基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003839

人参皂苷Rg1对大鼠神经病理性疼痛的缓解作用和机制研究

郭 强，王 坤，党彩艳，高晓猛
（西安市中心医院疼痛科，西安 710004）

【摘 要】目的：探讨人参皂苷Rg1（ginsenoside Rg1，GRg1）在大鼠神经病理性疼痛中的作用和镇痛机制。**方法：**将30只成年SD雄性大鼠随机分为5组：假手术组（sham）、模型组（SNI）、GRg1干预组（GRg1）、GRg1+空载质粒干预组（GRg1+vector）、GRg1+TLR4过表达质粒干预组（GRg1+TLR4），每组6只。后4组采用坐骨神经分支选择性损伤（spared nerve injury，SNI）法建立神经病理性疼痛大鼠模型，模型制备成功后以GRg1灌胃治疗14 d，尾静脉注射质粒。sham组仅暴露坐骨神经，不进行任何损伤操作。使用机械疼痛检测仪和辐射热测痛仪分别检测大鼠术前1 d和术后1、3、7、14 d的机械缩足反射阈值和热缩足反射潜伏期；取大鼠L_4~L_6脊髓组织，通过实时荧光定量PCR、蛋白免疫印迹法和间接免疫荧光实验检测星形胶质细胞活化标志物GFAP和小胶质细胞标志物Iba-1的mRNA和蛋白表达水平；酶联免疫吸附实验测定脊髓组织中IL-1β、TNF-α和CXCL1的含量；比色法测定脊髓组织中NO的含量；分子对接技术探究GRg1与TLR4的结合能力和相互作用模式。**结果：**GRg1恢复SNI大鼠机械缩足反射阈值（F=24.67，P=0.000）和热缩足反射潜伏期（*F*=8.058，*P*=0.034），同时下调SNI大鼠脊髓组织中GFAP（mRNA：*F*=37.74，P=0.000；蛋白：F=98.71，P=0.001）和Iba-1（mRNA：*F*=62.11，*P*=0.000；蛋白：*F*=187.0，*P*=0.000）的表达水平；GRg1降低SNI大鼠脊髓组织中IL-1β（*F*=56.96，*P*=0.000）、TNF-α（*F*=55.25，*P*=0.000）、CXCL1（*F*=93.54，*P*=0.000）和NO（*F*=30.57，*P*=0.000）含量。机制研究发现GRg1与TLR4结合高度稳定；GRg1下调SNI大鼠脊髓组织中TLR4表达水平（mRNA：*F*=62.66，*P*=0.000；蛋白：*F*=53.52，*P*=0.000），以及p38（*F*=300.3，*P*=0.000）和p65（*F*=121.6，*P*=0.000）磷酸化水平；TLR4的过表达逆转GRg1的作用（机械缩足反射阈值：*F*=24.67，*P*=0.000；热缩足反射潜伏值：*F*=8.058，*P*=0.034；GFAP，mRNA：*F*=37.74，*P*=0.009；蛋白：*F*=98.71，*P*=0.000；Iba-1，mRNA：*F*=62.11，*P*=0.006；蛋白：*F*=187.0，*P*=0.000；IL-1β：*F*=56.96，*P*=0.006；TNF-α：*F*=55.25，*P*=0.000；CXCL1：*F*=93.54，*P*=0.000；NO：*F*=30.57，*P*=0.042；TLR4，mRNA：*F*=62.66，*P*=0.000；蛋白：*F*=53.52，*P*=0.000；p38磷酸化水平：*F*=300.3，*P*=0.000；p65磷酸化水平：*F*=121.6，*P*=0.000）。**结论：**GRg1可能通过调控TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路抑制大鼠脊髓组织中星形胶质细胞和小胶质细胞活化，从而对SNI大鼠产生镇痛作用。

【关键词】人参皂苷Rg1；神经病理性疼痛；神经胶质细胞；炎症因子；Toll样受体4
【中图分类号】R285.5；R741 **【文献标志码】**A

Effect and mechanism of ginsenoside Rg1 in alleviating neuropathic pain in rats

Guo Qiang, *Wang Kun*, *Dang Caiyan*, *Gao Xiaomeng*
(*Department of Pain*, *Xi'an Central Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role and analgesic mechanism of ginsenoside Rg1 (GRg1) in neuropathic pain in rats. ***Methods*:** A total of 30 adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group, spared nerve injury (SNI) group, GRg1 group, GRg1+empty vector group (GRg1+vector group), and GRg1+TLR4 overexpression plasmid group (GRg1+TLR4 group), with 6 rats in each group. The SNI method was used to establish a rat model of neuropathic pain in the latter four groups, and after successful modeling, GRg1 was given by gavage for 14 days, while the plasmid was injected via the caudal vein. The sciatic nerve was exposed for the sham-operation group without any injury manipulation. A mechanical pain threshold detector and a radiation thermal pain threshold detector were used to measure mechanical withdrawal threshold and thermal withdrawal latency on day 1 before surgery and on days 1, 3, 7, and 14 after surgery. L_4-L_6 spinal cord tissue samples were collected, and quantitative real-time PCR, Western blot, and indirect immunofluorescence assay were used to measure the mRNA and protein expression levels of GFAP, a marker for astrocyte activation, and Iba-1, a marker for microglial cells; ELISA was used to measure the content of IL-1β, TNF-α, and CXCL1 in spinal cord tissue, and colorimetry was used to measure the content of NO in spinal cord tissue; molecular docking was used to investigate the binding ability and interaction mode between GRg1 and TLR4. ***Results*:** GRg1 restored mechanical withdrawal

