

本文引用: 曾锦明, 范成龙, 邓 姣, 屈战利, 李 刚. 大黄素抑制背根神经节压迫小鼠模型STAT3、VEGFA、p-ERK 蛋白表达及其镇痛作用研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(9): 1583-1591.

## 大黄素抑制背根神经节压迫小鼠模型 STAT3、VEGFA、p-ERK 蛋白表达及其镇痛作用研究

曾锦明<sup>1</sup>, 范成龙<sup>1</sup>, 邓 姣<sup>1</sup>, 屈战利<sup>2</sup>, 李 刚<sup>1\*</sup>

1. 川北医学院第二临床医学院麻醉科, 四川 南充 637000; 2. 川北医学院第二临床医学院神经内科, 四川 南充 637000

**[摘要]** **目的** 研究大黄素(Emodin, ED)对背根节压迫小鼠模型的镇痛作用以及对STAT3/VEGFA/p-ERK 信号通路的影响。**方法** 建立背根神经节慢性压迫(chronic compression damage, CCD)小鼠疼痛模型, 随机分为空白组、模型组、普瑞巴林组及 ED 低、中、高剂量组。通过检测动物机械痛敏和热辐射痛敏阈值、醋酸扭体实验评价镇痛效果; ELISA 检测小鼠 L4-L5 节段脊髓组织中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和 CD18 等炎症因子含量; Western blot 和免疫荧光检测脊髓组织信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1/2, p-ERK1/2)蛋白表达。**结果** 与空白组比较, 模型组的机械痛敏、热辐射痛敏阈值显著降低( $P<0.05$ ), 脊髓背角炎症因子表达显著增高( $P<0.05$ ), 脊髓中 VEGFA、STAT3、p-ERK 的表达显著上调( $P<0.05$ )。与模型组比, ED 低、中、高剂量组 CCD 小鼠模型的机械痛敏、热辐射痛敏阈值升高( $P<0.05$ ); 脊髓背角炎症因子表达降低( $P<0.05$ ); 脊髓背角小胶质细胞 STAT3、VEGFA、p-ERK 的表达降低( $P<0.05$ ), 醋酸诱导的小鼠急性疼痛中扭体次数减少( $P<0.05$ )。**结论** ED 对背根节压迫小鼠模型有良好的镇痛作用, 其机制可能与抑制脊髓背角炎症因子表达和 STAT3/VEGFA/p-ERK 介导的脊髓小胶质细胞活化有关。

**[关键词]** 大黄素; 背根神经节慢性压迫; 神经病理性疼痛; STAT3/VEGFA/p-ERK 信号通路; 镇痛; 炎症介质

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.09.005

## Inhibition of emodin on STAT3, VEGFA, and p-ERK protein expressions in mouse model of dorsal root ganglion compression and its analgesic effect

ZENG Jinming<sup>1</sup>, FAN Chenglong<sup>1</sup>, DENG Jiao<sup>1</sup>, QU Zhanli<sup>2</sup>, LI Gang<sup>1\*</sup>

1. Department of Anesthesiology, The Second Clinical Medical College of Sichuan North Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Neurology, The Second Clinical Medical College of Sichuan North Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China

**[Abstract]** **Objective** To study the analgesic effect of emodin (ED) on dorsal root ganglion compression mouse model and its impact on STAT3/VEGFA/p-ERK signaling pathway. **Methods** A chronic compression damage (CCD) pain mice model was established and the mice were randomized into blank group, model group, pregabalin group, low-, medium-, and high-dose ED groups. The mechanical and thermal radiation pain sensitivity thresholds of the animals were measured, and the analgesic effect was evaluated using the acetic acid writhing test; the levels of inflammatory factors such as Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$

**[收稿日期]** 2024-02-07

**[基金项目]** 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC0756)。

**[通信作者]** \* 李 刚, 男, 硕士, 硕士研究生导师, 主任医师, E-mail: ligang39074@126.com。

(TNF- $\alpha$ ), and CD18 in the spinal cord of mice at L4-L5 levels were checked by ELISA; the protein expressions of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), vascular endothelial growth factor (VEGF), and phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1/2 (p-ERK1/2) in the spinal cord were determined by Western blot and immunofluorescence. **Results** Compared with the blank group, the model group showed significantly decreased mechanical and thermal radiation pain sensitivity thresholds, as well as significantly increased expression of inflammatory factors in the spinal dorsal horn ( $P<0.05$ ), and the expressions of VEGFA, STAT3, and p-ERK in spinal cord were significantly up-regulated ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, the low-, medium-, and high-dose ED groups of the CCD mouse model exhibited increased mechanical and thermal radiation pain sensitivity thresholds ( $P<0.05$ ), decreased expression of inflammatory factors in spinal dorsal horn ( $P<0.05$ ), reduced expressions of STAT3, VEGFA, and p-ERK in spinal dorsal horn microglia ( $P<0.05$ ), and a decreased number of writhing in acute pain induced by acetic acid in mice ( $P<0.05$ ). **Conclusion** ED has a good analgesic effect on dorsal root ganglion compression mouse model, and its mechanism may be related to the inhibition of inflammatory factor expression in the spinal dorsal horn and the activation of spinal microglia mediated by STAT3/VEGFA/p-ERK.

