

· 药理 ·

双氢青蒿素调控神经-小胶质细胞缓解神经病理性疼痛

梁婷钧^{1,2}, 张国鑫², 刘莹², 朱春燕^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350108; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 该研究旨在L5脊神经结扎(SNL)模型及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)海马连续注射模型中, 评价双氢青蒿素(DHA)对海马神经损伤的干预效果; 在原代培养的小胶质细胞-海马神经元中, 确认DHA对小胶质细胞-海马神经元相互作用的调控模式。方法: 实验小鼠分为假手术(Sham)组、SNL组、DHA组(16 mg·kg⁻¹), 每组3只, 用腺相关病毒[(连接钙调素依赖蛋白激酶 II (CaMK II) dTomato AAV]标记海马CA3谷氨酸能神经元, 并以免疫荧光染色追踪其向海马CA1、前额叶皮质(Frc)、前扣带回(ACC)、伏隔核(Nac)及杏仁核(BLA)的投射; 实验小鼠分为Sham组、TNF- α 海马连续注射模型组、DHA低、中、高剂量(DHA-L、DHA-M、DHA-H)组(4、8、16 mg·kg⁻¹)及普瑞巴林组(25 mg·kg⁻¹), 每组4只, 以高尔基染色统计海马CA1和CA3区锥体神经元形态; 分别诱导海马原代神经元、小胶质细胞的持续激活, 并进行细胞共培养给予DHA干预, 以免疫荧光法统计细胞胞体面积和神经元初、次级树突棘内外的突触后密度蛋白95(PSD95)的表达量。结果: 与Sham组比较, SNL组海马CA3谷氨酸能神经元向CA1区、Frc及ACC的投射减少($P<0.01$), 而向Nac及BLA的投射升高($P<0.01$); 与SNL组比较, DHA组海马CA3谷氨酸能神经元向CA1区、Frc及ACC的投射升高($P<0.01$), 而向Nac及BLA的投射显著降低($P<0.01$)。与Sham组比较, TNF- α 海马连续注射模型组小鼠CA1锥体神经元树突棘密度及树突分支数量均显著减少($P<0.01$); 与TNF- α 海马连续注射模型组比较, DHA-M、DHA-H组海马CA1和CA3锥体神经元树突棘密度及树突分支数明显增多($P<0.05$, $P<0.01$); 与DHA-M组比较, DHA-H组海马CA1锥体神经元树突总长度显著增多($P<0.01$), DHA-L组CA1神经元树突总长度和CA3神经元树突基部总长度则显著减少($P<0.01$)。与空白组比较, 甘氨酸组和谷氨酸组细胞胞体面积显著增大($P<0.01$); 与甘氨酸组和谷氨酸组比较, 甘氨酸+谷氨酸组细胞胞体面积显著升高($P<0.01$); 与谷氨酸组比较, 谷氨酸+DHA组细胞胞体面积显著减少($P<0.01$); 与甘氨酸+谷氨酸组比较, 甘氨酸+谷氨酸+DHA组细胞胞体面积显著减少($P<0.01$); 与谷氨酸+DHA组比较, 甘氨酸+谷氨酸+DHA组细胞胞体面积减少($P<0.05$)。与空白组比较, 谷氨酸组细胞胞体面积显著升高($P<0.01$); 与谷氨酸组比较, 谷氨酸+DHA各剂量组细胞胞体面积显著降低($P<0.01$)。与空白组比较, 静息原代小胶质细胞+甘氨酸组神经元初、次级树突棘内、外PSD95表达量显著升高($P<0.01$); 与静息原代小胶质细胞+甘氨酸组比较, 活化原代小胶质细胞+甘氨酸组神经元的初、次级树突棘内、外PSD95表达量显著降低($P<0.01$); 与活化原代小胶质细胞+甘氨酸组比较, 活化原代小胶质细胞+甘氨酸+DHA组中神经元的初、次级树突棘内、外PSD95表达量显著升高($P<0.01$); 与活化原代小胶质细胞+DHA组比较, 活化原代小胶质细胞+甘氨酸+DHA组神经元初、次级树突棘内、外PSD95表达量显著升高($P<0.01$)。结论: DHA对NP病理状态下, 海马小胶质细胞及TNF- α 过表达导致的锥体神经元损伤具有显著的修复效果, 而该修复与DHA对神经元-小胶质细胞的双重抑制密切相关。

[关键词] 神经病理性疼痛; 双氢青蒿素; 神经兴奋性和可塑性; 神经炎症; 小胶质细胞; 海马神经元

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R745.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0073-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230440

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230310.1440.003.html>

[网络出版日期] 2023-03-10 16:44:35

Dihydroartemisinin Regulates Neuro-microglia to Relieve Neuropathic Pain

LIANG Tingjun^{1,2}, ZHANG Guoxin², LIU Ying², ZHU Chunyan^{2*}, LIN Na^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;

[收稿日期] 2023-02-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82074096); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目(ZYYCXTD-C-202002)

[第一作者] 梁婷钧, 在读硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: 1621764283@qq.com

