

## • 实验研究 •

## 布托啡诺调节 cGAS/STING 信号通路对脊髓损伤大鼠神经细胞炎症的影响

邵恩, 黄杨, 袁振武, 郭小丽\*

荆门市中心医院 荆楚理工学院附属荆门市中心医院 麻醉科, 湖北 荆门 448001

**摘要:** **目的** 探讨布托啡诺对脊髓损伤大鼠神经细胞炎症的影响及其机制。**方法** 复制脊髓损伤大鼠模型, 将大鼠分为假手术组、模型组、布托啡诺 (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 组、布托啡诺+2',3'-cGAMP (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  布托啡诺+500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  2',3'-cGAMP) 组, 对大鼠进行运动功能评分, 苏木精-伊红 (HE) 染色检测脊髓组织病理变化, TUNEL 染色检测细胞凋亡, ELISA 检测脊髓组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$ 、IL-18 水平, 免疫荧光染色检测小胶质细胞, Western blotting 检测脊髓组织环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶 (cGAS)、干扰素基因刺激因子 (STING)、Nod 样受体蛋白 3 (NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、IL-1 $\beta$  蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 布托啡诺组脊髓组织损伤减轻, 炎症细胞减少, 坏死细胞减少, Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分显著升高, 脊髓组织细胞凋亡率、小胶质细胞及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平, cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与布托啡诺组比较, 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组脊髓组织损伤加重, 细胞排列较为松散, 炎性细胞增多, BBB 评分显著降低, 脊髓组织细胞凋亡率、小胶质细胞及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平, cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 布托啡诺通过抑制 cGAS/STING 信号通路激活, 抑制小胶质细胞激活及炎症反应, 改善大鼠脊髓损伤。

**关键词:** 布托啡诺; 脊髓损伤; 神经炎症; 环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶/干扰素基因刺激因子信号通路; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; Nod 样受体蛋白 3; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1

中图分类号: R965; R971 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2024)05 - 1085 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.05.001

## Impact of butorphanol on nerve cell inflammation in rats with spinal cord injury by regulating cGAS/STING signal pathway

SHAO Ken, HUANG Yang, YUAN Zhenwu, GUO Xiaoli

Department of Anesthesiology, The Central Hospital of Jingmen, The Central Hospital of Jingmen Affiliated to Jingchu University of Technology, Jingmen 448001, China

**Abstract: Objective** To investigate the impact of butorphanol on nerve cell inflammation in rats with spinal cord injury and its mechanism. **Methods** Spinal cord injury rat models were duplicated and grouped into sham operation group, model group, butorphanol (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) group, and butorphanol + 2',3'-cGAMP (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  butorphanol + 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  2',3'-cGAMP) group, the rats were scored for motor function, HE staining was applied to detect the pathological changes of spinal cord tissue, TUNEL staining was applied to detect apoptosis, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-18 in spinal cord tissue were detected by ELISA, immunofluorescence staining was applied to detect microglia, Western blotting was applied to detect the expression of cGAS, STING, NLRP3, Caspase-1, and IL-1 $\beta$  proteins in spinal cord tissue. **Results** Compared with model group, the injury of spinal cord tissue, inflammatory cells and necrotic cells were reduced in butorphanol group, BBB score was obviously higher, the apoptosis rate of spinal cord tissue, the levels of microglia and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, and the protein expression of cGAS, STING, NLRP3, Caspase-1, and IL-1 $\beta$  were obviously decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with butorphanol group, the spinal cord tissue injury in butorphanol + 2',3'-cGAMP group

收稿日期: 2023-12-07

基金项目: 湖北陈孝平科技发展基金会临床专项研究基金 (CXPIJH12000005-07-102)

作者简介: 邵恩, 男, 主治医师, 本科, 主要研究方向为心血管麻醉及体外循环研究。E-mail: Yqq0578@163.com

\*通信作者: 郭小丽, 女, 主治医师, 本科, 主要研究方向为老年患者麻醉研究。E-mail: 852530247@qq.com

was aggravated, the cell arrangement was loose, and inflammatory cells were increased, the BBB score was obviously lower, the apoptosis rate of spinal cord tissue, the levels of microglia and TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, and the protein expression of cGAS, STING, NLRP3, Caspase-1, and IL-1 $\beta$  were obviously higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Butorphanol can improve spinal cord injury in rats by inhibiting the activation of cGAS/STING signal pathway and inhibiting the activation of microglia and inflammatory reaction.

