穿心莲内酯对大鼠神经性疼痛的影响机制Δ

陈天华*，江　群，董　航#（江汉大学附属医院/武汉市第六医院疼痛科，武汉　430014）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）20-2488-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.20.08

摘　要　目的　研究穿心莲内酯对大鼠神经性疼痛（NP）的影响机制。**方法**　将大鼠随机分为假手术组、模型组、穿心莲内酯低剂量组（1 mg/kg）、穿心莲内酯中剂量组（5 mg/kg）、穿心莲内酯高剂量组（10 mg/kg）、阿魏酸钠组（150 mg/kg），每组12只。除假手术组外，其余各组大鼠均采用坐骨神经慢性压迫损伤法复制NP模型。建模成功后，各给药组大鼠鞘内注射相应剂量的穿心莲内酯或灌胃相应剂量的阿魏酸钠，假手术组和模型组大鼠给予等体积生理盐水，每日1次，连续14 d。给药7、14 d时检测各组大鼠的机械性缩足反射阈值（MWT）和热刺激缩足反射潜伏期（TWL）；末次给药后，检测各组大鼠血清中白细胞介素6（IL-6）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）、前列腺素E_2（PGE_2）、P物质（SP）水平，观察脊髓组织病理形态，检测脊髓组织中离子钙接头蛋白分子1（Iba-1）、生长停滞特异性蛋白6（Gas6）、受体型酪氨酸激酶Axl（简称“Axl”）mRNA及蛋白表达量。**结果**　与模型组比较，各给药组大鼠给药7、14 d时MWT、TWL以及末次给药后Gas6、Axl mRNA及蛋白表达量均显著升高（$P<0.05$），IL-6、TNF-α、PGE_2、SP水平和Iba-1 mRNA及蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），脊髓组织神经元排列紊乱、毛细血管扩张充血等病理损伤均不同程度减轻；穿心莲内酯高剂量组与阿魏酸钠组大鼠上述指标比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。**结论**　穿心莲内酯可能通过激活Gas6/Axl信号轴来抑制炎症反应，从而发挥缓解NP的作用。

关键词　穿心莲内酯；神经性疼痛；Gas6/Axl信号轴；镇痛

Effect mechanism of andrographolide on neuropathic pain in rats

CHEN Tianhua, JIANG Qun, DONG Hang (Dept. of Pain, the Affiliated Hospital of Jianghan University/the Sixth Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effect mechanism of andrographolide (Andro) on neuropathic pain (NP) in rats. **METHODS** Rats were randomly separated into sham operation group, model group, Andro low-dose (1 mg/kg), Andro medium-dose (5 mg/kg) and Andro high-dose (10 mg/kg) groups, and sodium ferulic acid (150 mg/kg) group, with 12 rats in each group. Except for sham operation group, other groups used the chronic sciatic nerve compression injury method to induce NP model. After modeling, each group was given relevant dose of Andro intrathecally or sodium ferulate intragastrically. The sham operation group and model group were given a constant volume of normal saline once a day for 14 consecutive days. The mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) of rats were detected in each group after 7 and 14 days of administration. After the last medication, the serum levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF-α), prostaglandin E_2 (PGE_2), and substance P (SP) in rats were detected in each group, and the pathological morphology of spinal cord tissue was observed. mRNA and protein expressions of ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba-1), growth arrest specific protein 6 (Gas6), and Axl in spinal cord tissue were determined. **RESULTS** Compared with model group, MWT and TWL after 7 and 14 days of the administration, the mRNA and protein expressions of Gas6 and Axl after the last medication were all increased significantly in administration groups ($P<0.05$), while the levels of IL-6, TNF-α, PGE_2 and SP, mRNA and protein expressions of Iba-1 were all decreased significantly ($P<0.05$); pathological injuries such as the disordered arrangement of spinal cord neurons and dilation and congestion of capillaries had been alleviated to varying degrees. Compared with sodium ferulic acid group, there was no statistically significant difference in the above indicators in the Andro high-dose group ($P>0.05$). **CONCLUSIONS** Andro may inhibit inflammatory response by activating the Gas6/Axl signaling axis, thereby alleviating NP.

