

· 药理 ·

## 雷公藤红素对神经病理性疼痛模型小鼠的干预作用

吴红艳, 师钰琪, 李佳豪, 朱春燕\*, 林娜\*  
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:观察雷公藤红素对神经病理性疼痛(NP)模型小鼠疼痛、焦虑及抑郁共病的干预作用以及初步机制探索。方法:将小鼠随机分为假手术组,模型组,普瑞巴林组(25 mg·kg<sup>-1</sup>),雷公藤红素低、中、高剂量组(5,10,20 mg·kg<sup>-1</sup>),以L5脊神经结扎(SNL)的方法制备NP小鼠模型,采用Von Frey法检测小鼠机械痛阈值,旷场和悬尾实验分别检测小鼠焦虑和抑郁症状,免疫组化(IHC)观察各组小鼠海马小胶质细胞形态的变化;选用BV2-TdT小胶质细胞,以1 mg·L<sup>-1</sup>脂多糖(LPS)诱导细胞炎症,分为正常组、模型组、雷公藤红素(100 nmol·L<sup>-1</sup>)组,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的mRNA表达,免疫荧光(IF)检测TNF- $\alpha$ 的蛋白表达。结果:与假手术组比较,SNL模型组小鼠具有显著的机械痛敏、焦虑和抑郁症状( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),且海马小胶质细胞胞体面积明显升高( $P<0.05$ ),呈阿米巴样;与SNL模型组比较,20 mg·kg<sup>-1</sup>雷公藤红素能明显升高SNL小鼠50%缩足阈值和旷场中央区停留时间( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),降低SNL小鼠悬尾不动时间( $P<0.05$ ),减少SNL小鼠海马小胶质细胞的胞体面积( $P<0.05$ )。体外实验显示,与正常组比较,LPS诱导BV2小胶质细胞后2~4 h,细胞TNF- $\alpha$ 的mRNA和蛋白表达均明显升高( $P<0.05$ , $P<0.01$ );与LPS组比较,100 nmol·L<sup>-1</sup>雷公藤红素能显著抑制LPS诱导的TNF- $\alpha$ 在mRNA和蛋白水平上表达的异常升高( $P<0.01$ )。结论:雷公藤红素能改善NP模型小鼠痛与情绪障碍共病,其机制可能与中枢神经免疫调控有关。

**[关键词]** 雷公藤红素;神经病理性疼痛;抗炎免疫;海马;小胶质细胞

**[中图分类号]** R2-0;R289;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0097-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201437

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200416.1053.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-4-16 11:21

### Effect of Celastrol on Neuropathic Pain Model Mice

WU Hong-yan, SHI Yu-qi, LI Jia-hao, ZHU Chun-yan\*, LIN Na\*  
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,  
Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of celastrol on painful and the emotional of anxiety and depression comorbidity on neuropathic pain model animal and to explore its possible mechanism. **Method:** Mice were randomly divided into sham group, model group, pregabalin group(25 mg·kg<sup>-1</sup>), low, medium and high-dose celastrol groups (5, 10, 20 mg·kg<sup>-1</sup>). The mice model of neuropathic pain were established by the L5 spinal nerve ligation (SNL). After successful modeling, the treatment groups were given intragastric administration, the sham group and the model group were given the same volume of warm water. Mechanical pain were detected by Von Frey tests, anxiety and depression behaviors were separately detected by the open field and the tail tailing experiments, the pathological changes of microglial cells in hippocampus of mice in each

**[收稿日期]** 20191027(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81974526);国家“重大新药创新”科技重大专项(2019ZX09731-002);中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才(创新类)培养专项(ZZ13-YQ-051)

