0.05$, $$$P<0.01$, $$$$P<0.001$ (图 11 同)。

图 10 MLA (CHRNA7 拮抗剂)、Yohimbine (ADRA2A 拮抗剂) 及 ICI 118551 (ADRB2 拮抗剂) 对白脉软膏升高 CCD 模型大鼠机械痛敏阈值的影晌($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6$)

Fig. 10 Effects of MLA (CHRNA7 antagonist), Yohimbine (ADRA2A antagonist), and ICI 118551 (ADRB2 antagonist) on the increase of mechanical pain threshold in CCD rats by Baimai Ointment ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6$)

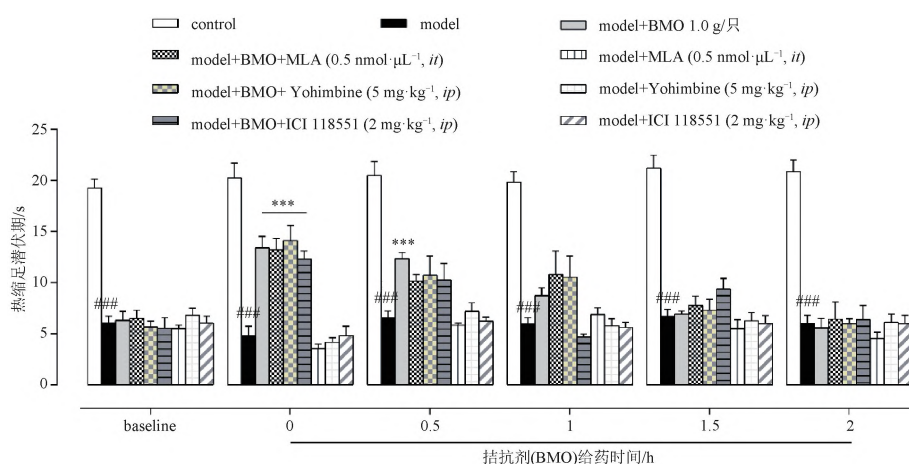


图 11 MLA (CHRNA7 拮抗剂)、Yohimbine (ADRA2A 拮抗剂) 及 ICI118551 (ADRB2 拮抗剂) 对白脉软膏升高 CCD 模型大鼠热辐射痛敏阈值的影晌

Fig. 11 Effects of MLA (CHRNA7 antagonist), Yohimbine (ADRA2A antagonist), and ICI118551 (ADRB2 antagonist) on the increase of thermal pain threshold in CCD rats by Baimai Ointment ($\bar{x}\pm\text{SEM}$, $n=6$)

结果表明,与正常组相比,CCD 大鼠脊髓背角 p-ERK 表达显著升高($P<0.001$),白脉软膏中、高剂量可显著降低病变脊髓背角 p-ERK 的表达($P<0.001$),阳性药普瑞巴林也能显著降低脊髓背角 p-ERK 的表达($P<0.001$),见图 14。在此基础上,采用免疫荧光的方法,用小胶质细胞标志物 IBA1 观测 p-ERK 的细胞定位,结果表明,CCD 大鼠造模第 28 天, p-ERK 均与小胶质细胞共标,白脉软膏高剂量能显著

降低 p-ERK/IBA1 共标细胞数目($P<0.001$);与模型组相比,阳性药物普瑞巴林降低 p-ERK/IBA1 共标细胞数目与白脉软膏高剂量效果相似,见图 14。

2.4.6 白脉软膏对 CCD 大鼠 L4/L5 脊髓背角组织 PI3K 表达的影响 结果表明,与正常组相比,CCD 大鼠脊髓背角 PI3K 表达显著升高($P<0.001$),白脉软膏能剂量依赖性降低病变脊髓背角 PI3K 的表达($P<0.001$),阳性药普瑞巴林也能显著降低脊髓背

