

如意珍宝丸对小鼠丘脑出血后中枢痛的干预作用

贾可欣¹, 仲格嘉², 朱春燕¹, 方罗昌婷¹, 王潇潇¹, 徐腾腾¹, 胡智星¹, 角加才仁²,
胡贤达², 刘春芳^{1*}, 林娜^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

2. 中国藏学研究中心北京藏医院, 北京 100029)

[摘要] 目的: 观察如意珍宝丸(RYZBW)对小鼠丘脑卒中后中枢痛的干预作用, 并初步探索其作用机制。方法: 利用IV型胶原酶立体定位注射小鼠下丘脑诱导小鼠卒中后中枢疼痛(CPSP)模型, 将小鼠分为假手术组、模型组、RYZBW低、中、高(0.65、1.3、2.6 g·kg⁻¹)剂量组和阳性药普瑞巴林组(0.075 g·kg⁻¹)。给药组造模小鼠术后7 d开始按照体质量每天1次灌胃给药, 共给药25 d, 假手术组及模型组小鼠给予等体积生理盐水; 期间检测不同时间点的机械痛敏、冷痛敏, 原位末端标记法(TUNEL)检测脑组织细胞凋亡状态, 液相悬浮芯片技术对36种经典广谱炎症因子进行定量分析, 筛选差异分子, 并采用蛋白免疫印迹法(Western blot)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)对其验证。结果: 与假手术组比较, 模型组机械痛阈值、冷痛阈值显著改变($P < 0.01$), TUNEL结果反映脑细胞凋亡明显, Western blot和ELISA结果显示下丘脑组织和血清中白细胞介素-1 α (IL-1 α)和趋化因子配体5(CCL5)表达增加, 而促血管生成素-2(Ang-2)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)和IL-4的表达均显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, RYZBW各剂量组可显著升高脑卒中后小鼠的机械痛阈值, 降低冷痛阈值, 降低下丘脑细胞凋亡比例($P < 0.01$), 下丘脑组织和血清中IL-1 α 和CCL5表达降低, 而Ang-2、G-CSF、IL-4的表达均明显升高($P < 0.05$)。结论: RYZBW可缓解CPSP小鼠的痛觉过敏, 其机制与调节促炎/抗炎因子IL-1 α 、CCL5、IL-4、G-CSF和Ang-2的表达有关。

[关键词] 如意珍宝丸; 丘脑卒中后中枢痛; IV型胶原酶; 炎症因子

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R743.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0082-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221539

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220610.1522.003.html>

[网络出版日期] 2022-06-10 17:24

Intervention Effect of Ruyi Zhenbao Pills on Mice with Central Pain After Thalamic Stroke

JIA Kexin¹, ZHONG Gejia², ZHU Chunyan¹, FANG Luochangting¹, WANG Xiaoxiao¹, XU Tengting¹,
HU Zhixing¹, JUEJIA Cairen², HU Xianda², LIU Chunfang^{1*}, LIN Na^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Beijing Hospital of Tibetan Medicine, China Tibetology Research Center, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the intervention effect of Ruyi Zhenbao pills (RYZBP) on central pain after thalamic stroke in mice and explore the underlying mechanism. **Method:** The central post-stroke pain syndrome (CPSP) model was induced by stereotactic injection of type IV collagenase into the hypothalamus in mice. The mice were divided into a sham group, a model group, low-, medium-, and high-dose RYZBP groups (0.65, 1.3, 2.6 g·kg⁻¹), and a pregabalin group (0.075 g·kg⁻¹). Seven days after modeling, the mice in the groups with drug intervention were administered with corresponding drugs by gavage according to the body

[收稿日期] 2022-04-12

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20181216); 国家重大财政专项

[第一作者] 贾可欣, 在读博士, 从事中药药理研究, E-mail: 979477114@qq.com

[通信作者] * 刘春芳, 博士, 研究员, 从事中药药理研究, E-mail: chunfang666@126.com;

* 林娜, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理研究, E-mail: linna888@163.com

mass, once per day for 25 days, while those in the sham group and the model group received an equal volume of normal saline. During this period, mechanical pain and cold pain were detected at different time points, and the apoptotic state of brain tissue cells was detected by in situ terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL). The 36 classical broad-spectrum inflammatory factors were quantitatively analyzed by liquid-phase chip technology, and differential molecules were screened out and verified by Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Compared with sham operation group, mechanical pain threshold and cold sensitive pain threshold in model group were significantly changed ($P<0.01$). TUNEL results showed that apoptosis of brain cells was obvious. Western blot and ELISA results showed that the expressions of interleukin-1 α (IL-1 α) and chemokine ligand 5 (CCL5) increased in hypothalamus tissue and serum, while the expressions of Ang-2, granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and IL-4 decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, RYZBW dose groups significantly increased mechanical pain threshold, decreased cold sensitivity pain threshold, decreased hypothalamus cell apoptosis ratio ($P<0.01$), decreased the expression of IL-1 α and CCL5 in hypothalamus tissue and serum, while the expression of ANG-2, G-CSF and IL-4 were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** RYZBP can relieve hyperalgesia in CPSP mice, and its mechanism is related to the regulation of the expression of pro-/anti-inflammatory factors IL-1 α , CCL5, IL-4, G-CSF, and Ang-2.

