

安石榴苷对神经病理性疼痛大鼠的镇痛作用及机制^Δ

汪 莉*,周 伶#,吴成龙(武汉市第四医院疼痛科,武汉 430035)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)10-1191-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.10.07



摘要 **目的** 基于缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)/核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(NLRP3)信号通路,探讨安石榴苷对神经病理性疼痛(NP)大鼠的镇痛作用及潜在机制。**方法** 将雄性SD大鼠随机分为假手术组(18只)和造模组(72只),造模组大鼠以坐骨神经慢性压迫损伤法诱导建立NP模型。将造模成功的大鼠分为NP组、2-甲氧基雌二醇组(HIF-1 α 拮抗剂10 mg/kg)、安石榴苷组(300 mg/kg)、安石榴苷+二甲基草酰甘氨酸组(安石榴苷300 mg/kg+HIF-1 α 激动剂175 mg/kg),每组18只。各组大鼠腹腔注射和(或)灌胃相应药液或1%二甲基亚砜/生理盐水,每天1次,连续14 d。末次给药后,检测各组大鼠的机械缩足反射阈值(MWT)、热缩足反射潜伏期(TWL)和脊髓组织中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6水平,观察其脊髓背角的形态学变化,检测其脊髓背角的神经元凋亡率、NLRP3/离子钙结合衔接分子1(Iba-1)共定位情况(以NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数计)以及脊髓组织中HIF-1 α 、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、胱天蛋白酶1(caspase-1)的表达情况。**结果** 与假手术组比较,NP组大鼠脊髓背角中神经原纤维明显增粗并缠绕成结,可见含嗜银颗粒的空泡变性;其MWT、TWL均降低或缩短,脊髓组织中TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,脊髓背角神经元凋亡率,NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数以及HIF-1 α 、NLRP3、ASC、caspase-1蛋白的表达均显著升高或上调($P<0.05$)。与NP组比较,2-甲氧基雌二醇组和安石榴苷组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$),而二甲基草酰甘氨酸则可显著逆转安石榴苷对上述指标的改善作用($P<0.05$)。**结论** 安石榴苷可缓解NP大鼠的疼痛,其镇痛作用可能是通过抑制HIF-1 α /NLRP3信号通路、阻碍脊髓背角小胶质细胞中NLRP3炎症小体的活化来实现的。

关键词 安石榴苷;神经病理性疼痛;炎症;HIF-1 α /NLRP3信号通路;脊髓背角

Analgesic effect and mechanism of punicalagin on neuropathic pain in rats

WANG Li,ZHOU Ling,WU Chenglong(Dept. of Pain, the Fourth Hospital of Wuhan, Wuhan 430035, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the analgesic effect and potential mechanism of punicalagin on neuropathic pain (NP) rats based on the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3 (NLRP3) signaling pathway. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into sham operation group (18 rats) and modeling group (72 rats). NP rat model was established by chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve. The successfully modeled rats were divided into NP group, 2-methoxyestradiol group (HIF-1 α antagonist 10 mg/kg), punicalagin group (300 mg/kg), and punicalagin+dimethylloxaloglycine group (punicalagin 300 mg/kg+HIF-1 α agonist 175 mg/kg), with 18 rats in each group. Rats in each group were injected intraperitoneally and/or intragastrically with the corresponding solution or 1% dimethyl sulfoxide/normal saline, once a day, for 14 consecutive days. After the last administration, the mechanical withdrawal threshold (MWT), thermal withdrawal latency (TWL), the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in spinal cord tissue were detected; the morphological changes in the spinal dorsal horn were observed. Apoptosis rate of spinal dorsal horn neurons, the co-localization of NLRP3/ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) (calculated by the number of NLRP3⁺/Iba-1⁺ cells) and the protein expressions of HIF-1 α , NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) and caspase-1 in spinal cord tissue were detected. **RESULTS** Compared with the sham operation group, neurofibril in spinal dorsal horn of rats in NP group was thickened and wound into knots, and vacuolar degeneration containing silver granules was observed; the MWT and TWL were reduced or shortened; the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in spinal cord tissue, the apoptosis rate of spinal dorsal horn neurons, the number of NLRP3⁺/Iba-1⁺ cells, and protein expressions of HIF-1 α , NLRP3, ASC and caspase-1 were significantly increased or up-regulated ($P<0.05$). Compared with the NP group, the above indexes were significantly improved in the 2-methoxyestradiol group and punicalagin group ($P<0.05$), while dimethylloxaloglycine could significantly reverse the improvement effect of punicalagin on the above indexes ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Punicalagin can relieve pain in NP rats, and

its analgesic effect may be achieved by inhibiting HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway and blocking the activation of NLRP3 inflammasome in spinal dorsal horn microglia.