作者介绍：郭 强，Email：strongqguo@sina.com，研究方向：无痛舒适化诊疗、慢性疼痛研究。
通信作者：王 坤，Email：keenwangk@sina.com。
基金项目：西安市科技计划资助项目（编号：22YXYJ0030）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250418.1611.004（2025-04-21）

threshold（F=24.67，P=0.000）and thermal withdrawal latency in SNI rats（F=8.058，P=0.034）and downregulated the expression levels of GFAP（mRNA：F=37.74，P=0.000；protein：F=98.71，P=0.001）and Iba-1（mRNA：F=62.11，P=0.000；protein：F=187.0，P=0.000）in spinal cord tissues of SNI rats，and it also reduced the levels of IL-1β（F=56.96，P=0.000），TNF-α（F=55.25，P=0.000），CXCL1（F=93.54，P=0.000）and NO（F=30.57，P=0.000）in the spinal cord tissues of SNI rats. The study on mechanisms showed highly stable binding between GRg1 and TLR4，and GRg1 downregulated the expression level of TLR4（mRNA：F=62.66，P=0.000；protein：F=53.52，P=0.000）and the phosphorylation levels of p38（F=300.3，P=0.000）and p65（F=121.6，P=0.000）in spinal cord tissues of SNI rats ，whereas the overexpression of TLR4 reversed the effect of GRg1（Mechanical Paw Withdrawal Threshold：F=24.67，P=0.000；Thermal Paw Withdrawal Latency：F=8.058，P=0.034；GFAP，mRNA：F=37.74，P=0.009；Protein：F=98.71，P=0.000；Iba-1，mRNA：F=62.11，P=0.006；Protein：F=187.0，P=0.000；IL-1β：F=56.96，P=0.006；TNF-α：F=55.25，P=0.000；CXCL1：F=93.54，P=0.000；NO：F=30.57，P=0.042；TLR4，mRNA：F=62.66，P=0.000；Protein：F=53.52，P=0.000；p38 Phosphorylation Level：F=300.3，P=0.000；p65 Phosphorylation Level：F=121.6，P=0.000）. ***Conclusion***：GRg1 may exert an analgesic effect on SNI rats by regulating the TLR4-p38/MAPK-NF-κB signaling pathway and activating the activation of astrocytes and microglial cells in spinal cord tissue.

【Key words】ginsenoside Rg1；neuropathic pain；neuroglial cell；inflammatory factor；Toll-like receptor 4

神经病理性疼痛（neuropathic pain，NP）是躯体感觉系统受损或疾病引起的疼痛，由创伤、感染和压迫等多种因素导致，主要临床表现为痛觉过敏、痛觉超敏和痛觉异常等[1]。NP不仅严重损害患者的生活质量和身体健康，同时给社会医疗资源带来了极大负担[2]。有研究表明，小胶质细胞和星形胶质细胞的活化是中枢神经元过度兴奋和维持神经疼痛的主要原因，且活化的神经胶质细胞会产生炎性细胞因子（IL-1β、TNF-α）、趋化因子（CXCL1）和细胞毒性物质（NO）来介导神经炎症，放大对疼痛信号的传递[3-4]。目前，NP的临床治疗药物主要包括钠通道阻断剂、钙离子通道调节剂、弱阿片类药物和非甾体抗炎药，但这些药物不仅疗效有限，还会产生严重的副作用[5]。因此，开发新的药物缓解NP并改善不良反应是很有必要的。

人参皂苷Rg1（ginsenoside Rg1，GRg1）是人参属植物中共有的有效成分之一，具有提高免疫力、抗炎、抗氧化和抗衰老等多种药理作用[6]。在过往的研究中，发现GRg1对阿尔茨海默病、帕金森病和抑郁症等多种神经系统疾病有保护作用[7]。然而，尽管已有临床研究证明GRg1可以通过抑制细胞凋亡、抗炎和抗氧化来实现神经保护功能，但其在NP中的作用机制仍不明确[8]。Toll样受体4（toll-like receptor 4，TLR4）是类Toll受体中主要的脂多糖受体，它的主要功能是在不同疾病中诱导炎症反应的发生。有研究报道称TLR4在NP的发生和维持中有着至关重要的作用，阻断TLR4激活可以抑制神经胶质细胞活化，减少炎性细胞因子产生[9]。

本实验旨在探究GRg1能否通过TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路在大鼠NP中发挥一定的作用，以期阐明GRg1的镇痛机制，为今后开发新型NP治疗药物提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 从北京维通利华实验动物技术有限公司购置30只成年SD雄性大鼠，将实验大鼠在（22±1）℃，相对湿度55%~65%的环境中进行饲养。所有大鼠均自由进食，并且进行12 h/12 h的光暗交替。本研究经西安市中心医院医学伦理委员会批准伦理号。

1.1.2 主要试剂 GRg1（成都曼斯特生物科技有限公司，货号：A0237，纯度>98%）；戊巴比妥钠（德国Merck，货号：P3761）；pcDNA3.1-TLR4过表达质粒和空载质粒（中国上海GenePharma公司）；胰蛋白酶-EDTA（美国Thermo Fisher，货号：25200114）；PBS（中国索莱宝，货号：P1020）；ECL化学发光试剂盒（中国Vazyme，货号：E423-01/02）；trizol试剂（Invitrogen公司，货号：15596026）；RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit（Thermo Scientific，货号：K1621）；RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒、脱脂奶粉和SDS-PAGE凝胶超快速配制试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，货号：P0013C、P0011、P0216和P0690）；NFκB-p65抗体、TLR4抗和p38抗体（武汉ABclonal公司，货号：A2547、A5258和A14401）；GFAP抗体、Iba-1抗体、p-p65抗体、p-p38抗体和GAPDH抗体（美国Abcam，货号：ab7260、ab153696、ab76302、ab4822和ab181602）；山羊抗兔-IgG抗体和山羊抗鼠-IgG抗体（北京Lablead公司，货号：S0101和S0100）；CoraLite® Plus 555标记的山羊抗兔-IgG和CoraLite® Plus 488标记的山羊抗兔IgG（武汉三鹰生命科技有限公司，货号：RGAR003和RGAR002）；ELISA试剂盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，货号：E-EL-R0012、E-EL-R2856和E-EL-R0003）；一氧化氮（NO）比色法测试盒（武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司，货号：E-BC-K035-M）。

1.1.3 主要仪器 辐射热测痛仪（KW-600，南京卡尔文仪器公司）；机械疼痛检测仪（KW-CT-1，南京卡尔文仪器公司）；台式高速离心机（上海医疗器械）；双目正置荧光显微镜（BX-51，日本奥林巴斯）；蛋白电泳装置（Mini-PROTEAN Tetra型，美国Bio-Rad公司）；全波长酶标仪（EPoch型，美国

