

- 版), 2017, 36(6): 897-900.
- [17] 卢晨欣, 孙警辉, 伍春莲. 白藜芦醇与紫杉醇联合用药对人喉癌 Hep-2 细胞凋亡机制的研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 476-83.
- [18] 胡赤丁. 消癌平治疗晚期恶性肿瘤 33 例 [J]. 医药导报, 2001, 20(10): 623.
- [19] FAN W, SUN L, ZHOU J Q, et al. Marsdenia tenacissima extract induces G₀/G₁ cell cycle arrest in human esophageal carcinoma cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway [J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(6): 428-437.
- [20] 刘丽雅, 韩永龙, 余奇, 等. 消癌平注射液等 4 种抗肿瘤中药注射剂对人肝微粒体中 CYP450 酶 7 种亚型的体外抑制作用研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(5): 522-527.

丹参酮 II A 对神经病理性疼痛大鼠的影响*

沈亦萱¹, 马玉清¹, 马越², 张红¹, 霍斌¹, 王晓庆¹

(1. 兰州大学第一医院麻醉科, 兰州 730000; 2. 兰州大学第一临床医学院 2015 级临床医学 1 班, 兰州 730000)

摘要 目的 观察丹参酮 II A (Tan II A) 对神经病理性疼痛模型 (SNL) 大鼠脊髓组织高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1)、Toll 样受体 4 (TLR4) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 10 (IL-10) 表达的影响, 探讨 Tan II A 对神经病理性疼痛的作用及其机制。方法 成年雄性 SD 大鼠 54 只, 随机分为 3 组: 假手术组、模型对照组和 Tan II A 组 (术后腹腔注射 Tan II A 30 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹), 分别于术前 1 d, 术后第 3, 7, 14 天测试机械痛阈和热痛阈后, 取 L₄~L₆ 脊髓, 置于液氮中迅速冷冻。实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测脊髓 HMGB1、TLR4 mRNA 和蛋白的表达, 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测脊髓 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 蛋白的表达情况。结果 与假手术组比较, 模型对照组、Tan II A 组在术后第 3, 7, 14 天机械痛阈和热痛阈降低, 脊髓 HMGB1、TLR4 mRNA 和蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较, Tan II A 组在术后第 3, 7, 14 天机械痛阈和热痛阈升高, 脊髓 HMGB1、TLR4 mRNA 和蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型对照组、Tan II A 组在术后第 3, 7, 14 天脊髓 TNF- α 、IL-1 β 表达上调 ($P < 0.05$), 而 IL-10 表达下调 ($P < 0.05$)。与模型对照组比较, Tan II A 组在术后第 3, 7, 14 天脊髓 TNF- α 、IL-1 β 表达下调 ($P < 0.05$), IL-10 表达上调, 行为学指标改善 ($P < 0.05$)。结论 丹参酮 II A 能减轻大鼠神经病理性疼痛, 可能机制是在分子水平抑制 HMGB1-TLR4 信号通路及其下游的细胞因子, HMGB1-TLR4 信号通路可能与神经病理性疼痛有关, 是治疗神经病理性疼痛的靶点。

关键词 丹参酮 II A; 疼痛, 神经病理性; 高迁移率族蛋白 B1; Toll 样受体 4; 细胞因子

中图分类号 R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2019)06-0700-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.06.003

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID)



Effect of Tanshinone II A on Neuropathic Pain Model of Rats

SHEN Yixuan¹, MA Yuqing¹, MA Yue², ZHANG Hong¹, HUO Bin¹, WANG Xiaoqing¹ (1. Department of Anesthesiology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Class One Grade 2015 Clinical Medicine, the First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT Objective Detect the expression level of HMGB1, TLR4, TNF- α , IL-1 β and IL-10 in spinal cord tissue of neuropathic pain model rat after tanshinone II A treated to explore its effect on neuropathic pain and the mechanisms. **Methods**

