·基础研究·

祖师麻片对 CCI 模型大鼠脊髓背角 $P2X_4$ 受体及 p38 MAPK 表达的影响△

宋敬怡[1]，张天睿[1]，马丹[1]，程龙[1]，程文豪[1]，李颖慧[1]，张硕峰[1*]，格桑顿珠[2*]

1. 北京中医药大学 中药学院，北京　100029；2. 西藏藏医药大学 藏药系，西藏　拉萨　850000

［摘要］　**目的：**研究祖师麻片对慢性挤压神经损伤（CCI）模型大鼠的镇痛作用及机制。**方法：**采用 CCI 诱导大鼠坐骨神经损伤，结扎手术完成第 8 天按痛反应时间（TWT）值随机分为 7 组（$n = 12$），即对照组、假手术组、模型组、布洛芬组及祖师麻片高、中、低剂量（0.432、0.216、0.108 $g \cdot kg^{-1}$）组，灌胃给药，每天 1 次，共给药 14 次。造模后第 20 天，测定 CCI 大鼠患肢（即右后足）的 TWT 值及 50% 机械缩足反射阈值（50% MWT）。造模第 21 天灌注取材，取脊髓段 $L_{4\sim6}$，利用免疫组化法观察大鼠脊髓背角 $P2X_4$ 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶（p38 MAPK）的表达情况。**结果：**与模型组比较，祖师麻片各剂量组在给药后各时间点可显著延长模型大鼠患侧的 TWT（$P < 0.01$）；可提高模型大鼠患侧的 50% MWT 值（$P < 0.01$）；且明显抑制 $P2X_4$ 受体和 p38 MAPK 在脊髓背角中的表达（$P < 0.05$）。**结论：**祖师麻片有明显的镇痛作用，能有效降低 CCI 诱导坐骨神经损伤所致的痛觉敏化，可减轻结扎坐骨神经所致痛觉敏感大鼠患肢对温度刺激、机械刺激的敏感性，其作用机制与其抑制脊髓背角 $P2X_4$/p38 MAPK 通路有关。

［关键词］　祖师麻片；坐骨神经痛；脊髓背角；$P2X_4$；p38 MAPK

［中图分类号］　R285.5　　［文献标识码］　A　　［文章编号］　1673-4890(2020)09-1470-05

doi：10.13313/j.issn.1673-4890.20190806001

Effect of Zushima Tablets on $P2X_4$ Receptor and p38 MAPK Expression in Spinal Dorsal Horn of CCI Rats

SONG Jing-yi[1], ZHANG Tian-rui[1], MA Dan[1], CHENG Long[1], CHENG Wen-hao[1], LI Ying-hui[1], ZHANG Shuo-feng[1*], GESANG Dun-zhu[2*]

1. *School of Chinese Materia Medica*, *Beijing University of Chinese Medicine*, *Beijing* 100029, *China*

2. *Department of Tibetan Medicine*, *Tibet Troditional Medical College*, *Lhasa* 850000, *China*

［**Abstract**］　**Objective**: To observe the pain response time, mechanical withdrawal threshold (50% MWT) and the expression of $P2X_4$ and p38 MAPK in spinal dorsal horn of CCI rats, and elucidate the analgesic effect of Zushima Tablets on CCI model rats and the related mechanism. **Methods**: Chronic constraining injury of the sciatic nerve model (CCI) was used to induce sciatic nerve injury. On the eighth day after ligation, the sciatic nerve was randomly divided into seven groups according to TWT value ($n = 12$): Control group, sham group, model group, ibuprofen group, Zushima Tablets 0.432, 0.216 and 0.108 $g \cdot kg^{-1}$ group. Rats were given orally once a day for 14 times. On 20th days after model establishment, the pain response time and 50% MWT of affected limbs (right hind foot) of CCI rats were measured. At the 21st day of modeling, perfusion materials were collected from the spinal cord segment $L_{4\text{-}6}$, the expression of $P2X_4$ and p38 MAPK in spinal dorsal horn of rats was observed by immunohistochemical method. **Results**: Zushima Tablets can significantly prolong the pain response time of the affected side of model animals at different time points after administration ($P < 0.01$), and the 50% MWT value of the affected side of the model animal was increased after administration ($P < 0.01$). The expression of $P2X_4$ receptor and p38 MAPK in the spinal dorsal horn of the model animal was significantly inhibited ($P < 0.05$). **Conclusion**: Zushima Tablets has obvious analgesic effect and can effectively reduce pain sensitization caused by sciatic nerve injury. It can alleviate the sensitivities of affected limbs to temperature and mechanical stimulation induced by sciatic nerve

