

白脉软膏对慢性炎症性疼痛小鼠外周敏化的干预作用

杨菲^{1,2}, 周方婷¹, 宗瑛¹, 毛霞¹, 万红叶³, 邹钊¹, 李玮婕¹, 明瑞蕊^{1,2},
方罗昌婷^{1,2}, 梁婷钧¹, 刘毓东¹, 苏晓慧¹, 王震⁴, 刘翠哲², 王超^{1*}, 林娜^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 承德医学院 中药研究所, 河北 承德 067000;
3. 中国中医科学院 针灸研究所, 北京 100700; 4. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 慢性炎症性疼痛以周围敏化为主要表现形式,藏族药经典外用方剂白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛临床疗效确切,但其缓解周围敏化的药效学及机制尚不明确。该研究拟建立完全弗氏佐剂诱导的慢性炎症性疼痛动物模型,并采用行为学检测、副作用评估、网络分析及实验验证等方法探讨白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的药效及机制。药效学研究表明白脉软膏可剂量依赖性提高慢性炎症性疼痛小鼠致炎足机械痛敏及热辐射痛敏阈值且无耐受性,对足肿胀、炎症介质及 TRPV1、TRPA1 的表达也有明确的抑制作用;体质量监测、正常小鼠痛敏阈值检测、轮替、强迫游泳实验等结果显示白脉软膏无明显毒副作用;根据白脉软膏基原药材药效、主要成分含量、ADME 参数等纳入的 51 个候选活性分子网络分析显示,白脉软膏对慢性炎症性疼痛的抑制作用与调节 TNF、T 细胞受体信号通路核心调控元件相关;进一步实验研究表明,白脉软膏可有效下调小鼠足跖部组织 MAPK14、MAPK1、PTGS2 的蛋白表达,并上调 GSK3B 的磷酸化水平。综上,白脉软膏可有效缓解慢性炎症性疼痛的周围痛敏且无耐受性及明显的毒副作用,相关机制可能与白脉软膏调控周围组织 TNF 及 T 细胞受体信号通路的核心调控元件相关。

[关键词] 白脉软膏; 慢性炎症性疼痛; 周围敏化; 网络分析; TNF 信号通路; T 细胞信号通路; 机制

Therapeutic effect of Baimai Ointment on peripheral sensitization of chronic inflammatory pain in mice

YANG Fei^{1,2}, ZHOU Fang-ting¹, ZONG Ying¹, MAO Xia¹, WAN Hong-ye³, ZOU Zhao¹, LI Wei-jie¹, MING Rui-rui^{1,2},
FANG Luo-chang-ting^{1,2}, LIANG Ting-jun¹, LIU Yu-dong¹, SU Xiao-hui¹, WANG Zhen⁴, LIU Cui-zhe², WANG Chao^{1*}, LIN Na^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, Chengde Medical University, Chengde 067000, China;
3. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
4. Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Chronic inflammatory pain is mainly manifested by peripheral sensitization. Baimai Ointment (BMO), a classical Tibetan medicine for external use, has good clinical efficacy in the treatment of chronic inflammatory pain, while its pharmacodynamics and mechanism for relieving peripheral sensitization remain unclear. This study established an animal model of chronic inflammatory pain induced by complete Freund's adjuvant to explore the mechanism of BMO in the treatment of chronic inflammatory pain by behavioral test, side effect assessment, network analysis, and experimental verification. The pharmacodynamics experiment showed that BMO increased the thresholds of mechanical pain sensitivity and thermal radiation pain sensitivity of chronic inflammatory pain mice in a dose-dependent manner, and had inhibitory effect on foot swelling, inflammatory mediator, and the expression of transient receptor potential

[收稿日期] 2022-06-18

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目 (C12021A03808); 中国中医科学院中药研究所技术研发项目 (20210701)

[通信作者] * 王超, 博士, 副研究员, 副主任医师, 主要从事中药药理与临床研究, Tel: (010) 64032658, E-mail: cwang@icmm.ac.cn; * 林娜, 博士, 研究员, 主要从事抗炎免疫中药药理研究, Tel: (010) 64032658, E-mail: nlin@icmm.ac.cn

[作者简介] 杨菲, 硕士研究生, 主要从事中药学研究, E-mail: yangfei20210521@163.com

vanilloid-1 (TRPV1) and transient receptor potential A1 (TRPA1). The results of body weight monitoring, pain sensitivity threshold detection in normal mice, rotarod performance test, and forced swimming test showed that BMO had no obvious toxic or side effect. The network analysis of 51 candidate active molecules selected according to the efficacy of BMO, content of main components, and ADME parameters showed that the inhibitory effect of BMO on chronic inflammatory pain was associated with the core regulatory elements of tumor necrosis factor (TNF) and T cell receptor signaling pathways. BMO down-regulated the protein levels of mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14), MAPK1, and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and up-regulated the phosphorylation level of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B) in the plantar tissue of mice. In conclusion, BMO can effectively relieve peripheral sensitization of chronic inflammatory pain without inducing tolerance and obvious toxic and side effects. The relevant mechanism may be related to the regulation of BMO on core regulatory elements of TNF and T cell receptor signaling pathways in surrounding tissues.

[Key words] Baimai Ointment; chronic inflammatory pain; peripheral sensitization; network analysis; TNF signaling pathway; T cell signaling pathway; mechanism

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220715.701

白脉软膏始载于《藏医临床札记》,为著名藏族医学家贡曼贡确班达根据藏族医学理论创制。白脉软膏是由姜黄、肉豆蔻、甘松、干姜、藏茴香、藏菖蒲、花椒、人工麝香、碱花、甘草等 11 味药物配合辅料组成的水包油外用软膏,其气芳香,易吸收,具舒筋活络、解痉止痛之功,临床治疗神经损伤、慢性疼痛等疗效独特,可改善中风后硬瘫、软瘫^[1-3],也可缓解三叉神经痛、坐骨神经痛等^[4];对骨关节炎、类风湿性关节炎、肩周炎、肌筋膜疼痛综合征等慢性炎症性疼痛亦有良效^[5-8]。先前的药理研究显示^[9-11]白脉软膏能降低脑缺血大鼠脑组织 P38 MAPK 和 GAP-43 的表达,其含药血浆对体外培育的大鼠退变滑膜细胞和软骨细胞体外分泌的炎症因子及骨代谢相关蛋白也有一定调节作用。然而,白脉软膏对慢性炎症性疼痛敏化的干预作用如何,至今尚未见报道。已知以周围组织炎性细胞为主的 MAPK、TNF 等信号通路活化并释放炎症介质诱导瞬态电压感受器(transient receptor potentials, TRPs)相关离子通道敏化是周围敏化的重要机制。课题组前期已通过生物信息学分析整合组方规律发掘的方法探索了白脉软膏治疗白脉病(神经病理性疼痛和炎症性疼痛等)的可能作用机制及其功效组配伍特点^[12],本研究拟以此为基础,通过整体动物实验证明白脉软膏对慢性炎症性疼痛的改善作用,并从外周敏化角度探索相关机制。相关研究结果可望为白脉软膏的临床合理应用提供参考,也有助于揭示藏族医药理论的科学内涵。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 ICR 小鼠购自北京斯贝福实验动物科技有限公司,SPF 级,体质量(20±2)g,适应性

