

乌头汤缓解神经病理性疼痛的炎症网络调控机制研究

郭秋岩[#], 李玮婕[#], 王超, 曹人邴, 李泰贤, 毛霞, 王晓月,
郭敏群, 张彦琼^{*}, 林娜^{*}

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 痛痹要方乌头汤临床治疗神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 疗效确切, 但作用机制尚不完全清楚, 本研究旨在探究乌头汤缓解NP的炎症网络调控机制。前期基于脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 小鼠模型, 通过全基因表达谱分析发现SNL发病相关基因集及乌头汤干预SNL药效相关基因集。本研究中“疾病基因-药物效应基因”互作网络及通路富集分析结果表明, 乌头汤的镇痛网络靶标参与丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的富集显著性最高 ($P = 4.04E-12$), 其中AKT激酶、MAP激酶的激酶4 (MAP kinase kinase 4, MKK4)、终端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和转录因子AP-1 (JUN) 与NP发生、发展中具有重要意义的神经炎症密切相关。基于SNL大鼠模型的药效学实验结果表明, 乌头汤可显著升高SNL大鼠的机械痛阈值 ($P < 0.01$) 和冷痛阈值 ($P < 0.05$); 机制层面的验证结果表明, SNL大鼠术后脊髓组织中AKT、MKK4、JNK和JUN磷酸化蛋白的表达量均显著升高 ($P < 0.001$); 乌头汤可上调具有神经保护作用的AKT磷酸化蛋白的表达量 ($P < 0.001$), 并降低促进神经炎症的MKK4、JNK和JUN磷酸化蛋白的表达量 ($P < 0.01$)。上述结果表明, 乌头汤可有效缓解SNL大鼠的疼痛程度, 其作用机制可能是通过调节AKT-MKK4-JNK-JUN信号轴而缓解神经炎症。本研究丰富了经方乌头汤治疗痛痹的科学内涵, 也为基于NP发病机制的多靶点镇痛药物的研发提供了方法学示范。本研究中的动物实验获得中国中医科学院实验动物伦理委员会批准。

关键词: 乌头汤; 神经病理性疼痛; 神经炎症; 网络药理学; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)06-1054-08

Investigation on the inflammation network mechanisms of Wutou decoction acting on neuropathic pain

GUO Qiu-yan[#], LI Wei-jie[#], WANG Chao, CAO Ren-li, LI Tai-xian, MAO Xia,
WANG Xiao-yue, GUO Min-qun, ZHANG Yan-qiong^{*}, LIN Na^{*}

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: Wu-tou decoction (WTD) was originally recorded in the synopsis of the golden chamber and it had been widely used for the treatment of neuropathic pain (NP) with exact therapeutic efficacy. However, the underlying molecular mechanisms still remain unclarified. Thus, in this research, we aimed at clarifying the underlying molecular mechanisms of WTD against NP by combining network analysis and experimental validation based on the spinal nerve ligation (SNL) model. Firstly, the network analysis indicated that key targets of WTD were significantly involved in the MAPK signaling pathway ($P = 4.04E-12$) and four important components of

收稿日期: 2018-11-09; 修回日期: 2018-12-18.

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81630107); 国家留学基金资助 (201808110263); 中国中医科学院博士研究生创新人才培养基金项目资助 (CX201803).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel: 86-10-64014411-2869, E-mail: yqzhang@icmm.ac.cn; nlin@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1017

the above pathway, AKT kinase (AKT), MAP kinase kinase 4 (MKK4), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and transcription factor AP-1 (JUN) had been reported to play a vital role in neuroinflammation during the disease process of NP. Then, experimental validation results proved that WTD markedly reduce the severity of mechanical allodynia ($P<0.01$) and cold hypersensitivity ($P<0.05$) of SNL rats. In addition, Western blot results provided evidence that the phosphorylated protein expression levels of AKT, MKK4, JNK and JUN in the superficial lamina of spinal cord of SNL rats were markedly increased ($P<0.001$), and WTD could improve the phosphorylated protein expression level of AKT ($P<0.001$) which was reported to be nerve protective and attenuate the phosphorylated protein expression levels of MKK4, JNK and JUN ($P<0.01$) which were closely involved into neuroinflammation. In conclusion, this study indicated that WTD might exert anti-hyperalgesia action through the inhibition of neuroinflammation mediated by AKT-MKK4-JNK-JUN which belong to the MAPK signaling pathway. These findings also provided scientific evidences that WTD might be a promising candidate for NP. Animal experiments in this study were approved by the Ethics Committee of Experimental Animals of the China Academy of Chinese Medical Sciences.