[通信作者] * 朱春燕, 博士, 助理研究员, 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

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the intervention effect of dihydroartemisinin (DHA) on hippocampal nerve injury in L5 spinal nerve ligation (SNL) model and tumor necrosis factor- α (TNF- α) hippocampal continuous injection model. In primary cultured microglia-hippocampal neurons, the regulatory pattern of DHA on microglia-hippocampal neuronal interactions was confirmed. **Method:** The experimental animals were divided into Sham group, SNL group, and DHA group ($16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 3 mice in each group. The hippocampal CA3 glutamatergic neurons were labeled with adeno-associated virus [Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II) dTomato AAV], and their contributions to the hippocampal CA1, prefrontal cortex (Frc), anterior cortex (ACC), projections of nucleus accumbens (Nac), and Basolateral Amygdala (BLA) were traced by immunofluorescence staining. The experimental animals were divided into a Sham group, a TNF- α hippocampus continuous injection model group, DHA-L, DHA-M, and DHA-H groups ($4, 8, 16 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and pregabalin group ($25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), with 4 mice in each group. The morphology of pyramidal neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions was counted by Golgi staining. The continuous activation of hippocampal primary neurons and microglia was induced, DHA intervention was given by co-culture, and the cell soma area and the expression of postsynaptic density protein 95 (PSD95) inside and outside the primary and secondary dendritic spines of neurons were counted by immunofluorescence. **Result:** Compared with the Sham group, the projection of CA3 glutamatergic neurons to CA1 region, Frc, and ACC in the SNL group was significantly reduced ($P<0.01$), while the projection to Nac and BLA was significantly increased ($P<0.01$). As compared with the SNL group, the projection of hippocampal CA3 glutamatergic neurons to CA1 region, Frc, and ACC was significantly increased in the DHA group ($P<0.01$), while the projection to Nac and BLA was significantly reduced ($P<0.01$). Golgi staining results showed that as compared with the Sham group, the density of dendritic spines and the number of dendritic branches in the CA1 and CA3 pyramidal neurons in the TNF- α hippocampal continuous injection model group were significantly reduced ($P<0.01$). As compared with the TNF- α hippocampal continuous injection model, the density of dendritic spines and the number of dendritic branches in hippocampal CA1 and CA3 pyramidal neurons in the DHA-M and DHA-H groups were significantly increased ($P<0.05, P<0.01$). Compared with DHA-M group, the total dendrite length of CA1 pyramidal neurons in hippocampus in DHA-H group was significantly increased ($P<0.01$), while the total dendrite length of CA1 neurons and the total dendrite base length of CA3 neurons in DHA-L group was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the blank control group, the cell soma area of the glycine group and glutamate group increased significantly ($P<0.01$). As compared with the glycine group and glutamate group, the cell area of the glycine + glutamate group was significantly increased ($P<0.01$), and as compared with the glutamate group, the cell soma area of the glutamate + DHA group was significantly reduced ($P<0.01$). As compared with the glycine acid + glutamate group, the cell soma area of the glycine + glutamate + DHA group was significantly reduced ($P<0.01$), and as compared with the glutamate + DHA group, the cell soma area of the glycine + glutamate + DHA group was also significantly reduced ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the cell soma area of the glutamate group was significantly increased ($P<0.01$). As compared with the glutamate group, the cell soma area of the glutamate + DHA-L, glutamate + DHA-M, and glutamate + DHA-H groups was significantly reduced ($P<0.01$). As compared with the blank control group, the expression of the resting primary microglia + glycine group in primary and secondary dendritic internal and external postsynaptic density protein 95 (PSD95) was significantly increased ($P<0.01$). As compared with the resting primary microglia + glycine group, the expression of PSD95 in the primary and secondary dendritic spinous and external neurons of the activated primary microglia + glycine group was significantly reduced ($P<0.01$). As compared with the activated primary

microglia + glycine group, the expression of PSD95 in the primary and secondary dendritic spinous and external neurons in the activated primary microglia + glycine + DHA group was significantly increased ($P < 0.01$). As compared with the activated primary microglia + DHA group, the expression of PSD95 in the primary and secondary dendritic spines and outside neurons in the activated primary microglia + glycine + DHA group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** DHA has a significant repair effect on vertebral neuronal damage caused by hippocampal microglia and TNF- α overexpression in NP pathology, and this repair is closely related to the dual inhibition of neuronal-microglia by DHA.

[Keywords] neuropathic pain; dihydroartemisinin; nerve excitability and plasticity; inflammation of nerves; microglia; hippocampal neurons

2011年国际疼痛协会将神经病理性疼痛(NP)重新定义为一种由于躯体神经系统的损害或疾病直接导致的疼痛^[1],该定义再次强调了感觉神经系统损伤在NP病理过程中的重要意义,而研究显示中枢小胶质细胞的持续激活在神经损伤的病理过程中起到了重要的作用,抑制小胶质细胞激活,修护神经损伤是新药研发较为关键的途径^[2]。然而现有的一线药物普瑞巴林(PGB),三环类抗抑郁药并没有确切的报道指出二者对于神经系统具有显著的修复效果,药物并没有体现对于神经炎症的抑制或者神经系统的修复效果。

相关研究已证实肿瘤坏死因子- α (TNF- α)既是小胶质细胞激活的标志物,又在小胶质细胞的激活中起到重要的调控作用。其中,多项研究表明,TNF- α 在海马中高表达可导致神经元和大脑功能网络损伤,而抑制TNF- α 高表达可以有效缓解脑神经功能损伤,提示TNF- α 是调控小胶质细胞,以干预神经损伤修复的关键靶点^[3-6]。然而市面上一些单抗体的药物及TNF- α 抑制剂存在经济成本过高、有脱髓鞘的风险、肿瘤复发等问题,如何安全有效地调控中枢神经炎症、修复神经系统依然是亟待解决的问题。

双氢青蒿素(DHA)是草本植物黄花蒿中的成分青蒿素的衍生物^[7],研究表明其主要通过调节炎症介质、免疫细胞及信号通路来达到抗炎效果,尤其是在中枢神经系统中,DHA具有抑制神经炎症,修复神经损伤的功能^[8-10]。本课题组前期研究显示,DHA从“疼痛-抑郁-焦虑”三大核心症状共治角度揭示其药效优势,而低剂量、高效、核心症状协同调控是DHA比较于现有一线药物所表现出的较突出药效优势^[10-11]。药理研究也显示,比较于一线药物,DHA对中枢神经损伤具有量效依赖的修复效果,且有效抑制中枢小胶质细胞激活及TNF- α 表达^[12]。基于此,本研究将进一步明确DHA对海马

神经元的修复效果,建立小胶质细胞TNF- α 表达调控与神经修复、症状改善的因果关系。

1 材料

1.1 动物 8周龄雄性SPF级33只ICR小鼠,体重(30 \pm 2)g;购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号SCXK(京)2019-0010;饲养于中国中医科学院医学实验中心,空调控制在23~25℃,相对湿度70%~80%,日光灯控明,模拟正常昼夜节律交替,自由饮水饮食,本实验中涉及操作均符合中国中医科学院研究伦理委员会要求和标准(许可编号2017-006)。

1.2 药品与试剂 DHA片,昆药集团股份有限公司,批号180509-03;DHA(上海源叶生物,批号S31426);PGB(辉瑞公司,批号M57973);连接钙调素依赖蛋白激酶II(CaMKII)dTomato AAV腺相关病毒(山东维真生物科技有限公司,批号20221206);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);二甲基亚砜(DMSO,美国Amresco公司,批号0231);OCT包埋剂(美国Ltipack公司,批号202468);曲拉通X-100(北京普利莱基因技术有限公司,批号A1009);高尔基染色试剂盒(哥伦比亚FD NeuroTechnologies公司,批号PK-401);异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司,批号R510-22-10);重组小鼠TNF- α 蛋白、离子化钙结合衔接分子-1(Iba-1)抗体、3型微管蛋白编码基因(TUBB3)抗体、突触后密度蛋白95(PSD95)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab157351、ab178847、ab78078、ab76115);荧光二抗驴抗兔594、荧光二抗山羊抗小鼠488(美国Earthox公司,批号分别为E032421、E032210)。

