

基于 NLRP3 炎症小体信号通路探讨盐酸小檗碱对三叉神经痛大鼠的影响[△]

梁自飞^{1*}, 吴安石², 沈文振², 魏昌伟^{2#} (1. 北京朝阳急诊抢救中心麻醉科, 北京 100020; 2. 首都医科大学附属北京朝阳医院麻醉科, 北京 100020)

中图分类号 R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)06-0658-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.06.005

摘要 目的:探讨盐酸小檗碱对三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)大鼠模型中 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体信号通路的影响以及对 TN 模型大鼠的保护作用。方法:采用眶下神经缩窄术制备 TN 大鼠模型,将造模成功的大鼠随机分为模型组和盐酸小檗碱低、中及高剂量组(25 mg/kg、50 mg/kg 及 100 mg/kg),每组 15 只。另取 15 只大鼠(仅分离眶下神经,不结扎)作为假手术组,假手术组和模型组大鼠予以等量 0.9% 氯化钠溶液灌胃,其他各组大鼠灌胃予以相应剂量的盐酸小檗碱,灌胃体积 10 ml/kg,1 日 1 次,共 14 d。采用电子测痛仪测定各组大鼠在不同时间的神经面部支配区机械痛阈值;采用酶联免疫吸附试验检测大鼠术侧三叉神经节组织中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平;采用实时荧光定量聚合酶链式反应检测各组大鼠术侧三叉神经节组织中降钙素基因相关肽(CGRP)、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)及胱天蛋白酶 1(caspase-1)的 mRNA 表达水平;采用蛋白质免疫印迹法检测大鼠术侧三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的蛋白表达水平。结果:建模前 3、1 d,各组大鼠机械痛阈值比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);建模后 1、3 d,与假手术组比较,模型组大鼠机械痛阈值明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),而模型组和盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠机械痛阈值两两比较的差异均无统计学意义($P>0.05$)。建模后 5~14 d,与假手术组比较,模型组大鼠机械痛阈值明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠机械痛阈值依次升高,呈剂量依赖性,差异均有统计学意义($P<0.05$)。术后第 15 日,与假手术组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量, CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA、蛋白表达水平均明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠三叉神经节组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量, CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA、蛋白表达水平依次降低,呈剂量依赖性,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:盐酸小檗碱可能通过下调 NLRP3 炎症小体信号通路减少炎症因子释放,降低术侧三叉神经节组织中 CGRP 表达水平,提高神经面部感觉区域的机械痛阈值,从而减轻 TN 对大鼠的损伤作用。

关键词 盐酸小檗碱; 三叉神经痛; NOD 样受体蛋白 3 炎症小体信号通路; 降钙素基因相关肽

Effects of Berberine Hydrochloride on Trigeminal Neuralgia in Rats Based on NLRP3 Inflammatory Signaling Pathway[△]

LIANG Zifei¹, WU Anshi², SHEN Wenzhen², WEI Changwei² (1. Dept. of Anesthesiology, Beijing Chaoyang Emergency Center, Beijing 100020, China; 2. Dept. of Anesthesiology, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the effects of berberine hydrochloride on the inflammatory signaling pathway of NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) in rats with trigeminal neuralgia (TN) and its protective effect on TN rats. **METHODS:** TN rat model was made by chronic constriction injury of infraorbital nerve model (ION-CCI) method. The successfully modeled rats were randomly divided into the model group, low-dose group, medium-dose group and high-dose group of berberine hydrochloride (25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg), with 15 rats in each group. Another 15 rats (only the infraorbital nerve was isolated, without ligation) were taken as the sham operation group. The sham operation group and the model group were given the same amount of normal saline by gavage. The other groups received the corresponding dose of berberine hydrochloride by gavage with the volume of 10 ml/kg, once a day for 14 d. The mechanical pain threshold of facial innervation at different time points were measured by electronic pain tester. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in trigeminal ganglia of rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression level of calcitonin gene-related peptide (CGRP), NLRP3, apoptosis-related speckle-like protein (ASC) and caspase-1 mRNA in the trigeminal ganglion