KEYWORDS　andrographolide; neuropathic pain; Gas6/Axl signal axis; analgesia

神经性疼痛（neuropathic pain，NP）是一种慢性疾病，通常由躯体感觉神经系统紊乱或病变引起，与多种合并症有关，例如抑郁、焦虑、认知障碍、记忆缺陷等，已成为一个重要的公共卫生问题[1]。美国国家健康与临床

Δ**基金项目**　武汉市医学科研项目（No.WX20D02）

*　**第一作者**　主治医师，硕士。研究方向：慢性疼痛的诊疗。E-mail：v04imh@163.com

#　**通信作者**　主任医师，博士。研究方向：临床麻醉及疼痛诊疗。E-mail：x31saa@163.com

优化研究所指南推荐使用非甾体抗炎药来缓解NP，但非甾体抗炎药的耐药性和长期使用后的副作用仍然会困扰患者[2]。因此，迫切需要一种治疗NP的新药。

穿心莲内酯是一种天然药物，在穿心莲中大量存在，具有抗菌、抗哮喘、抗病毒、保护神经和抗炎等作用[3]。Lin等[4]发现，穿心莲内酯可以缓解大鼠术后的伤口疼痛；Wang等[5]发现，穿心莲内酯可以抑制脊髓小胶质细胞的活化，改善炎症性疼痛小鼠的机械性异常性疼痛；孙跃先等[6]发现，穿心莲内酯可以改善糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经功能损伤，减轻机械性疼痛。但穿心莲内酯缓解疼痛的具体作用机制尚不清楚。有研究显示，上调生长停滞特异性蛋白6（growth arrest specific protein 6，Gas6）表达可减轻炎症，缓解尿酸单钠诱导的急性痛风疼痛[7]。打开ATP敏感钾通道（ATP-sensitive potassium channel，K_{ATP}）可激活Gas6/受体型酪氨酸激酶Axl（简称“Axl”）信号轴以诱导炎症耐受，从而缓解慢性疼痛[8]。由此可知，Gas6/Axl信号轴与NP密切相关。基于此，本研究基于Gas6/Axl信号轴，探讨穿心莲内酯对大鼠NP的影响机制，以期为NP的临床用药提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ZL-024B型机械测痛仪（安徽耀坤生物科技有限公司）、MK3型多功能全自动酶标仪（河南康拓医疗器械销售有限公司）、HPBIO-JX34型电泳仪[上海赫澎（上海）生物科技有限公司]、Xinyan22-013型离心机（上海欣言生物科技有限公司）、7500型聚合酶链式反应（PCR）仪（美国ABI公司）、Echo Revolve型光学显微镜（美国Echo Laboratories公司）。

1.2 主要药品与试剂

穿心莲内酯标准品（批号110797-201609，纯度≥98%）购自广州隽沐生物科技股份有限公司；阿魏酸钠片（批号H20073115，规格50 mg）购自成都亨达药业有限公司；白细胞介素6（interleukin-6，IL-6）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、前列腺素E_2（prostaglandin E_2，PGE_2）、P物质（substance P，SP）酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（批号分别为CB10218-Ra、CB11057-Ra、CB10693-Ra、CB10122-Ra）均购自上海科艾博生物技术有限公司；苏木精-伊红（hematoxylin eosin，HE）染色试剂盒（批号YX-DK00686）购自浙江羽翔生物科技有限公司；RIPA裂解液（批号JLC-E1144）购自江西江蓝纯生物试剂有限公司；蛋白定量试剂盒（批号PT0001）购自北京雷根生物技术有限公司；RNA提取试剂盒（Trizol法）（批号EZB-TZ1-L）购自上海海方生物技术有限公司；反转录试剂盒（批号JK-R5096）购自上海晶抗生物工程有限公司；电化学发光（ECL）检测试剂盒（批号E-CS-0050c）购自上海恒斐生物科技有限公司；PCR反应试剂盒（批号28322）购自上海齐源生物科技有限公司；兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）、离子钙接头蛋白分子1（ionized calcium binding adaptor molecule-1，Iba-1）、Gas6、Axl抗体（批号分别为ab181602、ab283319、ab86059、ab215205）及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号ab205718）均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

雄性SD大鼠，7～8周龄，体重180～230 g，购自湖北贝恩特生物科技有限公司，生产许可证号为SCXK（鄂）2021-0027。所有大鼠饲养在温度20.0～26.0 ℃、相对湿度35.0%～75.0%且保持12 h光/暗循环的标准实验室中，分笼饲养，每个笼子6只，适应性饲养1周，自由获取食物和水。所有实验方案和程序均经武汉华联科生物技术有限公司动物护理与福利委员会审核批准，审批号为HLK-202306215。