[**Keywords**] emodin; chronic compression of dorsal root ganglion; neuropathic pain; STAT3/VEGFA/p-ERK signaling pathway; analgesia; inflammatory mediator

背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)是脊髓神经根部的结构,包含感觉神经元胞体,负责传导来自身体特定区域的感觉信息至中枢神经系统<sup>[1-2]</sup>。当背根神经节由直接或间接因素受到压迫时,机械性压力可引起局部炎症反应,释放炎性介质如前列腺素,增强痛觉信号传导,引发剧烈腰疼以及下肢放射性疼痛(坐骨神经痛);持续的压迫可能导致背根神经纤维损伤、缺血或变性,进一步影响神经传导,出现感觉异常、肌肉力量减弱及反射改变等神经功能受损表现;长时间的压迫还可能诱发DRG自身及其周围组织的继发性病理变化,如水肿、纤维化甚至神经元死亡,加重症状并影响治疗效果<sup>[1-2]</sup>。DRG受压在腰椎间盘突出症中扮演着关键的角色,是疾病引发疼痛及神经症状的核心环节之一,也是临床治疗时需重点考虑解除病因以改善患者生活质量的重要目标<sup>[2]</sup>。

信号转导及转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)/血管内皮生长因子A(vascular endothelial growth factor A,VEGFA)/磷酸化的细胞外调节蛋白激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase,p-ERK)信号通路在DRG介导腰痛的过程中具有重要的作用<sup>[3-4]</sup>。当腰椎间盘突出或腰背部组织炎症等病理状态发生时,这些分子信号途径可能被激活并参与到疼痛的产生和维持中。STAT3是一种转录因子,在多种细胞应答过程中起到关键作用,包括炎症反应和细胞增殖;在神经病理性疼痛背景下,STAT3在DRG

内可能因炎症因子刺激而活化,促进与疼痛相关的基因表达,从而加剧痛觉敏感性<sup>[5-7]</sup>。VEGFA原本是参与血管生成的重要生长因子,但研究发现它也在神经损伤和炎症状态下于DRG上调表达;VEGFA可增强神经元的兴奋性,通过调节离子通道功能及促进神经纤维的新生和重塑,间接导致疼痛感觉的增强<sup>[8-10]</sup>。ERK属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族成员,其磷酸化形式p-ERK代表了该信号通路的激活状态;在神经病理性疼痛条件下,p-ERK信号通路在DRG中被激活,不仅影响神经元的生存与分化,还参与调控疼痛相关基因的转录,进而增加对疼痛刺激的感知和传递<sup>[11-13]</sup>。STAT3/VEGFA/p-ERK信号通路在DRG中协同作用,通过调控神经元功能状态、炎症反应和细胞内信号传导,介导并加剧腰痛的发生和发展<sup>[3]</sup>。大黄素(Emodin,ED)具有镇痛、抗炎作用<sup>[14-15]</sup>,但其对疼痛的治疗作用及机制尚不明确。本文旨在探究大黄素对慢性缩窄损伤(chronic constriction damage,CCD)小鼠疼痛模型的镇痛作用及可能的作用机制,为研发新的镇痛策略提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

54只SPF级ICR雄性小鼠,体质量18~22g,合格证号:SCXK(京)2021-0011。所使用实验动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SYXK(京)2019-0008),在动物实验中心进行饲

养,自由摄食、饮水,光照周期为12 h光/12 h暗,温度控制在 $(23\pm 1)$  °C,湿度为 $55\%\pm 5\%$ 。在适应性饲养2~3 d后用于实验。该实验经过川北医学院第二临床医学院伦理委员会批准,实验动物伦理审批号:2022KY1145。

### 1.2 药物与试剂

大黄素(美国Sigma-Aldrich公司,批号:2082588);普瑞巴林胶囊[齐鲁制药(海南)有限公司,批号:2022.03.26];STAT3、VEGFA、p-ERK1(沈阳万类生物有限公司,批号分别为WLP2412、WLP001a、WLP1512);小胶质细胞标志物(ionized calcium-binding adapter molecule 1,IBA-1)(英国Abcam公司,批号分别为ab201015、1832039、1816955);GAPDH(美国Cell Signaling Technology公司,批号:2118s);TNF- $\alpha$ 试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司,批号:98029ES48);IL-6(上海碧云天生物技术公司,批号:PI326);CD18试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号:E2023-0803-31063A);DAPI染色试剂(武碧云天生物科技有限公司,批号:C1006)。

### 1.3 仪器设备

37370型足底红外热刺激仪(法国BIOSEB公司);VonFrey型机械刺痛测试包(上海软隆科技发展有限公司);Varioskan LUX型多功能酶标仪[赛默飞世尔科技(上海)有限公司];CM1950型冰冻切片机[徠卡生物系统(努斯洛赫)有限公司];WSF400LED型倒置荧光显微镜(广州微域光学仪器有限公司);冷热板测痛仪(上海玉研科学仪器有限公司);光热尾痛测试仪(北京亚欧德鹏科技有限公司);ELITE系列电泳仪(苏州赛恩斯仪器有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 疼痛模型的建立与药物、试剂配制

使用“L”型不锈钢丝插入椎间孔建立CCD小鼠模型,模拟压迫神经节或神经根的经典动物模型,持续的压迫可导致疼痛、感觉缺失等神经元的异常反应<sup>[16]</sup>。动物造模后,能够保持肢体的感觉和运动功能,动物自主活动减少;造模后的动物表现出显著的对机械性和热痛敏感,动物手术后对侧的肢体亦表现出显著的对机械性和热痛敏感。CCD小鼠有上述表现或行为学异常,提示造模成功。本文构建的CCD小鼠模型参照DECOSTERD等的方法<sup>[17]</sup>,具体步骤