饲养 1 周,许可证号 SCXK(京)2019-0010。饲养于中国中医科学院实验动物中心,自由摄食饮水,12 h 光照,室温(22±1)℃,湿度 55%±2%。所有实验均符合国家实验动物福利伦理的相关规定,编号为 2022B089。

1.2 药物、试剂及仪器 白脉软膏(西藏奇正藏药股份有限公司,批号 Z20043178);双氯芬酸二乙胺乳胶剂(扶他林,北京诺华制药有限公司,批号 H19990291)。

完全弗氏佐剂(CFA, Sigma-Aldrich 公司,批号 7009);RIPA 裂解液(Beyotime 公司,批号 P0013B);Bradford 蛋白定量试剂盒、一抗稀释液、Triton X-100(普利莱基因技术有限公司,批号 P1510、C1243、A1009);山羊血清抗体封闭原液(北京索莱宝科技有限公司,批号 SL038);细胞外蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、磷酸化 ERK(p-ERK)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、瞬时受体电位香草酸受体 1(transient receptor potential vanilloid subfamily member1, TRPV1)、瞬时受体电位阳离子通道亚家族 A 成员 1(transient receptor potential cation channel subfamily A member 1, TRPA1)抗体、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 488)、山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 594)(Abcam 公司,批号分别为 ab17942、b201015、ab179800、ab6166、ab62053、ab150077、ab150080);P38 丝裂原激活蛋白激酶(P38 mitogen-activated protein kinase, P38 MAPK,简称为 P38)、磷酸化 P38 MAPK(p-P38 MAPK,简称为 p-P38)、磷酸化糖原合成酶激酶 3β(p-glycogen synthase kinase-3β, p-GSK-3β)、GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白

白(Ig)G(CST 公司,批号分别为 8690T、4511T、9323T、2118s、7074s)。

足底红外热刺激仪(UGO Basile 公司);Von frey filament(Aesthesio 公司);PV-200 足跖容积测量仪(成都泰盟软件有限公司);KP-3000 科德士宠物用电推剪(深圳科德士电器有限公司);BS224S 电子天平(德国赛多利斯公司);MK3 全自动酶标仪(Thermo 公司);TD5A-WS 低速台式离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);Power PacBasic 电泳仪和转膜仪(Bio-Rad 公司);Mini Trans-Blot® Cell 转移电泳槽(Bio-Rad 公司);TS-1 摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);Fusion FX5 凝胶成像仪(Vilber 公司);CM3050 冰冻切片机(Leica 公司);CKX31 荧光倒置显微镜(Olympus 公司)。

1.3 慢性炎症性疼痛模型的建立、分组及给药 ICR 小鼠按体质量随机分为对照组,模型组,扶他林组(FTL,150 mg/只)及白脉软膏(BMO)低、中、高剂量组(30、90、300 mg/只),每组 8 只。于左后足足跖部皮下注射 CFA 20 μ L,对照组予等量生理盐水。造模 48 h 后,小鼠致炎足出现明显红肿现象且痛敏阈值明显下降,表明造模成功^[13],并开始给药。小鼠于给药前 1 d 腿、背部剃毛后脱毛,足、背部涂抹药物,轻柔按摩促进吸收并戴项圈防止动物舔食。

1.4 痛敏阈值的检测 使用 Von Frey Filament (0.008~4 g)时序性观测小鼠左后足足跖部机械痛敏阈值变化,Dixon's up and down 方法检测小鼠刺激时间内缩足、抖足、舔足等阳性反应并计算 50%缩足阈值^[14]。同时红外热刺激仪时序性观测小鼠足跖部热辐射痛敏阈值,检测时将一定强度红外辐射热源对准小鼠左侧足跖部正中并记录缩足潜伏时间。对照组小鼠基础热辐射潜伏时间调整为 9~12 s($t_{\text{cut-off}}=20$ s)^[15]。

1.5 足肿胀测定 足跖容积测量仪检测小鼠左后足给药前后体积变化,计算足跖肿胀度与抑制率。足跖肿胀度=给药前足跖容积-给药后足跖容积;足跖肿胀抑制率=足跖肿胀度/(给药前足跖容积-对照组足跖容积) $\times 100\%$ ^[16-17]。

1.6 取材 末次给药最佳药效时间点取材,戊巴比妥钠深度麻醉小鼠,生理盐水清洗致炎足后迅速剪掉,放入-80℃冰箱保存,用于 ELISA 和 Western blot 检测;动物戊巴比妥钠(10 mg·mL⁻¹)深度麻醉后,生理盐水(37℃)、4%多聚甲醛固定液(4℃)依

次灌注,立即剪取小鼠 L4~L6 腰椎,沿腹侧面中线剪开,剥离脊髓,显微镊小心剥离椎间孔附近腰 4/5 背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)备用检测 Western blot 和免疫荧光。

1.7 ELISA 检测 提取实验小鼠左后足足跖部皮肤组织蛋白,ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL5、CXCL1、PGE2 的含量。

1.8 Western blot 检测 提取实验小鼠左后足足跖部皮肤组织及 DRG 蛋白,Bradford 法定量,制备 SDS-PAGE 凝胶,上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗(TRPV1 为 1:1 000;GAPDH 为 1:2 000 稀释)、洗涤、孵育二抗、显影、凝胶成像仪成像,ImageJ 软件分析结果。

1.9 免疫荧光检测 DRG 组织 15%、30%蔗糖溶液梯度脱水,包埋后冰冻切片机切片(30 μ m),PBS(含 Triton X-100)漂洗,15 min $\times$ 3 次;0.5% Triton X-100/PBS 室温作用 1 h;5%山羊血清抗体封闭液(含 0.5% Triton X-100)室温封闭 2 h;一抗:anti-TRPV1(1:250);anti-TRPA1(1:75),4℃冰箱过夜;室温平衡 30 min;PBS(含聚山梨酯-20)漂洗,15 min $\times$ 3 次;二抗(100 μ L):山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor® 488)(1:250)和山羊抗兔 IgG H&L(Alexa Fluor® 594)(1:250),室温孵育 2 h,避光;PBS(含聚山梨酯-20),避光洗涤,后 PBS 洗涤;避光裱片,荧光显微镜拍片。

