

## 红花口服液缓解神经病理性疼痛的分子机制

郭秋岩<sup>1,2</sup>, 赵明洪<sup>1,2,3</sup>, 卢天明<sup>1,2</sup>, 夏斐<sup>1,2</sup>, 张迎<sup>1,2</sup>, 张红兵<sup>4</sup>, 翟晓茹<sup>4</sup>, 杨倩<sup>5</sup>, 李永东<sup>4</sup>,  
李晋<sup>4</sup>, 李欣<sup>4</sup>, 沈硕<sup>1,2</sup>, 谷丽维<sup>1,2\*</sup>, 杜茂波<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院青蒿素研究中心, 北京 100700;  
3. 赣南医学院第一临床医学院, 江西 赣州 341000; 4. 山西华卫药业有限公司, 山西 晋中 030600;  
5. 青岛妇女儿童医院, 山东 青岛 266000)

**【摘要】** 目的: 考察红花口服液(HOL)缓解神经病理性疼痛(NP)的药效作用特点并探究其分子作用机制。方法: 基于脊神经结扎(SNL)大鼠模型, 将健康雄性SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, HOL低、中、高剂量组(0.5、1.0、2.0 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及阳性药普瑞巴林组(25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 每组6只。在脊神经结扎手术恢复3 d后, 连续灌胃给药14 d并采集样本。期间检测各组大鼠的机械痛阈值和冷痛阈值, 考察HOL的镇痛作用特点。将假手术组、模型组、HOL高剂量组的海马组织样本进行转录组测序, 获取不同组别之间的差异表达基因, 并进行通路富集分析, 进而, 选择与NP密切相关的靶标进行验证, 进一步通过分子对接寻找HOL关键活性成分与靶标分子的具体结合位点。此外, 检测血清中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素-10(IL-10)的表达水平, 评价HOL对NP大鼠的影响。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠的机械痛阈值及冷痛阈值均明显降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, HOL组可有效升高其机械痛阈值及冷痛阈值( $P < 0.05$ ); 转录组分析发现, 模型组与假手术组比较共有376个差异表达基因, 其中上调基因124个、下调基因252个, 模型组与HOL组比较共有194个差异表达基因, 其中上调基因33个、下调基因161个。其中, 类胰岛素一号生长因子(IGF1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-14(MMP-14)、酪氨酸激酶受体2(ERBB2)和整合素A5(ITGA5)与NP密切相关。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠海马中上述各分子的mRNA表达量均显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, HOL组可有效降低其mRNA表达量( $P < 0.01$ )。分子对接结果显示, 红花主要活性成分羟基红花黄色素A、山奈酚和槲皮素与上述靶标分子IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2、ITGA5的氨基酸残基形成稳定的氢键作用力。酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测结果显示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中TNF- $\alpha$ /IL-10表达失衡( $P < 0.01$ ), 与模型组比较, HOL组可显著减少促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 的含量( $P < 0.01$ ), 增加抗炎细胞因子IL-10的含量( $P < 0.05$ )。结论: HOL对SNL大鼠具有镇痛作用, 其机制与抑制神经炎症密切相关。

**【关键词】** 红花口服液; 神经病理性疼痛; 胰岛素样生长因子; 基质金属蛋白酶; 酪氨酸激酶受体2; 整合素A5

**【中图分类号】** R2-0; R33; R289; R322.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2023)06-0222-09

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20222442

**【网络出版地址】** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20221202.1603.006.html>

**【网络出版日期】** 2022-12-05 13:49:18

### Mechanism of Honghua Oral Liquid in Alleviating Neuropathic Pain

GUO Qiuyan<sup>1,2</sup>, ZHAO Minghong<sup>1,2,3</sup>, LU Tianming<sup>1,2</sup>, XIA Fei<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1,2</sup>, ZHANG Hongbing<sup>4</sup>,  
ZHAI Xiaoru<sup>4</sup>, YANG Qian<sup>5</sup>, LI Yongdong<sup>4</sup>, LI Jin<sup>4</sup>, LI Xin<sup>4</sup>, SHEN Shuo<sup>1,2</sup>, GU Liwei<sup>1,2\*</sup>, DU Maobo<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Artemisinin Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. The First School of Clinical Medicine, Gannan Medical University, Ganzhou 341000, China;

**【收稿日期】** 2022-09-16

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年基金项目(82104480); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ14-YQ-060); 中华中医药学会青年人才托举工程项目(2021-QNRC2-B29); 北京市自然科学基金青年基金项目(7214287)