如下:首先小鼠使用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉。剃毛,消毒后然后沿着L4~L5脊椎左侧约0.5 cm处手术刀纵向切口,使用钝器分离器充分暴露腰4至腰5横突及乳状突等解剖结构,直至术野完全暴露左侧第4腰椎间孔。采用直径为0.6 mm不锈钢丝(长约5 mm)小心缓慢紧贴椎间孔上缘插入左侧腰4椎间孔,进针方向为钢丝向头背方向与与脊柱侧面水平线成 $10^\circ$ 且与背部正中中线成 $30^\circ$ 。观察到同侧后肢肌肉轻微颤动表示钢丝插入成功。生理盐水冲洗伤口,缝合,放回鼠笼等待其苏醒。预防伤口感染。对于空白组的动物,暴露椎间孔后即缝合术口。动物造模次日口服灌胃给予相应受试物。

药物配制:称取所需量受试物(ED和普瑞巴林)置于定容过的烧杯中,缓慢加入少量生理盐水,使受试物表面润湿后再缓慢加入生理盐水,定容至所需体积。使用生理盐水稀释0.6%醋酸溶液至所需体积。

### 2.2 动物分组与给药

将54只实验小鼠随机分为6组,即空白组、模型组、普瑞巴林组(60 mg/kg)及ED低、中、高剂量组(7.5、15、30 mg/kg)。空白组只暴露椎间孔后即缝合术口;模型组CCD小鼠模型是使用“L”型不锈钢丝插入椎间孔,具体操作见上述造模方法;普瑞巴林组在模型组基础上给予普瑞巴林(60 mg/kg)灌胃;ED低、中、高剂量组在模型组基础上给予ED低、中、高剂量(7.5、15、30 mg/kg)灌胃。第二天上午9点起开始给药,空白组和模型组动物灌胃给予等体积的生理盐水。每日1次,连续16 d。

受试物剂量设置理由:根据人与小鼠的体表面积折算等效剂量。普瑞巴林临床推荐最大日用剂量为5 mg/kg,折算成小鼠的给药剂量为60 mg/kg。根据文献报道<sup>[16]</sup>,50 mg/kg ED对结肠癌小鼠模型的肿瘤具有明显抑制作用。因此,本研究将30 mg/kg设为最大给药剂量,并以2倍为梯度,设置低剂量组与中剂量组。

### 2.3 取材

末次给药后1.5 h,使用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉。打开椎骨游离脊髓取出L4~L5脊髓节段,借助显微镜游离L4~L5脊髓背角,擦除血迹,保存样品备测,用于免疫荧光实验、ELISA和Western blot检测评价ED镇痛药效。



## 2.4 机械痛觉和热辐射痛觉阈值的检测疼痛情况

将动物放置安静的环境适应 1~2 h。使用 Von Frey 细丝(2~26) g 随机测试小鼠左后足足底的机械痛觉阈值变化,采用序贯法检测小鼠缩足反应并通过软件计算 50%缩足阈值。红外线热刺激仪依照时间顺序聚焦热源,于小鼠左后足底中央,观察热刺激缩足反应的潜伏期。每只动物每隔 5 min 重复测试,共测试 3 次。最大反应时间预设定为 20 s,基础阈值预设范围:18~22 s。

## 2.5 醋酸扭体实验检测疼痛情况

普瑞巴林组于实验前 0.5 h 灌胃给予 60 mg/kg 普瑞巴林,ED 低、中、高剂量组(7.5、15、30 mg/kg)于实验前 1 h 灌胃给予相应浓度 ED,空白组和模型组给予等体积生理盐水。动物均按照 10 mL/kg 腹腔注射 0.6%醋酸溶液,记录小鼠 20 min 内的扭体次数。

## 2.6 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CD18 的含量

严格按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测各组小鼠 L4~L5 节段脊髓组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CD18 的含量。使用 FULL-自动酶标仪检测各组样本的吸光度值,计算 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 CD18 的相对含量,进行统计学分析。

## 2.7 Western blot 检测 STAT3、VEGFA、ERK1/2 蛋白表达水平

提取各组小鼠 L4~L5 脊髓组织,考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,封闭,孵育一抗(STAT3,1:800;VEGFA,1:300;p-ERK1/2,1:500;ERK1/2,1:500;GAPDH,1:1 000)过夜,PBS 洗涤 3 次,室温孵育二抗(1:5 000),PBS 洗涤 3 次后显影、凝胶成像仪成像,最后用 Image J 软件分析结果。

## 2.8 免疫荧光法检测 STAT3、VEGF、p-ERK1/2 蛋白表达水平

取出脊髓组织进行病理切片,PBS 漂洗,封闭,与特异性一抗(STAT3、VEGF、p-ERK1/2、IBA-1),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 漂洗后,室温孵育荧光二抗 2 h。荧光显微镜下观察标志物在组织中的表达和定位。采用图像分析系统计算阳性细胞率和积分吸光度值。

## 2.9 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)评估不同处理组之间是否存在显著差异,进一步使用多重比较法(Tukey's HSD test)明确各实验组与对照组之间的统计学差异, $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 ED 对各组机械痛敏及热辐射痛敏阈值的影响

与空白组相比,模型组机械痛敏和热辐射痛敏阈值明显降低( $P<0.05$ );与模型组相比,ED 低、中、高剂量组及普瑞巴林组机械痛敏和热辐射痛敏阈值明显上升( $P<0.05$ );与 ED 高剂量组比较,低、中剂量组机械痛敏和热辐射痛敏阈值明显降低( $P<0.05$ );与 ED 中剂量组比较,低剂量组机械痛敏和热辐射痛敏阈值明显降低( $P<0.05$ ),普瑞巴林组机械痛敏和热辐射痛敏阈值明显增加( $P<0.05$ )。详见表 1。

### 3.2 ED 对各组疼痛所致小鼠疼痛扭体次数的影响

与空白组相比,模型组小鼠的扭体次数显著增加( $P<0.05$ )。与模型组相比,ED 低、中、高剂量组及普瑞巴林组扭体次数减少( $P<0.05$ );与 ED 高剂量组比较,低、中剂量组及普瑞巴林组扭体次数增加