1.10 不良反应评估 监测给药后小鼠体质量变化;检测正常小鼠给药后基础痛敏阈值变化;轮替实验,疲劳转棒仪筛选 1 min 内不掉落的小鼠,适应性训练 3 d,30 r·min⁻¹转速测试白脉软膏最佳药效时间小鼠主轴停留时间($t_{\text{cut-off}}=5$ min);强迫游泳实验检测正常小鼠白脉软膏最佳药效时间小鼠游泳累计不动时间(水温 25℃,6 min,前 2 min 不记)。

1.11 网络分析 根据主要成分含量(主要成分或挥发油成分占药材提取物 1%左右)查找白脉软膏基原药材姜黄、肉豆蔻、甘松、干姜、藏茴香、藏菖蒲、花椒、人工麝香、甘草等 9 味药物的药效分子,并结合药物功效、文献报道、TCMSP 数据库 ADME 参数(OB $\geq 30\%$,DL ≥ 0.18)等筛选白脉软膏的候选活性成分。通过 TCMSP、Binding DB、PharmMapper^[18-20]等数据库收集候选活性分子靶标(收集时间 2022 年 1 月 1 日)。通过 Therapeutic Targets Database(TTD)^[21]、DrugBank^[22]、PharmGKB、OMIM、DisGeNET 等数据

库收集慢性炎症性疼痛基因集(收集时间 2022 年 1 月 1 日)。通过 DAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)数据库对交集靶标进行 GO 主要生物学过程与 KEGG 信号通路富集分析。综合富集分析结果、慢性炎症性疼痛发病机制及白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的药效学等筛选核心通路。通过计算核心通路中所有靶基因对应的候选活性分子数,筛选白脉软膏候选活性分子靶向较多的调控元件,并作为后续实验验证重点关注的对象,同时构建药物-候选活性分子-核心靶标网络拓扑分析图。

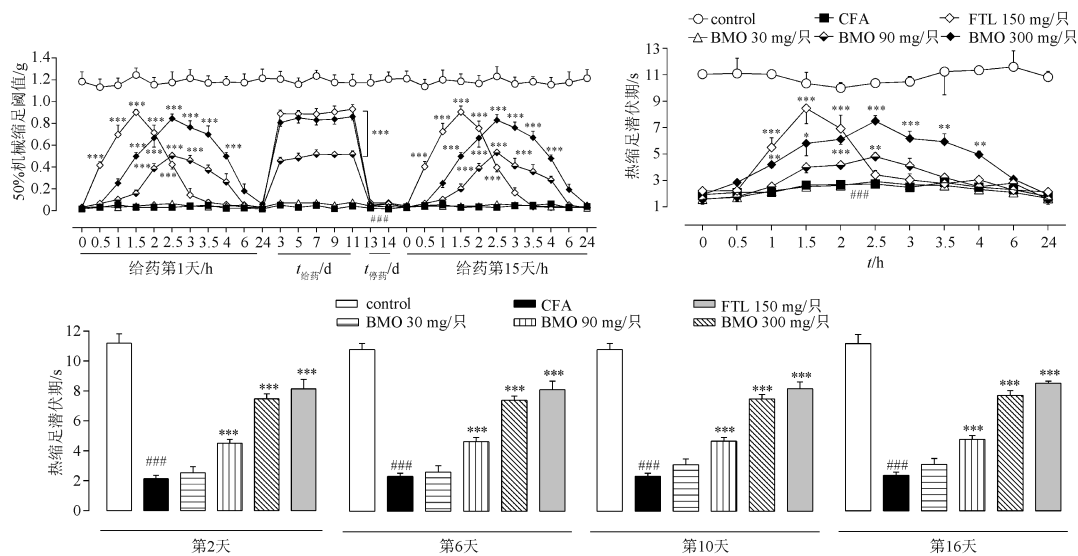
1.12 Western blot 检测 提取实验小鼠左后足足跖部皮肤组织蛋白, Bradford 法定量,制备 SDS-PAGE 凝胶,上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗(P38、p-P38、p-ERK、p-GSK3 β , 1:1 000 稀释; COX-2, 1:3 000 稀释; GAPDH, 1:2 000 稀释)、洗涤、孵育二抗,显影,凝胶成像仪成像,ImageJ 软件分析结果。

1.13 统计学分析 使用 GraphPad Prism 6 进行统计学分析,采用单因素方差分析或 t 检验,实验结果以均数 $\pm$ 标准误差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 认为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 白脉软膏对 CFA 小鼠机械痛敏及热辐射痛敏阈值的影响 与对照组相比,注射 CFA 48 h 后,小鼠机械痛敏阈值及热辐射痛敏阈值明显降低,造模成功。给药第 1 天,与模型组相比,白脉软膏(30、90、300 mg/只)可剂量依赖性提高 CFA 小鼠机械痛敏阈值,给药 2.5 h 镇痛效果最佳,高剂量镇痛药效时间至少维持 3 h 以上;扶他林(150 mg/只)最佳镇痛效果(用药后 1.5 h)与白脉软膏高剂量相当,其镇痛药效时间维持 2 h 左右。第 3、5、7、9、11 天各组最佳药效时间点镇痛效果与第 1 天相似,第 12 天给药后停药 24~48 h^[23-24],各给药组机械痛敏阈值回到基线,与 CFA 组相比无明显差异。第 15 天重新给药后,各组小鼠镇痛效果与第 1 天相似。给药第 2 天,白脉软膏及扶他林对 CFA 小鼠热辐射痛敏的时序性药效与第 1 天机械痛敏阈值检测结果类似,2、6、10、16 d 给药后最佳药效时间点热辐射检测结果与机械痛敏检测结果相似(图 1)。



control. 对照组;CFA. 模型组;FTL. 扶他林组;BMO. 白脉软膏组;与对照组相比 $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$;与模型组相比 $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ (图 3~6,图 9 同)。

图 1 白脉软膏对 CFA 小鼠机械痛敏阈值与热辐射痛敏阈值的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Fig. 1 Effect of Baimai Ointment on mechanical pain threshold and thermal radiation pain threshold of complete Freund's adjuvant (CFA)-induced mice ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

2.2 白脉软膏对 CFA 小鼠足肿胀与炎症介质表达的影响 与对照组相比,注射 CFA 48 h 后,小鼠左

后足部出现明显红肿。连续给药 16 d,与给药前相比,白脉软膏(30、90、300 mg/只)可剂量依赖性抑

制小鼠足肿胀;扶他林(150 mg/只)亦可明显抑制小鼠足肿胀(图2)。与对照组相比,CFA 组 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL5、CXCL1、PGE2 含量明显升高,白脉软膏可剂量依赖性(30、90、300 mg/只)降低以上炎症介质的表达(图3)。

2.3 白脉软膏对 CFA 小鼠足跖部组织与 DRG 中 TRPs 相关通道蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与对照组相比,CFA 小鼠足跖部及 DRG 中 TRPV1 蛋白表达显著升高;白脉软膏(30、90、300 mg/只)可剂量依赖性降低足跖部、DRG 中 TRPV1 的蛋白表达,扶他林(150 mg/只)亦可明显降低 TRPV1 的表达(图4)。免疫荧光结果表明,与对照组相比,CFA 小鼠 DRG 中 TRPV1、TRPA1 阳性细胞数目显著增多;白脉软膏(30、90、300 mg/只)可剂量