**【第一作者】** 郭秋岩, 博士, 从事抗炎免疫药理及中药药理研究, E-mail: qyguo@icmm.ac.cn

**【通信作者】** \* 谷丽维, 博士, 从事中药作用机制研究, E-mail: lwgu@icmm.ac.cn;

\* 杜茂波, 博士, 从事中药制剂及外用新剂型研究, E-mail: mbdu@icmm.ac.cn

4. Shanxi Huawei Pharmaceutical Co. Ltd. , Jinzhong 030600, China;
5. Qingdao Women and Children's Hospital, Qingdao 266000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the pharmacodynamic characteristics and explore the molecular mechanism of Honghua oral liquid (HOL) in relieving neuropathic pain (NP). **Method:** Healthy male SD rats were randomly assigned into sham group, model group, low-, medium-, high-dose (0.5, 1.0, 2.0 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectively) HOL groups, and a positive drug (pregabalin, 25 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) group, with 6 rats in each group. Spinal nerve ligation (SNL) of L5 was conducted in other groups except the sham group. Drug administration was performed 3 days after the SNL surgery for 2 consecutive weeks, and samples were collected after the end of the administration. During the treatment period, the mechanical pain threshold and cold pain threshold were determined to measure the pain-relieving effect of HOL. Transcriptome sequencing was performed on hippocampal tissue samples from the sham, model, and high-dose HOL groups, and differentially expressed genes between the sham group and the model group as well as the model group and HOL high-dose group were obtained. After pathway enrichment analysis, we selected the targets which were closely related to neuroinflammation for validation, and predicted the specific binding sites of the major active components in HOL with the targets through molecular docking. In addition, the serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-10 (IL-10) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to evaluate the effect of HOL on neuroinflammation in NP rats. **Result:** Compared with the sham group, SNL decreased the mechanical pain threshold and cold pain threshold ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, HOL recovered the mechanical pain threshold and cold pain threshold ( $P<0.05$ ). The transcriptome data showed that 376 differentially expressed genes (DEGs) were identified between the model group and the sham group, including 124 upregulated genes and 252 downregulated genes, and 194 DEGs between the model group and the high-dose HOL group, including 33 upregulated genes and 161 downregulated genes. Among them, insulin-like growth factor 1 (IGF1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-14 (MMP-14), erb-B2 receptor tyrosine kinase 2 (ERBB2), and integrin subunit alpha 5 (ITGA5) associated with NP were selected for further validation. The Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) results showed that compared with the sham group, the modeling up-regulated the mRNA levels of the above five molecules in the hippocampus ( $P<0.01$ ). Compared with model group, HOL down-regulated the mRNA levels of these molecules ( $P<0.01$ ). The molecular docking results showed that the main active components of safflower, hydroxysafflower yellow A, kaempferol, and quercetin, formed stable hydrogen bonds with the amino acid residues of IGF1, MMP-2, MMP-14, ERBB2, and ITGA5. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) results showed that compared with those in the sham group, the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 were out of balance in the model rats ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, HOL lowered the level of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  ( $P<0.01$ ) and elevated that of the anti-inflammatory cytokine IL-10 ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** HOL exerts analgesic effect on SNL rats by inhibiting neuroinflammation.

**[Keywords]** Honghua oral liquid; neuropathic pain; insulin-like growth factor; matrix metalloproteinase; erb-B2 receptor tyrosine kinase 2; integrin subunit alpha 5

神经病理性疼痛(NP)指躯体感觉系统的损害或疾病引发的疼痛<sup>[1]</sup>,据统计在普通人群中的发病率约为7%,给患者家庭和社会带来了沉重的负担<sup>[2]</sup>。NP常见类型包括无直接神经元损伤的自发性疼痛、阈下刺激的痛觉过敏和异位神经元活动的异常性疼痛,根据病变部位NP有可以分为慢性中

风后痛、脑或脊髓损伤等中枢神经性疼痛和三叉神经痛、疼痛性多发性神经病、带状疱疹后遗神经痛等周围神经性疼痛<sup>[3-5]</sup>。NP的发生主要受神经-免疫系统调节,报道显示中枢和外周神经受损后胰岛素样生长因子-1 (IGF-1)、基质金属蛋白酶(MMPs)、神经调节素1(NRG1)受体 erb-B2、erb-B3

和erb-B4分泌增加<sup>[6-7]</sup>。进而小胶质细胞和星形胶质细胞活化增殖,促炎因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )等释放增多,抗炎因子白细胞介素-10(IL-10)分泌减少。炎症反应产生伤害性信号持续刺激神经元,神经元过度兴奋或异常电位活动引起中枢及外周感受器痛觉过敏或异常性疼痛<sup>[8-9]</sup>。目前NP的缓解主要依赖于药物治疗,临床一线用药主要包括三环抗抑郁药物(阿米替林、去甲替林)和5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂(度洛西汀、文拉法辛),抗惊厥药(加巴喷丁、普瑞巴林),等。此外,阿片类药物曲马多、强阿片类药物吗啡、羟考酮也是治疗NP的常用药<sup>[10-11]</sup>。报道显示,仅有30%的NP患者疼痛程度靠药物得到缓解<sup>[12]</sup>。此外,NP患者由于神经炎症长期存在导致的疼痛慢性化,长期服药存在难以平衡药效与毒性的困扰。例如,三环类抗抑郁药能实现暂时性的疼痛缓解作用,但常引起头晕、心率过速、体位性低血压等众多并发症。抗惊厥药物常使患者嗜睡、乏力疲倦影响其正常精神状态<sup>[13]</sup>。而阿片类药物面临药物滥用的成瘾性和长期服药物的耐受性难题<sup>[14-15]</sup>。基于NP的上述治疗困境,越来越多的研究者试图从中医药领域寻找有效的镇痛药物。

红花口服液(HOL)的成分为治疗疼痛的传统中药红花,具有活血通络、散瘀止痛、宁心安神等功效<sup>[16-17]</sup>。现有研究表明,红花主要活性成分包括羟基红花黄色素A、山柰酚、槲皮素,其中羟基红花黄色素A是用于检测HOL是否稳定的判断性指标,其在红花的活性成分中含量最高且具有确切的神经保护活性<sup>[18-20]</sup>。前期研究表明,红花可能通过抑制炎症介质一氧化氮的产生,减轻炎症反应<sup>[21]</sup>,但HOL对NP的干预特点及具体分子机制仍需进一步探究。