[Keywords] Ruyi Zhenbao pills; central pain after thalamic stroke; type IV collagenase; inflammatory factor

脑卒中后中枢痛(CPSP)是由各种脑血管疾病引起中枢神经系统损伤导致的躯体感觉异常,临床主要表现为自发性疼痛、痛觉过敏和痛觉超敏。CPSP可在脑卒中后即刻或早期发生,通常发生于脑出血或脑梗死后6个月内^[1],卒中后人群CPSP发生率为8%~32%,最常见的可导致CPSP的卒中病灶区50%集中在丘脑。CPSP持续时间长,对临床常用的一线治疗神经病理性疼痛药物如加巴喷丁、普瑞巴林等敏感性较差^[2-3],因此如何改善CPSP,提高患者恢复期生存质量是临床上亟需解决的问题。

如意珍宝丸(RYZBW)源自藏医经典验方珍宝丸,由珍珠母、沉香、石灰英、金礞石、红花等30多种传统藏药药材组成,记载在藏医第司桑结嘉措著的《藏医医诀补遗》经典书籍中,具有清热解毒、醒脑开窍、舒经通络的功效^[4],常用于白脉病、瘟热、热证、偏瘫、四肢不利、痛风、肢体强直和关节不利等,是藏医用来治疗白脉病的首选药物。临床研究显示其对偏瘫性肩痛、带状疱疹后遗神经痛、眶上神经痛、偏头痛、三叉神经痛等外周神经病理性疼痛都有良好的镇痛效果,还可有效治疗脑梗死、脑出血、脑中风后遗症等^[5-6],但是对脑卒中后所致的后遗症中枢神经病理性疼痛的作用如何,还未见相关临床和基础研究报道。本研究拟采用小鼠丘脑腹后外侧核(VPL)立体定位注射IV型胶原酶建立小鼠CPSP模型,观察机械痛阈、冷痛阈等痛行为学指

标,对RYZBW干预丘脑出血后CPSP的疗效进行评价,并进一步从炎症角度探索初步作用机制,为临床的合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 66只ICR小鼠,雄性,体质量25~30g,清洁级动物标准饲养,适应性饲养3d后进行手术造模。动物合格证号SCXK(京)2016-0006,本实验通过中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理审查,编号20192019。

1.2 药物与试剂 RYZBW(中国金诃藏药股份有限公司,批号01200217);普瑞巴林(PGB,美国辉瑞制药,批号DA4519),IV型胶原酶(美国Sigma公司,货号SCR103);白细胞介素-1 α (IL-1 α)、粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)、IL-4酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(武汉酶免生物科技有限公司,货号分别为MM-0168M2、MM-0186M2、MM-0165M2);血管生成素-2(Ang-2)、趋化因子5(CCL5)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(爱必信上海生物科技有限公司,货号分别为abs147029、abs131231、abs132004);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(碧云天生物技术有限公司,货号A0208);多聚甲醛(天津永晟精细化工有限公司,货号20190907)。

1.3 仪器 900-0068-507型小动物脑立体定位仪、R530型异氟烷气体麻醉仪(深圳瑞沃德生命科技有

限公司), Von-Frey 针刺触觉测量套件(美国 Danmic Aesthesio 公司), VORTEX 2 型旋涡混匀器、IKA T10 型手持式匀浆机(广州艾卡 IKA 仪器设备有限公司), 3K15 小型台式高速冷冻离心机(上海西格玛奥德里奇贸易有限公司), BX50 型正置显微镜(日本 Olympus 公司), MK3 型全自动酶标仪(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 雄性 ICR 小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 即假手术组、模型组、RYZBW 低剂量组($0.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于临床 1 倍等效剂量)、RYZBW 中剂量组($1.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于临床 2 倍等效剂量)、RYZBW 高剂量组($2.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于临床 4 倍等效剂量)及阳性药 PGB 组($0.075 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 相当于临床 2 倍等效剂量)。各组小鼠下丘脑注射 IV 型胶原酶诱导 CPSP 模型, 其中假手术组只是注射操作但不注射胶原酶。RYZBW 和 PGB 经粉碎后用生理盐水配置不同浓度的药物混悬液备用; 各给药组在造模 7 d 后按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每天 1 次的口服灌胃给药, 至取材当天, 共给药 25 d, 其中假手术组和模型组按同样标准给予等体积生理盐水。

2.2 动物造模 采用小鼠 VPL 立体定位注射 IV 型胶原酶, 建立 CPSP 模型^[7]。小鼠术前禁食 12 h、禁水 4 h, 在常温(22 ± 3) °C 下, 异氟烷呼吸麻醉, 然后将小鼠俯卧位固定在立体定向仪上, 调整立体定向仪使门齿钩平面比耳间线平面低 1.0 mm, 此时前凶和后凶基本上在同一平面上; 将头部背侧的鼠毛剪去, 皮肤消毒后做一长度 0.5 cm 左右纵行切口, 暴露颅骨和前凶; 于前凶前 1.0 mm, 中线右旁 2 mm, 用牙科钻钻一直径约 1.0 mm 的圆孔, 不损伤硬脑膜, 用微量注射器沿钻孔方向垂直进针, 进针深度 2.7 mm, 10 min 内完成, 注射后留针 10 min, 缓慢退出微量注射器, 缝合皮肤切口, 保证整个手术操作过程小鼠有自主呼吸并注意保暖, 术后在保暖和通风环境下待动物苏醒。每只动物注射含 0.075 U 的 IV 型胶原酶 2 μL , 假手术组注射同等体积的生理盐水。