**[第一作者]** 吴红艳,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:15761638107@163.com

**[通信作者]** \*朱春燕,博士,从事中药药理学研究,E-mail:xijiangyue3013@163.com;

\*林娜,博士,研究员,从事中药药理学研究,E-mail:linna888@163.com

group were observed by immunohistochemical staining (IHC). The inflammation of BV2 microglial cell made by  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  lipopolysaccharide (LPS). Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). The expression levels of TNF- $\alpha$  protein were detected by immunofluorescence (IF) staining. **Result:** Compared with sham group, significant change of mechanical pain thresholds, anxiety and depression were detected in the SNL mice ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the significant decreases of the body size of hippocampal microglia ( $P < 0.05$ ). Compared with SNL model group,  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  celastrol significantly increased the 50% paw withdraw threshold and the time of the open field tests ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and decreased the time of the tail tiling experiments in the SNL mice ( $P < 0.05$ ), and the cell body area of hippocampal microglia in SNL mice was reduced ( $P < 0.05$ ). Experiment in vitro show, compared with control group, the expression of TNF- $\alpha$  mRNA and protein expression in LPS-induced BV2 microglia increased significantly from 2-4 h ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the LPS group, after  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  celastrol administration, LPS-induced microglia inflammatory factor TNF- $\alpha$  mRNA and TNF- $\alpha$  protein expression were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Celastrol can relieve pain-emotion comorbidity on neuropathic pain model mice, and its mechanism may be related to the anti-inflammation in the central nerves system.

[Key words] celastrol; neuropathic pain; anti-inflammatory immunity; hippocampus; microglia

神经病理性疼痛(NP)是由外周或中枢躯体感觉系统的损伤或疾病所造成的慢性难治性疼痛<sup>[1]</sup>。NP常伴认知功能下降、焦虑、抑郁、失眠,而痛与情绪障碍的共病被认为是NP临床治疗的瓶颈<sup>[2]</sup>。神经免疫异常是导致NP外周敏化、中枢敏化等多个关键病理环节的重要因素<sup>[3-5]</sup>。在脑神经系统中,神经免疫异常被认为是导致中枢神经元兴奋性及可塑性改变,引发痛觉感知、认知异常,造成痛与情绪共病的关键<sup>[6-8]</sup>。中枢神经免疫的异常与调控,是NP痛与情绪共病及共治的关键途径,也是多靶向药物研发的方向。

雷公藤红素是中药雷公藤的主要活性成分之一,具有祛风除湿、活血通络、消肿止痛的功效,临床上用于治疗类风湿关节炎和系统性红斑狼疮等疾病<sup>[9-10]</sup>。现代药理学研究表明其具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、减肥等多种生物活性<sup>[11-15]</sup>。然而,由于现有对雷公藤红素神经免疫的研究多集中于外周,而在中枢神经系统内抗炎免疫药效及机制的研究尚属于起步阶段,阻碍了其在中枢神经免疫相关疾病中的应用。本研究以L5脊神经结扎(SNL)小鼠为NP模型,旨在观察雷公藤红素对NP痛及情绪共病的干预作用,并从中枢抗炎免疫角度探索初步的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性ICR小鼠,体质量( $30 \pm 2$ ) g,购自维通利华生物科技有限责任公司,合格证号SCXK(京)2019-0010,动物标准饲养于中国中医科

学院基础理论研究所SPF级动物房,温度( $22 \pm 2$ ) °C,湿度控制在70%~80%,小鼠自由饮水摄食。本研究获得中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准。

**1.2 细胞** BV2-TdT细胞购自国家实验细胞资源共享服务平台(北京总部),将BV2小胶质细胞接种于10 cm培养皿中,培养液为含体积分数10%胎牛血清, $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素混合双抗的DMEM高糖培养基,置于37 °C含5% CO<sub>2</sub>和饱和湿度的培养箱内培养,每隔2~3 d传代,取8~12代用于实验。

**1.3 药品与试剂** 雷公藤红素(中国食品药品检定研究所,批号111946-201501);兔抗TMEM119抗体(英国Abcam公司,批号ab209064);内源性过氧化物酶阻断剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号K182311G);脂多糖(LPS,美国Sigma公司,批号025M40400V);胎牛血清,胰酶(美国Gibco公司,批号分别为16000-044,25200-056);青-链霉素(德国HyClone公司,批号SV30010);trizol试剂盒,cDNA反转录试剂盒(北京金全生物技术有限公司,批号分别为ER501,AE311);二甲基亚砜(DMSO,美国Amresco公司,批号0231);DAB显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号107168A07);OCT包埋剂(美国Ltipack公司,批号202468);中性树胶(上海麦克林生化科技有限公司,批号822941-100g);曲拉通X-100(北京普利莱基因技术有限公司,批号A1009);枸橼酸,枸橼酸钠

