

doi:10.3969/j.issn.1006-9852.2023.05.003

• 论 著 •

葛根素通过抑制背根神经节 Nav1.7 上调治疗
神经根性疼痛 *张玮丽 唐 倩 邓 镇 赵元淑 钟 祎[△]
(广州医科大学基础医学院, 广州 511436)

摘 要 **目的:** 探究传统中药葛根素 (puerarin, PU) 对腰椎间盘突出症引起的神经根性疼痛的作用及机制。**方法:** 采用自体髓核 (nucleus pulposus, NP) 移植的方法复制大鼠腰椎间盘突出症的模型。实验一: 20 只大鼠用完全随机化分组法分成假手术组 (sham, $n=4$) 和 NP 组 ($n=16$), NP 组采用免疫荧光染色方法检测背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 中电压门控钠通道 Nav1.7 的表达, ELISA 法检测 DRG 和脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的含量; Western blot 方法检测 DRG 组织 TNF- α 的表达。实验二: 40 只大鼠分为五组 ($n=8$): sham 组; NP 移植组; NP + PU 组; NP + Veh 组; NP + PU + TNF- α 组, 对 NP 移植大鼠连续 7 天腹腔注射葛根素 (100 mg/kg, 每日 1 次) 观察镇痛效果; 在术后 0、3、5、7、14 天进行疼痛行为学检测, 机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT) 和热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL) 作为痛觉阈值检测指标; Western blot 方法检测 DRG 组织中 TNF- α 和磷酸化核转录因子- κ B (phosphorylated-nucleus factor- κ B, p-NF- κ B) 表达水平; 免疫荧光染色方法检测 Nav1.7 表达情况。**结果:** NP 移植组大鼠手术同侧 DRG 中 Nav1.7 表达上升, 同侧 DRG 组织和 CSF 中 TNF- α 含量显著增加; 葛根素明显缓解 NP 移植引起的单侧机械性痛觉过敏和热痛觉超敏; 葛根素降低 NP 移植组大鼠同侧 DRG 中 TNF- α 、p-NF- κ B (p-p65) 和 Nav1.7 的表达; 鞘内注射 TNF- α (0.3 ng, 每 6 小时 1 次, 持续 7 天) 阻断了葛根素的镇痛作用, 并抑制了葛根素引起的 Nav1.7 的降低。**结论:** 葛根素可通过抑制背根神经节 Nav1.7 上调治疗神经根性疼痛。

关键词 葛根素; 肿瘤坏死因子- α ; 背根神经节; 电压依赖性钠通道; 神经根性疼痛; 腰椎间盘突出症

Puerarin alleviates radicular pain by inhibiting Nav1.7 upregulation in the dorsal root ganglia *ZHANG Weili, TANG Qian, DENG Zhen, ZHAO Yuanshu, ZHONG Yi[△]

(School of Basic Medical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract **Objective:** To explore the role and mechanism of traditional Chinese medicine puerarin (PU) in radicular pain induced by lumbar disc herniation. **Methods:** Rat model of lumbar disc herniation was induced by autologous nucleus pulposus (NP) implantation. In experiment one, 20 rats were completely randomized grouped into sham group ($n=4$) and NP group ($n=16$), voltage gated sodium channel Nav1.7 expression was detected by immunofluorescence; Tumor necrosis factor- α (TNF- α) level in the dorsal root ganglia (DRG) and cerebrospinal fluid (CSF) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); The expression of TNF- α in DRG was measured by western blotting analysis. In experiment two, 40 rats were divided into 5 groups ($n=8$): sham group, NP group, NP + PU group, NP + Veh group, NP + PU + TNF- α group, puerarin was successively delivered for 7 days (ip, 100 mg/kg, qd); Pain thresholds were assessed by mechanical withdrawal threshold (MWT) and thermal withdrawal latency (TWL) on day 0, 3, 5, 7, 14 after surgery; The expression of TNF- α and p-NF- κ B (p-p65) in DRG was measured by western blotting analysis; Nav1.7 expression was detected by immunofluorescence. **Results:**

* 基金项目: 广东省普通高校特性创新项目 (2019KTSCX145)

[△] 通信作者 钟祎 victoria0720@126.com



Nav1.7 expression in the DRG was increased in rats with NP implantation; TNF- α level in the DRG and CSF was increased in rats with NP implantation; Puerarin alleviated mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by NP implantation; Puerarin reduced TNF- α , p-p65 and Nav1.7 expression in DRG of rats with NP; Intrathecal delivery of TNF- α (0.3 ng, q6 h, for 7 days) significantly obscured the effect of puerarin on Nav1.7 expression.

Conclusion: Puerarin alleviates radicular pain by inhibiting Nav1.7 upregulation in the DRG.

Keywords puerarin; tumor necrosis factor- α (TNF- α); dorsal root ganglia; voltage-gated sodium channel; radicular pain; lumbar disc herniation

腰椎间盘突出症 (lumbar disc herniation, LDH) 是临床常见疾病, 也是神经根性疼痛的主要病因。主要表现为单侧下肢的痛觉过敏, 痛觉超敏和自发性疼痛, 以及腿麻无力、腰部僵硬和活动受限, 严重者引起马尾神经受压、大小便失禁^[1]。长期的慢性疼痛不仅损害病人的身心健康, 也带来沉重的社会和经济负担, 深入研究神经根性疼痛的发病机制, 具有重要临床意义。