△［基金项目］　中国医药教育协会专项课题（2016SKT-M006）

*［通信作者］　张硕峰，博士，教授，研究方向：中药药理；E-mail：shuofengzhang@sina.com

格桑顿珠，副教授，研究方向：藏药炮制、藏药新药；E-mail：zygedun@163.com

ligation in rats. Its mechanism is related to the inhibition of $P2X_4$/p38 MAPK pathway in spinal dorsal horn.

［**Keywords**］　Zushima Tablets; sciatica; dorsal horn of spinal cord; $P2X_4$; p38 MAPK

祖师麻为瑞香科植物黄瑞香 *Daphne giraldii* Nitsche、陕西瑞香 *Daphne tangutice* Maxim. 或凹叶瑞香 *Daphne retusa* Hemsl. 的干燥茎皮及根皮。其味辛、苦，性温；有小毒；归肝经，具有祛风除湿、止痛散瘀的功效，其制剂祖师麻片收载于《中华人民共和国药典》2015 年版，临床用于治疗坐骨神经痛及风湿、类风湿性关节炎。

坐骨神经痛属于神经病理性疼痛的一种。神经病理性疼痛的产生可导致神经系统对痛觉信号的产生、处理、传递等发生功能性障碍[1-2]。本研究采用慢性挤压神经损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve model，CCI)诱导的坐骨神经损伤大鼠模型[3-4]，以痛反应时间(thermal withdrawal threshold，TWT)、50% 机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold，50% MWT)为指标，观察祖师麻片对 CCI 模型大鼠神经病理性疼痛的抑制作用，并检测 CCI 模型大鼠患侧脊髓背角中丝裂原活化蛋白激酶 p38 (p38 MAPK)以及 $P2X_4$受体表达，以分析祖师麻片抑制坐骨神经痛的可能机制，为其在临床的应用提供试验依据。

1　材料

1.1　实验动物

6 ~ 7 周龄 SPF 级 SD 大鼠 84 只(北京维通利华实验动物技术有限公司，动物合格证编号分别为 11400700192661、11400700193358、11400700202282)，雌雄各 42 只，体质量(200 ± 20) g。大鼠饲养于北京中医药大学动物房，许可证号：SYXK(京)2016-0038，实验过程中严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。并获得北京中医药大学实验动物福利伦理委员会的批准(批准号：BUCM-4-2017090109-3009)。实验前，大鼠适应性饲养 3 d。

1.2　试剂

祖师麻片剂(秦皇岛市山海关药业有限责任公司，批号：20140702)，颜色为红棕色，规格 0.3 g/片，临床人用量为每日 3 次，3 片/次，即 2.7 $g \cdot d^{-1}$，按照人体质量为 75 kg 进行计算，即 36 $mg \cdot kg^{-1}$。确定大鼠受试剂量为 0.432、0.216、0.108 $g \cdot kg^{-1}$，即常规用量的 12、6、3 倍量。布洛芬缓释胶囊(天津中美史克制药有限公司，批号：16080652)，规格 4 mg/粒，常规用药量为 8 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，本实验采用 48 $mg \cdot kg^{-1}$作为阳性药组大鼠的受试剂量，即常规用药量的 6 倍。

兔抗 $P2X_4$ 多克隆抗体、兔抗 p38 MAPK 抗体(Proteitech 公司)；DAB 显色剂、兔二抗超敏试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3　仪器

Von-Frey 纤维毛(美国 Stoelting 公司)；冷/热盘测痛仪(美国 IITC 公司)。

2　方法

2.1　分组及给药

SD 大鼠 84 只，雌雄兼用。结扎手术完成后第 8 天按 TWT 值运用对位随机法分为 7 组，分别为对照组、模型组、假手术组、布洛芬组及祖师麻片 0.432、0.216、0.108 $g \cdot kg^{-1}$组。

布洛芬组及祖师麻片各剂量组大鼠于术后 1 周(即第 8 天)开始灌胃给药，每天给药 1 次，共 14 次，对照组、模型组、假手术组大鼠给予相同质量的 0.9% 氯化钠溶液。在造模后 20 d 测定相关行为学数据。