Key words: Wu-tou decoction; neuropathic pain; neuroinflammation; network pharmacology; molecular mechanism

神经病理性疼痛 (neuropathic pain, NP) 是一种严重影响患者生存质量的慢性疾病, 在一般人群中的发病率为 6.9%~10%^[1]。NP 的发病机制尚未被完全阐述清楚, 近年提出的“神经炎症学说”认为胶质细胞活化诱发神经炎症因子释放, 导致神经元异常兴奋, 进而介导 NP^[2,3]。越来越多的证据表明, 长期不能平息的神经炎症反应通过激活胶质细胞、募集炎症因子等多种途径诱发神经系统疾病^[4,5]。小胶质细胞是中枢神经系统应对感染和刺激的第一反应细胞, 研究者发现, 激活状态的小胶质细胞通过启动 MAPK、NF κ B 等多条信号通路诱发神经炎症^[6,7]。此外, NP 相关的活化因子及其受体激活星形胶质细胞后可启动 MAPK 等信号通路, 进而分泌趋化因子、炎症因子; 同时, 它们通过调控细胞内特异性元件使星形胶质细胞持续敏化, 该过程在 NP 的慢性化中发挥重要作用^[8]。可见, 神经炎症在 NP 的发生、发展过程中具有重要作用。目前, NP 的主要治疗手段是药物干预, 临床一线用药加巴喷丁、普瑞巴林等通过阻断疼痛信号的传递在一定程度上可缓解疼痛程度, 但存在药物耐受、作用靶点单一、价格昂贵等局限性, 据统计仅 50% NP 患者可达到 30% 疼痛缓解程度^[9-11]。因此, 针对 NP 的发病机制中具有重要意义的神经炎症探寻治疗 NP 的镇痛药物具有必要性。

NP 属于中医“痹”范畴, 乌头汤始载于张仲景所著《金匱要略》, 是治疗痹证的经方之一。临床研究表明, 乌头汤可有效用于三叉神经痛、癌性疼痛等不同类型 NP 的治疗, 总有效率约为 80%^[12,13]。本课题组前期基于脊神经结扎 (spinal nerve ligation, SNL) 模型, 采用全基因组表达谱芯片检测技术, 分别获得 NP 疾病相关的基因表达谱和乌头汤干预 NP 发挥镇痛药效相关

的基因表达谱, 通路富集分析显示 NP 相关的基因主要调控神经炎症而乌头汤镇痛相关基因主要作用于神经炎症反应^[14]。本研究基于上述结果, 采用网络药理学方法开展“疾病基因-药物效应基因”互作网络分析, 并结合实验验证, 进一步探究乌头汤缓解 NP 的炎症网络调控机制。

材料与方法

全基因组表达谱芯片检测及差异表达基因筛选 采用 RNeasy micro kit (Cat#74004, 德国 QIAGEN 公司) 提取并纯化 RNA, 采用安捷伦生物分析仪 2100 (美国 Agilent Technologies 公司) 检测 RNA 的完整性, 使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司) 和安捷伦生物分析仪 2100 (美国 Agilent Technologies 公司) 检测 RNA 的浓度和纯度。应用全基因组表达谱芯片 (美国 Agilent Technologies 公司) 检测对照组、SNL 组及乌头汤组动物脊髓背角组织的全基因组表达谱。采用 R 软件 (版本 1.0.2, 奥地利 R Core Team 公司) 检测原始数据、计算差异基因的表达倍数及 t 检验, 筛选 $|\log_2\text{-fold change (FC)}|>0.5$ 、 $P<0.05$ 的基因分别为 NP 疾病相关基因 (SNL 组 vs 对照组) 和乌头汤镇痛效应基因 (乌头汤组 vs SNL 组)。

已知 NP 靶标的收集 分别从以下两个数据库收集已知 NP 靶标: DrugBank 数据库 (<http://www.drugbank.ca/>, 版本 5.0) 和 OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>, 最近更新时间 2014 年 10 月 31 日)。

网络构建与分析 基于 String 数据库 (<http://string-db.org/>, 版本 10.0) 进行网络构建, 选择结合分数高于所有结合分数中值的基因-基因相互作用进行下

一步研究,采用Navigator软件(版本2.2.1)进行网络可视化。网络中的节点代表基因,边代表基因之间的相互作用,根据节点的4个网络拓扑特征值(连接度、紧密度、介度和K-Core值)筛选在网络中具有重要意义的hub节点。

基因功能和通路富集分析 本研究从KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>,最近更新时间:2012年10月16日)中选择 $P < 0.05$ 的信号通路,基于DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>,版本6.7)进行通路富集分析。

实验动物 健康雄性SD大鼠36只,6~8周龄,体重(180 ± 20)g,清洁级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物许可证:SCXK(京)2016-0006。动物饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心,饲养条件为恒温(23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、恒湿(55 ± 5)%,光照/黑暗周期为12h,固体饲料饲养、期间自由饮水。本研究中的动物实验获得中国中医科学院实验动物伦理委员会批准,按照实验需求尽可能地减少动物只数并减轻动物因实验所致的痛苦。