[△] 基金项目:北京市科学技术委员会科研计划项目(No. D191100002137014)

* 主治医师。研究方向:麻醉学基础与临床研究。E-mail:liangzifei873@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:麻醉学基础与临床研究。E-mail:3275524731@qq.com

tissues of rats were detect by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). And the expression level of CGRP, NLRP3, ASC and caspase-1 protein in trigeminal ganglia were detected by Western Blot. RESULTS: Before modeling of 3 d and 1 d, there was no statistically significant difference in mechanical pain threshold among four groups ($P>0.05$). After modeling of 3 d and 1 d, compared with the sham operation group, the mechanical pain threshold in the model group decreased, with statistically significant difference ($P<0.05$), and there was no statistically significant difference between the model group and low-dose group, medium-dose group and high-dose group of berberine hydrochloride ($P>0.05$). After modeling of 5 to 14 d, compared with the sham operation group, the mechanical pain threshold in the model group decreased, with statistically significant difference ($P<0.05$); compared with the model group, the mechanical pain threshold of low-dose group, medium-dose group and high-dose group of berberine hydrochloride increased in turn with dose-dependent ($P<0.05$). On the 15th d after surgery, compared with the sham operation group, the level of IL-1 β , TNF- α and the expression level of mRNA and protein in CGRP, NLRP3, ASC and caspase-1 in trigeminal ganglion tissue of the rats in the model group increased, with statistically significant difference ($P<0.05$); compared with the model group, the level of IL-1 β , TNF- α and the mRNA and protein expression level of CGRP, NLRP3, ASC and caspase-1 in the trigeminal ganglion tissue of the rats in the low-dose group, medium-dose group and high-dose group of berberine hydrochloride decreased in turn with dose-dependent ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Berberine hydrochloride may reduce the release of inflammatory factors by down-regulating the signal pathway of NLRP3 inflammatory corpuscle, decrease the expression level of CGRP in trigeminal ganglion tissues, and increase the mechanical pain sensitivity threshold of the neurofacial sensory area, so as to reduce the injury of TN on rats.

KEYWORDS Berberine hydrochloride; Trigeminal neuralgia; NOD-like receptor protein 3 inflammatory corpuscle signaling pathway; Calcitonin gene-related peptide

三叉神经痛(trigeminal neuralgia, TN)是指机体三叉神经分布区域由于受到某些触觉刺激,如说话、洗脸及刷牙等,引发的剧烈疼痛,有时会附带面部的痛性痉挛,中老年女性易患该病^[1]。TN易发生于面部右侧,可对患者身体健康造成严重影响,亦会影响患者的精神生活^[2]。一般情况下,机体为维持局部生理平衡,末梢神经中包含着各种非神经细胞,当神经受到损伤时,这些细胞会释放白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等炎症因子,引起神经组织产生相关递质,在痛觉传递神经处产生作用,使痛阈降低,产生疼痛^[3]。NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体为胞内模式识别受体,可激发调节免疫及炎症反应,由 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和胱天蛋白酶 1(caspase-1)组成通路,对各种炎症反应具有一定调节作用^[4]。降钙素基因相关肽(CGRP)在血管扩张和痛觉传导中有重要作用,近年来研究结果表明,CGRP 与 TN 的发生密切相关^[5,6]。盐酸小檗碱是从中药黄连中分离而来,为黄连的主要有效成分,具有抗菌、抗肿瘤、抗肺结核以及消炎等功效^[7]。但是,其对 TN 的治疗作用尚不明确。本研究通过制备 TN 模型大鼠,分析盐酸小檗碱对 TN 模型大鼠的作用及对 NLRP3 炎症小体信号通路的影响,以期明确其具体机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器:Electric Von Frey 型电子测痛仪(天津仪数科技有限公司);ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);TL988 型 qRT-PCR 仪(西安天隆科技有限公司);Gel Doc XR+型蛋白凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.1.2 药品与试剂:盐酸小檗碱(原料药,纯度 98.5%,长沙祯祥生物科技有限公司,批号为 633-65-8);IL-1 β 酶联免疫吸