BioTek 公司）；化学发光凝胶成像仪（ChemiDoc XRS，美国 Bio-Rad公司）；SW-CJ-1FD型超净工作台（苏净安泰公司）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 将大鼠随机分为5组：假手术组（sham组）、模型组（SNI组）、GRg1干预组（GRg1组）、GRg1+空载质粒干预组（GRg1+vector组）、GRg1+TLR4过表达质粒干预组（GRg1+TLR4组），每组6只。后4组采用坐骨神经分支选择性损伤（spared nerve injury，SNI）法建立NP大鼠模型，具体操作如下：腹腔内注射2%戊巴比妥钠以麻醉大鼠，剔除大鼠左侧大腿的毛发，剪开大鼠左侧大腿皮肤，钝性分离大腿中部肌肉，使坐骨神经分支：腓总神经、腓肠神经、胫神经暴露于视野中。用玻璃分针挑起腓总神经和胫神经进行结扎，在远心端将腓总神经和胫神经剪断并截断1~2 mm，整个过程不损伤腓肠神经，结束后对肌肉和皮肤进行逐层缝合和消毒。sham组大鼠仅剪开左侧大腿皮肤，暴露坐骨神经分支，不对腓总神经和胫神经进行结扎和截断。

将GRg1与生理盐水混合，GRg1+vector组和GRg1+TLR4组大鼠进行GRg1灌胃（30 mg/kg/d），同时根据说明书尾静脉注射空载质粒和TLR4过表达质粒（10 nmol/次，2次/周）；GRg1组每日灌胃30 mg/kg GRg1，尾静脉注射相同剂量生理盐水；sham组和SNI组大鼠以与GRg1+TLR4组相同剂量的生理盐水进行灌胃，并且尾静脉注射相同剂量生理盐水。每组大鼠均给药14 d。重组质粒pcDNA3.1-TLR4导入大鼠体内的方法是：腹腔内注射2%戊巴比妥钠以麻醉大鼠，溶于15 mL林格液的800 μg裸质粒在15 s内被快速注射进入大鼠尾静脉。

1.2.2 机械缩足反射阈值（mechanical withdraw threshold，MWT）的测定 在手术前1 d以及术后1、3、7 d和14 d通过机械疼痛检测仪分别测定大鼠左侧大腿和右侧大腿的MWT。将大鼠放入透明有机玻璃箱中，适应一段时间后，实验者使用压力检测针垂直刺向大鼠后爪足底皮肤，通过小动物生理检测仪检测针受到的压力值，观察大鼠对刺激的反应，记录大鼠是否出现缩足反射、舔足或抖足等阳性反应。每次刺激持续时间为5 s，刺激间隔为10 s，连续刺激5次，以阳性反应出现时压力检测针显示的压力值平均值作为抬足阈值。重复测量3次，每次测定间隔3 min以上，结果取平均值。

1.2.3 热缩足反射潜伏期（thermal withdrawal latency，TWL）的测定 使用辐射热测痛仪测定大鼠术前1 d和术后1、3、7 d和14 d的TWL。将大鼠放入透明有机玻璃盒中，让大鼠在盒子中适应1 h，以减少应激反应。将热辐射刺激仪的光源对准动物的足底，开始热刺激，同时开始计时，观察动物对热刺激的反应。一旦动物出现缩足反射（即抬起后肢），立即停止计时并记录时间。进行3次重复测试，每次测试之间间隔5 min，记录每次测试的结果，并计算平均值作为动物的TWL值。为了防止热辐射时间过长造成动物受伤，一般将刺激自动切断的时间设置为20 s。

1.2.4 实时荧光定量PCR（reverse transcription quantitative PCR，RT-qPCR） 在术后14 d，MWT和TWL检测结束后，利用断头法处死大鼠，取大鼠L_4~L_6脊髓组织进行后续实验。用trizol试剂处理脊髓组织，提取总RNA并测定浓度；根据说明书逆转录合成cDNA，并进行PCR反应。以GADPH基因作为内参基因，采用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算GFAP和Iba-1的相对表达量（表1）。

表1 RT-qPCR所用引物序列

引物	序列（5'~3'）
GFAP	上游GAGTGGTATCGGTCCAAGTT 下游CTCAAGGTCGCAGGTCAA
Iba-1	上游GCAGCCTCATCGTCATCT 下游CTCTCTTCCTGTTGGGCTT
TLR4	上游CCAGAGCCGTTGGTGTATCT 下游TCAAGGCTTTTCCATCCAAC
GAPDH	上游ATGGTGAAGGTCGGTGTG 下游AACTTGCCGTGGGTAGAG

1.2.5 蛋白免疫印迹（Western blot，WB） 在术后14 d，MWT和TWL检测结束后，利用断头法处死大鼠，取大鼠L_4~L_6脊髓组织。使用RIPA裂解液提取大鼠L_4~L_6脊髓组织中的蛋白质，使用BCA试剂盒检测蛋白质浓度。随后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上，于室温下封闭2 h。PVDF膜与一抗在4℃下孵育过夜，用TBST溶液漂洗3次后与二抗室温下共同孵育4 h。将发光液均匀地涂抹在PVDF膜表面，在暗室中进行发光显影。

1.2.6 间接免疫荧光试验 取大鼠L_4~L_6脊髓组织，用4%的多聚甲醛室温下固定30 min。固定结束后，对样品进行脱水、透明、浸蜡和包埋处理。完成后，使用切片机进行切片，将切好的片子于水中进行展片，在烤片机上烤片1 h即可。将制备完成的石蜡切片进行脱蜡复水、抗原修复和封闭，加入一抗，4℃下过夜，孵育结束后，用PBST洗涤样本，以去除未结合的一抗；随后室温下与相应的荧光二抗孵育1 h。使用DAPI室温染核10 min，用含抗荧光淬灭剂的封片液封片、干燥，荧光显微镜拍照，采集图像。

1.2.7 酶联免疫吸附实验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）及NO含量测定 收集大鼠的L_4~L_6脊髓组织并制备匀浆液，按照ELISA试剂盒说明书检测IL-1β、TNF-α和CXCL1的水平，根据一氧化氮（NO）比色法测试盒说明书测定NO水平。

1.2.8 分子对接 从PDB数据库中下载TLR4蛋白晶体结构（Homo sapiens：https://www.rcsb.org/structure/3FXI；Mus musculus：https://www.rcsb.org/structure/3VQ2），从PubChem数据库中下载GRg1分子结构（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/441923）。采用蛋白-配体对接软件Autodock Vina 1.2.2预测不同物种间GRg1与TLR4的结合能力和相互作用模式。结合能越低代表配体与受体之间结合越稳定，结合能<-5 kcal/mol说明对接结果良好。

1.3 统计学方法

本实验使用GraphPad Prism软件分析所有数据并制图，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。2组之间的比较采用独立样本t检验；单因素方差分析用于比较多组实验结果。每项实验均进行3次重复实验。检验水准α=0.05。

