

盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠的镇痛作用

贾可欣^{1,2}, 刘春芳², 王金霞², 李逸群², 徐腾腾², 明瑞蕊², 韩腾飞³, 王奇^{1*}, 林娜^{2*}

(1. 广州中医药大学 科技创新中心, 广州 510405;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700;

3. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 西安 710000)

[摘要] 目的:观察盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠的镇痛作用,并从核转录因子- κ B(NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路入手探索其初步作用机制。方法:采用完全弗氏佐剂(CFA)诱导大鼠建立慢性炎性疼痛模型,分正常组、模型组、盘龙七片(0.16, 0.32, 0.64 g·kg⁻¹)组、阳性药布洛芬(0.05 g·kg⁻¹)组共6组,每天1次经口灌服盘龙七片或布洛芬,标准 Von Frey 纤维评价机械痛阈值,用丙酮刺激大鼠致炎足底观察冷刺激诱发痛的反应评分,观察第1天给药前和给药后1, 2, 3, 4, 6 h以及第3~7天给药后4 h的机械痛阈值和冷痛敏反应评分,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清、致炎足和腰4~5脊髓背角中前列腺E₂(PGE₂),白细胞介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 的含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测腰4~5脊髓背角中MAPKs(p-p38, p-ERK, p-JNK)的蛋白含量,免疫荧光检测腰4~5脊髓背角中NF- κ B p65表达情况。结果:与正常组比较,模型组大鼠机械痛阈值降低而冷刺激反应评分升高($P < 0.01$);与模型组比较,0.16, 0.32, 0.64 g·kg⁻¹盘龙七片给药后可剂量依赖地升高模型大鼠的机械痛阈值和降低冷刺激反应评分($P < 0.05, P < 0.01$),作用持续6 h,其中4 h作用最显著,布洛芬的作用与中剂量组相近。此外,盘龙七片能降低模型组大鼠血清、致炎足和脊髓背角中异常增高的PGE₂, IL-1 β 和TNF- α 含量,降低脊髓背角中ERK和JNK的磷酸化水平以及NF- κ B p65的蛋白表达水平,以中大剂量组作用明显($P < 0.01$)。结论:盘龙七片对慢性炎性疼痛模型大鼠具有明显的镇痛作用,且这一作用可能与对脊髓背角NF- κ B和MAPKs信号通路的抑制有关。

[关键词] 盘龙七片; 慢性炎性疼痛; 完全弗氏佐剂; 核转录因子- κ B; 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R2-0; R285.5; R289; R364.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0061-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201542

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20200527.1154.005.html>

[网络出版日期] 2020-5-27 16:18

Analgesic Effect of Panlongqi Tablet on Rats with Chronic Inflammatory Pain

JIA Ke-xin^{1,2}, LIU Chun-fang², WANG Jin-xia², LI Yi-qun², XU Teng-teng², MING Rui-rui²,
HAN Teng-fei³, WANG Qi^{1*}, LIN Na^{2*}

(1. Innovation Centre for Science and Technology, Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510405, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China;

3. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Limited by Share LTD, Xi'an 710000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the analgesic effect of Panlongqi tablet(PLQT) on rats with chronic inflammatory pain, and to explore mechanism of the action preliminarily from the perspective of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and mitogen-activated protein kinase(MAPKs) signaling pathways. **Method:** Rats were induced to establish model of chronic inflammatory pain by complete

[收稿日期] 20200106(014)

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20191306);国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731-002)

[第一作者] 贾可欣,在读硕士,从事中医脑病学研究,E-mail:979477114@qq.com

[通信作者] *王奇,教授,从事脑病的临床与应用基础研究,E-mail:wangqi@gzucm.edu.cn;

