

# 乌头汤调控海马 BDNF/TrkB 通路以缓解神经病理性疼痛的痛共情绪症状

吴红艳<sup>1</sup>, 师钰琪<sup>2</sup>, 朱春燕<sup>2\*</sup>, 林娜<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550000; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 探索乌头汤对海马组织内脑源性神经营养因子/原肌球蛋白受体激酶 B(BDNF/TrkB)通路的调控作用,以明确乌头汤抑制神经病理性疼痛(NP)达到痛与情绪共治的初步机制。**方法:** 将小鼠随机分为假手术组(sham),脊神经结扎组(SNL),乌头汤组(乌头汤),乌头汤-ANA12拮抗剂组(乌头汤-ANA12),普瑞巴林(PGB)组和盐酸氟西汀(FLU)组 6 组。所有小鼠针对海马安装给药套管,除假手术组暴露但不结扎神经外,其余组均进行脊神经结扎。术后 1~21 d,各给药组分别以 126 mg·kg<sup>-1</sup> 乌头汤水煎液,25 mg·kg<sup>-1</sup> PGB,3 mg·kg<sup>-1</sup> FLU 灌胃给药,sham 组及 SNL 组以等体积生理盐水灌胃,1 次/d。术后 10~16 d 进行海马套管给药,其中乌头汤-ANA12 组给予 TrkB 受体拮抗剂 ANA12(50 nmol·L<sup>-1</sup>),其余组给予等体积生理盐水。采用 Von Frey 法检测小鼠的机械痛阈值,采用旷场和悬尾实验分别检测小鼠的焦虑和抑郁症状,采用高尔基染色法检测小鼠海马 CA3 区椎体神经元的病理性改变。**结果:** 与假手术组比较,SNL 模型组小鼠机械痛阈值显著降低,旷场中心区停留时间显著降低,悬尾不动时间显著增加( $P < 0.01$ ),海马神经元树突分支数明显减少( $P < 0.05, P < 0.01$ );与 SNL 模型组比较,术后 9~21 d 乌头汤组小鼠的机械痛阈值显著增高,旷场中央区停留时间显著增高,悬尾不动时间显著降低,海马 CA3 区椎体神经元顶部和底部树突分支数显著增高( $P < 0.01$ );与 SNL 模型组比较,乌头汤-ANA12 组的机械痛阈值在术后 9 d 显著增高( $P < 0.01$ ),但在通过套管进行 ANA12 干预后,乌头汤-ANA12 组的机械痛阈值持续降低,在术后 14~21 d 与 SNL 组比较无统计学差异。乌头汤-ANA12 组小鼠中心场停留时间在术后 9 d 较 SNL 模型组显著增高( $P < 0.01$ ),但在小鼠海马进行 ANA12 干预后,乌头汤-ANA12 组的中心场停留时间持续降低,在术后 21 d 降至与 SNL 组无统计学差异;乌头汤-ANA12 组小鼠悬尾不动时间在术后 21 d 与 SNL 组比较无统计学差异;海马高尔基染色显示,乌头汤-ANA12 组海马 CA3 区椎体神经元顶部和底部树突分支数与 SNL 组比较无统计学差异。**结论:** 乌头汤能缓解 SNL 导致的海马 CA3 区椎体神经元损伤及痛共情绪障碍症状,相关作用可能与其对海马 BDNF/TrkB 通路的调控有关。

**[关键词]** 乌头汤; 神经病理性疼痛; 痛与情绪共病; 海马; 脑源神经营养因子/原肌球蛋白受体激酶 B; 脊神经结扎

**[中图分类号]** R2-0;R289;R285.5;R246.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)01-0024-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200136

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190918.1114.008.html>

**[网络出版时间]** 2019-09-18 15:46

## Wutoutang Modulation Hippocampal BDNF/TrkB Pathway to Relieve Pain-emotion Co-curation

WU Hong-yan<sup>1</sup>, SHI Yu-qi<sup>2</sup>, ZHU Chun-yan<sup>2\*</sup>, LIN Na<sup>1,2\*</sup>

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China;

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

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mediating effect of Wutoutang (WTT) on brain-derived

**[收稿日期]** 20190401(027)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81603322,81630107);中央级公益性科研院所基本科研业务费课题(L2017046)