2.3 液相悬浮芯片技术检测 参考文献[8]方法进行检测, 小鼠麻醉取血后迅速置于冰上, 于冰上无菌无酶操作, 在显微镜下取下丘脑组织迅速冻存, 进行匀浆操作提取下丘脑组织蛋白, 定量后用蛋白芯片检测, 小鼠脑组织取材后, 根据 Luminex 试剂盒说明书准备标准品、抗体复合物、PE-链霉素亲和素、清洗液, 每孔加入 Beads、标准品和样品摇床孵

育 2 h; 清洗后加入抗体复合物摇床孵育 1 h, 磁力架吸附 Beads; 清洗后加入 PE-链霉素亲和素摇床孵育 0.5 h, 磁力架吸附 Beads; 清洗 3 次后清洗液重悬 Beads, 摇床孵育 2 min 后使用 Luminex 上机检测, 基于蛋白芯片检测结果分析差异表达蛋白, 选择差异蛋白进行后续验证研究。

2.4 原位末端标记法(TUNEL)检测脑细胞凋亡情况 麻醉小鼠后剪开其胸腔, 使心脏部位暴露, 处理扎针位置使生理盐水从左心室进, 右心耳出, 直到无血水流出, 用 4% 多聚甲醛灌注, 直到小鼠全身四肢僵硬即可, 断头开颅取脑, 将全脑放入装有 4% 多聚甲醛溶液的离心管, 4 °C 过夜, 再将原溶液依次置换为 8%、15%、30% PFA, 换液条件为 4 °C 静置组织沉底, 梯度脱水完成后, OTC 包埋剂包埋, 低温条件进行冰冻切片, 20 μm /片, 将冰冻切片放入蒸馏水中洗 5 min, 让组织周围的胶洗掉, 进入 TUNEL 染色步骤, 实验后进行荧光分析。

2.5 检测小鼠下丘脑组织/血清炎症因子的含量 小鼠麻醉取血后迅速置于冰上, 于冰上无菌无酶在显微镜下取下丘脑组织冻存; 脑组织以磷酸盐缓冲液(PBS)或生理盐水匀浆后提取上清, 以备酶联免疫检测; 而血液在小鼠摘除眼球取血后于室温下静置 2~4 h 左右离心取血清($4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min), 按照固定条件将全血于离心机中离心, 取上清冻存备检测, 标准曲线定量后对血清进行稀释, 而后按照 ELISA 说明书进行检测。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠下丘脑组织的蛋白水平 小鼠麻醉取血后迅速置于冰上, 于冰上无菌无酶操作, 在显微镜下取下丘脑组织迅速冻存, 匀浆裂解后提取下丘脑组织蛋白, 定量后用 Western blot 检测所选指标的蛋白变化水平。首先测定所提取组织蛋白浓度, 上样及电泳后进行转膜, 蛋白条带封闭后采用抗体 Ang-2、CCL5 (1:1 000) 及 GAPDH (1:1 万) 在 4 °C 条件下过夜孵育, 洗涤后使用二抗 (1:1 000) 处理, 再次洗涤并曝光条带, 获取图像后采用 Image J 1.8.0 软件进行分析。

2.7 统计学方法 数据使用 IBM SPSS 22.0.0.0 软件进行统计学分析。计量资料的结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料组内符合正态分布且方差齐性, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 用 GraphPad Prism 7.00 软件进行统计图制作。所有检验均为双侧性, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对CPSP小鼠机械痛阈的影响 建立IV型胶原酶诱导小鼠CPSP模型,观察RYZBW各剂量组给药后0、1、2、3、4、5、24 h等时间点的小鼠左后足机械痛阈变化。与假手术组比较,模型组机械痛阈显著降低($P<0.01$),提示CPSP模型构建成功,下丘脑出血可致使动物机械刺激痛敏反应,RYZBW作用后可以升高CPSP模型小鼠的机械痛

敏阈值,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性,其中,RYZBW高剂量组在给药2 h后的镇痛效应最明显,药效持续时间约为4 h;后续隔日机械痛敏阈值检测时间点选择在灌胃给药后的2 h,结果显示,RYZBW各剂量组持续给药25 d能维持相似的镇痛效果;而PGB有升高机械痛阈值的作用趋势,但差异无统计学意义。见表1和表2。

