

紫金莲醇提物2种萃取部位镇痛作用机制探讨

卢启振, 黄聪, 邓炜*

(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**探讨紫金莲醇提物2种萃取部位对甲醛致痛大鼠模型的镇痛作用及机制。**方法:**56只SD大鼠随机分6组,每组8只,分别设为正常组,模型组,紫金莲醇提物乙酸乙酯部位高(乙高组 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低(乙低组 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组,紫金莲醇提物正丁醇部位高(正高组, $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低(正低组, $8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组。各给药组按剂量 ig 大鼠,给药7d,每日1次。第7天末次给药40min后,除正常组外,其余各组大鼠左后足跖 sc 10%甲醛溶液 $50\text{ }\mu\text{L}$ /只,建立大鼠甲醛致痛模型。观察紫金莲2种活性部位对甲醛致痛模型大鼠痛行为的影响,生化法检测大鼠血清谷氨酸和 Ca^{2+} 含量,免疫组化法检测大鼠脑和脊髓c-fos阳性细胞表达和P物质(SP)含量。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠表现出了典型的两时相痛行为学反应,且在脑和脊髓中检测到了大量的c-fos阳性细胞,P物质(SP),升高血清谷氨酸及 Ca^{2+} 含量有显著性差异($P < 0.05$),表示造模成功。与模型组比较,紫金莲乙低组($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和正低组($8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),对大鼠第一时相伤害反应疼痛有显著的抑制作用($P < 0.05$),使大鼠血清谷氨酸和脑c-fos蛋白表达显著下降($P < 0.05$),血清 Ca^{2+} 含量显著升高($P < 0.05$);紫金莲醇提物乙高组($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和正高组($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)显著降低大鼠脊髓c-fos蛋白表达($P < 0.05$);紫金莲醇提物乙高、乙低组和紫金莲醇提物正高、正低组都能显著降低SP在大鼠脑和脊髓中的表达($P < 0.05$)。**结论:**紫金莲醇提物2种萃取部位对大鼠甲醛致痛模型均有镇痛作用,其镇痛机制可能与抑制体内谷氨酸的升高,抑制细胞内 Ca^{2+} 浓度升高及降低c-fos,SP在中枢神经系统内的表达有关。

[关键词] 紫金莲; 萃取部位; 镇痛; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0141-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080141

Study on Analgesic Mechanisms in CNS with Extraction Part of National Medicine *Ceratostigma willmottianum* LU Qi-zhen, HUANG Cong, DENG Wei* (Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the analgesic mechanisms of two extraction part of *Ceratostigma willmottianum* (CW) in rat pain model induced by formaldehyde. **Method:** Fifty-six SD rats were randomly divided into 6 groups with 8 in each group, including normal group, model group, CW alcohol extract's ethyl acetate part group ($30, 15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), *n*-butanol part group ($15, 8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Each group was given corresponding drugs by intragastric injection, respectively, once a day for 7 days. At the 7th day, the animals were fasted for 12 hours, and ig 40 min later, except normal group, the other groups were given subcutaneous injection of 10% formaldehyde solution $50\text{ }\mu\text{L}$ for establishing the pain models. The impact of CW active site was observed and serum glutamate and Ca^{2+} were detected with biochemical kit, and the expression of c-fos and substance P (SP) was assayed with immunohistochemistry (IHC). **Result:** Compared with normal group, model group showed a typical pain behavior, amounts of c-fos and SP were detected in the brain and spinal cord, and raised serum glutamic acid concentration, Ca^{2+} content with significant difference ($P < 0.05$), meaning that the pain model of rats induced by formaldehyde was successful. Compared with model group, the low dose of ethyl acetate part of CW alcohol extract ($15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and *n*-butanol part ($8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) can obvious inhibition to the first phase damage response ($P < 0.05$), make serum glutamic content, brain c-fos protein expression decreased

[收稿日期] 20141127(001)

[基金项目] 贵州省科技厅和贵阳中医学院联合基金项目(黔科合中药字[2011]LKZ7033号)

[第一作者] 卢启振, 硕士, 从事镇痛中药药效物质基础研究, Tel:18785122704, E-mail:1218917384@qq.com

[通讯作者] * 邓炜, 教授, 从事中药民族药药效物质基础研究, Tel:13885036019, E-mail:914214883@qq.com

significantly ($P < 0.05$), serum Ca^{2+} increased significantly ($P < 0.05$); the high dose of two parts decreased the expression of c-fos in spinal dorsal cord significantly ($P < 0.05$); both of high and low dose of CW alcohol extract's ethyl acetate and *n*-butanol part decreased the expression of SP significantly ($P < 0.05$) in central nervous system (CNS). **Conclusion:** Two extraction parts of CW alcohol extract have exact analgesic action in rat pain model induced by formaldehyde, and its analgesic mechanisms may be related to inhibiting the intracellular Ca^{2+} concentration and glutamate content in the body, reducing the expression of c-fos and SP in CNS.