KEYWORDS punicalagin; neuropathic pain; inflammation; HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway; spinal dorsal horn

^Δ **基金项目** 武汉市医学科研项目(No.WX18Q04)
* **第一作者** 主治医师。研究方向:疼痛相关。电话:027-68831644。E-mail:ma04e@163.com
通信作者 主任医师,硕士。研究方向:疼痛相关。电话:027-68831644。E-mail:xxfr82@163.com

神经病理性疼痛(neuropathic pain, NP)是由周围或中枢神经系统病变/疾病引起的慢性继发性疼痛,以痛觉过敏、异常疼痛、自发性疼痛等躯体疼痛异常为主要症状,具有发病率高、持续时间长等特点,是严重影响患者生活质量的公共卫生问题^[1-2]。目前,药物(包括阿片类药物、非甾体抗炎药和抗惊厥药)干预仍然是临床治疗NP的主要手段,但上述药物若长期使用可能引发严重的毒副作用,从而影响患者的治疗结局^[3]。因此,尽快开发更有效、更安全的NP治疗药物至关重要。

神经炎症是NP的病理基础,核苷酸结合结构域富含亮氨酸重复序列和含热蛋白结构域受体3(nucleotide-binding domain leucine-rich repeat and pyrin domain-containing receptor 3, NLRP3)炎症小体能够感知机体内部的损伤和应激信号,并触发炎症反应。在NP发生过程中,NLRP3炎症小体被激活,促进白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症因子释放,从而进一步加剧神经炎症和疼痛反应^[4-5]。可见,NLRP3炎症小体可能是新型镇痛药作用的潜在靶点。缺氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)是细胞在缺氧条件下的重要转录因子,在炎症反应中具有重要作用:在坐骨神经慢性压迫损伤(chronic constriction injury, CCI)诱导的NP大鼠中,抑制HIF-1 α 的表达可减少肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和IL-1 β 的过度分泌,减轻大鼠的NP并促进神经功能恢复^[6-7]。此外,HIF-1 α 还可通过激活NLRP3炎症小体来诱导炎症反应,而抑制HIF-1 α /NLRP3信号通路可减轻脑卒中后中枢性疼痛模型大鼠的神经炎症,改善其脑卒中后中枢性疼痛及焦虑、抑郁等症状^[8]。以上研究表明,靶向HIF-1 α /NLRP3信号通路介导的神经炎症可能是NP治疗的新途径。

安石榴苷是提取自石榴 *Punica granatum* L. 果皮的多酚类物质,具有抗炎、抗癌、抗病毒和抗氧化等作用^[9]。相关文献表明,安石榴苷可缓解脊髓炎症性疼痛^[10]以及长春新碱诱发的NP^[11]。此外,有报道证实,安石榴苷可通过抑制NLRP3炎症小体的活化来减少炎症反应引起的细胞死亡^[12]。然而,安石榴苷的镇痛作用是否与HIF-1 α /NLRP3信号通路有关尚未可知。基于此,本研究拟采用CCI法诱导建立NP大鼠模型,从HIF-1 α /NLRP3信号通路出发,初步探讨安石榴苷对NP大鼠的镇痛作用及潜在机制,为NP的临床治疗及相关药物开发提供理论依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括BME-410C型全自动热痛刺激仪、BME-403 Von Frey型机械痛测定仪(中国医学科学院生物医学工程研究所)、BX43型光学显微镜、BX53型荧光显微镜、Fluoview FV3000型激光扫描共聚

焦显微镜(日本Olympus公司),Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Gel Doc XR+型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

安石榴苷对照品(纯度99.97%,批号HY-N0063)、HIF-1 α 拮抗剂2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol, 2-ME)的对照品(纯度99.76%,批号HY-12033)均购自美国MCE公司;HIF-1 α 激动剂二甲基草酰甘氨酸(dimethyl oxaloylglycine, DMOG)的对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号D3695)购自美国Sigma-Aldrich公司;TUNEL一步法细胞凋亡检测试剂盒(批号C1086)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒和六胺银染色液(改良Grocott-苏木精法)(批号分别为ml002859、ml003057、ml102828、ml28108-1)均购自上海酶联生物技术有限公司;兔抗HIF-1 α 、NLRP3、胱天蛋白酶1(caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体,鼠抗离子钙结合衔接分子1(ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba-1)抗体,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(H&L)二抗, Alexa Fluor[®] 647标记的羊抗鼠IgG(H&L)二抗, Alexa Fluor[®] 488标记的羊抗兔IgG(H&L)二抗(批号分别为ab179483、ab283819、ab286125、ab307560、ab181602、ab283319、ab6721、ab150115、ab150077)均购自英国Abcam公司。

