

从 BDNF/TrkB 信号通路探讨乌头汤对神经病理性疼痛模型小鼠脑神经元的保护作用

师钰琪¹, 吴红艳², 朱春燕^{2*}, 林娜^{1,2*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 从脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶受体 B(TrkB)信号通路研究乌头汤对神经病理性疼痛模型小鼠的神经元保护作用。**方法:** 40 只雄性 ICR 小鼠随机分为假手术组(Sham), SNL 模型组, 乌头汤组(126 mg·kg⁻¹), ANA-12 + 乌头汤组。建立神经病理性疼痛 L5 脊神经结扎(SNL)小鼠模型, 造模成功后, 灌胃给药 10 d, 脑立体定位注射 BDNF/TrkB 受体拮抗剂 ANA-12(50 nmol·L⁻¹)7 d, 免疫组化法检测小鼠海马 BDNF, 蛋白激酶 B(Akt), 环磷酸腺苷(cAMP)反应元件结合蛋白(CREB)蛋白的表达。免疫荧光法观察谷氨酸(Glu)和 γ -氨基丁酸(GABA)神经元变化。小鼠海马神经细胞分离于精准孕 18 d 的胎鼠脑组织, 分为正常组、甘氨酸处理组, ANA-12 组(0.5 mmol·L⁻¹), ANA-12 + 甘氨酸组, ANA-12 + 乌头汤组, ANA-12 + 乌头汤 + 甘氨酸组, 细胞免疫荧光法观察原代神经元形态学变化; 海马神经细胞分为正常组、甘氨酸处理组(200 mmol·L⁻¹), 肿瘤坏死因子(TNF)- α (5 mg·L⁻¹) + 甘氨酸组, TNF- α + 乌头汤(5 mg·L⁻¹) + 甘氨酸组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA 组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + Akt-siRNA 组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA 组, 细胞免疫荧光法检测神经元初、次级树突棘内外的突触后密度蛋白 95(PSD95)的表达量。**结果:** 与正常组比较, 模型组 BDNF, Akt 和 CREB 阳性细胞数显著下降($P < 0.01$), Glu-GABA 能神经元失衡($P < 0.01$); 与模型组比较, 乌头汤组 BDNF, Akt 和 CREB 阳性细胞数显著上升($P < 0.01$), Glu-GABA 能神经元恢复平衡($P < 0.01$); 与乌头汤组比较, ANA-12 + 乌头汤组 BDNF 和 CREB 阳性细胞数又显著下降($P < 0.05$)而 Akt 组并无显著变化, Glu-GABA 能神经元失衡($P < 0.01$)。与正常组比较, 甘氨酸处理组神经元初、次级树突棘数量显著上升($P < 0.01$), 且突触后密度蛋白 95(PSD95)表达量显著上升($P < 0.01$), ANA-12 组, ANA-12 + 甘氨酸组, ANA-12 + 乌头汤组, ANA-12 + 乌头汤 + 甘氨酸组神经元初、次级树突棘数量均无明显变化; 与甘氨酸处理组比较, TNF- α + 甘氨酸组 PSD95 表达量显著下降($P < 0.01$); 与 TNF- α + 甘氨酸组比较, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸组 PSD95 表达量明显上升($P < 0.01$); 与 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸组比较, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA 组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + Akt-siRNA 组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA 组 PSD95 表达量均显著下降($P < 0.01$)。**结论:** 乌头汤对 SNL 小鼠海马谷氨酸能神经元兴奋性及可塑性损伤具有修复作用, 这一作用与其对 BDNF/TrkB 通路的调控有关。

[关键词] 乌头汤; 神经病理性疼痛; 脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶受体 B(TrkB)通路; 神经元保护

[中图分类号] R2-0; R289; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0023-08

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.20200639

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191209.1739.004.html>

[网络出版时间] 2019-12-09 18:32

Neuroprotective Effect by Wutoutang in Spinal Nerve Ligation Mice via BDNF/TrkB Signaling Pathway

SHI Yu-qi¹, WU Hong-yan², ZHU Chun-yan^{2*}, LIN Na^{1,2*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

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

[收稿日期] 20190902(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81630107, 81603322); 国家科技重大专项(2019ZX09731002); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(L2017046)

[第一作者] 师钰琪, 在读硕士, 从事中药药理学研究, E-mail: qq790863493@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