外周敏化是指背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 神经元上离子通道表达和功能的改变, 进而引起神经元兴奋性增加, 导致异常放电并产生过多的痛觉信号^[2], 外周敏化是神经根性疼痛发生的重要病理生理学机制。同行的研究及我们的预实验发现自体髓核 (nucleus pulposus, NP) 移植大鼠 DRG 上电压门控性钠通道 Nav1.7 表达增加^[3], 并且在神经损伤或者高血糖引起的慢性疼痛中, 均发现 DRG 中致炎细胞因子 TNF- α 上调是电压门控性钠通道表达及功能上调的重要原因^[4,5]。因此我们推断抑制 DRG 组织的炎症反应可以通过降低外周敏化治疗神经根性疼痛。目前临床治疗 LDH 的主要手段是通过外科手术摘除病变椎间盘, 但是手术费用较高并存在一定风险。本研究以神经炎症反应为切入点, 探究对神经炎症和外周敏化均有抑制作用的新药物, 以期治疗 LDH 提供新的实验室依据。

葛根素 (puerarin, PU) 是植物葛根中提取的一种药物, 广泛应用于高血压、冠心病、心梗等心血管疾病。近年来的研究发现葛根素对神经损伤和糖尿病引起的慢性疼痛有治疗作用^[6-8], 本课题组既往报道了腹腔注射葛根素明显降低 NP 移植大鼠脊髓 Toll-like receptor 4 (TLR4) 的表达, 抑制脊髓小胶质细胞的活化和致炎细胞因子的表达^[9,10], 这表明葛根素可通过抑制脊髓水平的神经炎症反应治疗神经根性疼痛, 葛根素是否可以通过抑制 DRG 水平的神经炎症反应降低外周敏化, 还值得深入研究。本研究采用自体髓核移植的方法构建大鼠 LDH 模型, 从外周神经炎症及外周敏化的角度, 探究葛根素缓解 LDH 诱导神经根性疼痛的发生机制。

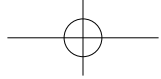
方 法

1. 动物

成年雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, 购于广东省实验动物中心 (合格证号: No. 44002100020691; No. 44002100021111; No. 44005800010307), 统一规范饲养在广州医科大学实验动物中心。所有动物实验依据国际疼痛学会的指导方针^[11], 并获得广州医科大学动物伦理委员会的批准 (伦理批号 GD2019-143)。实验一: 取 20 只大鼠用完全随机化分组法分成假手术组 (sham, $n=4$) 和 NP 组 ($n=16$), 其中 NP 组大鼠分别在术后 3 天、5 天、7 天、14 天 ($n=4$) 取出同侧 L₄ 和 L₅ DRG 和脑脊液, L₄ DRG 用于检测钠通道表达, L₅ DRG 和脑脊液用于检测 TNF- α 含量。实验二: 取 40 只大鼠用完全随机化分组法分为五组 ($n=8$): ① sham 组; ② NP 移植组; ③ NP + PU 组; ④ NP + Veh 组; ⑤ NP + PU + TNF- α 组, 在术后 0 天、3 天、5 天、7 天、14 天进行痛行为学检测, 第 14 天行为检测结束后, 每组取 4 只大鼠 DRG 检测 TNF- α 和 p-p65 含量, 另外 4 只大鼠取 DRG 检测钠通道表达。

2. 主要试剂

葛根素注射液 (麦克林生化科技有限公司, 货号 P816258, 中国) 经腹腔注射 100 mg(kg·d), 连续 7 天。大鼠重组 TNF- α (货号 510-RT) 购于 R&D Systems 公司 (美国), 多聚甲醛 (PFA, 货号 16005) 和 Triton X-100 (货号 X100) 购于 Sigma-Aldrich 公司 (美国)。大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (货号 EK0526) 购于博士德生物技术有限公司 (中国)。本实验用的一抗如下: 兔抗 TNF- α 抗体 (ab6671, Abcam, 美国), 兔抗 p-p65 抗体 (#3033, Cell Signaling Technology, 美国), 兔抗 GAPDH 抗体 (BA1054, 博士德, 中国), 兔抗 Nav1.7 抗体 (SCN9A, Alomone Labs, 以色列)。本实验用的二抗如下: HRP 偶联 IgG (BA1054, 博士德, 中国), Cy3 偶联 IgG (BA1031, 博士德, 中国)。



3. 方法

(1) 腰椎间盘突出症模型

实验一和二均采用大鼠自体髓核 (nucleus pulposus, NP) 移植方法复制腰椎间盘突出症模型^[12,13]。戊巴比妥钠麻醉后, 从L₄~L₅节段行半椎板切除术, 暴露L₅神经根, 用0.9%氯化钠注射液棉球保护手术面。大鼠改仰卧位, 从尾椎取出NP (5 mg), 立即转回俯卧位, 将NP轻置于暴露的L₅神经根上, 避免压迫。逐层缝合肌肉和皮肤。假手术 (sham) 组大鼠行同样的手术操作, 但NP不移植到神经根上。

(2) 鞘内置管

实验二: NP移植手术前2天进行鞘内置管用于持续给药^[14]。麻醉后将充满0.9%氯化钠注射液的无菌PE-10管 (Becton, Dickinson and Company, 美国) 从脊髓L₅~L₆椎间隙向头端插入到腰膨大位置, 外周端有脑脊液流出为插管成功标志。PE-10管外周端经皮下组织向头端推送, 藏于两耳间并烧熔封口。大鼠源性重组TNF- α 用PBS溶液稀释至0.3 ng/ μ l, TNF- α (每次10 μ l) 或者PBS溶液 (溶剂对照) 从外周端缓慢注入 (q6 h, 持续7天), 药物注射后再推注7 μ l 无菌0.9%氯化钠注射液保证药物进入蛛网膜下腔, 每次注射后烧熔封口。