A total of 54 males Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham-operated group, model control group, and Tan II A group. Tan II A was administered intraperitoneally to rats in Tan II A group at a dose of 30 mg \cdot kg⁻¹ daily for 14 days after surgery. The pain threshold was measured 1 day before SNL (baseline) and 3, 7, and 14 days after surgery. The expressions of HMGB1, TLR4 mRNA and protein in lumbar spinal cord 4-6 (L₄-L₆) were assessed by RT-PCR and Western blotting, respectively. The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the spinal cord were detected by ELISA. **Results** The paw withdrawal threshold (PWT) and paw withdrawal latency (PWL) were significantly decreased after SNL ($P < 0.05$). The expressions of TLR4, HMGB1 mRNA and protein were significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of TNF- α , IL-1 β were significantly increased after SNL compared with those in the sham-operated group ($P < 0.05$). After Tan II A treatment, HMGB1 and TLR4 mRNA and protein levels were reduced significantly ($P < 0.05$). TNF- α and IL-1 β were downregulated, but IL-10 was upregulated in the spinal cords of SNL-induced rats ($P < 0.05$), which was accompanied by improvement of pain behaviours in the Tan II A group ($P < 0.05$). **Conclusion** These results indicate Tanshinone II A inhibited SNL-induced neuropathic pain via multiple effects, the possible mechanism is that HMGB1-TLR4 signal transduction pathway and its downstream cytokines are

inhibited at the molecular level. It also suggesting that HMGB1-TLR4 signal transduction pathway may be related to neuropathic pain and is a target for the treatment of neuropathic pain.

KEY WORDS Tanshinone II A; Neuropathic pain; High mobility group box 1 protein; Toll-like receptor 4; Proinflammatory cytokines

神经病理性疼痛是神经系统损伤和神经元敏感性改变所致的难治性疼痛,周围神经和中枢神经元敏感化是诱发异常疼痛的原因,阿片类药物治疗效果不佳。新的靶分子导向的止痛剂备受期待。神经损伤后不可避免地激发神经元炎症反应。神经元炎症反应介导神经组织的修复和再生,参与慢性疼痛的发生。研究表明,高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 是一族含量丰富的非组蛋白核蛋白,氨基酸序列高度保守,可促发神经元炎症反应。通过靶向抑制 HMGB1 表达可减轻神经性疼痛,阻断 HMGB1 通路可能是治疗神经性疼痛的有效途径^[1]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是与免疫或炎症疾病密切相关的模式识别受体,与相应受体结合后激活 NF- κ B (nuclear transcription factor) 信号通路,释放细胞因子,引起炎症级联反应。丹参酮 (tanshinone) 是中药丹参根的脂溶性成分,含有邻醌或对醌结构。丹参酮 II A (tanshinone II A, Tan II A) 是丹参酮中含量最高、活性最稳定的成分,有明确的分子结构,有一定的抗炎和抗氧化作用。Tan II A 可通过抑制环氧化酶-2 (COX2) 的过表达和胶质细胞活化,抑制神经元炎症反应⁽²⁾。笔者在本研究将建立脊神经选择性结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 疼痛模型,在细胞和分子水平探讨 HMGB1-TLR4 信号通路在神经病理性疼痛的作用机制及 Tan II A 对疼痛模型大鼠的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年雄性无特定病原体 (SPF) 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,甘肃中医学院动物实验中心提供,实验动物生产许可证号: SCXK (甘) 2011-0001,实验动物使用许可证号: SYXK (甘) 2011-0001,体质量 200~240 g,动物脊髓取腰 (lumbar, L) 4~6

(L₄~L₆) 节段。

1.2 主要试剂 兔抗大鼠 HMGB1 多克隆抗体 (ab 11354)、TLR4 多克隆抗体 (ab 22408) 和辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,试剂盒购自 Abcam 公司;大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和白细胞介素 10 (IL-10) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司;丹参酮 II A 磺酸钠注射液 (STS, 上海第一生化药业有限公司,批号: 130408),其辅料为葡萄糖和注射用水;10% 水合氯醛溶液 (兰州大学第一医院药剂科)。

