

维生素 D 对坐骨神经慢性压迫性损伤大鼠 NF- κ B/CBS-H₂S 信号通路的影响

张琴, 蒋中晋, 敖胜福

(贵州中医药大学第二附属医院麻醉科, 贵阳 550003)

摘要 目的 探讨维生素 D 对坐骨神经慢性压迫性损伤(CCI)大鼠的改善作用以及对核因子 κ B(NF- κ B)/胱硫醚- β -合酶(CBS)-硫化氢(H₂S)系统的调节作用。方法 50 只大鼠按照随机数字表法分为对照组、模型组、维生素 D 组、激活剂组和激活剂+维生素 D 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余组大鼠通过结扎坐骨神经建立 CCI 模型, 维生素 D 组大鼠腹腔注射 500 mg/kg 维生素 D, 激活剂组大鼠腹腔注射 NF- κ B 激活剂脂多糖 10 mg/kg, 激活剂+维生素 D 组大鼠腹腔注射 500 mg/kg 维生素 D, 同时注射 10 mg/kg 脂多糖, 对照组和模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水, 1 次/天, 连续 2 周。比较各组大鼠热刺激缩足反射潜伏期(PWTL)、机械缩足阈值(MWT)、大鼠眼眶静脉血 25-羟维生素 D₃[25(OH)D₃]水平、H₂S 含量、大鼠 L4-L6 背根神经节降钙素基因相关肽(CGRP)、前列腺素 E₂(PGE₂)水平、大鼠 L4-L6 段脊髓维生素 D 受体(VDR)、NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白表达量。结果 与对照组比较, 模型组大鼠 PWTL 和 MWT、25(OH)D₃ 水平以及 VDR 蛋白表达量均降低, H₂S 含量、CGRP 和 PGE₂ 水平以及 NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白表达量均升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 维生素 D 组大鼠 PWTL 和 MWT、25(OH)D₃ 水平以及 VDR 蛋白表达量均升高($P < 0.05$), H₂S 含量、CGRP 和 PGE₂ 水平以及 NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白表达量均降低($P < 0.05$); 与激活剂组比较, 激活剂+维生素 D 组大鼠 PWTL 和 MWT、25(OH)D₃ 水平以及 VDR 蛋白表达量均升高, H₂S 含量、CGRP 和 PGE₂ 水平以及 NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白表达量均降低($P < 0.05$); 与维生素 D 组比较, 激活剂+维生素 D 组大鼠 PWTL 和 MWT、25(OH)D₃ 水平以及 VDR 蛋白表达量均降低, H₂S 含量、CGRP 和 PGE₂ 水平以及 NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白表达量均升高($P < 0.05$)。结论 外源性补充维生素 D 可缓解 CCI 大鼠神经疼痛, 降低痛觉敏感性, 其可能是通过抑制 NF- κ B/CBS-H₂S 信号通路发挥作用。

关键词 坐骨神经慢性损伤; 维生素 D; 疼痛行为学; 疼痛阈值; 受体; NF- κ B/CBS-H₂S 信号通路

中图分类号 R 745.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)09-1638-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.010

坐骨神经痛是由腰椎间盘突出等引起的外周神经病理性疼痛, 表现为阵发性、持续性麻木疼痛, 严重影响生活质量。神经病理性疼痛因神经受损而发生, 而神经修复困难。寻找有效的治疗药物是当前研究的热点之一。硫化氢(H₂S)作为气体信号分子, 参与炎症反应、血管舒缩和伤害信息传递等过程^[1-2]。目前认为内源性 H₂S 主要合成途径之一是通过胱硫醚- β -合酶(cystathionine- β -synthetase, CBS), 其主要表达于背根神经节、脊髓等组织中。研究^[3]表明 CBS-H₂S 通路在神经性病理疼痛中发挥重要作用。核因子 κ B(nuclear factor kappa-light-

chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) 是调节炎症反应的关键信号, 研究^[4]发现 NF- κ B 诱导 CBS 表达上调参与糖尿病大鼠机械痛过敏。维生素 D 是体内钙磷代谢的关键信号分子, 其与受体结合参与炎症、氧化应激等过程^[5-6]。维生素 D 受体(vitamin D receptors, VDR) 广泛分布于中枢神经系统。文献^[7]报道维生素 D 及 VDR 在调节疼痛中发挥关键作用, 可能与影响特定的疼痛信号通路密切相关。然而, 目前仅有少量证据表明维生素 D 对神经病理性疼痛的影响, 其具体机制仍不明确。因此, 该研究旨在探讨维生素 D 是否通过调节 NF- κ B/CBS-H₂S 信号通路在坐骨神经慢性压迫性损伤(chronic constriction injury of the sciatic nerve, CCI) 大鼠中发挥保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 8 周龄, 体质量 200~220 g, 购自北京维通利华实验动