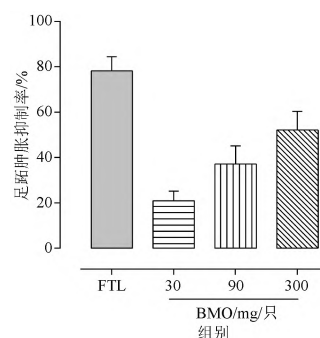
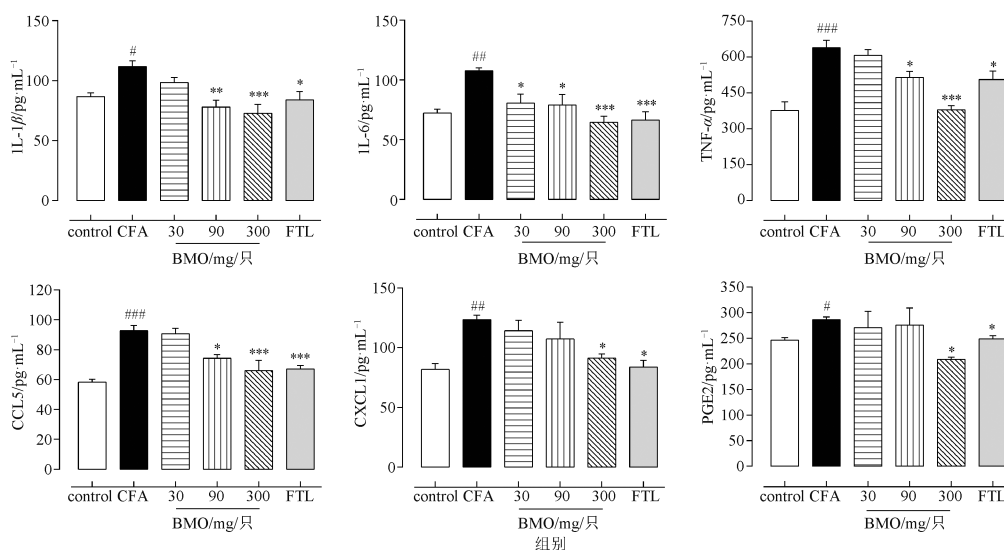


图2 白脉软膏对 CFA 小鼠足跖肿胀的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 2 Effect of Baimai Ointment on paw swelling of CFA-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

依赖性降低 TRPV1、TRPA1 阳性细胞数,扶他林(150 mg/只)亦可降低二者的阳性表达(图5)。



样本量为 4~6。

图3 白脉软膏对 CFA 小鼠足跖部组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL5、CXCL1、PGE2 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of Baimai Ointment on levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL5, CXCL1, and PGE2 in plantar tissue of CFA-induced mice ($\bar{x} \pm s$)

2.4 对白脉软膏毒副作用的观察 与对照组、模型组相比,白脉软膏(30、90、300 mg/只)连续给药 16 d,各组动物体质量无明显差异;给药 8、12、16 d 后,扶他林组小鼠(150 mg/只)体质量与对照组、模型组相比有统计学差异。与对照组相比,白脉软膏给药 2.5 h 后各组小鼠机械痛敏阈值及热辐射痛敏阈值无明显差异,同时白脉软膏对各组小鼠转棒停留时间及游泳不动时间亦无明显影响(图6)。

2.5 白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的网络分析 依

据前法描述的候选活性分子筛选与靶标收集原则,实验共纳入白脉软膏候选活性分子 51 个,获取潜在药物候选靶标 478 个,相关疾病基因 494 个,交集得到 105 个白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的基因靶标。

交集靶基因 GO 富集分析结果显示,白脉软膏靶标主要参与炎症反应、氧化还原反应等生物学过程(图7),KEGG 富集结果显示,相关基因主要富集于花生四烯酸代谢(arachidonic acid metabolism)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、T 细胞受体

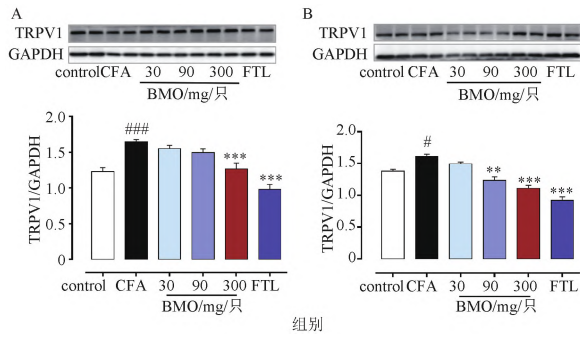


图4 白脉软膏对CFA小鼠背根神经节(A)与足跖部(B)中TRPV1蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of Baimai Ointment on protein levels of TRPV1 in dorsal root ganglion (A) and plantar (B) of CFA-induced mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

信号通路(T cell receptor signaling pathway)等炎症相关通路(图7)。

核心通路筛选:依据前述核心通路筛选原则,实验重点关注与慢性炎症性疼痛密切相关的TNF信号通路及T细胞受体信号通路,其中MAPK14(46)、PTGS2(18)、MAPK1(16)、CASP3(13)、AKT1(7)、CCL5(4)、MMP9(4)、RELA(3)、TNF(1)、IL6

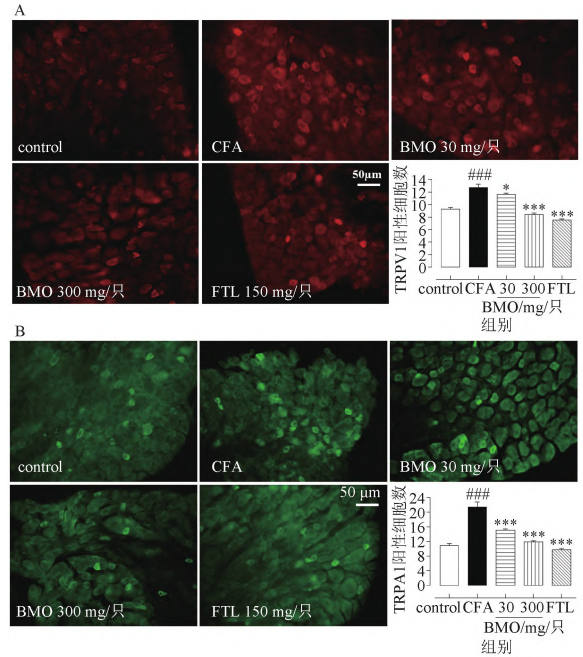


图5 白脉软膏对CFA小鼠背根神经节中TRPV1(A)与TRPA1(B)阳性细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of Baimai Ointment on the number of TRPV1 (A) and TRPA1 (B) positive cells in dorsal root ganglion of CFA-induced mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