实验药品、试剂及仪器 制川乌(*Aconitum carmichaelii* Debx.)、麻黄(*Ephedra sinica* Stapf)、黄芪[*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge.]、芍药(*Paeonia lactiflora* Pall.)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 购自北京华邈中药工程技术开发中心,经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定上述药材均合格。普瑞巴林胶囊(每粒75mg,辉瑞制药有限公司,国药准字J20100102);丙酮(北京化工厂,批号:20101223);Von frey hair疼痛测试仪(美国Stoeltingco公司);AKT磷酸化抗体(ab131443,1:1000)、JNK磷酸化抗体(ab124956,1:2000)、JUN磷酸化抗体(ab30620,1:1000)(Abcam公司);MKK4磷酸化抗体(Cell Signaling, #9155,1:1000)。

药品的制备 乌头汤的制备:按照原方比例称取药材(制川乌6g,麻黄、黄芪、白芍及炙甘草各9g),加入10倍量的水浸泡1h,煮沸后煎煮1.5h并收集煎出液,加8倍量的水待煮沸后继续煎煮1h,合并2次煎出液用纱布过滤,将上述煎液浓缩至 $0.75\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 备用。普瑞巴林的溶解:使用蒸馏水溶解至 $12.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

动物分组与给药 雄性SD大鼠36只,随机分为6个组($n=6$),组别设置为正常组(Con)、模型组(SNL)、乌头汤低剂量组(Low)、乌头汤中剂量组(Mid)、乌头汤高剂量组(High)和普瑞巴林组(PGB)。乌头汤的低、中、高剂量为 3.75 、 7.5 、 $15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别相当于1、2、4倍临床等效剂量,普瑞巴林的给药剂量为 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,约为4倍临床等效剂量^[15]。大鼠给药体积按照1mL/

100g,正常组和模型组灌服等体积蒸馏水,大鼠SNL手术3天后开始灌胃给药,连续给药3天。

SNL模型的构建 根据文献^[6]方法构建大鼠SNL模型,具体过程为将大鼠使用异氟烷麻醉后,动物放置在俯卧位,在显微镜下取出左L6椎体横突,然后小心剥离L4、L5脊神经,并用6-0丝线结扎L5脊神经。

疼痛检测方法 机械痛的检测方法:采用文献^[17]方法检测左足机械痛阈值,将大鼠静置于金属笼内30min后,用不同压力的von Frey丝(美国Stoelting公司)垂直刺激鼠足掌面,力度以von Frey丝轻微弯曲为准,持续5s或直至出现缩足反应。若出现缩足反应,记为阳性。采用up-and-down方法计算50%缩足反应阈值,每次测量维持3个周期,中间间隔5min,最后取平均值。冷痛阈值的检测方法:将大鼠置入铁丝笼中适应30min,用1mL注射器对准大鼠左侧足背中心给予0.05mL丙酮。阳性反应为大鼠接触丙酮后30s内出现迅速的抬足反射,记录30s内左足抬足反射的次数,每只重复3次求和,每组动物再取平均值。

组织取材 于最后一次疼痛阈值检测完毕后,使用戊巴比妥钠麻醉动物,并在显微镜下取患侧脊髓L5节段,冰PBS迅速清洗血污后,用铝铂纸包好放置于 -80°C 冰箱中保存备用。

统计学分析 采用SPSS(美国,版本15.0)进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 作为统计学具有显著性差异的标准。采用GraphPad Prism 5.0和Adobe Photoshop CS6软件制作图表。

结果

1 乌头汤干预SNL的关键网络靶标及其作用机制挖掘

前期,本项目组基于乌头汤给药和未给药处理的SNL模型动物的脊髓组织样本,开展全基因组表达谱芯片检测,分别获得SNL疾病相关基因集(SNL组vs对照组,共567个差异表达基因,其中,331个上调表达基因和236个下调表达基因)和乌头汤干预SNL药效相关基因集(乌头汤组vsSNL组,共442个差异表达基因,其中,171个上调表达基因和271个下调表达基因)^[14]。为进一步探索乌头汤干预SNL的作用机制,本研究基于SNL发病相关基因和乌头汤干预SNL药效相关基因的相互作用信息,建立“疾病基因-药物效应基因”互作网络,由592个节点和4066对相互作用组成。通过计算各节点的连接度、紧密度、介度和K-core值,选取4个拓扑特征值均大于其相应中位数的节点作为乌头汤干预SNL的候选关键网络靶标,共计170个基因。进一步,建立乌头汤镇痛候选网络靶标的直