表 1 ED 增加机械痛敏、热辐射痛敏阈值( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 1 ED increased mechanical pain sensitivity and thermal radiation pain sensitivity thresholds ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	剂量/(mg/kg)	机械痛敏		热辐射痛敏	
		基础阈值/g	最佳药效点阈值/g	基础阈值/s	最佳药效点阈值/s
空白组	—	11.28 $\pm$ 1.12	12.16 $\pm$ 0.81*	8.36 $\pm$ 0.67	8.52 $\pm$ 0.35*
模型组	—	1.42 $\pm$ 0.60	1.33 $\pm$ 0.12 <sup>##</sup>	4.58 $\pm$ 0.15	4.58 $\pm$ 0.41 <sup>##</sup>
ED 低剂量组	7.5	1.53 $\pm$ 0.21	1.94 $\pm$ 0.61* <sup>##</sup>	4.53 $\pm$ 0.29	5.35 $\pm$ 0.31* <sup>##</sup>
ED 中剂量组	15	1.41 $\pm$ 0.17	5.83 $\pm$ 1.87* <sup>##</sup>	4.65 $\pm$ 0.22	6.72 $\pm$ 0.55* <sup>##</sup>
ED 高剂量组	30	1.72 $\pm$ 0.51	10.29 $\pm$ 1.23* <sup>&amp;</sup>	4.98 $\pm$ 0.59	8.17 $\pm$ 0.45* <sup>&amp;</sup>
普瑞巴林组	5	1.58 $\pm$ 0.61	10.52 $\pm$ 1.15* <sup>&amp;</sup>	4.93 $\pm$ 0.49	8.18 $\pm$ 0.41* <sup>&amp;</sup>

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与普瑞巴林组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与 ED 高剂量组比较,<sup>S</sup> $P<0.05$ ;与 ED 中剂量组比较,<sup>&</sup> $P<0.05$ 。

( $P<0.05$ );与ED 中剂量组比较,低剂量组及普瑞巴林组扭体次数增加( $P<0.05$ );与普瑞巴林组相比,ED 高剂量组扭体次数无明显差异( $P>0.05$ )。详见图 1。

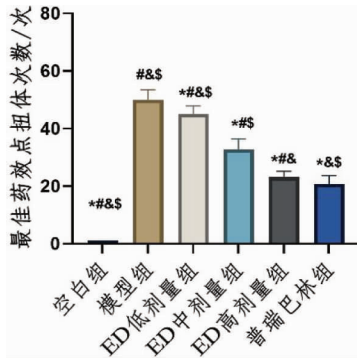


图 1 ED 抑制疼痛所致小鼠扭体次数 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Fig.1 ED inhibited the pain-induced writhing frequency in mice ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与普瑞巴林组比较,# $P<0.05$ ;与ED 高剂量组比较,\$ $P<0.05$ ;与 ED 中剂量组比较,& $P<0.05$ 。

### 3.3 ED 对各组脊髓背角炎症因子表达水平的影响

与空白组相比,模型组脊髓组织中炎症因子(TNF- $\alpha$ ,IL-6 和 CD18)水平显著增加( $P<0.05$ );与模型组相比,ED 低、中、高剂量组及普瑞巴林组小鼠病变脊髓组织中炎症因子(TNF- $\alpha$ ,IL-6 和 CD18)水平显著降低( $P<0.05$ );与普瑞巴林组相比,ED 低、中剂量组炎症因子水平明显上升( $P<0.05$ );与 ED 高剂量组比较,ED 低、中剂量组炎症因子水平明显上升( $P<0.05$ );与 ED 中剂量组比较,ED 高剂量组炎症因子水平明显降低( $P<0.05$ )。详见表 2。

### 3.4 ED 对各组脊髓背角组织 STAT3 表达水平的影响

与空白组比较,模型组小鼠脊髓背角组织中的 STAT3 表达量及 IBA-1 与 STAT3 共同标定的阳性

细胞数显著增加( $P<0.05$ )。与模型组比,ED 中、高剂量组以及普瑞巴林组 STAT3 表达量及 IBA-1 与 STAT3 共同标定的阳性细胞数显著降低( $P<0.05$ );与普瑞巴林组比,ED 低、中剂量组 STAT3 表达量及 IBA-1 与 STAT3 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ );与 ED 高剂量组比,ED 低、中剂量组 STAT3 表达量及 IBA-1 与 STAT3 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ )。详见图 2。

### 3.5 ED 对各组脊髓背角组织 VEGFA 表达水平的影响

与空白组比较,模型组小鼠脊髓背角组织中的 VEGFA 表达量及 IBA-1 与 VEGFA 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ )。与模型组比,ED 中、高剂量组以及普瑞巴林组 VEGFA 表达量及 IBA-1 与 VEGFA 共同标定的阳性细胞数显著降低( $P<0.05$ );与普瑞巴林组比,ED 低、中剂量组 VEGFA 表达量及 IBA-1 与 VEGFA 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ );与 ED 高剂量组比,ED 低、中剂量组 VEGFA 表达量及 IBA-1 与 VEGFA 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ )。详见图 3。

