

网络出版时间: 2023-03-07 14:43:12 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1348.014.html>

石蒜碱降低 COX-2/NLRP3 炎症信号缓解小鼠奥沙利铂化疗痛

过琛璐¹ 吴吉² 杨荷雨¹ 谢敏¹ 刘玲¹

摘要 目的 探究石蒜碱对奥沙利铂化疗痛模型小鼠的作用及机制。方法 40 只小鼠随机分为 4 组,10 只/组,分别为对照组、模型组、给药组和抑制剂组。采用连续 5 d 腹腔注射奥沙利铂的方法构建化疗痛模型;石蒜碱进行鞘内给药;检测各组小鼠行为学及炎症相关蛋白表达水平变化。结果 与对照组相比,模型组小鼠自发缩足次数增加,机械痛阈值下降,运动距离及停留时间减少;脊髓组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、环氧合酶 2(COX-2)、NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)和半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)表达水平均增加。与模型组相比,石蒜碱鞘内给药后小鼠自发缩足次数减少,机械痛阈值增加,运动距离及停留时间增加,结合 COX-2 并降低其表达,并下调 IL-1 β 、GFAP、NLRP3 和 Caspase-1 蛋白表达水平。结论 石蒜碱抑制 COX-2 表达,阻断 NLRP3 炎症小体激活,降低脊髓炎症从而改善动物痛觉行为和运动能力。

关键词 石蒜碱;化疗痛;神经炎症;环氧合酶 2

中图分类号 R 730.53

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0429-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.014

奥沙利铂(oxaliplatin, OXA)是第三代二氨基环己烷铂类化疗药物,广泛用于治疗癌症,但其使用可导致慢性神经病变,造成患者病理性疼痛,且持续几个月甚至几年,严重影响患者生存质量^[1]。因此,研究 OXA 化疗痛的病理机制有助于相关镇痛药物开发。

神经炎症是病理性疼痛的一个重要特征,表现为胶质细胞活化及促炎细胞因子释放增加。在脊髓组织中,化疗药物使用导致促炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等表达增加^[2]。石蒜碱是从石蒜中分离出来的一种天然生物碱,具有抗肿瘤、抗病毒、抗炎的生物功效^[3]。为明确其在神

经炎症及化疗痛中的作用及病理机制,该文构建了 OXA 化疗痛小鼠模型,并行石蒜碱鞘内给药,检测行为学、形态学及炎症相关蛋白表达变化,为石蒜碱在化疗痛中的应用提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体质量(20 \pm 2)g,购于湖北省实验动物中心。于饲养在室温为(22 \pm 2) $^{\circ}$ C,12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜交替环境里,提供充足的水和食物。动物实验经湖北科技学院实验动物伦理委员会批准(伦理货号:2021-05-981),所有实验程序均符合当地和国际动物伦理使用指南。

1.1.2 主要试剂 蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司;奥沙利铂(货号:K2011137)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;石蒜碱(货号:B21169)和 NS-398 抑制剂(货号:S27166)均购于上海源叶生物科技有限公司。本实验所用的一抗如下:IL-1 β (货号:AF5103)、胶质纤维酸性蛋白(astrocytic marker glial fibrillary acidic protein, GFAP)(货号:BF0345)和 β -肌动蛋白(β -actin,货号:AF7018)均购于江苏亲科生物公司;环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2),货号:A1253、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD like receptor protein 3, NLRP3),货号:A12694 和半胱氨酸蛋白酶-1(cysteiny l aspartate and specific proteinase 1, Caspase-1),货号:A0964 均购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;所用二抗为 HRP 标记山羊抗兔 IgG 和二抗为 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购于武汉爱博泰克生物科技有限公司;荧光二抗为异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG(货号:AB6785)购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及分组处理 小鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、给药组和抑制剂组,10 只/组。连续 5 d 腹腔注射 0.1 ml(4 mg/kg)奥沙利铂构建化

2023-02-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81901149、32100823)

作者单位:¹湖北科技学院医学部药学院,咸宁 437100

²右江民族医学院临床医学院,百色 533000

作者简介:过琛璐,女,硕士研究生;