**[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

neurotrophic factor/tropomyosin receptor kinase B (BDNF/TrkB) pathway in hippocampus and to clarify the mechanism of therapeutic action of WTD on pain-emotion comorbidity by inhibiting neuropathic pain (NP) preliminarily. **Method:** The mice were divided into sham group, spinal cord ligation (SNL) group, Wutoutang (WTT) group, Wutoutang-ANA12 antagonist (WTT-ANA12) group, pregabalin (PGB) group, Fluoxetine Hydrochloride (FLU) group randomly. Mice were fixed with the drug delivery cannula for hippocampal CA3. The L5 spinal cord of mice were tightly ligated but sham group (only exposed). During the 10-16<sup>th</sup> day after surgery, WTT, WTT-ANA12 groups were gavaged with 126 mg·kg<sup>-1</sup> WTT, PGB and FLU groups were respectively given 25 mg·kg<sup>-1</sup> PGB and 3 mg·kg<sup>-1</sup> FLU, sham and SNL groups were given the physiological saline once a day. Then, 50 nmol·L<sup>-1</sup> ANA12 were given to the hippocampal CA3 of the WTT-ANA12 mice by drug delivery cannula, and physiological saline were given to the others on the 10-16<sup>th</sup> day after surgery. Mechanical pain were detected by Von Frey tests, anxiety and depression behaviors were separately detected by the open field and the tail tiling experiments, while the morphology of CA3 pyramidal neurons were qualified by the Golgi-staining. **Result:** Compared with sham group, significant decreases of the mechanical pain thresholds, decreases of the duration time in the open field, as well as the increases of the no-struggling time during the tail-suspension were detected in the SNL mice ( $P < 0.01$ ). In addition, as illustrated by the Golgi-staining, the atrophy of hippocampal pyramidal neurons were found in SNL mice as compared with sham ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). On the contrary, as compared to the SNL, significant increases of the mechanical pain thresholds, increases of the duration time in the open field, the decreases of the no-struggling time during the tail-suspension ( $P < 0.01$ ), as well as the morphological improvements of the hippocampal CA3 pyramidal neurons were detected in the WTT mice. Furthermore, after 7 d hippocampal injections, There is no significant distinction of the mechanical pain thresholds, the duration time in the open field, the no-struggling time during the tail-suspension, as well as the atrophy of hippocampal neurons were detected in the WTT-ANA12 groups as compared with SNL. **Conclusion:** The data suggested that the effective inhibition of WTT on SNL-induced vertebral neuron injury in hippocampus CA3 and pain-emotion disorder, which might attribute to its regulation of BDNF/TrkB pathway in hippocampus.

**[Key words]** Wutoutang; neuropathic pain; pain-emotion comorbidity; hippocampus; brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin receptor kinase B; spinal cord ligation

神经病理性疼痛(NP)是一种包括痛觉感知、认知异常的复杂难治性疼痛,患病率为 6.9% ~ 10%<sup>[1]</sup>,在临床 NP 患者中,痛与情绪障碍的共病率高达 47%<sup>[2]</sup>。痛与情绪的共病被认为是 NP 复杂且难治性原因。最新研究显示,在 NP 患者及实验动物中发现海马神经元兴奋性和突触可塑性降低,其中海马退行性病变被认为是痛共情绪障碍的关键诱因<sup>[3]</sup>,而海马神经元兴奋性与可塑性损伤修复有望成为 NP 中痛与情绪共治的突破点<sup>[4]</sup>。

中药方剂成分复杂,具有多成分、多靶点、多途径整体调节发挥作用的特点,能对机体进行全方位调节,在慢性疼痛的治疗中显现出独特的优势。乌头汤源于东汉名医张仲景《金匮要略》,由制川乌、黄芪、麻黄、白芍和炙甘草 5 味中药组成,有通痹散寒止痛之效<sup>[5]</sup>,临床主要用来治疗类风湿性关节炎、腰椎间盘突出症、肩关节周围炎等多种炎症相关疾病<sup>[6-7]</sup>,对三叉神经痛等神经病理性疼痛亦具有

良好的镇痛效果<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现,乌头汤对实验性脊神经结扎(SNL)小鼠痛与情绪共病有很好的缓解作用,能增高 SNL 小鼠海马内异常降低的 BDNF 蛋白表达量<sup>[9]</sup>,相关作用与缓解海马神经元兴奋性及可塑性的修复有关<sup>[10]</sup>,但具体的分子途径尚不明确。