### 3.6 ED 对各组脊髓背角组织 p-ERK 表达水平的影响

各组间 ERK 蛋白表达水平无显著性差异( $P>0.05$ )。与空白组比较,模型组小鼠脊髓背角组织中的 p-ERK 表达量及 IBA-1 与 p-ERK 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ )。与模型组比,ED 中、高剂量组以及普瑞巴林组 p-ERK 表达量及 IBA-1 与 p-ERK 共同标定的阳性细胞数显著降低( $P<0.05$ );与普瑞巴林组比,ED 低、中剂量组 p-ERK 表达量及 IBA-1 与 p-ERK 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ );与 ED 高剂量组比,ED 低、中剂量组 p-ERK 表达量及 IBA-1 与 p-ERK 共同标定的阳性细胞数显著增加( $P<0.05$ )。详见图 4。

表 2 ED 抑制 CCD 小鼠脊髓背角炎症因子表达 ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 2 ED inhibited inflammatory factor expression in the dorsal horn of the spinal cord of CCD mice ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	IL-6/(ng·L <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(ng·L <sup>-1</sup> )	CD18/( $\mu$ g·L <sup>-1</sup> )
空白组	—	47.56 $\pm$ 20.14*	45.84 $\pm$ 18.12*	21.01 $\pm$ 2.11*
模型组	—	147.30 $\pm$ 20.20 <sup>#&amp;</sup>	235.01 $\pm$ 41.51 <sup>#&amp;</sup>	46.12 $\pm$ 10.02 <sup>#&amp;</sup>
ED 低剂量组	7.5	129.14 $\pm$ 3.16* <sup>#&amp;</sup>	170.81 $\pm$ 50.21* <sup>#&amp;</sup>	45.66 $\pm$ 9.01* <sup>#&amp;</sup>
ED 中剂量组	15	119.72 $\pm$ 14.50* <sup>#</sup>	131.15 $\pm$ 20.24* <sup>#</sup>	32.01 $\pm$ 4.16* <sup>#</sup>
ED 高剂量组	30	95.36 $\pm$ 14.02* <sup>#</sup>	94.18 $\pm$ 31.01* <sup>#</sup>	26.11 $\pm$ 4.15* <sup>#</sup>
普瑞巴林组	60	80.10 $\pm$ 15.41* <sup>#</sup>	101.29 $\pm$ 41.08* <sup>#</sup>	25.05 $\pm$ 4.11* <sup>#</sup>

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ;与普瑞巴林组比较,# $P<0.05$ ;与 ED 高剂量组比较,\$ $P<0.05$ ;与 ED 中剂量组比较,& $P<0.05$ 。

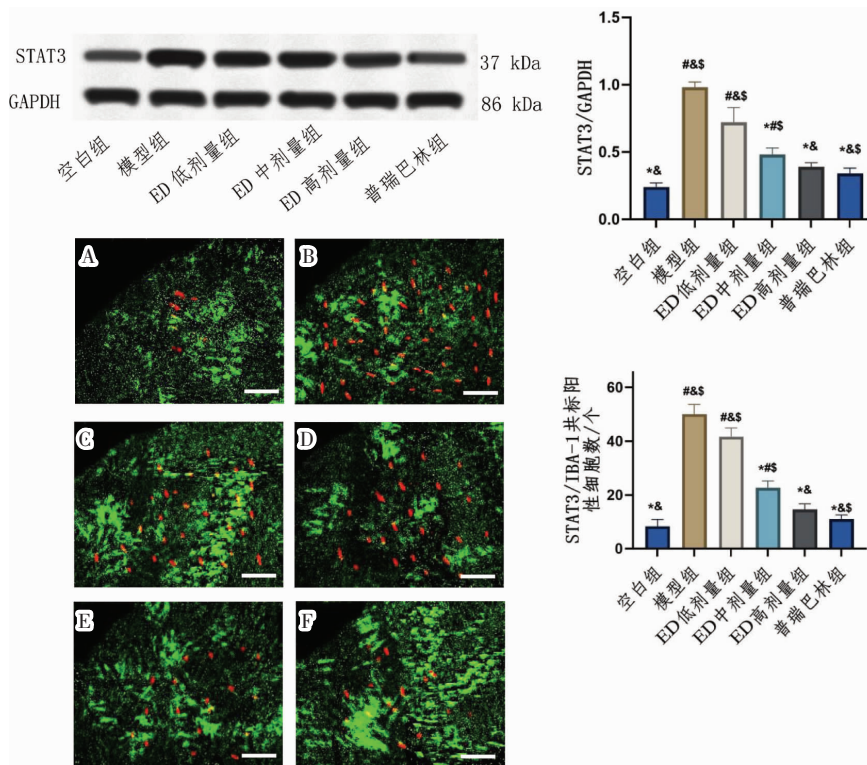


图 2 ED 抑制脊髓背角组织中 STAT3 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**Fig.2** ED inhibited the expression of STAT3 protein in spinal dorsal horn ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:A、B、C、D、E、F 分别表示空白组、模型组、ED 低剂量组、ED 中剂量组、ED 高剂量组、普瑞巴林组。IBA-1(绿色)/STAT3(红色)共标阳性细胞数量(免疫荧光,  $\times 400$ )。与模型组比较,  $*P < 0.05$ ; 与普瑞巴林组比较,  $\#P < 0.05$ ; 与 ED 高剂量组比较,  $\$P < 0.05$ ; 与 ED 中剂量组比较,  $\&P < 0.05$ 。