刘玲,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: liuling0306@163.com

疗痛模型^[4]; 对照组腹腔注射 0.1 ml 5% 葡萄糖溶液; 第 7 天时进行鞘内给药处理; 石蒜碱给药组在奥沙利铂模型基础上鞘内注射 2 μl (1 mg/kg) 石蒜碱^[5]; 抑制剂组在奥沙利铂模型基础上鞘内注射 2 μl (1 mg/kg) NS-398^[6]; 模型组小鼠鞘内注射同等剂量的溶剂 (1 : 1 体积稀释比的二甲基亚砷和 0.9% 氯化钠溶液)。鞘内注射具体方法如下: 小鼠背部剔毛消毒, 用无菌微量注射器在第五腰椎和第六腰椎椎棘突间隙垂直进针, 当注射器针头进入蛛网膜下腔后, 缓慢倾斜 45° 注入药物, 注射完后滞留 1 min 防止药物泄漏。给药结束 3 h 以后进行行为学测定。

1.2.2 记录小鼠自发缩足次数 将小鼠放置在 30 cm × 30 cm × 30 cm 的透明有机玻璃内。将小鼠放置 30 min 适应环境, 然后记录 5 min 内小鼠的自发缩足 (或舔爪) 次数, 总共进行 3 次, 每次 5 min^[7]。

1.2.3 机械痛阈值检测 将小鼠放在透明的有机玻璃盒内适应环境 30 min。用 Von Frey 纤维 0.4 ~ 26 g 对小鼠后足底正中部进行垂直刺激, 刺激时纤维弯曲 2 ~ 3 s 即可, 连续刺激时要间隔 2 min。安静状况下, 小鼠出现舔足或抬足等行为视为阳性反应, 反之则为阴性反应。当出现阳性反应时, 用相邻较低一级力度的 Von Frey 纤维再次进行刺激。测试 6 组数据即结束检测。使用公式机械痛阈值 = 10 [Xf + Kδ] / 10 000 来计算小鼠各组的缩足阈值 (Xf 为本次行为学测试中使用的最后一个 Von Frey 纤维的阶数, K 为痛觉阈值校正系数, δ 为相邻不同纤维刺激之间的差异^[8])。

1.2.4 小鼠转棒疲劳实验 实验前将小鼠放在转棒疲劳仪上进行为期 3 d 的转棒实验训练。开始实验, 先 10 r/min 的条件下匀速运动 10 s, 匀加速 10 s; 后以 20 r/min 的条件匀速运动 30 s, 匀加速 10 s, 运动总共进行 10 min。记录小鼠在转棒运动时的运动距离 (m) 和停留时间 (s) 重复 3 次, 期间间隔 10 min^[9]。

1.2.5 分子对接 PDB 数据库 (https://www.rcsb.org/) 下载 COX-2 蛋白 (ID 为 5f19) 结构; Pubchem 数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) 下载石蒜碱 (ID 为 4U4U) 二维结构; ChemBio3D 优化石蒜碱; Autodock_vina 将 COX-2 和石蒜碱对接; OpenBabel (v2.3.1) 39 分离文件, 添加氢键并分配可旋转键和电荷; PDBQT 进一步对接; PyMOL 可视化对接结果^[10]。

1.2.6 Western blot 法分析 行为学记录结束后, 每组随机各取 5 只小鼠给予过量麻醉剂戊巴比妥钠

(150 mg/kg) 处死小鼠, 分离腰段脊髓组织置于含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中在冰上进行组织匀浆。收集组织匀浆液于离心管中, 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 加入 1/3 体积的 4 × 上样缓冲液, 沸水中加热 10 min 变性。样品的蛋白质浓度用 BCA 蛋白分析试剂盒进行检测。SDS-PAGE 电泳分离蛋白质样品, 将蛋白质电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。一抗孵育之后, 洗膜 3 次, 并用二抗 (1 : 10 000) 室温孵 1 h, 然后用 LAS500 凝胶成像系统扫描观察, ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.2.7 免疫荧光法分析 每组随机各取 5 只小鼠, 将动物深度麻醉后, 经心脏灌流固定, 分离脊髓组织进一步脱水及石蜡包埋, 进行组织切片厚度为 4 μm。组织切片经脱蜡, 置于免疫荧光抗原修复液中 95 °C 煮沸 15 min 修复后自然冷却至室温, 然后将切片用 3% 过氧化氢孵化, PBS 漂洗, 用免疫荧光封闭液封闭 1 h, 加入一抗孵育过夜, PBS 洗 3 次, 加入荧光素标记二抗染色标记, 漂洗, 封片, 荧光显微镜观察, ImageJ 软件分析荧光强度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。所有数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 石蒜碱对化疗痛小鼠行为学的影响 如表 1 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠自发缩足次数增加 ($P < 0.01$); 机械痛阈值降低 ($P < 0.01$); 运动距离减少 ($P < 0.01$); 停留时间距离下降 ($P < 0.01$)。表明模型小鼠痛觉过敏并伴随运动能力受损。石蒜碱给药后发现, 与模型组相比, 给药组小鼠自发缩足次数减少 ($P < 0.01$), 机械痛阈值升高 ($P < 0.01$), 运动距离增长 ($P < 0.01$) 和停留时间增加 ($P < 0.01$)。表明石蒜碱鞘内给药可改善化疗痛模型小鼠的痛觉行为和运动能力。

