

◆ 实验研究 ◆

葛根素通过mTOR信号通路抑制小胶质细胞活化治疗慢性术后痛实验研究

陆培春, 潘鹏

昆山市中医医院麻醉科, 江苏 昆山 215300

[摘要] 目的: 基于mTOR信号通路探究葛根素对慢性术后痛的影响及其作用机制。方法: 50只大鼠随机分成对照组、假手术组、模型组、葛根素组和抑制剂组, 采用大鼠皮肤/肌肉切口牵拉(SMIR)的慢性疼痛模型, 葛根素组连续7d腹腔注射葛根素[100 mg/(kg·d)], 抑制剂组连续7d腹腔注射雷帕霉素[1 mg/(kg·d)], 观察镇痛效果。采用机械性刺激缩爪阈值(MWT)作为痛阈检测指标检测各组大鼠痛阈变化。取各组大鼠第7天的脊髓标本, 用Western blot方法检测脊髓组织mTOR、p-mTOR的蛋白水平。免疫荧光染色法探究mTOR在脊髓细胞的定位及观察脊髓背角小胶质细胞的激活情况。结果: 葛根素、雷帕霉素可以缓解SMIR引起的痛觉过敏, 葛根素对脊髓组织中mTOR的表达无影响, 但降低了脊髓组织中p-mTOR的蛋白表达水平, mTOR在脊髓背角与小胶质细胞特异性标记物共定位, 葛根素、雷帕霉素可以抑制脊髓小胶质细胞的激活。结论: 葛根素可通过抑制mTOR的磷酸化减轻小胶质细胞的激活治疗慢性术后痛。

[关键词] 慢性术后痛; 葛根素; mTOR信号通路; 小胶质细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 09-0001-06

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.09.001

Experimental Study of Puerarin Inhibiting Microglia Activation Through mTOR Signal Pathway in the Treatment of Chronic Postoperative Pain

LU Peichun, PAN Peng

Abstract: **Objective:** To explore the effect of puerarin on chronic postoperative pain and its mechanism based on mTOR signal pathway. **Methods:** Fifty rats were randomly divided into control group, sham-operation group, model group, puerarin group and inhibitor group. The chronic pain model of skin/muscle incision and retraction (SMIR) was used in rats. Puerarin group was injected intraperitoneally with puerarin [100 mg/(kg · d)] for 7 consecutive days, and inhibitor group was injected intraperitoneally with rapamycin [1 mg/(kg · d)] for 7 consecutive days, and the analgesic effect was observed. The change of pain threshold of rats in each group was detected by mechanical withdrawal threshold (MWT). The spinal cord samples of rats in each group on the seventh day were taken, and the protein levels of mTOR and p-mTOR in spinal cord tissue were detected by Western blot. Immunofluorescence staining was used to investigate the location of mTOR in spinal cord cells and observe the activation of microglia in the dorsal horn of the spinal cord. **Results:** Puerarin and rapamycin can alleviate the hyperalgesia caused by SMIR. Puerarin has no effect on the expression of mTOR in the spinal cord tissue, but reduces the protein expression

[收稿日期] 2022-12-10

[修回日期] 2023-02-18

[基金项目] 苏州市科技计划指导项目(SKJYD2021020); 昆山市社会发展科技专项项目(KSF202140); 昆山市社会发展科技专项项目(KSF202137); 昆山市中医医院院内青年基金项目(2020QNJJ08)

[作者简介] 陆培春(1994-), 男, 住院医师, E-mail: lupeichina@163.com。

[通信作者] 潘鹏(1984-), 男, 主治医师, E-mail: 791020072@qq.com。

level of p-mTOR in the spinal cord tissue. mTOR is co-located with microglia specific markers in the dorsal horn of the spinal cord. Puerarin and rapamycin can inhibit the activation of microglia in the spinal cord.

Conclusion: Puerarin can alleviate the activation of microglia by inhibiting the phosphorylation of mTOR to treat chronic postoperative pain.