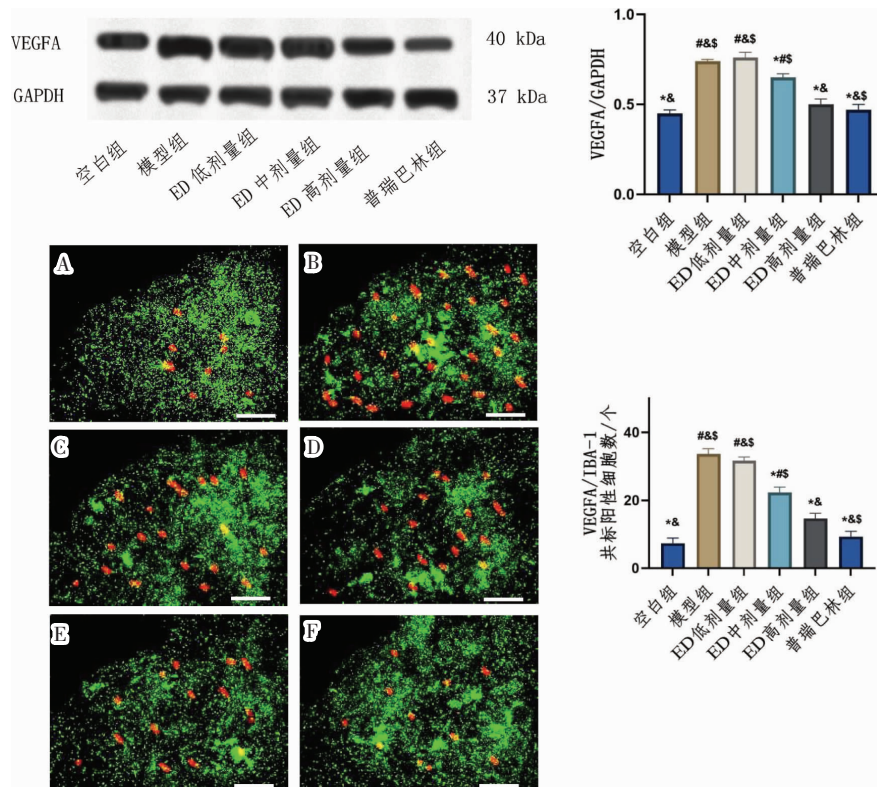


图 3 ED 抑制脊髓背角组织中 VEGFA 蛋白表达(免疫荧光,  $\times 400$ ;  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**Fig.3** ED inhibited protein expression of VEGFA in spinal dorsal horn (Immunofluorescence,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:A、B、C、D、E、F 分别表示空白组、模型组、ED 低剂量组、ED 中剂量组、ED 高剂量组、普瑞巴林组。免疫荧光阳性细胞数量为 IBA-1(绿色)/VEGFA(红色)共标。与模型组比较,  $*P < 0.05$ ; 与普瑞巴林组比较,  $\#P < 0.05$ ; 与 ED 高剂量组比较,  $\$P < 0.05$ ; 与 ED 中剂量组比较,  $\&P < 0.05$ 。



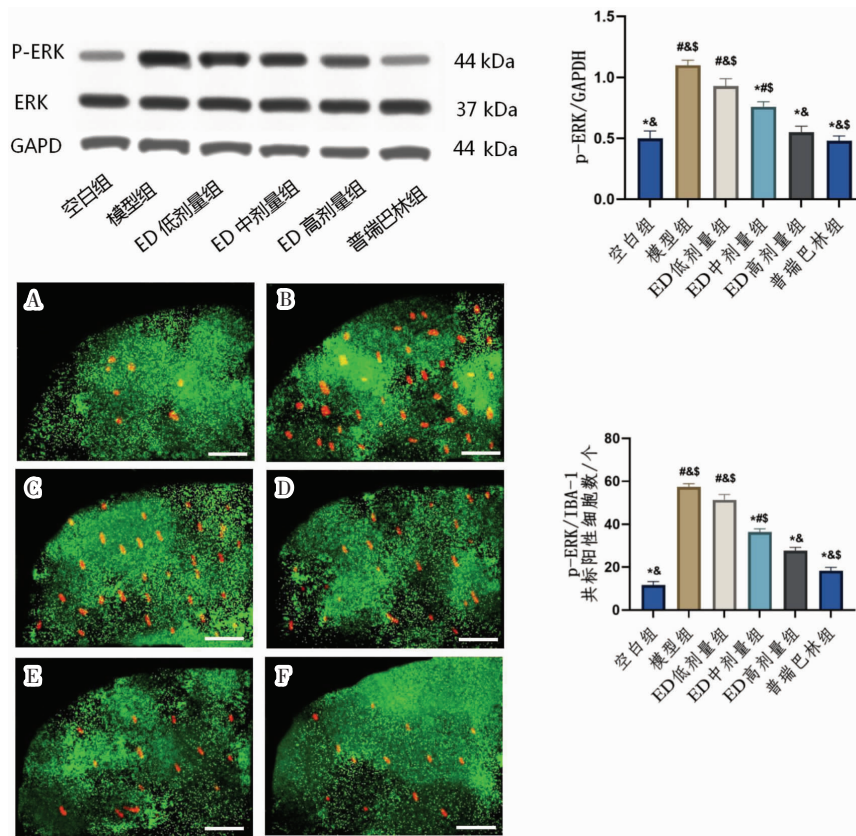


图4 ED抑制脊髓背角组织中p-ERK蛋白表达(免疫荧光,  $\times 400$ ;  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**Fig.4** ED inhibited protein expression of p-ERK in spinal dorsal horn (Immunofluorescence,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

注: A、B、C、D、E、F 分别表示空白组、模型组、ED 低剂量组、ED 中剂量组、ED 高剂量组、普瑞巴林组。免疫荧光阳性细胞数量为 IBA-1(绿色)/p-ERK(红色)共标。与模型组比较, \* $P < 0.05$ ; 与普瑞巴林组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 ED 高剂量组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 ED 中剂量组比较, \* $P < 0.05$ 。

