

## 柴胡桂枝汤减轻慢性胰腺炎神经性腹痛机制的探讨

李赛楠<sup>1</sup>, 张桂贤<sup>2\*</sup>, 沈洪昇<sup>2</sup>, 王曼雪<sup>2</sup>, 李锡晶<sup>2</sup>, 李霞<sup>2</sup>, 李文畅<sup>2</sup>, 肖懿<sup>1</sup>, 刘洪斌<sup>2\*</sup>

(1. 天津医科大学 研究生院, 天津 300070; 2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020)

**[摘要]** 目的:探讨柴胡桂枝汤(CHGZT)减轻三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠慢性胰腺炎(CP)神经性腹痛的初步机制。方法:50只雄性SD大鼠随机均分为5组,分别为假手术组、模型组、CHGZT低、中、高剂量组(4、8、16 g·kg<sup>-1</sup>)。假手术组轻轻翻动胰腺后即关腹,模型组采用向胰管内逆行注射2% TNBS-10%乙醇。CHGZT在造模后4周开始灌胃给药,连续2周。5组大鼠分别于术后6周进行Von Frey疼痛阈值检测;苏木素-伊红(HE)染色评估胰腺组织慢性炎症及纤维化病变;免疫组化法(IHC)检测PGP9.5蛋白表达,同时观察神经周围炎性改变;IHC及免疫荧光(IF)染色观察胰腺相关胸段脊髓后角离子钙结合蛋白-1(Iba-1)、嘌呤能受体P2X7(P2RX7)的定位及P2RX7和小胶质细胞的共表达。结果:与假手术组比较,模型大鼠胰腺组织腺泡萎缩评分、炎性浸润评分、纤维化评分显著增高( $P<0.01$ ),大鼠在不同力值疼痛反应值均明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),PGP9.5周围炎性浸润评分显著升高( $P<0.01$ ),模型组大鼠脊髓后角Iba-1与P2RX7表达均显著增强( $P<0.01$ );与模型组比较,CHGZT高、中剂量组明显降低大鼠胰腺组织腺泡萎缩评分、炎性浸润评分、纤维化评分,明显降低疼痛反应值,明显降低PGP9.5周围炎性浸润评分( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),CHGZT高、中、低剂量组显著降低Iba-1及P2RX7表达( $P<0.01$ )。结论:CHGZT可明显减轻CP模型大鼠腹痛程度,可能和通过抑制胰腺内神经炎症、降低相应脊髓后角小胶质细胞P2RX7活化有关。

**[关键词]** 慢性胰腺炎; 柴胡桂枝汤; 小胶质细胞; 巨噬细胞; 神经性疼痛; 神经炎; 嘌呤能受体P2X7(P2RX7)

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0040-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221407

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220713.1752.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-07-15 10:20

### Chaihu Guizhitang Attenuates Neuropathic Abdominal Pain of Chronic Pancreatitis

LI Sainan<sup>1</sup>, ZHANG Guixian<sup>2\*</sup>, SHEN Hongsheng<sup>2</sup>, WANG Manxue<sup>2</sup>, LI Xijing<sup>2</sup>, LI Xia<sup>2</sup>,  
LI Wenchang<sup>2</sup>, XIAO Yi<sup>1</sup>, LIU Hongbin<sup>2\*</sup>

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Chaihu Guizhitang (CHGZT) in alleviating neuropathic abdominal pain induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats with chronic pancreatitis (CP). **Method:** Fifty male SD rats were randomly assigned into five groups: sham operation, CP model, and low-, medium-, and high-dose (4, 8, and 16 g·kg<sup>-1</sup>, respectively) CHGZT groups. In the sham operation group, the abdomen was closed after the pancreas was gently stirred. The rat model of CP was established by retrograde injection of 2% TNBS-10% ethanol into the pancreatic duct. The oral administration of CHGZT started 4 weeks after modeling and lasted for 2 weeks. Pain threshold was measured by Von Frey fibers 6 weeks after surgery. Hematoxylin-eosin (HE) staining was employed to reveal the chronic inflammation and