Keywords: Chronic postoperative pain; Puerarin; mTOR signal pathway; Microglia

慢性术后疼痛已被描述为一个主要的公共问题^[1], 患病率在 5%~85%^[2], 该比率取决于手术类型和测量工具^[3]。但目前来看, 慢性术后疼痛的管理, 仍无法得到满意的效果, 越来越多的工作正在努力探索新的潜在目标或镇痛策略。中枢神经系统的胶质细胞发生表型和功能的改变, 导致了慢性痛的产生和发展^[4]。小胶质细胞(MG)活化后具有 M1 和 M2 两种表型, 分别有促炎、抑炎不同的功能^[5]。但通过调节 MG 表型转化, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路可发挥其潜在的抑制中枢炎症反应的作用^[6]。葛根素是葛根的主要成分, 已被证明在多种疾病中有效抑制促炎细胞因子的产生和(或)胶质细胞的激活^[7-8]。笔者推测葛根素可以通过 mTOR 抑制 MG 活化, 本研究旨在通过建立慢性术后疼痛模型来研究葛根素对慢性疼痛的作用及其相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由南通大学实验动物中心提供, 伦理委员会批准(编号: S2022118-009), 体质量 200~250 g, 鼠龄 8~10 周。50 只大鼠被随机分成对照组、假手术组、模型组、葛根素组、mTOR 抑制剂组 5 组, 每组 10 只。大鼠都被饲养在适宜的环境当中。

1.2 大鼠皮肤/肌肉切口牵拉(SMIR)模型的制备及处理 按照 Flatters SJ^[9]的方法建立大鼠 SMIR 模型, 对照组: 不做任何处理。假手术组: 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉大鼠后, 无菌条件下在右后肢隐静脉内侧 3~4 mm 处, 切割皮肤 1.5~2 cm 后缝合。模型组: 在假手术组基础上暴露浅层肌肉, 避开隐神经, 将撑开器头部放入浅层肌肉下撑开至 2 cm, 暴露内收肌筋膜, 持续 1 h(见图 1A)后缝合。葛根素组: 在模型组基础上, 参照文献[10]自建模第 1 天开始腹腔注射葛根素(100 mg/kg), 连续给药 7 d。mTOR 抑制剂组: 在模型组基础上, 连续 7 d 腹腔注

射 mTOR 抑制剂(雷帕霉素, 1 mg/kg^[11])。

1.3 机械性刺激缩爪阈值(MWT)检测 按照 Dixon WJ^[12]方法测定 MWT, von Frey filament 纤毛刺激仪(美国 North Coast Medical 公司)按照刚度力的递增顺序(0.16~26 g)垂直刺激术侧后爪的足底中部区域, 以 von Frey 轻微弯曲并保持约 6~8 s 作为标准, 出现缩爪、舔爪及爪子急剧撤回等现象视为阳性反应, 否则为阴性。从 0.16 g 开始, 升降法记录 5 次, 有 2 次或 2 次以上的反应视为机械性触诱发痛。若无则用相邻的大 1 级力度刺激, 如出现 2 次及以上的阳性反应则给予相邻小 1 级力度的刺激, 再连续测定 5 次, 间隔 30 s。对照阈值表查阈值, 单位为“g”。

1.4 蛋白质印迹(Western blot)检测 mTOR、p-mTOR 蛋白表达 麻醉后收集术后第 7 天 L₃₋₅ 腰膨大, 全细胞裂解试剂盒(上海生工公司)用于组织样品蛋白提取。将 100 μg 总蛋白加载到相应浓度的凝胶泳道上(上海生工公司)进行分离。然后用转移系统(美国伯乐公司)将蛋白转移到 0.45 mm PVDF 膜上。在室温下将膜放在含有 5.0% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐水和 Tween-20 封闭溶液中孵育 2 h, 然后在一抗封闭溶液中 4.0℃下孵育过夜: mTOR(1:1 000, 美国 CST 公司)、p-mTOR (1:1 000, 美国 CST 公司)和 GAPDH(1:5 000, 美国 Sigma 公司)。用 Tris 缓冲盐水和 Tween 20(10 min/次)洗膜 3 次, 室温下用羊抗兔二抗(1:5 000, 美国 Jackson 公司)孵育 2 h。洗涤后, 使用 Tanon 2500 凝胶成像系统和超敏 ECL 化学发光检测试剂盒(爱必信生物科技公司)检测。使用 Image J 分析结果, 计算条带的灰度值, GAPDH 作为内参。