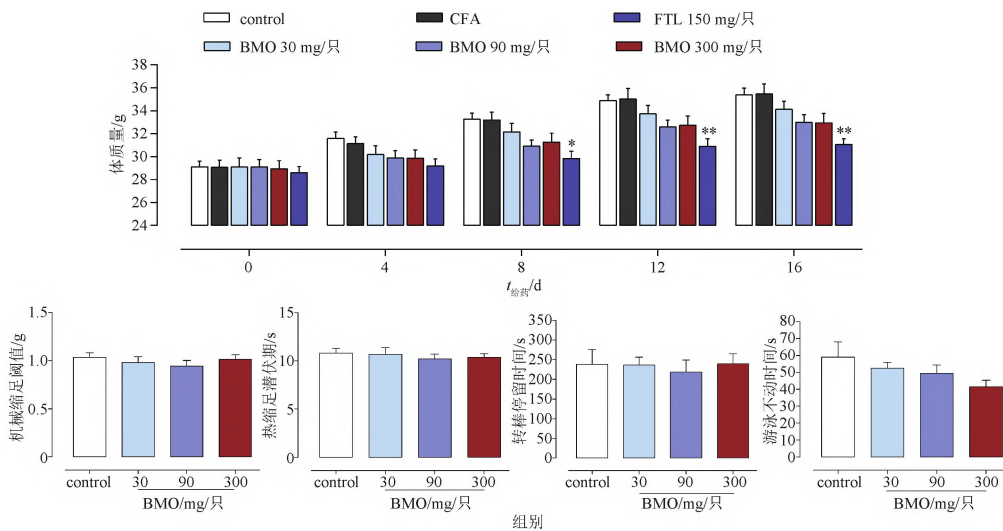


图6 白脉软膏对CFA小鼠体质量,对正常小鼠机械痛敏阈值、热辐射痛敏阈值、运动协调功能、游泳不动时间的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 6 Effect of Baimai Ointment on body weight of CFA-induced mice, as well as the mechanical pain threshold, thermal radiation pain threshold, motor coordination, and immobility time in forced swimming test of normal mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

(1)、FOS(1)等基因富集于TNF信号通路,MAPK14(46)、GSK3B(33)、MAPK1(16)、AKT1(7)、RHOA

(7)、IL2(5)、RELA(3)、NFATC3(1)、FOS(1)、TNF(1)等基因富集于T细胞受体信号通路(括号中数

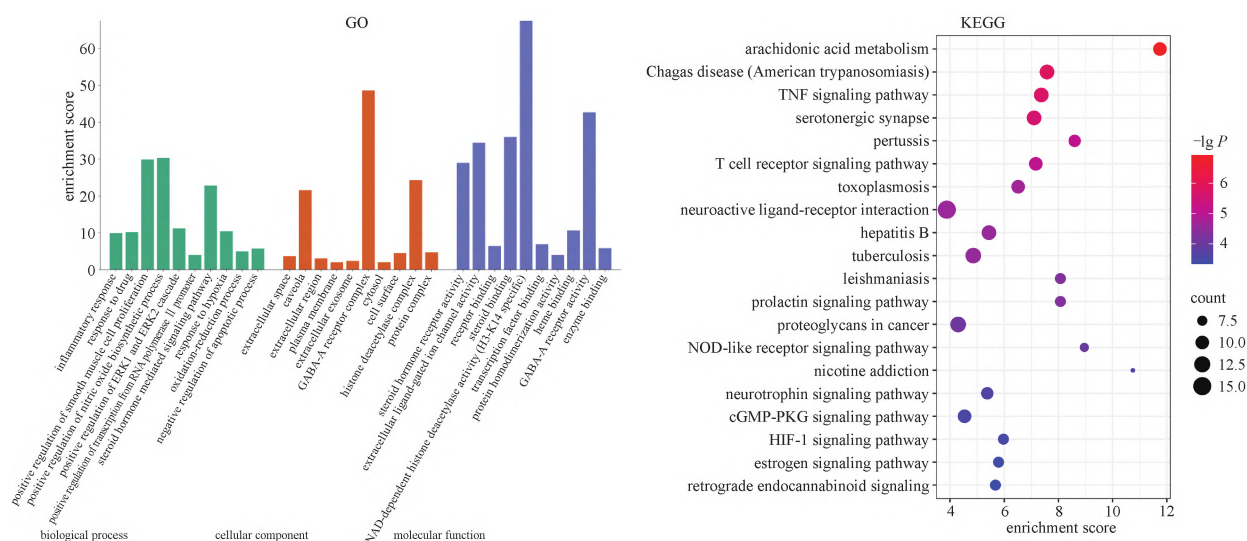


图 7 交集靶标 GO 富集分析条形图与 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 7 Intersection target GO enrichment analysis bar chart and KEGG enrichment analysis bubble chart

字表示 51 个白脉软膏候选活性分子作用于该靶基因的数目)。

核心靶标筛选:依据前述核心靶标筛选原则及核心通路的筛选结果,实验聚焦于 TNF 信号通路中的 MAPK14(46)、PTGS2(18)、MAPK1(16)及 T 细胞受体信号通路中的 MAPK14(46)、GSK3B(33)、MAPK1(16)等靶基因(括号中数字表示 51 个白脉软膏候选活性分子作用于该靶基因的数目),并作为后续验证实验重点关注的对象,同时构建白脉软膏药物-候选活性分子-基因靶标网络拓扑分析关系图(图 8),节点大小由 degree 界定。

2.6 Western blot 实验验证 与对照组相比,CFA 小鼠足跖部组织 p-P38、p-ERK2、COX-2 的蛋白表达水平明显升高,p-GSK-3 β 的表达水平明显降低;而白脉软膏(30、90、300 mg/只)可剂量依赖性降低 CFA 小鼠足跖部组织 p-P38、p-ERK2、COX-2 的蛋白表达,显著升高 p-GSK-3 β 的表达,差异有统计学意义。扶他林(150 mg/只)也可降低 COX-2、p-P38、p-ERK2 的表达,升高 p-GSK-3 β 的蛋白表达(图 9)。

3 讨论

炎症介质刺激初级传入神经纤维痛觉伤害性感受器产生的周围敏化是慢性炎症性疼痛的主要病机^[25],以痛觉过敏、痛觉超敏、自发性疼痛等为主要临床表现形式^[26],同时可伴有焦虑、抑郁等,具有发病率高、病情缠绵、治疗难度大等特点,不仅严重影响患者的生活质量,也给社会带来沉重的经济负