1.3 主要仪器 荧光定量 PCR 检测系统 (CF \times 96 Touch TM, Bio-Rad 公司);湿转印槽 (Bio-Rad 公司);图像分析系统 (ChemiDocTM MP Imaging System, Bio-Rad 公司);微显紫外分光光度计 (BioMateTM 3S Spectrophotometer, 美国 Thermo scientific 公司);BIO-RAD 伯乐酶标仪 (美国 Thermo scientific 公司);Von Frey 纤维 (美国 stoeling 公司);PL-200 热刺痛仪 (成都泰盟科技有限公司)。

1.4 脊神经结扎疼痛模型 (SNL) 的建立 参照文献 [3] 的方法制备 SNL 疼痛模型。腹腔注射 10% 水合氯醛 300 mg \cdot kg⁻¹ 麻醉大鼠,大鼠髂棘连线为 L₅~L₆ 间隙,在 L₄ 至 L₁ (S₁) 脊柱中线偏左 0.5 cm 处作长 1.5 cm 的纵行切口,钝性分离左侧椎旁肌肉,暴露 L₆ 横突和骶骨夹角,去除部分 L₆ 横突,钝性分离 L₅、L₆ 脊神经,用 6~0 号医用丝线紧紧结扎 L₅ 脊神经,并在线结远端 5 mm 处剪断 L₅ 脊神经^[4]。假手术组大鼠操作与手术大鼠相同,只暴露 L₅ 脊神经而不结扎。

1.5 动物分组与处理 成年雄性 SD 大鼠,采用随机数字表法分为 3 组:假手术组、模型对照组和 Tan II A 组,每组根据处死时间分为 3 小组:第 3 天组、第 7 天组和第 14 天组 ($n=6$)。SNL 术毕即刻, Tan II A 组腹腔注射 STS 30 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹,连续 14 d,而假手术组和模型对照组腹腔注射等体积注射用水。

1.6 痛阈测定 参照文献 [5] 方法,以 Von Frey 纤维丝测定大鼠 50% 缩足反应阈值 (paw withdrawal threshold, PWT),采用 PL-200 热辐射仪测定大鼠的热刺激缩爪潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL)。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测大鼠腰段脊髓 HMGB 和 TLR4 mRNA 的表达 登录 Genebank,根据大鼠 HMGB1 和 TLR4 全长基因序列,

收稿日期 2018-02-20 修回日期 2018-06-10

基金项目 * 甘肃省自然科学基金资助项目 (1606RJZA125)

作者简介 沈亦萱 (1973-),女,江苏苏州人,主治医师,学士,研究方向:疼痛机制研究。ORCID: 0000-0003-3866-9175。电话: 0931-8356662, E-mail: 474618721@qq.com。

通信作者 马玉清 (1969-),女,甘肃兰州人,主任医师,博士,研究方向:慢性疼痛机制研究。电话: 0931-8356662, E-mail: myq2392466@163.com。

应用 Perkin- Elmer Applied Biosystems 提供的 Primer Express soft ware 设计引物,由上海生物工程有限公司合成,目的基因引物、序列和长度见表 1。

表 1 目的基因引物、序列和长度

Tab.1 Primer, sequence and length of target gene

目的基因	扩增长度/bp	引物	序列
HMGB1	218	上游引物	5'AGC AAT CTG AAC GTC TGT CC 3'
		下游引物	5'GTT CTT GTG ATA GCC TTC GC 3'
TLR4	356	上游引物	5'GCC GGA AAG TTA TTG TGG TGG T 3'
		下游引物	5'ATG GGT TTT AGG CGC AGA GTT T 3'
β -actin	372	上游引物	5'GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA 3'
		下游引物	5'GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG 3'