1.3 仪器 1210B1210型冰冻切片仪(美国Thermo Scientific公司);XDS-1B型CO₂培养箱(重

庆光电仪器有限公司);XTS20/30型连续变倍体视显微镜(北京泰克仪器有限公司);WD-9405B型摇床(北京六一仪器厂);BX41型正置荧光显微镜(日本Olympus公司);68505型脑室立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备

2.1.1 SNL模型的制备 动物适应几天后,第1周在海马CA3区显微注射CaMK II启动子编码的CAMK II dTomato AAV腺相关病毒2 μL ,第4周构建小鼠L5脊神经结扎(SNL)模型:以异氟烷进行气体麻醉后,按照文献[13]的方法将左侧L5脊柱神经暴露并用手术缝合线将其紧紧结扎,后用生理盐水洗涤皮肤,青霉素处理伤口后缝合。其中假手术组(Sham组)仅暴露L5横突不结扎神经。小鼠造模后观察其行动状态,用Von Frey法检测小鼠机械痛敏,比较小鼠左足50%缩足阈值,根据文献[14]判断造模是否成功。将造模成功的小鼠按随机数字表法分为SNL组、DHA组,每组3只,另设Sham组3只,共9只。使用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶解药物,按照人与小鼠1:9的比例换算给药剂量,参考文献[15]及课题组前期预实验,设置DHA药物质量浓度为 $16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,换算为昆药集团DHA等效的1.7倍等效剂量,按小鼠体质量以 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的体积灌胃,Sham组、DHA组小鼠灌胃等体积0.5% CMC-Na,每日给药2次,间隔12 h。

2.1.2 TNF- α 海马连续注射模型的制备 在开始注射前1周,先将微型药物输送套管针固定在前、后囟后1.6 mm,中缝轴后2 mm,背腹轴后2.1 mm处,后分析这些小鼠的机械性痛觉是否异常。将没有异常机械性痛觉行为的小鼠随机分为两组,连续7 d接受TNF- α 的工作液或等体积生理盐水的微量给药套管针注射。按照人与小鼠1:9的比例换算给药剂量,参考文献[15]及课题组前期预实验,设置DHA低、中、高剂量(DHA-L、DHA-M、DHA-H)分别为4、8、 $16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,换算为昆药集团DHA 0.4、0.8、1.7倍等效剂量,其中DHA阳性药PGB剂量为 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,是PGB临床治疗NP的1倍等效剂量。将于海马中连续注射TNF- α 的小鼠按随机数字表法分为TNF- α 海马连续注射组、DHA-L组、DHA-M组、DHA-H组、PGB组;每组4只,另设Sham组4只,共24只。连续7 d在小鼠海马区注射纯化的TNF- α 蛋白,并在接下来的14 d内再根据分组进行套管给药,另Sham组给予等体积的生理盐水。

2.2 细胞模型的制备

2.2.1 原代小胶质细胞培养 消化12只新生小鼠的海马后将分离的细胞置于6孔板中。孵育14 d后,用Lipofectamine 2000将 $0.8\text{ }\mu\text{g}$ 编码增强绿色荧光蛋白(EGFP)的质粒转染到细胞混合物中,24 h后,将位于顶层的小胶质细胞消化、 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径8.33 cm,下同),再悬浮并重新铺在玻璃盖上,细胞密度为 1×10^4 个/板。将小胶质细胞Iba-1染色以确保分离的小胶质细胞纯度^[16]。将分离的原代小胶质细胞与含有/不含有 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸和含 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA的培养基一起孵育,6 h后加入 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸,其余组给予等体积的磷酸盐缓冲液(PBS),并再孵育40 min。

2.2.2 海马原代谷氨酸能神经元过度激活的海马原代神经元-小胶质细胞共培养 取怀孕18 d小鼠的海马原代神经元,在PBS中解剖大脑海马,并消化海马神经元^[17]。将原代海马神经元置于24孔板中的玻璃盖上,细胞浓度为 1×10^4 个/孔;培养原代小胶质细胞方法同2.2.1项;后将原代海马神经元与含有 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸或等体积的PBS的培养基孵育30 min,然后与重新悬浮的原代小胶质细胞一起孵育6 h,其中加入/不加入 $0.5/1/2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA。

2.2.3 小胶质细胞过度激活的海马原代神经元-小胶质细胞共培养 培养原代小胶质细胞方法同2.2.1项,将悬浮的原代小胶质细胞与含有/不含 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酸的培养基孵育30 min,用离心机 $12\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,用含/不含 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DHA培养基再悬浮,加入原代海马神经元,再孵育6 h。然后,将甘氨酸添加到共培养的海马神经元和小胶质细胞中,其余组给予等体积的PBS,再孵育40 min。

2.3 检测方法

2.3.1 免疫荧光法观察海马谷氨酸能神经元投射网络 将包埋好的冰冻切片组织放于PBS中冲洗3次;0.5%的BSAT封闭30 min,DAPI染色,PBST缓冲液清洗3遍,贴片、封片,在SV1000的激光共聚焦显微镜下观察(比例尺200 μm)后分析,通过计算右侧大脑切片中红色荧光数量以量化海马谷氨酸能神经元向各个核团的投射。

2.3.2 高尔基染色法观察海马CA1和CA3区细胞锥体神经元形态 给药第19天后取小鼠海马组织进行高尔基染色的预处理后,进行高尔基梯度染色,切成厚度为180 μm 冠状片,在SV1000的激光共聚焦显微镜下合成Z轴视野(每张片步长1 μm ,

比例尺 50 μm), 由 Photoshop 合并, 并由 Neuro J (Image J 的插件) 和 Sholl 分析, 统计海马 CA1 和 CA3 区锥体神经元树突的总长度及其分支数。

2.3.3 免疫荧光法观察原代小胶质细胞 固定小胶质细胞, 放于 PBS 中洗 3 次; 0.5% BSAT 中封闭 30 min, DAPI 染色, PBST 缓冲液清洗 3 遍, 贴片、封片, 在 SV1000 激光共聚焦显微镜下观察 (20 μm) 后分析, 观察细胞形态和统计细胞胞体面积。

2.3.4 免疫荧光法分析观察原代海马神经元-小胶质共培养体系小胶质细胞激活情况 固定小胶质细胞, 放于 PBS 中洗 3 次, 0.5% BSAT 封闭 30 min, 一抗孵育兔抗 Iba-1 (1:200), 4 °C 过夜; PBST 缓冲液清洗 3 遍, 二抗驴抗兔 594 (1:200) 孵育 1 h, DAPI 染色, PBST 缓冲液清洗再 3 遍, 贴片、封片, 在 SV1000 的激光共聚焦显微镜下观察 (200 μm) 后分析 EGFP-Iba-1 阳性小胶质细胞的形态。