2025-07-13 接收

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(编号: gzwkj2024-417)

作者简介: 张琴, 女, 硕士研究生;

蒋中晋, 男, 副主任医师, 通信作者, E-mail: 670934573@

qq.com

物技术有限公司,生产许可证号 SCXK(京)2016-0011。饲养期间保持室内温度(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,12 h 明暗交替,自由饮食饮水,空气湿度 50%~60%,适应性饲养 3 d 后进行实验。所有实验均符合贵州中医药大学第二附属医院伦理委员会要求(编号:2403423)。

1.2 主要试剂和仪器 25-羟维生素 D₃ [25(OH)D₃](美国 AdooQ BioScience 公司,货号: A10941-5);前列腺素 E2(prostaglandin E2,PGE2)ELISA 试剂盒和降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号: ml003859、ml002772);脂多糖(美国 Sigma-Aldrich 公司,货号: L2880-10MG);NF- κ Bp65 蛋白抗体、CBS 蛋白抗体(英国 Abcam 公司,货号: ab16502、ab37880);二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号: ZB2301);Von Frey 测痛仪和光热测痛仪(型号: VF4、TF2,天津市医学科学院生物医学工程研究所);紫外可见分光光度计(型号: HD-UV90,山东潍坊市霍尔德电子科技有限公司)。

1.3 模型制备与实验分组 50 只大鼠随机选取 40 只进行造模,具体操作如下:腹腔注射戊巴比妥钠(15~40 mg/kg)麻醉,俯卧位固定于鼠板上,右后肢大腿中部股骨外缘与股骨平行方向切开皮肤,分离肌肉筋膜组织和坐骨神经主干,在神经主干上依次间隔 1 mm 进行结扎,共结扎 3 处,当大鼠下肢或足趾轻微抽动时为最佳结扎强度。术后大鼠出现右后肢步态不稳、足趾卷曲,行走时足部边缘着地、跛行,则为模型制备成功,另外 10 只大鼠仅暴露坐骨神经,不结扎。将造模成功的大鼠随机分为模型组、维生素 D 组、激活剂组和激活剂+维生素 D 组,每组 10 只,未进行坐骨神经结扎的 10 只大鼠作为对照组。

1.4 干预方式 造模后第 1 天开始,维生素 D 组大鼠按照 500 mg/kg 腹腔注射维生素 D,激活剂组大鼠按照 10 mg/kg 腹腔注射脂多糖(NF- κ B 激活剂),激活剂+维生素 D 组大鼠参照维生素 D 组及激活剂组的用量,腹腔注射维生素 D+脂多糖,对照组和模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水,1 次/d,连续 2 周。

1.5 热刺激缩足反射潜伏期(paw withdraw thermal latency,PWTL)测定 分别在术前和术后 5、10、14 d 时使用 TF2-光热测痛仪,将光辐焦点对准大鼠右后肢掌中央照射,记录从开始照射到大鼠抬起后肢的时间,实验重复 6 次,每次间隔 5 min,取平

均值为大鼠热刺激 PWTL。

1.6 机械缩足反射阈值(mechanical withdrawal threshold,MWT)测定 分别在术前和术后 5、10 和 14 d 时,使用电子 Von Frey 测痛仪测量大鼠 MWT,将测试探头对准术侧后肢,朝掌中施加垂直向上的压力,当大鼠用力抬起后肢即为完成 1 次测定,记录测定仪的数值,重复测量 6 次,取平均值为 MWT。

1.7 25(OH)D₃ 含量测定 分别在术前和术后 5、10 和 14 d 时,采集大鼠眼眶静脉血 2 mL,分离血清,ELISA 法检测血清中 25(OH)D₃ 水平。

1.8 H₂S 含量测定 分别在术前和术后 5、10 和 14 d 时,采集大鼠眼眶静脉血 0.1 mL 于抗凝管中,向其中加入 0.5 mL 0.1% 乙酸锌,然后再分别加入 0.5 mL N,N-二甲基对苯二胺盐酸盐和三氯化铁,室温静置 10 min,再加入 0.5 mL 10% 三氯乙酸和 2.5 mL 蒸馏水,振荡混匀,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,利用分光光度计测定 670 nm 处的吸光度值,根据标准曲线计算样本中 H₂S 浓度。

1.9 大鼠背根神经节中痛觉敏感相关物质水平检测 术后 14 d,迅速剥离大鼠 L4-L6 段背根神经节,研磨,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,根据试剂盒说明书测定 CGRP 和 PGE2 水平。

1.10 蛋白印迹法检测 VDR、NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白表达量 术后 14 d,取大鼠 L4-L6 段脊髓匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。50 μg 蛋白样品进行电泳和湿转,封闭 1 h 后,VDR、NF- κ Bp65 和 CBS 蛋白抗体(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,洗膜,ECL 法显色,ImageJ 分析条带灰度值,计算目的蛋白表达量。