(上海麦克林生化科技有限公司,批号分别为C805019-500g,S818273-500g)。

**1.4 仪器** XTS20/30型连续变倍体视显微镜(北京泰克仪器有限公司,批号121998A103);Von Frey纤维细丝机械刺激针(法国Bioseb公司,批号Aesthesio);1210B1210型冰冻切片机(美国Thermo Scientific公司);BX41型正置荧光显微镜(日本Olympus公司);DNA Engine opticon MJI型实时实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);WD-9405B型摇床(北京六一仪器厂);XDS-1B型CO<sub>2</sub>培养箱(重庆光电仪器有限公司);疼痛测试钢架,铁丝网眼垫,旷场实验箱,悬尾实验箱均为中国中医科学院中药研究所自制。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备** 小鼠左侧腰椎第五脊神经结扎SNL模型建立:动物以异氟烷进行气体麻醉后,按照文献[16]方法暴露背部左侧L5横突,游离L5神经并以6号眼科线结扎,青霉素处理伤口后缝合。假手术假手术组仅暴露L5横突不结扎神经。小鼠造模后观察其行动状态,剔除运动行为受损的个体,小鼠左足50%机械缩足阈值显著降低说明模型复制成功。

**2.2 分组及给药** 按随机数字表法将小鼠分为假手术组,SNL模型组、普瑞巴林组,雷公藤红素低、中、高剂量组,每组8只。按照人-小鼠1:9,参照文献[17]方法设置雷公藤红素低、中、高剂量分别为5,10,20 mg·kg<sup>-1</sup>,阳性药普瑞巴林剂量为25 mg·kg<sup>-1</sup>,1次/d,连续灌胃给药16 d,假手术组及模型组灌胃等体积蒸馏水。

选取8~12代状态良好的BV2-TdT细胞,分为正常组,1 mg·L<sup>-1</sup> LPS组(LPS组),50 nmol·L<sup>-1</sup> 雷公藤红素+1 mg·L<sup>-1</sup> LPS组(雷公藤红素低剂量组),100 nmol·L<sup>-1</sup> 雷公藤红素+1 mg·L<sup>-1</sup> LPS组(雷公藤红素中剂量组),200 nmol·L<sup>-1</sup> 雷公藤红素+1 mg·L<sup>-1</sup> LPS组(雷公藤红素高剂量组),1次/d给药,正常组和LPS组给予等体积生理盐水。

**2.3 Von Frey法检测小鼠机械痛敏** 给药后将小鼠置于安静房间内的有机玻璃箱内适应1.5 h使小鼠处于静息状态,用Von Frey纤维丝持续刺激术侧后肢足底L5神经反射区3~4 s,共测试6次,每次间隔5 min,记录后爪50%机械缩足阈值。

**2.4 旷场实验检测小鼠焦虑情绪** 在安静自然光照的室内,将小鼠置于黑色方形旷场分析箱中,将每只动物头朝分析箱壁放入箱内底面边缘,统计

4 min内小鼠在中央区停留时间(s)。每次统计后,用75%乙醇清洗并擦干箱内壁及底面。

**2.5 悬尾实验检测小鼠焦虑情绪** 将黑色悬尾箱置于水平地面上,两边用重物固定防止悬尾箱晃动,再用长15 cm透明胶带将小鼠尾巴倒挂粘附在黑色悬尾箱上,先适应2 min后,摄像机记录再统计4 min内小鼠停止挣扎时间(s)。

**2.6 动物取材及组织处理** 小鼠以异氟烷诱导进行气体麻醉,用多聚甲醛固定后剥取脑组织后,置于4%多聚甲醛溶液中继续固定24 h,再用15%和30%蔗糖溶液梯度脱水。将脱水后的小鼠脑组织用OCT包埋剂包埋后,用冰冻切片机沿冠状面切为厚度为18 μm的脑片,置于冻存液中。

**2.7 免疫组化(IHC)检测小鼠海马小胶质细胞形态** 采用漂片染色法观察小鼠海马小胶质细胞的表达,磷酸盐缓冲液(PBS)洗去冻存液,加入内源性过氧化物阻断剂室温孵育5 min,PBS清洗,高温加热抗原修复液孵育20 min,静置恢复室温;PBS清洗,0.5%的BSAT室温封闭30 min, TMEM119一抗孵育(0.5%的BSAT 1:400稀释)4℃过夜;复温10 min,0.5% PBST清洗,山羊抗兔二抗(0.5%的BSAT 1:400稀释)室温孵育30 min,0.5% PBST清洗,现配的DAB显色液显色2~10 min后贴片并封片。将脑组织切片置于高倍显微照相系统进行图像采集,每张切片随机选3个高倍视野观察胞体形态有无阿米巴样,并以Image J软件绘制细胞胞体面积并统计。