**[收稿日期]** 2022-03-29

**[基金项目]** 天津市卫健委、天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(2021165);天津市科技计划项目(21JCZDJC01220)

**[第一作者]** 李赛楠,在读硕士,从事慢性胰腺炎药理学研究,E-mail:1015740473@qq.com

**[通信作者]** \*刘洪斌,博士,研究员,从事中西医结合治疗肝胆胰疾病的药理学研究,E-mail:jtss@sina.com;

\*张桂贤,助理研究员,从事急、慢性胰腺炎的药理学研究,E-mail:zhangguixian2007@aliyun.com

fibrosis of the pancreatic tissue. Immunohistochemistry (IHC) was employed to detect the expression of PGP9.5 (a marker of pancreatic nerves) and reveal the inflammatory changes around the nerves. IHC and immunofluorescence (IF) were used to determine the location of ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (Iba-1, microglia marker) and purinergic receptor P2X7 (P2RX7) and the co-expression of P2RX7 and Iba-1 in the thoracic spinal dorsal horn. **Result:** Compared with the sham operation group, the modeling increased the scores of pancreatic gland atrophy, inflammatory infiltration, and fibrosis ( $P<0.01$ ), the abdominal pain response under different force values ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), and the score of peripancreatic inflammation. Moreover, the modeling up-regulated the expression of Iba-1 and P2RX7 in the thoracic spinal dorsal horn ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the high- and medium-dose CHGZT lowered the scores of pancreatic gland atrophy, inflammatory infiltration, and fibrosis, the abdominal pain response, and the score of peripancreatic inflammation ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). The high-, medium-, and low-dose CHGZT all down-regulated the expression of Iba-1 and P2RX7 ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** CHGZT can significantly relieve abdominal pain in CP rat by suppressing the inflammation around nerves in the pancreas and the P2RX7 activation of microglia in the spinal dorsal horn.

**[Keywords]** chronic pancreatitis; Chaihu Guizhitang; microglia; macrophages; neuropathic pain; neuritis; purinergic receptor P2X7 (P2RX7)

慢性胰腺炎(CP)是一种反复发作的纤维化炎症综合征<sup>[1]</sup>,腹痛是CP的主要症状,这种疼痛往往呈进展性,甚至增加罹患胰腺癌的风险<sup>[2]</sup>。长期反复发作的腹痛造成患者巨大的心理和经济负担,严重降低了生活质量和预期寿命<sup>[3]</sup>。目前关于疼痛发生的机制尚不明确,大家较为接受的观点包括组织损伤、胰腺炎症、氧化应激、胰管狭窄、胰管或胰腺间质内压升高、胰外并发假性囊肿、门静脉血栓形成、胆管、十二指肠狭窄和消化道溃疡<sup>[4]</sup>及近些年来被研究最多的神经源性疼痛<sup>[5]</sup>。临床上针对上述病理机制的疼痛治疗仍十分棘手,内科治疗包括非甾体类抗炎药、阿片类镇痛药等,但是这类药物往往因为不良反应导致其作用极其有限<sup>[6]</sup>。对于大部分存在胰腺形态改变的CP患者,不管是内镜治疗还是早期的外科手术,都存在手术风险和并发症问题。因此寻求一种效果好,创伤小,经济而方便的缓解疼痛的治疗方法尤为重要。

柴胡桂枝汤(CHGZT)是《伤寒论》中治疗太阳少阳合病的经典方剂,《伤寒论》中第146条论述:“伤寒六七日,发热微恶寒,肢节烦疼,微呕,心下支结,外证未去者,柴胡桂枝汤主之。”而《金匱要略·腹满寒疝宿食病脉证治》中则记载了柴胡桂枝汤的另一功效:“柴胡桂枝汤方:治心腹卒中痛者”。现代诸多医家用CHGZT治疗躯体疼痛<sup>[7-8]</sup>及癌性疼痛<sup>[9]</sup>,由此推知CHGZT是一个止痛良方。

结合近年研究及对祖国医学的辨证理解,在三硝基苯磺酸(TNBS)诱导CP的基础上,通过疼痛行

为学、病理学及分子生物学等实验观察CHGZT神经性疼痛中的作用及机制,为以神经炎性反应为靶点的慢性疼痛性疾病提供新的临床理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD雄性大鼠50只,体质量(260±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SYXK(津)2021-0005。饲养条件:温度(22±3)℃,相对湿度(50±10)%,饲养环境12h光照与黑暗交替循环,自由进食、饮水。本动物实验经天津市医药科学研究所动物伦理委员会批准进行,编号IMPS-EAEP-Z-KTSB-202204。

**1.2 药物** CHGZT《伤寒论》中原方[柴胡四两(12g)、桂枝(去皮)一两半(4.5g)、黄芩一两半(4.5g)、人参一两半(4.5g)、甘草(炙)一两(3g)、半夏二合半(洗)(6g)、芍药一两半(4.5g)、大枣6枚(擘)4.5g、生姜一两半(切)(4.5g),均购自天津中药饮片厂有限公司,批号分别为G20003001、2012106-01、G201201102、2106057-01、G2010005-01、G210601301、G2005045-01、G200901-02、2010006-07]。提取工艺为取柴胡978g、桂枝366g、黄芩366g、人参366g、甘草244g、半夏490g、芍药366g、大枣375g、生姜366g,浸泡40min,加8倍量的水,煎煮40min,滤过,同法煎煮3次。水煎剂经过浓缩,终体积为1400mL,约3g·mL<sup>-1</sup>,分装备用。