接相互作用网络, 并基于其 GO 功能和 KEGG 通路信息的富集结果进行网络功能模块划分。如图 1 所示, 乌头汤的镇痛候选网络靶标主要参与丝裂原活化蛋白激酶信号通路 (mitogen-activated protein kinase, MAPK signaling pathway, $P = 4.04E-12$); 此外, 还参与趋化因子信号通路 (chemokine signaling pathway, $P = 7.43E-12$)、钙离子信号通路 (calcium signaling pathway, $P = 9.04E-12$)、受体酪氨酸蛋白激酶信号通路 (ErbB signaling pathway, $P = 4.99E-09$)、缝隙连接 (gap junction, $P = 5.79E-09$) 和细胞因子-细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction, $P = 2.89E-05$)。其中, MAPK 信号通路的药物候选网络靶标中包含 AKT-MKK4-JNK-JUN 信号轴, 上述 4 个分子在网络中具有拓扑特征重要性, 且已有文献报道, 上述分子在磷酸化后被激活, 参与神经炎症反应^[18,19], 而神经炎症在 NP 的发生、发展和转归中具有重要意义^[20-23]。接下来, 本研究拟基于 SNL 大鼠模型, 考察乌头汤对 AKT-MKK4-JNK-JUN 信号轴的调控作用。

2 乌头汤可显著升高 SNL 大鼠的机械痛阈值和冷痛阈值

本研究成功构建了 SNL 大鼠模型, 与正常组相比, SNL 大鼠的机械痛阈值显著降低 ($P < 0.01$)。乌头汤低、中、高剂量可不同程度地升高 SNL 大鼠的机械痛阈值, 其中高剂量药效与普瑞巴林无统计学差异。为观察乌头汤的药效作用特点, 第一天给药后检测不同时间点 (0.5、1、1.5、2 h) 各组动物的机械痛阈值, 发现大鼠灌胃乌头汤后, 1 h 后机械痛阈值升高最明显, 药效可以持续至少 2 h, 故后续机械痛的检测时间点为乌头汤给药后 1 h。此外, 与正常组相比, SNL 大鼠对丙酮所致冷刺激的反应次数明显增加; 与模型组相比, 乌头汤和普瑞巴林均可有效降低 SNL 大鼠对冷刺激的反应次数, 其中乌头汤中剂量和高剂量组具有统计

学意义。上述结果表明, 乌头汤对 SNL 大鼠镇痛药效确切, 且乌头汤高剂量的镇痛药效最佳 (图 2)。

3 乌头汤可调节 MAPK 信号通路中 AKT-MKK4-JNK-JUN 信号轴磷酸化蛋白的表达水平

为了考察乌头汤发挥镇痛作用的分子机制, 基于 SNL 大鼠患侧脊髓 L5 样本, 采用 Western blot 方法, 检测 AKT/MKK4/JNK/JUN 磷酸化蛋白的表达水平。根据文献报道, 上述指标磷酸化之后被激活并参与炎症反应^[24,25]。结果表明, 与 Con 相比, SNL 导致大鼠脊髓

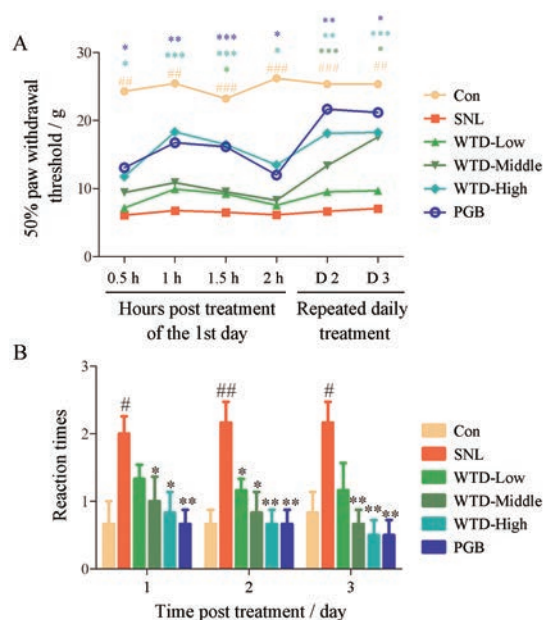


Figure 2 Anti-hyperalgesia effects of WTD against NP. Spinal nerve ligation (SNL) induced obvious mechanical allodynia and cold hyperalgesia of rats. WTD ($7.5-15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) markedly reversed SNL-induced mechanical allodynia (A) and cold hyperalgesia (B), the anti-hyperalgesia effects of high dosage of WTD ($15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) were similar to that of pregabalin (PGB, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, *p.o.*). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs control group (Con); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SNL group