*林娜,研究员,从事抗炎中药药理研究,E-mail:linna888@163.com

Freund adjuvant(CFA), which was divided into normal group, model group, the PLQT 0.16, 0.32, 0.64 g·kg⁻¹ group, and the ibuprofen 0.05 g·kg⁻¹ group (also positive group), give the medicine once a day by gavage. Standard Von Frey fiber was used to evaluate the mechanical pain threshold, acetone was used to stimulate rats inflammatory foot to get the cold-induced response score, with the mechanical pain threshold and cold-induced response score to be observed at 1, 2, 3, 4 and 6 h before and after administration on day 1, and at 4 h after administration on day 3-7. The content of PGE₂, IL-1, TNF- α in serum, inflammatory foot and 4-5 lumbar spinal cord was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein level of MAPKs (p-p38, p-ERK, p-JNK) in lumbar spinal cord 4-5 was detected by Western blot. The expression of NF- κ B p65 in the lumbar spinal cord was detected by IFA. **Result:** Model group had lower mechanical pain threshold and higher cold-induced response score than these in normal group ($P < 0.01$), while the mechanical pain threshold and cold-induced response score of the model rats were dose-dependent better regulated after administration of PLQT 0.16, 0.32, 0.64 g·kg⁻¹·d⁻¹ ($P < 0.05$, $P < 0.01$), these effect lasted 6 h, of which PLQT groups get the most significant effect on 4 h, however the effect of IBP was similar to that of PLQT medium dose group. In addition, PLQT reduced the abnormal increase of PGE₂, IL-1 and TNF- α contents in serum, inflammatory foot and spinal cord of rats in model group, decreased the protein phosphorylation levels of ERK and JNK in spinal cord, and decreased the protein expression of NF- κ B p65, that was significant in the PLQT high-dose group ($P < 0.01$). **Conclusion:** PLQT had significant analgesic effect on chronic inflammatory pain model rats, which may be related to the inhibition of NF- κ B and MAPKs signaling pathways in spinal cord.

[Key words] Panlongqi tablet; chronic inflammatory pain; complete Freund adjuvant; nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; mitogen-activated protein kinase

慢性炎性疼痛是一类常见的痛性疾病,治疗难度大,病程迁延反复,不仅给患者带来经济和身体上的负担,还会导致精神压力,因此该病一直是临床和基础研究亟需解决的难题。目前临床上对于慢性炎性疼痛尚无特别有效的治疗手段,因此临床医生和研究学者将目光转向传统医学,在我国传统的中医学中,对于痛性疾病一直有自身独到的认识和治疗手段,其中,盘龙七片是著名老中医、骨伤科专家、中国《中医辞典》编写顾问王家成老先生所献祖传秘方,由盘龙七、川乌、当归、杜仲、丹参等29味中药组成,其中17味中草药生长在海拔2500米以上的高寒地带,为秦巴山区的名贵珍稀药材。该药组方独特,具有活血化瘀、消肿止痛、除风除湿之功,临床对骨关节炎、风湿性关节炎、腰肌劳损、软组织损伤、外伤性骨折等病症所表现的疼痛、肿胀均具有显著的治疗效果^[1],但其镇痛的作用特点和作用机制尚不清楚。因此,本实验拟采用完全弗氏佐剂(CFA)足底皮下注射诱导大鼠慢性炎性疼痛模型,观察盘龙七片缓解慢性炎性疼痛的作用特点,并从核转录因子- κ B(NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号通路入手探索其镇痛抗炎的初步作用机制,为揭示这一确有临床疗效的中成药的功効科学内涵提供实验依据,也有利于指导临床合理用药。

1 材料

1.1 动物 55只雄性SD大鼠,体质量180~200 g,自北京维通利华实验动物技术有限公司购买,于中国中医科学院中药研究所中药安全评价中心饲养,常规照明,自由饮水、饮食,合格证号SCXK(京)2016-0006,本实验通过中国中医科学院中药研究所实验动物福利伦理审查,编号为20192019。

1.2 药物和试剂 盘龙七片(陕西盘龙药业集团股份有限公司,批号20190401);布洛芬缓释胶囊(北京红林制药有限公司,批号1190302);完全弗氏佐剂(CFA,美国Chondex公司,货号为7001);大鼠前列腺E₂(PGE₂),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉Elabscience公司,批号分别为E-EL-0034c, E-EL-R2856c, E-EL-R0012c);p38 MAPK,细胞外蛋白激酶(ERK),c-Jun氨基末端激酶(JNK),磷酸化p38 MAPK(p-p38 MAPK),磷酸化ERK(p-ERK),磷酸化JNK(p-JNK)和NF- κ B p65抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为8690, 4695, 9258, 4511, 4370, 4668S, 8242);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G, Bradford蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号分别为C2226, P1510)。

1.3 仪器 Von-Frey 针刺触觉测量套件(美国 Danmic Aesthesio 公司),NX70 型冰冻切片机,MK3 型酶免疫分析仪(美国 Thermo Fisher 公司),BX50 型正置显微镜(日本 Olympus 公司),Power Pac Basic 型电泳仪和转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),TS-1 型水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司),Fusion FX5 型凝胶成像仪(法国 Vilber 公司)。