表 1 石蒜碱对化疗痛模型小鼠痛觉行为和运动能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	自发缩足次数	机械痛阈值	运动距离 (m)	停留时间 (s)
对照	5.50 ± 1.27	0.81 ± 0.18	26.08 ± 0.61	587.31 ± 19.73
模型	13.70 ± 1.77**	0.22 ± 0.12**	6.472 ± 2.05**	250.65 ± 38.86**
给药	7.20 ± 1.23###	0.48 ± 0.04###	24.24 ± 1.86###	534.18 ± 44.36###
抑制剂	8.00 ± 1.63###	0.49 ± 0.08###	23.70 ± 2.39###	540.50 ± 49.99###
F 值	56.77	42.74	244.60	166.70

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ### $P < 0.01$

2.2 石蒜碱给药降低脊髓炎症 免疫荧光结果显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓背角中促炎细胞因子 IL-1 β 荧光强度增加 ($P < 0.01$) 见图 1、表 2。同时,免疫印迹实验结果分析显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓组织中 IL-1 β 的表达量高于对照组 ($P < 0.01$),见图 2、表 2;经石蒜碱给药后,与模型组相比,脊髓中 IL-1 β 荧光强度降低 ($P < 0.01$),见图 1、表 2,表达水平降低 ($P < 0.01$),见图 2、表 2。

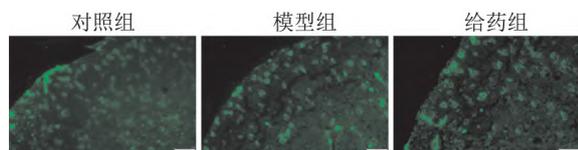


图 1 石蒜碱给药对小鼠脊髓 IL-1 β 荧光强度的影响 $\times 60$

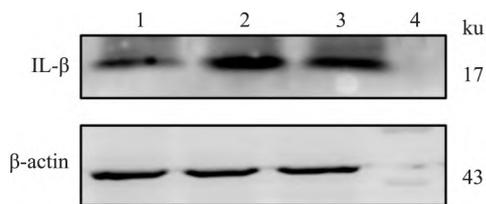


图 2 Western blot 检测石蒜碱给药对小鼠脊髓 IL-1 β 蛋白表达水平的影响
1: 对照组; 2: 模型组; 3: 给药组; 4: Marker

表 2 小鼠脊髓 IL-1 β 表达水平的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度	相对表达水平
对照	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.08
模型	1.47 \pm 0.06**	1.49 \pm 0.11**
给药	0.98 \pm 0.04##	1.16 \pm 0.14##
F 值	44.26	14.75

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.3 石蒜碱给药抑制脊髓星形胶质细胞激活 免疫荧光结果显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓背角中星形胶质细胞标志物 GFAP 荧光强度增加 ($P < 0.01$),见图 3、表 3。同时,Western blot 实验结果分析显示,模型组小鼠脊髓组织中 GFAP 的表达量增加 ($P < 0.01$),见图 4、表 3。与模型组相比,经石蒜碱给药后,脊髓 GFAP 荧光强度降低 ($P < 0.01$),见图 3、表 3,表达量也下调 ($P < 0.01$),见图 4、表 3。

表 3 小鼠脊髓 GFAP 表达水平的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度	相对表达水平
对照	1.00 \pm 0.08	1.00 \pm 0.09
模型	1.64 \pm 0.10**	1.54 \pm 0.12**
给药	1.08 \pm 0.07##	1.06 \pm 0.07##
F 值	54.11	27.05