2 结 果

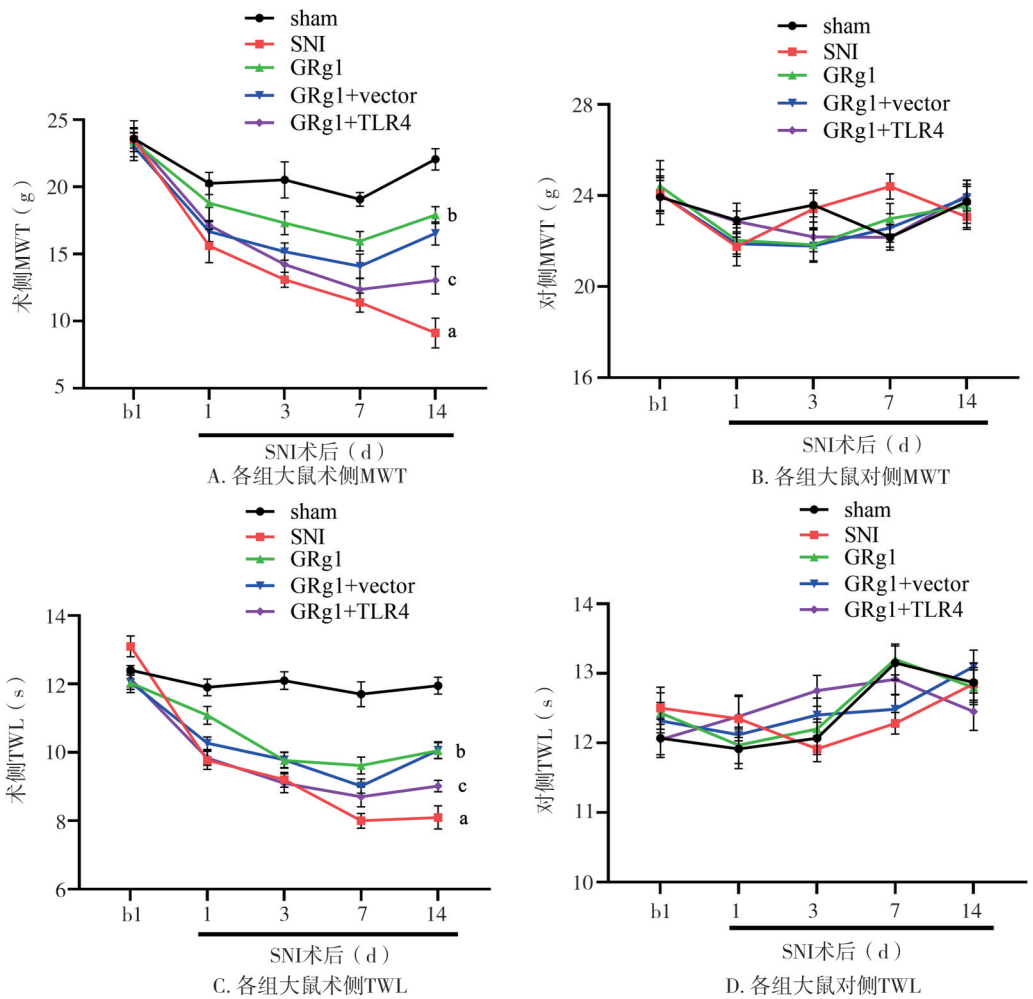
2.1 GRg1恢复SNI大鼠的MWT和TWL

手术前1 d和手术后1、3、7 d和14 d对大鼠术侧和对侧的MWT和TWL进行检测，结果显示，手术开始前1 d 5组大

鼠术侧MWT和TWL并无明显差异（术侧MWT：sham vs. SNl，F=24.67，P=0.999；sham vs. GRg1，F=24.67，P=0.995；sham vs. GRg1+vector，F=24.67，P=0.903；sham vs. GRg1+TLR4，F=24.67，P=0.999；SNI vs. GRg1，F=24.67，P=0.995；SNl vs. GRg1+vector，F=24.67，P=0.866；SNI vs. GRg1+TLR4，F=24.67，P=0.999；GRg1 vs. GRg1+vector，F=24.67，P=0.950；GRg1 vs. GRg1+TLR4，F=24.67，P=0.964；GRg1+vector vs. GRg1+TLR4，F=24.67，P=0.738）；术侧TWL：sham vs. SNl，F=8.058，P=0.321；sham vs. GRg1，F=8.058，P=0.768；sham vs. GRg1+vector，F=8.058，P=0.643；sham vs. GRg1+TLR4，F=8.058，P=0.880；SNI vs. GRg1，F=8.058，P=0.151；SNl vs. GRg1+vector，F=8.058，P=0.108；SNI vs. GRg1+TLR4，F=8.058，P=0.177；GRg1 vs. GRg1+vector，F=8.058，P=0.999；GRg1 vs. GRg1+TLR4，F=8.058，P=0.997；GRg1+vector vs. GRg1+TLR4，F=8.058，P=0.997；图1A，C）。手术后14 d，与sham组比较，SNI组大鼠术侧MWT（F=24.67，P=0.000）和TWL（F=8.058，P=0.000）显著下降（图1A和C），GRg1组大鼠术侧MWT（F=24.67，P=0.000）和TWL（F=8.058，P=0.007）相较于SNI组得到显著恢复（图1A和C），说明GRg1对SNI大鼠的MWT和TWL有恢复作用。此外，GRg1+TLR4组大鼠术侧MWT（F=24.67，P=0.000）和TWL（F=8.058，P=0.034）相比于GRg1组下降（图1A和C）。5组大鼠各时间点对侧的MWT和TWL均无统计学差异（图1B和D，P>0.05）。