**1.3 试剂** TNBS(美国Sigma公司,批号P2297),波恩氏液(Bouin固定液,福州飞净生物科技有限公司,批号20211010),苏木素染色液、伊红染料(珠海

贝索生物技术有限公司,货号分别为BA4041、BA4024),胰腺神经标志蛋白基因产物9.5(PGP9.5,美国CST公司,货号#13179S),嘌呤能2X7受体(P2RX7,华安生物,货号ER1919-21),离子钙结合衔接分子-1(Iba-1)、山羊抗小鼠荧光二抗(美国Abcam公司,货号分别为ab283319、ab197499),兔SP试剂盒、小鼠SP试剂盒(兔链霉卵白素-生物素法检测系统、DAB显色试剂盒(20×)、抗体稀释液(北京中杉金桥公司,批号分别为2122B0924、2023E1103、202301228、19082903),山羊抗兔荧光二抗(美国CST公司,货号4412S),4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,北京索莱宝科技有限公司,货号C0065),抗荧光淬灭封片剂(上海碧云天生物技术有限公司,货号P0126)。

**1.4 仪器** Von Frey型纤维丝测痛仪(美国North Coast Medical公司),Tissue-Tek®TEC®5型组织包埋机(日本樱花公司),HI1220型烘片机、RM2235型轮转式切片机、H1210型水浴摊片机(德国Leica公司),CX41型微图HTC1600正置显微镜(日本Olympus公司),LSM型共聚焦显微镜(德国Zeiss公司)。

## 2 方法

**2.1 CP大鼠模型制备** 将50只雄性SD大鼠随机分为5组,分别为假手术组、模型组、CHGZT低、中、高剂量组,按照参考文献[10]的方法,实验前12 h禁食不禁水,术前麻醉,开腹后将假手术外的各组向胰管内逆行注射2% TNBS-10%乙醇-磷酸盐缓冲液(PBS)溶液,共0.4 mL,速率0.5 mL/30 min,制备CP模型。待动物苏醒后将其放回鼠笼,注意观察生命体征的改变。

**2.2 给药剂量及时间** CHGZT组按低、中、高剂量(4、8、16 g·kg<sup>-1</sup>生药)在造模4周后开始灌胃治疗,每日2次,连续2周。假手术组开腹轻轻翻动腹腔脏器,给予等体积的0.9%的NaCl溶液。

**2.3 标本的采集及处理** 6周后,所有动物禁食不禁水12 h,将所有动物脱颈处死,留取各组大鼠的胰腺、脊髓于波恩氏液中固定。

**2.4 疼痛行为学测试<sup>[11]</sup>** 术前刮去腹部毛发,标记刺激部位,在一网状地板的笼子中放置实验大鼠,测试前予30 min的适应时间。用Von Frey纤维直径为4.74 mm,纤毛接触皮肤后略用力,纤毛头端弯曲成90度,持续刺激1~2 s,每次间隔10 s,以便实验动物能否恢复相对正常状态,连续测10次,记录阳性反应(即收缩反应)的百分比。每周检测1次,第

6周时应用不同的Von Frey纤维直径(4.74、4.93、5.07、5.18、5.46、5.88 mm)从小到大重复上述实验。

**2.5 苏木素-伊红(HE)染色观察胰腺组织的病理学变化** Bouin液固定10 h后75%乙醇过夜,常规脱水、包埋、切片3 μm,石蜡切片常规脱蜡,苏木素染色,自来水返蓝,1%盐酸乙醇分化,伊红染色,梯度乙醇、二甲苯透明,中性树胶封片,光镜下观察。

**2.6 免疫组化(IHC)检测胰腺PGP9.5、脊髓后角小胶质细胞Iba-1及P2RX7表达** 将组织切片置于65℃烤箱中烘烤2 h,取出后冷却至室温,分散放置切片架中,二甲苯及乙醇梯度体积分数脱水后,蒸馏水冲洗片刻,放置于PBS中,然后将切片置于枸橼酸钠缓冲液中进行抗原修复,山羊血清封闭。PGP9.5、Iba-1、P2RX7用抗体稀释液稀释至1:600,4℃湿盒孵育过夜。待湿盒复温后PBS漂洗,分别滴加适量山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗、三抗,DAB显色,自来水冲洗。苏木素复染。二甲苯、乙醇梯度脱水、透明,中性树胶封片,显微镜下观察。