2.2　CCI 模型的制备

除对照组外，其余各组大鼠腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉，呈俯卧状趴于手术台上，右后肢外侧褪毛处理。褪毛完成后将外侧皮肤消毒后剪开，依次拨开皮肤、脂肪、浅筋膜直至看到股二头肌，用眼科镊将股二头肌分离，用镊子轻柔地将坐骨神经主干挑起，以相邻结扎线的距离约为 1 mm 长度对坐骨神经进行结扎，共结扎 4 道。如大鼠大腿肌肉出现微微颤动，则说明结扎力度适宜[5]。结扎完毕之后将肌肉和皮肤逐层缝合，缝合处涂抹碘酒防止伤口感染。

2.3　指标检测

2.3.1　TWT 测定　测定时间均设定在 8：00 ~ 16：00。将大鼠放入透明玻璃罩内适应 5 min，测量的开始时间为大鼠停止探觅行为。开启冷/热盘测痛仪，温度调至 55 ℃，测定时间上限 30 s，观察部位为患肢(即右后足)。当仪器加热到指定温度后，大鼠会因灼热出现不停抬足或舔足现象，此时为时间记录终点。记录的时间长度应为自开启仪器至大鼠右后足

出现舔足反应所用的时间，每只大鼠测量 3 次，每次测量距离上次测量的时间超过 10 min，痛反应时间为 3 次测量数据的平均值。

2.3.2　50% MWT 的测定　测定时间均设定在 8：00～16：00，室温 20～25 ℃，湿度 46%～52%。将大鼠置于提前准备好的笼内，测量开始之前应使大鼠充分适应周围环境，待其安静后开始测量。利用 Von-Frey 纤维毛对其患肢（即右后足）进行刺激，方法为上下法，观察大鼠患肢对 Von-Frey 纤维毛刺激出现的反应。选用的 Von-Frey 纤维毛质量分别为 15、26、60、100、180、300 g，测量开始先用最小克数纤维毛对大鼠的患肢进行刺激，若大鼠对纤维毛产生蹬踹或缩足的变化记作 O（阳性反应），反之记作 ×（阴性反应）。当反应为 O 时，选取比当前用于测量的纤维毛质量低 1 级的纤维毛进行刺激，当反应为 × 时，选用比当前用于测量的纤维毛质量高 1 级的纤维毛刺激。当连续 2 个及 2 个以上性质相同的反应后出现与当前性质相反的反应时，此反应所对应的数值即为第 1 个正式数据，之后再测 5 个数据，则每只大鼠的正式数据共 6 个。查纤维毛换算系数表[6]并按照公式（1）计算 50% 引起阳性反应量（ED_{50}）。

$$ED_{50} = 10^{\log a + k \times b} \quad (1)$$

a：用于正式数据所对应的纤毛质量；b：相邻纤毛的对数差的平均值；k：表中的相应参数。

2.3.3　免疫组织化学反应显色　末次给药后 1 h，大鼠腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠麻醉，4% 多聚甲醛溶液灌注，取出大鼠脊髓段 $L_{4\sim6}$ 后立即放入 4% 多聚甲醛溶液固定。脊髓段固定好后，经脱水、包埋处理后，每组随机抽取较完整的 6 只大鼠脊髓组织进行切片，每张厚度为 3 μm 左右。切片脱蜡，磷酸盐缓冲液（PBS）洗 3 min × 3；3% H_2O_2（15 min）封闭内源性过氧化物酶，PBS 冲洗 3 min × 3；微波炉加热 20 min 进行抗原修复；PBS 洗 3 min × 3；加一抗在 37 ℃温箱孵育 1 h，4 ℃过夜；次日取出，PBS 洗 3 min × 3；加二抗孵育 2 h，DAB 显色，放入水中充分洗涤；树胶封片，观察结果。

本实验每只大鼠选取 3 张切片，于显微镜 200 倍的视野中观察免疫组化法染色后脊髓中 $P2X_4$ 和 p38 MAPK 的表达情况，光镜下阳性表达区呈现棕褐色，每张切片随机选取 3 个视野，完成后计算出各组别脊髓背角区域中阳性显色的平均吸光度（A）。

2.4　统计学方法

采用 SPSS 22.0 对实验结果进行统计学处理，实验数据的表示方式为（$\bar{x} \pm s$），各指标结果则采用单因素方差分析，$P < 0.05$ 即为差异有统计学意义。