[**Key words**] *Ceratostigma willmottianum*; extraction part; analgesic; mechanisms

紫金莲为贵州苗族、侗族等民族常用药,多用来治疗疼痛症,有活血止痛,化瘀生新功效。前期实验已证明紫金莲醇提物有良好的镇痛抗炎作用,且临床所用剂量安全无毒^[1]。后续实验发现紫金莲醇提物的乙酸乙酯部位和正丁醇部位有较高的镇痛活性,而其镇痛机制尚未见文献报道,故本文对紫金莲 2 种萃取部位的镇痛机制进行探讨。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雌雄各半,体重(280 ± 20) g, SPF 级。由中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK-(军)2012-0003。

1.2 药物 紫金莲药材采自贵州威宁县,经贵阳中医学院孙庆文副教授鉴定为蓝雪科植物紫金莲(*Ceratostigma willmottianum*, CW)。药材干燥打粉,取粗粉 1 700 g,加入 75% 乙醇回流提取 3 次,每次 1 h,回收乙醇,得醇提浓缩液 1 000 mL。依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,浓缩干燥,分别得到乙酸乙酯和正丁醇干浸膏 49.7, 25.2 g,其得膏率分别为 2.92%, 1.48% (1 mg 乙酸乙酯或正丁醇提取物分别相当于紫金莲生药材 34, 67 mg)。结合前期实验结果,确定紫金莲乙酸乙酯、正丁醇提取物对大鼠甲醛致痛实验的剂量高剂量组分别为 30, 15 $mg \cdot kg^{-1}$ (分别相当于紫金莲生药材 1 020, 1 005 $mg \cdot kg^{-1}$),低剂量组则分别减半。

1.3 试剂 大鼠谷氨酸测试盒(南京建成生物工程研究所,批号 20140630),大鼠血清钙试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20140610),PV-6001 兔二步法检测试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号 K143310B),ZLI-9032 DAB 显色试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司,批号 14138A10)。

1.4 仪器 ELx808IU 型自动酶标读数仪(美国 BLoTek 公司),752 型紫外-可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),LD4-2 型低速离心机(北京医用离心机厂),LEICA DM 1000 型彩色摄像机(日本 JVC 公司)。

2 方法

2.1 大鼠甲醛致痛实验^[2] SD 大鼠随机分为 6 组,每组 8 只,分别为正常组,模型组(给予等容积蒸馏水),紫金莲醇提物乙酸乙酯部位高、低剂量组(简称乙高、乙低组),紫金莲醇提物正丁醇部位高、低剂量组(简称正高、正低组)。按剂量大鼠 ig 给药 7 d,每日 1 次。第 7 天末次给药 40 min 后,于大鼠左后足跖皮下注射 10% 甲醛溶液 50 μL /只,以抬足、抽缩等行为学表现作为大鼠疼痛反应,记录抽缩次数。以注射甲醛溶液完毕开始计时,0 ~ 5 min 为第 I 相反应时间,间隔 15 min 为静止期,以 20 ~ 40 min 作为第 II 相反应时间,统计各组大鼠在第 I 相和第 II 相反应期内左后足抽缩次数。

2.2 对大鼠血清 Ca^{2+} 和谷氨酸的影响 各组大鼠给药 7 d,于末次给药后给大鼠左后足注射甲醛溶液致痛计时完毕,股动脉取血,分离血清。分别测定各组大鼠血清 Ca^{2+} 和谷氨酸的含量。

2.3 对大鼠中枢 c-fos 蛋白和 P 物质(SP)表达的影响 连续给药 1 周,于大鼠左后足注射甲醛致痛计时完毕,处死大鼠,于冰面迅速取大鼠全脑和脊髓腰段,用 10% 中性甲醛溶液快速固定、脱水、包埋、切片;按要求进行 DAB 显色,应用免疫组织化学标记法检测 c-fos 蛋白和 P 物质 SP 表达。在大鼠中脑导水管周围灰质区域和同侧脊髓背角腰膨大区,以胞核染成深棕色,胞浆未染色,神经细胞无形态轮廓显示,低倍和高倍镜下与背景区明确,为 c-fos 蛋白阳性表达;以胞浆中沉积棕褐色或深棕色颗粒,定位于细胞质,而胞核未染色,为 SP 阳性表达。每组取 5 张切片,随机选取 10 个视野 400 倍镜下观察大鼠脑和脊髓阳性表达区域,计数 240 个切片中阳性细胞数,取均值进行统计分析^[3]。