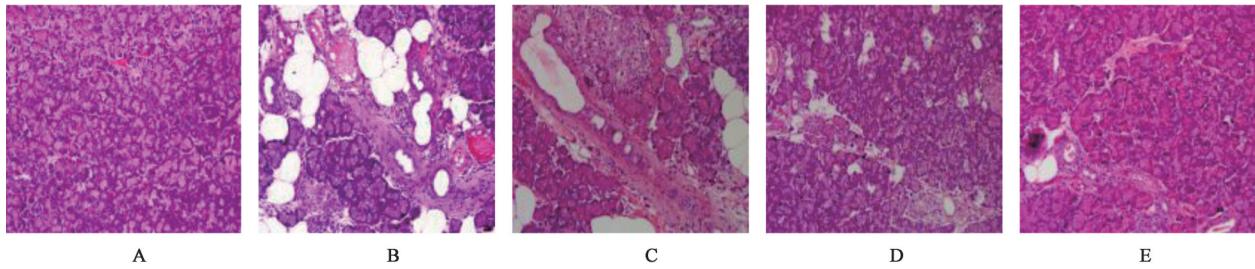
**2.7 免疫荧光(IF)观察脊髓后角小胶质细胞P2RX7表达** 操作步骤同IHC,不同之处在于两种荧光二抗需各自孵育4℃过夜,漂洗后用含DAPI抗荧光淬灭剂进行封片,采用共聚焦显微镜进行观察。

**2.8 统计学分析** 采用SPSS 25.0进行数据分析,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对CP大鼠胰腺组织病理学的影响** 采用MIYAMOTO等<sup>[12]</sup>的胰腺组织学评分标准评估胰腺组织病理改变。在光镜下,假手术组的胰腺组织细胞排列紧密、结构清晰、胞浆丰富、胰岛结构完整且胰导管无组织病理学改变;与假手术组比较,模型组CP大鼠胰腺组织腺泡细胞大量减少、萎缩、明显的炎症浸润、胰管周围及小叶内出现不同程度的纤维化,腺泡萎缩评分、炎性浸润评分、纤维化评分显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,CHGZT低剂量组变化差异无统计学意义,CHGZT中、高剂量组大鼠病理学镜下表现及相关评分均明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图1、表1。

**3.2 对CP大鼠机械性疼痛反应值的影响** 与假手术组比较,CP模型组大鼠的疼痛反应值6 g力到60 g力均明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型组比较,CHGZT高剂量组明显降低CP大鼠机械性疼痛反应值( $P < 0.05$ ),CHGZT中剂量组显著降低CP大



注:A.假手术组;B.模型组;C.CHGZT低剂量组;D.CHGZT中剂量组;E.CHGZT高剂量组(图2-图4同)

图1 CHGZT对CP大鼠胰腺组织病理学的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of CHGZT on pancreatic histopathology in CP rats (HE, ×200)

表1 CHGZT对CP大鼠模型胰腺组织病理学评分的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effect of CHGZT on pancreatic histopathological score of CP rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ ) 分

组别	剂量/ g·kg <sup>-1</sup>	腺泡萎缩 评分	炎性浸润 评分	纤维化评分
假手术组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		2.82±0.42 <sup>1)</sup>	3.86±0.32 <sup>1)</sup>	3.76±0.63 <sup>1)</sup>
CHGZT低剂量组	4	2.65±0.48	3.74±0.48	3.41±0.97
CHGZT中剂量组	8	2.14±0.32 <sup>2)</sup>	3.02±0.42 <sup>3)</sup>	3.76±1.03 <sup>2)</sup>
CHGZT高剂量组	16	1.30±0.48 <sup>3)</sup>	1.38±0.52 <sup>3)</sup>	1.84±0.63 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ (表3同)