1.3 实验动物

90只SD大鼠,雄性,SPF级,体重(200 $\pm$ 20)g,6~7周龄,由湖北贝恩特生物科技有限公司提供,动物生产许可证号为SCXK(鄂)2021-0027。将大鼠以每笼3~4只饲养在恒温[(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C]、恒湿[(55 $\pm$ 5)%]、光暗循环(12 h/12 h)的动物房内,自由摄食、饮水。本研究方案经湖北贝恩特生物科技有限公司动物伦理委员会审核批准(编号BNT-08685)。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将大鼠随机分为假手术组(18只)和造模组(72只)。造模组大鼠参照相关文献^[13]以CCI法建立NP模型:大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,从右后肢大腿中段平行于坐骨神经的方向切开皮肤,暴露坐骨神经主干,用4-0羊肠线结扎(以足趾或下肢轻微抽动为度),共4道(间隔1 mm)。假手术组大鼠仅暴露右后肢坐骨神经主干,不使用羊肠线结扎。所有手术均由同一个人完成,以尽量减少操作差异。造模1周后,检测两组大鼠的机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold, MWT),若造模组大鼠MWT较假手术组显著降低则表明造模成功^[13]。将造模成功的大鼠随机分为NP组、2-ME组、安石榴苷组、安石榴苷+DMOG组,每组18只。2-ME组大鼠腹腔

注射 10 mg/kg 的 HIF-1 α 拮抗剂 2-ME(1% 二甲基亚砷溶解)^[14]并灌胃等体积生理盐水,安石榴苷组大鼠灌胃 300 mg/kg 的安石榴苷(生理盐水溶解)^[11]并腹腔注射等体积 1% 二甲基亚砷;安石榴苷+DMOG 组大鼠灌胃 300 mg/kg 的安石榴苷并腹腔注射 175 mg/kg 的 HIF-1 α 激动剂 DMOG(1% 二甲基亚砷溶解)^[14];NP 组和假手术组均灌胃等体积生理盐水并腹腔注射等体积 1% 二甲基亚砷。每天 1 次,连续 14 d。

2.2 疼痛行为学评估

于末次给药 12 h 后,以机械痛测定仪测定各组的 MWT;将大鼠单独置于金属网笼中适应 30 min,然后用校准的 Von Frey 刺激针从网笼下方刺激其左侧足底,记录大鼠缩足时的刺激强度,即为 MWT。以红外辐射热法测定各组大鼠的热缩足反射潜伏期(thermal withdrawal latency, TWL):上述机械痛实验结束后,将大鼠置于有机玻璃笼中适应 30 min,然后用热痛刺激仪垂直照射大鼠后肢足底,若大鼠出现舔舐和(或)抬足,立即停止照射并记录所用照射时间,即为 TWL。上述疼痛行为指标(MWT 和 TWL)的检测均在上午 09:00—12:00 于安静的动物房内进行,每间隔 10 min 测量 1 次,重复 3 次取平均值。

2.3 脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平检测

疼痛行为学评估完成后,随机选取每组 6 只大鼠,腹腔注射过量戊巴比妥钠(120 mg/kg)处死后,分离其 L4~L6 脊髓组织,加入预冷的磷酸盐缓冲液,研磨后,以 12 000 r/min 离心 20 min,取上层清液,采用 ELISA 法以酶标仪检测其 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平。

2.4 脊髓背角形态学变化观察

随机选取每组另 6 只大鼠,按“2.3”项下方法处死后,分离其 L4~L6 脊髓组织,经 4% 多聚甲醛溶液固定后,行常规石蜡包埋、切片(厚约 5 μ m)。取上述切片适量,经烤片、脱蜡、脱水、氧化、洗涤等操作后,在 60 $^{\circ}$ C 水浴中用六胺银试剂染色(当切片呈烟草样黄色或黑色时停止染色,约 30 min);清洗后,用 0.1% 氯化金溶液调色 2 min;清洗后,用快绿溶液复染 1 min;经脱水、透明、封片后,使用光学显微镜观察脊髓背角的形态学变化。

2.5 脊髓背角神经元凋亡检测

取“2.4”项下各组大鼠的脊髓组织石蜡切片适量,经脱蜡和过氧化氢、蛋白酶 K 处理后,在避光条件下用 TUNEL 工作液孵育,然后用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液染核;经甘油封片后,使用荧光显微镜捕获染色图像并观察脊髓背角中神经元凋亡情况(凋亡神经元呈绿色),按下式计算凋亡率:凋亡率(%)=凋亡神经元数/总细胞数 $\times$ 100%。