因此,本文旨在探究HOL缓解NP的药效作用特点并初步阐明其可能的分子作用机制。首先,基于经典的脊神经结扎(SNL)大鼠模型,筛选HOL发挥镇痛作用的最佳剂量。其次,考虑到中药具有多靶点、多途径发挥作用的特点,本研究通过转录组测序分别获取模型组与空白组及HOL最佳剂量组与模型组的差异表达基因,根据差异表达基因的生物功能进行通路富集,选择与神经炎症密切相关的靶标检测其基因表达量进行实验验证。此外,通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中TNF- $\alpha$ 及IL-10的含量,评价HOL对神经炎症的影响。进一步,通过分子对接模拟红花主要活性成分羟基红

花黄色素A、山柰酚、槲皮素与本研究中发现的关键靶标分子的具体结合位点,初步阐明HOL缓解NP的分子机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性SD大鼠36只,体质量210~230 g,SPF级,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。动物合格证号SCXK(京)2019-0010。动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心,饲养条件恒温22~24℃、恒湿50%~60%,光照/黑暗周期为12 h,固体饲料饲养、期间自由饮水。本研究中的动物实验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(实验动物伦理审查批准号2021B111),并按照伦理要求尽可能地减少动物使用数量并减缓实验过程中动物的痛苦。

**1.2 药品及试剂** 红花口服液(山西华卫药业有限公司,批号20120801);普瑞巴林胶囊(辉瑞制药有限公司,批号DA4521);丙酮(北京化工厂,批号20210422),TRIzol、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为O31103、P20609、O21119);大鼠TNF- $\alpha$  ELISA测试盒(南京建成生物工程研究所,批号20220219),大鼠IL-10 ELISA测试盒(武汉菲恩生物科技有限公司,批号ER0033)。

**1.3 仪器** Von frey hair型疼痛测试仪(美国 Stoeltingco公司),NanoDrop One型超微量分光光度计、Applied Biosystems Veriti型梯度PCR仪、ABI StepOnePlus型Real-time PCR仪(美国 Thermo Fisher公司),EnVision型微孔板读板仪(美国 Perkin Elmer公司)。

## 2 方法

**2.1 SNL模型的构建** 根据文献所述方法构建SNL大鼠模型<sup>[22]</sup>。首先,使用戊巴比妥麻醉大鼠后,将动物放置于俯卧位,剃毛,消毒后在髂前上棘附近沿脊柱剪开皮肤。在显微镜下用手术镊钝性分离脊柱旁的组织,暴露出左侧L6椎体横突:钝性分离L4、L5脊神经并用手术缝合线结扎L5脊神经,用生理盐水清洗伤口并涂抹上青霉素后缝合伤口。对照组(假手术组)大鼠也接受手术,操作步骤同上,但是未进行L5脊神经结扎。判断造模是否成功用Von Frey法检测大鼠的50%缩足阈值。

**2.2 动物分组与给药** 雄性SD大鼠36只,随机均分为6个组( $n=6$ ),组别设置为假手术组,模型组,HOL低、中、高剂量组,以及阳性药普瑞巴林组。HOL的低、中、高剂量组的给药剂量分别为0.5、1、

2 mL·kg<sup>-1</sup>;普瑞巴林的给药剂量为25 mg·kg<sup>-1</sup>。大鼠SNL手术恢复3 d后开始灌胃给药,连续给药14 d后,经致死麻醉剂量(6 mL·kg<sup>-1</sup>的1%戊巴比妥钠溶液)处理动物并采集标本。基于前期机械痛与冷痛的药效评价HOL低、中、高剂量组中发现HOL高剂量组镇痛效果最佳,故后续以HOL高剂量组进行转录组测序及Real-time PCR、ELISA等机制研究相关的实验。

**2.3 Von frey测痛仪检测机械痛** 采用文献方法<sup>[23]</sup>检测大鼠左足L5反射区的机械痛阈值。首先,将大鼠静置于金属笼内;然后,待其处于安静而清醒的状态后,用不同力度的von Frey纤维丝垂直刺激鼠足掌面,力度以纤维丝轻微弯曲为准,持续5 s或直至大鼠出现缩足反应记为阳性。采用up-and-down方法,按照公式计算50%缩足反应阈值,每次测量3个周期,取平均值。

**2.4 丙酮刺激检测冷痛阈值** 采用文献方法<sup>[23]</sup>检测冷痛阈值。首先,将大鼠置于铁丝笼内处于安静而清醒的状态后;然后,使用丙酮20 μL刺激左侧后肢足跖部皮肤。出现迅速的抬足反应为阳性,记录30 s内动物抬足反应的次数,重复3次,期间间隔为5 min。每只重复3次求和,每组动物再取平均值。

**2.5 RNA-seq转录组测序分析** 选择大鼠大脑海马区组织进行RNA测序,简而言之,使用RNeasy迷你试剂盒(Qiagen, Germany)提取总RNA。根据TruSeq™RNA样品制备指南,使用TruSeq™RNA样品制备试剂盒(Illumina, USA)合成双末端文库。然后进行mRNA片段化,合成双链cDNA,cDNA末端修复,DNA纯化及PCR扩增。最后使用Illumina NovaSeq 6000(Illumina, 美国)进行测序。使用Hisat2软件参考基因组进行比对,使用edgeR软件基因定量,在此基础上根据组别信息再计算两组比较得到的差异基因。差异表达基因的筛选标准为adjust P value<0.05, |log fold change(logFC)|>0.5。将差异表达基因进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。