附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、TNF- α ELISA 试剂盒(美国 Sigma 公司,批号为 RAB3219、RAB0328);RNA 抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号为 DP419);逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号为 RRO37 A);实时荧光定量聚合酶链式反应(real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(美国 Genecopoeia 公司,批号为 QP115);蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo 公司,批号分别为 C510003、C503021);兔抗鼠 CGRP、NLRP3、ASC、caspase-1 及 β -肌动蛋白(β -actin)一抗(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab5419、ab3520、ab3518、abB3517 及 ab3508);聚偏氟乙烯(PVDF)膜、羊抗鼠 IgG 二抗(上海生工生物工程有限公司,批号分别为 F619537、D110098)。

1.1.3 动物:SPF 清洁级雄性 SD 大鼠 75 只,周龄 8~9 周,体重 220~250 g,购于浙江中医药大学动物实验中心,动物生产许可证号为 SCXK(浙)2019-0012,动物使用许可证号为 SYXK(浙)2019-0031,动物质量合格证号为 191103057。

1.2 方法

1.2.1 动物建模、分组及给药:实验前 1 周,使用电子测痛仪适应性刺激大鼠三叉神经支配区域,使大鼠适应后痛阈 >26 ,每日连续 5 次。随机取 15 只大鼠设为假手术组,剩下 60 只大鼠均采用眶下神经缩窄术(ION-CCI)^[8]制备 TN 大鼠模型,即腹腔注射水合氯醛(3 ml/kg)100 g/L 麻醉,剔除大鼠右侧面部全部毛发并用酒精消毒,于大鼠眶下缘 3~4 mm 处,紧贴鼻根,沿鼻骨方向长约 3~5 mm 处切口,分离出 2 条眶下神经(相隔约 1 mm),使用 4-0 烙制羊肠线结扎(假手术组仅分离眶下神经,不结扎,其于操作步骤与上述相同)。将建模成功的大鼠随机分为模型组、盐酸小檗碱低剂量组、盐

酸小檗碱中剂量组及盐酸小檗碱高剂量组,每组 15 只。盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠分别予以盐酸小檗碱溶液 25、50 及 100 mg/kg 灌胃^[9],假手术组和模型组大鼠则分别予以等量 0.9%氯化钠溶液灌胃,灌胃体积 10 ml/kg,1 日 1 次,共给药 14 d。手术过程中,所用物品均高压灭菌,术后常规饲养。

1.2.2 机械痛阈值的测定:各组大鼠分别在建模前 3 d、建模前 1 d 行机械刺激适应,建模成功后 1 d 开始,每间隔 1 d 用电子测痛仪刺激眶下神经分布区域^[10]。每只大鼠刺激 6 次,每次间隔 1 min。当大鼠出现以下任何一种行为学变化时记为阳性反应,①退缩反应,受刺激后动物表现为快速后退;②搔脸行为,连续搔抓面部刺激区域;③攻击行为,大鼠快速抓挠刺激物做出攻击动作。观察电子测痛仪数值,记录使大鼠产生阳性反应的强度最小值,即为术侧机械痛阈值。

1.2.3 大鼠术侧三叉神经节组织获取:术后第 15 日,应激实验完成后,各组大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(3 ml/kg)100 g/L 麻醉,实施安乐死,分离并收集大鼠术侧三叉神经节组织,平均分为 3 份并置于-80℃保存,分别用于后续 ELISA、qRT-PCR 和蛋白质免疫印迹(western blot, WB)实验研究。

1.2.4 ELISA 法分别测定术侧三叉神经节组织中 IL-1β、TNF-α 含量:从“1.2.3”项中的-80℃冰箱取出 1 份术侧三叉神经节组织,冰上融化,用 0℃、0.9%氯化钠溶液制成 5%匀浆后,于 4℃、1 200 r/min 下离心 15 min,取上清液。具体操作步骤按 ELISA 试剂盒说明书进行操作,测量样本 490 nm 处光密度值,根据标准曲线计算各组大鼠三叉神经节组织中 IL-1β、TNF-α 含量。