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

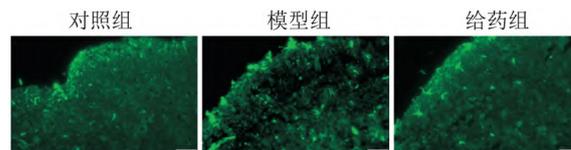


图 3 石蒜碱给药对小鼠脊髓 GFAP 荧光强度的影响 $\times 60$

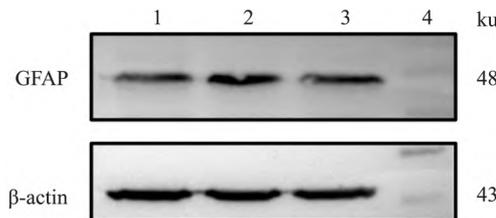


图 4 Western blot 检测石蒜碱给药对小鼠脊髓 GFAP 蛋白表达水平的影响
1: 对照组; 2: 模型组; 3: 给药组; 4: Marker

2.4 石蒜碱给药抑制 COX-2 表达 分子对接结果显示,石蒜碱可与 COX-2 第 126 和 372 位的丝氨酸和谷氨酰胺形成离子键,键长为 0.22 nm(图 5)。免疫荧光结果显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓背角处 COX-2 荧光强度增强 ($P < 0.01$),见图 6、表 4;与模型组相比,经石蒜碱给药后,脊髓背角 COX-2 荧光强度减弱 ($P < 0.01$),见图 6、表 4。同时,免疫印迹分析显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓组织中 COX-2 的表达量升高 ($P < 0.01$),见图 7、表 4。经过石蒜碱给药后 COX-2 下降 ($P < 0.01$),见图 7、表 4。

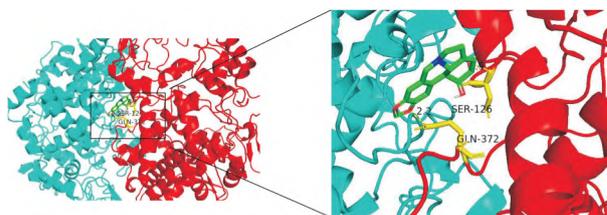


图 5 石蒜碱和 COX-2 相互作用示意图

黄色: 石蒜碱; 蓝色: COX-2 蛋白; 红色: 石蒜碱连接的 COX-2 氨基酸残基

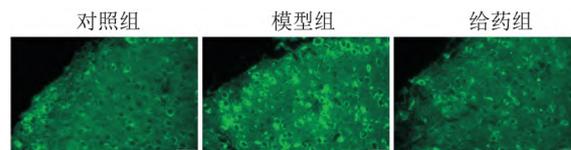


图 6 石蒜碱给药对小鼠脊髓 COX-2 荧光强度的影响 $\times 60$

2.5 石蒜碱给药阻断 NLRP3 炎症小体激活 免疫荧光结果显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓背角中炎症反应关键诱导活化因子 Caspase-1 荧光强度增强 ($P < 0.01$),见图 8、表 5。与模型组相比,经

石蒜碱给药后,脊髓背角 Caspase-1 荧光强度减弱 ($P < 0.01$),见图 8、表 5。免疫印迹结果显示,与对照组相比,模型组小鼠脊髓组织中 NLRP3 和 Activated caspase-1 的表达增加 ($P < 0.01$),见图 9、表 5,石蒜碱给药后 NLRP3 和 Activated caspase-1 表达水平下降 ($P < 0.01$),见图 9、表 5。

表 4 小鼠脊髓 COX-2 表达水平的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度	相对表达水平
对照	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.09
模型	1.66 ± 0.16**	1.90 ± 0.14**
给药	1.09 ± 0.12##	1.27 ± 0.10##
F 值	22.71	50.57