表1 RYZBW对CPSP小鼠机械痛阈的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of RYZBW on mechanical pain threshold in CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	24 h
假手术组		1.054±0.272	1.067±0.297	1.054±0.272	1.054±0.272	1.100±0.242	1.054±0.272	1.100±0.242
模型组		0.040±0.011 ¹⁾	0.050±0.008 ¹⁾	0.044±0.005 ¹⁾	0.047±0.010 ¹⁾	0.047±0.020 ¹⁾	0.040±0.011 ¹⁾	0.040±0.011 ¹⁾
RYZBW低剂量组	65	0.037±0.012	0.102±0.078	0.333±0.112 ²⁾	0.191±0.071	0.085±0.043	0.037±0.012	0.037±0.012
RYZBW中剂量组	130	0.041±0.010	0.097±0.072	0.916±0.443 ³⁾	0.243±0.122	0.093±0.029	0.041±0.010	0.041±0.011
RYZBW高剂量组	260	0.041±0.012	0.103±0.074	1.036±0.464 ³⁾	0.279±0.160	0.095±0.055	0.041±0.012	0.044±0.014
PGB组	75	0.039±0.021	0.182±0.068	0.714±0.078 ³⁾	0.347±0.170 ³⁾	0.049±0.024	0.039±0.021	0.047±0.048

注:与Sham组比较¹⁾ $P<0.01$;与Model组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ (表2-表7同)

表2 RYZBW对CPSP小鼠机械痛阈的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Effect of RYZBW on mechanical pain threshold in CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d	15 d
假手术组		1.054±0.272	1.100±0.242	1.145±0.358	1.100±0.242	1.070±0.297	1.070±0.297
模型组		0.039±0.012 ¹⁾	0.036±0.019 ¹⁾	0.036±0.011 ¹⁾	0.043±0.019 ¹⁾	0.039±0.012 ¹⁾	0.040±0.012 ¹⁾
RYZBW低剂量组	65	0.306±0.100 ²⁾	0.341±0.144 ²⁾	0.295±0.165 ²⁾	0.295±0.165 ²⁾	0.321±0.057 ²⁾	0.403±0.104 ³⁾
RYZBW中剂量组	130	0.756±0.099 ³⁾	0.809±0.109 ³⁾	0.768±0.145 ³⁾	0.771±0.129 ³⁾	0.792±0.057 ³⁾	0.738±0.052 ³⁾
RYZBW高剂量组	260	0.957±0.126 ³⁾	0.980±0.266 ³⁾	0.892±0.164 ³⁾	0.924±0.118 ³⁾	0.915±0.101 ³⁾	0.907±0.211 ³⁾
PGB组	75	0.259±0.125	0.301±0.111	0.156±0.154	0.164±0.070	0.154±0.077	0.141±0.068

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	17 d	19 d	21 d	23 d	25 d
假手术组		1.090±0.274	1.095±0.381	1.031±0.262	0.999±0.288	1.057±0.280
模型组		0.050±0.023 ¹⁾	0.041±0.011 ¹⁾	0.045±0.016 ¹⁾	0.043±0.019 ¹⁾	0.047±0.021 ¹⁾
RYZBW低剂量组	65	0.402±0.095 ³⁾	0.420±0.101 ³⁾	0.457±0.094 ³⁾	0.420±0.101 ³⁾	0.407±0.119 ³⁾
RYZBW中剂量组	130	0.798±0.145 ³⁾	0.776±0.155 ³⁾	0.808±0.261 ³⁾	0.829±0.119 ³⁾	0.771±0.126 ³⁾
RYZBW高剂量组	260	0.882±0.227 ³⁾	0.917±0.338 ³⁾	0.970±0.313 ³⁾	0.931±0.480 ³⁾	0.961±0.485 ³⁾
PGB组	75	0.110±0.030	0.177±0.143	0.133±0.075	0.128±0.079	0.127±0.089

3.2 对丘脑出血CPSP小鼠冷敏痛阈的影响 建立IV型胶原酶诱导小鼠CPSP模型,观察RYZBW各剂量组给药后0、1、2、3、24 h等时间点的小鼠左后足冷敏痛阈变化。实验结果显示,与假手术组比较,模型组冷敏痛阈显著升高($P<0.01$),提示胶原酶诱导下丘脑出血可致使小鼠冷敏痛反应,RYZBW作用后可以降低CPSP模型小鼠的冷敏痛阈值($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性,其中,RYZBW高剂

量组在给药1 h后的镇痛效应最明显,药效持续时间约为3 h;后续隔日冷敏痛阈值检测时间点选择在灌胃给药后的1 h,结果显示,RYZBW各剂量持续给药24 d能维持相似的镇痛效果;PGB对脑卒中后遗疼痛小鼠的冷敏痛的镇痛效果略弱于RYZBW低剂量给药组。见表3和表4。