(3) 机械性痛阈和热痛阈检测

实验二: 采用经典的up-down方法检测后肢机械刺激缩足反射阈值 (mechanical withdrawal threshold, MWT)^[15]。用von Frey Filaments (强度依次为: 0.41, 0.70, 1.20, 2.04, 3.63, 5.50, 8.51, 15.14 g) 垂直作用于足底6~8 s, 如果大鼠出现迅速的撤足或者舔舐足部, 视为阳性反应, 否则为阴性反应。从2.04 g强度开始测试, 如果出现阴性反应, 则用相邻的更强的刺激强度, 如果出现阳性反应, 则用相邻的更弱的刺激强度。

采用热平板 (7370, Ugo Basile, 意大利) 方法检测后肢热缩足反射潜伏期 (thermal withdrawal latency, TWL)^[16]。将热源置于大鼠足底, 如果大鼠出现迅速的撤足或者舔舐足部, 视为阳性反应。同一只大鼠, 同样温度下, 取3次TWL的平均值作为结果。术前3天, 每日检测MWT和TWL作为基础值对照, 行为测试的实验者不清楚对大鼠的分组情况。

(4) Western blot (WB)

实验一和二于大鼠麻醉后, 取出L₄~L₅ DRG, 迅速置于液氮中, 加入含蛋白酶抑制剂 (1:100, AR1182, 博士德, 中国) 和磷酸酶抑制剂 (1:100, AR1183, 博士德, 中国) 的Tris缓冲液 (15 mmol/L, pH 7.6) 中, 冰上匀浆并超声破碎。随后低温离心

(14,000 $\times$ g, 20 min) 取上清液分装冻存于-80 $^{\circ}$ C。

蛋白质定量 (bicinchoninic acid, BCA) 法检测标本蛋白浓度, SDS-PAGE电泳分离蛋白, 并转印到PVDF膜 (#1620264, Bio-Rad, 美国) 上。PVDF膜在室温封闭1 h后, 加入抗TNF- α 或p-p65或GAPDH的抗体4 $^{\circ}$ C孵育过夜。洗涤后加入HRP偶联的IgG常温孵育1 h, 再次洗涤后用超敏ECL试剂 (35055, Pierce, 美国) 检测免疫复合物。计算机辅助成像分析系统 (KONTRON IBAS 2.0, 德国) 计算条带灰度。

(5) 免疫荧光染色

实验一和二: 大鼠用0.9%氯化钠注射液灌注冲去血液, 再用4% PFA溶液 (溶于0.1 M磷酸盐缓冲液中, pH 7.4, 4 $^{\circ}$ C) 灌注固定。取出DRG组织, 继续后固定1 h, 随后转入30%蔗糖溶液脱水1天。用冰冻切片 (Leica CM1900, -20 $^{\circ}$ C) 将组织切成16 μ m薄片用于染色。

组织片用含3% 驴血清的0.3% Triton X-100溶液常温固定1 h, 再孵育Nav1.7抗体4 $^{\circ}$ C过夜, 洗涤后常温避光孵育Cy3偶联的IgG, 用荧光显微镜和CCD扫描相机 (Leica, 德国) 拍照。

(6) ELISA

实验一: 取DRG组织和脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF), DRG组织用预冷PBS溶液匀浆 (10 mg组织加入100 μ l PBS溶液) 并低温离心取上清液, 根据ELISA说明书, 在预包被抗体的96孔板中, 先后加入DRG上清液或者CSF反应1.5 h, 生物素标记抗体进行反应1 h。PBS洗去未结合的物质, 随后加入亲和素-过氧化物酶复合物反应0.5 h, 再次洗涤并依次加入TMB显色液和TMB终止液。450 nm波长下检测样本吸光度并制作标准曲线做参照。根据标准曲线计算组织中TNF- α 蛋白含量。

4. 统计学分析

所有实验数据用均数 $\pm$ 标准误 ($\bar{x}\pm SEM$) 表示并用GraphPad Prism 8.0软件分析。Western blot、免疫荧光和ELISA数据用单因素方差分析 (ANOVA) 统计。行为学测试数据、Western blot和免疫荧光数据中两组间的比较采用非配对t检验统计, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. NP移植大鼠DRG中Nav1.7表达增加, DRG和脑脊液中TNF- α 含量增加

免疫荧光结果显示与sham组相比, NP后3天、

5 天、7 天、14 天四个时间段，手术同侧 DRG 中 Nav1.7 阳性细胞百分比明显增加（见图 1A-F, NP vs. sham, $F(4,15) = 1782, P < 0.01$ ）；WB 结果显示：与 sham 组相比，NP 组大鼠在手术后各时间点，其手术同侧 DRG 组织中 TNF- α 含量均明显增加（见图 1G, NP vs. sham, $F(4,15) = 1211, P < 0.01$ ）；

ELISA 结果表明：与 sham 组相比，NP 组大鼠在手术后各时间点，其手术同侧 DRG 组织和 CSF 中 TNF- α 含量均明显增加（见图 1H, NP vs. sham, $F(4,15) = 373.5, P < 0.01$; $F(4,15) = 5.216, P < 0.05$ ）。表明 NP 移植上调手术同侧 DRG Nav1.7，同时引起显著的外周神经炎症反应。