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

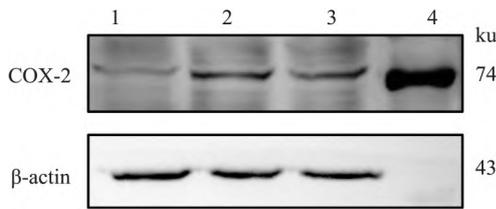


图 7 Western blot 检测小鼠脊髓 COX-2 蛋白表达水平的变化

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 给药组; 4: Marker

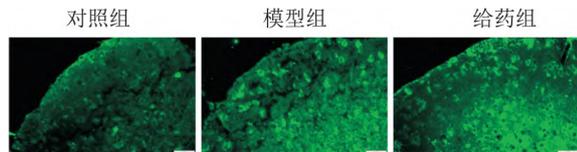


图 8 小鼠脊髓 Caspase-1 荧光强度的影响 ×60

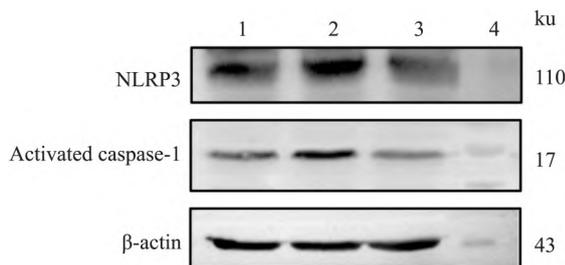


图 9 化疗痛小鼠脊髓 NLRP3 和 Activated caspase-1 蛋白水平的变化

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 给药组; 4: Marker

表 5 小鼠脊髓 NLRP3 和 Caspase-1 表达水平的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对荧光强度 (Caspase-1)	相对表达水平 (NLRP3)	相对表达水平 (Activated caspase-1)
对照	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07
模型	1.74 ± 0.11**	1.23 ± 0.02**	1.66 ± 0.08**
给药	1.26 ± 0.11##	0.75 ± 0.05##	0.91 ± 0.07##
F 值	32.17	68.80	83.32

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.6 NS-398 给药抑制 COX-2 蛋白表达缓解小鼠痛觉行为 与模型组小鼠相比,抑制组小鼠自发缩足次数减少 ($P < 0.01$),机械痛阈值升高 ($P < 0.01$),运动距离和转棒停留时间均增加 ($P < 0.01$)。同时,抑制组小鼠脊髓组织中 COX-2 表达下降 ($P < 0.01$)。见图 10 和表 1、6。

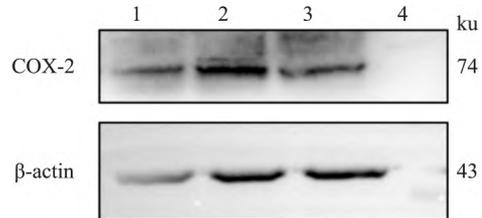


图 10 NS-398 抑制剂给药对小鼠脊髓 COX-2 蛋白表达水平的影响

1: 对照组; 2: 模型组; 3: 抑制剂组; 4: Marker

表 6 小鼠脊髓 COX-2 蛋白表达水平的相对定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对表达水平
对照	1.00 ± 0.13
模型	1.47 ± 0.08**
抑制剂	1.10 ± 0.14##
F 值	12.75

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

本研究显示石蒜碱可结合 COX-2 缓解化疗痛。COX-2 是一种炎症反应关键靶向蛋白,其抑制剂如美洛昔康和 NS-398 等属于非甾体类抗炎药,具有缓解病理性疼痛的效果。在大鼠脊神经结扎疼痛模型中,鞘内注射美洛昔康可抑制脊髓胶质细胞激活减轻机械异常疼痛和热痛过敏^[11]。NS-398 在大鼠角叉菜胶及佐剂型关节炎疼痛模型中,具有镇痛解热的作用^[6]。本研究中 NS-398 给药后可缓解奥沙利铂化疗痛。同时,在巨噬细胞中,石蒜碱剂量依赖性地抑制脂多糖诱导的 COX-2 蛋白水平的上调和 TNF- α 和 IL-6 的释放。石蒜碱在 1 mg/kg 剂量下可缓解醋酸诱发的小鼠疼痛反应,发挥抗伤害作用,并降低大鼠足肿胀程度。本研究中表明石蒜碱给药可缓解小鼠化疗痛,推测石蒜碱可作为一种缓解化疗痛的潜在药物。

石蒜碱可阻断 COX-2 降低脊髓炎症。NLRP3 炎症小体通过介导 Caspase-1 激活和 IL-1 β 分泌参与疼痛病理。NLRP3 的激活和上调导致大鼠痛觉过敏^[12]。特异性 NLRP3 拮抗剂治疗可减轻癌症诱导骨痛啮齿动物模型和奥沙利铂诱导周围神经病变