1.11 统计学处理 采用 SPSS26.0 软件进行数据分析,所有数据均符合正态分布,采用($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析,事后两两比较采用 LSD- t 检验,重复测量资料采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PWTL 和 MWT 测定结果 各组大鼠 PWTL 和 MWT 在术前比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。且随时间推移,模型组、维生素 D 组、激活剂组、激活剂+维生素 D 组大鼠的 PWTL 和 MWT 均明显降低。与对照组比较,模型组大鼠 PWTL 和 MWT 在术后各时间点均降低($P < 0.05$);与模型组

比较, 维生素 D 组大鼠 PWTL 和 MWT 在术后各时间点均升高 ($P < 0.05$); 与维生素 D 组比较, 激活剂 + 维生素 D 组大鼠 PWTL 和 MWT 在术后各时间点均降低 ($P < 0.05$); 与激活剂组比较, 激活剂 + 维生素 D 组大鼠 PWTL 和 MWT 在术后各时间点均升高 ($P < 0.05$)。见表 1、表 2。

2.2 25(OH)D₃ 水平测定结果 与对照组比较, 模型组大鼠术后各个时间点 25(OH)D₃ 水平均降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 维生素 D 组大鼠术后各个时间点 25(OH)D₃ 水平均升高 ($P < 0.05$); 与维生素 D 组比较, 激活剂 + 维生素 D 组大鼠术后各个时间点 25(OH)D₃ 水平均降低 ($P < 0.05$); 与激

活剂组比较, 激活剂 + 维生素 D 组大鼠术后各个时间点 25(OH)D₃ 水平均升高 ($P < 0.05$)。术前各组大鼠血清 25(OH)D₃ 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

2.3 H₂S 含量测定结果 与对照组比较, 模型组大鼠术后各个时间点 H₂S 含量均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 维生素 D 组大鼠术后各个时间点 H₂S 含量均降低 ($P < 0.05$); 与维生素 D 组比较, 激活剂 + 维生素 D 组大鼠术后各个时间点 H₂S 含量均升高 ($P < 0.05$); 与激活剂组比较, 激活剂 + 维生素 D 组大鼠术后各个时间点 H₂S 含量均降低 ($P < 0.05$)。术前各组大鼠 H₂S 含量比较, 差异无统计

表 1 各组大鼠 PWTL 不同时间点的比较 ($\bar{x} \pm s, s, n = 10$)

Tab. 1 Comparison of PWTL of rats at different time in each group ($\bar{x} \pm s, s, n = 10$)

Group	Pre-operation	5 days post-operation	10 days post-operation	14 days post-operation
Control	25.66 ± 3.45	25.80 ± 3.17	24.08 ± 3.14	23.46 ± 3.53
Model	24.78 ± 4.05	18.53 ± 2.13 ^{a*}	15.24 ± 2.22 ^{ab*}	11.66 ± 2.40 ^{abc*}
Vitamin D	25.77 ± 4.28	23.84 ± 2.06 ^{ab#}	19.53 ± 2.17 ^{ab#}	16.55 ± 2.41 ^{abc#}
Activator	23.96 ± 3.41	15.22 ± 2.29 ^{ab#}	12.74 ± 2.05 ^{ab#}	9.32 ± 2.43 ^{abc#}
Activator + Vitamin D	24.33 ± 4.22	21.44 ± 2.03 ^{aΔ▲}	17.34 ± 2.30 ^{abΔ▲}	14.22 ± 2.15 ^{abcΔ▲}
F value	$F_{\text{time effect}} = 62.560, F_{\text{group effect}} = 107.300, F_{\text{interaction effect}} = 5.583$			
P value	$P_{\text{time effect}} < 0.001, P_{\text{group effect}} < 0.001, P_{\text{interaction effect}} < 0.001$			

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; Δ $P < 0.05$ vs Vitamin D group; ▲ $P < 0.05$ vs Activator group; ^a $P < 0.05$ vs same group pre-operation; ^b $P < 0.05$ same group vs 5 days post-operation; ^c $P < 0.05$ vs same group 10 days post-operation.