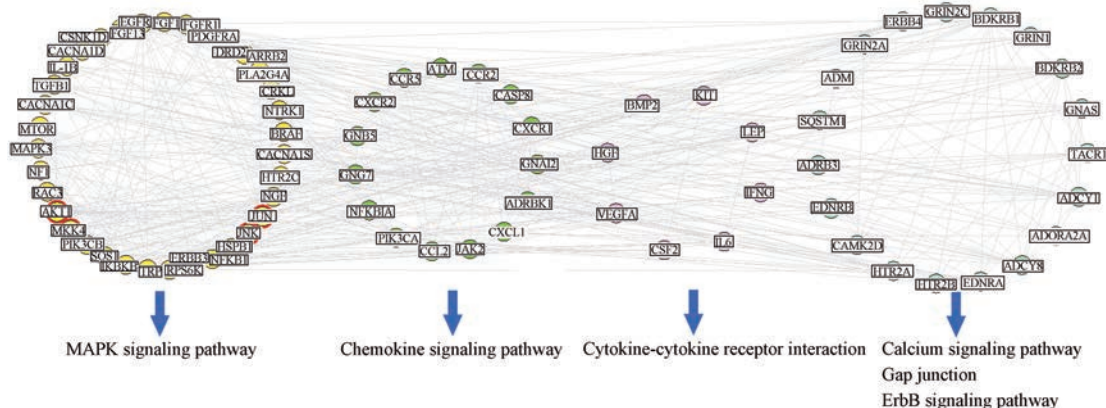


Figure 1 Interaction network of candidate targets of Wu-tou decoction (WTD) acting on neuropathic pain (NP), and the involved pathways by these target genes

组织中具有神经保护作用的AKT磷酸化蛋白(pAKT)的表达水平升高,乌头汤给药后可进一步升高该因子的表达水平;与Con相比,SNL导致大鼠脊髓组织中MKK4、JNK、JUN磷酸化蛋白(pMKK4、pJNK、pJUN)的表达水平异常升高,乌头汤给药后可显著下调上述分子磷酸化蛋白的表达水平(图3)。

讨论

中药复方具有多成分、多靶点、多途径发挥作用的特点,而网络药理学从系统的角度揭示不同中药及其化学成分之间的相互作用,近年来,被广泛而有效地用于中药复方作用机制的研究^[26-29]。本项目组基于前期全基因组表达谱芯片检测结果获取的SNL疾病相关基因集及乌头汤干预SNL药效相关基因集,进一步开展网络药理学分析,并发现乌头汤的镇痛网络靶标参与MAPK信号通路的富集显著性最高,根据网络拓扑特征值筛选出在“疾病基因-药物效应基因”互作网络中具有重要意义的4个分子,分别是AKT、MKK4、JNK和JUN。文献表明,上述分子与NP发生、发展中具有重要意义的神经炎症密切相关,因此,本研究选择AKT-MKK4-JNK-JUN信号轴作为后续机制研究的对象。基于SNL模型的药效学结果表明,乌头汤可以显著提高SNL大鼠的机械痛阈值和冷痛阈值,其中高剂量即4倍临床等效剂量的镇痛药效最佳。乌头汤中君药制川乌温经散寒、通痹止痛;臣药麻黄发汗宣表、散寒止痛;佐药黄芪固表敛汗、补中益气;佐使药白芍、甘草

酸甘化阴、缓急止痛,全方配伍精妙,共奏温经散寒,除湿止痛之功效^[30]。药理研究表明,乌头汤可有效缓解炎症的严重程度,显著降低多种与炎症密切相关的因子表达水平如白介素-1 β 、辣椒素受体-V1等^[31-33]。本研究中采用的阳性对照药为临床一线镇痛药物普瑞巴林,用量为临床4倍等效剂量,乌头汤高剂量组也为4倍临床等效剂量,药效学实验结果表明,二者的镇痛药效无显著性差异。在药物安全性方面,临床研究发现,普瑞巴林在使用过程中出现眩晕、嗜睡口干、周围性水肿、视力模糊、体重增加和注意力难以集中等不良反应,且呈剂量相关^[34],此外,普瑞巴林有肝毒性的个案报道^[35]。本课题组前期对乌头汤的不良反应进行评估,未发现乌头汤有药物耐受性、胃肠道反应及其他毒性,也未发现有动物体重和协调功能方面的影响变化^[33]。因此,痛痹要方乌头汤不仅具有多成分、多途径、多靶点作用于NP发生、发展过程中重要病理环节的特点,在药物安全性方面还具有一定的优势。

本研究根据网络拓扑特征的重要性筛选出乌头汤镇痛的关键候选靶标AKT-MKK4-JNK-JUN,上述4个分子是MAPK信号通路的重要成员分子MAPK信号通路的重要组成部分。MAPK是一个转导细胞外刺激到细胞内翻译后引起转录反应的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,包括p38、JNK和ERK。研究表明,MAPK信号通路与NP密切相关,NP大鼠鞘内注射MAPK信号通路的抑制剂(p38抑制剂、JNK抑制剂和ERK抑制剂)之后,可以部分降低模型诱发的机械性痛觉异常,