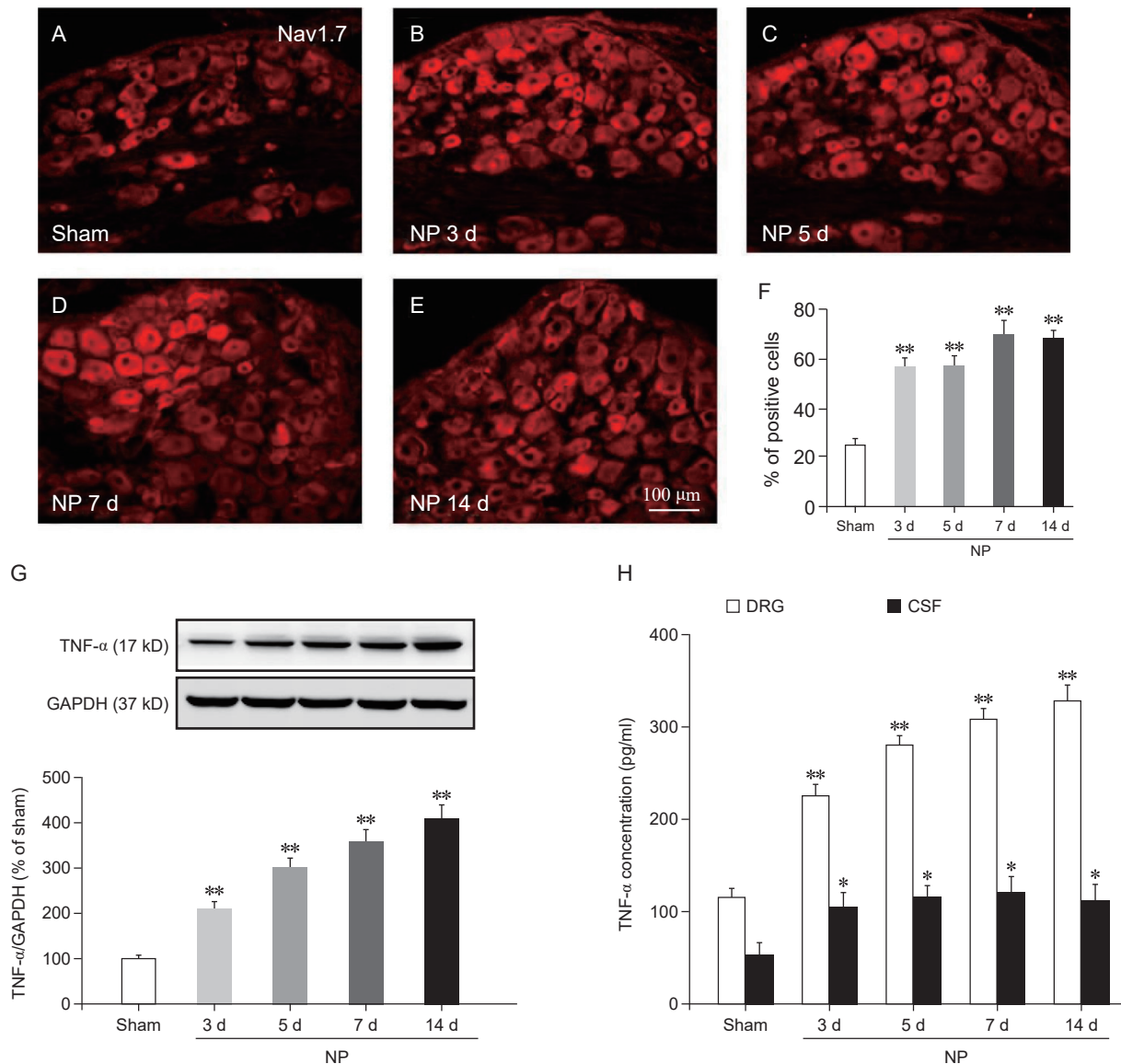


图 1 NP 移植后 DRG 中 Nav1.7 表达增加，DRG 和 CSF 中 TNF- α 蛋白含量增加 ($n = 4$) (A-F) 免疫荧光染色发现，与 sham 组相比，NP 移植后 3~14 天 DRG 中 Nav1.7 表达增加；Western blot (G) 和 ELISA 检测 (H) 均发现，与 sham 组相比，NP 移植后 3~14 天 DRG 组织和 CSF 中 TNF- α 蛋白表达明显增加 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ ，与 sham 组相比

Fig. 1 NP implantation increases Nav1.7 expression in DRG and increases TNF- α expression in both DRG and CSF ($n = 4$) (A-F) Immunofluorescence staining reveals that compared with sham group, Nav1.7 expression in DRG is increased in rats with NP implantation (group NP) from day 3 to day 14 after surgery; Western blotting (G) and ELISA (H) reveals that compared with group sham, TNF- α protein level is increased in DRG and CSF of rats in NP group from day 3 to day 14 after surgery.

$*P < 0.05$, $**P < 0.01$, compared with group sham.

2. 葛根素明显增加 NP 移植大鼠机械性和热痛觉阈值, 且外源性给予 TNF- α 可逆转葛根素的作用

检测大鼠后肢 MWT 和 TWL 评估大鼠痛行为。NP 移植组大鼠手术同侧 MWT 和 TWL 明显降低, 持续到术后 14 天 (见图 2, NP vs. sham, $t(df) = 44.92$ for MWT, $t(df) = 26.09$ for TWL, $P < 0.01$)。从术前 1 h 开始, 连续 7 天腹腔注射葛根素注射液 (100 mg/kg, 每日 1 次), 于给药后 1 h 进行行为学测试, 结果显示 PU 明显增加手术同侧后肢 MWT 和 TWL (见图 2, NP + PU vs. NP + Veh, $t(df) = 39.84$ for MWT, $t(df) = 15.69$ for TWL, $P < 0.01$)。效果可持续至术后 14 天; 给予葛根素的同时, 鞘内给予大鼠重组 TNF- α 明显逆转葛根素提高 MWT 和 TWL 的作用 (见图 2, NP + PU + TNF vs. NP + PU, $t(df) = 28.98$ for MWT, $t(df) = 13.77$ for TWL, $P < 0.01$)。表明葛根素可持续提高 NP 组大鼠痛觉阈值, 缓解机械性痛觉过敏和热痛觉超敏, 其镇痛效果可被 TNF- α 逆转。