担^[27]。目前临床常用一线药物如布洛芬、双氯芬酸二乙胺乳胶剂(扶他林)等虽可暂时缓解患者的疼痛症状,但伴随的胃肠反应、肾毒性及潜在心血管事件也限制了此类药物的广泛应用^[28]。白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛具有有效佳、安全等特点,但其镇痛的药效学及机制尚不明确。实验观察白脉软膏对 CFA 小鼠周围敏化的影响发现:白脉软膏可剂量依赖性抑制 CFA 小鼠的机械痛敏与热辐射痛敏,对小鼠足跖肿胀、炎症介质及周围痛敏感受的关键离子通道 TRPV1、TRPA1 也有明确的抑制作用,且无耐受性及明显毒副作用,其机制可能与白脉软膏调控周围组织 TNF 及 T 细胞受体信号通路的核心调控元件相关。

外周敏化主要表现为对外界刺激产生放大性疼痛反应^[29],机械与热痛敏检测方法常用于外周敏化痛敏检测^[30],研究使用 Von Frey Filament 与红外热刺激仪检测 CFA 小鼠机械与热辐射痛敏阈值发现白脉软膏可剂量依赖性抑制其机械与热辐射痛敏,且药效作用时间较扶他林长。肿胀度常用来衡量药效学及炎症反应程度,实验发现白脉软膏能明显缓解 CFA 小鼠足跖部肿胀;促炎因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等)、趋化因子、前列腺素^[31-32]等可直接或间接敏化 TRPs 相关离子通道(尤其是 TRPV1、TRPA1)并对伤害性刺激表现出增强反应^[33],而应用拮抗剂或基因敲除 TRPV1、TRPA1 后动物可表现出对伤害性刺激敏感性降低的现象^[34-36]。实验发现白脉软

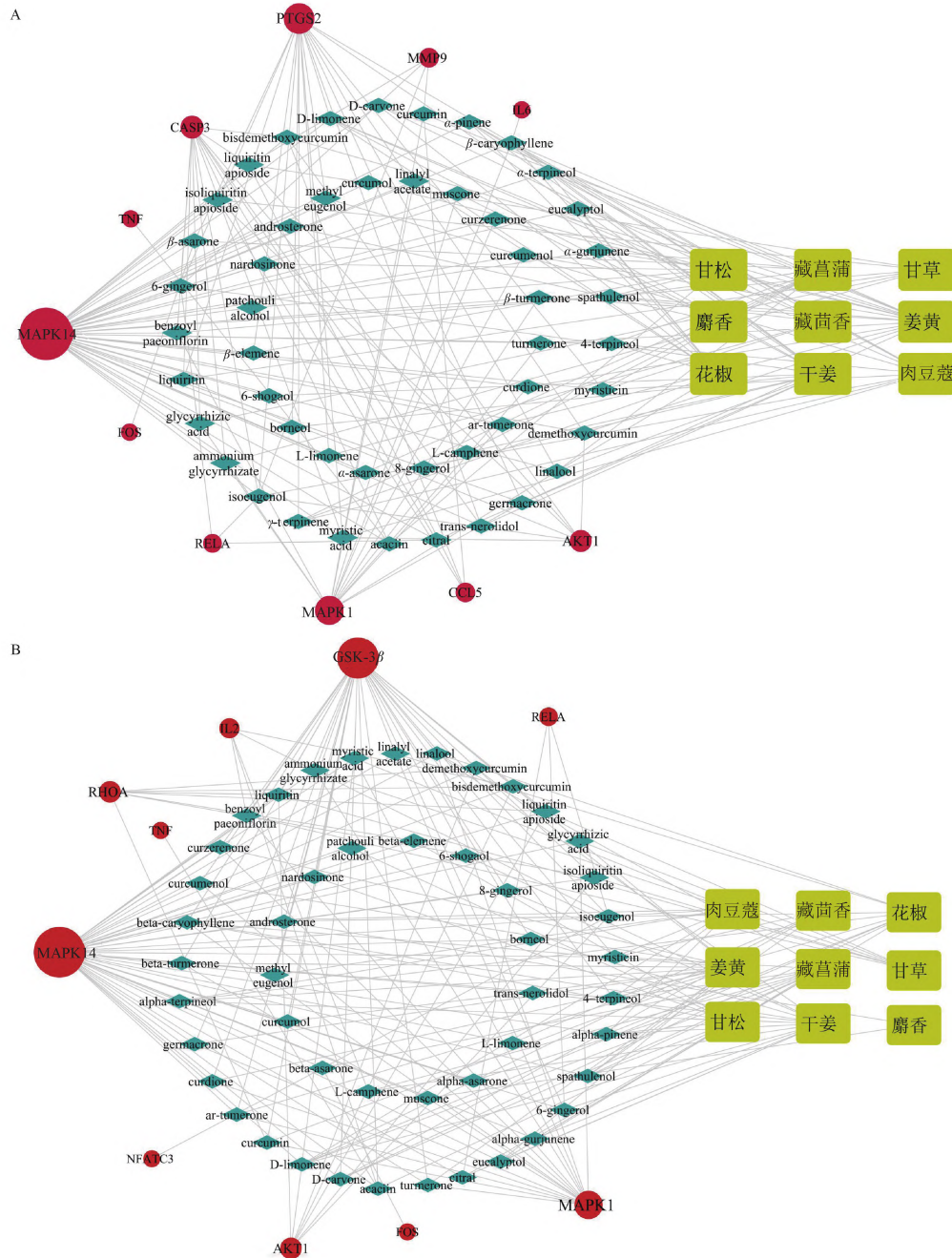


图 8 TNF 信号通路(A)与 T 细胞受体信号通路(B) 药物-候选活性分子-基因靶标网络

Fig. 8 Drug-candidate active molecule-target networks of TNF signaling pathway (A) and T cell receptor signaling pathway (B)

膏可显著降低小鼠足跖部组织 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、CCL5、CXCL1、PGE2 的含量,与足跖肿胀检测结果一致,同时可有效降低足跖部和/或 DRG 中 TRPV1、TRPA1 的表达,表明白脉软膏可通过降低外周组织炎症介质的含量间接抑制离子通道的敏化或表达而发挥周围痛敏的改善作用^[37]。

NSAIDs 类药物因消化道、肾毒性及潜在的心血

管事件等在治疗慢性炎症性疼痛中受到诸多限制^[28],实验发现扶他林给药 8 d 后小鼠体质量开始降低,可能与动物少量舔食扶他林致胃黏膜受损相关,而同等条件下白脉软膏对小鼠体质量无明显影响。耐受性是评判镇痛药物是否具有阿片类副作用的关键指标,实验采用停药 2 d 后再次给药的方法考察白脉软膏的耐受情况发现白脉软膏无耐受