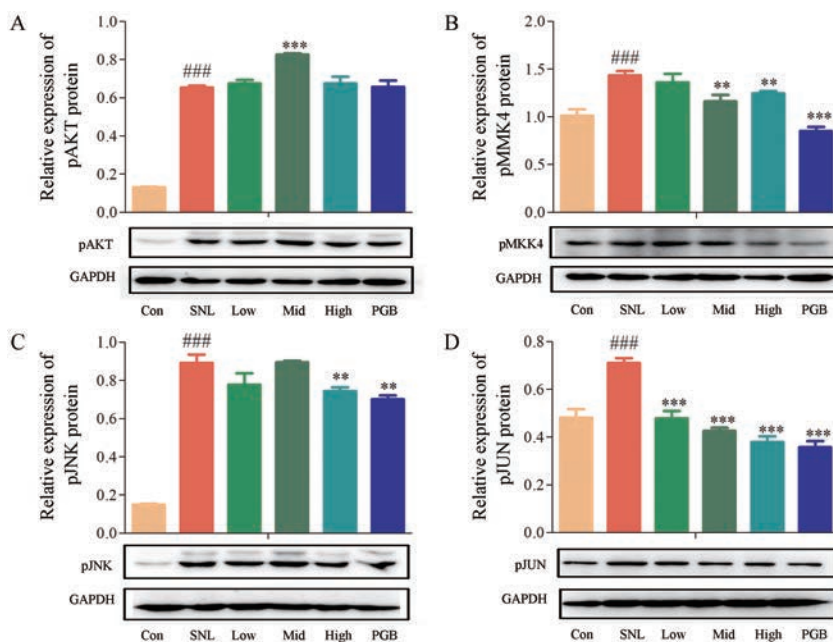


Figure 3 Regulation effects of WTD acting on MAPK signaling pathway. SNL induced increment of pAKT (A); SNL resulted in the upregulation of pMKK4 (B), pJNK (C) and pJUN (D), WTD significantly reduced their expression levels. $n = 6, \bar{x} \pm s$. ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs SNL group

并显著下调 MAPK 家族成员的蛋白和 mRNA 表达水平^[36]。蛋白水平的检测结果表明, 乌头汤可以矫正 SNL 大鼠患侧脊髓 L5 中上述 4 个分子蛋白表达水平的异常表达。其中, AKT 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 包括 AKT1/AKT2/AKT3 三种亚型, 主要参与调节细胞生长、增殖和血管再生等。研究表明, AKT 磷酸化 (pAKT) 可抑制双重特异性丝裂原活化蛋白激酶激酶 4 (MKK4) 磷酸化蛋白的表达水平^[18]。神经损伤发生时, 神经组织中 pAKT 的蛋白和 mRNA 表达水平均升高, 发挥神经保护作用; 给予神经保护作用的药物之后 pAKT 蛋白表达水平进一步显著升高^[37]。本研究同样发现 SNL 大鼠脊髓 L5 组织中 pAKT 表达水平升高, 乌头汤给药后 pAKT 的表达水平显著增加, 该结果与文献相符。研究表明, MKK4 的过度磷酸化会升高下游 JNK (应激活化蛋白激酶) 和 JUN (转录因子 AP-1) 磷酸化蛋白的表达水平, 伴随 pJUN 的靶基因 mRNA 表达水平的上调, 进而导致神经系统的疾病^[25]。MKK4-JNK 可被致炎因子、物理或者化学压力以及凋亡信号激活, 在非炎症状态下存在于细胞质中, 在炎症因子刺激后的滑膜成纤维细胞中 JNK 迁移到细胞核从而功能性地激活磷酸化状态的 JUN^[38-40]。此外, NP 状态下 JNK 的长期持续激活并可能参与星形胶质细胞中的信号传导^[41-44]。本研究发现, NP 大鼠脊髓 L5 组织中神经炎症密切相关的 MKK4、JNK、JUN 磷酸化蛋白的表达量显著升高, 痛痹要方乌头汤给药后明显降低了上述 3 种磷酸化蛋白的表达水平, 提示痛痹要方乌头汤通过调控 AKT-MKK4-JNK-JUN 信号轴抑制神经炎症进而发挥镇痛作用 (图 4)。

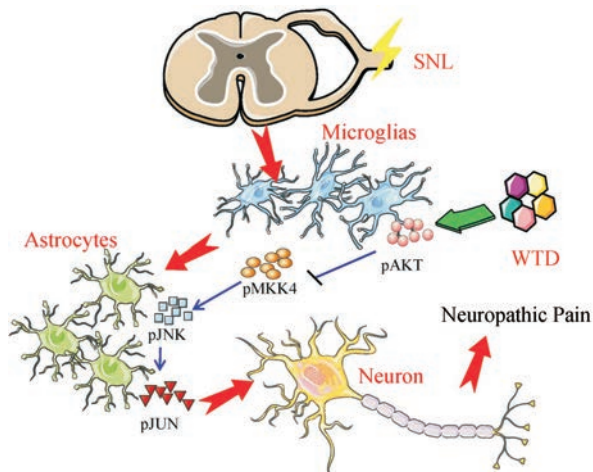


Figure 4 Simplified schematic illustration of anti-hyperalgesia mechanisms of WTD acting on NP. In the spinal tissue of SNL rats, the protein expression levels of pMKK4/pJNK/pJUN were increased, however, WTD could reduce the protein expression levels of them through increasing the protein expression level of pAKT