已知脑源性神经营养因子(BDNF)在疼痛、抑郁症、外界压力等多种疾病中参与了海马神经元损伤的发生及修复<sup>[11]</sup>,而 BDNF/原肌球蛋白受体激酶 B(TrkB)是 BDNF 发挥关键药效的信号通路。本研究拟采用 NP 国际经典的动物模型 SNL 小鼠模型,通过海马 CA3 区显微注射 BDNF/TrkB 通路受体拮抗剂 ANA12 的方式,探究乌头汤调控海马 BDNF/TrkB 通路以缓解 NP 的痛共情绪症状的初步作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 ICR 小鼠 48 只,SPF 级,8 周龄,

体质量 28 ~ 30 g, 购自北京大学医学部(实验动物科学部), 合格证号 SCXK(京)2011-0012。动物标准饲养, 动物房空调控温, 温度 22 ~ 24 °C, 相对湿度 70% ~ 80%, 日光灯控明, 动物自由摄食饮水。

**1.2 药品与试剂** 制川乌产自四川江油, 黄芪产自山西, 麻黄产自内蒙古, 白芍产自安徽, 炙甘草产自内蒙古, 均购自北京同仁堂药房, 经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定符合 2015 年版《中国药典》规定; 普瑞巴林(PGB)胶囊(美国辉瑞公司, 批号 M57973); 盐酸氟西汀(FLU)胶囊(法国 Patheon Fance 公司, 批号 6603A); ANA12(美国 MCE 公司, 批号 HY12497); FD 快速高尔基染色试剂盒(美国 FD Neuro Technologies 公司, 批号 PK401); 异戊烷(天津市大茂化学试剂厂, 批号 2011428); OCT 包埋剂(美国 Li-Pack 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); 二甲苯(武汉博士德生物工程有限公司, 批号 AR1022); 无水乙醇(北京化工厂, 批号 20150504)。

**1.3 仪器** XTS20/30 型连续变倍体视显微镜(北京泰克仪器有限公司); Aesthesio 型 Von Frey 纤维细丝机械刺激针(法国 Bioseb 公司); 68505 型脑室立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司); 62004 型套管(深圳瑞沃德生命科技有限公司); BX41 型正置荧光显微镜(德国 Olympus 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中药药性理论实验室自制)。

## 2 方法

**2.1 分组** 采用随机数字表法, 将小鼠分为假手术(sham)组, SNL 模型组, 乌头汤组, 乌头汤-ANA12 拮抗剂组, PGB 组, FLU 组, 每组 8 只。

### 2.2 动物模型制备

**2.2.1 左侧腰椎第五脊神经结扎(SNL)模型** 小鼠适应 3 d 后进行模型制备。动物以异氟烷进行气体麻醉后, 根据参考文献方法<sup>[12]</sup>, 暴露 L5 横突, 游离 L5 神经并以 6 号眼科线结扎, 以无菌生理盐水及青霉素处理伤口后缝合。除假手术组外, 其余各组小鼠制备 SNL 模型。假手术 sham 组仅暴露并拔除 L5 横突, 但不结扎神经。所有小鼠在手术后, 观察其行动状态, 剔除运动行为受损的动物。

**2.2.2 背测海马立体定位注射模型** 根据 Paxinos&Watson 脑立体定位图谱确定海马 CA3 区立体定位坐标。将小鼠俯位固定于定位仪上, 暴露前囟以标记海马 CA3, 放置给药套管, 再用骨水泥固

定, 缝合伤口。各组小鼠均安装脑定位给药套管。

**2.3 药品制备** 乌头汤水煎液制备: 按原方比例, 将黄芪 108 g, 白芍 108 g, 炙甘草 108 g, 麻黄 108 g, 制川乌 72 g 加蒸馏水 5 L 文火煎煮 1.5 h, 滤出上清; 再加蒸馏水 4 L, 继续煎煮 1 h, 滤出上清, 合并 2 次上清液并用纱布过滤药液。浓缩至 400 mL, 即得终质量浓度为  $1.26 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的乌头汤水煎液。PGB 生理盐水溶液配置: 将 PGB 溶解于生理盐水中, 配制成终质量浓度为  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。FLU 生理盐水溶液配置: 将 FLU 溶解于生理盐水中, 配制成终质量浓度为  $0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的溶液。为保证药物的稳定性及实验结果的可重复性, 实验所需乌头汤水煎液一次性制备好, 分装置于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱储存备用, 给药前复温, 并避免反复冻融; PGB 和 FLU 现用现配。