[Abstract] Objective: To investigate the neuroprotective effect and mechanism by Wutoutang (WTT) in the spinal nerve ligation (SNL) mice by neurotrophic factor (BDNF) /tyrosine kinase receptor B (TrkB) signaling BDNF/tyrosine kinase receptor B (TrkB). **Method:** The 40 mice were randomly divided into Sham group, SNL group, WTT group ($126 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), ANA-12 + WTT group. The L5 spinal nerve ligation model mice were established in mice, After that, WTT was administrated from the first day to the 10th day, then the consecutive 7-day hippocampal injection of ANA-12 ($0.05 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) were lasted for 7 days. The levels of brain-derived BDNF, cAMP-response element binding protein (CREB), and protein kinase B (Akt) and the change of hippocampal glutamatergic and GABAergic neurons in mice were detected by tissue immunofluorescence. E14 pregnant ICR mice were sacrificed and the hippocampus were dissected which were divided into control group, glycine group, tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + glycine group, TNF- α + WTT ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) + glycine group, TNF- α + WTT + glycine + BDNF-siRNA group, TNF- α + WTT + glycine + Akt-siRNA group, TNF- α + WTT + glycine + CREB-siRNA group, the primary and secondary dendrites, in which the arrowheads indicate the expression of postsynaptic density protein 95 (PSD95) in the shafts and arrows were tested by cellular immunofluorescence. The neurons were divided into control group, glycine group, ANA-12 group ($0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), ANA-12 + glycine group, ANA-12 + WTT group, ANA-12 + WTT + glycine group, the morphology of hippocampal neurons were tested by cellular immunofluorescence. **Result:** Compared with Sham group, BDNF, Akt and CREB positive cell of SNL group decreased significantly ($P < 0.01$), the hippocampal glutamatergic and GABAergic neurons out of balance ($P < 0.01$). Compared with SNL group, the BDNF, Akt and CREB positive cell of WTT group increased significantly ($P < 0.01$), Glutamine-aminobutyric acid neurons regain balance ($P < 0.01$). Compared with WTT group, BDNF and CREB positive cell of ANA-12 + WTT group decreased significantly ($P < 0.05$), Glutamine-aminobutyric acid neurons was disordered ($P < 0.05$). Compared with control group, the level of PSD95 of glycine group were increase significantly ($P < 0.01$). The number of dendritic spine density apically and basally of glycine group were increase significantly ($P < 0.01$), but the primary and secondary dendrites of ANA-12 group, ANA-12 + glycine group, ANA-12 + WTT group, ANA-12 + WTT + glycine group were not change. Compared with glycine group, the level of PSD95 of TNF- α + glycine group were decreased significantly ($P < 0.01$). Compared with TNF- α + glycine group, the level of PSD95 of TNF- α + WTT + glycine group were increase significantly ($P < 0.01$). Compared with TNF- α + WTT + glycine group, the level of PSD95 of TNF- α + WTT + glycine + BDNF-siRNA group, TNF- α + WTT + glycine + Akt-siRNA group, TNF- α + WTT + glycine + CREB-siRNA group were decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** *In vivo* and *in vitro* studies have shown that the WTT mediated remission of the primary hippocampal glutamatergic neurons were dependent on the BDNF/TrkB pathway.

[Key words] Wutoutang; neuropathic pain; neurotrophic factor (BDNF) /tyrosine kinase receptor B (TrkB) neurotrophic factor (BDNF) /tyrosine kinase receptor B (TrkB); neuroprotection

国际疼痛研究协会将神经病理性疼痛(NP)定义为由神经系统原发性损害和功能障碍所激发或引起的疼痛^[1-2]。NP对患者生活质量的影响是显而易见的,常伴有情绪障碍、睡眠障碍和认知障碍等,这种慢性疼痛和功能性障碍的共同发生症状被定义为合并症^[3-4],是神经病理性复杂性及难治性的根源。

乌头汤来源于张仲景的《金匮要略》,由制川乌、黄芪、麻黄、芍药和炙甘草组成。制川乌行气止痛,麻黄散寒行气,黄芪益气利湿,芍药配甘草开窍而通血脉,从而起温经祛寒,除湿解痛的作用。临床

研究表明,乌头汤可以缓解慢性炎症疼痛^[5-6]。现有研究显示,海马神经网络及脑源性神经营养因子(BDNF)/酪氨酸激酶受体B(TrkB)通路的异常广泛存在于抑郁、慢性疼痛等多类模型动物及患者中^[7],且在脊神经结扎小鼠中海马区BDNF的缺乏被认为与痛共情绪障碍有关^[8]。课题组前期的研究也显示,乌头汤对NP共情绪障碍具有显著的治疗效果,且对海马BDNF/TrkB通路的调控可能是乌头汤发挥药效的关键途径^[9-12]。

为了进一步探索乌头汤对NP模型小鼠神经元

保护作用的调控分子机制,本研究拟采用 NP 国际经典脊神经结扎(SNL)模型,从海马 BDNF/TrkB 通路入手,观察乌头汤改善 SNL 模型小鼠海马谷氨酸能神经元的兴奋性及可塑性以及相关机制,为后续进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 ICR 雄性小鼠,体质量 26 ~ 28 g,鼠龄 6 ~ 8 周,购自北京大学医学部(实验动物科学部),许可证号 SYXK(京)2015-0041,动物标准饲养,空调控温,温度 22 ~ 24 °C,相对湿度 70% ~ 80%,日光灯控明,自由摄食饮水。实验动物的所有操作取得了北京大学医学部实验动物伦理委员会批准(批号 2016-018)。