鼠机械性疼痛6g、8g、26g、60g力的反应值( $P<0.01$ ),低剂量组差异无统计学意义。见表2。

表2 CHGZT对CP大鼠机械性疼痛反应值的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 Effect of CHGZT on mechanical pain response value in CP rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	6g力反应值	8g力反应值	10g力反应值	15g力反应值	26g力反应值	60g力反应值
假手术组		0.22±0.08	0.24±0.09	0.27±0.13	0.30±0.09	0.45±0.17	0.50±0.19
模型组		0.54±0.19 <sup>1)</sup>	0.56±0.13 <sup>2)</sup>	0.60±0.15 <sup>2)</sup>	0.66±0.19 <sup>1)</sup>	0.81±0.13 <sup>2)</sup>	0.90±0.08 <sup>2)</sup>
CHGZT低剂量组	4	0.55±0.11	0.56±0.23	0.58±0.13	0.63±0.23	0.73±0.13	0.79±0.16
CHGZT中剂量组	8	0.30±0.19 <sup>4)</sup>	0.44±0.07 <sup>4)</sup>	0.50±0.19	0.54±0.12	0.62±0.17 <sup>4)</sup>	0.68±0.15 <sup>4)</sup>
CHGZT高剂量组	16	0.25±0.14 <sup>3)</sup>	0.25±0.09 <sup>3)</sup>	0.30±0.13 <sup>3)</sup>	0.32±0.15 <sup>3)</sup>	0.40±0.13 <sup>3)</sup>	0.60±0.16 <sup>3)</sup>

注:与假手术比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$

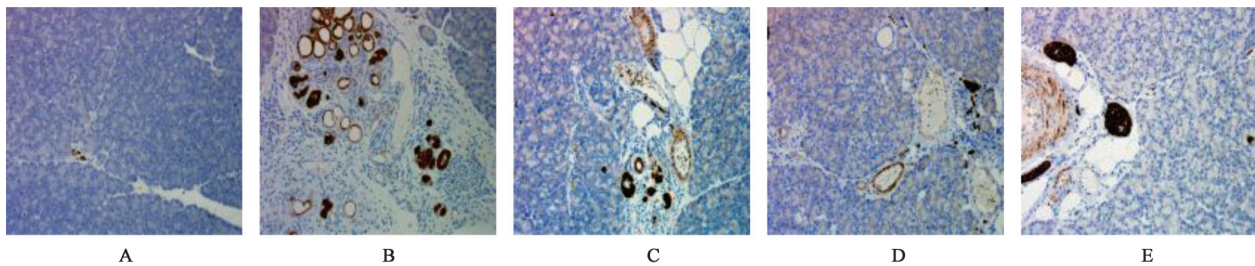


图2 CHGZT对CP大鼠胰腺神经周围PGP9.5蛋白表达和炎症的影响(IHC,×200)

Fig. 2 Effect of CHGZT on PGP9.5 protein expression and peripancreatic nerve inflammation in CP rats (IHC, ×200)

#### 4 讨论

在本研究中,通过行为学、病理学及分子生物

3.3 对CP大鼠胰腺神经周围PGP9.5蛋白表达和炎症的影响 与假手术组比较,CP大鼠胰腺神经周围PGP9.5的表达量显著升高,并且周围伴有慢性神经炎性细胞浸润评分显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,CHGZT各剂量组PGP9.5的表达差异无统计学意义,以及神经干周围的神经炎性细胞浸润评分明显减少( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。见图2、表3。

3.4 对CP大鼠脊髓后角上Iba和P2RX7阳性表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脊髓后角Iba和P2RX7蛋白和荧光强度表达显著升高,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ );与模型组比较,经过CHGZT治疗后显著降低Iba和P2RX7蛋白和荧光强度表达,差异有显著统计学意义( $P<0.01$ )。见图3、图4和表4。

学方法探讨了CHGZT减轻CP神经性腹痛的初步机制。结果显示,①在TNBS诱导的CP腹痛模型

表3 CHGZT对CP大鼠胰腺神经周围PGP9.5蛋白表达和炎症评分的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of CHGZT on PGP9.5 protein expression and peripancreatic nerve inflammation score in CP rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	PGP9.5	PGP9.5周围炎性浸润评分/分
假手术组		13.22±0.38	0.00±0.00
模型组		46.64±0.75 <sup>1)</sup>	3.78±0.42 <sup>1)</sup>
CHGZT低剂量组	4	42.55±1.54	3.43±0.70 <sup>2)</sup>
CHGZT中剂量组	8	45.49±0.72	2.64±0.52 <sup>3)</sup>
CHGZT高剂量组	16	43.36±1.72	1.01±0.42 <sup>3)</sup>

中,胰腺内神经的增多、增粗及神经周围的炎性浸润与疼痛的严重程度及胰腺的病理严重程度相关。②伴随疼痛反应值的降低,在胰腺神经支配胸段脊髓后角中,IHC和IF均证实小胶质细胞发生显著活

化,同时小胶质细胞上的P2RX7的表达显著升高。③经CHGZT治疗后,模型组大鼠胰腺病理改变减轻、Von Frey疼痛反应值降低、胰腺内神经炎症减轻、小胶质细胞的活化降低及P2RX7表达减少,这些结果提示CHGZT可能通过抑制CP的胰腺内神经炎症并降低脊髓中枢敏化,从而减轻CP大鼠慢性腹痛。