3　结果

3.1　祖师麻片对 CCI 大鼠痛阈值的影响

结果显示，大鼠结扎坐骨神经 21 d 后，患侧痛阈值明显降低，表现为 TWT 缩短，50% MWT 降低（$P < 0.01$），提示模型大鼠患肢对温度刺激、机械刺激敏感度提高，表现为痛觉过敏。与模型组比较，祖师麻片各剂量给药后 14 d，可明显抑制大鼠患肢对温度刺激、机械刺激敏感度的减低，表现为明显延长 TWT，提高 50% MWT 值（$P < 0.05$，$P < 0.01$），结果见表 1。

表 1　祖师麻片对 CCI 大鼠痛阈值的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	TWT/s	50% MWT/g
对照		6.31 ± 0.56	77.94 ± 18.34
假手术		8.02 ± 6.85$^{\#\#}$	77.71 ± 11.13$^{\#\#}$
模型		3.22 ± 0.77**	19.06 ± 11.03**
布洛芬	0.048	5.83 ± 0.82$^{\#\#}$	52.36 ± 13.93$^{\#\#}$
祖师麻片	0.432	5.78 ± 1.38$^{\#\#}$	57.20 ± 29.02$^{\#}$
	0.216	5.92 ± 0.88$^{\#\#}$	40.98 ± 9.81$^{\#\#}$
	0.108	5.92 ± 0.70$^{\#\#}$	50.65 ± 19.48$^{\#\#}$

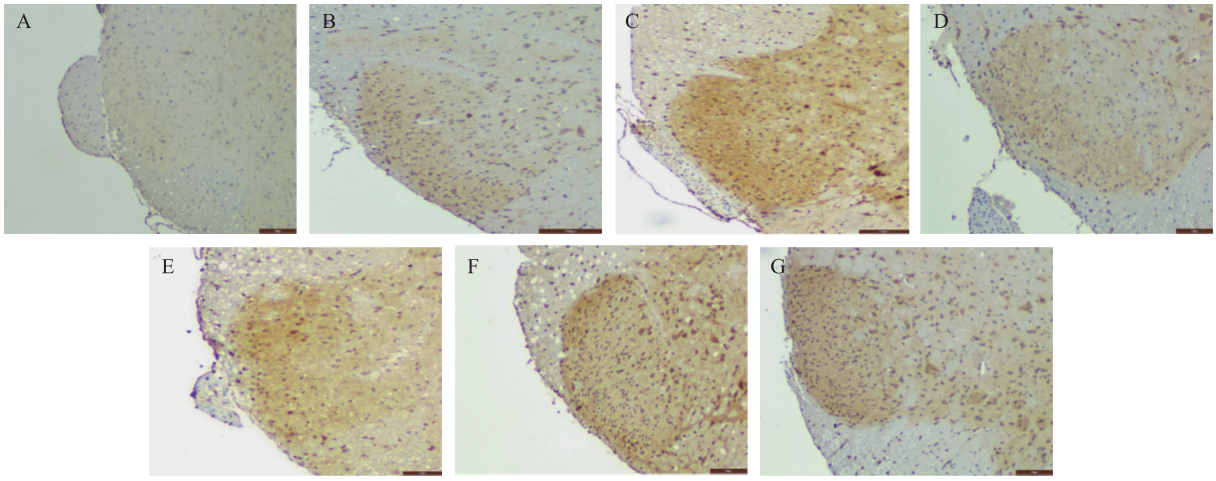
注：与对照组比较，$^{**}P < 0.01$；与模型组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$；下同。

3.2　祖师麻片对 CCI 大鼠脊髓背角中 p38 MAPK 和 $P2X_4$ 受体表达的影响

造模 21 d 后，模型大鼠患侧脊髓背角 p38 MAPK、$P2X_4$ 受体的表达水平明显提高（与假手术组、对照组比较，$P < 0.01$）。与模型组比较，祖师麻各剂量可不同程度抑制大鼠患侧脊髓背角中 p38 MAPK、$P2X_4$ 受体表达水平的增高（$P < 0.01$），见表 2 和图 1～2。