大鼠腰段脊髓组织 (≤ 30 mg),按 Total RNA Kit 说明书提取总 RNA,测定总 RNA 的浓度和纯度,鉴定 RNA 完整性。以提取的总 RNA 为模板,按照逆转录试剂盒 (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit) 说明书进行逆转录反应,合成 cDNA 第一链, -20°C 保存。以制备的 cDNA 为模板,分别扩增 β -actin、HMGB1 和 TLR4。cDNA 样品稀释 10 倍,分别进行实时荧光定量 PCR 扩增,荧光染料法 (SYBR Green) 实时监测 PCR 产物量,得出荧光曲线,通过 cDNA 浓度梯度的对数值对 CT 值作图比较两基因扩增效率。反应体系为: 95°C 预变性 15 s, 95°C 变性 3 min, 55°C 退火 1 min, 44 个循环。采用罗氏公司的 Fast Start Universal SYBR Green Master 试剂盒,在 CF \times 96 TouchTM 荧光定量 PCR 仪上进行目的基因 (HMGB1 和 TLR4) 和内参基因 (β -actin) 扩增,取 Ct 平均值,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法处理数据^[6]。

1.8 Western blotting 检测大鼠腰段脊髓 HMGB 和 TLR4 蛋白质的表达 采用 BCA 法蛋白质定量,在 50 μg 蛋白质/泳道中加入等体积 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸使蛋白质变性,电泳分离蛋白质;300 mA, 1 h 用半干转膜仪将蛋白质转移至聚偏氟乙烯 (Polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h, 4°C 封闭过夜;次日,加入稀释的一抗 (anti-HMGB1 mouse IgG, anti-TLR4 mouse IgG, anti- β -actin mouse IgG), 4°C 孵育 2 h; TBST 洗膜 10 min \times 3 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 4°C 孵育 4~8 h; TBST 洗膜 10 min \times 3 次。用 Western blotting 荧光检测试剂显色液,显色 1~15 min,显影后终止反应,用凝胶图像成像系统分析。

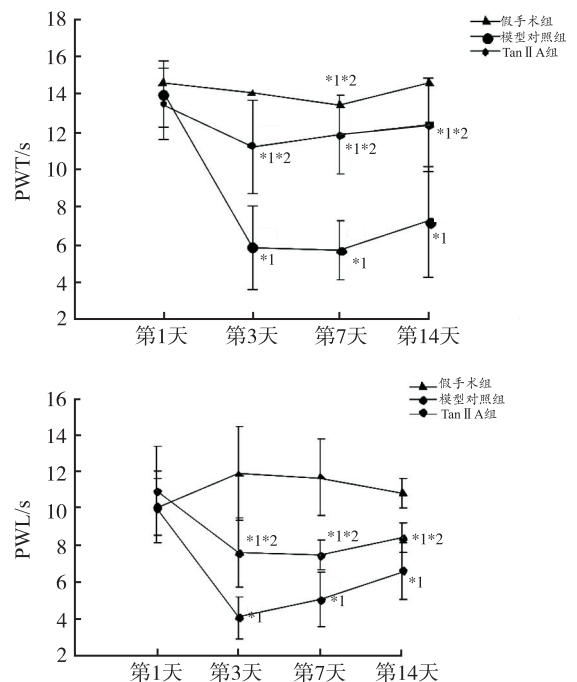
1.9 ELISA 检测大鼠腰段脊髓 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10

蛋白的表达 脊髓组织称定质量后置于匀浆缓冲液中匀浆, 4°C , 2000 $\times g$ 离心 30 min, 取上清液待用。在波长 450 nm 处测定标本吸光度 (A_{450} 值), 通过标准品 A 值绘出标准曲线, 按曲线方程式计算各样本浓度, 利用曲线方程式算出 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 的蛋白含量, 每组样品点 3 孔。