1.2 药物与试剂 乌头汤由制川乌、黄芪、麻黄、白芍、炙甘草组成,均购自北京同仁堂药房,经中国中医科学院张村研究员鉴定均为正品,符合 2015 年版《中国药典》规定。ANA-12(美国 MCE 公司,批号 HY-12497);BDNF 兔单克隆抗体, β -III 型微管蛋白(β -tubulin-III)小鼠单克隆抗体,突触后密度蛋白 95(PSD95)兔单克隆抗体,兔抗谷氨酸受体 1(GluR1)抗体,兔抗谷氨酸受体 2(GluR2)抗体,谷氨酸脱氢酶(GAD)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab182199, ab78078, ab76115, ab183797, ab206293, ab26113);cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)兔单克隆抗体,蛋白激酶 B(Akt)兔单克隆抗体,CREB-siRNA,Akt-siRNA(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 9197S, 4691, 6343, 6909);荧光二抗羊抗兔 594,荧光二抗山羊抗兔 488,荧光二抗羊抗鼠 488(北京凯瑞力枫生物科技有限公司,批号分别为 E032420, E032421, E032410); γ -氨基丁酸(GABA, 美国 R&D 公司,批号 SBJ-M0493);BDNF-siRNA(西班牙 Santa 公司,批号 sc-42122)。

1.3 仪器 68505 型脑室立体定位仪(深圳瑞沃德生命科技有限公司);BX41 型正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);1210B1210 型冰冻切片机(美国 Thermo Scientific 公司);WD-9405B 型摇床(北京市六一仪器厂型号);3K15 型低温离心机(美国 Sigma 公司);XDS-1B 型 CO₂ 培养箱(重庆光电仪器有限公司)。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 乌头汤水煎液制备 按照黄芪-白芍-炙甘草-麻黄-制川乌 9:9:9:9:6 配制。先称取制川乌,加其 10 倍体积的蒸馏水浸泡 1 h,其他药材一起用

10 倍体积的蒸馏水浸泡 1 h。制川乌煎煮 1.5 h 后加入其他 4 味药材再一起熬煮 1.5 h。滤出上清,加 8 倍体积蒸馏水,继续煎煮 1 h,取上清。合并两次煎出液并用纱布过滤,再煎煮浓缩至终质量浓度为 1.68 g·mL⁻¹,分装并置于 -20 °C 冰箱储存备用。

2.1.2 脑立体注射药物 ANA-12 制备 用生理盐水以 1:1 000 的比例稀释 10 mol·L⁻¹ ANA-12,并作为贮存溶液,分装并置于 -20 °C 冰箱储存备用。工作液为生理盐水 99 μ L 加入 ANA-12 贮存液 1 μ L。

2.2 动物分组及给药 雄性 ICR 小鼠 40 只,随机分为 5 组,分为假手术组(Sham),SNL 模型组,乌头汤组(126 mg·kg⁻¹),ANA-12 + 乌头汤组,造模成功后,连续灌胃给药 21 d,1 次/d。术后 10 d,乌头汤-ANA-12 组进行连续 7 d 的 ANA-12(50 nmol·L⁻¹)套管给药,其余组给予等体积的生理盐水。

2.3 SNL 模型构建 将小鼠麻醉后置于显微解剖镜下,根据文献[13]进行造模。将左侧 L5 脊柱神经暴露并用手术缝合线将其紧紧结扎,然后用生理盐水洗涤皮肤并缝合。Sham 组仅暴露并拔除 L5 神经,并不结扎神经。造模后采用 Von Frey 法检测小鼠机械痛敏,比较 50% 缩足阈值,判断造模是否成功^[14]。

2.4 立体定向注射 ANA-12 将小鼠麻醉后固定于脑立体定位仪上,选取前、后囟后 1.6 mm,中缝轴后 2 mm,背腹轴后 2.1 mm。用微量进样器缓慢注入 ANA-12 的工作溶液,连续注射 7 d。

2.5 免疫组化检测小鼠 BDNF, Akt 和 CREB 的表达变化 将包埋好的冰冻切片组织放于磷酸盐缓冲液(PBS)中洗 3 次,加入内源性过氧化物阻断剂,室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次,抗原修复,在柠檬酸钠缓冲液中用微波炉高火加热 3 ~ 5 min,温火加热 15 min,静置恢复室温, PBS 清洗, 0.5% 的 BSAT 封闭 30 min,孵育 BDNF, Akt 和 CREB 抗体, 4 °C 过夜, PBST 清洗后加二抗孵育 30 min, PBST 清洗后加入 DAB 显色液反应 2 ~ 5 min,贴片、封片,图片采集。

2.6 组织免疫荧光法观察小鼠马谷氨酸-氨基丁酸能神经元变化 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,一抗孵育, GAD 抗体, 4 °C 过夜; PBST 缓冲液清洗,孵育 GluR1, GluR2 抗体, 4 °C 过夜, PBST 清洗,二抗孵育 1 h, PBST 清洗, DAPI 染色,贴片、封片,图片采集。

2.7 原代海马神经元培养 解剖镜下,取精准孕 18 d 胎鼠脑组织于低温解剖液内,将海马组织移放于 3.5 cm 的培养皿内,弃上清,用 0.25% 胰蛋白酶于细胞培养箱消化 15 min;终止消化;制备成 5 × 10⁵

个/mL 的细胞悬液;移至预先涂有多聚-L-赖氨酸的直径为 35 mm 的培养皿中。培养液为含有 10% 胎牛血清及 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺, 1% 青霉素链霉素的 DMEM。24 h 后换全液(培养液中不含胎牛血清);每隔 3 d 补充 400 μL 新培养基。