1.5 免疫荧光染色法观察 mTOR 定位及 MG 激活 选取术后第 7 天大鼠麻醉后, 收集 L₃₋₅ 腰膨大, 4% 多聚甲醛固定, 蔗糖溶液脱水。切成 6 μm 的厚度冰

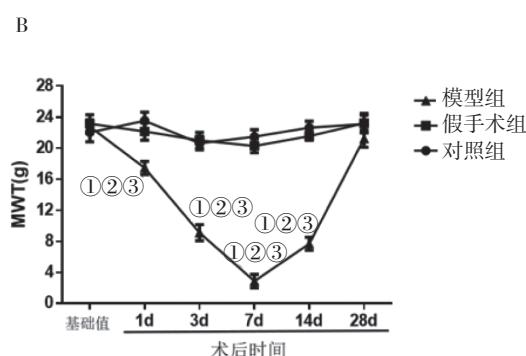
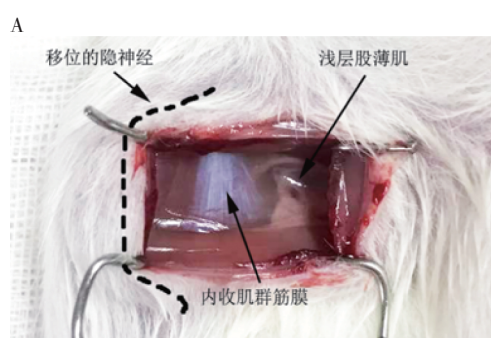
冻切片。室温下用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 1% TritonX-100 通透 1 h, 5%牛血清封闭 2 h, 用 1%血清稀释一抗。切片与 mTOR(1:100, 美国 CST 公司)、NeuN(1:100, 美国 CST 公司)、GFAP(1:100, 美国 CST 公司)和 Iba1(1:100, 英国 abcam 公司)孵育。4.0℃过夜, 用 PBS 洗涤 10 min×3 次。用 PBS 稀释二抗, Cy3-山羊抗兔 IgG(1:1 000, 美国 Jackson 公司)和 FITC-山羊抗小鼠 IgG(1:1 000, 美国 Jackson 公司)。室温下避光孵育 2 h, PBS 冲洗 15 min×3 次, 封片。荧光显微镜进行拍照。

1.6 统计学方法 采用 SPSS22.0 软件分析实验数据, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。行为学数据采用重复测量方差分析。Image J 软件分析蛋白质印迹特异性条带密度以及免疫荧光强度值, 多组间比较采用单因素方差分析, 先进行正态性与方差齐性检

验。若方差齐, 两两比较采用 LSD 法。若方差不齐, 先行 Welch(W)校正检验, 然后用 Dunnett's T_3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验至少重复 3 次。

2 结果

2.1 SMIR 后不同时间点 MWT 见图 1。按照 Flattes SJ 等^[9]方法成功复制和建立了 SMIR 模型(图 1A), 检测 MWT。对照组、假手术组、模型组术前 MWT 基础值分别为 $(23.42 \pm 1.12)g$ 、 $(23.16 \pm 1.14)g$ 和 $(22.76 \pm 0.87)g$, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与基础值比较, 假手术组痛阈无明显变化, 而模型组在术后第 1、3、7、14 天痛阈呈进行性下降($P < 0.05$); 与对照组和假手术组比较, 模型组显著降低($P < 0.05$)(图 1B)。