**Key words:** butorphanol; spinal cord injury; neuroinflammation; cGAS/STING signal pathway; TNF- $\alpha$ ; NLRP3; Caspase-1

脊髓损伤是由各种致病因素引起的中枢神经系统疾病, 可导致神经系统严重并发症, 使患者生活质量下降, 脊髓损伤发病率较高, 目前缺乏有效的治疗手段, 研究其损伤机制及有效治疗药物, 对于脊髓功能恢复, 预防继发损伤具有重要意义<sup>[1]</sup>。环磷酸鸟苷-磷酸腺苷合成酶(cGAS)属于核苷酸转移酶家族成员, 可通过激活干扰素基因刺激因子(STING)通路, 激活先天免疫系统, 在阿尔茨海默病、帕金森病等神经系统疾病中发挥作用<sup>[2]</sup>。研究显示, 脑中动脉闭塞小鼠模型中, 敲降cGAS表达, 可抑制cGAS/STING通路并可有效减少小鼠脑细胞凋亡, 降低脑梗死面积率, 最终改善缺血性中风期间受损的神经功能<sup>[3]</sup>。布托啡诺是阿片受体部分激动药, 具有缓解疼痛的作用, 临床研究显示, 布托啡诺可改善鼻内镜手术老年患者早期术后认知功能障碍<sup>[4]</sup>。另有研究显示, 布托啡诺通过抑制p38/JNK/ATF2/p53信号通路降低脂多糖(LPS)诱导的神经元炎症反应和细胞凋亡, 表明布托啡诺具有神经保护作用<sup>[5]</sup>。神经炎症是脊髓损伤重要的病理生理机制, 主要由定居巨噬细胞, 又称小胶质细胞, 介导, 引起炎症因子如肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等炎症因子水平升高, 而研究显示, 布托啡诺可通过抑制TNF- $\alpha$ 减缓人软骨细胞衰老<sup>[6]</sup>。核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路为主要炎症通路, 研究显示布托啡诺通过抑制NF- $\kappa$ B通路的激活, 降低巨噬细胞M1表型标记物(TNF- $\alpha$ 、诱导型一氧化氮合酶等)的表达, 并增强受LPS刺激的小鼠支气管肺泡灌洗液中肺泡巨噬细胞中M2标记物的表达<sup>[7]</sup>。脊髓小胶质细胞的活化伴随cGAS/STING通路激活, 从而激活NF- $\kappa$ B释放促炎因子, 如TNF- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6等, 导致炎症反应, 进而引起脊髓损伤<sup>[8]</sup>。因此本研究基于cGAS/STING通路, 探索布托啡诺对脊髓损伤大鼠神经细胞炎症的影响及其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

6~8周龄SPF级SD雄性大鼠共40只, 体重180~220g, 购自北京维通利华实验动物技术有

限公司, 生产许可证号SCXK(京)2021-0011。动物饲养于湖北梦阳药业股份有限公司, 使用许可证号SYXK(鄂)2022-0125。饲养环境条件: 温度22~24℃, 湿度(55 $\pm$ 10)%, 12h黑暗/12h循环光照, 自由饮用食水。本实验已通过荆门市中心医院动物实验伦理委员会审核并获得批准(审批号202209007)。