近年来有研究表明在CP中,慢性炎症细胞浸润会导致神经炎性损伤,这些损伤包括神经肥大、神经纤维的数量、直径、密度增加、交感和副交感神经比例的切换及纤维化、神经营养因子、神经肽的含量发生改变<sup>[13-14]</sup>,从而形成复杂的神经病理性疼痛。持续增加的外周痛觉导致中枢疼痛传递神经元的反应性增加,形成中枢性敏化,即在强烈的外周伤害性刺激、组织损伤或神经损伤后,持续的外

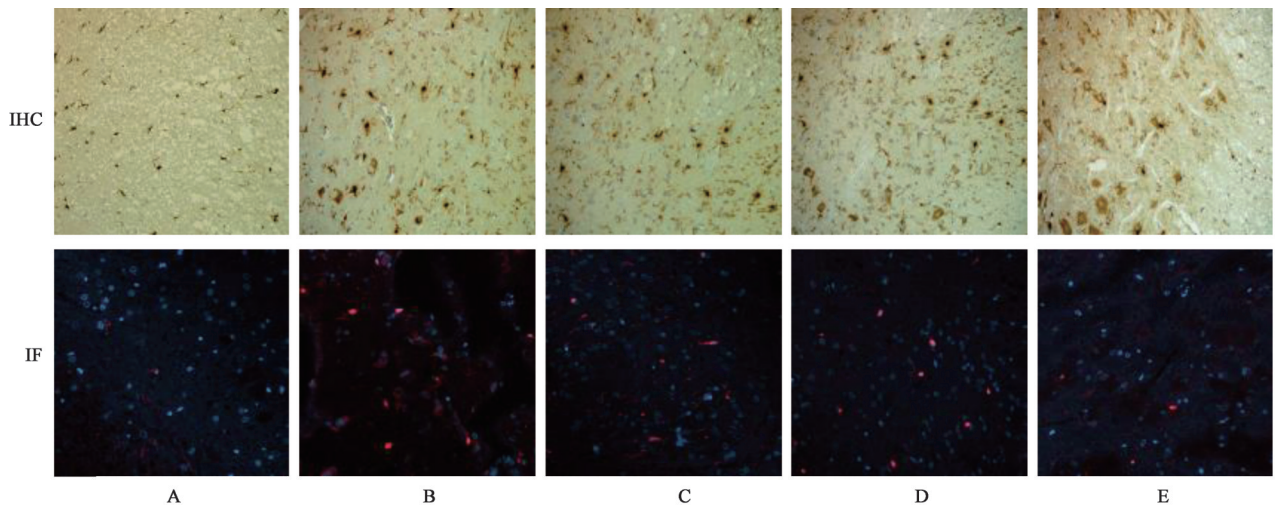


图3 CHGZT对CP大鼠脊髓后角上小胶质细胞状态、数量的影响( $\times 200$ )

Fig. 3 Effect of CHGZT on microglia status and quantity in posterior horn of spinal cord ( $\times 200$ )