3. 葛根素明显降低 NP 移植大鼠脊髓组织中 TNF- α 和 p-p65 蛋白表达

葛根素给药至术后 7 天, 于术后 14 天取 DRG 组织, 用 Western blot 方法检查 TNF- α 和 p-p65 蛋白水平, 与 sham 组相比, NP 组大鼠手术同侧 DRG 中 TNF- α 和 p-p65 表达明显增加 (见图 3, NP vs. sham, $t(df) = 22.36$, $t(df) = 22.33$, $P < 0.01$)。与溶剂对照组 (NP + Veh) 相比, 葛根素 (PU) 明显降低 TNF- α 和 p-p65 表达 (见图 3, NP + PU vs. NP + Veh, $t(df) = 14.19$, $t = 30.5$, $P < 0.01$)。

4. 葛根素明显抑制 NP 移植大鼠 DRG Nav1.7 表达, 且外源性给予 TNF- α 可逆转葛根素的作用

术后 14 天, 用免疫荧光染色方法检测不同组大鼠手术同侧 DRG 中 Nav1.7 的表达。与 sham 组相比, NP 组 Nav1.7 阳性细胞百分比明显增加 (见图 4A, B, F, NP vs. sham, $t = 12.82$, $P < 0.01$)。与溶剂对照组相比, PU 明显降低 Nav1.7 荧光阳性面积 (见图 4C, D, F, NP + PU vs. NP + Veh, $t(df) = 4.648$, $P < 0.01$)。给予 PU 的同时, 鞘内给予大鼠重组 TNF- α 可明显增加 Nav1.7 阳性细胞百分比 (见图 4C, E, F, NP + PU + TNF- α vs. NP + PU, $t = 9.322$, $P < 0.01$)。表明 PU 可通过抑制 DRG Nav1.7 上调治疗神经根性疼痛。

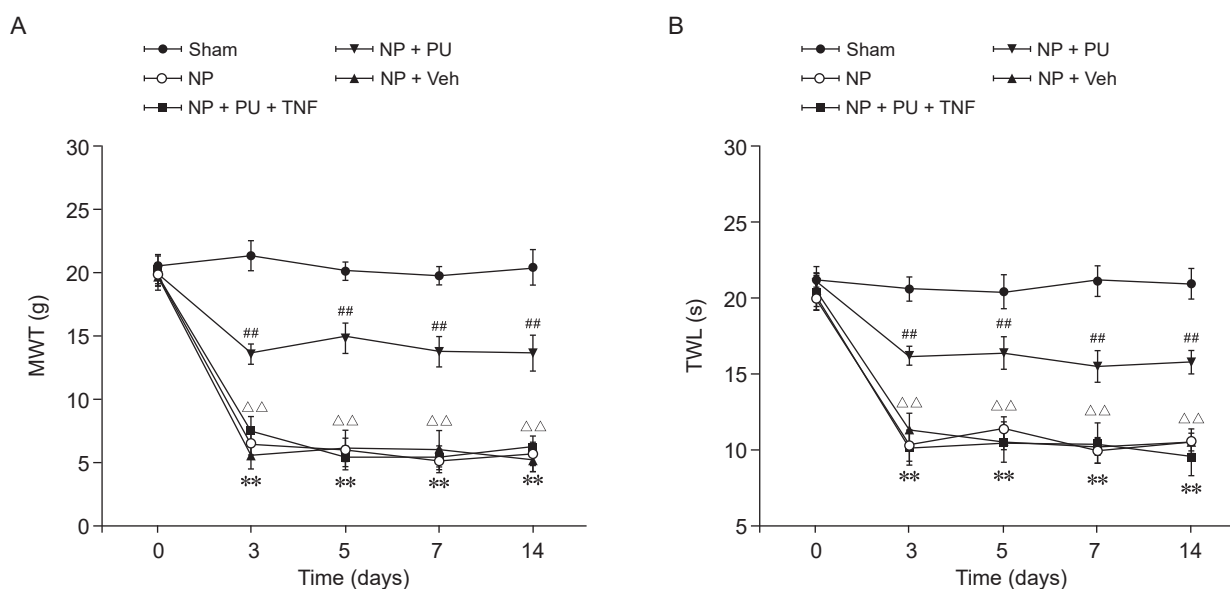


图 2 葛根素明显增加 NP 移植大鼠机械刺激缩足反射阈值(A)和热缩足反射潜伏期(B), TNF- α 可逆转葛根素的作用 ($n = 8$) ** $P < 0.01$, 与 sham 组相比, NP 组手术后 3~14 天大鼠后肢 MWT 和 TWL 明显下降; ## $P < 0.01$, 与溶剂对照组 (NP + Veh) 相比, 葛根素治疗组 (NP + PU) 大鼠的 MWT 和 TWL 明显增加; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与葛根素治疗组 (NP + PU) 相比, 葛根素与 TNF- α 同时给药组 (NP + PU + TNF) 大鼠的 MWT 和 TWL 明显降低

Fig. 2 Peurarin significantly increases MWT and TWL of rats with NP implantation which is obscured by TNF- α ($n = 8$) ** $P < 0.01$, compared with sham group, the mechanical MWT and TWL are decreased in rats of NP group from day 3 to day 14 after surgery; ## $P < 0.01$, compared with group NP + Veh, the MWT and TWL of group NP + PU are significantly increased; $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with group NP + PU, the MWT and TWL of group NP + PU + TNF are significantly decreased.