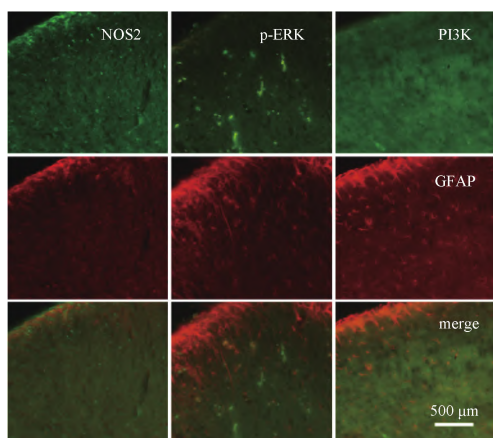
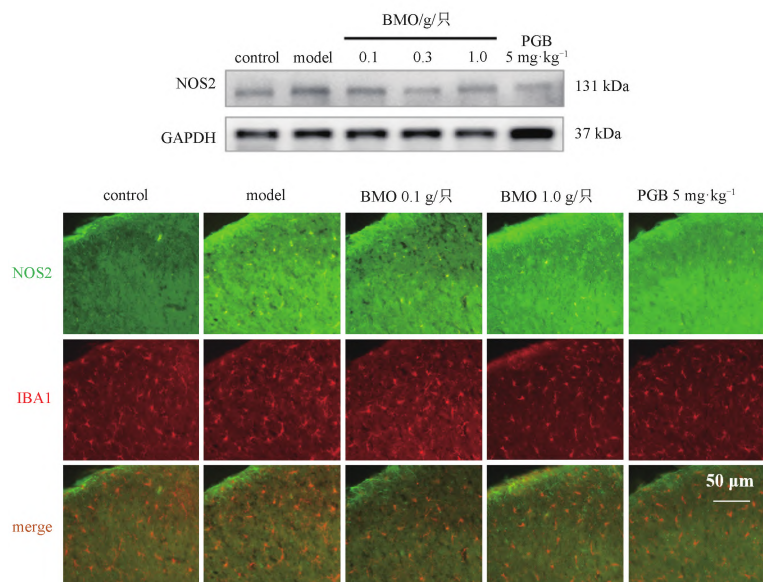


图 12 NOS2、PERK、PI3K 与 GFAP 共标情况

Fig. 12 Co-labeling of NOS2, PERK, and PI3K with GFAP

图 13 白脉软膏对 CCD 大鼠脊髓背角中 NOS2 蛋白表达及 NOS2/IBA1 共标阳性细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=3$)Fig. 13 Effect of Baimai Ointment on the expression of NOS2 and the number of NOS2/IBA1-positive cells in the spinal dorsal horn of CCD rats ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=3$)

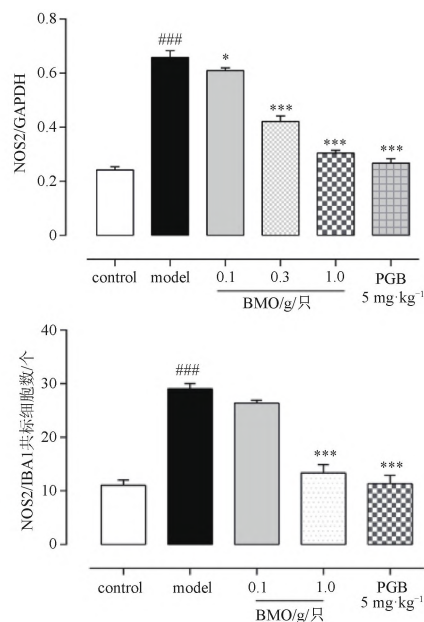
上以药物治疗联合物理治疗等其他手段治疗能取得一定疗效,其中西药通过镇痛、抗炎、减轻水肿等可暂时缓解症状或通过外科手段干预,均有一定局限性。藏族药治疗神经系统疾病有良好的疗效,经典藏族药白脉软膏舒筋活络,温通活血,辛香燥烈,寒热平调,其有明确的镇痛、抗炎、缓解肌肉痉挛、促进血液微循环等多重作用,临床治疗腰椎间盘突出等有 NP 属性的慢性疼痛疗效显著,少见副作用报道,但其镇痛的药效学特点及机制尚不明确,本研究基