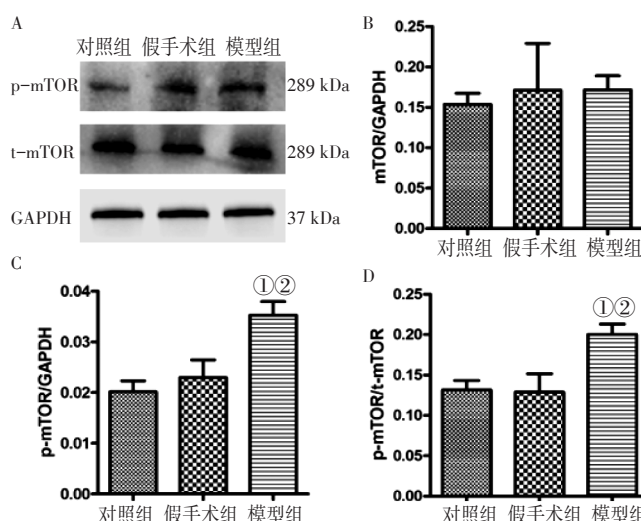
注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与假手术组比较, $P < 0.05$; ③与本组基础值比较, $P < 0.05$

图 1 SMIR 后不同时间点 MWT

2.2 蛋白质印迹检测大鼠脊髓中 mTOR、p-mTOR 蛋白表达 见图 2。与对照组相比, 假手术组和模型组术后 7 d 脊髓中 mTOR 表达无升高, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组、假手术组相比, 模型组术后 7 d 脊髓中 p-mTOR 表达增加($P < 0.05$)。

2.3 免疫荧光检测 mTOR 蛋白在大鼠脊髓中定位 见图 3。为研究 mTOR 在大鼠脊髓中具体表达于哪些细胞中, 选取模型组术后第 7 天的脊髓组织切片, 将 mTOR 分别与脊髓中各类细胞标记物进行免疫荧光双标。结果显示: mTOR 与 Iba1 共定位, 与 GFAP 和 NeuN 不定位。

2.4 腹腔注射葛根素、雷帕霉素后大鼠行为学变化 见图 4。葛根素、雷帕霉素给药后检测 MWT。假手术组、模型组、葛根素组和抑制剂组术前 MWT



注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与假手术组比较, $P < 0.05$

图 2 大鼠腰段脊髓背角 mTOR、p-mTOR 蛋白表达

基础值分别为(23.16±1.14)g、(22.76±0.87)g、(23.24±1.02)g和(22.58±0.64)g,差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组术后3 d、7 d、14 d比较,葛根素组和抑制剂组 MWT 显著升高($P<0.05$);表明葛根素、雷帕霉素可提高 SMIR 大鼠痛觉阈值,缓解机械性痛觉过敏。

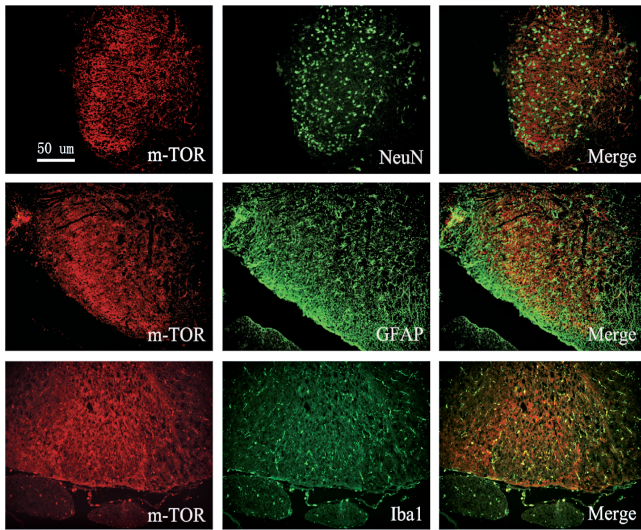
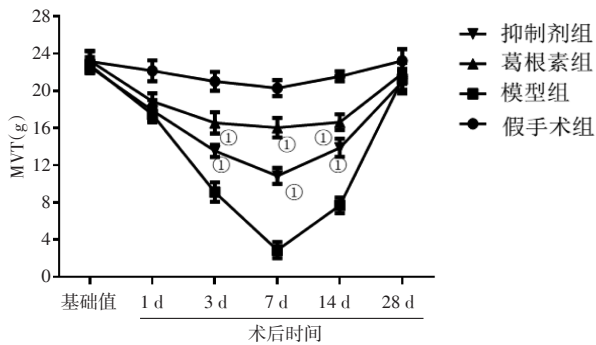