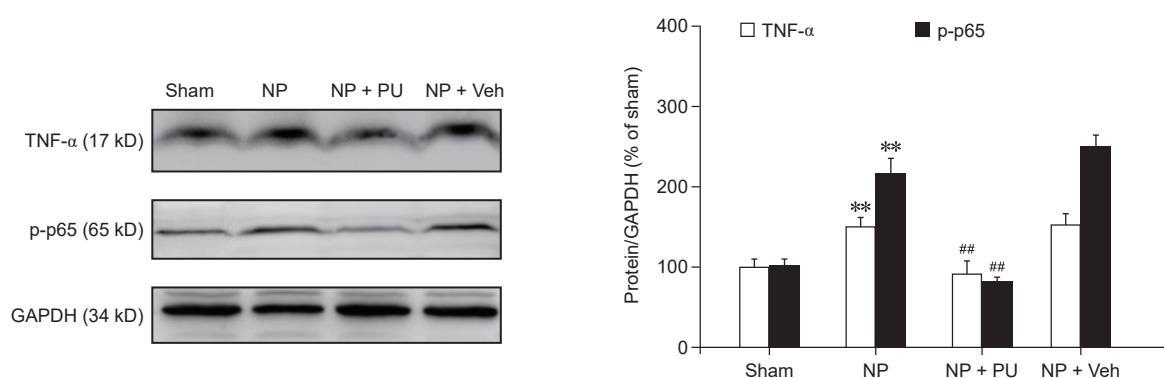


图3 葛根素明显降低 NP 移植大鼠 DRG 中 TNF-α 和 p-p65 表达 ($n = 4$)

** $P < 0.01$, 与 Sham 组相比, NP 移植 (NP 组) 大鼠 DRG 中 TNF-α 和 p-p65 表达明显上升; ## $P < 0.01$, 与溶剂对照组 (NP + Veh) 相比, 葛根素治疗组 (NP + PU) 组大鼠 DRG 中 TNF-α 和 p-p65 含量明显降低

Fig. 3 Peurarin significantly decreases TNF-α and p-p65 expression in DRG of rats with NP implantation ($n = 4$)

** $P < 0.01$, compared with group sham, TNF-α and p-p65 expression in DRG of rats with NP implantation (group NP) are significantly increased; ## $P < 0.01$, compared with group NP + Veh, in group NP + PU, TNF-α and p-p65 expression in DRG of rats in group NP + PU are significantly decreased.

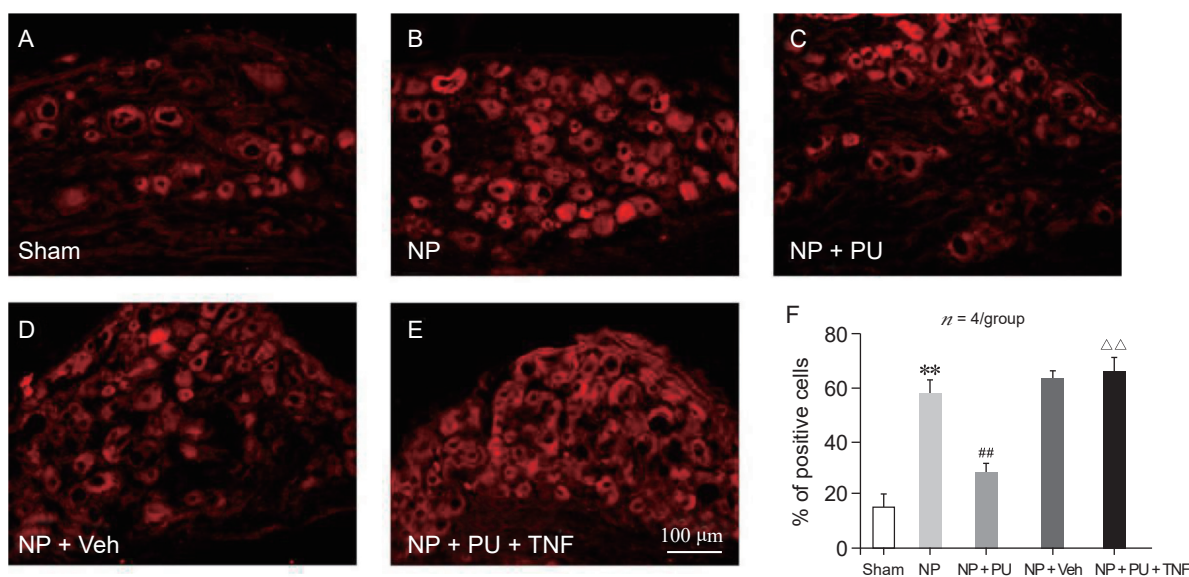


图4 葛根素抑制 NP 移植鼠 DRG Nav1.7 的上调, TNF-α 可阻断其作用 ($n = 4$)

** $P < 0.01$, 与 sham 组相比, NP 移植后 (NP 组) 大鼠 DRG 中 Nav1.7 表达明显上升 (A, B, F); ## $P < 0.01$, 与溶剂对照组 (NP + Veh) 相比, 葛根素治疗组 (NP + PU) 大鼠 DRG 中 Nav1.7 表达明显降低 (C, D, F); $\Delta\Delta P < 0.01$, 葛根素治疗组 (NP + PU) 相比, 葛根素治疗同时外源性给予 TNF-α (NP + PU + TNF) 大鼠的 DRG 中 Nav1.7 表达明显增加 (D-F)

Fig. 4 Peurarin inhibits Nav1.7 upregulation in DRG of rats with NP implantation which is obscured by TNF-α ($n = 4$)

** $P < 0.01$, compared with group sham, Nav1.7 expression in DRG of rats with NP implantation (group NP) are significantly increased (A, B, F); ## $P < 0.01$, compared with group NP + Veh, Nav1.7 expression in DRG of rats in group NP + PU are significantly decreased (C, D, F); $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with group NP + PU, co-administration of peurarin and TNF-α (group NP + PU + TNF) significantly increases Nav1.7 expression in DRG (D-F).