2 方法

2.1 分组和给药 SD 大鼠于测痛笼中每天适应 2 h,共适应 3 d 后进行测痛,筛选痛阈检测结果为离群值的大鼠,剩余用于实验。按体质量随机分为正常组,模型组,盘龙七片 0.16,0.32,0.64 g·kg⁻¹ 剂量组(分别为临床等效剂量的 0.5,1 和 2 倍)和布洛芬组(0.05 g·kg⁻¹,临床 1 倍等效剂量),每组 8 只。造模第 2 天,正常组及模型组按体质量予以生理盐水灌胃,给药组按体质量灌胃给药,1 次/d,持续 10 d。

2.2 CFA 大鼠模型建立 将大鼠置于俯卧位,固定其左后足,左后足皮下注射 CFA 溶液 0.1 mL/只^[2],造模 12 h 后,与未造模足比较,造模足出现明显的红肿,与正常组大鼠比较,造模组大鼠的活动行为明显减少,则造模成功^[3]。

2.3 大鼠体质量记录 观察大鼠一般情况,每隔 3 d 给大鼠进行称体质量,记录大鼠体质量的变化趋势,观察药物有无不良反应。

2.4 up-down 法检测机械痛 给药第 1 天,于给药前和给药后 1,2,3,4,5,6,24 h 等 8 个时间点以 Von-Frey 针刺触觉测量套件刺激大鼠左后足,up-down 法检测和计算大鼠机械痛阈^[4],于给药第 3,5,7 天于最佳药效时间测痛,记录大鼠机械痛变化。

2.5 化学刺激法检测冷刺激痛觉超敏反应 给药第 2 天,于给药前和给药后 1,2,3,4,5,6,24 h 等 8 个时间点,以及给药第 4,6,8 天于最佳药效时间测痛,测痛时以 0.2 mL 丙酮快喷射大鼠左后足,观察大鼠的应激反应情况,根据其冷刺激的反应进行冷痛敏行为学评分,没有任何反应者为 0 分;轻抬受刺激的后足为 1 分;反复剧烈抬、摇受刺激后足为 2 分;持续或反复撤足并舔爪、摇爪或大叫者为 3 分^[5]。

2.6 ELISA 检测组织中血清、致炎组织和脊髓背角组织中 PGE₂, TNF- α 和 IL-1 β 的含量 大鼠麻醉后腹主动脉取血,4 °C 离心后取血清;取致炎足足底皮肤以及 L₅ 脊髓背角组织,提取蛋白,Bradford 法蛋白定量,根据 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清、左后足及脊髓中 PGE₂, TNF- α 和 IL-1 β 的含量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测组织中 JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, p38, p-p38 的蛋白水平

取大鼠 L₅ 脊髓,通过研磨组织法提取脊髓背角组织蛋白,Bradford 法定量,制备 SDS-PAGE 上样凝胶,上样、电泳、转膜、封闭、孵育一抗(JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, p38, p-p38 以 1:1 000 比例稀释, GAPDH 以 1:2 万比例稀释)、洗涤、孵育二抗,显影,凝胶成像仪成像,利用 Image J 软件对结果进行分析。

2.8 免疫荧光法检测脊髓背角中 NF- κ B p65 的表达 取大鼠左 L₅ 脊髓节段,以 4% 多聚甲醛固定及梯度脱水处理,后进行包埋,18 μ m 冰冻切片, NF- κ B p65 抗体(1:400)4 °C 孵育过夜,荧光二抗(以 1:200)避光孵育 1 h,防荧光淬灭剂封片后尽快在荧光显微镜镜下观察脊髓背角中 NF- κ B p65 的阳性表达情况,利用 Image-ProPlus 软件对荧光图片进行分析。

2.9 统计学分析 GraphPad Prism 6.0 软件对结果进行分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 *t* 检验进行组间比较,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对慢性炎性疼痛大鼠大体情况的影响 各组大鼠精神状态良好,饮食饮水正常。正常组大鼠外观无异常,步态平稳;各造模组大鼠外观无明显异常,仅患侧足红肿、活动时均有不同程度的拖足现象。各组大鼠体质量呈稳态增长,各组大鼠之间体质量的生长无明显统计学差异。见表 1。