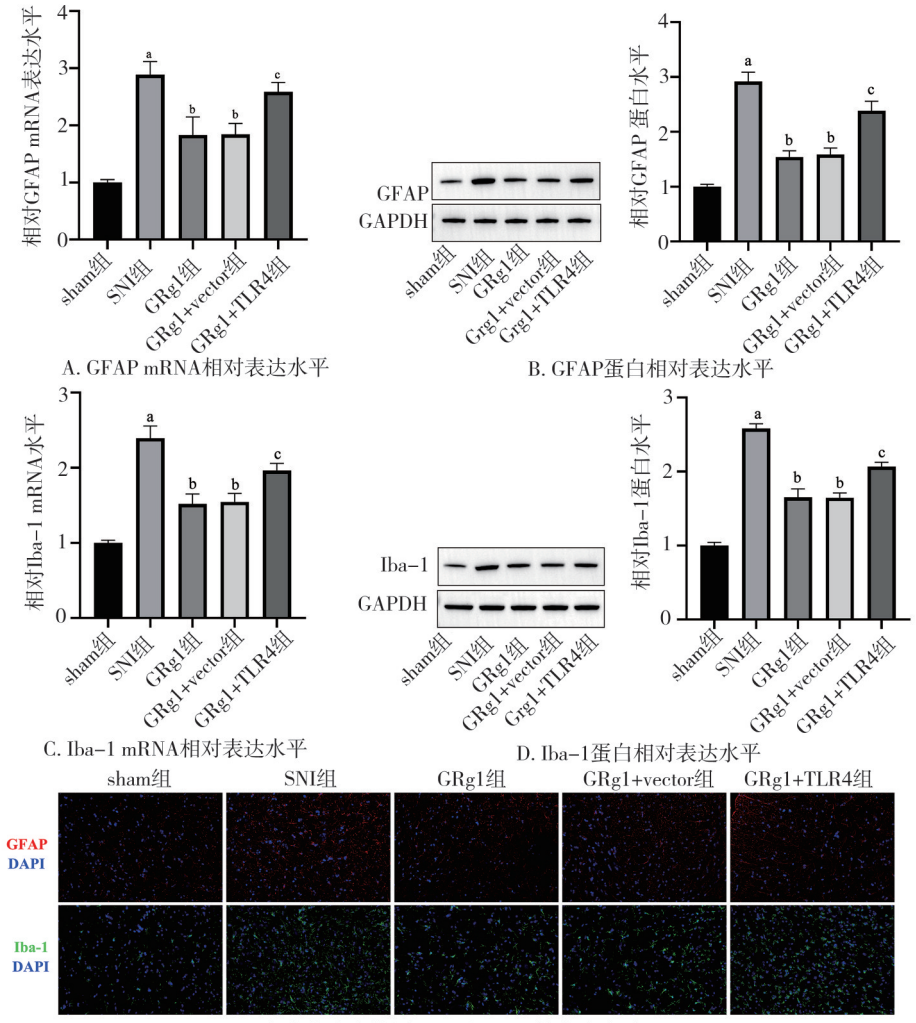
2.2 GRg1抑制SNI大鼠脊髓组织中GFAP和Iba-1的表达

行为学实验结束后处死大鼠，取其L4~L6脊髓组织检测星形胶质细胞标志物GFAP和小胶质细胞标志物Iba-1的mRNA和蛋白表达水平。RT-qPCR和Western blot的结果显示，与sham组相比，SNI组大鼠脊髓组织中GFAP和Iba-1的mRNA和蛋白表达量显著增加（GFAP，mRNA：F=37.74，P=0.000；蛋白：F=98.71，P=0.000；Iba-1，mRNA：F=62.11，P=0.000；蛋白：F=187.0，P=0.000；图2A~D），而GRg1抑制GFAP和Iba-1的表达（GFAP，mRNA：F=37.74，P=0.000；蛋白：F=98.71，P=0.000；Iba-1，mRNA：F=62.11，P=0.000；蛋白：F=187.00，P=0.000；图2A~D）。为了进一步验证该结果，本研究使用间接免疫荧光法检测GFAP和Iba-1的表达水平。如图2E所示，SNI组中GFAP和Iba-1的表达水平显著高于sham组，而GRg1组中GFAP和Iba-1的表达水平低于SN1组。此外，本研究发现过表达TLR4后，GFAP和Iba-1的表达量显著高于GRg1组（GFAP，mRNA：F=37.74，P=0.009；蛋白：F=98.71，P=0.000；Iba-1，mRNA：F=62.11，P=0.006；蛋白：F=187.00，P=0.000；图2A~E）。在SNI大鼠L4~L6脊髓组织中，星形胶质细胞和小胶质细胞被广泛激活，但这一激活现象被GRg1抑制。



注：a，与sham组比较，P<0.05；b，与SNI组比较，P<0.05；c，与GRg1组比较，P<0.05

图1 GRg1对SNI大鼠MWT和TWL的影响



注：a，与sham组比较，$P<0.05$；b，与SNI组比较，$P<0.05$；c，与GRg1组比较，$P<0.05$

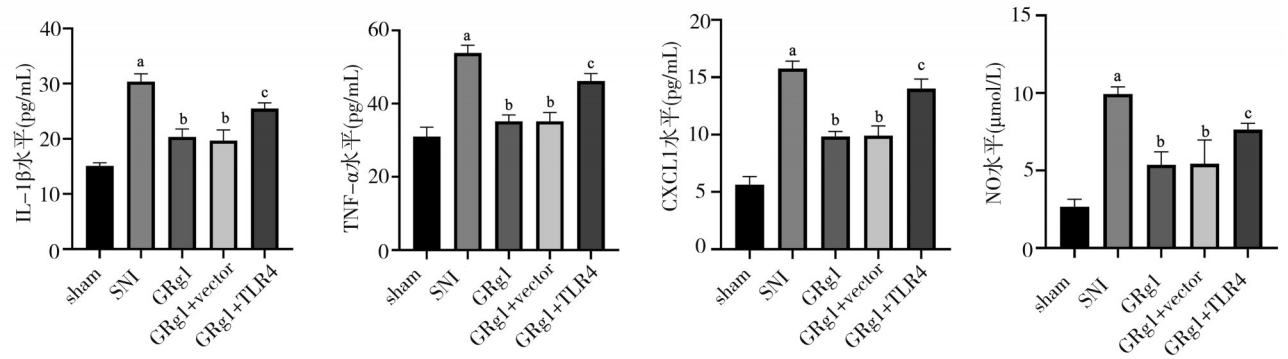
图2　GRg1对SNI大鼠脊髓组织中GFAP和Iba-1的mRNA和蛋白表达水平的影响

2.3　GRg1降低SNI大鼠脊髓组织中IL-1β、TNF-α、CXCL1和NO的含量

取大鼠L_4~L_6脊髓组织进行炎症因子、趋化因子和细胞毒性物质含量检测。与sham组比较，SNI组大鼠脊髓组织中IL-1β（F=56.96，P=0.000）、TNF-α（F=55.25，P=0.000）、CXCL1（F=93.54，P=0.000）和NO（F=30.57，P=0.000）的水平显著升高（图3A~D）；GRg1显著抑制SNI组大鼠脊髓组织中IL-1β（F=56.96，P=0.000）、TNF-α（F=55.25，P=0.000）、CXCL1（F=93.54，P=0.000）和NO（F=30.57，P=0.000）的分泌（图3A~D）。与GRg1组相比，GRg1+TLR4组大鼠脊髓组织中IL-1β（F=56.96，P=0.006）、TNF-α（F=55.25，P=0.000）、CXCL1（F=93.54，P=0.000）和NO（F=30.57，P=0.042）的含量显著增加（图3A~D）。