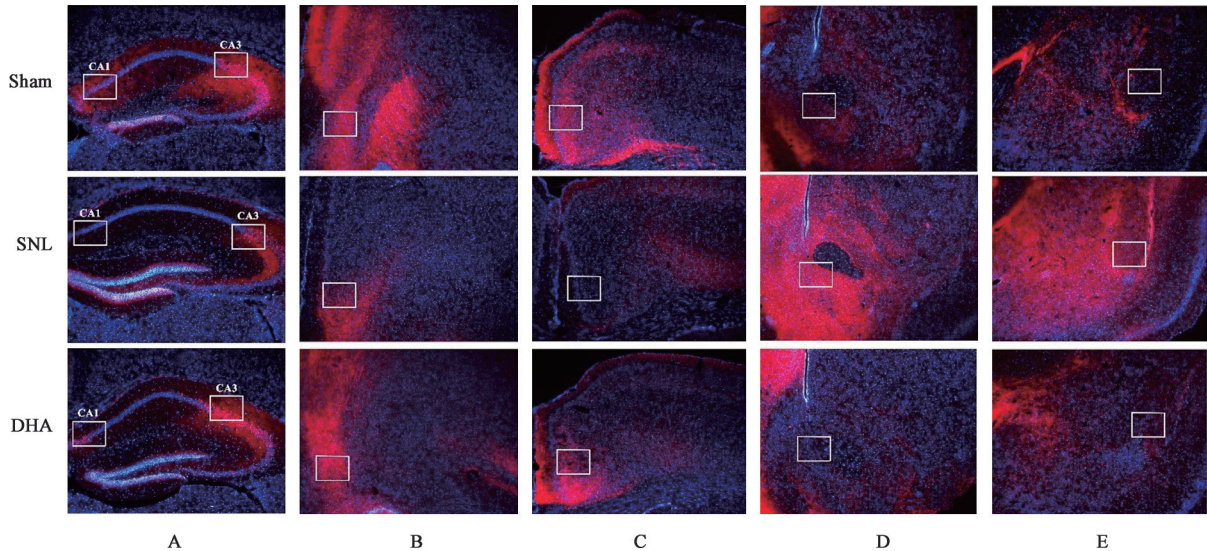
2.3.5 免疫荧光法分析观察原代海马神经元-小胶质共培养体系海马神经元兴奋性以及可塑性损伤情况 固定神经元, 放于 PBS 中洗 3 次, 0.5% BSAT 封闭 30 min, 一抗孵育小鼠抗 TUBB3 (1:600), 4 °C

过夜; PBST 缓冲液清洗 3 遍, 一抗再孵育兔抗 PSD95 (1:400), 4 °C 过夜; PBST 缓冲液清洗 3 遍, 二抗驴抗兔 594 (1:200) 及山羊抗小鼠 488 (1:400) 孵育 1 h, DAPI 染色, PBST 缓冲液清洗再 3 遍, 贴片、封片, 在 SV1000 激光共聚焦显微镜下观察 (20 μm) 后分析 PSD95-TUBB3 阳性海马神经元的形态。

2.4 统计学分析 采用 Image J 软件处理图片, Graphpad Prism 8 软件对数据进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 SNL 小鼠海马神经投射的影响 与 Sham 组比较, SNL 组的伏隔核 (Nac) 和杏仁核 (BLA) 中 dTomato 阳性神经元显著上升 ($P < 0.01$); 而前额叶皮质 (Frc)、前扣带回 (ACC)、和海马 (HP) CA1 区中 dTomato 阳性神经元显著下降 ($P < 0.01$)。在 DHA 组中, 与 SNL 组比较, Frc、ACC、HP 中 dTomato 阳性神经元显著增多 ($P < 0.01$), BLA、Nac 中 dTomato 阳性神经元显著减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 1、表 1。



注: A. HP; B. Frc; C. ACC; D. Nac; E. BLA
图 1 DHA 对 SNL 小鼠海马神经投射的影响 (免疫荧光, $\times 20$)

Fig. 1 Effect of DHA on hippocampal neuroprojection in SNL mice (IF, $\times 20$)

表 1 DHA 对 SNL 小鼠海马神经投射的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

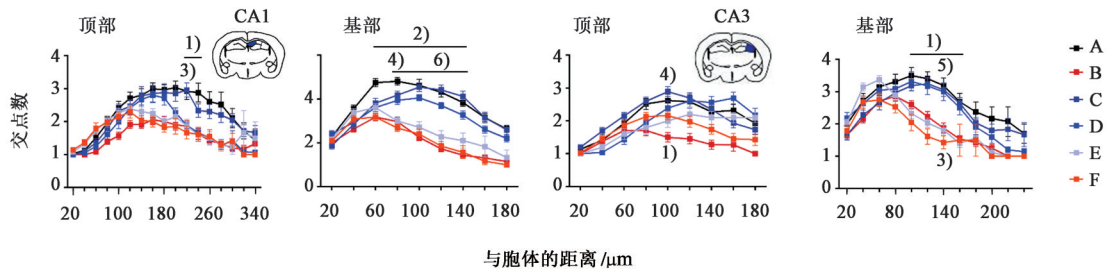
Table 1 Effect of DHA on hippocampal neuroprojection in SNL mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	HP	Frc	ACC	Nac	BLA
Sham 组		11.33 \pm 2.08	12.00 \pm 1.00	15.67 \pm 0.58	4.00 \pm 1.00	4.33 \pm 1.15
SNL 组		2.33 \pm 1.53 ¹⁾	5.00 \pm 1.73 ¹⁾	6.00 \pm 2.65 ¹⁾	13.00 \pm 1.00 ¹⁾	15.33 \pm 1.53 ¹⁾
DHA 组	16	10.33 \pm 2.08 ²⁾	11.67 \pm 1.53 ²⁾	14.00 \pm 2.65 ²⁾	4.33 \pm 0.58 ²⁾	5.33 \pm 0.58 ²⁾

注: 与 Sham 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 SNL 组比较²⁾ $P < 0.01$

3.2 对TNF- α 连续注射小鼠海马CA1和CA3锥体神经元的影响 与Sham组比较, TNF- α 海马连续注射模型组小鼠海马CA1和CA3锥体神经元树突总长度和分支数明显减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$); 与TNF- α 海马连续注射模型组比较, DHA-M、DHA-H组海马CA1和CA3锥体神经