1.2.5 qRT-PCR 法检测术侧三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达情况:从“1.2.3”项中的-80℃冰箱取出 1 份术侧三叉神经节组织,冰上融化,采用 RNA 抽提试剂盒提取各组大鼠神经节组织总 RNA,用逆转录试剂盒得到 cDNA,以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒说明书配置 PCR 反应体系,即 2×SYBR mix 10 μl, H₂O 8 μl,上下游引物各 0.5 μl, 10×cDNA 模板 1 μl。反应条件设定为 95℃预变性 5 min, 95℃变性 15 s, 60℃退火 50 s, 40 个循环, 72℃延伸 10 min。分别以 GAPDH 作为内参,根据 2^{-ΔΔCt} 算法

计算 mRNA 表达水平。CGRP、NLRP3、ASC、caspase-1 及 GAPDH 引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab 1 qRT-PCR primer sequence

引物名称	方向	序列(5'-3')
CGRP	F	CTCTAGTGTCACTGCCAGAA
	R	CTTCAGACCCCAATTGGT
NLRP3	F	CTGCTCTGCTGGATTGTGTG
	R	GTCCACCTCCTTCTGGAACA
ASC	F	TGGAGTCGTATGGCTTGGAG
	R	TGTCCTTCAGTCAGCACACT
caspase-1	F	ACTCGTACACGCTCTTGCCCTC
	R	CTGGGCAGGCAGCAAAATTC
GAPDH	F	AAATGCTGAAGGTCGGTGTG
	R	TGAAGGGTTCGTTGATGG

1.2.6 WB 法检测术侧三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 蛋白表达情况:从“1.2.3”项中的-80℃冰箱取出 1 份大鼠术侧三叉神经节组织,提取总蛋白并对蛋白进行定量。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,转 PVDF 膜,4℃下添加一抗 CGRP、NLRP3、ASC、caspase-1 和 β-actin 抗体(均为 1:500),孵育过夜。洗涤后添加羊抗鼠 IgG 二抗(稀释比 1:5 000)常温孵育 2 h。以 β-actin 为内参,采用 Tanon 600 图像分析系统分析 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 蛋白水平。

1.3 统计学方法

本研究所得数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)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 SNK-*q* 检验;*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠建模前后机械痛阈值比较

建模前 3 d,各组大鼠机械痛阈值比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);建模后 1、3 d,与假手术组比较,模型组大鼠机械痛阈值降低,差异有统计学意义(*P*<0.05),而模型组和盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠两两比较的差异无统计学意义(*P*>0.05);建模后 5~14 d,与假手术组比较,模型组大鼠机械痛阈值降低,与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠机械痛阈值依次升高,呈剂量依赖性,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 2。

表 2 各组大鼠建模前后机械痛阈值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	药物剂量/ (mg/kg)	机械痛阈值/g								
		建模前 3 d	建模前 1 d	建模后 1 d	建模后 3 d	建模后 5 d	建模后 7 d	建模后 9 d	建模后 11 d	建模后 14 d
假手术组(<i>n</i> =15)	0	27.03±2.01	26.98±3.27	27.03±3.01	27.12±3.72	27.11±3.16	26.96±2.84	26.98±2.68	27.10±2.90	27.17±2.73
模型组(<i>n</i> =15)	0	26.93±2.37	27.01±3.05	12.93±2.99 ^a	10.14±2.85 ^a	10.07±1.03 ^a	9.81±0.97 ^a	9.03±0.89 ^a	8.78±0.88 ^a	8.24±0.92 ^a
盐酸小檗碱低剂量组(<i>n</i> =15)	25	26.97±3.25	27.01±3.31	12.09±2.87	10.13±1.98	11.95±3.07 ^b	15.34±1.67 ^b	18.34±2.09 ^b	22.37±3.07 ^b	24.09±2.54 ^b
盐酸小檗碱中剂量组(<i>n</i> =15)	50	26.91±3.02	27.00±2.31	11.91±2.01	10.44±2.17	13.36±1.21 ^{bc}	17.68±1.17 ^{bc}	21.09±2.39 ^{bc}	24.37±2.51 ^{bc}	25.04±2.04 ^{bc}
盐酸小檗碱高剂量组(<i>n</i> =15)	100	27.03±3.01	26.93±2.97	12.14±3.24	10.59±2.71	15.03±3.16 ^{bcd}	18.65±1.92 ^{bcd}	22.37±2.90 ^{bcd}	26.37±3.22 ^{bcd}	26.58±3.47 ^{bcd}