6470

角 PI3K 的表达 ($P < 0.001$), 见图 15。实验进一步将 PI3K 与 IBA1 共标记, 采用免疫荧光的方法对 PI3K 表达的细胞进行定位, 结果表明, CCD 大鼠造模第 28 天, PI3K 均与小胶质细胞共标, 白脉软膏高剂量能显著降低 PI3K/IBA1 共标细胞数目 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 阳性药物普瑞巴林降低 PI3K/IBA1 共标细胞数目与白脉软膏高剂量效果相似, 见图 15。

3 讨论

腰椎间盘突出症是临床上常见的病症之一, 具有神经病理性疼痛和慢性炎症性疼痛的双重病理特点, 患者表现为腰背部疼痛及双下肢放射性痛^[26], 使其活动受限, 生理和心理健康受到严重威胁, 临床



于前期其治疗慢性炎症性疼痛的药效学及机制, 采用大鼠背根节慢性压迫模型, 对白脉软膏治疗 CCD 模型的药效学及机制进行了评估。

实验利用 L 型不锈钢丝插入 L4 椎间孔, 对大鼠背根神经节及邻近的神经根产生持久而稳定的压迫, 使躯体感觉神经元兴奋性升高, 自发性的动作电位增多, 引起自发痛、痛觉过敏或机械性痛觉异常, 使得神经组织局部水肿, 变性炎症反应, 较真实地模拟了腰椎间盘突出症的病理改变及临床症状, 是