表 2　祖师麻片对 CCI 大鼠脊髓背角中 p38 MAPK 和 $P2X_4$ 受体表达的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	A 值	
		p38 MAPK	$P2X_4$
对照		0.161 ± 0.009	0.163 ± 0.004
假手术		0.162 ± 0.006$^{\#\#}$	0.173 ± 0.010$^{\#\#}$
模型		0.188 ± 0.014**	0.208 ± 0.025**
布洛芬	0.048	0.154 ± 0.011$^{\#\#}$	0.175 ± 0.007$^{\#\#}$
祖师麻片	0.432	0.163 ± 0.006$^{\#\#}$	0.178 ± 0.010$^{\#\#}$
	0.216	0.184 ± 0.014	0.182 ± 0.014$^{\#\#}$
	0.108	0.164 ± 0.007$^{\#\#}$	0.174 ± 0.021$^{\#\#}$



注：A. 对照组；B. 假手术组；C. 模型组；D. 布洛芬组；E. 祖师麻片 0.108 g·kg^{-1}组；F. 祖师麻片 0.216 g·kg^{-1}组；G. 祖师麻片 0.432 g·kg^{-1}组；下同。

图 1　祖师麻片对 CCI 大鼠患侧脊髓背角 p38 MAPK 表达的影响

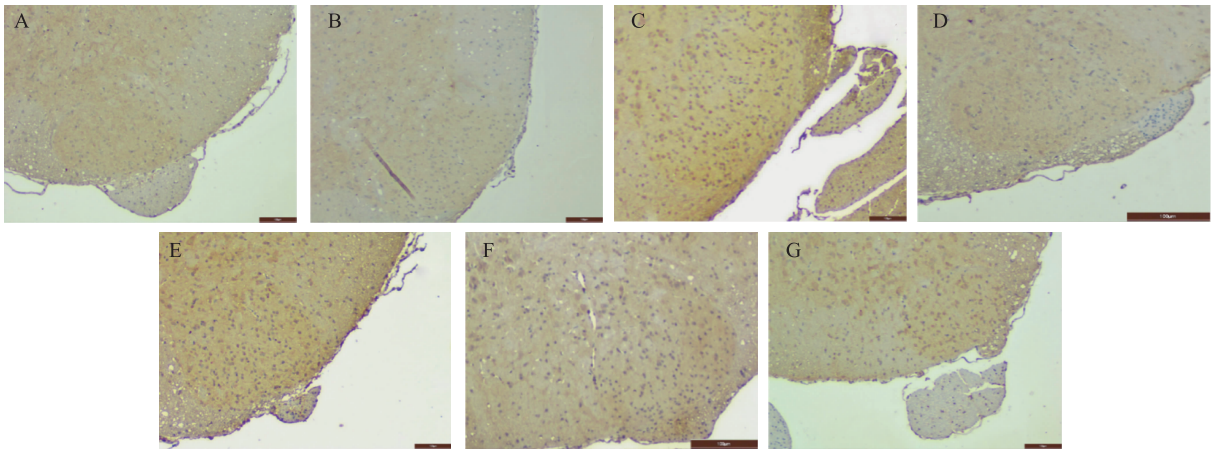


图 2　祖师麻片对 CCI 大鼠患侧脊髓背角中 $P2X_4$ 表达的影响

4　讨论

神经病理性疼痛是神经系统受到机械损伤或炎症侵害等引发的一种慢性疼痛，常导致痛觉的敏化，即痛觉过敏或触痛超敏。CCI 模型是临床研究神经病理性疼痛常用的动物模型之一。本研究表明，在大鼠结扎坐骨神经 1 周后，其患肢对热刺激、机械刺激敏感程度上升，具体表现为 TWT 缩短，50% MWT 降低并随着时间的推移有加重趋势。提示结扎大鼠坐骨神经可导致其产生痛觉过敏，与坐骨神经痛的临床症状一致。祖师麻为瑞香科植物，具有较强的抗炎、镇痛作用[7-8]，其制剂广泛用于类风湿、坐骨神经痛、跌打损伤等疾病的治疗[9-10]，但深入研究较少。本研究结果表明，祖师麻片可明显延长 CCI 模型大鼠患肢的 TWT、提高 50% MWT，显现出较强的抑制痛觉敏感的作用，与文献报道一致。