注:与假手术组比较,^a*P*<0.05;与模型组比较,^b*P*<0.05;与盐酸小檗碱低剂量组比较,^c*P*<0.05;与盐酸小檗碱中剂量组比较,^d*P*<0.05。
Note: vs. the sham operation group, ^a*P*<0.05; vs. the model group, ^b*P*<0.05; vs. the low-dose group of berberine hydrochloride, ^c*P*<0.05; vs. the medium-dose group of berberine hydrochloride, ^d*P*<0.05

2.2 盐酸小檗碱对大鼠三叉神经节组织中 IL-1β 和 TNF-α 含量的影响

与假手术组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 IL-1β、

TNF-α 含量明显升高;与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠三叉神经节组织中 IL-1β、TNF-α 含量依次降低,呈剂量依赖性,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 3。

表 3 各组大鼠三叉神经节组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量比较($\bar{x}\pm s$, ng/L)

组别	药物剂量/(mg/kg)	IL-1 β	TNF- α
假手术组($n=15$)	0	1.21 $\pm$ 0.32	2.47 $\pm$ 0.38
模型组($n=15$)	0	9.39 $\pm$ 0.40 ^a	17.35 $\pm$ 0.54 ^a
盐酸小檗碱低剂量组($n=15$)	25	6.72 $\pm$ 0.38 ^b	12.59 $\pm$ 0.51 ^b
盐酸小檗碱中剂量组($n=15$)	50	4.87 $\pm$ 0.31 ^{bc}	7.74 $\pm$ 0.50 ^{bc}
盐酸小檗碱高剂量组($n=15$)	100	2.19 $\pm$ 0.34 ^{bcd}	3.67 $\pm$ 0.48 ^{bcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与盐酸小檗碱低剂量组比较,^c $P<0.05$;与盐酸小檗碱中剂量组比较,^d $P<0.05$ 。

Note: vs. the sham operation group, ^a $P<0.05$; vs. the model group, ^b $P<0.05$; vs. the low-dose group of berberine hydrochloride, ^c $P<0.05$; vs. the medium-dose group of berberine hydrochloride, ^d $P<0.05$

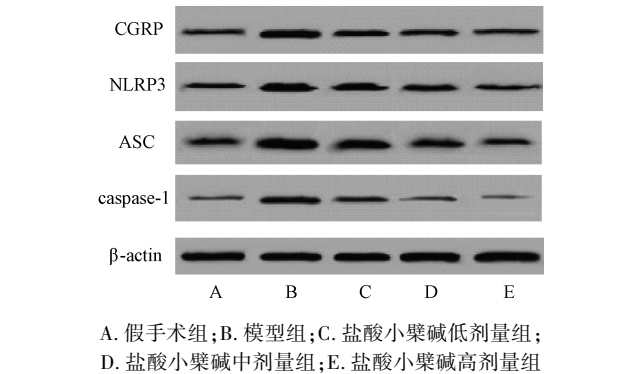
表 4 各组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Comparison of expression levels of mRNA in CGRP, NLRP3, ASC, and caspase-1 in trigeminal ganglion tissues among four groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	药物剂量/(mg/kg)	CGRP mRNA	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	caspase-1 mRNA
假手术组($n=15$)	0	0.97 $\pm$ 0.10	1.03 $\pm$ 0.11	0.98 $\pm$ 0.13	0.95 $\pm$ 0.10
模型组($n=15$)	0	3.10 $\pm$ 0.32 ^a	2.48 $\pm$ 0.26 ^a	2.29 $\pm$ 0.2 ^a	2.02 $\pm$ 0.21 ^a
盐酸小檗碱低剂量组($n=15$)	25	2.26 $\pm$ 0.25 ^b	1.91 $\pm$ 0.21 ^b	1.58 $\pm$ 0.17 ^b	1.49 $\pm$ 0.15 ^b
盐酸小檗碱中剂量组($n=15$)	50	1.58 $\pm$ 0.17 ^{bc}	1.46 $\pm$ 0.16 ^{bc}	1.26 $\pm$ 0.14 ^{bc}	1.18 $\pm$ 0.13 ^{bc}
盐酸小檗碱高剂量组($n=15$)	100	1.05 $\pm$ 0.11 ^{bcd}	1.12 $\pm$ 0.12 ^{bcd}	1.07 $\pm$ 0.11 ^{bcd}	1.03 $\pm$ 0.12 ^{bcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与盐酸小檗碱低剂量组比较,^c $P<0.05$;与盐酸小檗碱中剂量组比较,^d $P<0.05$