1.10 统计学方法 采用 SPSS 13.0 版统计学软件进行数据处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 数据采用非参数 Kruskal-Wallis 和 Mann-Whitney 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tan II A 对 SNL 大鼠痛敏的影响 SNL 手术增加大鼠后足对机械性刺激和热刺激的敏感性, 与假手术组比较, 模型对照组、Tan II A 组 PWT 和 PWL 均降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。模型对照组术后第 3 天时大鼠 PWT 和 PWL 均较术前明显降低 ($P<0.01$)。与模型对照组比较, Tan II A 组大鼠术后第 3 天时 PWT 和 PWL 升高 ($P<0.01$)。见图 1。



与假手术组比较, $^{*1}P<0.01$; 与模型对照组比较, $^{*2}P<0.01$

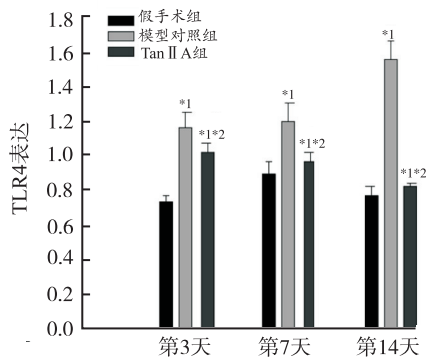
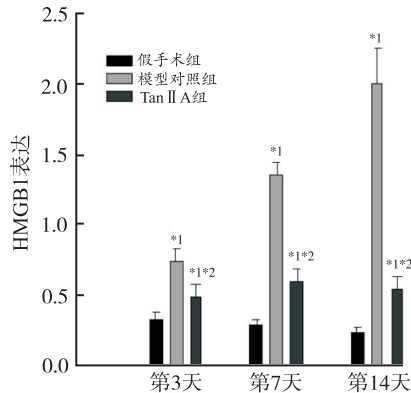
图 1 3 组大鼠不同时间 PWT 和 PWL 变化 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Compared with sham-operated group, $^{*1}P<0.01$; Compared with model control group, $^{*2}P<0.01$

Fig.1 Changes of PWT and PWL in three groups of rats on different time ($\bar{x}\pm s, n=6$)

2.2 Tan II A 对 SNL 大鼠腰段脊髓 HMGB1 和 TLR4

mRNA 表达的影响 Real-time PCR 检测大鼠脊髓 HMGB1 和 TLR4 mRNA 表达水平结果见图 2。与假手术组比较,模型对照组大鼠在第 3,7 和 14 天脊髓 HMGB1 和 TLR4 mRNA 表达水平显著升高,均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与模型对照组比较,Tan II A 组大鼠脊髓 HMGB1 和 TLR4 mRNA 表达水平显著降低,均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。



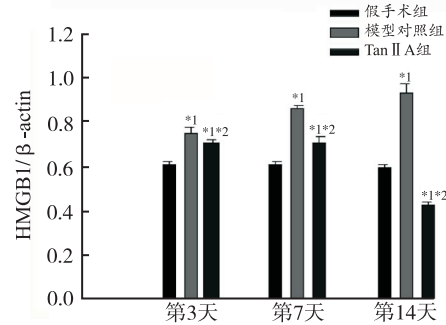
与假手术组比较, $*1 P < 0.05$; 与模型对照组比较, $*2 P < 0.05$

图2 3组大鼠 SNL 术后不同时间点 HMGB1 和 TLR4 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Compared with sham-operated group, $*1 P < 0.05$; Compared with model control group, $*2 P < 0.05$

Fig.2 The mRNA level of HMGB1 and TLR4 in three groups of rats on different time after SNL operation($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.3 Tan II A 对 SNL 大鼠腰段脊髓 HMGB1 和 TLR4 蛋白表达的影响 Western blotting 检测大鼠脊髓 HMGB1 和 TLR4 蛋白表达水平结果见图 3,4。与假手术组比较,模型对照组大鼠在第 3,7 和 14 天脊髓 HMGB1 和 TLR4 蛋白表达水平显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,Tan II A 组大鼠脊髓 HMGB1 和 TLR4 蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果提示,模型大鼠痛阈变化可能与 HMGB1、TLR4 高表达有关。