**2.8 Real-time PCR检测炎症因子TNF-α mRNA表达** 取8~12代细胞接种于6孔板中,按照提取RNA trizol试剂盒说明书,分别提取正常组,LPS组,雷公藤红素低、中、高质量浓度组细胞总RNA,反转录合成cDNA,反应参数为42℃ 60 min,70℃ 5 min;4℃ 2 min。然后按试剂盒说明书进行目的基因和内参基因的PCR反应。目的基因TNF-α及内参基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)序列均由北京赛诺基因组研究中心设计合成,引物序列见表1。反应参数为预变性50℃ 2 min,变性95℃ 10 min,退火95℃ 15 s;延伸60℃ 1 min,循环35次。反应结束后,使用ABI7500 Fast软件分析每个检测样本C<sub>t</sub>值,采用2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法计算各基因mRNA相对表达量。

**2.9 免疫荧光(IF)检测炎症因子TNF-α蛋白表达** 全程避光操作,步骤如下:将传代细胞圆片接种于24孔板中,吸弃上清用PBS清洗,4%多聚甲醛

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequences of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	20
	下游 TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	21
TNF- $\alpha$	上游 CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	21
	下游 -AGGGTCTGGCCATAGA AACT	20

固定 15 min, PBS 清洗, 0.5% 的 PBST 透化 20 min, 0.5% 的 BSAT 封闭 30 min, TNF- $\alpha$  一抗 (0.5% 的 BSAT 1:200 稀释) 孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, 0.5% 的 PBST 清洗; 二抗孵育 1 h, 0.5% 的 PBST 清洗; DAPI(1:1 000) 室温染色 5 min; 贴片、封片; 置于高倍显微照相系统进行图像采集, 观察并统计。

2.10 统计学方法 采用 Image J 软件对上述采集

得到的图片按要求进行相应处理; 采用 Graphpad Prism 8 软件对数据进行统计学分析, 所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对小鼠机械痛敏的影响 与假手术组比较, SNL 模型组小鼠 50% 缩足阈值显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 SNL 模型比较, 雷公藤红素高剂量组小鼠给药 7 d 后 50% 缩足阈值明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 雷公藤红素低、中剂量组小鼠给药后机械痛阈值与 SNL 模型组无显著差异。在给药 16 d 后, 对 SNL 小鼠 50% 缩足阈值和雷公藤红素剂量进行线性回归分析, 发现雷公藤红素缓解 SNL 小鼠机械痛敏呈现剂量依赖性。见表 2。

表2 雷公藤红素对 SNL 模型小鼠 50% 缩足阈值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 2 Effect of celastrol on 50% shrinkage threshold in SNL mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	造模前	给药 1 d	给药 4 d	给药 7 d	给药 10 d	给药 13 d	给药 16 d
假手术	-	0.392 $\pm$ 0.038	0.355 $\pm$ 0.027	0.337 $\pm$ 0.020	0.365 $\pm$ 0.034	0.383 $\pm$ 0.044	0.359 $\pm$ 0.039	0.362 $\pm$ 0.048
SNL 模型	-	0.377 $\pm$ 0.041	0.006 $\pm$ 0.002 <sup>2)</sup>	0.018 $\pm$ 0.001 <sup>2)</sup>	0.021 $\pm$ 0.003 <sup>2)</sup>	0.015 $\pm$ 0.008 <sup>2)</sup>	0.015 $\pm$ 0.010 <sup>2)</sup>	0.021 $\pm$ 0.009 <sup>2)</sup>
普瑞巴林	25	0.379 $\pm$ 0.044	0.027 $\pm$ 0.012	0.081 $\pm$ 0.015 <sup>1)</sup>	0.133 $\pm$ 0.039 <sup>1)</sup>	0.167 $\pm$ 0.022 <sup>2)</sup>	0.201 $\pm$ 0.037 <sup>2)</sup>	0.232 $\pm$ 0.035 <sup>2)</sup>
雷公藤红素	5	0.361 $\pm$ 0.033	0.015 $\pm$ 0.017	0.023 $\pm$ 0.009	0.027 $\pm$ 0.011	0.021 $\pm$ 0.017	0.027 $\pm$ 0.025	0.026 $\pm$ 0.019
	10	0.376 $\pm$ 0.047	0.015 $\pm$ 0.008	0.020 $\pm$ 0.017	0.024 $\pm$ 0.012	0.036 $\pm$ 0.012	0.045 $\pm$ 0.009	0.067 $\pm$ 0.010 <sup>3)</sup>
	20	0.330 $\pm$ 0.037	0.012 $\pm$ 0.002	0.034 $\pm$ 0.009	0.071 $\pm$ 0.013 <sup>3)</sup>	0.094 $\pm$ 0.017 <sup>3)</sup>	0.165 $\pm$ 0.021 <sup>4)</sup>	0.207 $\pm$ 0.032 <sup>4)</sup>