表 2 各组大鼠 MWT 不同时间点的比较 ($\bar{x} \pm s, g, n = 10$)

Tab. 2 Comparison of MWT of rats at different time in each group ($\bar{x} \pm s, g, n = 10$)

Group	Pre-operation	5 days post-operation	10 days post-operation	14 days post-operation
Control	40.47 ± 4.65	42.85 ± 5.24	42.77 ± 5.25	39.71 ± 5.63
Model	40.66 ± 4.12	30.54 ± 4.81 ^{a*}	23.88 ± 4.27 ^{ab*}	19.91 ± 4.42 ^{abc*}
Vitamin D	41.98 ± 4.53	38.19 ± 4.07 ^{ab#}	33.40 ± 3.46 ^{ab#}	27.55 ± 4.31 ^{abc#}
Activator	42.62 ± 4.24	25.41 ± 4.76 ^{ab#}	19.46 ± 3.57 ^{ab#}	15.99 ± 3.06 ^{abc#}
Activator + Vitamin D	39.99 ± 5.60	34.15 ± 4.33 ^{aΔ▲}	28.19 ± 4.41 ^{abΔ▲}	24.85 ± 3.61 ^{abcΔ▲}
F value	$F_{\text{time effect}} = 111.900, F_{\text{group effect}} = 73.290, F_{\text{interaction effect}} = 10.640$			
P value	$P_{\text{time effect}} < 0.001, P_{\text{group effect}} < 0.001, P_{\text{interaction effect}} < 0.001$			

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; Δ $P < 0.05$ vs Vitamin D group; ▲ $P < 0.05$ vs Activator group; ^a $P < 0.05$ vs same group pre-operation; ^b $P < 0.05$ same group vs 5 days post-operation; ^c $P < 0.05$ vs same group 10 days post-operation.

表 3 各组大鼠血清 25(OH)D₃ 水平比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}, n = 10$)

Tab. 3 Comparison levels of 25(OH)D₃ levels in rat orbital venous blood in each group ($\bar{x} \pm s, \text{ng/mL}, n = 10$)

Group	Pre-operation	5 days post-operation	10 days post-operation	14 days post-operation
Control	74.26 ± 6.69	77.66 ± 7.25	75.34 ± 7.95	77.80 ± 7.36
Model	77.38 ± 7.52	49.24 ± 5.11 ^{a*}	41.85 ± 5.88 ^{ab*}	33.69 ± 6.55 ^{abc*}
Vitamin D	76.14 ± 7.90	64.79 ± 5.43 ^{ab#}	68.96 ± 6.71 ^{ab#}	72.79 ± 5.23 ^{abc#}
Activator	76.89 ± 6.25	36.24 ± 6.51 ^{ab#}	29.53 ± 6.22 ^{ab#}	24.90 ± 6.11 ^{abc#}
Activator + Vitamin D	75.83 ± 7.44	56.74 ± 6.85 ^{aΔ▲}	60.29 ± 6.44 ^{abΔ▲}	67.85 ± 6.27 ^{abcΔ▲}
F value	$F_{\text{time effect}} = 117.300, F_{\text{group effect}} = 186.100, F_{\text{interaction effect}} = 28.970$			
P value	$P_{\text{time effect}} < 0.001, P_{\text{group effect}} < 0.001, P_{\text{interaction effect}} < 0.001$			

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Model group; Δ $P < 0.05$ vs Vitamin D group; ▲ $P < 0.05$ vs Activator group; ^a $P < 0.05$ vs same group pre-operation; ^b $P < 0.05$ same group vs 5 days post-operation; ^c $P < 0.05$ vs same group 10 days post-operation.

表4 各组大鼠血清 H₂S 含量比较($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n = 10$)
Tab.4 Comparison of H₂S content of rats in every each group ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}, n = 10$)

Group	Pre-operation	5 days post-operation	10 days post-operation	14 days post-operation
Control	6.28 ± 0.74	6.75 ± 0.65	6.19 ± 0.44	6.80 ± 0.65
Model	6.93 ± 0.55	23.84 ± 2.65 ^{a*}	20.90 ± 2.53 ^{ab*}	15.67 ± 2.33 ^{abc*}
Vitamin D	6.34 ± 0.46	18.45 ± 3.11 ^{a#}	16.78 ± 2.04 ^{ab#}	10.19 ± 2.42 ^{abc#}
Activator	7.19 ± 0.77	26.51 ± 2.19 ^{a#}	23.49 ± 2.36 ^{ab#}	20.31 ± 2.50 ^{abc#}
Activator + Vitamin D	6.81 ± 0.43	20.69 ± 2.15 ^{a△▲}	18.08 ± 2.12 ^{ab△▲}	12.54 ± 2.07 ^{abc△▲}
<i>F</i> value		<i>F</i> _{time effect} = 424.700, <i>F</i> _{group effect} = 264.600, <i>F</i> _{interaction effect} = 32.140		
<i>P</i> value		<i>P</i> _{time effect} < 0.001, <i>P</i> _{group effect} < 0.001, <i>P</i> _{interaction effect} < 0.001		

* *P* < 0.05 vs Control group; # *P* < 0.05 vs Model group; △ *P* < 0.05 vs Vitamin D group; ▲ *P* < 0.05 vs Activator group; ^a*P* < 0.05 vs same group pre-operation; ^b*P* < 0.05 same group vs 5 days post-operation; ^c*P* < 0.05 vs same group 10 days post-operation.