## 4 讨论

慢性神经性疼痛,常由 DRG 压迫引发,是临床上最常见且治疗难度较高的症状之一。尽管科学家和临床医生已经探索了众多治疗靶点和方法,但临床治疗效果仍有限。据研究报道,约 11.9%的人口遭受着难以控制的神经性疼痛<sup>[18]</sup>。这种慢性疼痛不仅严重影响患者的生活质量,还导致了医疗保健成本的增加和生产力的损失<sup>[19]</sup>。在保守治疗失败后,药物治疗成为选择,但往往受限,尤其是阿片类药物的使用,其成瘾性成为一个严重问题<sup>[20]</sup>。CCD 小鼠模型是研究慢性疼痛的重要动物模型,可以模拟人类慢性疼痛的病理生理过程<sup>[3]</sup>。CCD 模型不仅有助于揭示疼痛信号在神经系统中的传递、处理和调控机制,还可以探究神经可塑性、神经炎症和神经再生等与慢性疼痛密切相关的领域<sup>[4]</sup>。此外,CCD 模型在药物研发领域具有极高的应用价值,它可以用来评估不同

药物对慢性疼痛的治疗效果,探讨药物的作用机制,并研究药物的毒副作用、耐受性及联合用药等问题。CCD 模型还能用于研究慢性疼痛对动物行为的影响,通过观察小鼠在慢性疼痛状态下的行为变化,可以更好地理解慢性疼痛对患者情绪、认知功能和社交行为的影响,从而为患者提供有效的心理干预。通过对 CCD 小鼠模型进行基因编辑,可以揭示特定基因在疼痛感知和传递中的作用,为慢性疼痛的遗传基础研究和基因治疗提供理论基础<sup>[4]</sup>。总之,CCD 小鼠疼痛模型在慢性疼痛研究领域具有广泛的应用价值,通过对该模型的研究可以深入了解慢性疼痛的神经生物学机制,为药物研发提供实验依据,并为临床治疗提供新的思路。

ED 作为一种天然的苯醌类化合物,存在于多种中草药中,为中药大黄和虎杖的主要成分。研究表明<sup>[14-15]</sup>,ED 表现出多方面的药理活性,ED 可能通过影响神经递质释放或其他疼痛信号传导途径发挥一

定的镇痛效果;在神经病理性疼痛的研究中,ED可通过调节 VEGF/ERK 信号通路影响痛觉传递,这表明它可能对疼痛有一定的调控作用。此外,ED对多种炎症反应有抑制作用,能够通过调节相关炎症因子的表达来减轻炎症及疼痛症状<sup>[21-22]</sup>。

在探讨 ED 的镇痛作用中,STAT3、VEGFA 和 p-ERK 三个蛋白在信号传导通路中的相互作用至关重要,它们参与调控神经生长、炎症反应以及组织修复过程,与疼痛的发生和发展密切相关<sup>[3-4]</sup>。STAT3 作为上游的转录因子,在多种病理条件下被激活,其激活可以促进包括 VEGFA 在内的多种基因的表达,促进伤害感受神经元的功能改变,从而加剧疼痛感<sup>[5-6]</sup>。VEGFA 的上调不仅促进血管生成,还可能通过其受体作用于神经元,增强神经兴奋性,从而在神经病理性疼痛中起到作用<sup>[8-10]</sup>。而 p-ERK 作为 MAPK 信号通路的关键成员,其激活状态影响着细胞的多种生物学功能,包括痛觉信号的传导;同时,ERK 也与 VEGFA 和 STAT3 信号传导互作,共同介导炎症反应和疼痛感知的持续和放大<sup>[3,11-13]</sup>。STAT3 的激活可以导致 VEGFA 的表达增加,VEGFA 通过其受体影响神经元功能,可能进一步激活或增强 p-ERK 的信号传导。p-ERK 的激活又可以反馈调节 STAT3 的活性,形成一个复杂的调控网络<sup>[3,11-13]</sup>。在这个网络中,ED 可能通过抑制 STAT3 的磷酸化和活化,减少 VEGFA 的表达,进而阻断 p-ERK 的激活,从而在多个层面上减轻疼痛信号的传导和放大,实现其镇痛效果。因此,深入研究这 3 个蛋白之间的相互作用及其在疼痛信号通路中的具体作用机制,对于阐明 ED 的镇痛作用具有重要意义。

本研究结果表明,ED 对 CCD 小鼠模型的机械痛敏、热辐射痛敏在最佳药效点阈值较模型组显著降低;通过小鼠醋酸扭体实验也进一步证实 ED 对 CCD 小鼠的镇痛作用,且与普瑞巴林(阳性对照药物)的效果相当,证实了 ED 作为一种潜在的镇痛剂的可行性。CD18 是黏附分子成员  $\beta 2$  整合素中的一种,主要分布于单核-巨噬细胞、自然杀伤细胞等,在白细胞与血管内皮细胞黏附中起重要作用,参与炎症的发生<sup>[23]</sup>。IL-6 和 TNF- $\alpha$  是参与炎症反应的炎性介质,在疼痛的发生、发展过程中起到重要作用<sup>[24]</sup>。

本研究表明,ED 可降低 CCD 小鼠模型中脊髓背角组织 IL-6、TNF- $\alpha$  和 CD18 的含量,提示 ED 发挥镇痛作用可能与抑制细胞释放炎症因子有关。CCD 小鼠疼痛模型诱导疼痛的产生与主要诱导脊髓小胶质细胞活化、STAT3 激活、炎症因子表达等相关<sup>[3-4]</sup>。脊髓小胶质细胞在神经炎症诱导的疼痛发生中起关键作用,本研究通过标记 IBA-1 对脊髓小胶质细胞进行了研究。在分子层面,我们观察到 CCD 模型中 STAT3、VEGFA 和 p-ERK 的表达水平显著上调,这与文献<sup>[3,4]</sup>中关于这些分子在神经病理性疼痛中的作用相一致。本研究证实 ED 可抑制 STAT3、VEGFA、p-ERK 在小胶质细胞中的表达、同时抑制脊髓炎症因子水平,提示 ED 抑制神经炎症诱导的疼痛可能与小胶质细胞 STAT3、VEGFA、p-ERK 等信号调控有关。