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与 SNL 模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ , <sup>4)</sup> $P < 0.01$  (表 3~5 同)。

3.2 对小鼠焦虑情绪的影响 与假手术组比较, SNL 模型组和普瑞巴林组小鼠旷场中央区停留时间均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 SNL 模型组比较, 雷公藤红素低、中、高剂量组在给药 16 d 后旷场中央区停留时间均明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。对 SNL 小鼠旷场中央区停留时间和雷公藤红素给药剂量进行线性回归分析, 发现雷公藤红素缓解 SNL 小鼠焦虑情绪呈剂量依赖性。见表 3。

3.3 对小鼠抑郁情绪的影响 与假手术组比较, SNL 模型组和普瑞巴林组小鼠造模 16 d 后悬尾停止挣扎时间明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 SNL 模型组比较, 雷公藤红素低、中、高剂量组在给药 16 d 后悬尾停止挣扎时间均明显降低 ( $P < 0.05$ )。对 SNL 小鼠悬尾停止挣扎时间和雷公藤红素剂量进行线性回归分析, 显示雷公藤红素剂量依赖性地缓解 SNL 小鼠抑郁情绪。见表 4。

3.4 对小鼠海马小胶质细胞的影响 与假手术组比较, SNL 模型组小鼠海马小胶质细胞呈阿米巴

表3 雷公藤红素对 SNL 模型小鼠焦虑情绪的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of celastrol on relieving anxiety in SNL mice ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	中心区停留时间/s	
		造模前	给药 16 d
假手术	-	29.09 $\pm$ 2.62	29.09 $\pm$ 2.62
SNL 模型	-	26.09 $\pm$ 6.34	8.16 $\pm$ 1.30 <sup>2)</sup>
普瑞巴林	25	27.84 $\pm$ 9.02	5.39 $\pm$ 0.99 <sup>2)</sup>
雷公藤红素	5	24.99 $\pm$ 6.71	15.41 $\pm$ 1.59 <sup>3)</sup>
	10	25.64 $\pm$ 3.55	17.68 $\pm$ 1.87 <sup>3)</sup>
	20	25.06 $\pm$ 7.05	24.07 $\pm$ 2.62 <sup>4)</sup>

样, 胞体面积显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 SNL 模型组比较, 雷公藤红素低、中剂量组海马小胶质细胞形态和胞体面积差异无统计学意义, 雷公藤红素高剂量组小鼠海马小胶质细胞未见阿米巴样, 胞体面积明显降低 ( $P < 0.05$ )。对海马小胶质细胞胞体面积和雷公藤红素剂量进行线性回归分析, 显示雷公藤红

表4 雷公藤红素对SNL模型小鼠抑郁情绪的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 4 Effect of celastrol on relieving depression in SNL mice ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	停止挣扎时间/s	
		造模前	给药16 d
假手术	-	66.38±5.88	66.38±5.88
SNL模型	-	59.95±11.50	131.10±6.43 <sup>1)</sup>
普瑞巴林	25	62.93±15.65	151.36±10.77 <sup>2)</sup>
雷公藤红素	5	58.79±14.54	98.60±11.55 <sup>3)</sup>
	10	60.05±16.11	92.05±3.75 <sup>3)</sup>
	20	54.35±14.83	86.77±8.02 <sup>3)</sup>