2 方法

2.1 建模、分组与干预

将大鼠随机分为假手术组、模型组、穿心莲内酯低剂量（穿心莲内酯-L）组、穿心莲内酯中剂量（穿心莲内酯-M）组、穿心莲内酯高剂量（穿心莲内酯-H）组、阿魏酸钠（阳性对照）组，每组12只。除假手术组大鼠只暴露坐骨神经而不结扎外，其余各组大鼠均采用坐骨神经慢性压迫损伤法复制NP大鼠模型[9]：腹膜内注射3%戊巴比妥钠（40 mg/kg）后，经手术暴露大鼠的右坐骨神经，并在显微镜下使用4.0缝合线结扎右坐骨神经（以1 mm间隔重复4次）。术后24 h内，大鼠出现下肢足趾并拢背屈、跛行及悬空、舔舐等状态，视为NP模型复制成功。

建模成功后，穿心莲内酯-L、穿心莲内酯-M、穿心莲内酯-H组大鼠分别鞘内注射1、5、10 mg/kg穿心莲内酯溶液（含5%乙醇）[6]并灌胃等体积生理盐水；阿魏酸钠组大鼠鞘内注射等体积生理盐水（含5%乙醇）并灌胃阿魏酸钠（150 mg/kg）[10]；假手术组和模型组大鼠均鞘内注射等体积生理盐水（含5%乙醇）并灌胃等体积生理盐水，每日给药1次，连续14 d。

2.2 疼痛敏化行为分析

分别于造模前和造模后给药前以及给药7、14 d时对各组大鼠进行疼痛敏化行为分析。使用Von Frey细丝刺激大鼠足底部，采用机械测痛仪检测机械性缩足反射阈值（mechanical withdrawal threshold，MWT），重复检测3次，间隔5 min，取平均值。将大鼠足底表面放置在辐射热源上方的玻璃地板上，测定开始照射到出现缩足的时间，即热刺激缩足反射潜伏期（thermal withdrawal latency，TWL），重复检测3次，间隔5 min，取平均值。

2.3 样品采集

疼痛敏化行为分析结束后，通过戊巴比妥钠麻醉大鼠，腹主动脉取血，离心后收集上清液，－80 ℃冰箱中保存，备用。随后，迅速断头处死大鼠，收集脊髓组织，各组分别取6只大鼠的脊髓组织置于4%多聚甲醛中固定，剩余6只大鼠的脊髓组织置于液氮中保存，备用。

2.4 血清中炎症及疼痛相关因子水平检测

采用ELISA法检测。取“2.3”项下各组大鼠的血清样本，按试剂盒说明书操作，检测血清中IL-6、TNF-α、PGE_2、SP水平。

2.5 大鼠脊髓组织病理形态观察

取“2.3”项下固定的大鼠脊髓组织，以石蜡包埋，切成厚度为3 μm的切片，经二甲苯脱蜡后，依次用100%、90%、80%、70%乙醇水化，再用磷酸盐缓冲液冲洗切片5 min，经HE染色、干燥、封片后，采用光学显微镜观察大鼠脊髓组织的病理形态并拍照。

2.6 大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl mRNA表达检测

取“2.3”项下液氮中保存的大鼠脊髓组织适量，破碎后提取RNA。用DNase I处理RNA以避免DNA污染，评估总RNA纯度，反转录合成cDNA，并进行扩增。PCR反应体系为PCR Master Mix 10 μL，正、反向引物各0.5 μL，cDNA2 μL，加双蒸水至20 μL。实时荧光定量PCR反应条件为96 ℃预变性10 min；96 ℃变性15 s，56 ℃退火30 s，60 ℃延伸30 s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算Iba-1、Gas6、Axl mRNA的表达量。引物由南京钟鼎生物技术有限公司设计、合成，引物序列与产物大小见表1。

表1 引物序列与产物大小

基因	正向引物(5′→3′)	反向引物(5′→3′)	产物大小/bp
Iba-1	GCAGCCTCATCGTCATCT	CTCTCTTCCTGTTGGGCTT	118
Gas6	AGCTGAGTTTGACTTCCGGA	CTTGATGACCAGATTCCGCG	223
Axl	GCCAGTGGCATGGAGTATC	TACGTCCCTGGCGGTAGTAG	154
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	AATGAAGGGGTCATTGATGG	109