元的树突总长度和分支数明显增多 ($P<0.05, P<0.01$); 与DHA-M组比较, DHA-H组海马CA1锥体神经元的树突总长度均显著变多 ($P<0.01$), 而DHA-L组CA1神经元树突总长度和CA3神经元树突基部总长度则显著减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。见图2、表2。



注: A. Sham组; B. TNF- α 海马连续注射模型组; C. DHA-H组; D. DHA-M组; E. DHA-L组; F. PGB组; 与Sham组比较, TNF- α 海马连续注射模型组¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与TNF- α 海马连续注射模型组比较, DHA-H组³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$; 与TNF- α 海马连续注射模型组比较, DHA-M组⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$

图2 DHA对TNF- α 连续注射小鼠海马中CA1和CA3锥体神经元的影响

Fig. 2 Effect of DHA on TNF- α continuous injection of CA1 and CA3 vertebral neurons in hippocampus

表2 DHA对TNF- α 连续注射小鼠海马中CA1和CA3锥体神经元的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

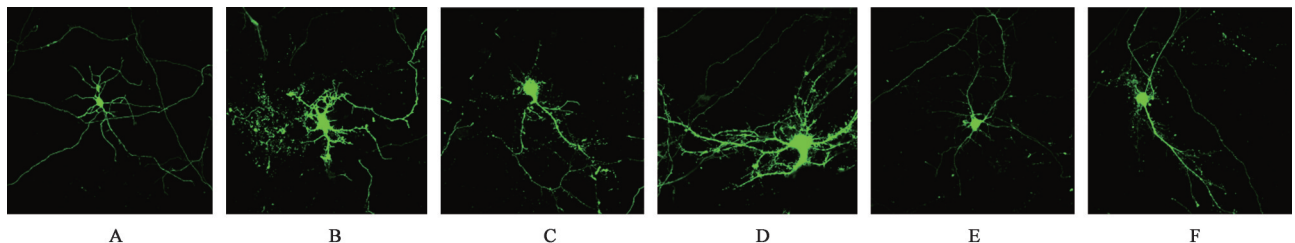
Table 2 Effect of DHA on TNF- α continuous injection of CA1 and CA3 vertebral neurons in hippocampus ($\bar{x}\pm s, n=3$) μm

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	CA1神经元树突总长度		CA3神经元树突总长度	
		顶部	基部	顶部	基部
Sham组		770.0±184.3	697.0±151.1	484.8±117.9	616.2±171.0
TNF- α 海马连续注射模型组		401.3±77.1 ¹⁾	350.1±103.8 ¹⁾	207.2±53.1 ¹⁾	395.4±85.6 ¹⁾
DHA-H组	16	792.1±169.2 ^{3,4)}	778.7±159.0 ^{3,4)}	506.8±153.8 ³⁾	563.0±136.3 ³⁾
DHA-M组	8	571.5±108.7 ³⁾	579.4±234.0 ³⁾	452.6±100.5 ³⁾	497.9±97.2 ²⁾
DHA-L组	4	462.4±131.4 ⁴⁾	391.0±167.4 ⁴⁾	427.8±131.3	373.9±140.7 ⁴⁾
PGB组	25	407.3±135.4	310.0±107.5	337.8±102.7	279.3±98.8

注: 与Sham组比较, TNF- α 海马连续注射模型组¹⁾ $P<0.01$; 与TNF- α 海马连续注射模型组比较²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$; 与DHA-M组比较⁴⁾ $P<0.01$

3.3 对原代小胶质细胞胞体的影响 与空白组比较, 甘氨酸组和谷氨酸组细胞均呈阿米巴样, 细胞胞体面积显著升高 ($P<0.01$); 与甘氨酸组及谷氨酸组比较, 甘氨酸+谷氨酸组细胞胞体面积显著升高 ($P<0.01$); 与谷氨酸组比较, 谷氨酸+DHA组细胞胞

体面积显著减少 ($P<0.01$); 与甘氨酸+谷氨酸组比较, 甘氨酸+谷氨酸+DHA组细胞胞体面积显著减少 ($P<0.01$); 与谷氨酸+DHA组比较, 甘氨酸+谷氨酸+DHA组胞体面积减少, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图3、表3。



注: A. 空白组; B. 甘氨酸组; C. 谷氨酸组; D. 甘氨酸+谷氨酸组; E. 谷氨酸+DHA组; F. 甘氨酸+谷氨酸+DHA组

图3 DHA对原代小胶质细胞胞体的影响 (免疫荧光, $\times 100$)

Fig. 3 Effect of DHA on primary microglia (IF, $\times 100$)

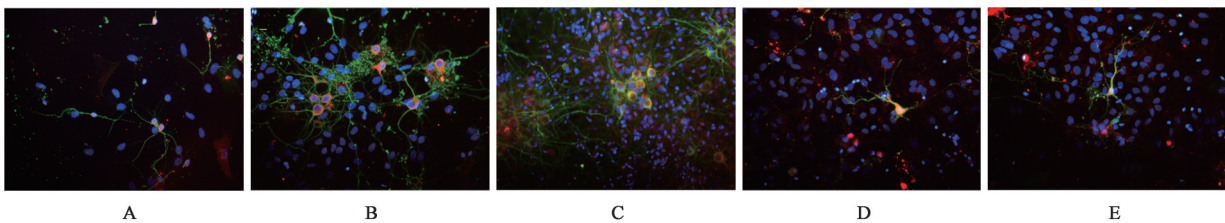
表3 DHA对原代小胶质细胞胞体的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of DHA on primary microglia ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞胞体面积/ μm^2
空白组		72.43±40.15
甘氨酸组		182.64±98.58 ¹⁾
谷氨酸组		280.79±105.17 ¹⁾
甘氨酸+谷氨酸组		387.19±181.74 ^{2,3)}
谷氨酸+DHA组	2	76.05±41.57 ³⁾
甘氨酸+谷氨酸+DHA组	2	149.76±49.64 ^{4,5)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与甘氨酸组比较²⁾ $P<0.01$;与谷氨酸组比较³⁾ $P<0.01$;与甘氨酸+谷氨酸组比较⁴⁾ $P<0.01$;与谷氨酸+DHA组比较⁵⁾ $P<0.05$