**2.4 给药** 所有给药剂量按照人: 小鼠 = 1:9 比例, 其中乌头汤按照临床用于治疗类风湿性关节炎的 2 倍剂量, PGB 按照临床治疗神经病理性疼痛的 1 倍剂量, FLU 按照临床治疗抑郁症的 1 倍等效剂量计算。造模成功后, 以  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  小鼠体质量灌胃, 乌头汤组及乌头汤-ANA12 拮抗剂组以  $12.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  乌头汤水煎液, PGB 组以  $0.025 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  PGB 溶液, FLU 组以  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  FLU 溶液, sham 组及 SNL 模型组灌胃等体积生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 21 d。术后 10 d, 乌头汤-ANA12 拮抗剂组进行连续 7 d 的 ANA12 ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 套管给药, 其余组给予等体积的生理盐水。

**2.5 Von Frey 法检测小鼠机械痛敏** 根据文献[13], 采用 Von Frey 法, 在手术前、后 1, 4, 7, 9, 12, 14, 17, 21 d 分别检测小鼠机械痛敏, 检测步骤如下: 测试前将小鼠置于位于镂空金属网格架上的有机玻璃箱内适应 1 h 使小鼠处于安静平息状态, 用 Von Frey 纤维丝刺激术侧后肢足底 L5 神经反射区, 持续刺激 3 ~ 4 s, 测试后爪收缩阈值。首次收缩阈值测试后, 再次测试小鼠的收缩阈值, 每次需间隔 5 min, 共测试 6 次。50% 缩足阈值 =  $[10^{(Xf + k\theta)}] \times 10\ 000^{-1}$ , 其中 Xf 为末次动物收缩所使用的 Von Frey 纤维细丝对应的质量值(g), k 为阳性/阴性反应测试对应的值,  $\theta$  为纤维细丝刺激之间的均值差, 为固定值 0.224。50% 缩足阈值的降低代表机械痛敏感症状的发生, 反之, 50% 缩足阈值增高表明机械痛敏感症状的改善。

**2.6 旷场实验检测小鼠焦虑情绪** 旷场实验是评价实验动物在新异环境中自主行为、探究行为与紧张度最常用的方法, 主要用于评估分析小鼠的运动能

力,智力和焦虑相关的情绪行为<sup>[14]</sup>。本研究选用旷场实验分别在手术前、术后 7,21 d 检测小鼠焦虑情绪,实验操作如下:将小鼠置于高 50 cm,边长 100 cm,周边和底面均为黑色、底面中心区域边长为 30 cm 的方形旷场分析箱中,自然光照,室内安静。将每只动物头朝分析箱壁放入箱内底面边缘,统计 4 min 内小鼠在中心区停留时间。每次统计后,用 75% 乙醇清洗并擦干箱内壁及底面。小鼠旷场中心区停留时间越短,代表小鼠紧张度和焦虑情绪越严重。

**2.7 悬尾实验检测小鼠抑郁情绪** 选用悬尾实验分别在手术前、术后 21 d 检测小鼠抑郁情绪,利用小鼠悬尾后企图逃脱但又无法逃脱,从而放弃挣扎,进入特有的抑郁不动状态,记录小鼠不动时间来反映抑郁状态<sup>[15]</sup>。步骤如下,将小段光滑吸管头套入小鼠尾巴,防止小鼠顺其尾巴向上爬,再用长 1 cm × 10 cm 透明胶带在离尾尖端 5 mm 将小鼠尾巴倒挂黏附在黑色悬尾箱上,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造成实验误差。每 2 只小鼠间用挡板挡住间隔 20 cm。摄像机记录 6 min 内小鼠的行为,计算每只小鼠实验过程中后 4 min 的不动时间。小鼠悬尾不动时间越长表示小鼠获得性无助的症状,即抑郁情绪越严重。

**2.8 动物取材及切片** 高尔基染色固定液固定脑组织后冰冻切片,小鼠以异氟烷麻醉,剥取脑组织后用蒸馏水洗净血渍,再用高尔基染色剂逐步染色固定;将固定后的脑组织置于预冷后的冰冻切片机内

用 OCT 包埋剂包埋后,沿冠状面将处理好的脑组织切为厚度为 200 μm 的脑组织切片。

**2.9 高尔基染色法检测小鼠神经元形态** 高尔基染色法是一种观察体内神经元形态学经典检测方法。操作步骤如下:双蒸水冲洗组织切片后把组织切片置于高尔基染色液中染色;用蒸馏水冲洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透化后用中性树脂进行封片,全程避光操作;将封片好的脑组织片置于 400 倍透视显微镜下观察海马 CA3 区椎体神经元形态,并进行图像采集合成,采用 Image J 软件描绘神经元树突形态,并对顶部和基部神经元分支数统计分析。