2.7 大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl蛋白表达检测

取“2.6”项下剩余的大鼠脊髓组织，裂解后，提取总蛋白质，采用二辛可宁酸法测定蛋白浓度后，加热变性。取变性蛋白样品20 μg，电泳分离并转移到聚偏氟乙烯膜上，用5%脱脂奶粉封闭1 h，加入Iba-1、Gas6、Axl、GAPDH一抗（稀释比例均为1∶1 000），4 ℃孵育过夜；加入相应二抗（稀释比例为1∶1 000），室温孵育90 min。按ECL检测试剂盒说明书操作，对蛋白信号进行可视化，使用Image J软件分析各条带的灰度值，以目的蛋白与内参（GAPDH）的灰度值比值计算Iba-1、Gas6、Axl蛋白的表达量。

2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件进行分析。计量资料经正态性检验，均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 穿心莲内酯对大鼠疼痛敏化行为的影响

造模前，各组大鼠的MWT、TWL比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。造模后给药前，与假手术组比较，其余各组大鼠的MWT、TWL均显著降低（$P<0.05$）。给药7、14 d时，与假手术组比较，模型组大鼠的MWT、TWL均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，穿心莲内酯-L组、穿心莲内酯-M组、穿心莲内酯-H组、阿魏酸钠组大鼠的MWT、TWL均显著升高（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用呈剂量依赖性（$P<0.05$）；穿心莲内酯-H组与阿魏酸钠组大鼠的MWT、TWL比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2、表3。

表2 各组大鼠的MWT比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，s）

分组	造模前	造模后给药前	给药	
			7 d	14 d
假手术组	23.26±2.15	23.38±2.02	23.50±2.14	23.59±2.13
模型组	24.07±2.12	5.01±0.95[a]	8.36±1.05[a]	10.23±1.06[a]
穿心莲内酯-L组	23.24±2.21	5.55±1.03[a]	12.53±1.12[b]	13.85±1.18[b]
穿心莲内酯-M组	23.28±2.19	5.37±0.88[a]	16.18±1.09[bc]	17.94±1.24[bc]
穿心莲内酯-H组	23.60±2.34	5.21±1.05[a]	20.84±1.13[bcd]	22.56±1.31[bcd]
阿魏酸钠组	23.39±2.16	5.35±1.01[a]	20.76±1.17[b]	22.68±1.23[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯-L组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯-M组比较，$P<0.05$。

表3 各组大鼠的TWL比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$，s）

分组	给药前	造模后给药前	给药后	
			7 d	14 d
假手术组	17.83±1.14	17.69±1.12	17.83±1.15	18.24±1.16
模型组	18.04±1.10	4.01±0.95[a]	4.67±1.01[a]	5.98±1.02[a]
穿心莲内酯-L组	17.75±1.12	3.82±0.91[a]	7.32±1.09[b]	8.13±1.04[b]
穿心莲内酯-M组	17.84±1.08	3.99±0.87[a]	11.49±1.15[bc]	12.35±1.15[bc]
穿心莲内酯-H组	17.95±1.15	4.06±0.93[a]	15.80±1.23[bcd]	16.79±1.20[bcd]
阿魏酸钠组	18.01±1.17	3.88±0.89[a]	15.94±1.26[b]	16.97±1.23[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯-L组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯-M组比较，$P<0.05$。

3.2 穿心莲内酯对大鼠血清中炎症及疼痛相关因子水平的影响

与假手术组比较，模型组大鼠血清中IL-6、TNF-α、PGE_2、SP水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，穿心莲内酯-L组、穿心莲内酯-M组、穿心莲内酯-H组、阿魏酸钠组大鼠血清中IL-6、TNF-α、PGE_2、SP水平均显著降低（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用呈剂量依赖性（$P<0.05$）；穿心莲内酯-H组与阿魏酸钠组大鼠血清中IL-6、TNF-α、PGE_2、SP水平比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表4。