与假手术组比较, $*1 P < 0.05$; 与模型对照组比较, $*2 P < 0.05$

图3 3组大鼠 SNL 术后不同时间点 HMGB1 蛋白的表达变化

Compared with sham-operated group, $*1 P < 0.05$; Compared with model control group, $*2 P < 0.05$

Fig.3 HMGB1 expression in three groups of rats on different time points after SNL operation($\bar{x} \pm s, n=6$)

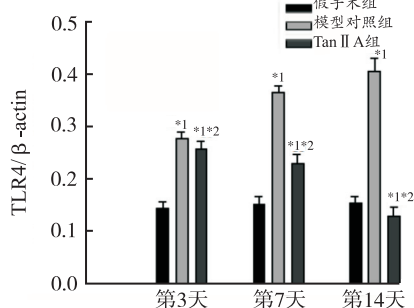
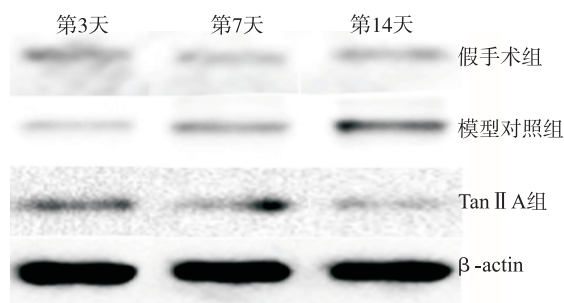
2.4 Tan II A 对 SNL 大鼠脊髓 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 蛋白表达的影响 ELISA 法检测结果见图 5。与假手术组比较,模型对照组、Tan II A 组大鼠第 3,7 和 14 天脊髓 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平增加($P < 0.05$);与模型对照组比较,Tan II A 组大鼠第 3,7 和 14 天脊髓 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平降低($P < 0.05$),而 IL-10 的表达水平显著增加,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究采用改良的 L₅ SNL 模型,参照文献方法制备脊神经选择性结扎切断模型,行为学测试结果显示,SNL 术后大鼠后足对机械性和热刺激的敏感性增加,术后第 3,7 和 14 天大鼠 PWT 和 PWL 明显降低,表明模型成功。Tan II A 腹腔注射后大鼠后足机械性和热刺激的敏感性降低,术后第 3,7 和 14 天大鼠 PWT 和 PWL 明显升高,镇痛作用明显。

笔者在预实验采用 30 和 50 mg \cdot kg⁻¹ 的 STS 腹腔注射用药,效果无明显区别,但 50 mg \cdot kg⁻¹ 时大鼠出现明显的副作用。因此,根据药量药效学最佳比例,选择实验剂量 30 mg \cdot kg⁻¹。Tan II A 不易吸收,以水溶性 STS 替代以提高生物利用度。