3.3 对丘脑出血CPSP小鼠脑组织细胞凋亡的影响 与假手术组比较,模型组小鼠的下丘脑组织细

表3 RYZBW对CPSP小鼠冷敏痛阈值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of RYZBW on cold sensitivity and pain threshold of CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	0 h	1 h	2 h	3 h	24 h
假手术组		1.111±0.172	1.056±0.136	1.093±0.148	1.111±0.172	1.111±0.172
模型组		2.833±0.192 ¹⁾	2.917±0.167 ¹⁾	2.861±0.167 ¹⁾	2.833±0.192 ¹⁾	2.833±0.192 ¹⁾
RYZBW 低剂量组	65	2.889±0.172 ²⁾	2.111±0.272 ²⁾	2.630±0.135 ³⁾	2.889±0.172 ²⁾	2.889±0.172 ²⁾
RYZBW 中剂量组	130	2.778±0.272 ³⁾	1.944±0.390 ³⁾	2.500±0.251 ³⁾	2.778±0.272 ³⁾	2.778±0.272 ³⁾
RYZBW 高剂量组	260	2.778±0.272 ³⁾	1.556±0.344 ³⁾	2.370±0.269 ³⁾	2.778±0.272 ³⁾	2.733±0.279 ³⁾
PGB组	75	2.778±0.272 ²⁾	1.944±0.390 ²⁾	2.500±0.251 ²⁾	2.778±0.272 ²⁾	2.778±0.272 ²⁾

表4 RYZBW对CPSP小鼠冷敏痛阈值的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of RYZBW on cold sensitivity and pain threshold of CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
假手术组		1.056±0.136	0.889±0.172	0.889±0.172	0.889±0.172	0.889±0.172
模型组		2.917±0.167 ¹⁾	3.000±0.000 ¹⁾	3.000±0.000 ¹⁾	3.000±0.000 ¹⁾	2.917±0.167 ¹⁾
RYZBW 低剂量组	65	2.444±0.272 ²⁾	2.500±0.183 ²⁾	2.444±0.272 ²⁾	2.167±0.408 ²⁾	1.944±0.743 ²⁾
RYZBW 中剂量组	130	1.778±0.344 ³⁾	1.667±0.365 ³⁾	1.667±0.365 ³⁾	1.722±0.328 ³⁾	1.778±0.502 ³⁾
RYZBW 高剂量组	260	1.533±0.380 ³⁾	1.467±0.183 ³⁾	1.533±0.183 ³⁾	1.333±0.333 ³⁾	1.267±0.149 ³⁾
PGB组	75	2.333±0.516 ²⁾	2.167±0.408 ²⁾	1.944±0.647 ²⁾	2.056±0.534 ²⁾	2.278±0.712 ²⁾

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	16 d	18 d	20 d	22 d	24 d
假手术组		0.833±0.183	0.722±0.251	0.722±0.251	0.722±0.328	0.733±0.365
模型组		3.000±0.000 ¹⁾	2.833±0.192 ¹⁾	2.917±0.167 ¹⁾	3.000±0.000 ¹⁾	3.000±0.000 ¹⁾
RYZBW 低剂量组	65	2.222±0.502 ²⁾	2.111±0.404 ²⁾	2.000±0.596 ²⁾	2.000±0.596 ²⁾	2.056±0.574 ²⁾
RYZBW 中剂量组	130	1.833±0.460 ³⁾	1.833±0.548 ³⁾	1.944±0.574 ³⁾	1.778±0.656 ³⁾	1.778±0.656 ³⁾
RYZBW 高剂量组	260	1.200±0.606 ³⁾	1.133±0.558 ³⁾	1.267±0.149 ³⁾	1.133±0.183 ³⁾	1.200±0.183 ³⁾
PGB组	75	2.056±0.647 ²⁾	2.222±0.502 ²⁾	2.333±0.422 ²⁾	2.278±0.443 ²⁾	2.333±0.422 ²⁾

脑凋亡显著($P<0.01$),提示IV型胶原酶诱导小鼠脑卒中可造成下丘脑注射部位的细胞凋亡;与模型组比较,RYZBW各给药组可明显降低脑细胞凋亡的程度($P<0.05, P<0.01$),且呈剂量依赖性,PGB组对降低脑细胞凋亡的作用与RYZBW中剂量组相近。见表5和图1。

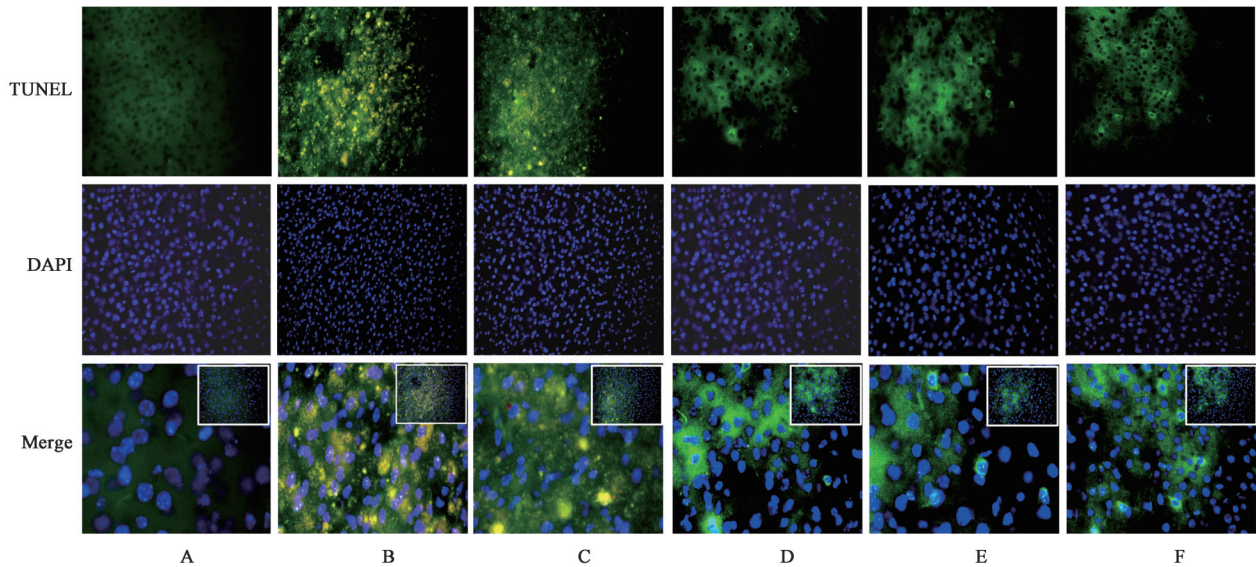
表5 RYZBW对CPSP小鼠脑细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of RYZBW on apoptosis of brain cells in CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	细胞凋亡/%
假手术组		0.456±0.220
模型组		4.283±0.721 ¹⁾
RYZBW 低剂量组	65	2.789±0.821 ²⁾
RYZBW 中剂量组	130	1.517±0.414 ³⁾
RYZBW 高剂量组	260	1.008±0.198 ³⁾
PGB组	75	1.496±0.565 ³⁾