学意义(*P* > 0.05)。见表4。

2.4 疼痛相关物质水平测定结果 与对照组比较,模型组大鼠 CGRP 和 PGE2 水平均升高(*P* < 0.05);与模型组比较,维生素 D 组大鼠 CGRP 和 PGE2 水平均降低(*P* < 0.05);与维生素 D 组比较,激活剂 + 维生素 D 组大鼠 CGRP 和 PGE2 水平均升高(*P* < 0.05);与激活剂组比较,激活剂 + 维生素 D 组大鼠 CGRP 和 PGE2 水平均降低(*P* < 0.05)。术前各组大鼠 CGRP 和 PGE2 水平比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表5。

表5 各组大鼠 CGRP 和 PGE2 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 Comparison of CGRP and PGE2 levels in rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	CGRP (pg/g)	PGE2 (ng/g)
Control	34.99 ± 4.06	41.95 ± 6.33
Model	133.46 ± 10.87 [*]	125.86 ± 11.44 [*]
Vitamin D	61.85 ± 8.53 [#]	55.25 ± 7.71 [#]
Activator	165.79 ± 11.24 [#]	187.36 ± 14.05 [#]
Activator + Vitamin D	104.67 ± 12.95 ^{△▲}	87.35 ± 8.67 ^{△▲}

* *P* < 0.05 vs Control group; # *P* < 0.05 vs Model group; △ *P* < 0.05 vs Vitamin D group; ▲ *P* < 0.05 vs Activator group.

2.5 蛋白印迹法检测结果 与对照组比较,模型组大鼠术后 NF-κBp65 和 CBS 蛋白表达量均升高, VDR 蛋白表达量降低(LSD-*t* = 28.743、37.477、26.175, *P* < 0.05);与模型组比较,维生素 D 组大鼠术后 NF-κBp65 和 CBS 蛋白表达量均降低, VDR 蛋白表达量升高(LSD-*t* = 24.947、13.156、14.322, *P* < 0.05);与维生素 D 组比较,激活剂 + 维生素 D 组大鼠术后 NF-κBp65 和 CBS 蛋白表达量均升高, VDR 蛋白表达量降低(LSD-*t* = 14.643、6.336、10.371, *P* < 0.05);与激活剂组比较,激活剂 + 维生素 D 组大鼠术后 NF-κBp65 和 CBS 蛋白表达量均降低, VDR 蛋白表达量升高(LSD-*t* = 29.227、14.406、

11.739, *P* < 0.05)。见表6、图1。

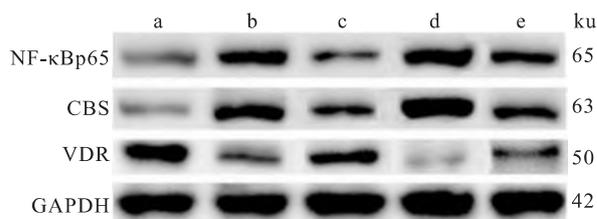


图1 NF-κB p65、CBS 和 VDR 蛋白表达电泳图

Fig.1 Western blot showed the expression of CBS, NF-κB p65 and VDR protein in rats

a: Control group; b: Model group; c: Vitamin D group; d: Activator group; e: Activator + Vitamin D group.

3 讨论

维生素 D 是一种类固醇激素,除参与钙磷代谢平衡外,其与高血压、肥胖症、代谢性和自身免疫性疾病等多种疾病有关^[8]。在大鼠神经系统内的感觉神经元存在大量 VDR 及其代谢酶,提示维生素 D 不足可能影响疼痛感知。研究显示^[9],外源性补充维生素 D 可显著缓解 CCI 大鼠神经痛,提高疼痛阈值。文献报道^[10],维生素 D 缺乏与带状疱疹后神经痛的严重程度和持续时间具有正相关性。此外,维生素 D 通过降低神经炎症反应可提高慢性神经痛大鼠对疼痛的阈值^[11]。背根神经节是初级感觉神经元胞体汇聚之地,具有传输和调节机体感觉、接受和传导伤害性感受的功能。L4 - L6 背根神经节位于腰段,该区域的 DRG 体积较大,且与众多上、下肢脊神经的发源节段有关,这使得它们在神经病理学疼痛中扮演重要角色。本研究结果显示,模型组大鼠术后各时间点 25(OH)D₃ 水平、PWTL 和 MWT 均低于对照组,而维生素 D 组大鼠各时间点 25(OH)D₃ 水平、PWTL 和 MWT 均高于模型组,此

表 6 各组大鼠 L4 - L6 背根神经节中 NF-κBp65、CBS 和 VDR 蛋白表达量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Tab.6 Comparison of the expressions levels of NF-κB p65, CBS and VDR protein in the L4 - L6 segments of the rat spinal cord among different groups of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	NF-κBp65	CBS	VDR
Control	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.76 ± 0.05
Model	0.68 ± 0.05*	0.65 ± 0.04*	0.23 ± 0.04*
Vitamin D	0.22 ± 0.03#	0.35 ± 0.06#	0.52 ± 0.05#
Activator	0.84 ± 0.06#	0.94 ± 0.07#	0.10 ± 0.04#
Activator + Vitamin D	0.49 ± 0.05 ^{△▲}	0.52 ± 0.06 ^{△▲}	0.31 ± 0.04 ^{△▲}

* P < 0.05 vs Control group; # P < 0.05 vs Model group; [△] P < 0.05 vs Vitamin D group group; [▲] P < 0.05 vs Activator group.