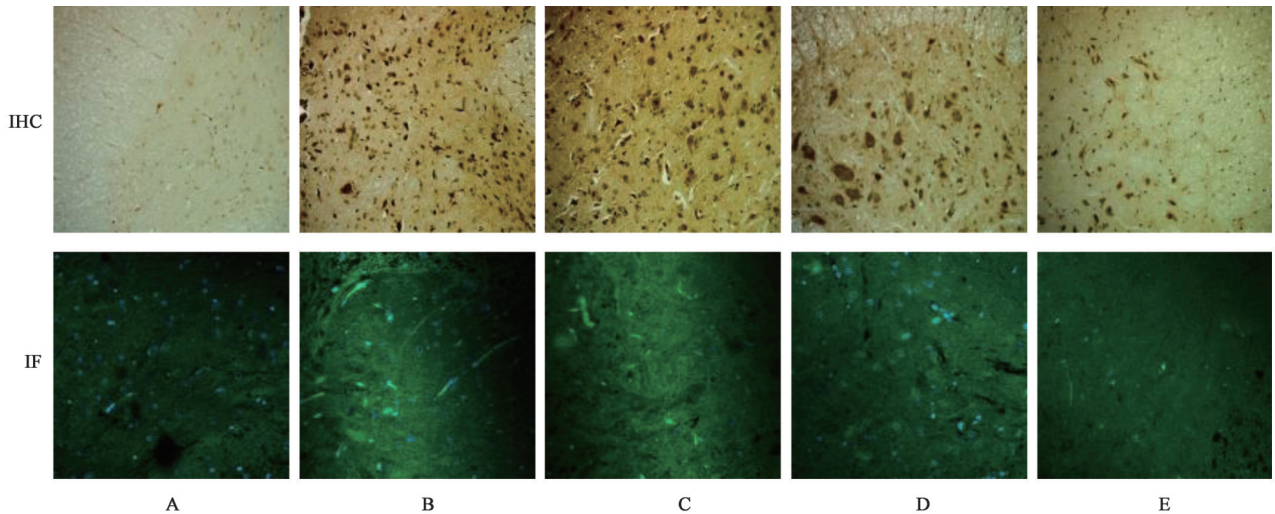


图4 CHGZT对CP大鼠脊髓后角小胶质细胞P2RX7表达的影响( $\times 200$ )

Fig. 4 Effect of CHGZT on expression of P2RX7 in microglia of spinal cord posterior horn ( $\times 200$ )

表4 CHGZT对CP大鼠脊髓后角上Iba和P2RX7阳性表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of CHGZT on Iba and P2RX7 expression in posterior horn of spinal cord ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Iba		P2RX7	
		蛋白	荧光强度	蛋白	荧光强度
假手术组		56.12±0.53	7.07±0.82	2.57±0.40	5.60±0.79
模型组		78.57±0.80 <sup>1)</sup>	55.89±1.01 <sup>1)</sup>	91.52±0.76 <sup>1)</sup>	72.54±1.90 <sup>1)</sup>
CHGZT低剂量组	4	75.64±1.00 <sup>2)</sup>	40.28±1.28 <sup>2)</sup>	79.54±1.10 <sup>2)</sup>	59.36±2.11 <sup>2)</sup>
CHGZT中剂量组	8	55.68±0.67 <sup>2)</sup>	34.62±1.86 <sup>2)</sup>	58.76±1.20 <sup>2)</sup>	44.88±3.91 <sup>2)</sup>
CHGZT高剂量组	16	46.02±0.87 <sup>2)</sup>	12.89±1.74 <sup>2)</sup>	28.04±0.86 <sup>2)</sup>	21.29±1.84 <sup>2)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>2)</sup>P<0.01

周刺激导致脊髓神经元的兴奋性长期增加,疼痛处理不再与伤害性外周刺激的存在、强度或持续时间同步<sup>[15]</sup>。上消化道器官的内脏敏感性(与胰腺共享脊髓神经支配)可作为脊髓致敏的标志,在一项研究中,与对照组相比,CP患者食管、胃和十二指肠电刺激引起的牵涉性疼痛区域增加<sup>[16]</sup>。LIU等<sup>[17]</sup>研究表明发生在脊髓后角“长时程增强”效应机制和这种神经元的可塑性变化有关。结合前人研究,在对PGP9.5胰腺神经的染色基础上,同时观察了神经周围的炎性改变,胰腺内神经的肥大、增多、增粗与先前研究一致,但尚缺乏进一步探究胰腺内交感和副交感神经重塑的关系以及对脊髓后角突触传递长时程增强的观察。P2RX7是嘌呤能受体家族中的一员,在炎性通路活化中发挥着重要作用,细胞外ATP激活P2RX7受体,开放通道,允许小阳离子通过,包括Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>,进而调控NLRP3炎症小体的组装促进下游促炎介质的释放,如IL-1 $\beta$ ,从而诱发多种炎症性疾病。本课题组也发现P2RX7拮抗剂可抑制胰腺的慢性炎症及纤维化<sup>[18]</sup>。近年来脊髓中的星型胶质细胞及小胶质细胞被证明与CP的神经疼痛相关<sup>[19-20]</sup>。DUAN等<sup>[21]</sup>也证明了星型胶质细胞上存在P2RX7,提示在某些病理条件下P2RX7可能在星型胶质细胞上发挥生物学功能。在本实验中观察到P2RX7和小胶质细胞形态学标志物Iba明显发生改变,但是仍不能排除星型胶质细胞上P2RX7的存在及其在CHGZT治疗CP腹痛中发挥作用的可能性。

CHGZT作为《伤寒论》中的经典方剂,在临床最常用于体质偏弱的人群,应用中最常见的中医病症为痹症、感冒、胃痛、胁痛、头痛、腹痛、眩晕、郁症等,其中腹痛、身痛、头痛在主要症状的前列<sup>[22]</sup>。CP腹痛部位常以左上腹或上腹、脐周为主,可向背部、双侧季肋部、前胸、肩胛等处放射,和“心腹卒中痛”中所谓的心腹等吻合,结合现代医家应用本方加减