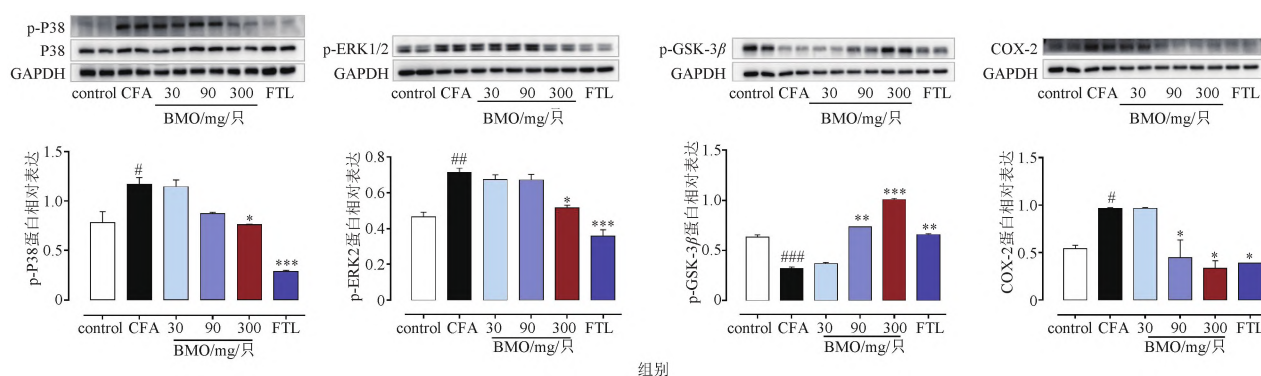


图9 白脉软膏对CFA小鼠足趾部组织p-P38、p-ERK2、p-GSK-3 β 、COX-2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of Baimai Ointment on the protein levels of p-P38, p-ERK2, p-GSK-3 β , and COX-2 in the plantar tissue of CFA-induced mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

性^[38]。对生理状态基础痛敏阈值的影响是评判镇痛药物是否优良的重要指标,实验发现白脉软膏对正常小鼠基础痛敏阈值无影响。镇痛药物还可通过中枢抑制或肌肉松弛等影响动物行为学,研究采用轮替实验评价动物协调功能显示白脉软膏不影响其运动协调功能;强迫游泳实验为评价动物抑郁倾向的方法^[39],实验显示白脉软膏不影响小鼠的游泳不动时间,表明白脉软膏对慢性炎症性疼痛的镇痛作用不依赖于中枢神经系统的抑制或运动功能的损害,且对动物焦虑抑郁水平无明显影响。以上结果提示白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛无明显毒副作用。

近年来,多维药理学常用于阐述中药复方与疾病靶点间的关系,其中,网络药理学手段应用最为广泛。在前期研究基础上^[12],实验依据药效分子ADME参数($OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$),并结合基原药材药物功效、主要成分含量、药效分子药理活性等条件共收集白脉软膏候选活性分子51个。通过PharmMapper等数据库获取候选分子靶标478个,TTD等数据库收集疾病基因靶标494个,交集发现105个候选靶标为白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的主要分子靶标。KEGG通路富集分析发现105个靶基因和TNF信号通路、T细胞受体信号通路等密切相关。研究表明,炎症介质(如TNF- α 、IL-1 β 等)可通过其受体启动P38 MAPK、ERK、转录因子NF- κ B等的磷酸化^[40]诱导炎症细胞TNF信号通路、T细胞受体信号通路激活并促进“炎症汤”产生^[41-43]及伤害性神经纤维TRPs通道敏化^[31],同时,TNF信号通路中的COX-2活化促进PGE2释放也可诱导周围敏化,而T细胞受体信号通路中的GSK-3 β 磷酸化可

降低PGE2、5-HT、TNF- α 等发挥炎症反应的拮抗作用^[44],网络分析发现白脉软膏51个候选活性分子有46、16个候选活性成分共同靶向于TNF及T细胞受体信号通路的2个重要靶基因(MAPK14与MAPK1),18个候选活性成分靶向于TNF信号通路中的PTGS2,33个候选活性成分靶向于T细胞受体信号通路中的GSK-3 β ,提示以上调控元件是白脉软膏治疗慢性炎症性疼痛的重要靶标。

CFA为油包水乳浊液,内含结核分枝杆菌细胞壁成分,CFA小鼠足跖部皮下注射可诱发血管通透性增高并引起局部组织单核细胞、淋巴细胞浸润,而巨噬细胞无法将结核分枝杆菌细胞壁消化,进而,致敏T-淋巴细胞吞噬分枝杆菌细胞壁成分诱发细胞变性坏死、肉芽肿等为主要特征的IV型超敏反应,使慢性炎症在小鼠周围组织中持续存在^[45]。而在慢性炎症性疼痛周围敏化病理过程中,局部的炎症使血管通透性增加,致使T淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润,释放的炎症介质直接或间接敏化伤害性神经元,引发痛敏。可见,T淋巴细胞、巨噬细胞、伤害性神经元等在CFA足跖部皮下注射诱发的慢性炎症性疼痛病理演化过程中扮演了关键角色^[31]。进一步实验研究表明,白脉软膏可有效下调小鼠足跖部组织MAPK14、MAPK1、PTGS2的蛋白表达,上调GSK-3 β 的磷酸化水平,提示白脉软膏缓解慢性炎症性疼痛周围敏化的机制可能与其调节T淋巴细胞、巨噬细胞、伤害性神经元中的TNF信号通路或T细胞受体信号通路的核心调控元件相关。

阳起石、碱花虽无成分纳入,但不排除其在疾病干预中的辅助作用;扶他林治疗慢性炎症性疼痛的

主要靶点为 COX-2,其对 TRPs 相关通道、p-ERK2、p-P38 等的抑制机制可能与其降低 COX-2 下游炎症介质引发的负反馈效应相关^[46]。

综上,白脉软膏可有效改善慢性炎症性疼痛的周围敏化且有药效时间长、无耐受性等特点,相关机制可能与其多方位、多靶点双向调控周围组织炎性细胞、神经元中 TNF、T 细胞受体信号通路等的促炎调控元件(MAPK14、MAPK1、PTGS2)、抗炎调控元件(GSK-3 β)相关,有别于传统的 NSAIDs 类药物,白脉软膏无明显的毒副作用。相关研究丰富了白脉软膏治疗慢性疼痛的生物学内涵并指导其临床合理用药,并为处方优化及新药研发提供了参考。