结果提示,CCI 大鼠维生素 D 水平降低,而且对疼痛的敏感性增强,外源性补充维生素 D 可降低大鼠对疼痛的敏感性。CGRP 和 PGE2 的表达水平与疼痛关系密切,CGRP 表达增多可导致痛觉敏感性提高,并长时间维持伤害性疼痛及炎症性疼痛状态,加重患者疼痛感^[12]。本研究结果显示,模型组 CGRP 和 PGE2 水平高于对照组,维生素 D 组二者水平均低于模型组。此结果提示维生素 D 可降低 CCI 大鼠疼痛介质的表达水平,缓解大鼠疼痛程度。

NF-κB 是由 Rel 家族构成的二聚体蛋白,参与多种基因的转录调控,而且对多种疼痛基因的表达和编码具有调节作用。研究^[13-14]表明,NF-κB 在 CCI 大鼠脊髓中高表达,其诱导神经炎症反应,造成神经性疼痛。在疼痛的传递过程中,细胞外伤害感受信号的转导需要细胞内信号分子的参与,H₂S 作为一种内源性气体信号分子,参与炎症、突触活动以及细胞凋亡等病理生理过程,同时在痛觉调制中发挥重要作用^[15-17]。CBS 是 H₂S 的重要合成酶,主要在神经系统表达,研究^[18-19]表明,CBS 在腰椎间盘突出症大鼠脊髓中高表达且大鼠疼痛阈值降低,当鞘内注射 CBS 抑制剂 AOAA 后可显著性降低神经元的兴奋性并减轻痛觉过敏,说明 CBS-H₂S 信号通路在神经痛的发展中具有重要意义。为进一步探讨维生素 D 缓解 CCI 大鼠神经痛的具体机制,本研究通过腹腔注射脂多糖激活 NF-κB 表达,同时给予维生素 D 治疗,结果显示,与激活剂组比较,激活剂 + 维生素 D 组大鼠各时间点 25(OH)D₃ 水平、PWT 和 MWT 升高;术后 CGRP 和 PGE2 的表达水平,NF-κBp65 和 CBS 蛋白表达量以及 H₂S 含量均降低,VDR 水平升高,此结果提示维生素 D 可降低 NF-κBp65 表达活性,从而抑制 CBS-H₂S 系统,缓解 CCI 大鼠疼痛。

综上所述,维生素 D 可缓解 CCI 大鼠疼痛程度,其可能是通过抑制 NF-κB/CBS-H₂S 信号通路发挥作用。但是本研究仍存在不足之处:首先,对维生

素 D 发挥作用的具体机制研究不够深入;其次,本研究仅涉及动物模型,缺乏细胞水平的验证。因此本研究需要进一步的补充和完善。

参考文献

- [1] Li Y, Chandra T P, Song X, et al. H₂S improves doxorubicin-induced myocardial fibrosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis via Keap1-Nrf2 [J]. Technol Health Care, 2021, 29(S1): 195 - 209. doi: 10.3233/THC-218020.
- [2] Tian J J, Tan C Y, Chen Q Y, et al. Upregulation of Nav1.7 by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain [J]. Int J Mol Med, 2020, 46(2): 782 - 94. doi: 10.3892/ijmm.2020.4611.
- [3] Chen H, Ma D, Zhang H, et al. Antinociceptive effects of oleuropein in experimental models of neuropathic pain in male rats [J]. Korean J Pain, 2021, 34(1): 35 - 46. doi: 10.3344/kjp.2021.34.1.35.
- [4] Baška P, Norbury L J. The role of nuclear factor kappa B (NF-κB) in the immune response against parasites [J]. Pathogens, 2022, 11(3): 310. doi: 10.3390/pathogens11030310.
- [5] Dong B, Zhou Y, Wang W, et al. Vitamin D receptor activation in liver macrophages ameliorates hepatic inflammation, steatosis, and insulin resistance in mice [J]. Hepatology, 2020, 71(5): 1559 - 74. doi: 10.1002/hep.30937.
- [6] Valle M S, Russo C, Malaguarnera L. Protective role of vitamin D against oxidative stress in diabetic retinopathy [J]. Diabetes Metab Res Rev, 2021, 37(8): e3447. doi: 10.1002/dmrr.3447.
- [7] Santos M C Q, da Silva T C B, da Silva F B O, et al. Effects of vitamin D administration on nociception and spinal cord pro-oxidant and antioxidant markers in a rat model of neuropathic pain [J]. Braz J Med Biol Res, 2021, 54(10): e11207. doi: 10.1590/1414-431X2021e11207.
- [8] 贾 斌, 梁思敏. 维生素 D₃ 对小鼠支气管哮喘气道炎症和氧化应激反应的作用及其分子机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(1): 58 - 63. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.010.
- [8] Jia B, Liang S M. The effects and molecular mechanisms of vitamin D₃ on airway inflammation and oxidative stress response in a mouse model of bronchial asthma [J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(1): 58 - 63. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.