Note: vs. the sham operation group, ^a $P<0.05$; vs. the model group, ^b $P<0.05$; vs. the low-dose group of berberine hydrochloride, ^c $P<0.05$; vs. the medium-dose group of berberine hydrochloride, ^d $P<0.05$



A. sham operation group; B. model group; C. low-dose group of berberine hydrochloride; D. medium-dose group of berberine hydrochloride; E. high-dose group of berberine hydrochloride

图 1 WB 法检测各组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的蛋白表达情况

Fig 1 Expression levels of protein in CGRP, NLRP3, ASC and caspase-1 in trigeminal ganglion tissues detected by WB

3 讨论

TN 是神经病理性疼痛,局部节段性脱髓鞘改变为其主要病理特征^[11]。CGRP 是一种舒张血管的神经肽,对神经节间的痛觉传递起重要作用,在中枢神经、外周神经和感觉神经节内均有表达^[12-14]。CGRP 受体由 3 个部分组成,分别为降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 1 和受体组分蛋白。研究结果表明,CGRP 与 TN、颜面部疼痛、痛觉过敏和偏头痛都有密切关系,但具体分子机制尚不清楚。本研究采用 ION-CCI 建立 TN 大鼠模型,该模型操作简单易行,能较好地模拟临床三叉神

2.3 盐酸小檗碱对大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA、蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达水平显著升高;与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达水平依次降低,呈剂量依赖性,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 4。与假手术组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 蛋白表达水平显著升高;与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 蛋白表达水平依次降低,呈剂量依赖性,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5、图 1。

经受压迫引起的痛觉超敏现象,结果显示,建模前 3 d 和前 1 d,各组大鼠机械痛阈值的差异无统计学意义($P>0.05$);而建模后 5~14 d,与假手术组比较,模型组大鼠机械痛阈值显著降低,且建模后第 15 日,与假手术组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 CGRP 的 mRNA、蛋白表达显著升高,与以往研究结果相符^[15-16],说明 TN 大鼠模型制备成功。给予盐酸小檗碱药物处理后,与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠机械痛阈值依次升高,三叉神经节组织中 CGRP 的 mRNA、蛋白表达依次降低且呈剂量依赖性,提示盐酸小檗碱能降低三叉神经节组织 CGRP 的 mRNA、蛋白表达量,减少神经节间的痛觉传递,增加 TN 大鼠机械痛阈值,在一定程度上保护大鼠免受 TN 带来的伤害。