**2.6 网络药理学分析** 为了进一步了解HOL缓解NP的差异表达基因功能及靶标分子之间相互作用关系。将差异表达基因在上传IPA系统,实现差异表达基因的经典信号通路分析和相互作用网络可视化、疾病与功能分析、调控效应分析。通过“Build-Connection”模块与“Core analysis”来阐述基因的相互调控关系和分析差异表达基因相互作用网络的关联度,得到关联度最强的疾病、功能和通

路。使用通过路径设计模块对网络结构进行优化。网络分析的算法使用Fisher精确检验。

**2.7 Real-time PCR检测核心靶点mRNA表达水平** 取大鼠脑组织的右侧海马组织,加入TRIzol进行组织匀浆。之后进行三氯甲烷抽提、异丙醇沉淀、乙醇洗涤分离提纯RNA。采用Thermo scientific超微量分光光度计检测RNA的纯度和浓度, $A_{260/280}$ 在2.0以上, $A_{260/230}$ 在2.0左右,质量浓度稀释到500 mg·L<sup>-1</sup>。按照说明使用逆转录试剂盒将RNA逆转为cDNA,实验条件为25 °C反应10 min,42 °C反应30 min,85 °C反应5 s。将得到的cDNA为模板,用Real-time PCR试剂盒进行扩增,检测IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2和ITGA5的mRNA表达。反应条件为94 °C预变性30 s,94 °C变性5 s,60 °C退火15 s,72 °C延伸10 s,共40个循环。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,计算出2<sup>-ΔΔCt</sup>显示mRNA的表达量,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
IGF1	上游 AACCTGCAAAACATCGGAAC	20
	下游 GCAGCCAAAATTCAGAGAGG	20
MMP-2	上游 GTCCTGACCAAGGATATAGCC	21
	下游 AGACCCAGTACTCATTCCCTG	21
MMP-14	上游 GTTCTGGCGGGTGAGGAATAAC	22
	下游 TCATAGGCAGTGTGGATGGATGC	23
ERBB2	上游 GGGCTGGCTCCGATGTGTTTG	21
	下游 CCGCTGTAGAGGGCTGAGGTC	21
ITGA5	上游 CAAGACGCTCCAGTGAGGATT	21
	下游 AGACGTGAGGTCCTGGTTGT	20
GAPDH	上游 TGCTGAGTATGTCGTGGAGTC	21
	下游 GGAGATGATGACCCCTTTTGG	20

**2.8 分子对接** 从PubChem数据库获取羟基红花黄色素A、山柰酚、槲皮素结构(PubChem CID: 6443665, 5280863, 5280343), Uniprot蛋白质数据库中寻找IGF1(P05019, IGF1\_HUMAN)、MMP-2(P08253MMP-2\_HUMAN)、MMP-14(P50281, MMP-14\_HUMAN)、ERBB2(P04626, ERBB2\_HUMAN)、ITGA5(P08648, ITA5\_HUMAN)的蛋白质晶体结构。AutoDock Vina39软件用于分子对接,对接前蛋白质进行脱水和氢化并选为受体,药物进行氢化并选为配体。Pymol软件用于对接结果可

视化。

**2.9 ELISA检测各组大鼠血清中炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-10表达水平** TNF- $\alpha$ 和IL-10检测按照ELISA试剂盒说明书操作步骤进行实验。

**2.10 统计学分析** 采用GraphPad Prism 9.0版本进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,满足正态性和方差齐性用单因素方差分析(One-way ANOVA),满足正态性但不满足方差齐性用Welch检验和Brown-Forsythe检验,不满足正态性用非参

数检验, $P < 0.05$ 为差异具体统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对SNL大鼠的机械痛阈值的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠的机械痛阈值显著降低( $P < 0.01$ ),提示造模成功。与模型组比较,HOL低、中、高剂量组和普瑞巴林组机械痛阈值均不同程度地升高,差异具有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.01$ ),表明HOL给药后SNL大鼠对机械刺激引起的痛觉过敏得以缓解。见表2。

表2 红花口服液(HOL)对大鼠机械痛阈值影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Honghua oral liquids(HOL)on mechanical pain threshold in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 /mL·kg <sup>-1</sup>	机械痛阈值					
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
假手术组		61.61±22.55	97.71±7.31	77.94±22.32	86.26±24.64	75.24±30.18	65.32±26.77
模型组		11.07±3.65 <sup>1)</sup>	6.07±1.88 <sup>2)</sup>	5.53±1.71 <sup>2)</sup>	5.35±1.68 <sup>2)</sup>	5.49±1.77 <sup>2)</sup>	8.66±0.57 <sup>2)</sup>
普瑞巴林组	25.0 <sup>5)</sup>	50.17±43.08	72.27±23.60 <sup>3)</sup>	47.38±39.09 <sup>4)</sup>	44.02±19.98 <sup>3)</sup>	36.73±19.98 <sup>3)</sup>	32.65±19.94
HOL低剂量组	0.5	11.04±6.15	56.95±59.30 <sup>3)</sup>	11.32±1.59	8.86±3.52	8.79±2.62	10.89±4.28
HOL中剂量组	1.0	26.83±18.27	72.86±39.21	10.60±2.71	26.03±22.27	15.97±5.17	17.72±3.34
HOL高剂量组	2.0	62.57±40.97 <sup>3)</sup>	53.87±50.77	17.00±5.22	42.97±27.09	55.29±5.75 <sup>3)</sup>	46.45±21.06 <sup>3)</sup>