图3 mTOR在脊髓中定位(×200, 标尺50 μm)



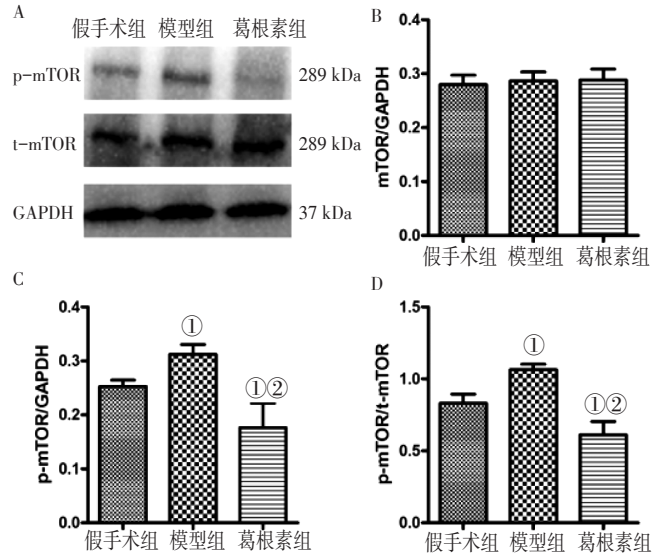
注: ①与模型组同时时间比较, $P<0.05$

图4 腹腔注射葛根素、雷帕霉素后大鼠行为学变化

2.5 腹腔注射葛根素后 mTOR、p-mTOR 蛋白表达变化 见图5。与假手术组、模型组相比,葛根素组术后7 d脊髓中 mTOR 表达无升高,差异无统计学意义($P>0.05$)。与假手术组、模型组相比,葛根素组术后7 d脊髓中 p-mTOR 表达降低($P<0.05$),提示葛根素可以降低 mTOR 磷酸化。

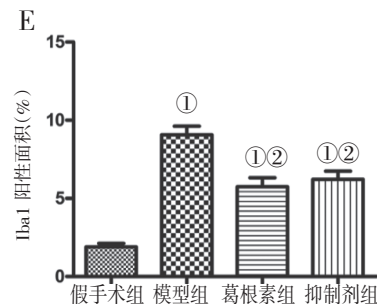
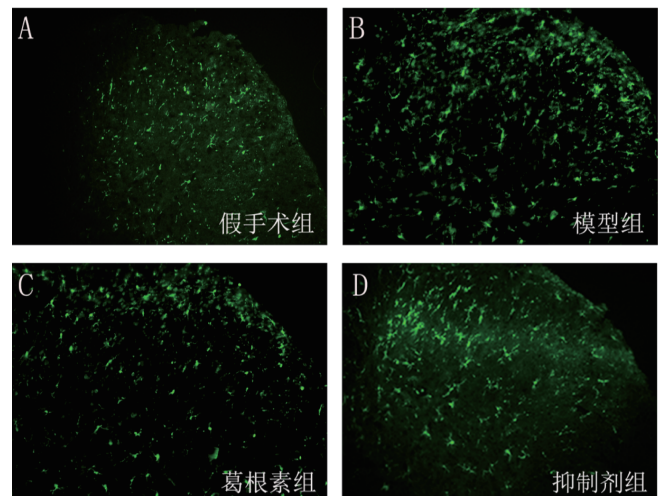
2.6 腹腔注射葛根素、雷帕霉素抑制脊髓中 MG 活化 见图6。免疫荧光染色方法检测 MG 特异性标记物 Iba1 的表达。与假手术组相比,模型组大鼠脊髓背角 Iba1 阳性面积显著增加($P<0.05$);与假手术组

比较,葛根素组、mTOR 抑制剂组 Iba1 阳性面积增加($P<0.05$)。与模型组相比,葛根素组、mTOR 抑制剂组 Iba1 阳性面积显著降低($P<0.05$)。