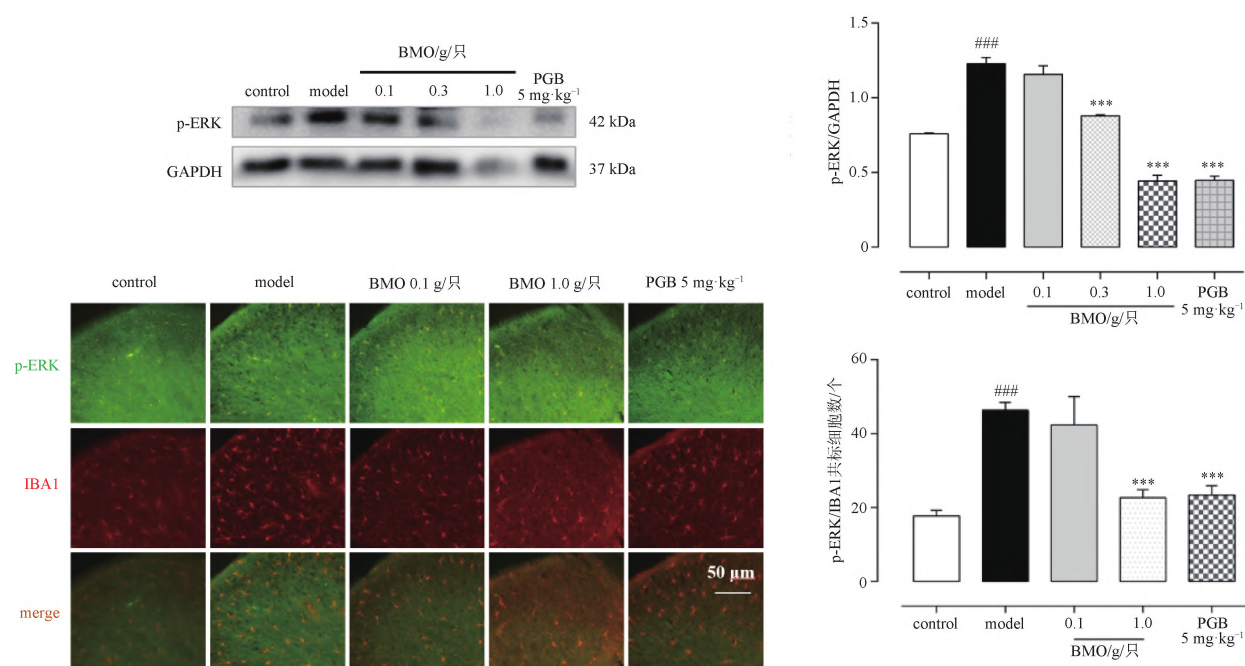


图 14 白脉软膏对 CCD 大鼠脊髓背角中 p-ERK 蛋白表达及 p-ERK/IBA1 共标阳性细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 3$)

Fig. 14 Effect of Baimai Ointment on the expression of p-ERK and the number of p-ERK/IBA1-positive cells in the spinal dorsal horn of CCD rats ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 3$)

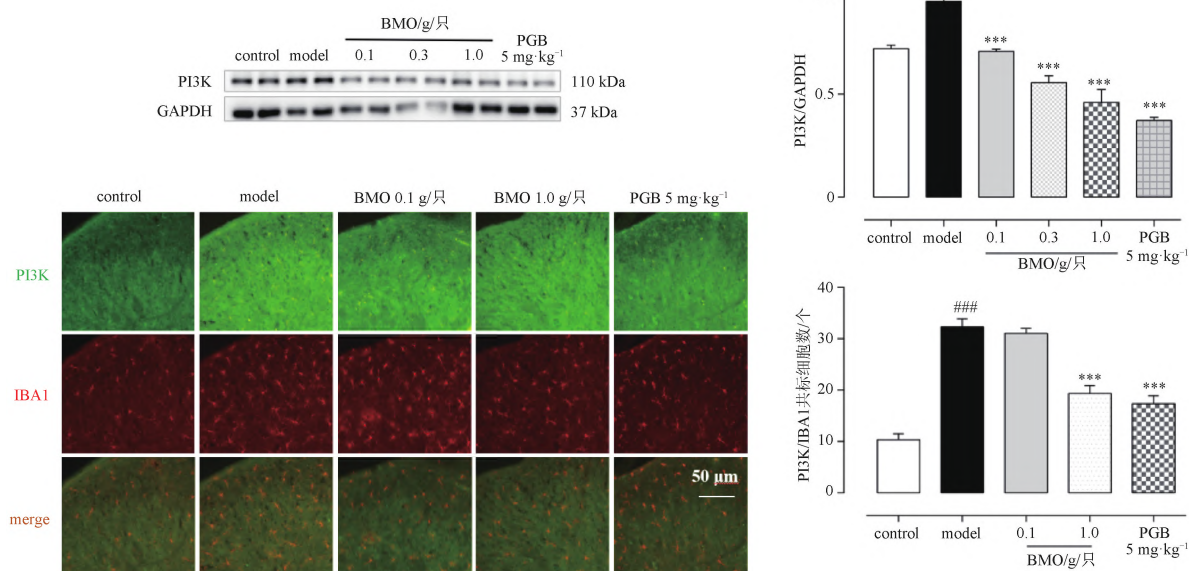


图 15 白脉软膏对 CCD 大鼠脊髓背角中 PI3K 蛋白表达及 PI3K/IBA1 共标阳性细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 3$)

Fig. 15 Effect of Baimai Ointment on the expression of PI3K and the number of PI3K/IBA1-positive cells in the spinal dorsal horn of CCD rats ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 3$)

椎间盘突出症药效学研究及机制探讨的理想模型。普瑞巴林是一种钙通道调节剂,通过与电压门控性钙离子通道的 $\alpha 2\text{-}\delta$ 亚基相结合,减少兴奋性神经递