注:与假手术组比较<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> $P < 0.01$ ;<sup>5)</sup>表示剂量单位为mg·kg<sup>-1</sup>(表3-表5同)

**3.2 对SNL大鼠的冷痛阈值的影响** 与假手术组比较,模型组大鼠对丙酮导致冷痛刺激的缩足反应次数明显增加( $P < 0.05$ ),即冷痛阈值明显降低,并在造模后14 d内无明显恢复现象;与模型组比较,

HOL高剂量组和普瑞巴林组在给药6 d后明显提高冷痛阈值( $P < 0.05, P < 0.01$ )。表明HOL给药后可以有效改善SNL大鼠对冷刺激引起的痛觉过敏现象。见表3。

表3 HOL对大鼠冷痛阈值的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effect of HOL on cold pain threshold in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 /mL·kg <sup>-1</sup>	冷痛阈值					
		4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
假手术组		2.50±1.00	2.80±1.00	2.30±1.00	2.00±0.70	2.00±0.70	2.20±0.40
模型组		3.80±0.40	5.20±1.30	4.80±0.80 <sup>1)</sup>	4.80±1.30 <sup>1)</sup>	5.00±1.20 <sup>1)</sup>	5.00±1.00 <sup>1)</sup>
普瑞巴林组	25.0 <sup>5)</sup>	2.00±0.70 <sup>3)</sup>	2.40±0.90 <sup>3)</sup>	1.80±1.10 <sup>4)</sup>	1.80±1.10 <sup>3)</sup>	1.60±0.90 <sup>4)</sup>	2.20±0.40 <sup>3)</sup>
HOL低剂量组	0.5	3.00±0.80	4.00±1.20	4.00±1.20	3.50±1.30	2.80±1.00	3.00±1.40
HOL中剂量组	1.0	2.60±1.10	2.60±0.50 <sup>3)</sup>	2.60±1.50	2.00±0.80	2.00±1.60	3.00±0.80
HOL高剂量组	2.0	2.20±0.80	2.40±1.50 <sup>3)</sup>	2.70±0.60	1.70±0.60 <sup>3)</sup>	1.70±0.60 <sup>3)</sup>	2.00±1.00 <sup>3)</sup>

**3.3 HOL处理SNL大鼠差异表达基因分析** 根据转录组数据,得到不同组别大鼠的差异表达基因,热图显示出多个基因在SNL组与假手术组,HOL组与假手术组,SNL组与HOL组的表达水平。模型SNL组与HOL组比较,获得了874个差异表达基因。其中有65上调基因,809下调基因。火山图显示了两组样本间基因表达水平差异的分布状况,横轴为差异倍数的对数,分布X轴在两端的基因差

异倍数大;纵轴为多差异显著性P值的负对数,纵轴越往上代表差异越显著,蓝点表示显著下调的基因,黑点表示无显著差异的基因,红点表示显著上调的基因(见增强出版附加材料)。

**3.4 HOL处理SNL大鼠差异表达基因KEGG通路富集分析和IPA基因作用通路富集分析** 基于3.3项获得的模型组与HOL高剂量组的差异表达基因,分别进行了KEGG通路富集分析及IPA基因作

用通路富集分析。KEGG通路富集分析结果表明,模型组与HOL高剂量组的差异表达基因主要富集在HIF信号通路、ECM-受体相互作用、抗原处理和呈递等通路(见增强出版附加材料);IPA基因作用通路分析结果显示,模型组与HOL高剂量组的差异表达基因富集到的经典通路主要有轴突导向信号、无粒白细胞粘连和渗出、神经肌肉接头处的聚集蛋白相互作用、神经调节蛋白信号、内源性大麻素神经元突触等通路(见增强出版附加材料)。

### 3.5 HOL缓解NP的核心靶标及其功能互作网络

基于转录组测序数据,进一步通过网络药理分析发现,HOL缓解NP的靶标主要富集在轴突导向信号、无粒白细胞粘连和渗出及肝脏脂肪细胞因子信号转导通路,其中轴突导向信号通路的富集度最高。进一步分析轴突导向信号通路中靶标分子之间的互作关系,发现IGF1、MMP-2、MMP-14、

ERBB2、ITGA5是该网络中具有重要作用的核心靶标(见增强出版附加材料)。靶标形状表示相应分子的类型,线条表示靶标分子间存在相互关联,紫色代表与周围节点连接较多的重要靶标(见增强出版附加材料)。上述分析结果提示,HOL缓解NP的分子机制可能与对轴突导向信号通路中关键靶标分子IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2、ITGA5的调节有关。

**3.6** HOL显著下调SNL大鼠海马组织中NP相关靶标分子的mRNA表达量 结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠镇痛相关靶标分子IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2、ITGA5的mRNA表达水平均显著上升( $P<0.01$ )。与模型组比较,HOL高剂量组和阳性药普瑞巴林组均明显下调了IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2、ITGA5的mRNA表达水平( $P<0.01$ )。见表4。