模型中的机械性痛觉异常,并降低脊髓中 NLRP3、Caspase-1 和 IL-1 β 的表达水平到基础水平^[13]。COX-2 抑制剂塞来昔布或基因敲低抑制 NLRP3 炎症小体激活、IL-1 β 分泌及 Caspase-1 活性^[14]。巨噬细胞和小胶质细胞中, lincRNA-COX-2 敲低抑制 NLRP3 炎症小体激活并阻止 Caspase-1 激活,导致 IL-1 β 分泌减少^[15]。进而,在特发性肺纤维化小鼠模型中,石蒜碱给药抑制 NLRP3 炎症小体激活,降低 Caspase-1 活性表达,缓解肺部炎症。在化疗痛模型小鼠中,石蒜碱降低脊髓 NLRP3 和活化的 Caspase-1 表达。综合上述数据及文献报道,石蒜碱阻断 COX-2 抑制 NLRP3 炎症小体介导的脊髓炎症。

本研究的创新点在于明确石蒜碱的作用靶点及降低脊髓炎症和缓解化疗痛的药理学功效,为其在化疗痛中的使用提供数据支持。然而,局限性在于为确定石蒜碱对脊髓中枢的影响,给药方式为鞘内给药,而实际应用中多为口服或静脉给药,因此,为进一步分析石蒜碱的药理剂量与功效的对应关系,还应尝试多种给药方式及给药浓度。

参考文献

- [1] Sałat K. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: part 1-current state of knowledge and perspectives for pharmacotherapy [J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(3): 486–507.
- [2] 王星,余万,黄保胜. 异甘草素通过 TLR4-TBK1-IKK ϵ 信号通路对创伤性脑损伤大鼠脑内炎症反应的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2021, 56(2): 277–82.
- [3] Yuan Q, Zhang X, Wei W, et al. Lycorine improves peripheral nerve function by promoting schwann cell autophagy *via* AMPK pathway activation and MMP9 downregulation in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 105985.
- [4] Deng J, Ding H H, Long J L, et al. Oxaliplatin-induced neuro-
- pathic pain involves HOXA6 *via* a TET1-dependent demethylation of the SOX10 promoter [J]. *Int J Cancer*, 2020, 147(9): 2503–14.
- [5] Çitoğlu G S, Acikara O B, Yilmaz B S, et al. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *sternbergia fisheriana* (herbert) rupr [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1): 81–7.
- [6] Segelcke D, Reichl S, Neuffer S, et al. The role of the spinal cyclooxygenase (COX) for incisional pain in rats at different developmental stages [J]. *Eur J Pain*, 2020, 24(2): 312–24.
- [7] Mao Y, Wang C, Tian X, et al. Endoplasmic reticulum stress contributes to nociception *via* neuroinflammation in a murine bone cancer pain model [J]. *Anesthesiology*, 2020, 132(2): 357–72.
- [8] Maynard K R, Hobbs J W, Phan B N, et al. BDNF-TrkB signaling in oxytocin neurons contributes to maternal behavior [J]. *eLife*, 2018, 7: e33676–82.
- [9] Shi X, Bai H, Wang J, et al. Behavioral assessment of sensory, motor, emotion, and cognition in rodent models of intracerebral hemorrhage [J]. *Front Neurol*, 2021, 12: 667511.
- [10] Chen Z, Lin T, Liao X, et al. Network pharmacology based research into the effect and mechanism of Yinchenhao decoction against cholangiocarcinoma [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 13.
- [11] Stevens A M, Saleem M, Deal B, et al. Targeted cyclooxygenase-2 inhibiting nanomedicine results in pain-relief and differential expression of the RNA transcriptome in the dorsal root ganglia of injured male rats [J]. *Mol Pain*, 2020, 16: 1744806920943309.
- [12] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [13] Lopez-Castejon G. Control of the inflammasome by the ubiquitin-system [J]. *FEBS J*, 2020, 287(1): 11–26.
- [14] Hua K F, Chou J C, Ka S M, et al. Cyclooxygenase-2 regulates NLRP3 inflammasome-derived IL-1 β production [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4): 863–74.
- [15] Xue Z, Zhang Z, Liu H, et al. lincRNA-Cox2 regulates NLRP3 inflammasome and autophagy mediated neuroinflammation [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 130–45.