痛觉敏感是病理性疼痛的主要症状，而中枢敏化是产生痛觉敏感的主要机制。脊髓神经元的可塑性使神经细胞的兴奋性升高及痛觉的传导性提高，是痛觉中枢敏化的主要机制。MAPK 在受体间的信号传导过程中有着至关重要的作用，p38 MAPK 作为 MAPK 家族中重要的信号通路之一，近年来受到了广泛关注[11-12]。p38 MAPK 广泛存在于神经细胞和小胶质细胞中，可完成通路信息间的交流，可参与神经病理性疼痛的形成与维持。腺苷三磷酸（ATP adenosine triphosphate）是全身重要的供能物质，可以作为信号分子作用于小胶质细胞表面[13]。神经损伤产生后，小胶质细胞表面的 $P2X_4$ 受体上调[14]，使神经细胞 p38 MAPK 激活并表达增强，p38 MAPK 激活后可提高神经元的兴奋性，机体表现为疼痛感

增强[15]。

本研究表明，CCI 大鼠进行坐骨神经结扎后，脊髓背角的 $P2X_4$受体和 p38 MAPK 表达显著性增多，与 TWT、50% MWT 的结果一致。布洛芬可抑制脊髓背角小胶质细胞表面的 $P2X_4$受体激活，患侧脊髓背角 p38 MAPK 表达下调，阻断中枢敏化的形成[6]，与实验结果一致。祖师麻片可明显抑制 p38 MAPK 和 $P2X_4$受体在 CCI 大鼠患侧脊髓背角的表达，与给药后模型大鼠的痛阈提高变化一致。提示祖师麻片可有效抑制 CCI 模型大鼠脊髓背角的 $P2X_4$受体上调，进而导致 p38 MAPK 的表达下降，使脊髓背角神经细胞的兴奋性降低，调节痛觉信号传导，疼痛反应减轻，这可能是祖师麻在脊髓水平发挥镇痛作用的机制之一。

综上所述，祖师麻片可抑制结扎大鼠坐骨神经所致的痛觉敏感，其机制与抑制脊髓患侧背角中 $P2X_4$受体表达以及抑制 p38 MAPK 通路有关。

参考文献

[1] 严广斌. 神经病理性疼痛[J]. 中华关节外科杂志(电子版),2017,11(4):446.

[2] MERSKEY H. Pain terms:A list with definitions and notes on usage[J]. Pain,1979,6(3):249-252.

[3] BENNETT G J,XIE Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain,1988,33(1):87-107.

[4] 郑奇辉,王迎斌,刘伟,等. 梓醇对坐骨神经结扎模型神经病理性疼痛的影响[J]. 西部中医药,2018,31(5):11-13.

[5] 张天睿,张硕峰,宋敬怡,等. 祖师麻肠溶微丸对结扎坐骨神经所致痛觉敏感大鼠背根神经节 $P2X_4$ 受体及 p38MAPK 表达的影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(9):37-40.

[6] 张天睿. 祖师麻肠溶制剂的药效学研究[D]. 北京:北京中医药大学,2018.

[7] 白玮,张娇,叶潇. 祖师麻的研究进展[J]. 现代中医药,2017,37(5):117-120.

[8] 胡伊力格其,曹萨丽,林龙飞,等. LC-MS/MS 同时测定大鼠血浆中瑞香素、西瑞香素和瑞香新素及其药代动力学研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(10):1964-1970.

[9] 吕志阳,李月菲,杭嘉祥,等. 复方祖师麻软膏镇痛抗炎作用研究[J]. 亚太传统医药,2018,14(6):5-7.

[10] 程文豪,张天睿,李颖慧,等. 祖师麻肠溶制剂对佐剂性关节炎大鼠的抗炎与镇痛作用研究[J]. 上海中医药杂志,2019,53(1):107-111.

[11] 陈拓,王荣春,林仕彬,等. 抑制 p38 MAPK 对皮瓣缺血再灌注损伤过程中炎症因子、细胞凋亡的影响[J]. 海南医学院学报,2017,23(5):577-580.

[12] 陈建勇,王聪,王娟. MAPK 信号通路研究进展[J]. 中国医药科学,2011,1(8):32-34.

[13] SAWYNOK J. Adenosine and ATP receptors[J]. Handb Exp Pharmacol,2006,177(177):309-328.

[14] 刘超阳,刘清,王莎,等. P2X4 受体在慢性偏头痛大鼠三叉神经脊束尾核的表达及意义[J]. 中国疼痛医学杂志,2018,24(3):169-175.

[15] 王高霞,黄晓丽,刘晓红,等. 鞘内注射 MRS2211 对慢性坐骨神经结扎大鼠脊髓背角 P2X4 受体和 P38MAPK 表达的影响[J]. 神经解剖学杂志,2015,31(2):225-230.

(收稿日期：2019-08-06　编辑：田苗)