表4 HOL对SNL大鼠疼痛相关靶标分子mRNA表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 4 Effect of HOL on mRNA expression of NP-related target molecules in SNL rats ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/mL·kg <sup>-1</sup>	IGF1	MMP-2	MMP-14	ERBB2	ITGA5
假手术组		1.01±0.12	1.00±0.05	1.00±0.08	1.02±0.21	1.00±0.08
模型组		6.14±1.10 <sup>2)</sup>	4.56±1.12 <sup>2)</sup>	2.56±0.23 <sup>2)</sup>	2.55±0.36 <sup>2)</sup>	1.26±0.11 <sup>2)</sup>
普瑞巴林组	25.0 <sup>5)</sup>	2.02±0.67 <sup>4)</sup>	0.85±0.44 <sup>4)</sup>	0.94±0.21 <sup>4)</sup>	0.97±0.12 <sup>4)</sup>	0.68±0.12 <sup>4)</sup>
HOL组	2.0	3.39±0.72 <sup>4)</sup>	0.12±0.02 <sup>4)</sup>	1.27±0.24 <sup>4)</sup>	1.80±0.28 <sup>4)</sup>	0.33±0.04 <sup>4)</sup>

### 3.7 HOL关键活性成分与疼痛相关靶标蛋白的分子对接

**3.7.1** HOL活性成分羟基红花黄色素A可与疼痛相关靶标蛋白形成稳定的氢键作用力 分子对接结果表明,羟基红花黄色素与IGF1的氨基酸残基GLU-3、THR-4、GLU-9, MMP-2的氨基酸残基ASP-382、LYS-36, MMP-14的氨基酸残基GLU-1145、LEU-1147、TRP-1177, ERBB2的氨基酸残基GLN-1319、ASP-1288、GLU-1290, ITGA5的氨基酸残基VAL-211形成氢键作用力,键长单位为Å,详见增强出版附加材料。

**3.7.2** HOL活性成分山柰酚与疼痛相关靶标蛋白形成稳定的氢键作用力 分子对接结果表明,山柰酚与IGF1的氨基酸残基LEU-64、ARG-21、GLU-58、MET-59, MMP-2的氨基酸残基THR-248、ASP-249, MMP-14的氨基酸残基SER-1075、ILE-1078, ERBB2的氨基酸残基ASN-1304、GLY-1298、GLY-1300,以及ITGA5的氨基酸残基GLY-89形成氢键作用力,键长单位为Å,具体详见增强出版附加材料。

**3.7.3** HOL活性成分槲皮素与疼痛相关靶标蛋白形成稳定的氢键作用力 分子对接结果表明,槲皮素与IGF1的氨基酸残基LYS-65、LEU-64、ARG-21、GLU-58, MMP-2的氨基酸残基GLY-200, MMP-14的氨基酸残基GLU-183, ERBB2的氨基酸残基GLU-1346、THR-1356, ITGA5的氨基酸残基VAL-211形成氢键作用力,键长单位为Å,详见增强出版附加材料。

### 3.8 对大鼠血清中TNF-α、IL-10水平的影响

ELISA检测结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠血清中TNF-α表达显著升高( $P<0.01$ ), IL-10表达水平显著降低( $P<0.01$ )。HOL高剂量组和阳性药普瑞巴林组明显逆转了上述现象( $P<0.05, P<0.01$ ),有效减轻了炎症反应。见表5。

## 4 讨论

NP是一种难治性疾病,具有发病率高的特点,据报道在普通人群中该病的发病率高达17%,且NP有痛觉过敏和异常性疼痛等特征,在不同人中疼痛引起的身体功能障碍差异较大,疾病持续时间长,缺乏有效的治疗方式,患者生活质量较低,且精神

表5 HOL对大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-10表达影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )  
Table 5 Effect of HOL on expression of TNF- $\alpha$  and IL-10 in rats serum ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/mL·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-10
假手术组		11.45±0.68	50.28±10.99
模型组		21.38±6.29 <sup>2)</sup>	25.40±4.67 <sup>2)</sup>
普瑞巴林组	25.0 <sup>5)</sup>	13.07±0.72 <sup>4)</sup>	36.72±3.69
HOL组	2.0	13.54±0.87 <sup>4)</sup>	39.86±4.28 <sup>3)</sup>

状态欠佳<sup>[24-25]</sup>。常用的镇痛药物有抗抑郁药物、抗惊厥药物、阿片类药物等,但其治疗效果不理想,且具有不可避免的副作用,以及药物长期使用的耐受性和成瘾性等问题<sup>[26]</sup>。而中医药治疗NP具有独特的优势,如资源丰富、价格低廉、无明显不良作用等<sup>[27]</sup>。红花是传统镇痛中药之一,据报道羟基红花黄色素A、山柰酚、槲皮素是其主要活性成分,常用于益气活血、祛瘀止痛、抗炎镇痛,且具有保护神经细胞和减轻神经炎症的作用<sup>[28]</sup>。

NP的发病机制尚不完全清楚,但是研究领域内普遍认可“神经炎症学说”,比如神经损伤后神经胶质细胞活化增殖、炎症因子TNF- $\alpha$ /IL-10表达失衡,电压门控性钠离子通道蛋白表达增高导致神经元过度兴奋,从而诱发中枢敏化加剧疼痛症状<sup>[10,29-30]</sup>。而IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2、ITGA5是感受疼痛的敏感靶基因。胰岛素样生长因子IGF1可通过白血病抑制因子激活神经胶质细胞,促进NP患者的病变神经生长和神经敏化,是导致痛觉过敏和异常性疼痛的关键驱动基因<sup>[31-32]</sup>。IGF1水平与疼痛感强度呈正相关,能引起急性痛觉过敏,而IGF1受体拮抗剂能明显减弱神经元过度兴奋的痛觉过敏<sup>[33]</sup>。在本研究中,模型组大鼠脑组织海马区IGF1基因表达水平显著上升。红花口服液给药后,IGF1的表达水平下降,提示该药可通过抑制IGF1的表达缓解神经炎症,抑制神经元异常激活和中枢敏化来缓解疼痛。MMP-2和MMP-14在受损的神经元中释放,激活神经胶质细胞并通过N-甲基-D-天冬氨酸受体(NR)1和NR2B使神经细胞过度活跃,导致阈下刺激也能引起神经细胞持续兴奋而导致痛觉过敏<sup>[34]</sup>。而通过抑制基质金属蛋白酶MMP-14的活性可以增加相关神经再生因子的水平,促进感觉神经损伤后轴突的再生,减轻神经炎症损伤<sup>[35]</sup>。本研究中HOL下调MMP-2和MMP-14基因的表达,与已有报道的结果具有一致性。酪氨酸激酶受体ERBB2的高表达引起机械性异常性疼痛,常与小胶质细胞增殖活化和分泌促炎因子相关。而ERBB2