2.6 脊髓背角小胶质细胞中 NLRP3 阳性表达检测

取“2.4”项下各组大鼠的脊髓组织石蜡切片适量,经脱蜡、水化后,用 0.2% Triton X-100 试剂孵育 10 min,于

室温下用 10% 山羊血清封闭 1 h;加入 NLRP3、Iba-1 一抗(稀释比例均为 1:100),4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;加入荧光标记的相应二抗(稀释比例均为 1:200),室温下孵育 2 h;加入 DAPI 染液,于室温下染核 8 min;以中性树脂封片后,使用共聚焦显微镜观察并使用 Image J 软件对 NLRP3 和 Iba-1 共染色细胞(即 NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞,呈黄绿色)进行计数,用以表示大鼠脊髓背角小胶质细胞中 NLRP3 的阳性表达情况。

2.7 脊髓组织中 HIF-1 α 、NLRP3、ASC、caspase-1 蛋白表达检测

采用 Western blot 实验检测。取各组剩余 6 只大鼠,按“2.3”项下方法处死后,分离其 L4~L6 脊髓组织,用 RIPA 裂解缓冲液提取其总蛋白,用 BCA 法检测蛋白浓度后,于金属浴中加热变性。取变性蛋白适量,进行 12.5% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移到聚偏二氟乙烯膜上,用 5% 脱脂牛奶于室温下封闭 2 h;洗膜后,加入 HIF-1 α 、NLRP3、ASC、caspase-1、GAPDH 一抗(稀释比例分别为 1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:2 000),于 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为 1:4 000),于室温下孵育 1 h;洗膜后,加入 ECL 试剂显影,于凝胶成像仪下成像。使用 Image J 软件,以 GAPDH 为内参,用各目的蛋白与内参蛋白的灰度比值表示各目的蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Tukey 事后检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 安石榴苷对大鼠疼痛行为学的影响

与假手术组比较,NP 组大鼠的 MWT、TWL 均显著降低或缩短($P<0.05$);与 NP 组比较,2-ME 组、安石榴苷组大鼠的 MWT、TWL 均显著升高或延长($P<0.05$);与安石榴苷组比较,安石榴苷+DMOG 组大鼠的 MWT、TWL 均显著降低或缩短($P<0.05$)。结果见表 1。

表 1 各组大鼠 MWT、TWL 比较($\bar{x} \pm s, n=18$)

组别	MWT/g	TWL/s
假手术组	23.40 $\pm$ 2.52	15.65 $\pm$ 1.60
NP 组	8.96 $\pm$ 1.47 ^a	4.73 $\pm$ 0.89 ^a
2-ME 组	17.15 $\pm$ 2.04 ^b	12.40 $\pm$ 1.35 ^b
安石榴苷组	16.84 $\pm$ 1.95 ^b	11.93 $\pm$ 1.28 ^b
安石榴苷+DMOG 组	10.72 $\pm$ 1.80 ^c	7.00 $\pm$ 0.94 ^c

a:与假手术组比较, $P<0.05$;b:与 NP 组比较, $P<0.05$;c:与安石榴苷组比较, $P<0.05$ 。

3.2 安石榴苷对大鼠脊髓组织中炎症因子水平的影响

与假手术组比较,NP 组大鼠脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均显著升高($P<0.05$);与 NP 组比较,2-ME 组、安石榴苷组大鼠脊髓组织中上述各炎症因子水平均显著降低($P<0.05$);与安石榴苷组比较,安石榴苷+

DMOG组大鼠脊髓组织中上述各炎症因子水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠脊髓组织TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平比较($\bar{x}\pm s, n=6, \text{pg/mg}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术组	45.69 $\pm$ 7.31	12.42 $\pm$ 1.59	23.25 $\pm$ 2.94
NP组	186.20 $\pm$ 13.05 ^a	51.36 $\pm$ 3.11 ^a	87.10 $\pm$ 5.23 ^a
2-ME组	79.44 $\pm$ 8.62 ^b	23.80 $\pm$ 1.74 ^b	39.34 $\pm$ 3.30 ^b
安石榴苷组	83.81 $\pm$ 9.04 ^b	26.55 $\pm$ 1.96 ^b	44.02 $\pm$ 3.78 ^b
安石榴苷+DMOG组	152.76 $\pm$ 12.18 ^c	42.31 $\pm$ 2.58 ^c	75.54 $\pm$ 4.62 ^c

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与NP组比较, $P<0.05$; c: 与安石榴苷组比较, $P<0.05$ 。

3.3 安石榴苷对大鼠脊髓背角形态学变化的影响

假手术组大鼠脊髓背角可见少量空泡样变化, 未见明显的神经原纤维缠绕; 与假手术组比较, NP组大鼠脊髓背角中神经原纤维明显增粗并缠绕成结, 同时神经元细胞质可见含嗜银颗粒的空泡, 且呈簇状分布; 与NP组比较, 2-ME组和安石榴苷组大鼠脊髓背角神经原纤维缠绕和空泡变性有所减少; 与安石榴苷组比较, 安石榴苷+DMOG组大鼠脊髓背角神经原纤维缠绕和空泡变性有所增多。结果见图1。