Lycorine alleviates oxaliplatin – induced chemotherapy induced pain in mice *via* reducing COX – 2 /NLRP3 inflammatory signaling

Guo Chenlu¹, Wu Ji², Yang Heyu¹, Xie Min¹, Liu Ling¹

(¹School of Pharmacy Xianning Medical College Hubei University of Science and Technology Xianning 437100;

²Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000)

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of lycorine on oxaliplatin (OXA) induced chemotherapy pain in mice. **Methods** 40 mice were randomly divided into 4 groups, 10 mice per group, which were respectively divided into control group, model group, administration group, and inhibitor group. A mouse model of chemotherapy induced pain was established by intraperitoneal injection of OXA for 5 consecutive days. Intrathecal administration of lycorine was performed. Behavioral changes and expression levels of inflammatory related proteins were

(下转第 441 页)

Multi – database analysis and experimental study on the expression of HNF4A in gastric cancer

Lu Hao¹, Fan Jichang¹, Zhou Liqiang², Wu You¹, Xin Lin¹

(¹Dept of Gastrointestinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000;

²Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330000)

Abstract Objective To investigate the expression, prognosis and biological role of hepatocyte nuclear factor 4A (HNF4A) in gastric cancer, and to study its effect on the proliferation of gastric cancer cells. **Methods** Tumor Immune Estimation Resource 2.0 (TIMER2.0) and Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) databases were used to analyze the relative expression levels of HNF4A in gastric cancer and normal tissue, KM Plotter was used to analyze the correlation between the expression level of HNF4A and the survival rate of gastric cancer patients, TISIDB database and R language (4.1.2) were used to analyze whether HNF4A was involved in the immune regulation process of gastric cancer. cBioPortal database was used to analyze the mutations of HNF4A in gastric cancer, GSEA 4.2 was used to analyze the functional enrichment of HNF4A, and LinkedOmics database was used to predict the genes that might be regulated by HNF4A. The relative expression of HNF4A in gastric cancer and adjacent tissues was detected by qRT-PCR, Western blot and immunohistochemistry (IHC). The proliferation and cell cycle of gastric cancer cells were analyzed by CCK-8, EdU, colony forming assay and flow cytometry. **Results** The expression of HNF4A increased in gastric cancer tissues ($P < 0.05$), and the overall survival rate of gastric cancer patients with high HNF4A expression was worse ($P < 0.001$). HNF4A was mainly missense mutated in gastric cancer. Immune cell infiltration showed that HNF4A was associated with B lymphocytes, CD8⁺ T cells, neutrophils, macrophages and dendritic cells (all $P < 0.001$). HNF4A was also associated with tumor mutation burden ($r = 0.28$, $P < 0.0001$) and microsatellite instability ($r = 0.13$, $P < 0.01$). After knockdown of HNF4A, cell proliferation ability was significantly inhibited, and cell cycle was arrested at G0/G1 phase. **Conclusion** HNF4A expression significantly increased in gastric cancer tissues, which is associated with poor prognosis, and may also be involved in immune regulation. Knockdown of HNF4A can inhibit the proliferation of gastric cancer cells.

Key words HNF4A; gastric cancer; cell proliferation; bioinformatics

(上接第 433 页)

detected. **Results** Compared with control group, model group mice exhibited the increased number of spontaneous flinches, decreased mechanical nociceptive threshold, decreased movement distance and latency, and up-regulated expression levels of interleukin-1 β (IL-1 β), astrocytic marker glial fibrillary acidic protein (GFAP), cyclooxygenase-2 (COX-2), NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), cysteinyl aspartate and specific proteinase 1 (Caspase-1). Compared with model group, lycorine administration reduced the number of spontaneous flinches, increased mechanical nociceptive threshold, enhanced the movement distance and latency, bound and reduced COX-2 expression, down-regulated the expression levels of IL-1 β , GFAP, NLRP3 and Caspase-1. **Conclusion** Lycorine reduces COX-2 expression, inhibits NLRP3 inflammasome activation, suppresses spinal inflammation, consequently alleviates pain behaviors and improved motor ability of mice.

Key words lycorine; chemotherapy induced pain; neuroinflammation; cyclooxygenase-2