参考文献

- [1] 覃桂水. 穴位按摩联合白脉软膏治疗卒中后偏瘫的效果观察[J]. 实用临床护理学电子杂志, 2017, 2(33): 48.
- [2] 程伟, 占超, 丰平. 白脉软膏联合循阳明经推拿对卒中软瘫期下肢肌张力影响的临床观察[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1177.
- [3] 覃桂水. 中医定向透药疗法治疗 60 例卒中肢体半身不遂的临床观察[J]. 中国医药指南, 2019, 17(23): 168.
- [4] 王晏雯, 刘小利, 舒勤奋, 等. 白脉软膏联合卡马西平片治疗原发性三叉神经痛 40 例临床观察[J]. 中医杂志, 2015, 56(10): 863.
- [5] 陈帅, 张小海, 张宏艺. 白脉软膏外敷治疗急性踝关节扭伤临床疗效观察[J]. 江西医药, 2017, 52(2): 126.
- [6] 张兴平, 许根荣, 徐善强, 等. 藏药白脉软膏治疗桡骨远端骨折后腕关节功能障碍的病例对照研究[J]. 中国骨伤, 2014, 27(11): 920.
- [7] 王荣田, 陈兆军, 吴俊德, 等. 藏药白脉软膏实效性临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2021, 29(11): 32.
- [8] 范佳佳, 李鑫, 孙洪昊, 等. 基于藏族医学理论的白脉病内涵挖掘及白脉软膏组方用法分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1409.
- [9] 郭文华, 张微微, 黄勇华, 等. 白脉软膏对脑缺血大鼠脑组织 p38 MAPK 及 GAP-43 蛋白表达影响的实验研究[J]. 北京医学, 2009, 31(1): 41.
- [10] 蒋鼎, 丁道芳, 韩大鹏, 等. 白脉软膏含药血浆对大鼠退变滑膜细胞和软骨细胞共培养体系的作用及机制研究[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(172): 556.
- [11] 黄有荣, 高冠群, 杨丽平, 等. 白脉软膏对家兔桡骨骨折愈合过程及骨痂骨形态发生蛋白 2、碱性成纤维细胞生长因子水平的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6: 3599.
- [12] 刘毓东, 毛霞, 张苏雅, 等. 基于生物信息学分析整合组方规律发掘白脉软膏治疗白脉病的作用机制及其功效组配伍特点[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 186.
- [13] KOO S T, LEE C H, CHOI H, et al. The effects of pressure on arthritic knees in a rat model of CFA-induced arthritis [J]. Pain Physician, 2013, 16(2): E95.
- [14] DIXON W J. Efficient analysis of experimental observations [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20: 441.
- [15] 范真真, 曲玉娟, 魏慧, 等. 瞬时感受器电位离子通道 4 在大鼠背根神经节持续受压后异位放电中的作用[J]. 中国康复医学杂志, 2013, 28(3): 193.
- [16] 顾正位. 木瓜物质基础辨识与抗类风湿性关节炎作用机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- [17] 王蒙, 李静, 魏晴, 等. 防己水煎液总生物碱的镇痛抗炎作用及其机制研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2): 335.
- [18] WANG X, SHEN Y, WANG S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W356.
- [19] LIU X, OUYANG S, YU B, et al. PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: W609.
- [20] WANG X, PAN C, GONG J, et al. Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs [J]. J Chem Inf Model, 2016, 56(6): 1175.
- [21] WANG Y, ZHANG S, LI F, et al. Therapeutic target database 2020: enriched resource for facilitating research and early development of targeted therapeutics[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1): D1031.
- [22] WISHART D S, FEUNANG Y D, GUO A C, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1): D1074.
- [23] BATISTA P A, WERNER M F, OLIVEIRA E C, et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice [J]. Neurosci Lett, 2008, 440(3): 299.
- [24] BATISTA P A, WERNER M F, OLIVEIRA E C, et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice [J]. J Pain, 2010, 11(11): 1222.
- [25] BASBAUM A I, BAUTISTA D M, SCHERRER G, et al. Cellular and molecular mechanisms of pain[J]. Cell, 2009, 139(2): 267.
- [26] MIFFLIN K A, KERR B J. The transition from acute to chronic pain: understanding how different biological systems interact[J]. Can J Anaesth, 2014, 61(2): 112.
- [27] KHAN S, SHEHZAD O, CHUN J, et al. Mechanism underlying anti-hyperalgesic and anti-allodynic properties of anomalin in both acute and chronic inflammatory pain models in mice through inhibition of NF- κ B, MAPKs and CREB signaling cascades[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 718(1/3): 448.
- [28] JI R R, XU Z Z, STRICHARTZ G, et al. Emerging roles of resolvins in the resolution of inflammation and pain[J]. Trends Neurosci, 2011, 34(11): 599.

- [29] SUN J, CHEN F, BRAUN C, et al. Role of curcumin in the management of pathological pain [J]. *Phytomedicine*, 2018, 48: 129.
- [30] 孙焱芳, 陈军, 熊利泽, 等. 乙咪酯全身及鞘内用药对蜜蜂毒诱致大鼠热和机械性痛敏的抑制作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2001, 21(5): 45.
- [31] DEVAL E, GASULL X, NOËL J, et al. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 128(3): 549.
- [32] JI R R, XU Z Z, GAO Y J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(7): 533.
- [33] CORTRIGHT D N, SZALLASI A. TRP channels and pain [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(15): 1736.
- [34] OBATA K, KATSURA H, MIZUSHIMA T, et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(9): 2393.
- [35] DA COSTA D S, MEOTTI F C, ANDRADE E L, et al. The involvement of the transient receptor potential A1 (TRPA1) in the maintenance of mechanical and cold hyperalgesia in persistent inflammation [J]. *Pain*, 2010, 148(3): 431.
- [36] WANG C, SUN D, LIU C, et al. Mother root of *Aconitum carmichaelii* Debeaux exerts antinociceptive effect in complete Freund's adjuvant-induced mice; roles of dynorpin/kappa-opioid system and transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 284.
- [37] 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.
- [38] HARNED M, SLOAN P. Safety concerns with long-term opioid use[J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2016, 15(7): 955.
- [39] HAO Y, GE H, SUN M, et al. Selecting an appropriate animal model of depression [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4827.
- [40] BORCHI A, VERSTREPEN L, BEYAERT R. TRAF2 multi-tasking in TNF receptor-induced signaling to NF-kappaB, MAP kinases and cell death[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016, 116: 1.
- [41] CHEN Y, CHEN X, YU J, et al. JAB1 is involved in neuropathic pain by regulating JNK and NF-kappaB activation after chronic constriction injury [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41: 1119.
- [42] NOTLEY C A, INGLIS J J, ALZABIN S, et al. Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells [J]. *Exp Med*, 2008, 205(11): 2491.
- [43] WEI X W, GONG J F, ZHU J. The suppressive effect of triptolide on chronic colitis and TNF- α /TNFR2 signal pathway in interleukin-10 deficient mice [J]. *Clin Immunol*, 2008, 129: 211.
- [44] ZHOU H, LIU J, ZENG J, et al. Inhibition of GSK-3 β alleviates collagen II-induced rheumatoid arthritis in rats [J]. *Med Sci Monitor*, 2016, 22: 1047.
- [45] MAHON R N, ROJAS R E, FULTON S A, et al. Mycobacterium tuberculosis cell wall glycolipids directly inhibit CD4 T-cell activation by interfering with proximal T-cell-receptor signaling [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(10): 4574.
- [46] GAN T J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile[J]. *Curr Med Res Opin*, 2010, 26(7): 1715.

[责任编辑 陈玲]