### 1.2 主要材料与试剂

酒石酸布托啡诺注射液(规格1mL:1mg, 批号20210925)购自江苏恒瑞医药股份有限公司; cGAS激活剂(2',3'-cGAMP, 货号HY-100564)购自美国MCE公司, 一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)(货号C1089)、大鼠TNF- $\alpha$ (货号PT516)、IL-18(货号PI555)、IL-1 $\beta$ (货号PI303)试剂盒购自碧云天生物科技有限公司; IBA-1(货号ab178847)及Alexa Fluor<sup>®</sup>647标记的山羊抗兔IgG(货号ab150079)购自英国Abcam公司; cGAS(货号79978)、STING(货号50494)、Nod样受体蛋白3(NLRP3)(货号#15101)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)(货号83383)、IL-1 $\beta$ (货号31202)及内参 $\beta$ -actin(货号4970)抗体购自CST公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验分组及模型制备** 将大鼠随机分为假手术组、模型组、布托啡诺组、布托啡诺+2',3'-cGAMP组, 每组10只。根据参考文献报道<sup>[9]</sup>, 制备脊髓损伤大鼠模型, SD大鼠ip 10%戊巴比妥钠麻醉, 沿背部中线, 切开皮肤, 去除T<sub>9</sub>~T<sub>11</sub>椎板, 使用10g的打击器自5cm高度自由下落打击暴露T<sub>10</sub>脊髓后迅速移开, 若大鼠出现后肢和尾部抽搐, 双后肢出现瘫痪, 表明造模成功。假手术组大鼠仅行椎板切除术而不损伤脊髓。造模成功后2、12、24h, 布托啡诺组使用100 $\mu$ g/kg布托啡诺鼻内给药, 布托啡诺+2',3'-cGAMP组同时使用100 $\mu$ g/kg布托啡诺与500 $\mu$ g/kg 2',3'-cGAMP鼻内给药, 给药剂量参考文献报道<sup>[10-11]</sup>, 1次/d, 连续给药14d, 假手术组与模型组给予等量PBS缓冲液。

**1.3.2 运动功能评分** 在术后 1、3、7、14 d 后, 对大鼠采用 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分对大鼠运动功能进行评分, 共 0~21 分, 0 分表示完全瘫痪, 21 分表示神经行为功能完全正常<sup>[12]</sup>。

**1.3.3 苏木精-伊红(HE)染色法检测脊髓组织病理变化** 末次给药 24 h 后, 麻醉处死大鼠, 分离出大鼠脊髓, 取下以损伤部位为中心的 1 cm 长脊髓组织, 取其中 5 只大鼠脊髓组织 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片后进行 HE 染色, 显微镜观察脊髓组织病理变化。其余 5 只大鼠脊髓组织分成 2 部分于 -80 °C 保存, 一部分用于炎症因子水平及 Western blotting 检测, 另一部分用于免疫荧光染色。

**1.3.4 TUNEL 法检测细胞凋亡** 取大鼠脊髓组织切片, 脱蜡水化后, 加入 20 μg/mL 蛋白酶 K 孵育 20 min, PBS 洗涤后, 加入 50 μL TUNEL 反应液, 37 °C 避光染色 1 h, DAPI 复染细胞核, 荧光显微镜观察并拍照, 计算细胞凋亡率。

**1.3.5 脊髓组织 TNF-α、IL-1β、IL-18 水平检测** 取冷冻脊髓组织, 按照 1:9 将组织加入生理盐水匀浆后, 12 000 r/min 离心 10 min, 采集上清, ELISA 法检测 TNF-α、IL-1β、IL-18 水平。

**1.3.6 免疫荧光染色检测小胶质细胞** 取大鼠冷冻脊髓组织, 切片后, 加入 0.3% PBST 透化, 加入 IBA-

1 (1:1 000) 抗体稀释液, 再加入 Alexa Fluor® 647 标记的 IgG 二抗孵育, DAPI 复染细胞核, 荧光显微镜观察并拍照。

**1.3.7 Western blotting 检测脊髓组织蛋白表达** 取脊髓组织加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, 蛋白定量后, 经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后, 分别加入兔抗鼠 cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1β 及内参 β-actin 一抗稀释液, 均按照 1:1 000 稀释, 4 °C 孵育过夜, HRP 标记的二抗 (1:1 500 稀释) 室温孵育 1 h, 经显色成像后, 采用 Image J 软件分析蛋白相对表达量。