3.4 对海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系中
原代小胶质细胞的影响 与空白组比较,谷氨酸组
细胞呈阿米巴样,胞体面积显著升高($P<0.01$);与谷
氨酸组比较,谷氨酸+DHA-L、谷氨酸+DHA-M、谷
氨酸+DHA-H组细胞均未见阿米巴样,且胞体面积
显著降低($P<0.01$);与谷氨酸+DHA-L组比较,谷
氨酸+DHA-M组细胞胞体面积明显降低($P<0.05$);与
谷氨酸+DHA-M组比较,谷氨酸+DHA-H组细胞胞
体面积明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。
见图4、表4。



注:A.空白组;B.甘氨酸组;C.谷氨酸+DHA-L组;D.谷氨酸+DHA-M组;E.谷氨酸+DHA-H组;红色.Iba-1
图4 DHA对海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系中原代小胶质细胞的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 4 Effect of DHA on microglia in hippocampal primary neuron-microglia co-culture systems (IF, ×100)

表4 DHA对海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系中原代小
胶质细胞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

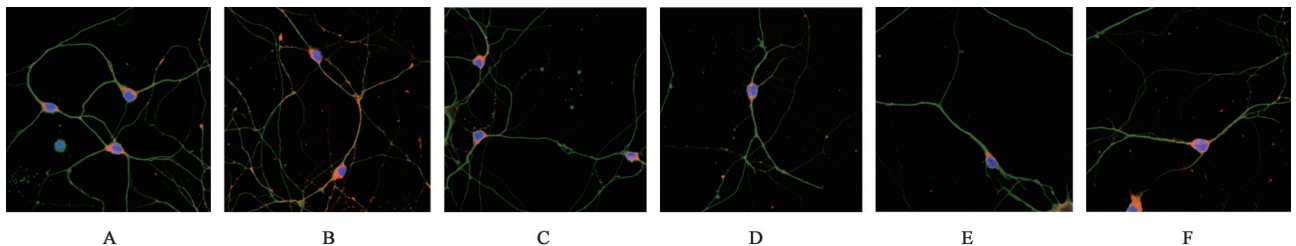
Table 4 Effect of DHA on microglia in hippocampal primary
neuron-microglia co-culture systems ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞胞体面积/ μm^2
空白组		105.44±42.49
谷氨酸组		207.75±28.57 ¹⁾
谷氨酸+DHA-L组	0.5	142.90±43.63 ²⁾
谷氨酸+DHA-M组	1	111.85±24.81 ^{2,3)}
谷氨酸+DHA-H组	2	89.42±26.46 ^{2,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与谷氨酸组比较²⁾ $P<0.01$;与谷氨酸+DHA-L组比较³⁾ $P<0.05$;与谷氨酸+DHA-M组比较⁴⁾ $P<0.05$

小胶质细胞+甘氨酸组的海马原代神经元初、次级
树突棘内、外 PSD95 表达量显著升高,差异具有统
计学意义($P<0.01$);与静息原代小胶质细胞+甘
氨酸组比较,活化原代小胶质细胞+甘氨酸组中海
马原代神经元的初、次级树突棘内、外 PSD95 表
达量均显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$);
与活化原代小胶质细胞+甘氨酸组比较,活化原代
小胶质细胞+甘氨酸+DHA组中海马原代神经元的
初、次级树突棘内、外 PSD95 表达量均显著升
高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与活化原代
小胶质细胞+DHA组比较,活化原代小胶质细胞+
甘氨酸+DHA组中观察到神经元初、次级树突棘
内、外 PSD95 表达量显著升高,差异具有统计学
意义($P<0.01$)。见图5、表5。

3.5 对海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系中
海马原代神经元的影响 与空白组比较,静息原代



注:A.空白组;B.静息原代小胶质细胞+甘氨酸组;C.活化原代小胶质细胞组;D.活化原代小胶质细胞+甘氨酸组;E.活化原代小胶质细胞+DHA组;F.活化原代小胶质细胞+甘氨酸+DHA组;红色.PSD95;绿色.TUBB3

图5 DHA对海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系中海马原代神经元的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 5 Effect of DHA on hippocampal primary neurons in hippocampal primary neuron-microglial co-culture system (IF, ×100)

表 5 DHA 对海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系中海马原代神经元的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of DHA on hippocampal primary neurons in hippocampal primary neuron-microglial co-culture system ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	初级树突棘内	初级树突棘外	次级树突棘内	次级树突棘外
空白组		2.76 \pm 1.49	15.30 \pm 8.72	1.62 \pm 0.88	4.19 \pm 2.63
静息原代小胶质细胞+甘氨酸组		12.89 \pm 4.49 ¹⁾	62.49 \pm 33.38 ¹⁾	6.45 \pm 3.50 ¹⁾	18.16 \pm 13.09 ¹⁾
活化原代小胶质细胞组		2.71 \pm 1.42	13.11 \pm 8.09	2.15 \pm 1.42	2.79 \pm 1.51
活化原代小胶质细胞+甘氨酸组		2.16 \pm 1.47 ²⁾	14.36 \pm 11.03 ²⁾	2.61 \pm 1.71 ²⁾	4.28 \pm 3.43 ²⁾
活化原代小胶质细胞+DHA 组	2	1.81 \pm 0.72	10.73 \pm 7.13	1.59 \pm 0.89	2.81 \pm 1.85
活化原代小胶质细胞+甘氨酸+DHA 组	2	9.81 \pm 5.74 ^{3,4)}	60.14 \pm 54.10 ^{3,4)}	6.41 \pm 4.24 ^{3,4)}	17.73 \pm 10.72 ^{3,4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与静息原代小胶质细胞+甘氨酸组比较²⁾ $P<0.01$;与活化原代小胶质细胞+甘氨酸组比较³⁾ $P<0.01$;与活化原代小胶质细胞+DHA 组比较⁴⁾ $P<0.01$

4 讨论

大量研究表明,抑制小胶质细胞过度激活,修复神经损伤是缓解 NP,改善三大核心症状的关键^[5]。TNF- α 在小胶质细胞激活中起到重要调控作用,且其在海马神经元中过表达导致大脑神经元损伤^[3,4]。本课题组前期研究显示,DHA 可抑制小胶质细胞激活及 TNF- α 表达,且能修复神经损伤^[12],但 DHA 如何调控海马及小胶质细胞的调控机制尚不明确。基于此,本实验将从 DHA 对海马神经元及小胶质细胞的调控的角度以期探索 DHA 缓解海马神经元损伤治疗 NP 的保护作用。