脊髓是调节痛觉信号传导的重要中枢,脊髓水平



与假手术组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^{*2} $P < 0.05$

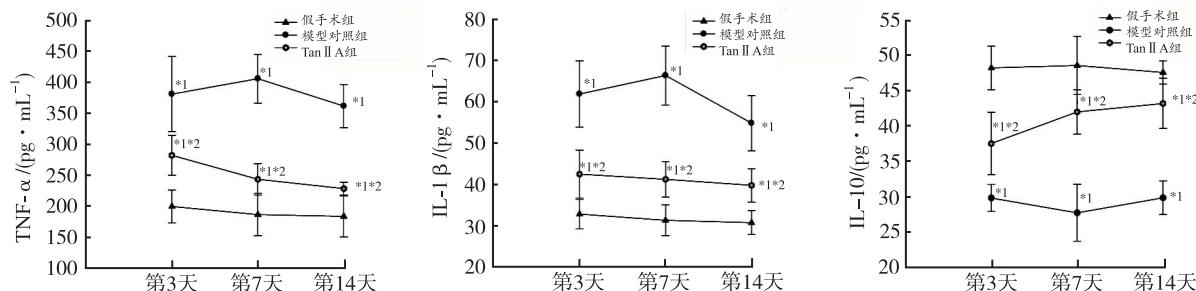
图4 3组大鼠SNL术后不同时间点TLR4蛋白的表达($\bar{x} \pm s, n=6$)

Compared with sham-operated group, ^{*1} $P < 0.05$; Compared with model control group, ^{*2} $P < 0.05$

Fig. 4 TLR4 expression in three groups of rats on different time points after SNL operation($\bar{x} \pm s, n=6$)

HMGB1及其内源性配体在神经病理性疼痛中作用的研究不多。本研究结果显示,假手术组脊髓组织中HMGB1 mRNA和蛋白质表达极少,SNL术后第3天,随着异常痛敏的产生,模型对照组脊髓HMGB1 mRNA和蛋白质表达均明显升高。推测HMGB1与病理性疼痛时的机械性痛觉超敏和热刺激诱发的痛觉过敏有关。研究表明,大鼠神经受损后,用HMGB1抗体治疗

可明显减轻痛觉过敏,说明HMGB1与神经病理性疼痛有关^[7]。有研究发现HMGB1可延长慢性炎症性疼痛的病理进程,推测原因为脊髓星形胶质细胞和背根神经节细胞中HMGB1表达上调所致^[8]。本研究发现,Tan II A组与模型对照组比较,大鼠脊髓组织HMGB1的表达明显减少,且该组大鼠的PWT和PWL同时显著减轻。提示腹腔注射Tan II A在产生镇痛效应的同时,也抑制脊髓组织HMGB1 mRNA和蛋白的表达,推测HMGB1表达下调可能是Tan II A发挥镇痛作用的机制。假手术组大鼠脊髓的TLR4 mRNA和蛋白表达较低,SNL术后第3天,伴随异常痛敏的出现,模型对照组脊髓TLR4 mRNA和蛋白表达上调并维持在较高水平,推测TLR4与机械痛和热敏痛有关。HMGB与TLR4结合呈二聚体化,激活MAPK和NF- κ B信号转导通路^[9],生成大量的细胞因子TNF- α 和IL-1 β ,产生痛觉过敏和痛觉超敏^[10],这与本实验结果一致。TLR位于神经元界面,越来越多的证据表明TLR激活神经胶质细胞(包括小胶质细胞和星形胶质细胞)、感觉神经元和其他细胞的炎症反应,影响痛觉传导,导致疼痛扩大和不易治愈^[11]。本实验检测到TLR4的表达量较HMGB1少,因为TLR4不是HMGB1的唯一受体,晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)也与可HMGB1受体结合,启动NF- κ B信号通路。神经元胶质细胞激活后可释放一系列的炎症细胞因子TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等,产生神经病理性疼痛^[12]。本研究还发现,Tan II A腹腔注射抑制TLR4和下游炎症因子TNF- α 和IL-1 β 的表达,且该组大鼠的PWT和PWL同时显著减轻,提示腹腔注射Tan II A产生镇痛效应的同时,抑制脊髓组织中TLR4 mRNA及蛋白的表达,推测



与假手术组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与模型对照组比较, ^{*2} $P < 0.05$

图5 3组SNL术后大鼠脊髓TNF- α 、IL-1 β 和IL-10的表达变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

Compared with sham-operated group, ^{*1} $P < 0.05$; Compared with model control group, ^{*2} $P < 0.05$

Fig. 5 Expression changes of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in spinal cords of three groups of rats on different time points after SNL operation($\bar{x} \pm s, n=6$)