**2.10 统计学分析** 采用 Graphpad Prism 5 软件对数据进行统计分析,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, $P < 0.05$  表示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 模型组小鼠术后 1 ~ 21 d 50% 缩足阈值均显著降低( $P < 0.01$ );与 SNL 模型组比较,PGB 组小鼠在术后 4 ~ 21 d,FLU 组小鼠在术后 12 ~ 21 d,乌头汤组在术后 9 ~ 21 d 的机械痛阈值较 SNL 模型组均明显增高( $P < 0.05, P < 0.01$ );乌头汤-ANA12 拮抗剂组的机械痛阈值在术后 9 d 较 SNL 模型组显著增高( $P < 0.01$ ),通过套管进行 ANA12 干预后,乌头汤-ANA12 拮抗剂组的机械痛阈值持续降低,在术后 14 ~ 21 d 降至与 SNL 组无统计学差异。见表 1。

表 1 乌头汤对小鼠机械痛敏的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of Wutoutang on mechanical pain in SNL mice( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	50% 缩足阈值/g								
		手术前	术后 1 d	术后 4 d	术后 7 d	术后 9 d	术后 12 d	术后 14 d	术后 19 d	术后 21 d
sham	-	0.40 ± 0.06	0.39 ± 0.07	0.43 ± 0.09	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.09	0.42 ± 0.11	0.41 ± 0.08	0.41 ± 0.07	0.40 ± 0.10
SNL 模型	-	0.41 ± 0.04	0.17 ± 0.03 <sup>2)</sup>	0.04 ± 0.02 <sup>2)</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.04 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.02 ± 0.01 <sup>2)</sup>	0.03 ± 0.01 <sup>2)</sup>
PGB	25	0.40 ± 0.05	0.16 ± 0.04	0.23 ± 0.12 <sup>4)</sup>	0.24 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.20 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.26 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.22 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.17 ± 0.07 <sup>4)</sup>
FLU	3	0.41 ± 0.08	0.14 ± 0.05	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.11 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.13 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.14 ± 0.05 <sup>4)</sup>
乌头汤	126	0.43 ± 0.02	0.18 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.04 ± 0.04	0.17 ± 0.09 <sup>4)</sup>	0.24 ± 0.08 <sup>4)</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.35 ± 0.13 <sup>4)</sup>
乌头汤- ANA12 拮抗剂	126	0.39 ± 0.09	0.15 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.21 ± 0.11 <sup>4)</sup>	0.14 ± 0.11 <sup>3)</sup>	0.10 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.03

注:与 sham 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>  $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

**3.2 对小鼠焦虑情绪的影响** 与假手术组比较,术后 7 ~ 21 d,SNL 模型组小鼠中心区停留时间显著减少( $P < 0.01$ );与 SNL 模型组比较,术后 7 ~ 21 d, PGB 组小鼠与模型组无统计学差异,FLU 及乌头汤组小鼠在术后 7 d 中心区停留时间均显著增加,并

持续至第 21 天( $P < 0.05, P < 0.01$ );乌头汤-ANA12 拮抗剂组在术后 7 d 的中心区停留时间较 SNL 模型组明显升高( $P < 0.05$ ),在术后 21 d 与 SNL 模型组无统计学差异。见表 2。

**3.3 对小鼠抑郁情绪的影响** 与假手术组比较,

表 2 乌头汤对小鼠焦虑情绪的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of Wutoutang on 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	
		术后 7 d	术后 21 d
sham	-	25.39 ± 6.97	26.62 ± 9.36
SNL 模型	-	7.97 ± 6.39 <sup>2)</sup>	6.26 ± 3.53 <sup>2)</sup>
PGB	25	3.65 ± 1.58	6.20 ± 3.99
FLU	3	16.07 ± 7.56 <sup>3)</sup>	21.95 ± 4.61 <sup>4)</sup>
乌头汤	126	24.26 ± 6.99 <sup>4)</sup>	23.54 ± 5.37 <sup>4)</sup>
乌头汤-ANA12 拮抗剂	126	23.10 ± 6.68 <sup>4)</sup>	9.67 ± 3.89