3.4 安石榴苷对大鼠脊髓背角神经元凋亡的影响

与假手术组[(5.07 $\pm$ 0.84)%]比较, NP组大鼠脊髓背角神经元凋亡增多, 凋亡率[(23.12 $\pm$ 1.55)%]显著升高($P<0.05$); 与NP组比较, 2-ME组、安石榴苷组大鼠

脊髓背角神经元凋亡有所减少, 凋亡率[(8.80 $\pm$ 1.13)%、(9.26 $\pm$ 1.27)%]均显著降低($P<0.05$); 与安石榴苷组比较, 安石榴苷+DMOG组大鼠脊髓背角神经元凋亡增多, 凋亡率[(17.58 $\pm$ 1.41)%]显著升高($P<0.05$)。结果见图2。

3.5 安石榴苷对大鼠脊髓背角小胶质细胞中NLRP3阳性表达的影响

与假手术组[(3.15 $\pm$ 0.45)个]比较, NP组大鼠脊髓背角NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数[(8.20 $\pm$ 0.80)个]显著增多($P<0.05$); 与NP组比较, 2-ME组、安石榴苷组大鼠脊髓背角NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数[(4.41 $\pm$ 0.52)、(4.89 $\pm$ 0.60)个]均显著减少($P<0.05$); 与安石榴苷组比较, 安石榴苷+DMOG组大鼠脊髓背角NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数[(7.75 $\pm$ 0.73)个]显著增多($P<0.05$)。结果见图3。

3.6 安石榴苷对大鼠脊髓组织中HIF-1 α 、NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达的影响

与假手术组比较, NP组大鼠脊髓组织中HIF-1 α 、NLRP3、ASC、caspase-1蛋白的表达均显著上调($P<0.05$); 与NP组比较, 2-ME组、安石榴苷组大鼠脊髓组织中上述蛋白的表达均显著下调($P<0.05$); 与安石榴苷组比较, 安石榴苷+DMOG组大鼠脊髓组织中上述蛋白的表达均显著上调($P<0.05$)。结果见图4、表3。

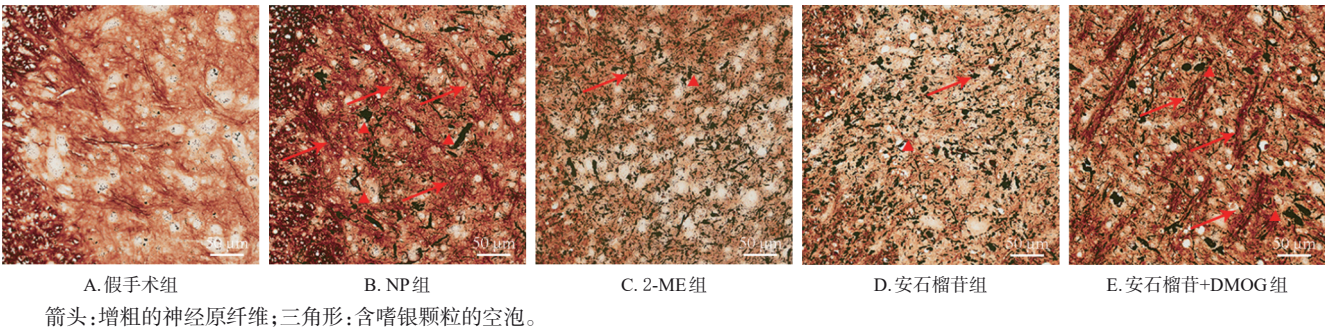


图1 各组大鼠脊髓背角形态学变化的显微图(六胺银染色)

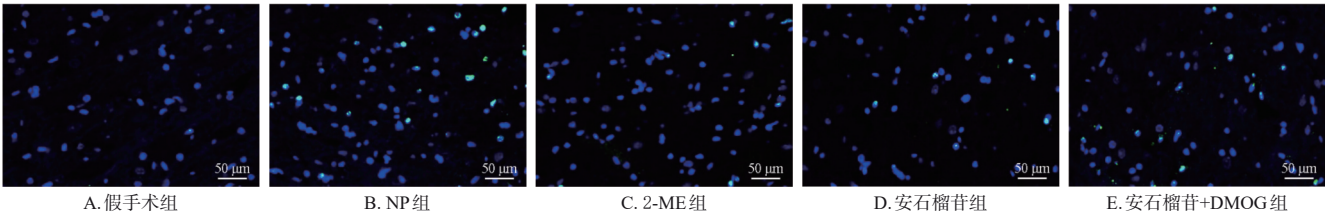


图2 各组大鼠脊髓背角神经元凋亡的显微图(TUNEL染色)