3.2 对慢性炎性疼痛大鼠机械痛阈值的影响 与正常组比较,模型组机械痛阈值显著降低(*P* < 0.01),说明模型组造模成功,CFA 可明显诱导大鼠的机械刺激痛敏反应;给药第 1 天,与模型组比较,盘龙七片 0.16,0.32,0.64 g·kg⁻¹ 剂量组能剂量依赖地升高机械痛阈值,在第 4 h 升高最明显,之后升高作用逐渐减弱,至给药 6 h 后几乎消失,提示盘龙七片对 CFA 诱导大鼠的机械痛具有较好的缓解作用;与模型组比较,布洛芬 0.05 g·kg⁻¹ 组也显著升高机械痛阈值,且在给药 3 h 升高最明显。见表 2。

由于盘龙七片对机械痛的最佳镇痛时间点为给药后的第 4 h,因此在后续的观察时间内检测了大鼠给药后 4 h 的机械痛阈值。结果显示,第 3,5,7 天与第 1 天的情况相似,给药 4 h 后,与模型组比较,盘龙七片各治疗组的机械痛阈值均明显升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01)。见表 2。

表1 盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 d	3 d	6 d	9 d
正常	-	202.40±5.40	208.06±8.97	218.65±13.92	233.38±4.77
模型	-	201.44±3.31	206.86±2.32	216.08±12.63	232.20±1.08
盘龙七片	0.16	202.46±4.23	202.18±12.51	215.33±12.63	221.65±7.57
	0.32	199.67±4.34	201.25±4.85	216.08±10.28	233.38±6.78
	0.64	200.57±3.60	206.50±2.80	216.19±9.46	231.65±7.52
布洛芬	0.05	201.40±3.23	206.78±3.51	215.67±12.77	230.56±8.87

表2 盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠机械痛阈值的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
正常	-	8.93±0.97	9.27±0.72	8.60±1.19	8.94±0.98	9.61±0.81	8.60±0.91
模型	-	1.23±0.12 ²⁾	1.17±0.09 ²⁾	1.15±0.11 ²⁾	1.14±0.12 ²⁾	1.19±0.13 ²⁾	1.09±0.04 ²⁾
盘龙七片	0.16	1.61±0.12	1.36±0.08	1.18±0.13	2.24±0.40	2.87±0.20 ⁴⁾	1.19±0.12
	0.32	1.25±0.21	1.43±0.09	1.29±0.13	3.41±0.45 ⁴⁾	3.40±0.56 ⁴⁾	1.89±0.23
	0.64	1.26±0.16	1.51±0.45	2.29±1.25	4.78±1.57 ⁴⁾	7.24±2.74 ⁴⁾	1.98±0.39
布洛芬	0.05	1.25±0.13	1.22±0.08	1.32±0.14	5.26±1.71 ⁴⁾	4.23±0.95 ⁴⁾	2.23±0.27

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6 h	24 h	3 d	5 d	7 d
正常	-	8.76±1.07	9.26±0.75	9.41±0.60	9.26±0.46	9.60±0.52
模型	-	1.22±0.06 ²⁾	1.14±0.08 ²⁾	1.08±0.06 ²⁾	1.13±0.07 ²⁾	1.08±0.04 ²⁾
盘龙七片	0.16	1.16±0.09	1.10±0.08	2.22±0.52	2.66±0.21 ³⁾	2.84±0.32 ⁴⁾
	0.32	1.32±0.18	1.17±0.12	4.10±0.85 ⁴⁾	4.59±0.83 ⁴⁾	4.61±0.63 ⁴⁾
	0.64	1.29±0.09	1.26±0.10	5.91±1.31 ⁴⁾	6.41±0.84 ⁴⁾	6.61±0.64 ⁴⁾
布洛芬	0.05	1.29±0.12	1.30±0.13	4.46±0.56 ⁴⁾	3.76±0.38 ⁴⁾	4.01±0.29 ⁴⁾

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3~6同)。

3.3 对慢性炎性疼痛大鼠冷痛觉超敏反应的影响

与正常组比较,模型组大鼠对丙酮刺激诱导痛的反应评分显著升高($P<0.01$),提示CFA加重丙酮诱导的大鼠痛觉超敏反应;在给药第2天,与模型组比较,盘龙七片0.16,0.32,0.64 g·kg⁻¹组剂量依赖地降低冷痛觉超敏反应评分,给药4 h时最低,之后降低作用逐渐减弱,至给药6 h以后几乎消失,提示盘龙七片对CFA诱导大鼠丙酮刺激诱发的痛敏反应具有缓解作用;与模型组比较,布洛芬给药组也显著降低冷刺激痛的反应评分,且在给药3 h时降低最明显。