呈剂量依赖性地缓解SNL小鼠海马小胶质细胞的过度激活。见表5,图1。

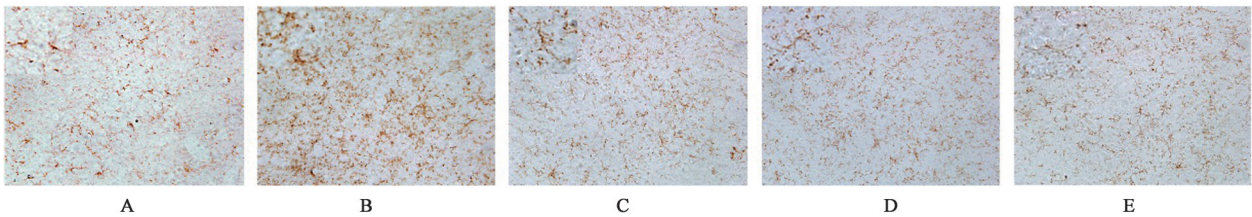
**3.5 对BV2小胶质细胞系TNF- $\alpha$  mRNA的影响** 与正常组比较,1 mg·L<sup>-1</sup>的LPS诱导BV2小胶质细胞后2~4 h, LPS组BV2细胞TNF- $\alpha$

表5 雷公藤红素对海马小胶质细胞的影响( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

Table 5 Effect of celastrol on hippocampal microglia ( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	海马小胶质细胞胞体面积/ $\mu\text{m}^2$
假手术	-	38.10±6.93
SNL模型	-	74.97±16.86 <sup>2)</sup>
雷公藤红素	5	60.11±1.86
	10	53.40±1.23
	20	45.05±3.45 <sup>3)</sup>

mRNA水平显著升高( $P<0.01$ );与LPS组比较,雷公藤红素低、中、高剂量组LPS诱导2~4 h后各组BV2细胞炎症因子TNF- $\alpha$  mRNA水平均显著降低( $P<0.01$ )。见表6。与雷公藤红素低、高剂量组比较,雷公藤红素中剂量组的差异性最明显,故选择100 nmol·L<sup>-1</sup>剂量的雷公藤红素进行后续实验。



A. 假手术组; B. SNL模型组; C. 雷公藤红素低剂量组; D. 雷公藤红素中剂量组; E. 雷公藤红素高剂量组

图1 雷公藤红素对海马小胶质细胞胞体的影响(免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of celastrol on cell area on hippocampal microglia (IHC,  $\times 400$ )

表6 雷公藤红素对BV2小胶质细胞系TNF- $\alpha$  mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of celastrol on TNF- $\alpha$  mRNA expression in BV2 microglia ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/nmol·L <sup>-1</sup>	0 h	2 h	4 h	6 h	12 h
正常	-	0.21±0.07	0.20±0.13	0.18±0.11	0.24±0.08	0.19±0.10
LPS	1 <sup>5)</sup>	0.19±0.09	1.63±0.21 <sup>2)</sup>	0.97±0.09 <sup>2)</sup>	0.37±0.14	0.19±0.11
雷公藤红素	50+1 <sup>5)</sup>	0.22±0.12	0.23±0.19 <sup>4)</sup>	0.17±0.15 <sup>4)</sup>	0.15±0.21	0.14±0.18
	100+1 <sup>5)</sup>	0.21±0.11	0.29±0.08 <sup>4)</sup>	0.27±0.02 <sup>4)</sup>	0.23±0.14	0.16±0.11
	200+1 <sup>5)</sup>	0.20±0.08	0.28±0.15 <sup>4)</sup>	0.15±0.09 <sup>4)</sup>	0.17±0.10	0.14±0.06

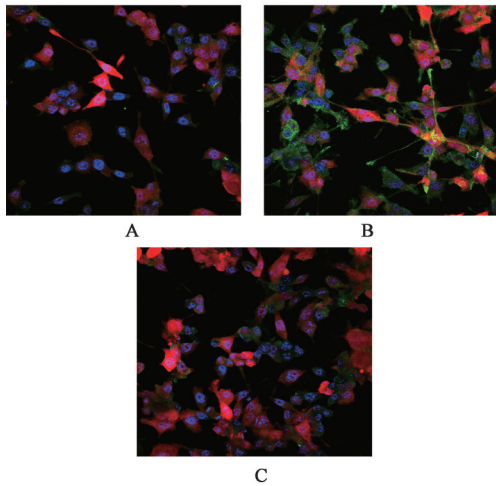
注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与LPS组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ ;<sup>5)</sup>质量浓度单位为mg·L<sup>-1</sup>。