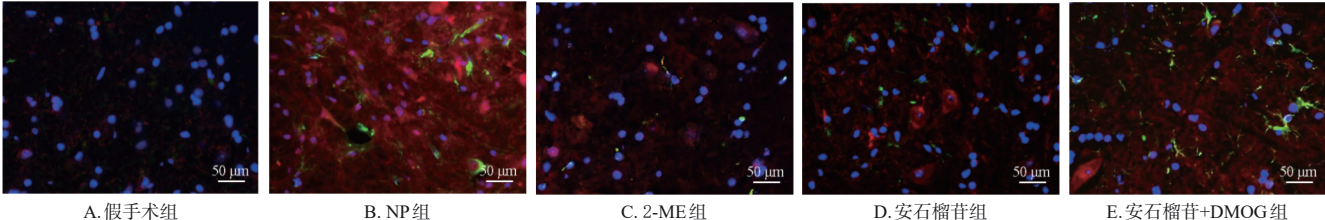


图3 各组大鼠脊髓背角NLRP3与Iba-1共定位显微图(免疫荧光染色)

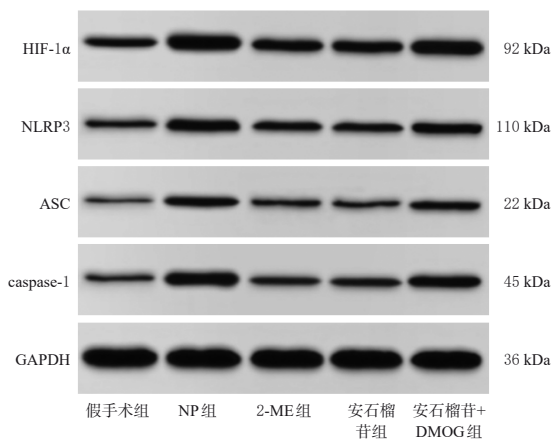


图4 各组大鼠脊髓组织中HIF-1α、NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠脊髓组织中HIF-1α、NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	HIF-1α/GAPDH	NLRP3/GAPDH	ASC/GAPDH	caspase-1/GAPDH
假手术组	0.28±0.05	0.20±0.04	0.11±0.02	0.15±0.03
NP组	0.79±0.08 ^a	0.56±0.06 ^a	0.43±0.04 ^a	0.64±0.06 ^a
2-ME组	0.40±0.06 ^b	0.31±0.04 ^b	0.18±0.03 ^b	0.25±0.03 ^b
安石榴苷组	0.45±0.06 ^b	0.35±0.05 ^b	0.22±0.03 ^b	0.30±0.04 ^b
安石榴苷+DMOG组	0.71±0.07 ^c	0.48±0.06 ^c	0.36±0.04 ^c	0.55±0.06 ^c

a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与NP组比较, $P<0.05$; c: 与安石榴苷组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

NP是临床常见疾病,长期疼痛不仅会影响患者的睡眠质量,而且会引发抑郁、精神障碍,甚至产生自杀倾向,严重影响患者的生活质量^[15]。然而,NP的发病机制复杂,现有药物安全性欠佳,使得其有效治疗仍是临床面临的巨大挑战之一。因此,探索并开发新的NP治疗药物具有重要的临床意义。

安石榴苷是石榴科植物石榴果皮提取物中的主要活性成分,是一种多酚类化合物,具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌和抗病毒活性^[16]。近期研究发现,安石榴苷具有抑制NP的作用,可减弱CCI致NP大鼠的机械痛觉和冷痛觉过敏,并可缓解福尔马林诱导的急性和持续性脊髓炎症性疼痛,其镇痛作用与加巴喷丁相当^[10];在长春新碱诱发的NP模型大鼠中,安石榴苷可下调TNF-α、IL-6和髓过氧化物酶水平,缓解长春新碱引起的异常性疼痛、机械性痛觉过敏和功能障碍^[11]。CCI是一种广泛应用于NP动物实验的造模方法^[13],本研究通过该法建立NP大鼠模型来探讨安石榴苷的镇痛作用及潜在机制。结果显示,CCI诱导的NP大鼠的MWT和TWL均显著降低或缩短;经安石榴苷干预后,NP大鼠的MWT和TWL均显著升高或延长,提示安石榴苷能够有效改善NP大鼠的疼痛行为。

NP常见的病因包括炎症引起的脊髓背角中枢和周围神经元敏化。小胶质细胞是脊髓背角中枢神经系统中的一种常驻免疫细胞,在NP的发病过程中发挥关键作用^[17]。研究显示,异常激活的小胶质细胞可与星形胶