质的释放实现镇痛等作用,多项随机对照试验证实了普瑞巴林在治疗神经病理性疼痛中的确切疗效^[27-28],普瑞巴林 300、450、600 $\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}$ 被证实对神

经病理性疼痛的治疗有效,起效迅速,用药后 0.5 h 便可达到改善疼痛的效果,且药效可以维持 5 h 左右^[28],同时参考中、英文文献中此疾病研究阳性药物的选择,本研究选用了普瑞巴林作为治疗椎间盘突出症的阳性对照药物。

在建立稳定的椎间盘突出症模型基础上,本实验外用给予白脉软膏进行治疗,发现白脉软膏可剂量依赖性升高 CCD 大鼠的机械痛敏、热辐射痛敏,降低冷痛敏阈值,与阳性药普瑞巴林相比,药效最佳时间点的镇痛效果二者无较大差异。实验停药 2 d 再给药发现白脉软膏升高痛敏阈值的作用与第 1 天相似,说明药物无明显耐受效应,步态分析可以客观分析大鼠由于运动缺陷或疼痛引起的步态变化,用于评估白脉软膏对 CCD 大鼠的药效学作用,结果发现白脉软膏可改善 CCD 大鼠手术侧后足的足印相关指标。

本研究根据白脉软膏基原药材(姜黄、干姜、肉豆蔻、甘松、人工麝香、花椒、藏茴香、藏菖蒲)主要成分含量,结合文献报道的药效分子药理作用、ADME 参数等共筛选出 40 个药效分子,如甘松新酮、榄香烯、6-姜辣素、6-姜烯酚、右旋柠檬烯、芳姜黄酮、姜黄酮、4-松油醇、麝香酮、芳樟醇等,这些成分在单味药或整方提取物(如挥发油)中占有较大比例,容易被人体吸收利用^[29];且候选药效分子多具镇痛、抗炎、营养神经、改善认知等方面的药理作用,总之,相关候选药效分子能总体代表白脉软膏治疗 NP 的主要物质基础。

白脉软膏 40 个候选药效分子共有靶标 4 129 个,而合并除重后仅余 1 220 个,即有 2 909 个重复靶标,不仅说明各药物候选药效分子结构、药理活性的相似性,也表明白脉软膏各药物之间紧密而鲜明的协同作用。白脉软膏 40 个候选药效分子靶标共参与 175 条相关信号通路,而约 70 个基因较均匀富集在各个通路中,相关通路不仅与疼痛、神经炎症、能量代谢密切相关,还参与阿尔茨海默病、帕金森病、胶质细胞瘤、黑色素瘤等多种疾病或病理过程,表明白脉软膏治疗神经系统疾病的广泛性,并为其适应症拓展奠定了基础。

网络分析中,碱花、阳起石等矿物类药物虽无纳入成分和预测靶标,但不排除其在疾病干预中的辅助作用。

本研究对白脉软膏姜黄、甘松等 9 味药物候选

药效分子的 60 个共同靶标进行分析显示,相关基因主要富集于神经系统相关信号通路,如神经活动配体-受体相互作用通路、尼古丁成瘾性、内源性大麻素受体信号通路等,进一步说明白脉软膏治疗疼痛的合理性和专属性。

本研究对白脉软膏候选药效分子靶标-NP 疾病靶标交集进行 GO 分析显示,白脉软膏主要参与膜去极化、突触后膜电位的调节、感知疼痛等与炎症疼痛密切相关的生物学过程;KEGG 分析发现,白脉软膏主要调控神经活动配体-受体相互作用通路及神经炎症通路(如 PI3K/Akt、HIF-1、TNF 等通路),表明交集靶标和疼痛密切相关。