本研究中,DHA 的神经保护作用 and 协同调控作用与有效抑制海马体中异常激活的小胶质细胞密切相关,且其通过对神经元和小胶质细胞的双重调控达到良好的修复效果,为解释 DHA 可能参与治疗 NP 及改善三大核心症状提供了证据。且 NP 均与脑区中的不同核团存在着密切的联系。相关研究表明,在海马中随着机械痛和痛觉过敏的增强,TNF- α 显著升高^[18]。亦有研究表明 BLA 在情绪调节特别是恐惧调节方面发挥着重要作用。从形态学和功能学的角度,内侧前额叶皮层(mPFC)亦被证明与大鼠的神经病理性疼痛有关^[19]。相关文献表明海马-内侧前额叶皮层的功能紊乱被认为是导致疼痛障碍的原因^[20]。而 ACC 作为内侧痛觉系统的组成部分,在处理疼痛的情绪/动机特征(而非感觉特征)及在对有害刺激做出反应时产生行为的习得性变化方面起着重要作用^[21]。人类影像学及相关临床研究均表明,疼痛会使 ACC 神经元过度激活而使神经功能受损^[22],本研究通过观察谷氨酸能神经元对于神经环路的投射情况发现,DHA 均可显著改善 NP 对于上述核团的影响;基于此为 DHA 可能通过调节脑神经环路来治疗 NP 提供了论证。为了追踪海马谷氨酸能神经元的投射,将带有红色荧光标记

的可追踪谷氨酸能神经元的 CAMK II dTomato AAV 腺相关病毒注射到海马 CA3 区,在第 17 天后通过切片染色,根据荧光量统计,检测 CAMK II dTomato AAV 腺相关病毒在各个核团的荧光量,以此统计谷氨酸能神经元的投射情况。根据免疫荧光结果显示,相较于 SNL 模型,给予 DHA 后在 Frc/ACC/CA1 中 dTomato 阳性神经元数目显著增多,而在 BLA/Nac 中 dTomato 阳性神经元数目明显减少;提示 DHA 增强了 SNL 小鼠对 Frc 和 ACC 的海马谷氨酸投射,同时消融了对 BLA 和 Nac 的投射。以上表明 DHA 明显缓解了 SNL 模型的海马神经环路对应的病理性改变。本实验通过追踪海马神经元在病理及药效干预下投射模式的改变,不仅从神经环路的角度评价双氢青蒿素的药效,更为解释其共治特点提供了神经解剖学和功能学上的证据。

为进一步探索 DHA 对于小胶质细胞的调控是否为其治疗 NP 的关键药理途径,该实验构建了海马连续注射 TNF- α 导致的 NP 模型,并以高尔基染色来检测 DHA 的药效,以高尔基染色统计海马 CA1 和 CA3 区锥体神经元顶部和基部树突的总长度及其分支数。数据显示模型组小鼠海马 CA1 和 CA3 锥体神经元树突总长度和分支数显著减少,提示海马神经元的可塑性受到了损伤;而给药组小鼠海马 CA1 和 CA3 锥体神经元树突总长度和分支数明显增多,且 DHA 呈现剂量依赖性改善了这一病理性变化,这提示 TNF- α 海马连续注射模型小鼠的病理改变和临床基础以及过往研究是相一致的^[23-25]。这也为使用 TNF- α 连续注射模型小鼠来评价 DHA 对于海马功能的改善这一论证提供了科学论证。

上述研究提示对中枢神经进行修复是 NP 研究的重要难题,研究显示在没有重新建立处理疼痛认知和感知的脑功能网络的情况下,通过一线药物如 PGB 单独抑制痛觉信号输入,或通过传统抗抑郁药

物调节神经递质并不能达到很好的治疗效果^[26-28]。双氢青蒿素呈现量效依赖性地改善NP,而这与整体上镇痛抗抑郁抗焦虑,改善三大核心症状的药效相一致,并且在此前提下,对于海马神经元呈现量效依赖的改善。并且,对于海马神经元的改善的量效与整体药效一致,这提示了DHA对于海马神经元有修复作用且有较好的量效关系。其次,对于海马神经元的修复的量效与其整体药效是相关的,这是DHA的特点以及优势。

为了明确DHA对过度激活的原代小胶质细胞的调控作用,本研究以甘氨酸诱导原代小胶质细胞的持续激活,用甘氨酸和谷氨酸诱导原代小胶质细胞的过度激活以检测DHA对此的干预效果。小胶质细胞激活时呈现阿米巴样的形变,同时胞体面积增加,因此通过统计胞体面积来评价其激活状态。结果表明与空白组比较,分别用甘氨酸诱导的原代小胶质细胞激活和用谷氨酸诱导的原代小胶质细胞呈阿米巴样;但二者同时诱导的原代小胶质细胞胞体面积比较于二者单独激活的原代小胶质细胞胞体面积显著升高,这提示甘氨酸和谷氨酸同时诱导能导致原代小胶质细胞过度激活;且在加入DHA后,由谷氨酸诱导的原代小胶质细胞胞体面积显著减少,提示DHA能显著性地缓解谷氨酸诱导的原代小胶质细胞的过度激活;而在二者同时诱导的原代小胶质细胞中加入DHA后,原代小胶质细胞的胞体面积亦显著减少,这提示DHA亦能显著性地缓解甘氨酸及谷氨酸诱导的原代小胶质细胞的过度激活。

为了评价DHA对于海马神经元和小胶质细胞的双向调控作用,本实验构建了海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系,分别以小胶质细胞的胞体面积和海马神经元的形态来量化DHA对其调控的作用。为了探索DHA对于共培养体系中原代小胶质细胞持续过度激活的影响,在共培养体系中通过使海马神经元异常兴奋的方式持续过度激活原代小胶质细胞后,用Iba-1抗体对原代小胶质细胞进行免疫荧光染色,分析EGFP-Iba-1阳性小胶质细胞的形态。实验结果显示谷氨酸组中小胶质细胞相较于空白组呈阿米巴样,胞体面积变大,提示异常兴奋的海马原代神经元可诱导小胶质细胞激活;且比较于谷氨酸组,在分别加入低、中、高剂量的DHA后,谷氨酸+DHA-L、谷氨酸+DHA-M、谷氨酸+DHA-H组小胶质细胞胞体面积变小,且均未呈现阿米巴样,提示DHA呈剂量依赖性地缓解由海马原代谷氨酸能神经元过度激活所诱发的小胶质细胞的过度