治疗多种痛症,推测CHGZT是一个止痛良方,结合实验结果也印证了这一观点。

综上所述,CHGZT在治疗TNBS诱发的CP腹痛过程中,可能与通过抑制胰腺内神经周围炎症,降低相应脊髓小胶质细胞P2RX7激活而引起的脊髓中枢敏化有关,本研究可为临床CP腹痛治疗提供一个新思路及治疗靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] HOFFMEISTER A, MAYERLE J, BEGLINGER C, et al. English language version of the S3-consensus guidelines on chronic pancreatitis: Definition, aetiology, diagnostic examinations, medical, endoscopic and surgical management of chronic pancreatitis[J]. Z Gastroenterol, 2015, 53(12): 1447-1495.
- [2] KIRKEGARD J, MORTENSEN F V, CRONIN-FENTON D. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer risk: A systematic review and Meta-analysis[J]. Am J Gastroenterol, 2017, 112: 1366-1372.
- [3] HUNG J, AWASTHI R, KLIBANOV A L, et al. Identification of novel ligands for targeted antifibrotic therapy of chronic pancreatitis[J]. Int J Nanomedicine, 2021, 16: 5495-5512.
- [4] WENIGER M, REINELT L, NEUMANN J, et al. The analgesic effect of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 in pancreatic inflammation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4650489.
- [5] OLESEN S S, KRAUSS T, DEMIR I E, et al. Towards a neurobiological understanding of pain in chronic pancreatitis: Mechanisms and implications for treatment[J]. Pain Rep, 2017, 2(6): e625.
- [6] SINGH V K, DREWES A M. Medical management of pain in chronic pancreatitis[J]. Dig Dis Sci, 2017, 62(7): 1721-1728.

- [ 7 ] 廖华君,钟玉梅,冯泳铿,等. 柴胡麻黄汤与柴胡桂枝汤的临床运用探赜[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(4):2103-2105.
- [ 8 ] 姜洮洮. 柴胡桂枝汤方证的研究[D]. 广州:暨南大学, 2014.
- [ 9 ] 江恒,原薇薇,廖皓,等. 柴胡桂枝汤联合盐酸羟考酮缓释片治疗癌性疼痛的临床疗效观察[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(14):2517-2519.
- [10] JI R R, SUTER M R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain [J]. *Mol Pain*, 2007, 3:33.
- [11] WINSTON J H, HE Z J, SHENOY M, et al. Molecular and behavioral changes in nociception in a novel rat model of chronic pancreatitis for the study of pain[J]. *Pain*, 2005, 117(1/2):214-222.
- [12] MIYAMOTO T, NAKAMURA H, NAGASHIO Y, et al. Overexpression of Smad6 exacerbates pancreatic fibrosis in murine caerulein-induced chronic pancreatic injuries[J]. *Pancreas*, 2010, 39(3):385-391.
- [13] DEMIR I E, HEINRICH T, CARTY D G, et al. Targeting nNOS ameliorates the severe neuropathic pain due to chronic pancreatitis [J]. *EBioMedicine*, 2019, 46:431-443.
- [14] CEYHAN G O, DEMIR I E, MAAK M, et al. Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2010, 24(3):311-322.
- [15] OLESEN S S, KRAUSS T, DEMIR I E, et al. Towards a neurobiological understanding of pain in chronic pancreatitis: Mechanisms and implications for treatment[J]. *Pain Rep*, 2017, 2(6):e625.
- [16] OLESEN S S, BROCK C, KRARUP A L, et al. Descending inhibitory pain modulation is impaired in patients with chronic pancreatitis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2010, 8(8):724-730.
- [17] LIU X G, SANDKÜHLER J. Activation of spinal *N*-methyl-*D*-aspartate or neurokinin receptors induces long-term potentiation of spinal C-fibre-evoked potentials[J]. *Neuroscience*, 1998, 86(4):1209-1216.
- [18] ZHANG G X, WANG M X, NIE W, et al. P2X7R blockade prevents NLRP3 inflammasome activation and pancreatic fibrosis in a mouse model of chronic pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2017, 46(10):1327-1335.
- [19] QIAN N S, LIAO Y H, FENG Q X, et al. Spinal toll like receptor 3 is involved in chronic pancreatitis-induced mechanical allodynia of rat [J]. *Mol Pain*, 2011, 7:15.
- [20] TSUDA M. Microglia-mediated regulation of neuropathic pain: Molecular and cellular mechanisms [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(12):1959-1968.
- [21] DUAN S, ANDERSON C M, KEUNG E C, et al. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(4):1320-1328.
- [22] 曹卓青. 柴胡桂枝汤证治思路及应用规律的研究[D]. 太原:山西中医药大学, 2018.

[责任编辑 周冰冰]