SNL 模型组小鼠术后 21 d 悬尾不动时间显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与 SNL 模型组比较, PGB 组术后 21 d 小鼠悬尾不动时间与 SNL 组无统计学差异, FLU 组及乌头汤组小鼠在术后 21 d 悬尾不动时间较 SNL 组显著降低 ( $P < 0.01$ ); 乌头汤-ANA12 拮抗剂组通过套管进行海马 ANA12 干预后, 术后 21 d 悬尾不动时间与 SNL 组无统计学差异。见表 3。

**3.4 对小鼠海马 CA3 区神经元的影响** 与假手术组比较, SNL 模型组小鼠海马 CA3 区锥体神经元顶部和底部树突分支数明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与 SNL 模型组比较, 乌头汤组小鼠海马 CA3 区锥体神经元顶部和底部树突分支数均明显增加 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 乌头汤-ANA12 拮抗剂组小鼠海马 CA3 区锥体神经元顶部和底部树突分支数与 SNL 组无统计学差异。见图 1, 表 4, 5。

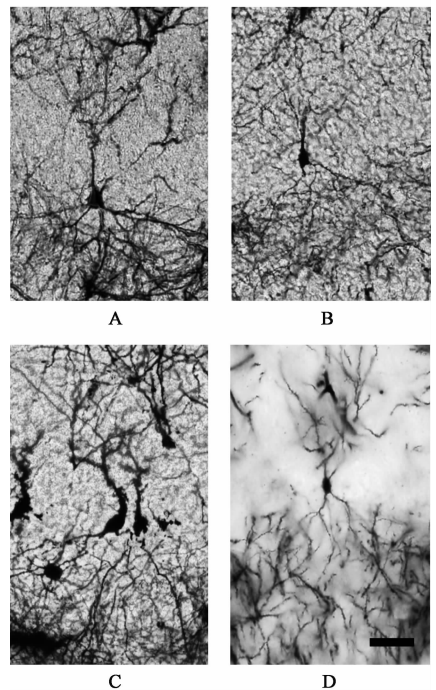
**4 讨论**

本课题组的前期研究显示, ANA12 注射能显著降低 BDNF/TrkB 通路中诸如 BDNF, AKT 和 CREB 等关键分子的表达量, 海马 ANA12 注射具有良好的海马 BDNF/TrkB 通路拮抗作用。本研究采用海马 CA3 区定位注射 ANA12 的方法, 通过检测小鼠机械痛阈值、焦虑与抑郁情绪以及海马神经元形态, 旨在

表 3 乌头汤对小鼠抑郁情绪的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

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

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	不动时间/s	
		手术前	术后 21 d
sham	-	59.98 ± 15.74	64.53 ± 14.50
SNL 模型	-	59.95 ± 11.50	152.00 ± 34.45 <sup>2)</sup>
PGB	25	58.79 ± 14.54	124.56 ± 32.03
FLU	3	60.05 ± 16.11	67.95 ± 13.35 <sup>4)</sup>
乌头汤	126	54.35 ± 14.83	102.29 ± 25.78 <sup>4)</sup>
乌头汤-ANA12 拮抗剂	126	61.85 ± 15.98	138.28 ± 32.89



A. 假手术组; B. SNL 模型组; C. 乌头汤组; D. 乌头汤-ANA12 组  
图 1 乌头汤对小鼠海马 CA3 区神经元的影响 (高尔基染色, ×400)  
Fig. 1 Effect of Wutoutang on neurons in hippocampal CA3 area in SNL mice (Golgi staining, ×400)