神经配基方面,在神经活动配体-受体相互作用通路中,白脉软膏候选药效分子主要靶向于以下神经配基:①胆碱能受体 CHRNA7、CHRM2、CHRM3 等,其中,40 个白脉软膏药效成分有 35 个候选药效分子作用于 CHRNA7 受体,LORAM L C 等^[22]发现,CHRNA7 激动剂经微渗透泵给药后显著减弱慢性缩窄性损伤(chronic constrictive injury, CCI)模型诱导的痛觉超敏反应,减轻背根神经节和/或坐骨神经损伤部位的炎症,提示 CHRNA7 与 NP 关系密切,可能为白脉软膏治疗 NP 的重要靶标之一;②肾上腺素能受体 ADRA2A、ADRB2、ADRA1A 等,其中有 33 个候选药效分子靶向于 ADRA2A, SUDO R T 等^[9]发现,ADRA2A 激动剂对热板和福尔马林注射引起的疼痛反应具有剂量依赖性的镇痛作用;CHOUCAIR-JAAFAR N 等^[24]发现,ADRB2 激动剂 ICI 118551 慢性治疗能够有效缓解机械性触诱发痛,提示 CHRNA7、ADRA2A、ADRB2 可能为白脉软膏治疗 NP 的潜在靶标。进一步的抑制剂行为学验证实验中,显示 CHRNA7 拮抗剂 MLA、ADRA2A 拮抗剂 Yohimbine、ADRB2 拮抗剂 ICI 118551 能够部分逆转白脉软膏对 CCD 大鼠的镇痛效应,使机械痛敏阈值降低。以上研究提示,白脉软膏可能通过调节 CHRNA7、ADRA2A、ADRB2 等神经配基发挥 NP 镇痛作用。

神经炎症方面,近年研究表明,神经炎症在 NP 病理演化过程中扮演了重要角色,中枢神经系统胶质细胞活化、炎症因子释放、胶质细胞-神经元 crosstalk 等为 NP 的主要病理表现及慢性化根源,并为 NP 的干预指明了新方向。KEGG 分析表明,白脉软膏治疗 NP 可能与调控神经炎症通路,如

PI3K/Akt、HIF-1、TNF 等信号通路相关,分析发现,40 个白脉软膏药效成分有 13 个候选药效分子靶向于 PI3K/Akt 信号通路中的 PIK3R1 和 PIK3R2;有 36 个候选药效分子靶向于 HIF-1 信号通路中的 NOS2;有 23 个候选药效分子靶向于 TNF 信号通路中的 ERK2。GUO J R 等^[30]发现,抑制 PI3K/Akt 信号通路可减轻 CCI 大鼠的疼痛行为,降低小胶质细胞及骨髓中 GFAP 和 NGF 的表达;DUDHGAONKAR S P 等^[31]发现,单独使用 NOS2 抑制剂能够显著升高 CCI 模型大鼠的机械痛敏阈值;TNF 信号通路可调控多种炎症介质并介导联级反应,在 NP 发生、发展过程中扮演重要角色,神经损伤后,脊髓胶质细胞中的 ERK 被激活,导致促炎介质的合成,从而增强和延长疼痛反应,在不同的 NP 动物模型中,抑制 ERK2 的表达可减轻疼痛反应^[32]。

热板实验和福尔马林实验可用于筛选镇痛药物镇痛部位,实验结果表明白脉软膏能够明显增加正常小鼠的热板潜伏期,能够抑制正常小鼠第二时相的伤害性反应时间,提示脊髓及脊髓以上的中枢部位可能是白脉软膏发挥镇痛作用的主要部位。中枢神经系统中的小胶质细胞是 CNS 的巨噬细胞,是 CNS 应对感染、炎症和病理生理刺激的第一反应细胞,其受到刺激后激活变成“阿米巴”状,其在 M1 促炎状态下分泌促炎因子如 IL-1 β 、TNF、活性氧和前列腺素等炎症介质产生神经损伤,是中枢敏化的标志物。ELISA 结果显示,白脉软膏能够剂量依赖性地降低脊髓背角组织中 IL-1 β 、TNF- α 及 NOS2 的含量,提示白脉软膏可能通过抑制 CCD 大鼠脊髓病变部位细胞的功能状态或过度活化的神经炎症而发挥镇痛作用。Western blot 和免疫荧光结果表明,白脉软膏同时降低了 PI3K、NOS2、p-ERK 在小胶质细胞中的表达。以上研究提示,白脉软膏可能通过调控 PI3K、NOS2、ERK 等发挥神经炎症的抑制作用。