## 1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 布托啡诺对大鼠后肢运动障碍的影响

脊髓损伤 1、3、7、14 d 后, 与假手术组比较, 模型组 BBB 评分显著降低 ( $P < 0.05$ ); 3、7、14 d 后, 与模型组比较, 布托啡诺组 BBB 评分显著升高 ( $P < 0.05$ ); 3、7、14 d 后, 与布托啡诺组比较, 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组 BBB 评分显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠 BBB 评分 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 BBB scores of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(μg·kg <sup>-1</sup> )	BBB 评分			
		1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	—	21	21	21	21
模型	—	1.15 ± 0.25*	4.65 ± 0.92*	5.78 ± 1.25*	6.76 ± 1.26*
布托啡诺	100	1.23 ± 0.31	7.23 ± 0.61#	9.54 ± 1.78#	11.34 ± 2.51#
布托啡诺+2',3'-cGAMP	100+500	1.19 ± 0.30	5.15 ± 0.74&	7.13 ± 1.24&	8.21 ± 1.62&

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与布托啡诺组比较: & $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group after treatment; & $P < 0.05$  vs butorphanol group.

### 2.2 布托啡诺对脊髓组织病理学变化的影响

假手术组脊髓结构完整, 细胞形态正常且排列紧密; 模型组脊髓组织损伤严重, 有大量炎症细胞浸润, 部分脊髓神经细胞水肿坏死; 布托啡诺组脊髓组织损伤减轻, 炎症细胞、坏死细胞减少; 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组较布托啡诺组脊髓组织损伤加重, 细胞排列较为松散, 炎性细胞增多, 见图 1。

### 2.3 布托啡诺对大鼠脊髓组织细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果显示, 假手术组显示几乎无细胞凋亡; 与假手术组比较, 模型组细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 布托啡诺组细胞

凋亡率显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与布托啡诺组比较, 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组的细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2、表 2。

### 2.4 布托啡诺对大鼠脊髓组织 TNF-α、IL-1β、IL-18 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠脊髓组织 TNF-α、IL-1β、IL-18 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 布托啡诺组 TNF-α、IL-1β、IL-18 水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与布托啡诺组比较, 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组 TNF-α、IL-1β、IL-18 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。

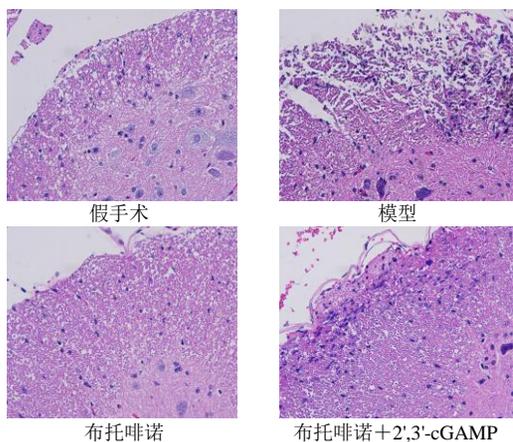


图 1 HE 染色观察脊髓组织病理学变化 (×200)  
Fig. 1 HE staining observation of pathological changes in spinal cord tissue (×200)