综上所述, 本研究通过 SNL 大鼠模型证明了乌头汤可有效缓解 NP 症状, 并采用全基因表达谱和网络药理学分析加上实验验证的方法, 初步揭示了其通过调节 AKT-MKK4-JNK-JUN 信号轴而发挥镇痛抗炎作用的机制。相关研究结果将有利于丰富痛痹要方乌头汤开痹镇痛功效的科学内涵, 也为针对 NP 发病机制的多靶点镇痛药物的研发提供方法学参考。针对本研究存在的一些不足, 课题组目前正在开展以下两方面工作, 一是研究乌头汤所含活性成分的暴露特征、血药浓度和靶靶浓度, 另外是探讨乌头汤活性成分不同配比对不同靶标的调控作用, 以便明确其药效物质, 从分子层面揭示复方的作用机制。

References

- [1] Van HO, Austin SK, Khan RA, et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies [J]. *Pain*, 2014, 155: 654-662.
- [2] Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, et al. Neuropathic pain [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 1-45.
- [3] Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal - glial interactions, and central processing of neuropathic pain [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126: 56-68.
- [4] Skaper SD, Facci L, Zusso M, et al. An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 1-26.
- [5] Qiu AW, Liu Z, Guo J, et al. Relationship between neuroinflammation and neurodegenerative diseases [J]. *Prog Physiol Sci (生理科学进展)*, 2011, 42: 353-358.
- [6] Wu HG, Gao Z, Luo FW, et al. Signaling pathways associated with neuroinflammation in microglia [J]. *Curr Immunol (现代免疫学)*, 2014, 34: 501-505, 496.
- [7] Skaper SD, Facci L. Mast cell - glia axis in neuroinflammation and therapeutic potential of the anandamide congener palmitoylethanolamide [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, 367: 3312-3325.
- [8] Cao RL, Yuan B, Gu YL, et al. Research progress on molecular mechanism of astrocyte-mediated neuroinflammation regulating neuropathic pain and the intervention of traditional Chinese medicine [J]. *E J Transl Med (转化医学电子杂志)*, 2018, 9: 20-25.
- [9] Gao YJ, Zhang ZJ, Cao DL. Chemokine mediated neuroinflammatory response and neuropathic pain [J]. *Chin J Cell Biol (中国细胞生物学学报)*, 2014, 36: 297-307.
- [10] Hurley RW, Adams MC, Benzon HT. Neuropathic pain: treatment guidelines and updates [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2013, 26: 580-587.
- [11] Guo QY, Zhang YQ, Lin N. Research progress on mechanism of Chinese medicine acting on neuropathic pain [J]. *E J Transl Med (转化医学电子杂志)*, 2017, 4: 1-6.