综上,本研究在结合白脉软膏道地药材主要成分含量、NP 发病机制、白脉软膏治疗神经损伤性疾病的临床特点、ADME 参数等确定白脉软膏治疗 NP 候选药效分子的基础上进行网络分析和动物实验验证,结果表明,白脉软膏组方配伍严谨,君臣佐使配伍的协同性/协调性有相关物质基础,白脉软膏治疗神经系统疾病具有广泛性,干预中枢疼痛具有专属性;白脉软膏治疗 NP 的作用机制可能是通过多途

径、多靶点协同发挥的,可调节胆碱能类、氨基酸类、肾上腺素能类、胺类受体等神经配基通路发挥 NP 的瞬时镇痛作用,也可调节 HIF-1 等信号通路发挥神经炎症的抑制作用。相关结果初步阐释了白脉软膏的组方特点,也表明“白脉理论”与神经炎症及神经配基的生理病理相关,相关研究丰富了白脉软膏“舒筋活络”的生物学内涵,并为进一步的机制研究、新药研发、适应症拓展、方剂配伍理论阐释等奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 张淑芬,杨红军,邓兵梅,等. TNF- α 在 CCD 模型大鼠背根神经节中的表达及机制[J]. 中国病理生理杂志,2015,31(4): 675.
- [2] JI R R, BERTA T, NEDERGAARD M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy[J]. Pain, 2013, 154(Suppl 1): S10.
- [3] FINNERUP N B, KUNER R, JENSEN T S. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment[J]. Physiol Rev, 2021, 101(1): 259.
- [4] 李宁,郭文华,董纪革,等. 白脉软膏改善脑卒中患者肌张力增高的有效性和安全性临床研究[J]. 中国实用医药,2011,6(35):240.
- [5] 陈薇,詹红生,罗辉. 白脉软膏临床应用专家意见[J]. 中国中药杂志,2022,47(5):1403.
- [6] 杨菲,周方婷,宗瑛,等. 白脉软膏对慢性炎症性疼痛小鼠外周敏化的干预作用[J]. 中国中药杂志,2022,47(24):6730.
- [7] 胡三觉,邢俊玲. 大鼠背根节慢性压迫对行为和电生理反应的影响[J]. 中国疼痛医学杂志,1997,3(3):158.
- [8] ABDIN M J, MORIOKA N, MORITA K, et al. Analgesic action of nicotine on tibial nerve transection (TNT)-induced mechanical allodynia through enhancement of the glycinergic inhibitory system in spinal cord[J]. Life Sci, 2006, 80(1):9.
- [9] SUDO R T, DO AMARAL R V, MONTEIRO C, et al. Antinociception induced by a novel $\alpha 2$ adrenergic receptor agonist in rodents acute and chronic pain models[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815:210.
- [10] M'DAHOMA S, POITEVIN M, DABALA E, et al. $\alpha 2$ - and $\beta 2$ -adrenoreceptor-mediated efficacy of the atypical antidepressant agomelatine combined with gabapentin to suppress allodynia in neuropathic rats with ligated infraorbital or sciatic nerve[J]. Front Pharmacol, 2018, 9:587.
- [11] DIXON W J. Efficient analysis of experimental observations[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20: 441.
- [12] HARGREAVES K, DUBNER R, BROWN F, et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. Pain, 1988, 32(1): 77.
- [13] 吕智桢,孔令军,程艳彬,等. 基于 CatWalk 评价脊柱推拿干预慢性下腰痛模型大鼠步态行为[J]. 中华中医药杂志,2022,37(6):3475.