综上,本研究表明,ED 具有良好的镇痛作用,可降低 CCD 小鼠模型中脊髓背角组织中与疼痛发生、发展相关的炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和 CD18 表达,其镇痛机制与抑制 STAT3、VEGFA、p-ERK 介导的脊髓小胶质细胞活化相关。

## 参考文献

- [1] 张显琦, 陈荣贵, 孔微微, 等. 颈背根节神经元异位自发放电增强诱致大鼠慢性颈椎根性痛的作用机制研究[J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(3): 357-362.
- [2] 陈建平, 韩冲芳, 张宇, 等. 慢性背根神经节压迫诱导神经病理性痛大鼠脊髓背角 NMDA 受体磷酸化的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 2014, 34(5): 566-569.
- [3] 侯吴琼, 宗瑛, 周方婷, 等. 恒古骨伤愈合剂对背根节压迫模型小鼠的镇痛作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(24): 30-41.
- [4] 周方婷, 宗瑛, 侯吴琼, 等. 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小鼠慢性疼痛的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(23): 6457-6474.
- [5] DAI X Y, LIU L, SONG F H, et al. Targeting the JAK2/STAT3 signaling pathway for chronic pain[J]. Aging and Disease, 2024, 15(1): 186-200.
- [6] LEE J Y, PARK C S, SEO K J, et al. IL-6/JAK2/STAT3 axis mediates neuropathic pain by regulating astrocyte and microglia activation after spinal cord injury[J]. Experimental Neurology, 2023, 370: 114576.



- [7] 胡 焱, 冯 丹, 田佳玉, 等. 天麻素对坐骨神经痛模型小鼠 TNF- $\alpha$ /STAT3 通路及痛觉敏感性的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(18): 2209-2215.
- [8] FRANTSIYANTS E M, KAPLIEVA I V, SURIKOVA E I, et al. Influence of chronic neuropathic pain on VEGFA in tumors of mice with genetically determined inhibition of tumor growth[J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2020, 38(15-suppl): e22103.
- [9] XU T, WANG J, WU Y, et al. Ac4C enhances the translation efficiency of vegfa mRNA and mediates central sensitization in spinal dorsal horn in neuropathic pain[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(35): e2303113.
- [10] ZHE P, FAN Y, SITING H, et al. Targeting VEGFA with Soluble VEGFR1 ameliorates nerve injury-induced neuropathic pain[J]. *Molecular pain*, 2022, 18(3): 1-23.
- [11] SHAO J P, YU W L, WEI W, et al. MAPK-ERK-CREB signaling pathway upregulates Nav1.6 in oxaliplatin-induced neuropathic pain in the rat[J]. *Toxicology Letters*, 2023, 384: 149-160.
- [12] HAN M L, ZHANG F, WANG Y, et al. Spinal CBX2 contributes to neuropathic pain by activating ERK signaling pathway in male mice[J]. *Neuroscience Letters*, 2023, 812: 137363.
- [13] 刘亚涛, 刘 伟, 王晓庆, 等. 右美托咪定通过影响脊髓 ERK1 和 CREB 磷酸化改善小鼠肠易激综合征内脏痛[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(8): 801-809.
- [14] YANG H Y, WU J, LU H, et al. Emodin suppresses oxaliplatin-induced neuropathic pain by inhibiting COX2/NF- $\kappa$ B mediated spinal inflammation[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2023, 37(1): e23229.
- [15] 谢 蓉, 张民权, 李 莹, 等. 大黄素药理作用及新剂型研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(12): 120-125.
- [16] MA C, LAMOTTE R H. Enhanced excitability of dissociated primary sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion in the rat[J]. *Pain*, 2005, 113(1/2): 106-112.
- [17] DECOSTERD I, WOOLF C J. Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain[J]. *Pain*, 2000, 87(2): 149-158.
- [18] LIEM L, VAN DONGEN E, HUYGEN F J, et al. The dorsal root ganglion as a therapeutic target for chronic pain[J]. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 2016, 41(4): 511-519.
- [19] PATEL V B, WASSERMAN R, IMANI F. Interventional therapies for chronic low back pain: A focused review (efficacy and outcomes)[J]. *Anesthesiology and Pain Medicine*, 2015, 5(4): e29716.
- [20] 林相宏, 江 仁, 黄长顺, 等. 非药物疗法在慢性疼痛干预中的应用和治疗机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(10): 2406-2419.
- [21] 陈 晨, 郑润泉, 张贵春. 大黄素对骨关节炎软骨细胞增殖、凋亡和氧化应激的影响[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(28): 4528-4534.
- [22] XIONG W J, LI Y, ZHANG L, et al. Emodin alleviates lupus nephritis in rats by regulating M1/M2 macrophage polarization[J]. *Journal of Chemistry*, 2023, 2023: 5224921.
- [23] NOWATZKY J, MANCHES O, KHAN S A, et al. Modulation of human Th17 cell responses through complement receptor 3 (CD11 b/CD18) ligation on monocyte-derived dendritic cells[J]. *Journal of Autoimmunity*, 2018, 92: 57-66.
- [24] 贾延劼, 李燕飞, 陈雪梅. 脊髓损伤后神经病理性疼痛的研究现状[J]. 内科理论与实践, 2017, 12(2): 92-96.

(本文编辑 苏 维)