TLR4 和下游细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达下调可能是 Tan II A 发挥镇痛作用的机制。IL-10 可以抑制炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及脊髓胶质细胞活化所致的疼痛过敏^[13]。HMGB1 抗体或 HMGB1 抑制剂对炎性病理性疼痛疗效明显^[14]。HMGB1 抑制剂(丙酮酸乙酯)可抑制脑损伤模型大鼠的 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号转导通路和炎症反应,改善模型大鼠的脑水肿^[15]。本实验也观察到, Tan II A 可抑制 SNL 大鼠脊髓 HMGB1、TLR4、TNF- α 和 IL-1 β 的表达,促进 IL-10 的表达,逆转 SNL 所致热敏痛和机械痛。

Tan II A 可逆转 SNL 所致热敏痛和机械痛,使 HMGB1 和 TLR4 mRNA 和蛋白质表达降低,炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的表达减少,抗炎因子 IL-10 的表达增加,抑制 HMGB1-TLR4 信号通路。表明在 L₅SNL 模型中抑制 HMGB1-TLR4 信号通路有一定的镇痛作用, HMGB1-TLR4 信号通路与神经病理性疼痛有关,可作为治疗病理性疼痛的靶点。

参考文献

- [1] ZHANG J,ZHANG H,ZI T.Overexpression of microRNA-141 relieves chronic constriction injury-induced neuropathic pain via targeting high-mobility group box 1[J].Int J Mol Med,2015,36(5):1433-1439.
- [2] 李阳,刘开祥,俸军林,等.丹参酮 II A 对脑缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制[J].时珍国医国药,2008,19(7):1648-1649.
- [3] KIM S H,CHUNG J M.An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat[J].Pain,1992,50(3):355-363.
- [4] LI H,XIE W,STRONG J A,et al.Systemic anti-inflammatory corticosteroid reduces mechanical pain behavior, sympathetics prouting, and elevation of proinflammatory cytokines in a rat model of neuropathic pain[J].Anesthesiology,2007,107(3):469-477.
- [5] 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):77-88.

- [6] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method[J].Methods,2001,25(4):402-408.
- [7] NAKAMURA Y,MORIOKA N,ABE H,et al. Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1[J].PLoS One,2013,18(8):e73640.
- [8] MAEDA T,OZAKI M,KOBAYASHI Y,et al. HMGB1 as a potential therapeutic target for neuropathic pain[J].J Pharmacol Sci,2013,123(4):301-305.
- [9] KUMAR H,KAWAI T,AKIRA S.Toll-like receptors and innate immunity[J].Biochem Bio Phys Res Comm,2009,388(4):621-625.
- [10] KAWAI T,AKIRA S.TLR signaling[J].Cell Death Differ,2006,13(10):816-825.
- [11] LACAGNINA M J,WATKINS L R,GRACE P M. Toll-like receptors and their role in persistent pain[J].Pharmacol Ther,2018,184:145-158.
- [12] ZHOU L J,YANG T,WEI X,et al.Brain-derived neurotrophic factor contributes to spinal long-term potentiation and mechanical hypersensitivity by activation of spinal microglia in rat[J].Brain Behav Immun,2011,25(2):322-334.
- [13] MILLIGAN E D,PENZKOVER K R,SODERQUIST R G,et al. Spinal interleukin-10 therapy to treat peripheral neuropathic pain[J].Neuromodulation,2012,15(6):520-526.
- [14] LIU K,MORI S,TAKAHASHI H K,et al.Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats[J].FASEB J,2007,21(14):3904-3916.
- [15] SU X,WANG H,ZHAO J,et al.Beneficial effects of ethyl pyruvate through inhibiting high-mobility group box 1 expression and TLR4/NF- κ B pathway after traumatic brain injury in the rat[J]. Mediators Inflamm, 2011, 2011: 807142.