2.8 细胞免疫荧光染色法检测原代海马神经元的树突形态变化和突触重塑 吸掉上清, PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定, 避光 15 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 min, 0.5% 的 PBST 透化 20 min, 0.5% 的 BSAT 封闭 30 min, 抗体孵育, PSD95 和 β -tubulin-III 抗体(1:400), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 0.5% 的 PBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, 二抗孵育 1 h, 0.5% 的 PBST 冲洗 3 次, 每次 5 min, DAPI 染色, 稀释比为 1:1 000, 室温 5 min, 贴片、封片;图片采集。

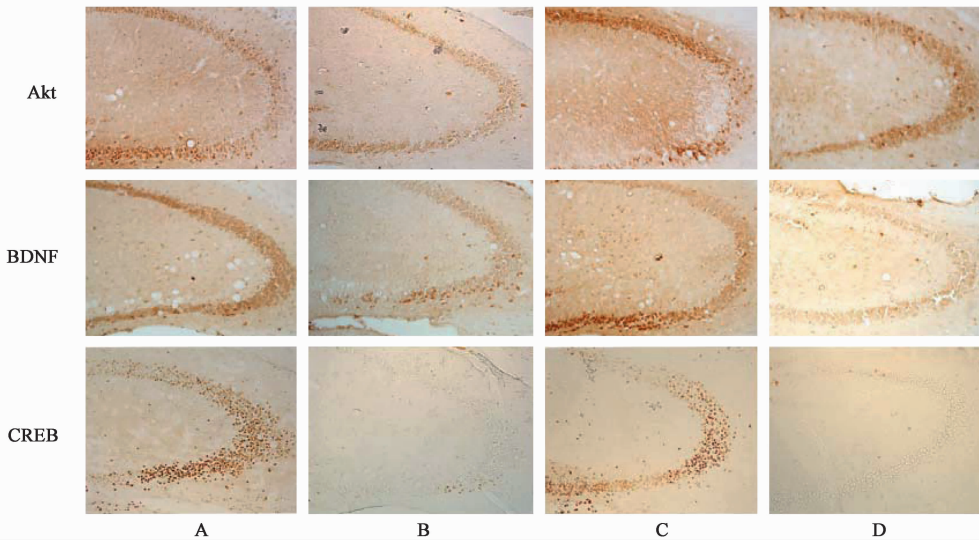
2.9 原代海马神经元细胞转染及给药 细胞培养至第 12 天^[10], 进行转染实验。24 h 后细胞给药。乌头汤原药质量浓度为 $1.68 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 将其稀释至 $45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 母液 1 μL 加培养基 89 μL , 即加入细胞的乌头汤终质量浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。TNF- α 以母

液 1 μL 加培养基 19 μL 进行 20 倍稀释, 配制 TNF- α 工作液。Glu 以母液 1 μL 加培养基 9 μL 进行 10 倍稀释, 配制 Glu 工作液。细胞加入乌头汤后 30 min, 再加入 TNF- α , 20 min 后, 再加入 Glu, 40 min 后细胞收样, 进行染色。

2.10 图像分析和数据处理 上述采集得到的图片使用 Image J 进行相应处理。采用 Graphpad Prism 5 软件对数据进行统计分析, 各组所得数据采用 One-way ANOVA 检验, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠海马 BDNF/TrkB 通路中 Akt, BDNF, CREB 表达的影响 与 Sham 组比较, SNL 组的 Akt, BDNF 和 CREB 阳性细胞数目显著降低($P < 0.01$); 与 SNL 组比较, 乌头汤组 Akt, BDNF, CREB 阳性细胞数目显著增高($P < 0.01$); 与乌头汤组比较, 乌头汤 + ANA-12 组 Akt, BDNF, CREB 阳性细胞数目显著降低($P < 0.05$), 而对 Akt 阳性细胞数目无显著影响。见图 1, 表 1。



A. Sham 组; B. SNL 组; C. 乌头汤组; D. ANA-12 + 乌头汤组(图 4 同)

图 1 乌头汤对小鼠海马 BDNF/TrkB 通路中 BDNF, CREB, Akt 阳性细胞数的影响(免疫组化, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Wutoutang (WTT) on BDNF, CREB, Akt proteins in SNL mice(IHC, $\times 400$)

表 1 乌头汤对小鼠海马 BDNF/TrkB 通路中 Akt, BDNF, CREB 阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of WTT on number of Akt, BDNF and CREB positive cells in hippocampal BDNF/TrkB pathway of mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | Akt | BDNF | CREB |
|--------------|-------------------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Sham | - | 17.60 ± 6.29 | 48.00 ± 7.51 | 35.50 ± 9.66 |
| SNL | - | $4.20 \pm 4.13^{1)}$ | $17.30 \pm 8.92^{1)}$ | $1.50 \pm 0.62^{1)}$ |
| 乌头汤 | 0.126 | $13.40 \pm 6.61^{2)}$ | $36.50 \pm 15.93^{2)}$ | $26.60 \pm 17.42^{2)}$ |
| ANA-12 + 乌头汤 | 0.126 | 13.30 ± 5.86 | $21.40 \pm 9.78^{3)}$ | $8.00 \pm 3.06^{3)}$ |