表 4 乌头汤对小鼠海马神经元顶部不同距离树突分支数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of Wutoutang on number of different distance away from dendritic branches at top of hippocampal neurons in SNL mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	海马神经元顶部树突分支数/个								
		20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm	120 μm	140 μm	160 μm	180 μm
sham	-	1.60 ± 0.13	2.37 ± 0.20	3.13 ± 0.26	3.75 ± 0.31	3.92 ± 0.36	3.77 ± 0.38	3.12 ± 0.38	2.78 ± 0.27	2.44 ± 0.31
SNL 模型	-	1.70 ± 0.16	2.28 ± 0.16	2.45 ± 0.20	2.22 ± 0.20 <sup>1)</sup>	2.10 ± 0.18 <sup>2)</sup>	2.00 ± 0.17 <sup>2)</sup>	1.86 ± 0.18 <sup>2)</sup>	1.23 ± 0.12 <sup>1)</sup>	1.13 ± 0.13 <sup>1)</sup>
乌头汤	126	1.50 ± 0.16	1.82 ± 0.28	2.66 ± 0.34	3.25 ± 0.38 <sup>3)</sup>	3.38 ± 0.38 <sup>3)</sup>	3.49 ± 0.34 <sup>3)</sup>	2.91 ± 0.32 <sup>3)</sup>	2.70 ± 0.30 <sup>3)</sup>	1.88 ± 0.18
乌头汤-ANA12 拮抗剂	126	1.24 ± 0.11	1.69 ± 0.19	1.97 ± 0.22	2.17 ± 0.22	2.41 ± 0.27	2.50 ± 0.26	2.17 ± 0.27	2.19 ± 0.25	2.12 ± 0.19

表 5 乌头汤对小鼠海马神经元底部不同距离树突分支数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of Wutoutang on number of different distance away from dendritic branches at bottom of hippocampal neurons in SNL mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	海马神经元底部树突分支数/个						
		20 μm	40 μm	60 μm	80 μm	100 μm	120 μm	140 μm
sham	-	2.57 ± 0.22	4.34 ± 0.32	5.29 ± 0.33	5.53 ± 0.38	5.24 ± 0.38	4.69 ± 0.39	4.17 ± 0.35
SNL 模型	-	1.80 ± 0.13	2.13 ± 0.16 <sup>2)</sup>	2.38 ± 0.21 <sup>2)</sup>	2.74 ± 0.23 <sup>2)</sup>	2.73 ± 0.27 <sup>2)</sup>	2.23 ± 0.35 <sup>2)</sup>	1.83 ± 0.36 <sup>2)</sup>
乌头汤	126	2.30 ± 0.21	4.05 ± 0.28 <sup>4)</sup>	5.69 ± 0.30 <sup>4)</sup>	6.01 ± 0.35 <sup>4)</sup>	5.67 ± 0.39 <sup>4)</sup>	4.92 ± 0.44 <sup>4)</sup>	4.61 ± 0.41 <sup>4)</sup>
乌头汤-ANA12 拮抗剂	126	1.80 ± 0.21	2.73 ± 0.22	2.68 ± 0.23	2.50 ± 0.23	2.07 ± 0.32	1.56 ± 0.29	1.75 ± 0.25

探究乌头汤对 NP 痛与焦虑、抑郁症状缓解的关键途径。实验结果显示,SNL 模型小鼠机械痛阈值和旷场中心区停留时间显著降低,悬尾不动时间显著增高,显现出典型的痛与情绪共病症状,这些共病症状稳定、持续、动物个体差异小,和之前相关文献报道的特点相似<sup>[16-17]</sup>,为后续进一步探究机制提供了良好的基础。根据 NP 临床用药指南<sup>[18]</sup>,本研究选用治疗 NP 的一线药物 PGB 为机械痛敏的阳性对照,选用治疗 NP 抑郁、焦虑情绪的一线药物 FIU 为情绪的阳性对照来评价乌头汤对 NP 痛与情绪的治疗作用,结果显示,PGB 具有较好的镇痛效果,FIU 能改善 NP 焦虑与抑郁情绪但镇痛效果较差,而乌头汤能同时改善 SNL 模型小鼠痛与焦虑、抑郁共病症状,但小鼠海马 CA3 区套管 ANA12 干预后,小鼠的机械痛敏、焦虑和抑郁情绪均与 SNL 模型组无统计学差异,从行为学角度,提示了海马 CA3 区 ANA12 的注射阻断 WTD 对 SNL 小鼠机械痛与焦虑、抑郁共病症状的缓解。

海马是痛觉感知、认知形成的关键核团,也是调控情绪的关键部位,海马神经元退行性病变的发生被认为是 NP 共病的关键病理环节。现有病理研究显示,改善海马椎体神经元的退行性病变能有效缓解 NP 痛共情绪障碍的发生<sup>[19]</sup>。本课题组前期研究显示,乌头汤在缓解 NP 痛共情绪障碍和修复海马椎体神经元损伤的同时,也能特异性地改善 SNL 模型小鼠海马 CA3 区 BDNF 蛋白表达量的异常降低<sup>[20]</sup>,但 BDNF 通路是否是乌头汤发挥共治药效和改善海马神经元退行性病变的药理途径尚不清楚。因此,本研究中,笔者以海马神经元退行性病变的发生及改善作为药效途径研究的辅助证据,以实验数据正、反向验证了乌头汤对海马 BDNF/TrkB 通路的调控是其神经修复、共病症状改善的关键途径。