2.4 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 17.0 进行方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对甲醛致痛模型大鼠行为学反应及其血清 Ca^{2+} 及谷氨酸的影响 正常组大鼠均未见到抽缩足等行为学表现,模型组和各给药组均出现注射足抽缩等痛行为学反应。各给药组大鼠第 I 时相左后足总抽缩次数与模型组比较均有所减少,乙低组、正低组有显著性差异 ($P < 0.05$);而在第 II 时相,各给药组与模型组比较均无显著性差异。大鼠甲醛引起的疼痛是一种比较局限的紧张性疼痛,常用于鉴定中枢作用药物,本实验结果提示紫金莲醇提取物乙酸乙酯、正丁醇部位的小剂量皆有明显的中枢镇痛作用,且主要抑制急性痛反应,持续时间较短。而且与模型组比较,乙高组、乙低组、正低组在降低血清谷氨酸浓度和升高血清 Ca^{2+} 含量方面,均具有显著差异性 ($P < 0.05$),与大鼠行为学实验结果基本吻合。

提示紫金莲醇提取物乙酸乙酯、正丁醇部位小剂量的中枢镇痛作用,与降低血清谷氨酸浓度及钙拮抗作用有关。见表 1。

3.2 对甲醛致痛模型大鼠 c-fos 蛋白和 SP 表达的影响 正常组大鼠的脑和脊髓中均未见到 c-fos 蛋白和 SP 物质表达。与模型组比较,各给药组降低甲醛刺激模型大鼠脑和脊髓 c-fos 蛋白和 SP 表达均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。紫金莲醇提取物乙酸乙酯部位和正丁醇部位的低剂量明显降低脑 c-fos 蛋白表达;而乙酸乙酯部位和正丁醇部位的高剂量在降低脊髓 c-fos 蛋白表达较明显。同时紫金莲醇提取物乙酸乙酯和正丁醇部位高、低剂量都能显著降低 SP 在脑和脊髓中的表达 ($P < 0.05$)。提示紫金莲醇提取物正丁醇部位和乙酸乙酯部位皆能明显抑制模型大鼠脑和脊髓 c-fos 蛋白和 SP 的表达,发挥中枢镇痛作用。见表 2。

表 1 紫金莲 2 种萃取部位对甲醛致痛模型大鼠行为学反应及其血清 Ca^{2+} 、谷氨酸的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Impact of CW extraction part to pain behavior caused by formaldehyde and serum Ca^{2+} , glutamate in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	第 I 相缩足数/次	谷氨酸/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	Ca^{2+} 含量/ $mmol \cdot L^{-1}$
正常	-	-	80.2 ± 15.0	0.5 ± 0.0
模型	-	$34.0 \pm 10.8^{2)}$	$295.1 \pm 12.5^{2)}$	$1.2 \pm 0.1^{2)}$
CWZ 乙酸乙酯部位	30	21.7 ± 9.6	$185.9 \pm 15.4^{3)}$	$1.3 \pm 0.1^{3)}$
	15	$17.0 \pm 6.7^{3)}$	$176.2 \pm 10.3^{3)}$	$1.3 \pm 0.0^{3)}$
CW 正丁醇部位	15	22.2 ± 10.2	207.1 ± 18.8	1.2 ± 0.0
	8	$17.6 \pm 7.3^{3)}$	$100.9 \pm 9.1^{3)}$	$1.3 \pm 0.0^{3)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 紫金莲 2 种萃取部位对甲醛致痛模型大鼠 c-fos 蛋白和 SP 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Impact of CW extraction part to expression of c-fos and SP caused by formaldehyde in pain model of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $mg \cdot kg^{-1}$	c-fos 阳性细胞数/个		SP 阳性细胞数/个	
		脑	脊髓	脑	脊髓
正常	-	-	-	-	-
模型	-	$51.9 \pm 3.4^{2)}$	$27.8 \pm 5.7^{2)}$	$31.1 \pm 3.2^{2)}$	$24.5 \pm 6.1^{2)}$
CWZ 乙酸乙酯部位	30	$27.9 \pm 7.7^{3)}$	$19.5 \pm 5.3^{3)}$	$14.1 \pm 4.5^{3)}$	$11.3 \pm 1.8^{3)}$
	15	$21.6 \pm 5.4^{3)}$	$19.6 \pm 6.4^{3)}$	$12.3 \pm 3.6^{3)}$	$16.6 \pm 4.1^{3)}$
CW 正丁醇部位	15	$22.8 \pm 7.9^{3)}$	$19.3 \pm 6.2^{3)}$	$12.0 \pm 4.1^{3)}$	$16.3 \pm 4.8^{3)}$
	8	$18.5 \pm 6.1^{3)}$	23.9 ± 8.5	$11.0 \pm 2.4^{3)}$	$16.9 \pm 3.6^{3)}$