- [12] Bai GH, Zhang JH. Clinical observation of 28 cases of trigeminal neuralgia treated with modified Wu tou Decoction [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med (现代中西医结合杂志), 2003, 4: 385.
- [13] Zhou H, He XY, Zou QF. Clinical observation of 48 cases of metastatic bone cancer pain treated by Wu tou Decoction [J]. J Sichuan Tradit Chin Med (四川中医), 2013, 31: 92-93.
- [14] Zhang YQ, Wang Chao, Guo QY, et al. Molecular mechanisms of the analgesic action of Wu-tou Decoction on neuropathic pain in mice revealed using microarray and network analysis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39: 988-997.
- [15] Le CC, Castagné V. Face-to-face comparison of the predictive validity of two models of neuropathic pain in the rat: analgesic activity of pregabalin, tramadol and duloxetine [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 735: 17-25.
- [16] Kim S, Chung J. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat [J]. Pain, 1992, 50: 355-363.
- [17] Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw [J]. J Neurosci Meth, 1994, 53: 55-63.
- [18] Wang R, Zhang QG, Han D. Inhibition of MLK3-MKK4 / 7-JNK1/2 pathway by Akt1 in exogenous estrogen-induced neuroprotection against transient global cerebral ischemia by a non-genomic mechanism in male rats [J]. J Neurochem, 2006, 99: 1543-1554.
- [19] Ji RR, Suter MR. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain [J]. Mol Pain, 2007, 3: 33.
- [20] Ellis A, Bennett DL. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain [J]. Br J Anaesth, 2013, 111: 26-37.
- [21] Yu HM, Wang Q, Sun WB. Silencing of FKBP51 alleviates the mechanical pain threshold, inhibits DRG inflammatory factors and pain mediators through the NF- κ B signaling pathway [J]. Gene, 2017, 627: 169-175.
- [22] Leung L, Cahill CM. TNF- α and neuropathic pain - a review [J]. J Neuroinflammation, 2010, 7: 27.
- [23] Nakanishi M, Nakae A, Kishida Y. Go-sha-jinki-Gan (GJG) ameliorates allodynia in chronic constriction injury-model mice *via* suppression of TNF- α expression in the spinal cord [J]. Mol Pain, 2016. DOI:10.1177/1744806916656382.
- [24] Calvo M, Zhu N, Grist J, et al. Following nerve injury neuregulin-1 drives microglial proliferation and neuropathic pain *via* the MEK/ERK pathway [J]. Glia, 2011, 59: 554-568.
- [25] Chen CY, Weng YH, Chien KY, et al. (G2019S) LRRK2 activates MKK4-JNK pathway and causes degeneration of SN dopaminergic neurons in a transgenic mouse model of PD [J]. Cell Death Differ, 2012, 19: 1623-1633.
- [26] Xu HY, Peng XJ, Chen YB, et al. Exploration of "principle-recipe-composition-target-activity" association of Bupleuri Radix and Scutellariae Radix drug pair for diabetes treatment based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1414-1421.
- [27] Li JL, Liang Hui, Cai SZ, et al. Mechanism of detoxification of Chebulae Fructus against Aconiti kusnezoffii radix toxicity based on network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1670-1679.
- [28] Chai X, Meng YK, Bai ZF, et al. Mechanism of anti-hepatitis B virus activity of tonkinensis based on biological targets network [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 396-402.
- [29] Li WJ, Lu JQ, Mao X, et al. A comparative study on the mechanisms of two classical herbal formulae for rheumatoid arthritis applying cold and heat patterns based on target network [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1387-1397.
- [30] Wang DH, Liu CF, Tan SF, et al. Analgesic effect of Wutou Decoction on rats and its preliminary mechanism [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 109-112.
- [31] He LH, Liu CF, Sun CC, et al. Wu-Tou Decoction inhibits angiogenesis in experimental arthritis by targeting VEGFR2 signaling pathway [J]. Rejuven Res, 2018, 21: 442-455.
- [32] Mao ZY, Xu QH, Zhu CY, et al. Mechanism of Wutoutang in alleviating neuropathic pain by improving damages of descending inhibitory system [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 82-87.
- [33] Wang C, Liu C, Wan H, et al. Wu-tou decoction inhibits chronic inflammatory pain in mice: participation of TRPV1 and TRPA1 ion channels [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 328707.
- [34] Chen BQ, Li CW, Shi YP, et al. Pharmacological effects and clinical evaluation of pregabalin [J]. Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志), 2010, 29: 11-14.
- [35] Toth C. Pregabalin: latest safety evidence and clinical implications for the management of neuropathic pain [J]. Ther Adv Drug Saf, 2014, 5: 38-56.
- [36] Qu Y, Jia L, Zhang X, et al. MAPK pathways are involved in neuropathic pain in rats with chronic compression of the dorsal root ganglion [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 6153215.
- [37] Liu BN, Han BX, Liu F. Neuroprotective effect of pAkt and HIF-1 on ischemia rats [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014, 7: 221-225.
- [38] Hietakangas V, Elo I, Rosenström H. Activation of the MKK4-JNK pathway during erythroid differentiation of K562 cells is inhibited by the heat shock factor 2- β isoform [J]. FEBS Lett, 2001, 505: 168-172.
- [39] Yamasaki T, Kawasaki H, Nishina H. Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain [J]. J Signal Transduct, 2012, 2012: 459265.
- [40] Sundarajan M, Boyle DL, Chabaud-Riou M, et al. Expression of the MAPK kinases MKK-4 and MKK-7 in rheumatoid arthritis and their role as key regulators of JNK [J]. Arthritis Rheum,

- 2003, 48: 2450-2460.
- [41] Sanna MD, Stark H, Lucarini L, et al. Histamine H4 receptor activation alleviates neuropathic pain through differential regulation of ERK, JNK, and P38 MAPK phosphorylation [J]. *Pain*, 2015, 156: 2492-2504.
- [42] Cao J, Wang JS, Ren XH, et al. Spinal sample showing p-JNK and P38 associated with the pain signaling transduction of glial cell in neuropathic pain [J]. *Spinal Cord*, 2015, 53: 92-97.
- [43] Mei XP, Zhang H, Wang W, et al. Inhibition of spinal astrocytic c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation correlates with the analgesic effects of ketamine in neuropathic pain [J]. *J Neuroinflammation*, 2011, 8: 6.
- [44] Zhuang ZY, Wen YR, Zhang DR, et al. A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance [J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 3551-3560.