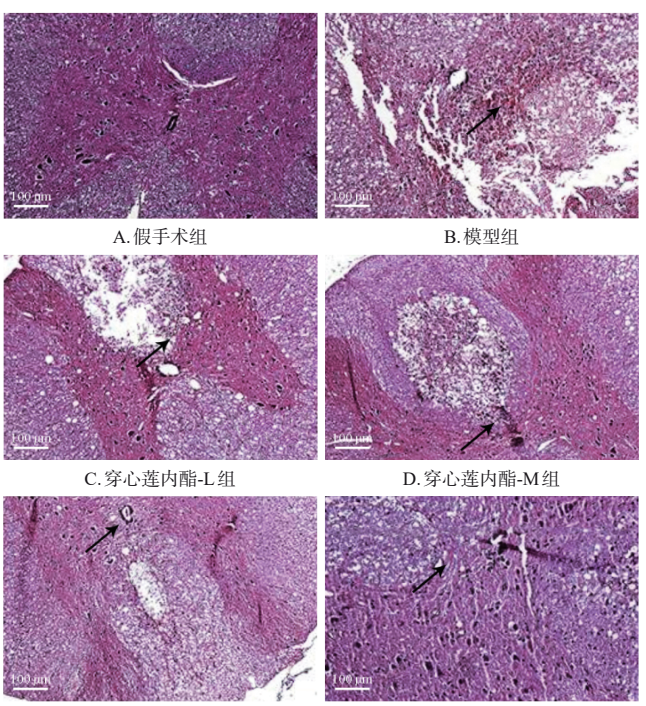
表4　各组大鼠血清中炎症及疼痛相关因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	IL-6/（pg/mL）	TNF-α/（pg/mL）	PGE_2/（μmol/L）	SP/（ng/L）
假手术组	46.53±3.28	20.18±2.54	34.27±6.90	50.21±7.86
模型组	165.97±9.24^{a}	95.37±5.62^{a}	146.93±10.38^{a}	179.42±12.93^{a}
穿心莲内酯-L组	134.16±8.27^{b}	71.02±4.25^{b}	120.57±9.46^{b}	135.18±10.64^{b}
穿心莲内酯-M组	97.38±6.95^{bc}	52.61±3.28^{bc}	85.39±7.54^{bc}	106.92±9.57^{bc}
穿心莲内酯-H组	59.40±5.23^{bcd}	34.58±2.37^{bcd}	50.72±7.39^{bcd}	62.31±8.35^{bcd}
阿魏酸钠组	56.79±5.18^{b}	32.39±2.54^{b}	48.93±8.10^{b}	60.59±8.24^{b}

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯-L组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯-M组比较，$P<0.05$。

3.3　穿心莲内酯对大鼠脊髓组织病理形态的影响

假手术组大鼠脊髓组织结构正常，神经元紧密排列，核膜、核仁染色清晰；与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中神经元排列紊乱，细胞变形，毛细血管扩张充血；与模型组比较，穿心莲内酯-L组、穿心莲内酯-M组、穿心莲内酯-H组、阿魏酸钠组大鼠脊髓组织的病理损伤均有不同程度减轻，其中穿心莲内酯-H组及阿魏酸钠组效果最为明显。结果见图1。



A.假手术组　B.模型组　C.穿心莲内酯-L组　D.穿心莲内酯-M组　E.穿心莲内酯-H组　F.阿魏酸钠组

箭头：毛细血管扩张充血。

图1　各组大鼠脊髓组织病理形态的显微镜图（HE染色）

3.4　穿心莲内酯对大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl mRNA表达的影响

与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中Gas6、Axl mRNA表达量均显著降低，Iba-1 mRNA表达量显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，穿心莲内酯-L组、穿心莲内酯-M组、穿心莲内酯-H组、阿魏酸钠组大鼠脊髓组织中Gas6、Axl mRNA表达量均显著升高，Iba-1 mRNA表达量均显著降低（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用呈剂量依赖性（$P<0.05$）；穿心莲内酯-H组与阿魏酸钠组大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl mRNA表达量比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表5。

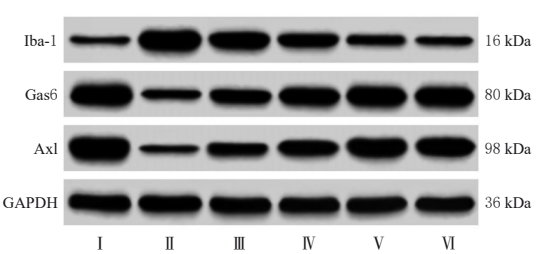
表5　各组大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl mRNA表达比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Iba-1 mRNA	Gas6 mRNA	Axl mRNA
假手术组	1.00±0.10	1.00±0.10	1.01±0.11
模型组	2.54±0.23^{a}	0.23±0.06^{a}	0.35±0.07^{a}
穿心莲内酯-L组	2.20±0.20^{b}	0.57±0.07^{b}	0.62±0.09^{b}
穿心莲内酯-M组	1.76±0.18^{bc}	0.98±0.10^{bc}	1.15±0.10^{bc}
穿心莲内酯-H组	1.45±0.16^{bcd}	1.36±0.12^{bcd}	1.48±0.11^{bcd}
阿魏酸钠组	1.42±0.15^{b}	1.45±0.13^{b}	1.52±0.12^{b}