本课题组前期建立了从外围损伤部位-脊髓-脑整合探究乌头汤治疗 NP 的多靶向优势,建立了痛

与情绪共治的药效评价标准<sup>[21]</sup>。本研究从脑神经核团入手,以脑神经核团显微注射的方式,建立了正、反向研究的模式来探索乌头汤在 NP 治疗中具有痛与情绪的共治的独特优势,在后续研究中,本课题组将从乌头汤入脑成分分析入手,进一步探索乌头汤干预海马 BDNF/TrkB 通路的药理途径,为乌头汤在临床的应用提供参考。

[参考文献]

[1] Hecke V O, Austin S K, Khan R A, et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies [J]. Pain, 2014, 155 (4): 654-662.

[2] Radat F, Margot-Duclot A, Attal N. Psychiatric comorbidities in patients with chronic peripheral neuropathic pain: a multicenter cohort study [J]. Eur J Pain, 2013, 17(10): 1547-1557.

[3] 田润利,郭朝晖,李永男. 神经病理性疼痛对海马影响的研究进展 [J]. 疑难病杂志, 2017, 16 (11): 1166-1170.

[4] Blugeot A, Rivat C, Bouvier E, et al. Vulnerability to depression: from brain neuroplasticity to identification of biomarkers [J]. J Neurosci, 2011, 31 (36): 12889-12899.

[5] 张仲景. 金匱要略 [M]. 北京: 中医古籍出版社, 1997: 14.

[6] 冯振宇,赵杰,马小娟,等. 助阳开郁方对抑郁症大鼠海马 BDNF 表达及其胞内信号转导通路的影响 [J]. 山西中医学院学报, 2018, 19(6): 21-24.

[7] LI X Y, WANG N, WANG Y J, et al. Long-term temporal imprecision of information coding in the anterior cingulate cortex of mice with peripheral inflammation or nerve injury [J]. J Neurosci, 2014, (32): 10675-10687.

[8] 白光辉,张建华. 加减乌头汤治疗三叉神经痛 28 例 [J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(4): 385.

- [ 9 ] WANG C, KONG X, ZHU C, et al. Wutou Tang attenuates neuropathic pain via suppressing spinal astrocytic IL-1R1/TRAF6/JNK signaling [ J ]. *Oncotarget*, 2017, 8(54) :92864-92879.
- [ 10 ] ZHU C, XU Q, WANG C, et al. Evidence that CA3 is underlying the comorbidity between pain and depression and the Co-curation by Wutou Tang in neuropathic pain [ J ]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) :11935.
- [ 11 ] LI C Q, XU J M, LIU D, et al. Brain derived neurotrophic factor ( BDNF ) contributes to the pain hypersensitivity following surgical incision in the rats [ J ]. *Mol Pain*, 2008, 4(27) :1-11.
- [ 12 ] Kim S, Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [ J ]. *Pain*, 1992, 50(3) :355-363.
- [ 13 ] 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.
- [ 14 ] 刘兵,尹维宏. 实验基础医学 [ M ]. 西安:第四军医大学出版社, 2007 :316.
- [ 15 ] Can A, Blackwell R A, Piantadosi S C. Antidepressant-like responses to lithium in genetically diverse mouse strains [ J ]. *Genes Brain Behav*, 2011, 10(4) :434-443.
- [ 16 ] Kim S H, Chung J M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [ J ]. *Pain*, 1992, 50 ( 3 ) : 355-363.
- [ 17 ] Yalcin I, Barthas F, Barrot M. Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies [ J ]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2014, 47 :154-164.
- [ 18 ] 黄宇光,徐建国. 神经病理疼痛临床诊疗学 [ M ]. 北京:人民卫生出版社, 2010 :3611-3678.
- [ 19 ] Finnerup N B, Attal N, Haroutounian S, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis [ J ]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(2) :162-173.
- [ 20 ] ZHU C, XU Q, LIN N. The Chinese medicine Wutou Tang relieves neuropathic pain by inhibiting hippocampal microglia activation [ J ]. *Sci Rep*, 2018, 8(16) :12292.
- [ 21 ] 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.

[ 责任编辑 孙丛丛 ]