- [14] 祁珊珊, 辛薇, 王永吉. 大鼠皮肤石蜡切片的制作技巧与质量控制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2015, 31(11): 1307.
- [15] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6(1): 13.
- [16] GILSON M K, LIU T, BAITALUK M, et al. BindingDB in 2015: a public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology [J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(D1): D1045.
- [17] GONG J, CAI C, LIU X, et al. ChemMapper: a versatile web server for exploring pharmacology and chemical structure association based on molecular 3D similarity method [J]. Bioinformatics, 2013, 29(14): 1827.
- [18] FISHILEVICH S, ZIMMERMAN S, KOHN A, et al. Genic insights from integrated human proteomics in GeneCards [J]. Database, 2016, doi: 10.1093/database/baw030.
- [19] HYLDEN J L, WILCOX G L. Intrathecal morphine in mice: a new technique [J]. Eur J Pharmacol, 1980, 67(2/3): 313.
- [20] 井紫薇, 樊钊, 李光耀, 等. miR-125a-5p 通过靶向 HIF1AN 调控 HIF-1 α 参与小胶质细胞活化 [J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(4): 311.
- [21] 荆凤. 小胶质细胞 P2Y₁₂ 受体参与慢性偏头痛中枢敏化的机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- [22] LORAM L C, TAYLOR F R, STRAND K A, et al. Systemic administration of an α -7 nicotinic acetylcholine agonist reverses neuropathic pain in male Sprague Dawley rats [J]. J Pain, 2012, 13(12): 1162.
- [23] SHI Y, PENG X H, LI X, et al. Neuroprotective role of dexmedetomidine pretreatment in cerebral ischemia injury via AD-RA2A-mediated phosphorylation of ERK1/2 in adult rats [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(6): 5201.
- [24] CHOUCAIR-JAAAFAR N, YALCIN I, RODEAU J L, et al. Beta2-adrenoceptor agonists alleviate neuropathic allodynia in mice after chronic treatment [J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(7): 1683.
- [25] SHEU S Y, HONG Y W, SUN J S, et al. Radix Scrophulariae extracts (harpagoside) suppresses hypoxia-induced microglial activation and neurotoxicity [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15: 324.
- [26] ZHANG X, ZHAO Z, NIU C, et al. Spinal biomechanical modelling in the process of lumbar intervertebral disc herniation in middle-aged and elderly [J]. J Healthc Eng, 2021, 2021: 2869488.
- [27] 彭凯. 普瑞巴林对缓解神经病理性疼痛的效果和安全性 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2022, 32(18): 111.
- [28] 朱谦, 赵晶, 覃旺军, 等. 基于血药浓度监测普瑞巴林治疗带状疱疹后神经痛的临床观察 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28(5): 340.
- [29] 蒋鼎, 丁道芳, 韩大鹏, 等. 白脉软膏含药血浆对大鼠退变滑膜细胞和软骨细胞共培养体系的作用及机制研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(4): 556.
- [30] GUO J R, WANG H, JIN X J, et al. Effect and mechanism of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signal pathway on chronic neuropathic pain and spinal microglia in a rat model of chronic constriction injury [J]. Oncotarget, 2017, 8(32): 52923.
- [31] DUDHGAONKAR S P, TANDAN S K, KUMAR D, et al. Ameliorative effect of combined administration of inducible nitric oxide synthase inhibitor with cyclooxygenase-2 inhibitors in neuropathic pain in rats [J]. Eur J Pain, 2007, 11(5): 528.
- [32] ZHUANG Z Y, WEN Y R, ZHANG D R, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation; respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance [J]. J Neurosci, 2006, 26(13): 3551.

[责任编辑 马超一]