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯-L组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯-M组比较，$P<0.05$。

3.5　穿心莲内酯对大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl蛋白表达的影响

与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中Gas6、Axl蛋白表达量均显著降低，Iba-1蛋白表达量显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，穿心莲内酯-L组、穿心莲内酯-M组、穿心莲内酯-H组、阿魏酸钠组大鼠脊髓组织中Gas6、Axl蛋白表达量均显著升高，Iba-1蛋白表达量均显著降低（$P<0.05$），且穿心莲内酯的作用呈剂量依赖性（$P<0.05$）；穿心莲内酯-H组与阿魏酸钠组大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl蛋白表达量比较，差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图2、表6。



Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：穿心莲内酯-L组；Ⅳ：穿心莲内酯-M组；Ⅴ：穿心莲内酯-H组；Ⅵ：阿魏酸钠组。

图2　各组大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl蛋白表达的电泳图

表6　各组大鼠脊髓组织中Iba-1、Gas6、Axl蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Iba-1/GAPDH	Gas6/GAPDH	Axl/GAPDH
假手术组	0.28±0.06	1.79±0.14	1.85±0.15
模型组	1.74±0.13^{a}	0.52±0.08^{a}	0.46±0.08^{a}
穿心莲内酯-L组	1.36±0.12^{b}	0.97±0.10^{b}	0.78±0.10^{b}
穿心莲内酯-M组	0.95±0.10^{bc}	1.36±0.12^{bc}	1.29±0.11^{bc}
穿心莲内酯-H组	0.47±0.08^{bcd}	1.64±0.12^{bcd}	1.69±0.13^{bcd}
阿魏酸钠组	0.39±0.06^{b}	1.68±0.13^{b}	1.72±0.14^{b}

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与穿心莲内酯-L组比较，$P<0.05$；d：与穿心莲内酯-M组比较，$P<0.05$。

4　讨论

神经炎症是慢性疼痛的主要原因，脊髓中的神经炎症信号通过神经元-神经胶质相互作用引发慢性疼痛，

神经炎症在中枢神经系统中的扩散以小胶质细胞激活为基础，小胶质细胞可在神经损伤后立即被激活，来促进促炎因子IL-1β、IL-6和TNF-α大量释放，从而增强中枢敏感性并诱发疼痛超敏反应，加剧NP[11]。因此，抑制小胶质细胞活化以及促炎因子的释放为治疗NP提供了新的思路。NP可以触发SP、PGE_2等疼痛介质的释放，其中SP是一种神经递质，能通过促进谷氨酸释放，从而参与疼痛传递；PGE_2是一种重要的脂质介质，由环氧合酶产生，可通过促进脊髓背角的突触传递来促进炎症性疼痛敏化[12]。本研究结果显示，与模型组比较，穿心莲内酯各剂量组大鼠的MWT、TWL均显著升高，炎症因子IL-6、TNF-α和疼痛介质PGE_2、SP水平以及小胶质细胞活化标志物Iba-1 mRNA及蛋白表达量均显著降低。这提示，穿心莲内酯可能通过抑制炎症反应来缓解NP。另外，本研究设置了阿魏酸钠组作为阳性对照，结果显示，高剂量穿心莲内酯缓解NP的作用与阿魏酸钠基本相同。

已有研究发现，Gas6可在体外抑制促炎细胞因子（TNF、IL-6和IL-1β）的释放，激活Gas6/Axl信号轴，抑制机械性异常性疼痛，并诱导炎症耐受以缓解神经炎症和术后疼痛[8]。Gas6通过调节Axl/Rac1信号传导，促进小胶质细胞胞吐作用和防止炎症反应来减轻神经损伤[13]。Gas6、Axl信号转导缺失会导致神经损伤小鼠促炎因子水平显著升高，并加重神经损伤小鼠运动缺陷[14]。本研究结果显示，与模型组比较，穿心莲内酯各剂量组和阿魏酸钠组大鼠脊髓组织中Gas6、Axl mRNA及蛋白表达量均显著升高。这提示，穿心莲内酯可能通过激活Gas6/Axl信号轴来抑制炎症反应，从而发挥缓解NP的作用。