3.4 对丘脑出血CPSP小鼠炎症因子的影响 采用Luminex液相悬浮芯片技术对CPSP小鼠下丘脑组织的36种经典广谱炎症相关因子进行定量分析,通过组间比较,发现IL-1 α 、IL-4、CCL5、Ang-2、G-CSF等5个炎症因子具有明显差异,故进一步采用ELISA或Western blot验证。

ELISA结果显示,与假手术组比较,模型组下丘脑和血清中IL-4和显著降低($P<0.01$);与模型组比较,RYZBW各给药组下丘脑和血清中IL-4表达量明显升高($P<0.05, P<0.01$),PGB组血清中IL-4含量显著升高($P<0.01$),而对下丘脑中的无明显影响。与假手术组比较,模型组的下丘脑和血清中G-CSF的表达量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,RYZBW高剂量组下丘脑和血清中G-CSF的表达量明显升高($P<0.05$),RYZBW低、中剂量组和PGB组血清和下丘脑中G-CSF的含量差异无统计学意义。模型组小鼠下丘脑和血清中的IL-1 α 含量均较假手术组显著



注: A.假手术组;B.模型组;C.RYZBW 0.65 g·kg⁻¹组;D.RYZBW 1.3 g·kg⁻¹组;E.RYZBW 2.6 g·kg⁻¹组;F.PGB 0.075 g·kg⁻¹组(图2同)

图1 TUNEL荧光染色评价RYZBW对CPSP小鼠脑细胞凋亡的影响(TUNEL,×40)

Fig. 1 TUNEL fluorescent staining to evaluate effect of RYZBW on brain cell apoptosis in CPSP mice (TUNEL,×40)

升高($P<0.01$), RYZBW高剂量组血清和下丘脑中 IL-1 α 的含量均较模型组显著降低($P<0.01$)。见表6。

表6 RYZBW对CPSP小鼠下丘脑和血清中IL-1 α 、IL-4和G-CSF蛋白水平的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of RYZBW on protein levels of IL-1 α , IL-4 and G-CSF in hypothalamus and serum of CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=10$) ng·L⁻¹

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-4		IL-1 α		G-CSF	
		下丘脑	血清	下丘脑	血清	下丘脑	血清
假手术组		89.34±1.62	85.51±0.50	21.34±3.89	23.84±4.00	601.29±80.57	589.27±40.16
模型组		63.26±2.79 ¹⁾	33.49±9.49 ¹⁾	36.12±0.04 ¹⁾	37.17±0.66 ¹⁾	386.96±5.08 ¹⁾	376.30±51.93 ¹⁾
RYZBW低剂量组	65	80.53±0.53 ²⁾	76.63±0.58	37.82±2.63	35.43±3.97	375.93±19.99	361.92±43.38
RYZBW中剂量组	130	77.51±7.53 ²⁾	83.83±14.41 ³⁾	36.70±1.57	35.03±3.42	371.72±2.14	377.75±8.34
RYZBW高剂量组	260	87.11±18.91 ³⁾	86.53±12.31 ³⁾	27.98±2.53 ³⁾	25.88±0.20 ³⁾	418.70±16.23 ²⁾	473.12±31.23 ²⁾
PGB组	75	61.40±11.55	72.39±11.97 ³⁾	37.19±7.53	37.62±0.40	358.49±24.51	373.89±63.99

与假手术组比较,模型组脑组织中Ang-2的表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,RYZBW各给药组Ang-2的表达量显著降低($P<0.01$)。与假手术组比较,模型组脑组织中CCL5的表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,RYZBW各给药组及PGB组CCL5的表达量显著降低($P<0.01$)。见图2、表7。