质细胞和神经元相互作用,从而引发神经炎症并促进疼痛信号传递,且活化的小胶质细胞通常与NLRP3蛋白共定位^[18]。NLRP3炎症小体是先天免疫系统的细胞质受体,由NLRP3、ASC和caspase-1前体(pro-caspase-1)组成,当NLRP3被激活后,其会通过募集衔接蛋白ASC来与pro-caspase-1结合,从而形成NLRP3炎症小体^[5]。pro-caspase-1是一种蛋白水解酶,可自动裂解成活性caspase-1,进而激活IL-1β,导致炎症因子过度释放,并诱导程序性细胞死亡^[19]。据报道,在NP发生过程中,NLRP3炎症小体在脊髓小胶质细胞中被激活,从而导致caspase-1活化,促进IL-1β等炎症因子成熟和分泌,这些炎症因子能进一步加剧神经炎症,最终促进NP的发展;抑制脊髓小胶质细胞中NLRP3炎症小体的活化可减轻CCI引起的疼痛过敏^[20-21]。脊髓背角是痛觉信号处理的主要部位,因此本研究选择该部位来评估安石榴苷对CCI致小胶质细胞异常激活的影响。本研究结果显示,与正常大鼠比较,CCI致NP大鼠脊髓背角内的NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数显著增多,同时脊髓组织中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著升高;六胺银染色结果显示,NP大鼠神经原纤维明显增粗并缠结,可见内含嗜银颗粒的空泡变性;TUNEL染色结果显示,NP大鼠脊髓背角神经元凋亡增多,凋亡率显著升高;Western blot实验结果显示,NP大鼠脊髓组织中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白的表达均显著上调,表明大鼠脊髓背角小胶质细胞中的NLRP3炎症小体明显活化,神经元凋亡增加。经安石榴苷干预后,NP大鼠脊髓背角内NLRP3⁺/Iba-1⁺细胞数显著减少,脊髓组织中TNF-α、IL-1β、IL-6水平均显著降低,其脊髓背角形态学改变有所缓解,神经元凋亡率以及脊髓组织中NLRP3、ASC、caspase-1蛋白的表达均显著降低或下调,表明安石榴苷对大鼠NP的改善作用可能是通过抑制脊髓背角小胶质细胞中NLRP3炎症小体的活化而实现的。

HIF-1α是HIF-1的关键亚型,是在细胞缺氧条件下广泛存在的关键调控分子,也是神经炎症的重要诱导剂,可促进神经胶质细胞的激活和促炎细胞因子的释放,与NP的发生发展密切相关^[22]。研究指出,在CCI诱导的NP大鼠中,抑制HIF-1α可降低TNF-α和IL-1β的表达,从而减轻大鼠的神经性疼痛^[6-7]。此外,HIF-1α表达升高可促进NLRP3炎症小体的活化;在脊髓损伤小鼠模型中,HIF-1α和NLRP3的表达均明显增加,而干扰HIF-1α的表达可促进小胶质细胞焦亡,从而抑制神经炎症反应^[23];此外,下调HIF-1α/NLRP3信号通路还可缓解脑卒中后中枢性疼痛^[8]。本研究结果显示,与正常大鼠比较,NP大鼠除NLRP3、ASC、caspase-1蛋白表达上调外,HIF-1α蛋白在脊髓组织中的表达亦显著上调;而经安石榴苷干预后,上述蛋白的表达均显著下调,且安石榴苷的作用与HIF-1α拮抗剂2-ME的作用基本一致。由此推测,安石榴苷可能通过抑制HIF-1α/NLRP3信号通路来发挥镇痛作用。为了验证此推测,本研究在安石榴苷的基础上联用了HIF-1α激动剂DMOG进行干预,

结果显示,DMOG可显著逆转安石榴苷的镇痛作用,提示安石榴苷可能通过下调HIF-1 α /NLRP3信号通路来缓解大鼠的NP。

综上所述,安石榴苷可缓解NP大鼠的疼痛,其镇痛作用可能是通过抑制HIF-1 α /NLRP3信号通路,阻碍脊髓背角小胶质细胞中NLRP3炎症小体的活化来实现的。未来本课题组将探讨安石榴苷发挥镇痛作用的其他靶点,同时采用其他NP模型对其镇痛作用及机制进行深入分析,并在此基础上分析安石榴苷的药动学和体内代谢过程,探讨其实际应用的可行性。