张学智等^[17]的研究结果发现,TN 患者部分髓鞘受压迫后变薄,与一般的神经病变相似,可在三叉神经病变中产生炎症反应,进而引起神经胶质细胞浸润、轴索变性、雪旺细胞增生和炎症细胞浸润等。三叉神经节中炎症反应的关键转录因子核因子 κ B (NF- κ B) 可诱导 NLRP3 炎症小体信号通路的激活,该通路可进一步促使机体释放大量相关炎症因子^[18]。本研究结果发现,与假手术组比较,模型组大鼠三叉神经节组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量显著增高,提示 NLRP3 炎症小体信号通路控制的炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 在 TN 发生发展中发挥了重要作用。NLRP3 炎症小体是能够参与机体固有免疫,觉察体内微生物代谢物变化和应激反应,识别炎症刺激信号,调控炎症因子产生、释放的蛋白复合物^[19]。张婷等^[20]的研究结果发现,脊髓背角中 IL-1 β 、TNF- α 在神经病理性痛大鼠模型中起传递痛觉的作用。马腾飞等^[21]的研究结果发现,经眶下孔注射相关炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 可制造大鼠 TN 模型。本研究发现,

表5 各组大鼠三叉神经节组织中 CGRP、NLRP3、ASC 及 caspase-1 的蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab 5 Comparison of expression levels of protein in CGRP, NLRP3, ASC and caspase-1 in the trigeminal ganglion tissues among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	药物剂量/(mg/kg)	CGRP β -actin	NLRP3 β -actin	ASC β -actin	caspase-1 β -actin
假手术组($n=15$)	0	0.25 $\pm$ 0.03	0.12 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.01
模型组($n=15$)	0	0.93 $\pm$ 0.11 ^a	0.89 $\pm$ 0.09 ^a	0.98 $\pm$ 0.11 ^a	0.76 $\pm$ 0.08 ^a
盐酸小檗碱低剂量组($n=15$)	25	0.52 $\pm$ 0.06 ^b	0.56 $\pm$ 0.06 ^b	0.79 $\pm$ 0.08 ^b	0.42 $\pm$ 0.05 ^b
盐酸小檗碱中剂量组($n=15$)	50	0.39 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.29 $\pm$ 0.03 ^{bc}	0.43 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.19 $\pm$ 0.03 ^{bc}
盐酸小檗碱高剂量组($n=15$)	100	0.23 $\pm$ 0.03 ^{bcd}	0.18 $\pm$ 0.02 ^{bcd}	0.21 $\pm$ 0.03 ^{bcd}	0.05 $\pm$ 0.02 ^{bcd}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与盐酸小檗碱低剂量组比较,^c $P<0.05$;与盐酸小檗碱中剂量组比较,^d $P<0.05$

Note: vs. the sham operation group, ^a $P<0.05$; vs. the model group, ^b $P<0.05$; vs. the low-dose group of berberine hydrochloride, ^c $P<0.05$; vs. the medium-dose group of berberine hydrochloride, ^d $P<0.05$

盐酸小檗碱处理的大鼠三叉神经节组织中 IL-1 β 、TNF- α 含量显著依次降低,呈剂量依赖性,提示盐酸小檗碱可减轻炎症反应。姜开洋等^[22]的研究结果发现,IL-1 β 、TNF- α 在气滞血瘀证原发性 TN 患者神经节内表达水平上调,与 TN 引起的炎症反应有关。本研究结果显示,模型组大鼠三叉神经节组织中 NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA、蛋白表达水平均高于假手术组;与模型组比较,盐酸小檗碱低、中及高剂量组大鼠三叉神经节组织中 NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA、蛋白表达水平依次减少,呈剂量依赖性,提示盐酸小檗碱可能通过抑制 NLRP3 炎症小体信号通路,减轻 TN 大鼠三叉神经节组织中炎症反应,从而缓解 TN 大鼠的症状。

综上所述,盐酸小檗碱可能通过抑制 NLRP3 炎症小体信号通路,降低 TN 大鼠机械痛阈值以及神经肽 CGRP 的表达,减轻炎症反应,从而减轻神经节间的痛觉传递,进而对 TN 大鼠起到一定的保护作用。