2.4　GRg1抑制SNI大鼠脊髓组织中TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路

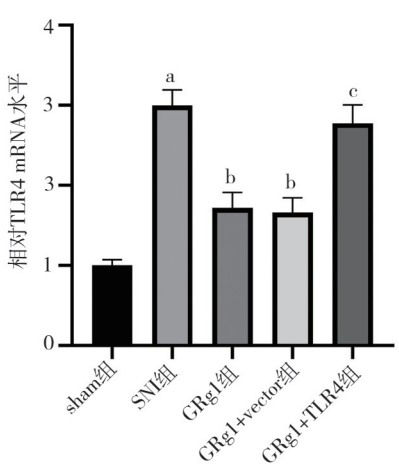
对SNI大鼠脊髓组织中TLR4的表达量，p38和p65的磷酸化水平进行蛋白免疫印迹检测。结果提示，SNI组大鼠脊髓组织中TLR4的mRNA（F=62.66，P=0.000）和蛋白质表达量（F=53.52，P=0.000）显著升高，且p38（F=300.30，P=0.000）和p65（F=121.60，P=0.000）的磷酸化水平也显著提高，与sham组相比，差异具有统计学意义（图4A~E）；相较于SNI组，GRg1组TLR4的mRNA（F=62.66，P=0.000）和蛋白质表达量（F=53.52，P=0.000）及p38（F=300.30，P=0.000）和p65（F=121.60，P=0.000）的磷酸化水平显著降低（4A~E），说明GRg1抑制SNI大鼠脊髓组织中TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路的激活。为了进一步验证上述结果，本研究进行了不同物种TLR4蛋白与GRg1的分子对接。结果显示，TLR4是GRg1的靶标分子，人类TLR4蛋白与GRg1的结合能为-12.534 kcal/mol，两者的结合高度稳定；小鼠TLR4蛋白与GRg1的结合能为-13.064 kcal/mol，两者的结合依然高度稳定（图4F）。此外，GRg1+TLR4组大鼠脊髓组织中TLR4的mRNA（F=62.66，P=0.000）和蛋白质表达量（F=53.52，P=0.000）及p38（F=300.30，P=0.000）和p65（F=121.60，P=0.000）的磷酸化水平相较于GRg1组显著提高（图4A~E），说明GRg1通过稳定结合并下调TLR4来抑制TLR4-p38/MAPK-NF-κB信号传导。



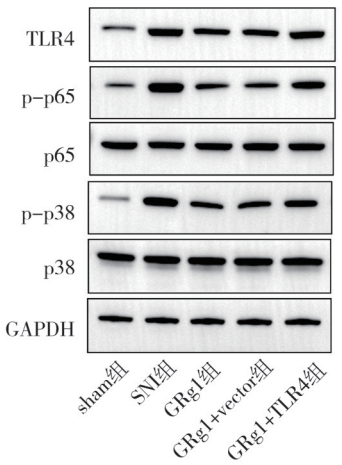
A. IL-1β水平　B. TNF-α水平　C. CXCL1水平　D. NO水平

注：a，与sham组比较，$P<0.05$；b，与SNI组比较，$P<0.05$；c，与GRg1组比较，$P<0.05$

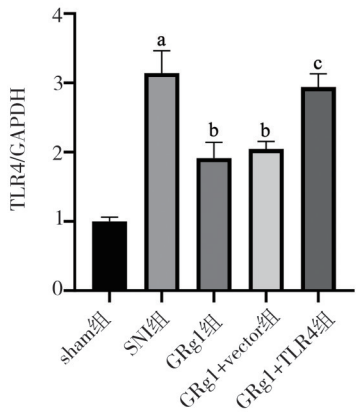
图3　GRg1对SNI大鼠脊髓组织中IL-1β、TNF-α、CXCL1和NO含量的影响



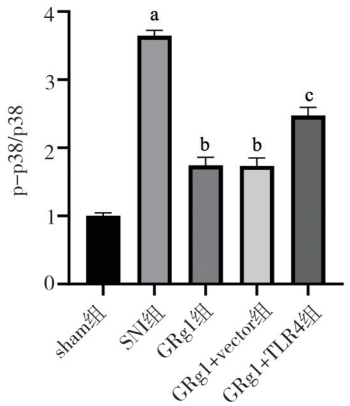
A. GRg1对TLR4 mRNA表达水平的影响



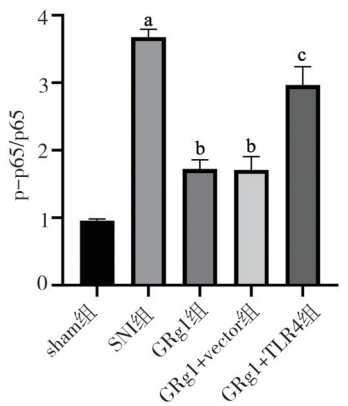
B. GRg1对TLR4、p38、p-p38、p65和p-p65蛋白表达水平的影响