综上所述，穿心莲内酯可能通过激活Gas6/Axl信号轴来抑制炎症反应，从而发挥缓解NP的作用。后续本研究将进一步使用Gas6/Axl信号轴相关激活剂或抑制剂深入验证穿心莲内酯的相关作用机制。

参考文献

[1] FIORE N T, DEBS S R, HAYES J P, et al. Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain[J]. Nat Rev Neurol, 2023, 19(4): 199-220.

[2] KIM K H, SEO H J, ABDI S, et al. All about pain pharmacology: what pain physicians should know[J]. Korean J Pain, 2020, 33(2): 108-120.

[3] ZENG B, WEI A L, ZHOU Q, et al. Andrographolide: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, toxicity and clinical trials and pharmaceutical researches[J]. Phytother Res, 2022, 36(1): 336-364.

[4] LIN Y L, LIAO J W, WANG S, et al. Andrographolide relieves post-operative wound pain but affects local angiogenesis[J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(12): 1586.

[5] WANG D, ZHENG Y J, XIE J J, et al. Andrographolide inhibits the activation of spinal microglia and ameliorates mechanical allodynia[J]. Metab Brain Dis, 2024, 39(1): 115-127.

[6] 孙跃先，王九妹，崔新刚，等. 穿心莲内酯调节HMGB1/RAGE信号通路对糖尿病周围神经病变大鼠坐骨神经功能损伤的影响[J]. 中国药房，2024，35(5)：572-577.
SUN Y X, WANG J M, CUI X G, et al. Impacts of andrographolide on sciatic nerve function damage in diabetic peripheral neuropathy rats by regulating HMGB1/RAGE signaling pathway[J]. China Pharm, 2024, 35(5): 572-577.

[7] FAN W, LIU C, CHEN D C, et al. Ozone alleviates MSU-induced acute gout pain via upregulating AMPK/GAS6/MerTK/SOCS3 signaling pathway[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 890.

[8] QIAN C, FAN Y X, ZONG L J, et al. Opening K_{ATP} channels induces inflammatory tolerance and prevents chronic pain[J]. Brain Behav Immun, 2023, 107: 76-86.

[9] KOGO Y, KOEBIS M, KOBAYASHI Y, et al. Analgesic effect of safinamide mesylate in a rat model of neuropathic pain[J]. Behav Brain Res, 2023, 452: 114555.

[10] 王士珍，张晓蕾，丁苏彭，等. 小檗碱对神经病理性疼痛大鼠疼痛行为及IRAK1/TRAF6信号通路介导的神经炎症的影响[J]. 中国病理生理杂志，2022，38(9)：1561-1568.
WANG S Z, ZHANG X L, DING S P, et al. Effects of berberine on pain behavior and neuroinflammation mediated by IRAK1/TRAF6 signaling pathway in neuropathic pain rats[J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(9): 1561-1568.

[11] CRISTIANO C, GIORGIO C, COCCHIARO P, et al. Inhibition of C5aR1 as a promising approach to treat taxane-induced neuropathy[J]. Cytokine, 2023, 171: 156370.

[12] FENG L M, CHEN Y Y, XU D Q, et al. An integrated strategy for discovering effective components of Shaoyao Gancao decoction for treating neuropathic pain by the combination of partial least-squares regression and multi-index comprehensive method[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 260: 113050.

[13] TANG J J, JIN Y C, JIA F, et al. Gas6 promotes microglia efferocytosis and suppresses inflammation through activating Axl/Rac1 signaling in subarachnoid hemorrhage mice [J]. Transl Stroke Res, 2023, 14(6): 955-969.

[14] RAY A K, DUBOIS J C, GRUBER R C, et al. Loss of Gas6 and Axl signaling results in extensive axonal damage, motor deficits, prolonged neuroinflammation, and less remyelination following cuprizone exposure[J]. Glia, 2017, 65(12): 2051-2069.

（收稿日期：2024-04-03　修回日期：2024-06-12）
（编辑：邹丽娟）