- 2024.01.010.
- [9] Habib A M, Nagi K, Thillaiappan N B, et al. Vitamin D and its potential interplay with pain signaling pathways [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 820. doi: 10.3389/fimmu.2020.00820.
- [10] Seetan K, Albashir S, Jarrar B, et al. Assessment of serum vitamin D levels in the serum of patients with postherpetic neuralgia and its correlation to pain severity: a cross-sectional comparative study [J]. *Int J Clin Pract*, 2021, 75(11): e14750. doi: 10.1111/ijcp.14750.
- [11] Poisbeau P, Aouad M, Gazzo G, et al. Cholecalciferol (vitamin D₃) reduces rat neuropathic pain by modulating opioid signaling [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(10): 7208–21. doi: 10.1007/s12035-019-1582-6.
- [12] Nakatani A, Kunimatsu R, Tsuka Y, et al. High-frequency near-infrared semiconductor laser irradiation suppressed experimental tooth movement-induced inflammatory pain markers in the periodontal ligament tissues of rats [J]. *Lasers Med Sci*, 2023, 38(1): 109. doi: 10.1007/s10103-023-03761-x.
- [13] Yang H, Wu L, Deng H, et al. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells attenuates neuropathic pain by inhibiting the TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway in spinal microglia [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 154. doi: 10.1186/s12974-020-1731-x.
- [14] Bian J, Zhang B, Zhang Y, et al. FGF 10 inhibited spinal microglial activation in neuropathic pain *via* PPAR- γ /NF- κ B signaling [J]. *Neuroscience*, 2022, 500: 52–62. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.07.033.
- [15] Wang J, Zhang N, Liu H Z, et al. H₂S alleviates neuropathic pain in mice by Nrf2 signaling pathway activation [J]. *J Mol Neurosci*, 2023, 73(6): 456–68. doi: 10.1007/s12031-023-02134-x.
- [16] Guo J, Li G, Yang L. Role of H₂S in pain: growing evidences of mystification [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173322. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173322.
- [17] Li H, Liu S, Wang Z, et al. Hydrogen sulfide attenuates diabetic neuropathic pain through NO/cGMP/PKG pathway and μ -opioid receptor [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2020, 245(9): 823–34. doi: 10.1177/1535370220918193.
- [18] Huerta de la Cruz S, Rodríguez-Palma E J, Santiago-Castañeda C L, et al. Exogenous hydrogen sulfide restores CSE and CBS but not 3-MST protein expression in the hypothalamus and brainstem after severe traumatic brain injury [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(6): 1863–74. doi: 10.1007/s11011-022-01033-1.
- [19] 王前亮, 严军, 徐敏, 等. 硫化氢参与腰椎间盘突出症模型大鼠痛觉高敏 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(10): 1747–50. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.10.039.
- [19] Wang Q L, Yan J, Xu M, et al. H₂S expression in the hyperalgesia of rat lumbar disc herniation model [J]. *Chin J Exp Surg*, 2017, 34(10): 1747–50. doi: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2017.10.039.

Effect of vitamin D on NF- κ B/CBS-H₂S signaling pathway in rats with chronic sciatic nerve injury

Zhang Qin, Jiang Zhongjin, Ao Shengfu

(Dept of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003)

Abstract Objective To investigate the ameliorative effect of vitamin D on sciatic nerve chronic compression injury (CCI) rats and its regulatory effect on nuclear factor κ B (NF- κ B) /cystathione- β -synthase (CBS) -hydrogen sulfide (H₂S) system. **Methods** Fifty rats were randomly divided into five groups: control group, model group, vitamin D group, activator group, and activator + vitamin D group, with 10 rats in each group. Except for the control group, the rats in the other groups underwent sciatic nerve ligation to establish the CCI model. The vitamin D group received intraperitoneal injection of 500 mg/kg vitamin D, the activator group received intraperitoneal injection of 10 mg/kg NF- κ B activator lipopolysaccharide, and the activator + vitamin D group received intraperitoneal injection of 500 mg/kg vitamin D along with 10 mg/kg lipopolysaccharide. The control and model groups received intraperitoneal injection of an equal volume of saline, once per day for 2 weeks. The following parameters were compared among the groups: paw withdraw thermal latency (PWTl), mechanical withdrawal threshold (MWT), serum 25-hydroxyvitamin D₃ [25(OH)D₃] levels, H₂S content, calcitonin gene-related peptide (CGRP), prostaglandin E₂ (PGE₂) levels, and the expression of vitamin D receptor (VDR), NF- κ Bp65, and CBS proteins in the L4–L6 dorsal root ganglia of rats. **Results** Compared with the control group, the model group showed decreased PWTl, MWT, 25(OH)D₃ levels and VDR protein expression, while H₂S content, CGRP and PGE₂ levels, and