讨 论

腰椎间盘突出症是临床常见疾病,主要表现为单侧的,沿着坐骨神经方向的放射性腰疼和腿疼,临床也称为神经根性疼痛^[1]。目前临床最常见的治

疗手段为手术摘除病变椎间盘。相比药物治疗,手术治疗费用更高,并发症较多,甚至有 10% 的病人手术摘除病变椎间盘后还出现长期的神经根性疼痛症状,因此深入研究神经根性疼痛产生的机制具有重要意义。

外周敏化是慢性疼痛的重要病理生理学机制,是指初级传入神经元上离子通道的表达、运输及功能的改变,进而增加神经元的兴奋性,诱发神经元异常放电,向中枢传递过多的痛觉信号^[2,17]。电压门控性钠通道(VGSCs)是决定神经元兴奋性最重要的离子通道,神经根性疼痛模型中发现多种亚型的钠通道如Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7和Nav1.8的上调^[3,18,19]。Nav1.7通道失活慢,关闭慢^[20],从而对小而慢的去极化产生一种斜坡电流^[21];Nav1.7的表达和功能上调可降低痛阈,并对阈下刺激产生过激反应^[21],因此对神经元异常放电的发生至关重要。最近的研究发现Nav1.7基因SCN9A的功能丧失型突变是人类先天无痛症发生的重要基础^[22],提示Nav1.7的功能缺失直接影响伤害性感受器的功能,导致正常痛觉的丧失。既往对神经损伤和高血糖引起慢性疼痛的研究,发现DRG上致炎细胞因子TNF- α 表达增加是钠通道上调的重要原因^[4,5]。因此,我们推断抑制DRG中的神经炎症反应可能通过下调Nav1.7缓解神经根性疼痛。

葛根素是从天然植物葛根中提取的一种C-糖基化大豆异黄酮,具有抗炎、抗氧化和抗凋亡的作用^[6-8],广泛用于治疗心血管系统疾病。近年来实验室研究发现葛根素对神经损伤、高血糖引起的慢性疼痛有治疗作用^[6,7,23]。临床研究发现,葛根素配合手法治疗可明显缓解颈椎病人的疼痛和眩晕症状^[24],葛根素对于老年女性骨质疏松并股骨颈骨折手术病人也具有较好的镇痛作用^[25],葛根素注射液对糖尿病引起的肢体麻木、疼痛及感觉异常有明显缓解作用^[8,26]。我们课题组也发现并报道了腹腔注射葛根素可通过抑制脊髓水平的神经炎症反应,抑制小胶质细胞的活化缓解神经根性疼痛^[9,10]。在此基础上,我们进一步探究葛根素对DRG水平的炎症反应的作用,发现连续7天腹腔注射葛根素可明显降低NP移植大鼠DRG及脑脊液中致炎细胞因子TNF- α 含量,并降低下游信号分子p-p65,这表明葛根素对DRG水平的炎症反应同样具有抑制作用。进一步实验发现葛根素可降低NP移植大鼠神经元上Nav1.7的表达,且注射葛根素的同时,鞘内给予大鼠重组TNF- α 可明显增加Nav1.7的表达,因此葛根素可能通过抑制DRG的神经炎症,下调DRG Nav1.7的表达,缓解神经根性疼痛。

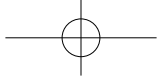
综上所述,本研究从在体水平证实葛根素可能通过抑制TNF- α /NF- κ B信号通路,降低DRG中Nav1.7的表达,抑制外周敏化,从而治疗神经根性疼痛。不足之处在于缺乏离体实验数据,后续研究