参考文献

- [1] RAYMOND T J. Chronic pain syndromes: chronic neuropathic pain[J]. *FP Essent*, 2023, 533: 27-40.
- [2] PETHŐ G, KÁNTÁS B, HORVÁTH Á, et al. The epigenetics of neuropathic pain: a systematic update[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17143.
- [3] MICHELI L, LUCARINI E, NOBILI S, et al. Ultramicrosized N-palmitoylethanolamine contributes to morphine efficacy against neuropathic pain: implication of mast cells and glia[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2024, 22(1): 88-106.
- [4] JING B, CHEN Z N, SI W M, et al. (+)-Catechin attenuates CCI-induced neuropathic pain in male rats by promoting the Nrf2 antioxidant pathway to inhibit ROS/TLR4/NF- κ B-mediated activation of the NLRP3 inflammasome[J]. *J Neurosci Res*, 2024, 102(8): e25372.
- [5] CHEN C, SMITH M T. The NLRP3 inflammasome: role in the pathobiology of chronic pain[J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(4): 1589-1603.
- [6] HSIEH Y L, CHOU L W, CHANG P L, et al. Low-level laser therapy alleviates neuropathic pain and promotes function recovery in rats with chronic constriction injury: possible involvements in hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)[J]. *J Comp Neurol*, 2012, 520(13): 2903-2916.
- [7] MO C, XU M Y, WEN C, et al. Normalizing JMJD6 expression in rat spinal dorsal horn alleviates hyperalgesia following chronic constriction injury[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 542.
- [8] SHI Z M, JING J J, XUE Z J, et al. Stellate ganglion block ameliorated central post-stroke pain with comorbid anxiety and depression through inhibiting HIF-1 α /NLRP3 signaling following thalamic hemorrhagic stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 82.
- [9] HERING N A, LUETTIG J, JEBAUTZKE B, et al. The punicalagin metabolites ellagic acid and urolithin A exert different strengthening and anti-inflammatory effects on tight junction-mediated intestinal barrier function *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 610164.
- [10] HARANISHI Y, HARA K, TERADA T. Analgesic potency of intrathecally administered punicalagin in rat neuropathic and inflammatory pain models[J]. *J Nat Med*, 2022, 76(1): 314-320.
- [11] JAIN V, PAREEK A, BHARDWAJ Y R, et al. Punicalagin and ellagic acid containing *Punica granatum* L. fruit rind extract prevents vincristine-induced neuropathic pain in rats: an *in silico* and *in vivo* evidence of GABAergic action and cytokine inhibition[J]. *Nutr Neurosci*, 2022, 25(10): 2149-2166.
- [12] PENG J F, ZHAO X N, ZHANG M, et al. Punicalagin attenuates ventricular remodeling after acute myocardial infarction via regulating the NLRP3/caspase-1 pathway[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 963-972.
- [13] 姜政男, 张溢珈, 刘臻, 等. 大鼠神经病理性疼痛模型的建立及其引起抑郁样状态伴失眠的机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(4): 905-912.
- [14] HE J, QIN Z S, CHEN X, et al. HIF-1 α ameliorates diabetic neuropathic pain via parkin-mediated mitophagy in a mouse model[J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 5274375.
- [15] VIEIRA W F, COELHO D R A, LITWILER S T, et al. Neuropathic pain, mood, and stress-related disorders: a literature review of comorbidity and co-pathogenesis[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2024, 161: 105673.
- [16] VENUSOVA E, KOLESAROVA A, HORKY P, et al. Physiological and immune functions of punicalagin[J]. *Nutrients*, 2021, 13(7): 2150.
- [17] INOUE K. Microglia in neuropathic pain[J]. *Adv Neurobiol*, 2024, 37: 399-403.
- [18] LIANG J H, YU H, XIA C P, et al. Ginkgolide B effectively mitigates neuropathic pain by suppressing the activation of the NLRP3 inflammasome through the induction of mitophagy in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 177: 117006.
- [19] SILVA SANTOS RIBEIRO P, WILLEMEN H L D M, VERSTEEG S, et al. NLRP3 inflammasome activation in sensory neurons promotes chronic inflammatory and osteoarthritis pain[J]. *Immunother Adv*, 2023, 3(1): Itad022.
- [20] WU D, WANG P, ZHAO C H, et al. Levo-tetrahydropalmatine ameliorates neuropathic pain by inhibiting the activation of the Clec7a-MAPK/NF- κ B-NLRP3 inflammasome axis[J]. *Phytomedicine*, 2023, 121: 155075.
- [21] ZHU J S, YANG J M, XU J G. Erratum to “miR-223 inhibits the polarization and recruitment of macrophages via NLRP3/IL-1 β pathway to meliorate neuropathic pain” [J]. *Pain Res Manag*, 2023, 2023: 9756947.
- [22] HUA T, KONG E L, ZHANG H L, et al. PRMT6 deficiency or inhibition alleviates neuropathic pain by decreasing glycolysis and inflammation in microglia[J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 118: 101-114.
- [23] XU S, WANG J, ZHONG J J, et al. CD73 alleviates GSDMD-mediated microglia pyroptosis in spinal cord injury through PI3K/AKT/Foxo1 signaling[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(1): e269.

(收稿日期: 2024-11-04 修回日期: 2025-03-26)

(编辑: 张元媛)