Kobophenol A 通过 Prdx6 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化

陈天宇^{1,2}, 王浩^{1,2}, 王金虹^{1,2}, 赵英杰^{1,2}, 周仁鹏^{1,2}, 胡伟^{1,2}, 鲁超^{1,3}

(¹ 安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; ² 安徽医科大学第二附属医院药物临床试验研究中心, 合肥 230601; ³ 安徽理工大学第一附属医院临床试验研究中心, 淮南 232007)

摘要 目的 探究 Kobophenol A (KPA) 对脂多糖 (LPS) 诱导的巨噬细胞 M1 型极化的作用及机制, 以期为炎症免疫性疾病的治疗和新药研发提供理论依据。方法 使用 LPS 诱导建立 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化模型, 并使用过氧化物还原酶 6 (Prdx6) 的抑制剂 MJ33 和 Prdx6-siRNA 构建 Prdx6 沉默模型。采用不同浓度的 KPA 处理小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, CCK-8 法检测细胞活力。Western blot 和免疫荧光染色法检测巨噬细胞 Prdx6 和巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-2 (COX-2) 的表达水平。RT-qPCR 检测巨噬细胞 Prdx6 和巨噬细胞 M1 型极化相关基因 iNOS、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达水平。流式检测 M1 型巨噬细胞标志分化簇 86 分子 (CD86) 的表达情况。结果 与 LPS 诱导的巨噬细胞 M1 型极化模型相比, KPA 可以显著恢复 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化形态学变化, 降低巨噬细胞 M1 型极化相关蛋白 iNOS、COX-2、CD86 和相关基因 iNOS、IL-6、TNF- α 的表达 (均 $P < 0.05$)。此外, LPS 显著下调 RAW264.7 巨噬细胞中 Prdx6 的表达, 而加入 KPA 可以上调 Prdx6 的表达, 并且 Prdx6 的抑制剂 MJ33 处理能够上调 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化标志蛋白 iNOS 的表达, 而 KPA 处理可以下调 iNOS 的表达 (均 $P < 0.05$)。结论 KPA 通过上调 Prdx6 的表达抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 M1 型极化。

关键词 Kobophenol A; RAW264.7 巨噬细胞; LPS; M1 型极化; Prdx6; MJ33

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)09-1644-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.011

2025-06-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(编号: 2208085MH215)

作者简介: 陈天宇, 男, 硕士研究生;

鲁超, 男, 研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: chaolu@aus.edu.cn

巨噬细胞是具有高度可塑性和功能多样性的先天免疫细胞^[1]。巨噬细胞向 M1 型极化过程中, 分泌促炎细胞因子促进炎症的发生发展, 巨噬细胞 M1/M2 极化比例失衡是多种炎症免疫性疾病发生和发展的始动因素^[2-3]。近期研究^[4-6]表明, 细胞

NF- κ Bp65 and CBS protein expression significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the vitamin D group exhibited increased PWTL, MWT, 25(OH) D₃ levels and VDR protein expression ($P < 0.05$), while H₂S content, CGRP and PGE2 levels, and NF- κ Bp65 and CBS protein expression significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the activator group, the activator + Vitamin D group showed increased PWTL, MWT, 25(OH) D₃ levels and VDR protein expression, and decreased H₂S content, CGRP and PGE2 levels and decreased NF- κ Bp65, CBS protein expression ($P < 0.05$). Compared with the vitamin D group, the activator + vitamin D group showed decreased PWTL, MWT, 25(OH) D₃ levels and VDR protein expression, while H₂S content, CGRP and PGE2 levels, and NF- κ Bp65 and CBS protein expression significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Exogenous supplementation of vitamin D can relieve nerve pain and reduce pain sensitivity in CCI rats, possibly by inhibiting NF- κ B/CBS-H₂S signaling pathway.

Key words sciatic nerve chronic injury; vitamin D; pain behavior; the pain threshold; receptors; NF- κ B/CBS-H₂S signaling pathway

Fund program Scientific and Technological Project of Guizhou Health Commission (No. gzwkj2024-417)

Corresponding author Jiang Zhongjin, E-mail: 670934573@qq.com