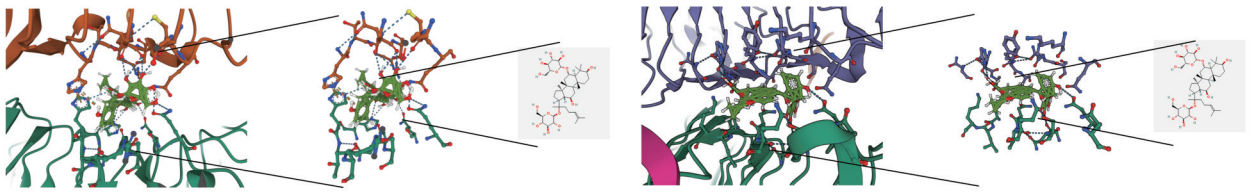
C. TLR4相对表达水平



D. p38相对磷酸化水平



E. p65相对磷酸化水平



GRg1与TLR4（3FXI）的结合示意图　GRg1 2D结构　GRg1与TLR4（3VQ2）的结合示意图　GRg1 2D结构

F. GRg1和人类和小鼠中TLR4蛋白分子对接结果

注：a，与sham组比较，$P<0.05$；b，与SNI组比较，$P<0.05$；c，与GRg1组比较，$P<0.05$

图4　GRg1对SNI大鼠脊髓组织中TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路的作用

3 讨 论

NP是慢性疼痛的主要类型，近年来在我国的发病率逐年递增。薛松和孙涛[10]提出NP的发展与神经胶质细胞息息相关，激活的神经胶质细胞可以通过分泌炎性因子、趋化因子和细胞毒性物质参与NP的发生和维持。在NP中发挥作用的神经胶质细胞主要有2种：小胶质细胞和星形胶质细胞。小胶质细胞和星形胶质细胞是神经中枢系统中最常见的非神经元细胞，在神经炎症性疾病中存在互作机制[11]。有文献报道称小胶质细胞和星形胶质细胞可以通过C3/C3aR通路相互作用，从而调节大鼠的NP[12]。在本实验中，通过对小胶质细胞生物标志物Iba-1和星形胶质细胞生物标志物CFAP进行检测，发现在SNI大鼠中，小胶质细胞和星形胶质细胞存在明显的活化趋势，这与前人的研究结果[13-14]相似。

在NP中，活化的神经胶质细胞通过改变细胞形态来激活炎症通路，释放促炎细胞因子从而导致炎症的发生，脊髓神经元产生致敏和炎症反应后进一步加剧疼痛的产生[15-16]。炎性因子IL-1β和TNF-α在NP的维持中存在作用，其中IL-1β诱导p38丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）磷酸化使伤害感受神经元敏感，导致机械和热痛觉过敏；TNF-α也是神经炎症相关因子，通过抑制TNF-α相关的通路，可以缓解炎症，减轻疼痛[17]。除了炎性因子，趋化因子和细胞毒性物质也是NP研究的主要方向。趋化因子可以参与脊髓中神经元与神经胶质细胞的相互作用，调节由于神经损伤引起的NP。例如，趋化因子CX3CL1及其受体CX3CR1作为一种在神经元与胶质细胞相互调控的介质参与NP的调节，在NP中发挥着非常重要的作用[18]；而CCL2可以作为神经调质调节外周伤害性感受器对伤害性刺激的感受作用，增强痛觉信号在脊髓的传递效应[19]。此外，神经胶质细胞还会在NP的发生中分泌细胞毒性物质（如NO等），对神经元造成损伤和死亡[20]。

目前，针对NP的治疗并没有效果良好的特异性药物，因此临床上防治该类疾病存在极大的挑战。GRg1具有抗凋亡、抗氧化应激和抗炎等药理学特性，在其他神经疾病中表现出良好疗效。杜姝等[21]通过对癫痫小鼠的研究发现GRg1可以抑制神经胶质细胞的活化，降低氧化应激相关指标和炎症因子的表达水平，对癫痫起一定的缓解作用。在神经退行性疾病糖尿病视网膜病变中，GRg1可以通过上调miR-216a-5p抑制TLR4/NF-kB通路的激活，从而抑制糖尿病视网膜病变中趋化因子和炎性细胞因子的产生[22]。因此，本研究选择GRg1作为研究对象进行实验，发现GRg1能够显著恢复SNI大鼠的MWT和TWL，抑制IL-1β、TNF-α、CXCL1和NO的分泌。通过分子对接技术，本研究发现TLR4是GRg1的靶标分子。在前人的研究中，TLR4可以与病原体结合，通过一系列的适配器蛋白和激酶，将信号传递给p38/MAPK，促使MAPK激活，激活的MAPK会导致NF-κB进入细胞核，诱导炎症反应[23]。有研究表明，TLR4参与紫杉醇诱导的大鼠神经病理性疼痛，并影响神经病理性疼痛过程中炎症细胞因子（IL-1β和TNF-α）的释放[24]。此外，在紫杉醇诱导的神经病理性疼痛大鼠的脊髓组织中，TRL4的表达水平显著升高，炎性因子的表达增加，星形胶质细胞及小胶质细胞活化增强[25]。因此，本研究推测GRg1通过抑制TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路改善SNI大鼠的氧化应激反应和炎症反应，缓解大鼠NP。为了验证这一猜想，我们进行了拯救实验。与SNI组相比，GRg1组大鼠脊髓组织中TLR4的mRNA和蛋白质表达量显著降低，因此，本研究在GRg1处理后的SNI大鼠尾静脉注射空载质粒和TLR4过表达质粒，外源性的过表达了TLR4，验证GRg1是否通过TLR4在大鼠NP中发挥作用。结果和预期一致，过表达TLR4部分逆转了GRg1对SNI大鼠的抗氧化应激和抗炎作用，表明GRg1对SNI大鼠的抗炎和抗氧化应激作用与TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路存在潜在的联系。

本研究在GRg1对大鼠NP的缓解作用的机制研究中已经取得一些显著成果，但仍存在一些不足之处。尽管在本研究中通过设立不同组别，对GRg1在SNI大鼠中的疗效进行了初步评估，并取得了一定的成果，但本研究的样本量相对较小。小样本量可能导致结果的统计意义受限，难以全面反映GRg1在更大范围的疗效和安全性。此外，很多天然产物在体内或者体外实验中都有良好的效果，但是在临床上的作用却比较一般，GRg1在NP临床治疗中的具体效果仍不可知。在后续的研究中，为了更全面地评GRg1的疗效和安全性，我们会进一步扩大样本量，以获取更具统计意义和普适性的结果，也会逐步进行人体内和体外实验，进一步证明GRg1对NP的缓解作用。

综上所述，本研究发现GRg1可以显著恢复SNI大鼠的MWT和TWL；抑制SNI大鼠脊髓组织中GFAP和Iba-1的表达；通过抑制TLR4-p38/MAPK-NF-κB通路改善SNI大鼠的炎症和氧化应激。

GRg1作为一种具有抗炎和抗氧化性的天然产物，在改善NP进程方面发挥着重要作用。尽管GRg1对大鼠NP有一定缓解作用，但临床应用仍存在许多问题和挑战。首先，需要了解GRg1与其他药物或治疗方法是否存在相互作用和协同效应，为其临床应用提供科学依据；其次，还需要开展更多的临床研究，以验证GRg1在治疗人类NP中的有效性和可行性。

参 考 文 献

[1] Bouhassira D. Neuropathic pain：definition，assessment and epidemiology[J]. Rev Neurol，2019，175(1/2)：16-25.