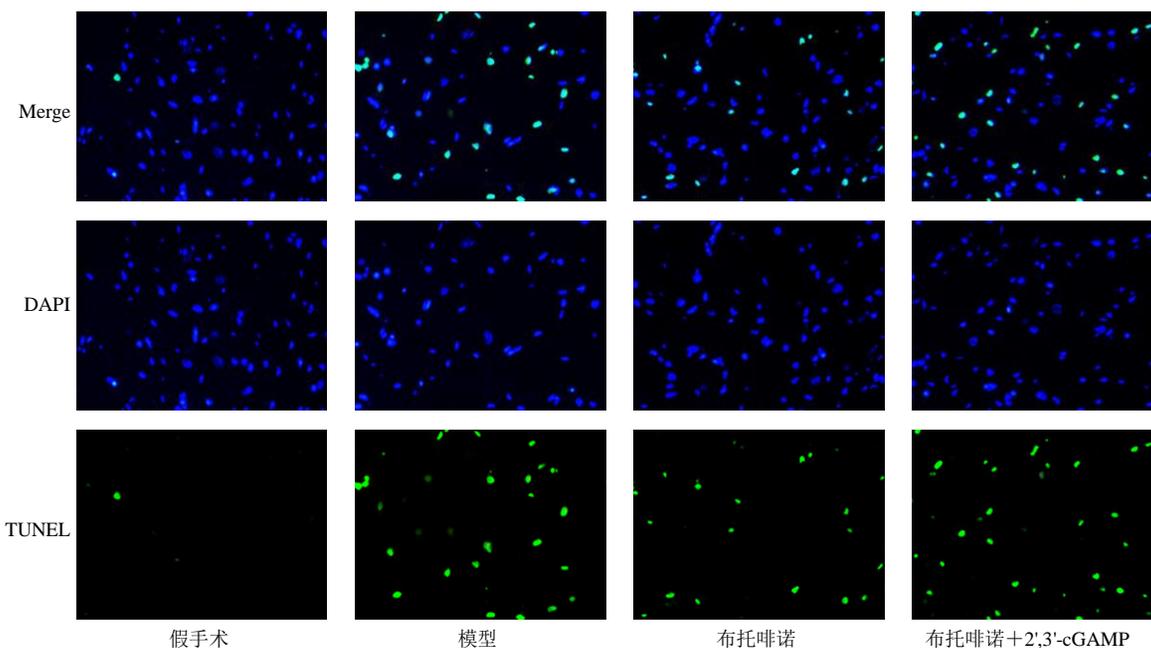


图 2 各组大鼠脊髓组织细胞凋亡的情况 (TUNEL 染色, ×400)  
Fig. 2 Apoptosis of spinal cord tissue cells in each group of rats (TUNEL staining, ×400)

表 2 各组大鼠脊髓组织细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )  
Table 2 Comparison of cell apoptosis rates in spinal cord tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	细胞凋亡率/%
假手术	—	1.75 ± 0.34
模型	—	32.21 ± 5.21*
布托啡诺	100	15.34 ± 3.58#
布托啡诺+2',3'-cGAMP	100+500	24.38 ± 4.62&

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ; 与布托啡诺组比较: & $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; # $P < 0.05$  vs model group after treatment; & $P < 0.05$  vs butorphanol group.

### 2.5 布托啡诺对小胶质细胞的影响

与假手术组比较, 模型组红色荧光增加, 小胶质细胞增加; 与模型组比较, 布托啡诺组红色荧光减少, 小胶质细胞减少; 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组较布托啡诺组小胶质细胞增加, 见图 3。

### 2.6 布托啡诺对脊髓组织 cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响

与假手术组比较, 模型组 cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 布托啡诺组 cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与布托啡诺组比较, 布托啡诺+2',3'-cGAMP 组 cGAS、STING、NLRP3、

Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 4、图 4。

### 3 讨论

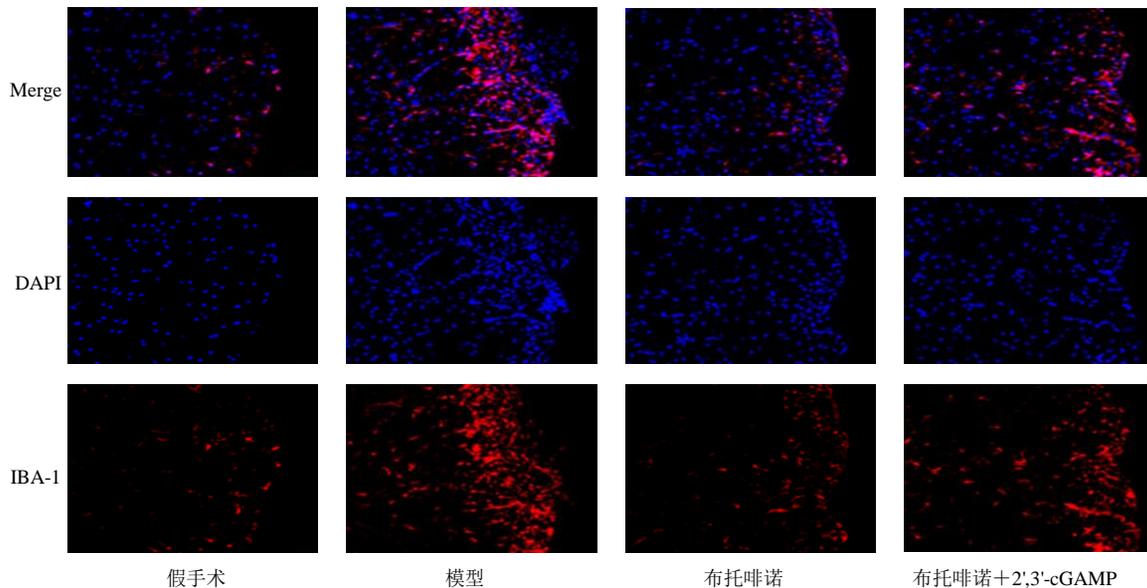
脊髓损伤是一种创伤性疾病, 具有较高的发病率与致残率, 目前尚无有效的治疗药物。脊髓发生损伤引发炎症反应、神经元坏死、轴突脱髓鞘等多种病理生理变化, 进而加重损伤, 影响脊髓修复, 导致神经行为功能障碍<sup>[13]</sup>。本研究显示, 布托啡诺可改善大鼠脊髓损伤, 减轻神经细胞炎症。布托啡诺是阿片类受体的激动-拮抗剂, 广泛应用于各科手术的麻醉镇痛, 最新研究显示, 布托啡诺还具有改