受体抑制能够降低神经元损伤的痛觉过敏,缓解机械性异常性疼痛或冷痛<sup>[36-38]</sup>。本研究中HOL给药后ERBB2基因表达下调,改善了神经炎症引起的痛觉过敏。整合素 $\alpha 5$ (ITGA5)能促进细胞的增殖、迁移和侵袭组织能力<sup>[39]</sup>。在系统性硬化症(SSc)疾病中炎症程度与ITGA5表达水平呈正相关,ITGA5能促进成纤维细胞活化和侵袭能力<sup>[40]</sup>。ITGA5的高表达增强了炎症细胞的活跃程度,炎症反应产生伤害性信号不断刺激神经元导致痛觉过敏。而本研究发现,HOL给药后可有效降低ITGA5的基因表达水平改善神经炎症。笔者进一步通过分子对接探究HOL主要活性成分与轴突导向信号中疼痛相关靶标分子的结合模式,发现羟基红花黄色素A、山柰酚、槲皮素分别与IGF1、MMP-2、MMP-14、ERBB2、ITGA5的不同位点产生稳定的结合力。

综上,本研究基于经典的SNL大鼠NP模型,发现HOL对SNL大鼠具有镇痛作用,表现在显著升高SNL大鼠的机械痛阈值和冷痛阈值方面,初步发现其镇痛机制可能与其对IGF1、ERBB2、MMP-2、MMP-14、ITGA5的调控及矫正炎症因子TNF- $\alpha$ /IL-10表达失衡所致神经炎症有关。本文虽然初步阐明了HOL缓解NP的作用机制,在一定程度上揭示了HOL发挥镇痛作用的分子机制,为其临床用药提供参考,但尚存在一定的局限性。在未来的研究中,笔者将全面获取HOL的化学成分谱;通过经典的镇痛药效评价模型筛选HOL发挥镇痛作用的关键活性成分组合并基于体内、外多层次实验借助多组学研究策略系统性阐明其镇痛分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] XU L, ZHANG Y, HUANG Y. Advances in the treatment of neuropathic pain[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 904:117-29.
- [2] LAEDERMANN C J, CACHEMAILLE M, KIRSCHMANN G, et al. Dysregulation of voltage-gated sodium channels by ubiquitin ligase NEDD4-2 in neuropathic pain [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (7) : 3002-3013.
- [3] MEACHAM K, SHEPHERD A, MOHAPATRA D P, et al. Neuropathic pain: Central vs. peripheral mechanisms [J]. Curr Pain Headache Rep, 2017, 21(6):28.
- [4] JONGEN J L, HANS G, BENZON H T, et al. Neuropathic pain and pharmacological treatment [J].