4 讨论

丘脑VPL立体定位注射IV型胶原酶建立的卒中后CPST模型,具有制作简单、快捷、重复性较好,且与人类脑出血病理、生化和病理生理学相似等特点。本实验利用实验小鼠复制了这一模型,并通过检测机械痛阈和热痛阈来评价小鼠CPSP的疼痛特征,结果显示造模7~32 d模型小鼠机械痛阈较正常小鼠明显升高,而热敏痛阈明显降低,提示小鼠VPL出血后,可引发中枢神经病理性疼痛。在成功

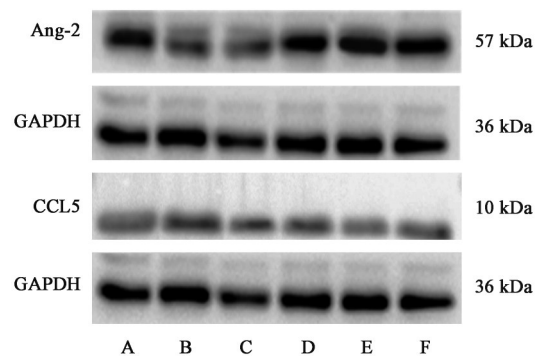


图2 CPSP小鼠脑组织中Ang-2和CCL5蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Ang-2 and CCL5 in brain of CPSP mice

建立小鼠CPSP模型的基础上,笔者采用口服RYZBW的方式进行干预,以PGB为阳性对照,用爪触觉测试仪、丙酮刺激测量不同时间点的机械痛阈和冷刺激反应评分,评价RYZBW的镇痛作用特点。结果显示,RYZBW 0.65~2.6 g·kg⁻¹治疗后能剂

表7 RYZBW对CPSP小鼠脑组织中Ang-2和CCL5蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of RYZBW on Ang-2 and CCL5 in brain of CPSP mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Ang-2/GAPDH	CCL5/GAPDH
假手术组		1.056±0.017	0.773±0.022
模型组		0.604±0.007 ¹⁾	1.069±0.004 ¹⁾
RYZBW低剂量组	65	0.791±0.017 ³⁾	0.829±0.012 ³⁾
RYZBW中剂量组	130	0.988±0.009 ³⁾	0.870±0.021 ³⁾
RYZBW高剂量组	260	1.092±0.016 ³⁾	0.785±0.019 ³⁾
PGB组	75	1.248±0.023 ³⁾	0.880±0.007 ³⁾

量依赖地抑制CPSP小鼠的机械痛和丙酮诱发痛,对机械痛的最佳镇痛时间为给药后2h,镇痛作用可以持续到给药4h,对丙酮诱发痛的最佳镇痛时间为给药后1h,镇痛作用可以持续到给药3h,且RYZBW 0.65 g·kg⁻¹组作用优于阳性药PGB,提示RYZBW对丘脑出血后CPSP具有良好的镇痛作用。比较之下,给药24d后临床2倍等效剂量的PGB对CPSP小鼠机械痛无明显影响,其对丙酮诱发痛的镇痛作用也仅仅与RYZBW低剂量组相近,提示RYZBW在缓解CPSP方面比PGB更具药效优势,而且2种药物可能存在着不一样的作用机制。实验中观察到RYZBW对丙酮诱发痛的最佳镇痛时间点早于机械痛,而镇痛持续时间短于机械痛,这一镇痛药效特点所蕴含的作用机制有待后续探索。进一步,笔者采用TUNEL检测法观察了CPSP小鼠下丘脑注射部位的细胞凋亡情况,结果显示,IV型胶原酶诱导可造成小鼠的下丘脑注射部位的细胞凋亡,经RYZBW 0.65~2.6 g·kg⁻¹治疗后能剂量依赖地改善这一作用。

目前,关于CPSP的疼痛机制有中枢敏化、去抑制、中枢失衡等假说,而神经炎症所诱发的中枢敏化在疼痛中的作用愈加重要。炎症因子的复杂多样是神经病理性疼痛治疗失败的主要原因^[9-10]。为了了解RYZBW是否通过抗炎发挥治疗CPSP的作用,笔者使用Luminex液相悬浮芯片技术检测了CPSP小鼠下丘脑中36种炎症因子的表达情况。结果显示,RYZBW能调节CPSP小鼠下丘脑中IL-1 α 、CCL5、IL-4、G-CSF、Ang-2的异常表达,初步提示了RYZBW可以通过多靶点缓解CPSP小鼠下丘脑炎症。已知IL-1 α 是神经病理性疼痛神经炎症中重要的促炎细胞因子,能够促使白细胞聚集于炎症部位,还能够刺激单核巨噬细胞等分泌细胞因子包括TNF- α 、IL-1、IL-6等^[11-13]。趋化因子CCL5趋化T细

胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,并在白细胞向炎症部位募集中发挥着积极的作用,其通过受体CCR5发挥作用,与胶质细胞活化和神经细胞间交流发挥积极作用,在脑与神经类疾病中发挥重要作用。IL-4是抗炎因子,在神经病理性疼痛的发挥过程中发挥作用^[14-15]。G-CSF主要作用于中性粒细胞系,可通过神经保护,调节VEGF,影响炎症因子释放等功能在大鼠脑出血、脑水肿等疾病中发挥保护作用^[16-17]。Ang-2是促血管生成因子,可调节血管重构^[18],在临床出血性脑梗死患者的检测中出现率高^[19],在CPSP晚期可能与血管重建密切相关^[20]。故此,本实验采用ELISA和Western blot对血清和(或)下丘脑中上述炎症因子进行了验证研究,结果显示RYZBW能够抑制血清和/或下丘脑中IL-1 α 和CCL5的含量,同时提高IL-4和G-CSF和Ang2的表达水平,而阳性药PGB对IL-1 α 和G-CSF无明显影响,提示RYZBW具有良好的抗炎作用,且这一作用可能是其缓解CPSP的关键。

综上,本实验首次通过IV型胶原酶立体定位注射建立丘脑出血后CPSP模型小鼠,证明了RYZBW对CPSP小鼠痛觉过敏的缓解作用及比较较于一线治疗神经病理性疼痛药PGB的药效优势;进一步,通过广谱炎症因子的筛查和验证,发现RYZBW改善CPSP的机制与调节促炎/抗炎因子IL-1 α 、CCL5、IL-4、G-CSF和Ang-2的表达有关。本研究结果将为后续深入的分子机制研究提供实验基础,也有利于RYZBW功效科学内涵的揭示,为临床新适应症的拓展提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BOWSER D. Central pain: Clinical and physiological characteristics [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1996, 61(1): 62-69.
- [2] AKYUZ G, KURU P. Systematic review of central post stroke pain: What is happening in the central nervous system? [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2016, 95(8): 618-627.
- [3] CHEN C C, CHUANG Y F, HUANG A C, et al. The antalgic effects of non-invasive physical modalities on central post-stroke pain: A systematic review [J]. J Phys Ther Sci, 2016, 28(4): 1368-1373.
- [4] 许宗仁,包旭宏,田其健.如意珍宝丸(片)的研究综述[J].中国民间疗法,2020,28(13):106-109.
- [5] 王海苹.藏药如意珍宝丸临床应用现状[J].中国民

- 族医药杂志, 2014, 20(1): 46-49.
- [6] 罗亚敏, 任小巧, 宋慧荣, 等. 藏药如意珍宝丸 20 年研究进展[J]. 中国民族医药杂志, 2017, 23(7): 69-72.
- [7] 谭敬, 肖新莉, 陈新林, 等. 采用 IV 型胶原酶建立小鼠脑出血模型[J]. 陕西医学杂志, 2014, 43(5): 522-525.
- [8] 李佳豪, 田聪敏, 池宏宇, 等. 瘀血痹片通过抑制外周炎症缓解慢性炎性痛小鼠痛觉过敏及足肿胀[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 31-37.
- [9] 金宇林, 徐海平, 宋兴荣, 等. 大鼠神经病理性痛时脊髓 kindlin-1/Wnt3a 信号通路与炎症反应的关系[J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41(3): 319-322.
- [10] 王新颖, 任安, 李梦绮, 等. TLRs/IRAK1/TRAF6/NF- κ B 信号通路介导神经炎症参与神经病理性痛的研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2020, 40(9): 917-923.
- [11] MIKA J, KOROSTYNSKI M, KAMINSKA D, et al. Interleukin-1 alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model[J]. Pain, 2008, 138(3): 587-597.
- [12] MA F, ZHANG L, OZ H S, et al. Dysregulated TNF- α promotes cytokine proteome profile increases and bilateral orofacial hypersensitivity[J]. Neuroscience, 2015, 300: 493-507.
- [13] ShamASH S, REICHERT F, ROTSHENKER S. The cytokine network of Wallerian degeneration: Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta[J]. J Neurosci, 2002, 22(8): 3052-3060.
- [14] BOBINSKI F, TEIXEIRA J M, SLUKA K A, et al. Interleukin-4 mediates the analgesia produced by low-intensity exercise in mice with neuropathic pain[J]. Pain, 2018, 159(3): 437-450.
- [15] KIGUCHI N, KOBAYASHI Y, SAIKA F, et al. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain[J]. Pain, 2015, 156(4): 684-693.
- [16] KHORASANIZADEH M, ESKIAN M, VACCARO A R, et al. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for the treatment of spinal cord injury[J]. CNS Drugs, 2017, 31(11): 911-937.
- [17] ZHANG E, LEE S, YI M H, et al. Expression of granulocyte colony-stimulating factor 3 receptor in the spinal dorsal horn following spinal nerve ligation-induced neuropathic pain[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2): 2009-2015.
- [18] SHIUE S J, RAU R H, SHIUE H S, et al. Mesenchymal stem cell exosomes as a cell-free therapy for nerve injury-induced pain in rats[J]. Pain, 2019, 160(1): 210-223.
- [19] 刘发生, 李帅, 郭立峰, 等. HMGB-1、cTnI 及 Ang2 与急诊多发伤血管损伤、院内死亡风险的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(8): 1349-1352.
- [20] ZHOU H J, QIN L, ZHANG H, et al. Endothelial exocytosis of angiotensin-2 resulting from CCM3 deficiency contributes to cerebral cavernous malformation[J]. Nat Med, 2016, 22(9): 1033-1042.

[责任编辑 孙丛丛]