表 3 布托啡诺对大鼠脊髓组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-18 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 3 Effect of butorphanol on the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-18 in rat spinal cord tissue ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	TNF- $\alpha$ /( $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	IL-1 $\beta$ /( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	IL-18/( $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
假手术	—	6.45 $\pm$ 1.24	104.21 $\pm$ 12.37	63.56 $\pm$ 10.95
模型	—	18.69 $\pm$ 3.59*	181.55 $\pm$ 23.67*	147.52 $\pm$ 20.73*
布托啡诺	100	9.37 $\pm$ 1.35 <sup>#</sup>	110.15 $\pm$ 12.12 <sup>#</sup>	98.24 $\pm$ 15.69 <sup>#</sup>
布托啡诺+2',3'-cGAMP	100+500	14.62 $\pm$ 2.53 <sup>&amp;</sup>	145.46 $\pm$ 22.23 <sup>&amp;</sup>	126.72 $\pm$ 12.14 <sup>&amp;</sup>

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与布托啡诺组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group after treatment; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs butorphanol group.

图 3 免疫荧光染色观察小胶质细胞的激活 ( $\times 200$ )Fig. 3 Observation of activation of microglia by immunofluorescence staining ( $\times 200$ )表 4 各组大鼠脊髓组织 cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Table 4 Comparison of cGAS, STING, NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  protein expression in spinal cord tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	蛋白相对表达量				
		cGAS	STING	NLRP3	Caspase-1	IL-1 $\beta$
假手术	—	0.21 $\pm$ 0.04	0.37 $\pm$ 0.05	0.15 $\pm$ 0.03	0.33 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.04
模型	—	0.78 $\pm$ 0.08*	0.90 $\pm$ 0.09*	1.07 $\pm$ 0.12*	1.21 $\pm$ 0.14*	1.13 $\pm$ 0.11*
布托啡诺	100	0.43 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	0.51 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	0.55 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>
布托啡诺+2',3'-cGAMP	100+500	0.58 $\pm$ 0.07 <sup>&amp;</sup>	0.72 $\pm$ 0.07 <sup>&amp;</sup>	0.83 $\pm$ 0.08 <sup>&amp;</sup>	0.98 $\pm$ 0.10 <sup>&amp;</sup>	0.65 $\pm$ 0.07 <sup>&amp;</sup>

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与布托啡诺组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group after treatment; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs butorphanol group.

善认知功能障碍, 抑制炎症反应保护神经损伤的作用<sup>[14]</sup>。在脓毒症诱导的大鼠脑损伤模型中, 布托啡诺通过 NF- $\kappa$ B 信号通路降低炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 水平, 减轻脑损伤<sup>[15]</sup>。布托啡诺还可抑制神经炎症反应和细胞凋亡, 保护氧葡萄糖剥夺/复氧诱导的神经损伤<sup>[16]</sup>。本研究使用布托啡诺干预脊髓损伤模型大鼠后, 大鼠脊髓组织损伤减轻, 炎症细胞减少, 坏死细胞减少, 细胞凋亡率减少, BBB 评分升高, 表明布托啡诺可改善大鼠脊髓损伤, 具有神