- Pain Pract, 2014, 14(3):283-295.
- [ 5 ] SCHOLZ J, FINNERUP N B, ATTAL N, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain [J]. Pain, 2019, 160 ( 1 ) : 53-59.
- [ 6 ] ZHAO H, ALAM A, CHEN Q, et al. The role of microglia in the pathobiology of neuropathic pain development: What do we know? [J]. Br J Anaesth, 2017, 118(4):504-516.
- [ 7 ] CALVO M, ZHU N, TSANTOULAS C, et al. Neuregulin-ErbB signaling promotes microglial proliferation and chemotaxis contributing to microgliosis and pain after peripheral nerve injury [J]. J Neurosci, 2010, 30(15):5437-5450.
- [ 8 ] MIKA J, ZYCHOWSKA M, POPIOLEK-BARCZYK K, et al. Importance of glial activation in neuropathic pain [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 716(1/3):106-119.
- [ 9 ] KUFFLER D P. Mechanisms for reducing neuropathic pain [J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(1):67-87.
- [ 10 ] LIM E Y, KIM Y T. Food-derived natural compounds for pain relief in neuropathic pain [J]. Biomed Res Int, 2016, 2016:7917528.
- [ 11 ] GUSTAVSSON A, BJORKMAN J, LJUNGCRANTZ C, et al. Pharmacological treatment patterns in neuropathic pain-lessons from Swedish administrative registries [J]. Pain Med, 2013, 14(7):1072-1080.
- [ 12 ] ROSENBERGER D C, BLECHSCHMIDT V, TIMMERMAN H, et al. Challenges of neuropathic pain: Focus on diabetic neuropathy [J]. J Neural Transm (Vienna), 2020, 127(4):589-624.
- [ 13 ] JACKSON K C. Pharmacotherapy for neuropathic pain [J]. Pain Pract, 2006, 6(1):27-33.
- [ 14 ] SISIGNANO M, PARNHAM M J, GEISLINGER G. Novel approaches to persistent pain therapy [J]. Trends Pharmacol Sci, 2019, 40(6):367-377.
- [ 15 ] BASU P, MAIER C, BASU A. Effects of curcumin and its different formulations in preclinical and clinical studies of peripheral neuropathic and postoperative pain: A comprehensive review [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9):22.
- [ 16 ] 朱慧渊, 苗琦, 王江, 等. 丹参、红花有效组分配伍对缺血性脑卒中大鼠脑组织致炎因子的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(21):77-83.
- [ 17 ] 黄正良, 高其铭, 崔祝梅. 红花黄色素镇痛、抗炎症及镇静作用的研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 1984(00):54-57.
- [ 18 ] 冯丹萍, 段宝忠, 夏从龙, 等. 红花化学成分的研究 [J]. 中成药, 2021, 43(8):2253-2255.
- [ 19 ] 陈亭亭, 杜玉娟, 刘晓雷, 等. 羟基红花黄色素 A 对脑缺血大鼠皮层炎症信号转导途径相关因子的抑制作用 [J]. 药学学报, 2008, doi: 10.16438/j.0513-4870.2008.06.002.
- [ 20 ] 翟晓茹, 李永东, 张红兵, 等. 红花口服液的稳定性研究 [J]. 北方药学, 2015, 12(11):9-10.
- [ 21 ] 杨宇, 史昌乾, 佟杰. 羟基红花黄色素 A 镇痛作用及机制初步研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(1):53-56.
- [ 22 ] 师钰琪, 吴红艳, 朱春燕, 等. 从 BDNF/TrkB 信号通路探讨乌头汤对神经病理性疼痛模型小鼠神经元的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7):23-30.
- [ 23 ] 郭秋岩, 李玮婕, 王超, 等. 乌头汤缓解神经病理性疼痛的炎症网络调控机制研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(6):1054-1061.
- [ 24 ] CAVALLI E, MAMMANA S, NICOLETTI F, et al. The neuropathic pain: An overview of the current treatment and future therapeutic approaches [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2019, 33:20587.
- [ 25 ] HOWARD R F, WIENER S, WALKER S M. Neuropathic pain in children [J]. Arch Dis Child, 2014, 99(1):84-89.
- [ 26 ] BOYD A, BLEAKLEY C, HURLEY D A, et al. Herbal medicinal products or preparations for neuropathic pain [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 4(4):Cd010528.
- [ 27 ] 许俊杰, 陈眉. 神经病理性疼痛及其中医药治疗的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10):2110-2113.
- [ 28 ] 赖真, 李丽珊, 程少冰. 黄芪加红花对脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及半胱氨酸蛋白酶-3 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2):45-48.
- [ 29 ] PAN C, WANG C, ZHANG L, et al. Procyanidins attenuate neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinase-9/2 [J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1):187.
- [ 30 ] 汪小芳, 何苏月, 马卓琳, 等. 大鼠 DRG 内 CIC-3 敲减导致的 TNF- $\alpha$ /IL-10 失衡对电压门控性钠通道表达和机械痛敏的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7):1153-1160.
- [ 31 ] STRICKLAND E R, WOLLER S A, GARRAWAY S M, et al. Regulatory effects of intermittent noxious stimulation on spinal cord injury-sensitive microRNAs and their presumptive targets following spinal cord contusion [J]. Front Neural Circuits, 2014, 8:117.
- [ 32 ] FORSTER R, SARGINSON A, VELICHKOVA A, et al. Macrophage-derived insulin-like growth factor-1 is a key neurotrophic and nerve-sensitizing factor in pain

- associated with endometriosis [J]. *Faseb J*, 2019, 33 (10):11210-11222.
- [33] TANG Z, CAO F, ZHANG H, et al. Peripheral pain is enhanced by insulin-like growth factor 1 and its receptors in a mouse model of type 2 diabetes mellitus [J]. *J Diabetes*, 2019, 11(4):309-315.
- [34] LI J, XU L, DENG X, et al. N-acetyl-cysteine attenuates neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinases [J]. *Pain*, 2016, 157 (8) : 1711-1723.
- [35] NISHIHARA T, REMACLE A G, ANGERT M, et al. Matrix metalloproteinase-14 both sheds cell surface neuronal glial antigen 2 (NG2) proteoglycan on macrophages and governs the response to peripheral nerve injury [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (6) : 3693-3707.
- [36] MA F, ZHANG L, WESTLUND K N. Trigeminal nerve injury ErbB3/ErbB2 promotes mechanical hypersensitivity [J]. *Anesthesiology*, 2012, 117 (2) : 381-388.
- [37] DAI D W, XU Z, CHEN X, et al. Distinct roles of neuregulin in different models of neuropathic pain [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(4):531-536.
- [38] XIANG Y, LIU T, YANG H, et al. NRG1-ErbB signalling promotes microglia activation contributing to incision-induced mechanical allodynia [J]. *Eur J Pain*, 2015, 19(5):686-694.
- [39] DENG Y, WAN Q, YAN W. Integrin  $\alpha 5$ /ITGA5 promotes the proliferation, migration, invasion and progression of oral squamous carcinoma by epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:9609-9620.
- [40] XU D, LI T, WANG R, et al. Expression and pathogenic analysis of integrin family genes in systemic sclerosis [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, doi:10.3389/fmed.2021.674523.

[责任编辑 孙丛丛]