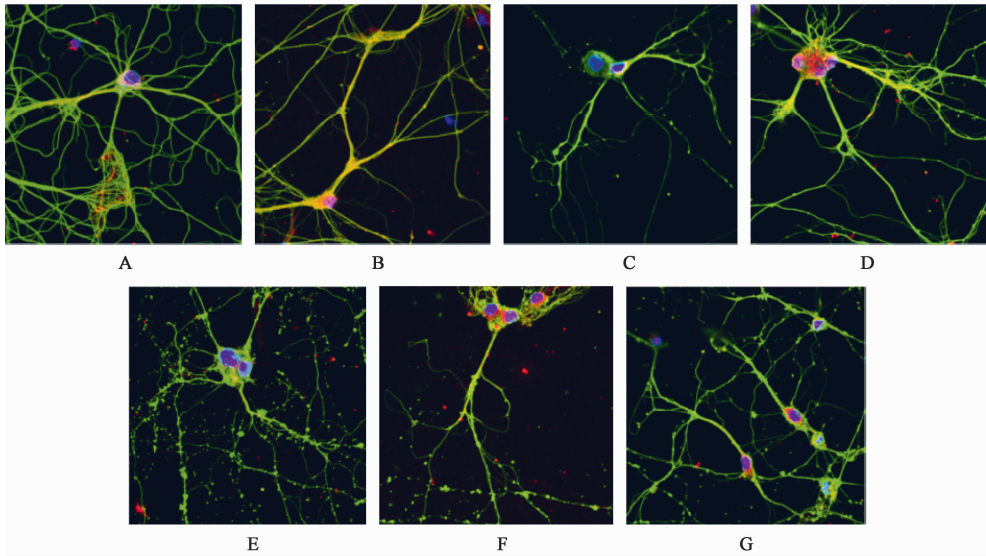
注:与 Sham 组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 SNL 组比较²⁾ $P < 0.01$; 与乌头汤组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 乌头汤对小鼠海马原代神经元兴奋性及可塑性的影响

3.2.1 对小鼠海马初、次级原代神经元形态的影响

与正常组比较,甘氨酸处理组的神经元初、次级树突棘内、外 PSD95 表达量均显著上升 ($P < 0.01$);与甘氨酸处理组比较, TNF- α + 甘氨酸组的神经元初、次级树突棘内、外 PSD95 表达量均显著下降 ($P < 0.01$);与 TNF- α + 甘氨酸组比较, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸组的神经元初、次级树突棘内、外 PSD95 表达

量均显著上升 ($P < 0.01$);与 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA 组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + Akt-siRNA 组, TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA 组的神经元初、次级树突棘内、外 PSD95 表达量均显著下降 ($P < 0.01$),但 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + Akt-siRNA 组跟 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA 组和 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA 组比较明显上升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2,表 2。



A. 正常组;B. 甘氨酸组;C. TNF- α + 甘氨酸组;D. TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸组;E. TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA 组;F. TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + Akt-siRNA 组;G. TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA 组;绿色. TUBB3;红色. PSD95

图 2 乌头汤对小鼠海马原代神经元形态的影响(免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of WTT on morphology of primary hippocampal neurons in mice(IF, $\times 200$)

表 2 乌头汤对 PSD95 在小鼠海马初、次级原代神经元中强度的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of WTT on intensity of PSD95 in primary and secondary hippocampal neurons in SNL mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

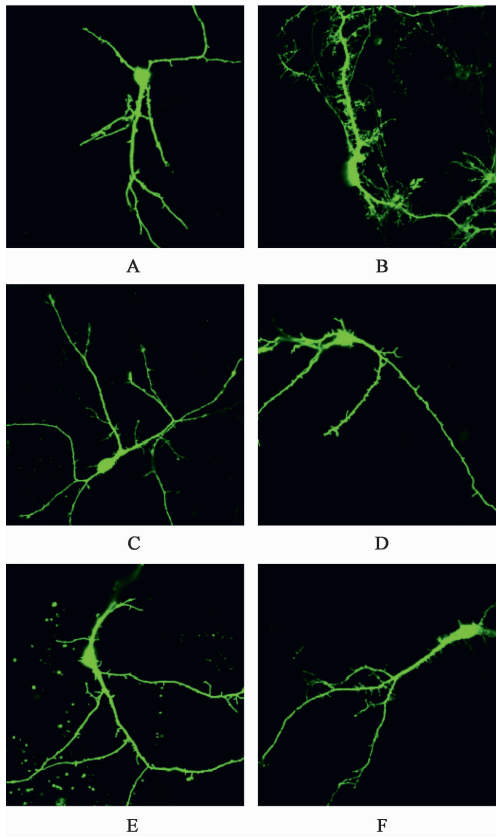
| 组别 | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | 初级 | | 次级 | |
|--|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | | 树突棘内 | 树突棘外 | 树突棘内 | 树突棘外 |
| 正常 | - | 1.47 ± 0.67 | 1.35 ± 0.59 | 1.76 ± 0.63 | 1.47 ± 0.67 |
| 甘氨酸 | - | 3.98 ± 1.25 ¹⁾ | 2.70 ± 1.29 ¹⁾ | 4.86 ± 1.45 ¹⁾ | 3.98 ± 1.25 ¹⁾ |
| TNF- α + 甘氨酸 | - | 1.44 ± 0.75 ²⁾ | 1.23 ± 0.47 ²⁾ | 1.49 ± 0.87 ²⁾ | 1.44 ± 0.75 ²⁾ |
| TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 | 5 | 4.26 ± 0.92 ³⁾ | 2.65 ± 1.17 ³⁾ | 4.30 ± 0.88 ³⁾ | 4.26 ± 0.92 ³⁾ |
| TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA | 5 | 1.59 ± 0.56 ⁴⁾ | 0.76 ± 0.41 ⁴⁾ | 1.41 ± 0.63 ⁴⁾ | 1.59 ± 0.56 ⁴⁾ |
| TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + Akt-siRNA | 5 | 2.07 ± 0.84 ⁴⁾ | 1.23 ± 0.69 ^{4,5)} | 1.29 ± 0.56 ^{4,6)} | 2.07 ± 0.84 ^{4,5,6)} |
| TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA | 5 | 1.46 ± 0.73 ⁴⁾ | 1.22 ± 0.55 ⁴⁾ | 1.06 ± 0.56 ⁴⁾ | 1.46 ± 0.73 ⁴⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与甘氨酸处理组比较²⁾ $P < 0.01$;与 TNF- α + 甘氨酸组比较³⁾ $P < 0.01$;与 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸组比较⁴⁾ $P < 0.01$;与 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + BDNF-siRNA 组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与 TNF- α + 乌头汤 + 甘氨酸 + CREB-siRNA 组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