经保护的作用, 与以往报道结果类似。

炎症反应参与脊髓损伤的发生发展, TNF- $\alpha$  可以促进小胶质细胞和星形胶质细胞的活性, 刺激细胞和促进基质增殖, 还可导致凋亡并影响神经元功能, IL-1 $\beta$  诱导细胞凋亡, 刺激黏附因子, 促进炎症反应<sup>[17]</sup>。在脊髓损伤中, 伴随着 NLRP3 炎症小体的激活, NLRP3 可介导 Caspase-1 激活, 进而促使 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 等大量炎症因子的释放, 加重脊髓损伤, 导致细胞凋亡, 抑制 NLRP3 炎症小体激

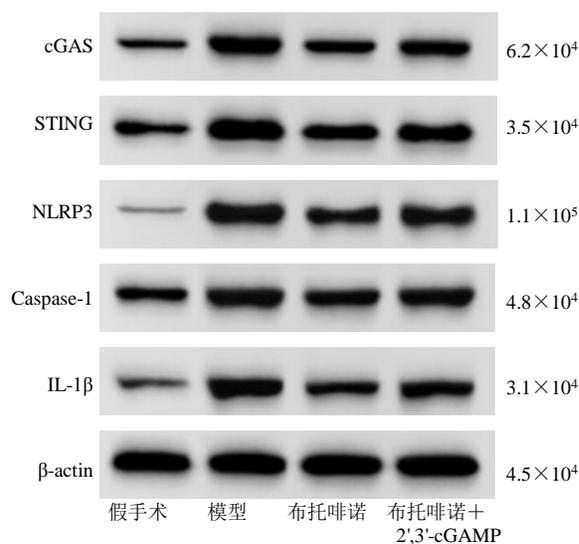


图 4 Western blotting 检测 cGAS、STING、NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  蛋白表达

Fig. 4 Western blotting detection of cGAS, STING, NLRP3, Caspase-1, IL-1 $\beta$  protein expression

活，能够促进损伤组织的修复<sup>[18]</sup>。IBA-1 是一种钙结合蛋白，是小胶质细胞激活的标志物。本研究显示，使用布托啡诺干预后，脊髓组织小胶质细胞减少，NLRP3、Caspase-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平显著降低，提示布托啡诺通过抑制小胶质细胞激活，抑制炎症反应和大鼠脊髓损伤。

cGAS 是一种重要的细胞质 DNA 受体，可识别内源性和外源性双链 DNA，cGAS 可催化三磷酸鸟苷 (GTP) 和三磷酸腺苷 (ATP) 之间的反应，产生 2',3'-cGAMP，结合并激活 STING，介导炎症因子的产生，通过激活转录因子 NF- $\kappa$ B 加重炎症反应与免疫失衡<sup>[19]</sup>。cGAS/STING 通路的激活，由 dsDNA 的异常积累触发，与脑缺血/再灌注损伤、多发性硬化等多种神经系统疾病密切相关<sup>[20]</sup>。研究显示，激活 cGAS/STING 轴促进脑静脉窦血栓形成 (CVST) 小鼠模型的神经炎症，并诱导炎性小体激活和小胶质细胞焦亡<sup>[7]</sup>。抑制 cGAS/STING 信号通路激活，减少促炎细胞因子的表达，减少小胶质细胞和星形胶质细胞的活化，改善阿尔兹海默病转基因小鼠模型的神经炎症与细胞衰老<sup>[21]</sup>。本研究给予脊髓损伤大鼠布托啡诺干预后，脊髓组织 cGAS、STING 表达水平显著降低，提示布托啡诺可能抑制 cGAS-STING 信号通路激活。本研究还显示，布托啡诺改善大鼠脊髓损伤的作用可被 cGAS 激活剂逆转，证实布托啡诺通过抑制 cGAS/STING 信号激活，抑制小胶质细胞激活及炎症反应，改善大鼠脊髓损伤。