**3.6 对BV2小胶质细胞系TNF- $\alpha$ 蛋白的影响** 与正常组(3 431±404.2)比较,LPS组红色荧光和绿色荧光比例显著增加,提示LPS组BV2细胞和TNF- $\alpha$ 蛋白表达显著升高(4 588±520.4,  $P<0.01$ );与LPS组比较,100 nmol·L<sup>-1</sup>雷公藤红素可显著降低LPS诱导后红色荧光和绿色荧光比例的增加,提示100 nmol·L<sup>-1</sup>雷公藤红素组BV2细胞和炎症因子TNF- $\alpha$ 蛋白表达显著降低(2 688±233.3,  $P<0.01$ )。见图2。

#### 4 讨论

临床治疗NP的一线镇痛药物多是单靶向设计,在短期具有较好的镇痛效果,但随用药时间的延长药效逐渐降低甚至消失,且常伴有诸如睡眠、情绪等严重的副反应<sup>[18]</sup>。因此,规避现有单靶向药物的弊端,抓住痛与情绪共病的关键病机、设计具有多靶向整合治疗的新药成为研究的关键。

雷公藤红素为雷公藤的主要活性成分之一,临床主要用来治疗类风湿性关节炎、炎症性肠病等免疫性疾病<sup>[19]</sup>。雷公藤红素在抗炎免疫方面的进展



A. 正常组; B. LPS组; C.  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  雷公藤红素组; 蓝色为 Dapi; 绿色为 TNF- $\alpha$ ; 红色为 BV2

图2 雷公藤红素对BV2细胞TNF- $\alpha$ 蛋白的影响(免疫荧光,  $\times 400$ )  
Fig. 2 Effect of celastrol on BV2 cell in TNF- $\alpha$  protein(IF,  $\times 400$ )

绝大多数研究都停留在外周,对中枢抗炎免疫研究鲜有报道。近几年有研究显示,雷公藤红素对代谢性疾病如肥胖症、神经退行性疾病如阿尔兹海默病、帕金森病、脑缺血和实验性自身免疫性脑脊髓炎等疾病有一定的治疗作用<sup>[20-26]</sup>,显示出雷公藤红素具有潜在的中枢保护作用。本研究在成功构建NP痛与情绪共病SNL小鼠模型的基础上,明确了雷公藤红素呈剂量依赖性的增加SNL模型小鼠的机械痛阈值和旷场中心场停留时间,减少其悬尾停止挣扎时间,显示出雷公藤红素具有显著的痛与抑郁、焦虑共治的药效。

课题组前期研究显示,海马小胶质细胞的异常激活既是NP痛与情绪共病的关键诱因,也可能是药物达到痛与情绪共治的关键途径<sup>[27]</sup>。因此本研究从雷公藤红素对中枢海马小胶质细胞的调控入手,探究雷公藤红素缓解NP痛及焦虑、抑郁情绪的共病与海马小胶质细胞过度激活调控的相关性。在体外研究中,发现雷公藤红素能显著抑制LPS诱发的TNF- $\alpha$  mRNA及蛋白表达的异常升高,提示雷公藤红素对小胶质细胞的调控与其抑制TNF- $\alpha$ 转录翻译密切相关。

本研究首次从中枢抗炎免疫角度探究雷公藤红素治疗NP的中枢机制,并通过体内脑组织及体外细胞系明确了雷公藤红素对NP痛与情绪障碍共治的药效特点,相关研究结果将有利于进一步揭示中药雷公藤活性成分的抗炎免疫分子作用机制。