可以取DRG组织进行神经元的原代培养,在细胞水平再次验证葛根素及TNF- α /NF- κ B信号通路对Nav1.7表达的影响。

利益冲突声明:作者声明本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会疼痛学分会脊柱源性疼痛学组. 腰椎间盘突出症诊疗中国疼痛专家共识[J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(1):2-6.
- [2] Tibbs GR, Posson DJ, Goldstein PA. Voltage-gated ion channels in the PNS: novel therapies for neuropathic pain[J]. Trends Pharmacol Sci, 2016, 37(7):522-542.
- [3] Yan J, Zou K, Liu X, et al. Hyperexcitability and sensitization of sodium channels of dorsal root ganglion neurons in a rat model of lumbar disc herniation[J]. Eur Spine J, 2016, 25(1):177-185.
- [4] He XH, Zang Y, Chen X, et al. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1.3 and Nav1.8 in DRG neurons following motor fiber injury[J]. Pain, 2010, 151(2):266-279.
- [5] Huang YL, Zang Y, Zhou LJ, et al. The role of TNF- α /NF- κ B pathway on the up-regulation of voltage-gated sodium channel Nav1.7 in DRG neurons of rats with diabetic neuropathy[J]. Neurochem Int, 2014, 75:112-119.
- [6] Liu M, Liao K, Yu C, et al. Puerarin alleviates neuropathic pain by inhibiting neuroinflammation in spinal cord[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014:485927.
- [7] Zhao J, Luo D, Liang Z, et al. Plant natural product puerarin ameliorates depressive behaviors and chronic pain in mice with spared nerve injury (SNI)[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(4):2801-2812.
- [8] Wu J, Zhang X, Zhang B. Efficacy and safety of puerarin injection in treatment of diabetic peripheral neuropathy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(4):401-410.
- [9] 胡育铭, 朱丽蓉, 赵元淑, 等. 葛根素通过抑制脊髓胶质细胞活化和炎症反应治疗腰椎间盘突出症引起的神经根性疼痛[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7):1316-1322.
- [10] 陈璐, 朱丽蓉, 蒋珊, 等. 葛根素通过抑制小胶质细胞TLR4/NF- κ B介导的炎症反应治疗神经根性疼痛[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(4):667-672.
- [11] Zimmerman M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals[J]. Pain, 1983, 16(2):109-110.
- [12] Zhong Y, Huang Y, Hu Y, et al. SFRs/p38 pathway is involved in radicular pain by promoting spinal expression of pro-inflammatory cytokines in a rat model of



- lumbar disc herniation[J]. Spine, 2019, 44(19):E1112-E1121.
- [13] Kaneuchi Y, Sekiguchi M, Kameda T, *et al.* Temporal and spatial changes of μ -opioid receptors in the brain, spinal cord and dorsal root ganglion in a rat lumbar disc herniation model[J]. Spine, 2019, 44(2):85-95.
- [14] Zhu LR, Huang YL, Hu YM, *et al.* Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in radicular pain by encouraging spinal microglia activation and inflammatory response in a rat model of lumbar disc herniation[J]. Korean J Pain, 2021, 34(1):47-57.
- [15] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw[J]. J Neurosci Methods, 1994, 53:55-63.
- [16] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. Pain, 1988, 32(1):77-88.
- [17] Woolf CJ. The pathophysiology of peripheral neuropathic pain-abnormal peripheral input and abnormal central processing[J]. Acta Neurochir Suppl (Wien), 1993, 58:125-130.
- [18] Xie W, Tan ZY, Barbosa C, *et al.* Upregulation of the sodium channel Nav β 4 subunit and its contributions to mechanical hypersensitivity and neuronal hyperexcitability in a rat model of radicular pain induced by local dorsal root ganglion inflammation[J]. Pain, 2016, 157(4):879-891.
- [19] Terashima Y, Takebayashi T, Jimbo S, *et al.* Analgesic effects of calcitonin on radicular pain in male rats[J]. J Pain Res, 2019, 12:223-230.
- [20] Herzog RI, Cummins TR, Ghassemi F, *et al.* Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons[J]. J Physiol, 2003, 551(Pt 3):741-750.
- [21] Hameed S. Nav1.7 and Nav1.8: Role in the pathophysiology of pain[J]. Mol Pain, 2019, 15:1744806919858801.
- [22] 单文琪, 张江涛. 揭秘人类先天无痛症的病理基础——电压门控钠通道 Nav1.7 在人类痛觉中的功能作用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(3):161-168.
- [23] 谢恒韬, 段轶轩, 张照庆, 等. 葛根素对神经病理性疼痛模型大鼠机械/热痛觉超敏的影响 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(11):817-822.
- [24] 姜东辉, 张爱华, 许鲁平, 等. 葛根素配合手法治疗颈椎病 62 例临床疗效观察 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(10):39-41.
- [25] 许金秀, 孙玉敏, 许晓琳, 等. 葛根素对老年女性骨质疏松症并股骨颈骨折手术患者的镇痛效果观察 [J]. 山东医药, 2015, 55 (48):49-50.
- [26] 郑承红. 葛根素注射液治疗糖尿病性周围神经炎 31 例 [J]. 湖北中医杂志, 2001, 23(4):33.

· 消 息 ·

2023 年《中国疼痛医学杂志》征稿与征订

《中国疼痛医学杂志》是由中华人民共和国教育部主管，北京大学和中华医学会疼痛学分会共同主办的专业性学术期刊。报道有关疼痛基础研究和临床诊疗的综合性学术刊物。现已被中文核心期刊（北京大学图书馆），中国科技论文统计源期刊、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库（CSCD）来源期刊、世界期刊影响力指数（WJCI）报告（2022 科技版）等国内权威的文献检索系统收录。《中国疼痛医学杂志》诚邀您投稿、订阅。

投稿：来稿可在杂志官网在线投稿 <http://casp.ijournals.cn>，请署真实姓名、工作单位、职称，附单位介绍信（信中须注明未“一稿两投”、署名无争议、对文章内容的真实性负责、无泄密内容）。投稿时请注明通信作者、提供伦理审查批号及证明、基金资助信息，以及详细的通信地址、邮编、联系电话、E-mail 等。衷心希望《中国疼痛医学杂志》成为您了解疼痛医学发展和发表科研成果的平台之一。

订购：邮发代号：82-832，本刊为月刊，大 16 开本，80 页，每册定价 32.00 元，全年 12 期，共 384.00 元。欢迎在当地邮局订阅或直接联系编辑部订阅。

编辑部地址：北京市海淀区学院路 38 号，北京大学医学部《中国疼痛医学杂志》编辑部

杂志官网：<http://casp.ijournals.cn>

联系电话：010-82801712；010-82801705

电子邮箱：pain1712@126.com

联系人：赵磊