综上所述，布托啡诺通过抑制 cGAS/STING 信号通路激活，抑制小胶质细胞激活及炎症反应，改善大鼠脊髓损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Li R B, Han J, Chen B, *et al.* Homeodomain interacting protein kinase 2-modified rat spinal astrocytes affect neurofunctional recovery after spinal cord injury [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2022, 19(2): 171-180.
- [2] Chen K, Lai C, Su Y, *et al.* cGAS-STING-mediated IFN-I response in host defense and neuroinflammatory diseases [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2022, 20(2): 362-371.
- [3] Jiang G L, Yang X L, Zhou H J, *et al.* cGAS knockdown promotes microglial M2 polarization to alleviate neuroinflammation by inhibiting cGAS-STING signaling pathway in cerebral ischemic stroke [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 171: 183-195.
- [4] 杨林, 孙德峰, 韩俊, 等. 布托啡诺经鼻腔给药超前镇痛对行鼻内镜手术老年患者早期术后认知功能障碍的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(15): 3679-3682.
- [5] Huang Y S, Li S H, Chen H X, *et al.* Butorphanol reduces the neuronal inflammatory response and apoptosis via inhibition of p38/JNK/ATF2/p53 signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 23(3): 229.
- [6] Zhang C Y, Jiang S L, Lu Y, *et al.* Butorphanol tartrate mitigates cellular senescence against tumor necrosis factor - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in human HC-A chondrocytes [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 5434-5442.
- [7] Luan G X, Pan F, Bu L N, *et al.* Butorphanol promotes macrophage phenotypic transition to inhibit inflammatory lung injury via  $\kappa$  receptors [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 692286.
- [8] Wu W Y, Zhang X W, Wang S, *et al.* Pharmacological inhibition of the cGAS-STING signaling pathway suppresses microglial M1-polarization in the spinal cord and attenuates neuropathic pain [J]. *Neuropharmacology*, 2022, 217: 109206.
- [9] 杨光, 姚富, 陈永旺, 等. 依托咪酯对脊髓损伤大鼠的脑保护作用及其机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(6): 32-37.
- [10] Chen F, Wang L Q, Chen S J, *et al.* Nasal inhalation of butorphanol in combination with ketamine quickly elevates the mechanical pain threshold in the model of chronic constriction injury to the sciatic nerve of rat [J]. *J Surg Res*, 2014, 186(1): 292-296.
- [11] Ding R, Li H Y, Liu Y Q, *et al.* Activating cGAS-STING

- axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 137.
- [12] Duan H Q, Wu Q L, Yao X, *et al.* Nafamostat mesilate attenuates inflammation and apoptosis and promotes locomotor recovery after spinal cord injury [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(5): 429-438.
- [13] 史旭, 李瑞语, 张兵, 等. 小胶质细胞极化介导炎症反应在脊髓损伤中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(1): 121-129.
- [14] 杨清龄, 赵继波, 袁明霞, 等. 布托啡诺减轻老年大鼠胫骨骨折术后认知功能障碍的作用机制研究 [J]. 中国药师, 2021, 24(8): 440-444.
- [15] Meng J, Jiang S J, Jiang D, *et al.* Butorphanol attenuates inflammation via targeting NF- $\kappa$ B in septic rats with brain injury [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3 Suppl): 161-170.
- [16] Yang Z J, Wang L, Hu Y J, *et al.* Butorphanol protects PC12 cells against OGD/R-induced inflammation and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 1969-1975.
- [17] Fan H, Tang H B, Chen Z, *et al.* Inhibiting HMGB1-RAGE axis prevents pro-inflammatory macrophages/microglia polarization and affords neuroprotection after spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 295.
- [18] 周雨昕, 马勇, 吴承杰, 等. 基于 NLRP3 炎症小体途径探究脊髓康促进脊髓损伤大鼠修复的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(9): 5385-5389.
- [19] Paul B D, Snyder S H, Bohr V A. Signaling by cGAS-STING in neurodegeneration, neuroinflammation, and aging [J]. *Trends Neurosci*, 2021, 44(2): 83-96.
- [20] 李冰玉, 高文蔚, 李亚男, 等. 小鼠脑缺血再灌注早期 cGAS-STING 信号通路与其自噬的关系 [J]. 中华麻醉学杂志, 2022, 42(8): 953-956.
- [21] Hou Y J, Wei Y, Lautrup S, *et al.* NAD<sup>+</sup> supplementation reduces neuroinflammation and cell senescence in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via cGAS-STING [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(37): e2011226118.

[责任编辑 高源]