激活。进一步地,为了评价DHA对于共培养体系中损伤海马神经元兴奋性及可塑性的影响,在共培养体系中通过使原代小胶质细胞过度激活的方式使海马神经元造成兴奋性及可塑性的损伤,对小胶质细胞进行免疫荧光染色,分析PSD95-TUBB3阳性海马神经元的形态,统计海马神经元树突棘的数量来进一步量化DHA对其调控的作用。实验结果显示,与空白组比较,在静息的原代小胶质细胞中加入甘氨酸发现海马神经元初、次级树突棘内、外PSD95表达量上升,提示甘氨酸可诱导海马神经元的激活;而与静息原代小胶质细胞+甘氨酸组比较,活化原代小胶质细胞+甘氨酸组中海马神经元的初、次级树突棘内、外PSD95表达量降低,这提示异常激活的原代小胶质细胞对海马原代神经元造成了兴奋性及可塑性的损伤;在加入DHA后,活化原代小胶质细胞+甘氨酸组中神经元的初、次级树突棘内、外PSD95表达量升高,提示DHA对于由不良激活的原代小胶质细胞损伤的海马原代神经元有明显保护作用。基于上述实验结果发现DHA对海马原代神经元的保护可体现在两个方面:一方面DHA可抑制原代小胶质细胞的神经伤害性的表型从而保护神经元,另一方面DHA对于海马原代神经元也有保护的效果,而DHA对于保护海马原代神经元与抑制原代小胶质细胞之间二者存在一定关联,并从细胞层面更加明确地阐述了DHA双向抑制原代小胶质细胞以及保护海马原代神经元的关系。上述研究也为海马原代神经元和原代小胶质细胞二者之间的相互调控提供了有利的证据,该研究也与之前的文献报道和研究一致^[23]。

因此,本研究推测DHA对NP的治疗可能是通过抑制原代小胶质细胞的激活,减少海马原代神经元的损伤或死亡,从而起到修复神经损伤与改善三大核心症状的作用,达到治疗NP的效果。本研究从体内脑区和体外细胞的角度,探讨了DHA通过双向调控海马原代神经元-小胶质细胞共培养体系达到神经元保护和修复的作用,为后续探索DHA基于神经免疫分子机制深入研究奠定基础。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【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] 张晴, 吉海旺. 脊髓小胶质细胞群参与神经病理性疼痛的缓解和复发[J]. 中国疼痛医学杂志, 2022, 28

- (8):569-570.
- [3] FASICK V, SPENGLER R N, SAMANKAN S, et al. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015, 53: 139-159.
- [4] 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.
- [5] DELLAROLE A, MORTON P, BRAMBILLA R, et al. Neuropathic pain-induced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling [J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 41: 65-81.
- [6] 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.
- [7] 史乃元, 何涵, 刘彦希, 等. 双氢青蒿素药理作用研究进展 [J]. *吉林医药学院学报*, 2022, 43(2): 142-144.
- [8] 张然, 杨冰, 李红珠, 等. 双氢青蒿素抗炎作用机制的研究进展 [J]. *中国药房*, 2021, 32(9): 1147-1152.
- [9] 闫思超, 李玉洁, 王娅杰, 等. 青蒿素类药物对T细胞免疫调节作用研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(22): 4992-4999.
- [10] 朱春燕, 许琼虹, 毛志云, 等. 3种青蒿素衍生物对神经病理性疼痛小鼠痛共情绪障碍干预效果的比较 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(15): 3058-3063.
- [11] 谷丽维, 李玉洁, 蔡维艳, 等. 双氢青蒿素体外对疟原虫感染人红细胞膜通透性的影响研究 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(17): 3589-3594.
- [12] ZHU C, ZHU Y, ZHANG G, et al. The analgesic and antidepressant properties of dihydroartemisinin in the neuropathic pain mice: By the downregulation of HnRNPA1 in the spinal cord and hippocampus [J]. *Clin Transl Med*, 2022, 12(2): e751.
- [13] HO KIM S, MO CHUNG J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. *Pain*, 1992, 50(3): 355-363.
- [14] CHAPLAN S R, BACH F W, POGREL J W, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1): 55-63.
- [15] 吴红艳. 双氢青蒿素对神经病理性疼痛模型小鼠痛与情绪障碍共病的干预作用和特点研究 [D]. 贵阳: 贵州中医药大学, 2020.
- [16] TAMASHIRO T T, DALGARD C L, BYRNES K R. Primary microglia isolation from mixed glial cell cultures of neonatal rat brain tissue [J]. *J Vis Exp*, 2012(66): e3814.
- [17] ZHU C Y, SHEN Y, XU Q. Propagation of dysbindin-1B aggregates: Exosome-mediated transmission of neurotoxic deposits [J]. *Neuroscience*, 2015, 291: 301-316.
- [18] ZHU J, WEI X, LIU J, et al. Interaction of glia activation and neurotransmission in hippocampus of neuropathic rats treated with mirtazapine [J]. *Exp Clin Psychopharmacol*, 2009, 17(3): 198-203.
- [19] DEVOIZE L, ALVAREZ P, MONCONDUIT L, et al. Representation of dynamic mechanical allodynia in the ventral medial prefrontal cortex of trigeminal neuropathic rats [J]. *Eur J Pain*, 2011, 15(7): 676-682.
- [20] CARDOSO-CRUZ H, LIMA D, GALHARDO V. Impaired spatial memory performance in a rat model of neuropathic pain is associated with reduced hippocampus-prefrontal cortex connectivity [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(6): 2465-2480.
- [21] GUNGOR N Z, JOHANSEN J. A chronic pain in the ACC [J]. *Neuron*, 2019, 102(5): 903-905.
- [22] JURCAU A. Insights into the pathogenesis of neurodegenerative diseases: Focus on mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11847.
- [23] COVEY W C, IGNATOWSKI T A, KNIGHT P R, et al. Brain-derived TNFalpha: Involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain [J]. *Brain Res*, 2000, 859(1): 113-122.
- [24] FASICK V, SPENGLER R N, SAMANKAN S, et al. The hippocampus and TNF: Common links between chronic pain and depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015, 53: 139-159.
- [25] FIORE N T, AUSTIN P J. Are the emergence of affective disturbances in neuropathic pain states contingent on supraspinal neuroinflammation? [J]. *Brain Behav Immun*, 2016, 56: 397-411.
- [26] CARUSO R, OSTUZZI G, TURRINI G, et al. Beyond pain: Can antidepressants improve depressive symptoms and quality of life in patients with neuropathic pain? A systematic review and Meta-analysis [J]. *Pain*, 2019, 160(10): 2186-2198.
- [27] ALLES S, SMITH P A. Etiology and pharmacology of neuropathic pain [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(2): 315-347.
- [28] YELLAND M. Review: Pregabalin reduces fibromyalgia pain but increases adverse events [J]. *Ann Intern Med*, 2017, doi: 10.7326/ACPJC-2017-166-2-002.

[责任编辑 孙丛丛]