#### [参考文献]

- [1] JENSEN T S, BARON R, HAANPAA M, et al. A new definition of neuropathic pain [J]. Pain, 2011, 152 (10):2204-2205.
- [2] RADAT F, MARGOT-DUCLOT A, ATTAL N. Psychiatric co-morbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicenter cohort study [J]. Pain, 2013, 17(10):1547-1557.
- [3] WANG C, KONG X, ZHU C, et al. Wu-tou decoction attenuates neuropathic pain via suppressing spinal astrocytic IL-1R1/TRAF6/JNK signaling [J]. Oncotarget, 2017, 8(54):64-79.
- [4] 毛志云, 许琼虹, 朱春燕, 等. 乌头汤改善下行抑制系统损伤以缓解神经病理性疼痛的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(5):82-87.
- [5] ZHANG Y, PAOLICELLI R C, SFORAZZINI F, et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior[J]. Nat. Neurosci, 2014, 17(3):400-406.
- [6] KORHONEN T, KARPPINEN J, PAIMELA L, et al. The treatment of discherniation-induced sciatica with infliximab: results of a randomized, controlled, 3-month follow-up study[J]. Spine, 2005, 30(24):2724-2728.
- [7] MARTUSCELLO R T, SPENGLER R N, BONOIU A C, et al. Increasing TNF levels solely in the rat hippocampus produces persistent pain-like symptoms [J]. Pain, 2012, 153(9):1871-1882.
- [8] DELLAROLE A, MORTON P, BRAMBILLA R, et al. Neuropathic pain-in-duced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling [J]. Brain Behav Immun, 2014, 4(41):65-81.
- [9] 孙新, 张素敏, 田春华, 等. 雷公藤及其安全性[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(7):539-543.
- [10] CASCAO R, FONSECA J. Celastrol: a spectrum of treatment opportunities in chronic diseases [J]. Front Med, 2017, doi:10.3389/fmed.2017.00069.
- [11] 任春晓. 雷公藤的药理基础及其制剂的研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2010, 23(2):160-162.
- [12] 胡凯, 葛卫红. 雷公藤红素药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2012, 8(11):179-181.
- [13] LIU J, LEE J S, HERNANDEZ M, et al. Treatment of obesity with celastrol [J]. Cell, 2015, 161(5):999-1011.
- [14] KIM J E, LEE M L, NAM D H, et al. Celastrol, an NF-kappaB inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice [J]. PLoS One,

- 2013, 8(4):62068.
- [15] 龚建军, 胡永胜. 雷公藤红素对神经胶质瘤U87细胞增殖、凋亡和迁移的影响[J]. 中草药, 2017, 48(24): 5194-5199.
- [16] KIM S, CHUANG J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. Pain, 1992, 50 (3) : 355-363.
- [17] 李剑明, 姜泉, 唐晓颇, 等. 雷公藤及其提取物对类风湿关节炎固有免疫系统调节的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16):3384-3390.
- [18] BOUHASSIRA D, LANTERI-MINET M, ATTAL N, et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population[J]. Pain, 2008, 136(3):380-387.
- [19] LIANG J, CHEN L, PAN Y, et al. Systematic understanding the mechanisms of *Tripterygium wilfordii* on atherosclerosis and pharmacodynamics research in Apo mice model [J]. Pharmacogn Mag, 2018, 14(14):624-633.
- [20] CHEN S, DAI Y, ZHAO J, et al. A mechanistic overview of triptolide and celastrol, natural products from *Tripterygium wilfordii* Hook F [J]. Front Pharmacol, 2018, 2(14):14-27.
- [21] RITA C, BRUNO V, INES P, et al. Decrease of CD68 synovial macrophages in celastrol treated arthritic rats [J]. PLoS One, 2015, 10(12):e0142448.
- [22] 胡高峰, 程魁红, 黄贤芬, 等. 雷公藤红素通过抑制氧化应激对脑缺血再灌注损伤的保护研究[J]. 赣南医学院学报, 2018, 38(10):968-971.
- [23] JIANG M, LIU S H, ZHANG D H, et al. Celastrol treatment protects against acute ischemic stroke-induced brain injury by promoting an IL-33/ST2 axis-mediated microglia/macrophage M2 polarization [J]. Neuroinflammation, 2018, doi: 10.1186/s12974-018-1124-6.
- [24] LUO D. Natural product celastrol suppressed macrophage M1 polarization against inflammation in diet-induced obese mice via regulating Nrf2/HO-1, MAP kinase and NF-kappaB pathways [J]. Aging, 2017, doi:10.18632/aging.101302.
- [25] FENG X D, GUAN D X, AUEN T, et al. IL1R1 is required for celastrol's leptin-sensitization and antiobesity effects [J]. Nat Med, 2019, 25 (4) : 575-582.
- [26] BIAN M, DU X Y, CUI G J, et al. Celastrol protects mouse retinas from bright light-induced degeneration through inhibition of oxidative stress and inflammation [J]. Neuroinflammation, 2016, 13(1):50.
- [27] ZHU C, XU Q, WANG C, et al. Evidence that CA3 is Underling the comorbidity between pain and depression and the co-curation by Wu-Tou decoction in neuropathic pain[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):11935.
- [责任编辑 孙丛丛]