[2] Boccella S，De Filippis L，Giorgio C，et al. Combination drug therapy for the management of chronic neuropathic pain[J]. Biomolecules，2023，13(12)：1802.

[3] Vranken JH. Elucidation of pathophysiology and treatment of neuropathic pain[J]. Cent Nerv Syst Agents Med Chem，2012，12(4)：304-314.

[4] Yi MH，Liu YU，Liu K，et al. Chemogenetic manipulation of microglia inhibits neuroinflammation and neuropathic pain in mice[J]. Brain Behav Immun，2021，92：78-89.

[5] Yousuf MS，Sahn JJ，Yang H，et al. Highly specific σ2R/TMEM97 ligand FEM-1689 alleviates neuropathic pain and inhibits the integrated stress response[J]. Proc Natl Acad Sci USA，2023，120(52)：e2306090120.

[6] Li J，Cai D，Yao X，et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on hematopoietic stem/progenitor cells through attenuating oxidative stress and the Wnt/β-catenin signaling pathway in a mouse model of d-galactose-induced aging[J]. Int J Mol Sci，2016，17(6)：E849.

[7] Sun Y，Yang Y，Liu S，et al. New therapeutic approaches to and mechanisms of ginsenoside Rg1 against neurological diseases[J]. Cells，2022，11(16)：2529.

[8] Yu L，Hao YJ，Ren ZN，et al. Ginsenoside Rg1 relieves rat intervertebral disc degeneration and inhibits IL-1β-induced nucleus pulposus cell apoptosis and inflammation *via* NF-κB signaling pathway[J]. Vitro Cell Dev Biol Anim，2024，60(3)：287-299.

[9] Liao YC，Guo C，Wen AD，et al. Frankincense-Myrrh treatment alleviates neuropathic pain *via* the inhibition of neuroglia activation mediated by the TLR4/MyD88 pathway and TRPV1 signaling[J]. Phytomedicine，2023，108：154540.

[10] 薛 松，孙 涛. 小胶质细胞介导脊髓损伤后神经病理性疼痛机制研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志，2022，28(3)：165-172.

Xue S，Sun T. Research progress on the mechanism of microglia in neuropathic pain after spinal cord injury[J]. Chin J Pain Med，2022，28(3)：165-172.

[11] Liu LR，Liu JC，Bao JS，et al. Interaction of microglia and astrocytes in the neurovascular unit[J]. Front Immunol，2020，11：1024.

[12] Mou W，Ma L，Zhu A，et al. Astrocyte-microglia interaction through C3/C3aR pathway modulates neuropathic pain in rats model of chronic constriction injury[J]. Mol Pain，2022，18：17448069221140532.

[13] Li J，Wei Y，Zhou J，et al. Activation of locus coeruleus-spinal cord noradrenergic neurons alleviates neuropathic pain in mice via reducing neuroinflammation from astrocytes and microglia in spinal dorsal horn[J]. J Neuroinflammation，2022，19(1)：123.

[14] Liu ZY，Song ZW，Guo SW，et al. CXCL12/CXCR4 signaling contributes to neuropathic pain *via* central sensitization mechanisms in a rat spinal nerve ligation model[J]. CNS Neurosci Ther，2019，25(9)：922-936.

[15] Malcangio M. Role of the immune system in neuropathic pain[J]. Scand J Pain，2019，20(1)：33-37.

[16] Xanthos DN，Sandkühler J. Neurogenic neuroinflammation：inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity[J]. Nat Rev Neurosci，2014，15：43-53.

[17] Li Z，Bai H，Zhang R，et al. Systematic analysis of critical genes and pathways identified a signature of neuropathic pain after spinal cord injury[J]. Eur J Neurosci，2022，56(2)：3991-4008.

[18] Pawelec P，Ziemka-Nalecz M，Sypecka J，et al. The impact of the CX3CL1/CX3CR1 axis in neurological disorders[J]. Cells，2020，9(10)：E2277.

[19] Du S，Wu S，Feng X，et al. A nerve injury-specific long noncoding RNA promotes neuropathic pain by increasing Ccl2 expression[J]. J Clin Invest，2022，132(13)：e153563.

[20] Hervera A，Leánez S，Negrete R，et al. Carbon monoxide reduces neuropathic pain and spinal microglial activation by inhibiting nitric oxide synthesis in mice[J]. PLoS One，2012，7(8)：e43693.

[21] 杜 姝，姜 岩，刘 晶，等. 人参皂苷Rg1对癫痫大鼠海马神经元损伤和小胶质细胞活化的影响[J]. 免疫学杂志，2021，37(3)：202-209.

Du S，Jiang Y，Liu J，et al. Effects of ginsenoside Rg1 on hippocampal neuron damage and microglial activation in epilepsy rats[J]. J Immunological Journal，2022，37(3)：202-209.

[22] Xue LP，Hu M，Zhu Q，et al. GRg1 inhibits the TLR4/NF-κB signaling pathway by upregulating miR-216a-5p to reduce growth factors and inflammatory cytokines in DR[J]. Mol Biol Rep，2023，50(11)：9379-9394.

[23] Liu ZH，Liu M，Wang HR，et al. Glutamine attenuates bisphenol A-induced intestinal inflammation by regulating gut microbiota and TLR4-p38/MAPK-NF-κB pathway in piglets[J]. Ecotoxicol Environ Saf，2024，270：115836.

[24] Iannotta M，Belardo C，Trotta MC，et al. N-palmitoyl-D-glucosamine，a natural monosaccharide-based glycolipid，inhibits TLR4 and prevents LPS-induced inflammation and neuropathic pain in mice[J]. Int J Mol Sci，2021，22(3)：1491.

[25] 魏 星，马 莉，李维妙，等. HMGB1/TLR4通路在白蛋白结合型紫杉醇致神经病理性疼痛大鼠脊髓的表达[J]. 山西医科大学学报，2022，53(9)：1113-1119.

Wei X，Ma L，Li WM，et al. Expression of HMGB1/TLR4 pathway in spinal cord in neuropathic pain induced by nab-paclitaxel in rats[J]. J Shanxi Med Univ，2022，53(9)：1113-1119.

（收稿：2024-10-12；修回：2025-02-19；录用：2025-02-27）

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

郭 强，王 坤，党彩艳，等. 人参皂苷Rg1对大鼠神经病理性疼痛的缓解作用和机制研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(10)：1418-1425.