3.2.2 对小鼠海马原代神经元树突形态的影响
与正常组比较,甘氨酸处理组谷氨酸能神经元的总树突棘、粗短状树突棘、细小状树突棘和蘑菇状树突棘的数量均显著增高,甘氨酸可诱导谷氨酸能神经

元的激活 ($P < 0.01$);与甘氨酸处理组比较, ANA-12 组, ANA-12 + 甘氨酸组, ANA-12 + 乌头汤组和 ANA-12 + 乌头汤 + 甘氨酸组中谷氨酸能神经元的总树突棘、粗短状树突棘、细小状树突棘和蘑菇状树

突棘的数量均明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3, 表 3。



A. 正常组; B. 甘氨酸处理组; C. ANA-12 组; D. ANA-12 + 甘氨酸; E. ANA-12 + 乌头汤; F. ANA-12 + 乌头汤 + 甘氨酸; 绿色: TUBB3

图 3 乌头汤对小鼠海马原代神经元树突形态的影响 (免疫荧光, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of WTT on dendritic morphology of primary hippocampal neurons in mice (IF, $\times 200$)

3.3 对小鼠海马谷氨酸-氨基丁酸能神经元平衡的影响 与 Sham 组比较, SNL 组海马 CA3 区 AMPAR1/GAD65 及 AMPAR2/GAD65 显著减少,

谷氨酸-氨基丁酸能神经元失衡 ($P < 0.01$); 与 SNL 组比较, 乌头汤组 SNL 小鼠海马 CA3 区 AMPAR1/GAD65 及 AMPAR2/GAD65 显著增高, 乌头汤可缓解 SNL 小鼠的谷氨酸-氨基丁酸能神经元失衡 ($P < 0.01$); 与乌头汤组比较, ANA-12 组海马 CA3 区 AMPAR1/GAD65 及 AMPAR2/GAD65 显著减少, 拮抗 BDNF/TrkB 通路后乌头汤无法缓解 SNL 小鼠谷氨酸-氨基丁酸能神经元的失衡 ($P < 0.01$); 与 ANA-12 组比较, 在拮抗和乌头汤共治时, 小鼠海马 CA3 区 AMPAR1/GAD65 及 AMPAR2/GAD65 显著提高, SNL 小鼠谷氨酸-氨基丁酸能神经元失衡缓解 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 4。

4 讨论

BDNF 广泛分布于中枢神经系统, 是维持神经元兴奋性及可塑性的重要的调节因子^[15], BDNF/TrkB 通路被认为与 NP 有关^[16]。本课题组前期研究显示, 海马定位注射 ANA-12 可良好拮抗海马 BDNF/TrkB 通路, 乌头汤可通过控制海马 BDNF/TrkB 通路以缓解^[9], 但具体调控的分子机制尚不明确。因此, 本实验从分子生化和形态学方面展开, 在明确 BDNF/TrkB 通路在乌头汤联治疗神经病理性疼痛中起关键作用后, 确定了乌头汤联在体外对海马原代神经元兴奋性和可塑性的影响和在体内对谷氨酸-氨基丁酸能神经元平衡的调控均与 BDNF/TrkB 通路有关, 从 BDNF/TrkB 通路角度探究乌头汤联治疗神经病理性疼痛模型小鼠脑神经元的保护作用。