注: ①与假手术组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$

图5 腹腔注射葛根素后 mTOR、p-mTOR 蛋白表达变化



注: ①与假手术组比较, $P<0.05$; ②与模型组比较, $P<0.05$

图6 腹腔注射葛根素、雷帕霉素抑制脊髓中 MG 活化

3 讨论

慢性疼痛在治疗上的选择有限,是值得学者们重点研究的问题。阿片类药物仍然是慢性疼痛的常规治疗方法,但长时间暴露于阿片类药物治疗会产生耐受和痛觉过敏。中医药以其疗效确切、副作用少等优势逐渐受到人们的关注。有文献[13]表明,鞘内给药葛根素可以通过抑制神经炎症过程和胶质细胞的激活,在坐骨神经慢性压迫损伤模型和糖尿病引起的神经性疼痛中产生剂量依赖性抗伤害效应^[14],并且葛根素还可通过抑制促炎介质减轻完全氟氏佐剂诱导的炎症动物模型中的疼痛^[15]。这些研究结果提示葛根素对各种因素引起的慢性疼痛有缓解作用,但其对慢性术后痛的作用及作用机制研究尚少,哪些重要的分子参与整个过程有待深入的研究。

本实验构建 SMIR 慢性术后痛模型,分别检测各组大鼠的 MWT 发现,建模后 7 d 模型组大鼠痛阈显著下降至建模后 28 d 逐渐恢复,与既往研究结果一致^[16],表明 SMIR 模型建立成功;葛根素组在经过葛根素治疗 7 d 以后,可明显缓解大鼠疼痛,提高机械痛阈,表明葛根素对慢性术后痛也具有一定的疗效。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,目前较广泛的应用于治疗心血管系统的疾病。近年的研究发现葛根素对各种慢性疼痛有缓解作用^[17-18]。该实验进一步发现葛根素可能通过抑制 mTOR 通路治疗慢性术后痛。

mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,大多数研究 mTOR 在疼痛中作用的研究都集中在脊髓水平,在背角浅层和背根神经节中发现 mTOR 的表达^[19]。发现在癌症相关炎症和神经病理性疼痛包括脊髓损伤时,在背角和背根节的 mTOR 的磷酸化水平会增加。此外,在炎症性和神经病理性疼痛的动物模型当中,使用 mTOR 抑制剂雷帕霉素可降低背角神经元的过度兴奋性和抗伤害性^[20]。笔者发现大鼠脊髓中 mTOR 蛋白表达在建模及葛根素治疗后无明显变化,但 p-mTOR 在建模后表达升高,而在葛根素治疗后表达减低,表明慢性术后痛可使 mTOR 磷酸化水平增高,而葛根素可降低 mTOR 磷酸化水平。并且脊髓 p-mTOR 的蛋白表达变化伴随着大鼠痛觉阈值变化,提示 mTOR 磷酸化可能参与慢性术后痛的发生以及发展。而在结节性硬化症复杂脑损伤中

发现了 mTOR 磷酸化与 MG 促炎激活之间有直接联系, mTOR 磷酸化导致促炎 MG 活化^[21],笔者发现注射 mTOR 抑制剂雷帕霉素后大鼠疼痛缓解,而脊髓背角 MG 激活减弱,这进一步揭示了在 SMIR 模型中 mTOR 磷酸化和 MG 的联系。

有报道腹腔注射葛根素可抑制脊髓胶质细胞的活化和炎症反应^[22]。在中枢神经系统中,本实验发现 mTOR 在脊髓背角中主要表达在 MG 中,另外发现大鼠建模后机械痛阈下降, mTOR 磷酸化水平增高,同时脊髓背角 MG 特异性细胞标记物 Iba1 荧光阳性面积增加, MG 显著激活;而葛根素治疗后大鼠机械痛阈升高, mTOR 磷酸化水平降低,同时脊髓背角 MG 激活减弱,特异性细胞标记物 Iba1 荧光阳性面积减少,表明葛根素可显著抑制 MG 活化。

综上所述,本实验通过构建 SMIR 慢性术后痛模型,观察葛根素对其疗效及大鼠脊髓背角内 mTOR、p-mTOR 的变化和 MG 激活情况,初步探究了慢性术后疼痛的相关分子变化,葛根素可通过抑制 mTOR 磷酸化减少 MG 活化从而缓解慢性术后痛。