参考文献

- [1] Ayele BA, Mengesha AT, Zewde YZ. Clinical characteristics and associated factors of trigeminal neuralgia: experience from Addis Ababa, Ethiopia[J]. BMC Oral Health, 2020, 20(1): 244.
- [2] Cruccu G, Di Stefano G, Truini A. Trigeminal Neuralgia[J]. N Engl J Med, 2020, 383(8): 754-762.
- [3] 李秋月, 许海玉, 杨洪军. 促炎因子 TNF- α , IL-1 β , IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3709-3712.
- [4] 张燕子, 隋晓露, 许云鹏, 等. NLRP3 炎症小体信号通路对痛风性肾病的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2018, 34(5): 387-388.
- [5] Frederiksen SD, Warfvinge K, Ohlsson L, et al. Expression of Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide, Calcitonin Gene-related Peptide and Headache Targets in the Trigeminal Ganglia of Rats and Humans[J]. Neuroscience, 2018, 393: 319-332.
- [6] 郜丽琴, 杜玉敏, 郝露露, 等. 降钙素基因相关肽和 P 物质在原发性三叉神经痛发作过程中的作用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(10): 744-748.
- [7] 王景, 葛静, 王旭, 等. 盐酸小檗碱对宫颈癌 HeLa 细胞分泌物的影响及其机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2020, 46(4): 779-785.
- [8] 刘丽娟, 尹灿灿, 关书, 等. 三叉神经痛大鼠三叉神经节中 BDNF 的表达变化[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(4): 576-580.
- [9] 马竞, 何文龙, 高重阳, 等. 盐酸小檗碱对脂多糖诱导的大鼠急性脑损伤后脑组织形态学和 NF- κ B 活性的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(21): 2582-2586.
- [10] 熊樱岚, 罗晓, 李欣, 等. Cx43 及 GLT-1 对三叉神经痛大鼠疼痛行为学变化的调控作用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(2): 89-95.
- [11] Wu M, Fu X, Ji Y, et al. Microvascular decompression for classical trigeminal neuralgia caused by venous compression novel anatomical classifications and surgical strategy[J]. World Neurosurg, 2018, 113: e707-e713.
- [12] Wattiez AS, Sowers LP, Russo AF. Calcitonin gene-related peptide (CGRP): role in migraine pathophysiology and therapeutic targeting[J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(2): 91-100.
- [13] Neychev D, Shirkova T, Ivanovska M, et al. Correlation between CGRP levels and the neuropathic and inflammatory component of postoperative pain[J]. Folia Med (Plovdiv), 2020, 62(2): 365-371.
- [14] 陈文佳, 孟晓文, 王丽娜, 等. 神经病理性痛大鼠背根神经节神经元 IB4 和 CGRP 表达的变化[J]. 中华麻醉学杂志, 2018, 38(10): 1224-1226.
- [15] Messlinger K. The big CGRP flood-sources, sinks and signalling sites in the trigeminovascular system[J]. J Headache Pain, 2018, 19(1): 22.
- [16] Edvinsson L. The Trigemino-vascular Pathway: Role of CGRP and CGRP Receptors in Migraine: CGRP and CGRP Receptors in Migraine[J]. Headache, 2017, 57(Suppl 2): 47-55.
- [17] 张学智, 苏旭, 张永豪, 等. 三叉神经痛周围支神经阻滞的研究进展[J]. 中国实验诊断学, 2019, 23(3): 558-560.
- [18] 杨毅, 韩晨阳, 郭丽, 等. 米诺环素抑制卫星胶质细胞激活对于三叉神经痛大鼠模型镇痛机制的研究[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(7): 656-661.
- [19] Lee DW, Kim JS, Kim IY, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation induces acute renal inflammation through activation of caspase-1 and NLRP3 inflammasome[J]. Anatol J Cardiol, 2019, 21(3): 134-141.
- [20] 张婷, 孙凯, 张法强, 等. 鞘内注射 SOCS3 对神经病理性疼痛模型小鼠痛行为及脊髓促炎因子表达的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志, 2018, 27(10): 865-869.
- [21] 马腾飞, 王霁蕾, 黄姗姗, 等. 经眶下孔注射相关炎症因子制造大鼠三叉神经痛模型的实验研究[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(6): 753-756.
- [22] 姜开洋, 郑喜胜, 董莉丽. 疏肝通窍汤辅助治疗气滞血瘀证原发性三叉神经痛的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 190-194.

(收稿日期: 2020-11-05)