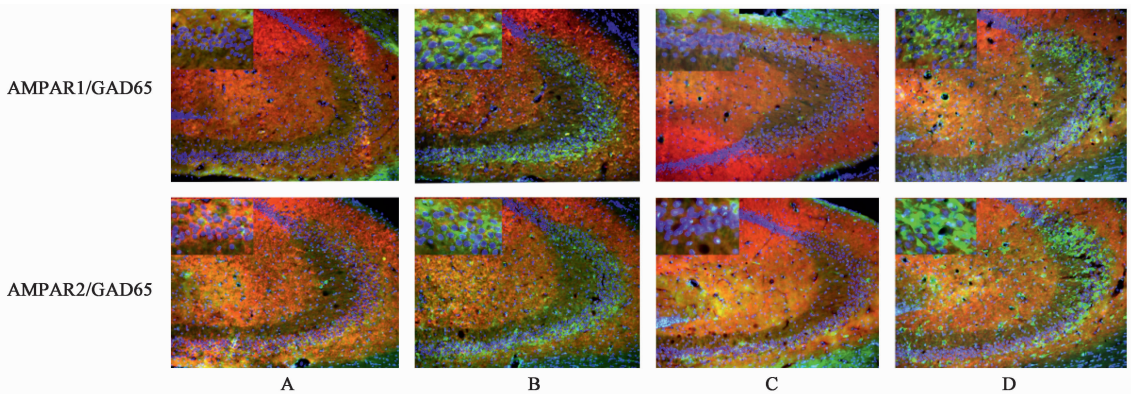
本实验构建 NP 经典模型 SNL 和海马定位注射 ANA-12, 通过正、反方向来明确 BDNF/TrkB 通路对乌头汤联治疗作用的影响。结果显示, 在 SNL 小鼠中 BDNF, Akt 及 CREB 的表达量较假手术组均显著降低, 乌头汤对上述分子的表达量均有显著地改善,

表 3 乌头汤对小鼠海马初、次级原代神经元树突形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of WTT on dendritic morphology of primary and secondary primary hippocampal neurons in mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 质量浓度 /mg·L ⁻¹ | 初级 | | | | 次级 | | | |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | 总树突棘 | 粗短状树突棘 | 细小状树突棘 | 蘑菇状树突棘 | 总树突棘 | 粗短状树突棘 | 细小状树突棘 | 蘑菇状树突棘 |
| 正常 | - | 2.82 ± 1.17 | 1.78 ± 0.99 | 1.15 ± 0.68 | 0.28 ± 0.34 | 2.02 ± 0.76 | 1.37 ± 0.57 | 0.53 ± 0.47 | 0.35 ± 0.40 |
| 甘氨酸 | - | 6.85 ± 2.54 ¹⁾ | 3.12 ± 1.99 ¹⁾ | 2.26 ± 1.05 ¹⁾ | 1.60 ± 0.74 ¹⁾ | 4.72 ± 1.26 ¹⁾ | 2.31 ± 1.00 ¹⁾ | 1.60 ± 0.71 ¹⁾ | 1.83 ± 1.04 ¹⁾ |
| ANA-12 | - | 2.79 ± 1.68 ²⁾ | 1.80 ± 1.15 ²⁾ | 0.95 ± 0.66 ²⁾ | 0.10 ± 0.20 ²⁾ | 2.03 ± 0.98 ²⁾ | 1.27 ± 0.71 ²⁾ | 0.51 ± 0.42 ²⁾ | 0.17 ± 0.29 ²⁾ |
| ANA-12 + 甘氨酸 | - | 2.83 ± 0.96 ²⁾ | 1.77 ± 0.75 ²⁾ | 0.88 ± 0.67 ²⁾ | 0.16 ± 0.28 ²⁾ | 1.91 ± 0.94 ²⁾ | 1.17 ± 0.81 ²⁾ | 0.40 ± 0.45 ²⁾ | 0.34 ± 0.37 ²⁾ |
| ANA-12 + 乌头汤 | 5 | 2.91 ± 0.57 ²⁾ | 2.22 ± 0.59 ²⁾ | 0.61 ± 0.57 ²⁾ | 0.07 ± 0.15 ²⁾ | 2.11 ± 1.03 ²⁾ | 1.56 ± 0.89 ²⁾ | 0.45 ± 0.42 ²⁾ | 0.10 ± 0.21 ²⁾ |
| ANA-12 + 乌头汤 + 甘氨酸 | 5 | 2.88 ± 0.90 ²⁾ | 1.76 ± 0.70 ²⁾ | 0.95 ± 0.61 ²⁾ | 0.09 ± 0.17 ²⁾ | 2.16 ± 0.92 ²⁾ | 1.44 ± 0.86 ²⁾ | 0.60 ± 0.62 ²⁾ | 0.11 ± 0.20 ²⁾ |

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与甘氨酸组比较²⁾ $P < 0.01$ 。



红色. AMPAR1/AMPAR2;绿色. GAD65;蓝色. DAPI

图 4 乌头汤对 SNL 小鼠海马谷氨酸-氨基丁酸能神经元平衡的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of WTT on balance between hippocampal glutamatergic and GABAergic neurons in SNL mice(IF, ×400)

表 4 乌头汤对 SNL 小鼠海马谷氨酸-氨基丁酸能神经元平衡的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of WTT on balance between hippocampal glutamatergic and GABAergic neurons in SNL mice($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | AMPAR1/GAD65 | AMPAR2/GAD65 |
|--------------|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Sham | - | 4.8 ± 0.72 | 5.0 ± 0.30 |
| SNL | - | $1.4 \pm 0.70^{1)}$ | $1.0 \pm 0.36^{1)}$ |
| 乌头汤 | 0.126 | $4.7 \pm 0.97^{2)}$ | $4.0 \pm 1.44^{2)}$ |
| ANA-12 + 乌头汤 | 0.126 | $5.3 \pm 0.72^{3)}$ | $4.7 \pm 0.42^{3)}$ |