[参考文献]

- [1] RAMADAN M I, HYA K, OBAID A T, et al. Prevalence of Chronic Postsurgical Pain among Cancer Patients: A Cross-Sectional Study[J]. *Anesth Essays Res*, 2022, 16(1): 71-79.
- [2] HETMANN F, KONGSGAARD U E, SANDVIK L, et al. Prevalence and predictors of persistent post-surgical pain 12 months after thoracotomy[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2015, 59(6): 740-748.
- [3] DROSOS G I, TRIANTAFILIDOU T, VERVERIDIS A, et al. Persistent post-surgical pain and neuropathic pain after total knee replacement[J]. *World J Orthop*, 2015, 6(7): 528-536.
- [4] JI R R, BERTA T, NEDERGAARD M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy?[J]. *Pain*, 2013, 154(Suppl 1): S10-S28.
- [5] ARYANPOUR R, PASBAKHSH P, ZIBARA K, et al. Progesterone therapy induces an M1 to M2 switch in microglia phenotype and suppresses NLRP3 inflammasome in a cuprizone-induced demyelination mouse model[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51: 131-139.
- [6] JIN M M, WANG F, QI D, et al. A Critical Role of Autophagy in Regulating Microglia Polarization in Neurodegeneration[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10: 378.
- [7] ZHANG Z, LAM T N, ZUO Z. Radix Puerariae: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use[J]. *J Clin Pharmacol*, 2013, 53(8): 787-811.
- [8] LIU Y, SHAO L L, PANG W, et al. Induction of adhesion molecule expression in co-culture of human bronchial epithelial cells

- and neutrophils suppressed by puerarin via down-regulating p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor κ B pathways[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(5): 360-368.
- [9] FLATTERS S J. Characterization of a model of persistent postoperative pain evoked by skin/muscle incision and retraction (SMIR)[J]. *Pain*, 2008, 135(1-2): 119-130.
- [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] TATEDA S, KANNO H, OZAWA H, et al. Rapamycin suppresses microglial activation and reduces the development of neuropathic pain after spinal cord injury[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(1): 93-103.
- [12] DIXON W J. Staircase bioassay: the up- and- down method[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1991, 15(1): 47-50.
- [13] ZHONG Y, HUANG Y L, HU Y M, et al. Puerarin alleviate radicular pain from lumbar disc herniation by inhibiting ERK-dependent spinal microglia activation[J]. *Neuropeptides*, 2018, 72: 30-37.
- [14] XIE H T, XIA Z Y, PAN X, et al. Puerarin ameliorates allodynia and hyperalgesia in rats with peripheral nerve injury[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(7): 1263-1268.
- [15] DU K R, WU W, FENG X B, et al. Puerarin attenuates complete Freund's adjuvant-induced trigeminal neuralgia and inflammation in a mouse model via Sirt1-mediated TGF- β 1/Smad3 inhibition[J]. *J Pain Res*, 2021, 14: 2469-2479.
- [16] LI T, LIU T, CHEN X, et al. Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain[J]. *Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 211.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] XU J T, ZHAO X, YASTER M, et al. Expression and distribution of mTOR, p70S6K, 4E-BP1, and their phosphorylated counterparts in rat dorsal root ganglion and spinal cord dorsal horn[J]. *Brain Res*, 2010, 1336: 46-57.
- [20] LIANG L, TAO B, FAN L, et al. mTOR and its downstream pathway are activated in the dorsal root ganglion and spinal cord after peripheral inflammation, but not after nerve injury[J]. *Brain Res*, 2013, 1513: 17-25.
- [21] CHO C, MICHAILIDIS V, MARTIN L J. Revealing brain mechanisms of mTOR-mediated translational regulation: Implications for chronic pain[J]. *Neurobiol Pain*, 2018, 4: 27-34.
- [22] ZHONG Y, HUANG Y L, HU Y M, et al. Puerarin alleviate radicular pain from lumbar disc herniation by inhibiting ERK-dependent spinal microglia activation[J]. *Neuropeptides*, 2018, 72: 30-37.

(责任编辑: 吴凌, 李海霞)