4 讨论

疼痛是多种疾病的伴随症状,可造成器官组织损害及功能障碍。组织损伤刺激是急慢性疼痛中最常见的原因。民族药紫金莲是贵州少数民族常用来治疗疼痛症的药物,以紫金莲为主药的通迪胶囊为中药镇痛制剂,具有镇痛疗效好、没有依赖性、应用

范围广的特点^[4]。但紫金莲的镇痛作用及机制未见报道,本研究在前期紫金莲镇痛活性部位筛选的基础上,针对大鼠甲醛致痛模型,初步探讨紫金莲活性部位的镇痛作用机制。

由 Dubuisson 等^[5]创立的甲醛疼痛模型主要用于鉴定中枢作用药物,其速发型应答反应所导致的

疼痛行为,第Ⅰ时相为急性疼痛期,直接刺激神经末梢初级疼痛感受器,由直接的化学刺激通过A δ 纤维介导信息传入引起;第Ⅱ时相为强直期,是由逐渐减弱的外周疼痛感受器传入刺激、局部组织不断活化和释放炎性介质使中枢致敏所致^[6]。本实验中观察到甲醛致大鼠后足抽搐和抬腿等行为反应,具有典型的两时相和间歇期。紫金莲2个活性部位在低剂量时有明显的短时程中枢镇痛作用。谷氨酸参与脊髓水平伤害性信息传递和痛觉过敏形成,阻碍以谷氨酸为媒介的神经冲动传递,阻滞痛觉信号传导,抑制痛觉中枢产生兴奋,起到中枢镇痛作用^[7]。紫金莲醇提物乙酸乙酯部位和正丁醇部位低剂量有明显降低血清谷氨酸浓度作用。在痛觉调控中,通过控制细胞外钙离子内流,产生钙拮抗作用,进而抑制神经冲动传导,使痛觉感受器不能兴奋而发挥镇痛作用^[2]。紫金莲醇提物乙酸乙酯部位低剂量和正丁醇部位低剂量能显著升高血清Ca²⁺含量,减少细胞外Ca²⁺内流。其对大鼠甲醛致足痛的镇痛机制可能与降低血清谷氨酸浓度和拮抗Ca²⁺内流作用有关。

c-fos原癌基因是刺激作用下最早的反应基因,正常情况下细胞内c-fos很少表达,外周伤害性刺激可诱导中枢系统c-fos基因表达fos蛋白,是疼痛在分子水平的标志,特别是在脊髓中的表达已作为疼痛的一项客观指标,其在中枢神经系统内的表达与痛觉调控密切相关^[2,8]。实验证实紫金莲醇提物乙酸乙酯及正丁醇部位的高剂量能明显降低甲醛致痛模型大鼠c-fos蛋白在脊髓中的表达,而其低剂量则在降低脑中c-fos蛋白表达较为明显。SP广泛分布于中枢、外周神经系统的初级传入神经纤维内,在脊髓水平参与痛觉调控,大剂量SP可直接兴奋感觉神经元,导致持久性疼痛和痛觉过敏^[9]。同时在SP

的作用下,脊髓星形胶质细胞的c-fos表达明显。实验证实紫金莲醇提物乙酸乙酯和正丁醇部位各剂量,均能明显降低甲醛致痛模型大鼠脑和脊髓中P物质的表达。因此提示紫金莲的镇痛作用机制可能与降低中枢神经系统c-fos蛋白和P物质表达有关。

[参考文献]

- [1] 卢启振,邓炜,田宏平,等. 民族药紫金莲镇痛抗炎作用及急性毒性实验研究[J]. 贵州科学,2014,32(1):26-28.
- [2] 洪庚辛. 镇痛药研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:20,360,504,528-529,772,773.
- [3] 邓炜,郑民强,张静,等. 两种黔产淫羊藿总黄酮对痴呆大鼠学习记忆的影响[J]. 中国药理学通报,2011,27(6):868-871.
- [4] 李东莺,冯瑞晶,刘延青,等. 通迪胶囊与芬必得胶囊镇痛疗效对照研究[J]. 中国疼痛医学杂志,2004,10(2):92-93.
- [5] Dubuisson D, Dennis S G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats [J]. Pain, 1977, 4(2):161-174.
- [6] McCall W D, Tanner K D, Levine J D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat[J]. Neurosci Lett, 2006, 208(1):45-48.
- [7] 黄云巧,杨建明,陈国强. 谷氨酸与慢性疼痛[J]. 昆明医学院学报,2007,28(2B):117-121.
- [8] 马加海,徐礼献. c-fos原癌基因与痛觉调控[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册,2000,21(3):141-143.
- [9] Wang X Y, Yang G. Progress of study on the mechanism of substance P's participating in the algisia control in spinal cord [J]. For Med Sci: Anesthesiol Resusc, 2001, 22(1):5-10.

[责任编辑 聂淑琴]