注:与 Sham 组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 SNL 组比较²⁾ $P < 0.01$;与乌头汤组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

而海马定位注射 ANA-12 后仅有 CREB 的表达量受到显著抑制,而 Akt 的表达量未受到显著影响。海马内谷氨酸和氨基丁酸能神经元的平衡对维持机体的平衡至关重要^[17-18],通过免疫荧光,观察海马内谷氨酸、氨基丁酸能神经元修复的比例。结果显示,乌头汤联可缓解 SNL 小鼠中谷氨酸-氨基丁酸能神经元的失衡,拮抗 BDNF/TrkB 通路后乌头汤联失去了调控作用。以上结果表明,乌头汤联可通过调控 BDNF/TrkB-CREB 通路来调节谷氨酸-氨基丁酸能神经元的失衡,从而达到 NP 的治疗效果。

在体外培养原代海马神经元,通过统计在突触信号传递中发挥重要作用的 PSD95^[19]表达量和树突棘^[20-21]的数量,探究 BDNF/TrkB 通路在乌头汤联对小鼠海马原代神经元兴奋性和可塑性的影响。课题组前期研究显示,SNL 小鼠海马区中过度激活的小胶质细胞会持续释放 TNF- α ,从而造成神经元的兴奋性损伤,而乌头汤对 TNF- α 直接诱导的神经损伤具有良好的缓解效果^[11]。本研究通过细胞给 TNF- α 来构建细胞模型,显示乌头汤联可通过激活甘氨酸增加 PSD95 在初、次级神经元的表达量和

增多树突棘数量,而转染 BDNF-siRNA 质粒,CREB-siRNA 质粒后和 ANA-12 给药后,乌头汤联失去了对 PSD95 和树突棘的调控作用。表明乌头汤联可通过对 BDNF/TrkB-CREB 通路的调控来缓解原代神经元兴奋性及可塑性损伤,促进神经修复。

本研究从神经元兴奋性和可塑性角度,揭示了通过 BDNF/TrkB 通路来调控谷氨酸-氨基丁酸能神经元的平衡,从而达到神经元保护,为后续基于神经免疫分子机制的角度,深入研究奠定基础,也有利于乌头汤这一治痹经典名方功效科学内涵的探索。

[参考文献]

[1] JESEN T S, BARON R, HAANPAA M, et al. A new definition of neuropathic pain [J]. Pain, 2011, 152 (3): 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]. Eur J Pain, 2013, 17(10): 1547-1557.

[3] ALSCHULER K N, EHDE D M, JENSEN M P. Co-occurring depression and pain in multiple sclerosis [J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2013, 24(4): 703-715.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 陈少珍. 乌头汤治疗类风湿性关节炎的药效学及作用机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.

- [7] 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.
- [8] YI L T, LI J, LIU B B, et al. BDNF-ERK-CREB signalling mediates the role of miR-132 in the regulation of the effects of oleanolic acid in male mice [J]. *J Psychiatry Neurosci*, 2014, 39(5) : 348-359.
- [9] 吴红艳, 师钰琪, 朱春燕, 等. 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 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 26(1) : 24-30.
- [10] ZHU C, XU Q, MAO Z, et al. The Chinese medicine Wu-Tou decoction relieves neuropathic pain by inhibiting hippocampal microglia activation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1) : 12292.
- [11] 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.
- [12] GE H X, GUAN S, SHEN Y L, et al. Dihydromyricetin affects BDNF levels in the nervous system in rats with comorbid diabetic neuropathic pain and depression [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1) : 14619.
- [13] 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.
- [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] SANTOS A R, COMPRIDO D, DUARTE C B. Regulation of local translation at the synapse by BDNF [J]. *Prog Neurobiol*, 2010, 92(4) : 505-516.
- [16] GE H, GUAN S, SHEN Y, et al. Dihydromyricetin affects BDNF levels in the nervous system in rats with comorbid diabetic neuropathic pain and depression [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1) : 14619.
- [17] CONTI F, WEINBERG R J. Shaping excitation at glutamatergic synapses [J]. *Trends Neurosci*, 1999, 22(10) : 451.
- [18] CHERUBINI E, CONTI F. Generating diversity at GABAergic synapses [J]. *Trends Neurosci*, 2001, 24(3) : 155.
- [19] WANG D, LI B, WU Y, et al. The effects of maternal atrazine exposure and swimming training on spatial learning memory and hippocampal morphology in offspring male rats via psd95/nr2b signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(7) : 1003-1015.
- [20] WANG D, LI B, WU Y, et al. The effects of maternal atrazine exposure and swimming training on spatial learning memory and hippocampal morphology in offspring male rats via PSD95/NR2B signaling pathway [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(7) : 1003-1015.
- [21] BARRETO C L, CARRILLO J R, ROLDAN-ROLDAN G, et al. Cyclic changes and actions of progesterone and allopregnanolone on cognition and hippocampal basal (stratum oriens) dendritic spines of female rats [J]. *Behav Brain Res*, 2019 : 112355.

[责任编辑 孙丛丛]