由于盘龙七片对冷刺激诱发痛敏反应的最佳镇痛时间点也为给药4 h,因此在后续的观察时间内每天检测大鼠给药后4 h的冷痛反应评分。结果显示,第4,6,8天与第2天的结果相似,与模型组比较,盘龙七片各给药组丙酮诱发的痛敏反应评分均明显降低($P<0.05, P<0.01$),且剂量越高作用越明

显,而与模型组比较,布洛芬的作用略次于盘龙七片0.32 g·kg⁻¹组。见表3。

3.4 对慢性炎性疼痛大鼠血清、致炎足和脊髓中炎症介质PGE₂, IL-1 β 和TNF- α 含量的影响

与正常组比较,模型组血清、致炎足和脊髓中PGE₂, IL-1 β 和TNF- α 含量均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,盘龙七片各剂量组均能明显降低血清、致炎足和脊髓中PGE₂, IL-1 β 和TNF- α 的含量,剂量越大作用越明显,其中0.32 g·kg⁻¹剂量组血清和0.64 g·kg⁻¹剂量组血清、致炎足和脊髓的PGE₂均明显降低($P<0.05, P<0.01$),0.16 g·kg⁻¹剂量组血清及0.32和0.64 g·kg⁻¹剂量组血清、致炎足和脊髓的IL-1 β 含量均显著降低($P<0.01$),0.16,0.32,0.64 g·kg⁻¹剂量组3个部位的TNF- α 含量均显著降低($P<0.01$)。见表4。

3.5 对慢性炎性疼痛大鼠脊髓背角中NF- κ B p65表达水平的影响

与正常组比较,模型组大鼠脊髓

表 3 盘龙七片对慢性炎症疼痛大鼠冷痛觉超敏反应评分的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Anti-hyperalgesia effect of Panlongqi tablet on rats of CFA-induced chronic inflammatory pain($\bar{x}\pm s, n=8$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
正常	-	0.58±0.10	0.67±0.27	0.42±0.23	0.34±0.01	0.58±0.23	0.59±0.10
模型	-	2.75±0.09 ²⁾	2.92±0.10 ²⁾	2.58±0.10 ²⁾	2.67±0.13 ²⁾	2.58±0.20 ²⁾	2.75±0.10 ²⁾
盘龙七片	0.16	2.58±0.23	2.58±0.20	2.58±0.23	1.91±0.19	1.67±0.27 ⁴⁾	2.42±0.33
	0.32	2.58±0.24	2.62±0.20	2.83±0.15	2.25±0.30 ⁴⁾	1.67±0.22 ⁴⁾	2.62±0.13
	0.64	2.54±0.19	2.54±0.21	2.50±0.33	1.96±0.27 ⁴⁾	1.37±0.28 ⁴⁾	2.38±0.33
布洛芬	0.05	2.58±0.20	2.59±0.21	2.50±0.27	1.75±0.20 ⁴⁾	1.96±0.29 ⁴⁾	2.17±0.27

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6 h	24 h	4 d	6 d	8 d
正常	-	0.50±0.13	0.67±0.13	0.17±0.14	0.25±0.10	0.42±0.20
模型	-	2.83±0.13 ²⁾	2.67±0.13 ²⁾	2.75±0.30 ²⁾	2.59±0.33 ²⁾	2.83±0.13 ²⁾
盘龙七片	0.16	2.67±0.27	2.75±0.20	0.83±0.39 ⁴⁾	0.99±0.27 ⁴⁾	1.08±0.33 ⁴⁾
	0.32	2.67±0.15	2.46±0.23	1.46±0.44 ⁴⁾	1.42±0.33 ⁴⁾	1.50±0.26 ⁴⁾
	0.64	2.67±0.14	2.54±0.21	0.63±0.33 ⁴⁾	0.79±0.26 ⁴⁾	0.83±0.33 ⁴⁾
布洛芬	0.05	2.67±0.13	2.50±0.26	0.50±0.20 ⁴⁾	0.58±0.23 ⁴⁾	0.42±0.23 ⁴⁾

表 4 盘龙七片对慢性炎症疼痛大鼠血清、致炎足、脊髓中 PGE₂, IL-1β 和 TNF-α 含量的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Panlongqi tablet on PGE₂, IL-1β and TNF-α levels in serum, inflammatory foot and spinal cord of rats with chronic inflammatory pain($\bar{x}\pm s, n=4$) pg·L⁻¹

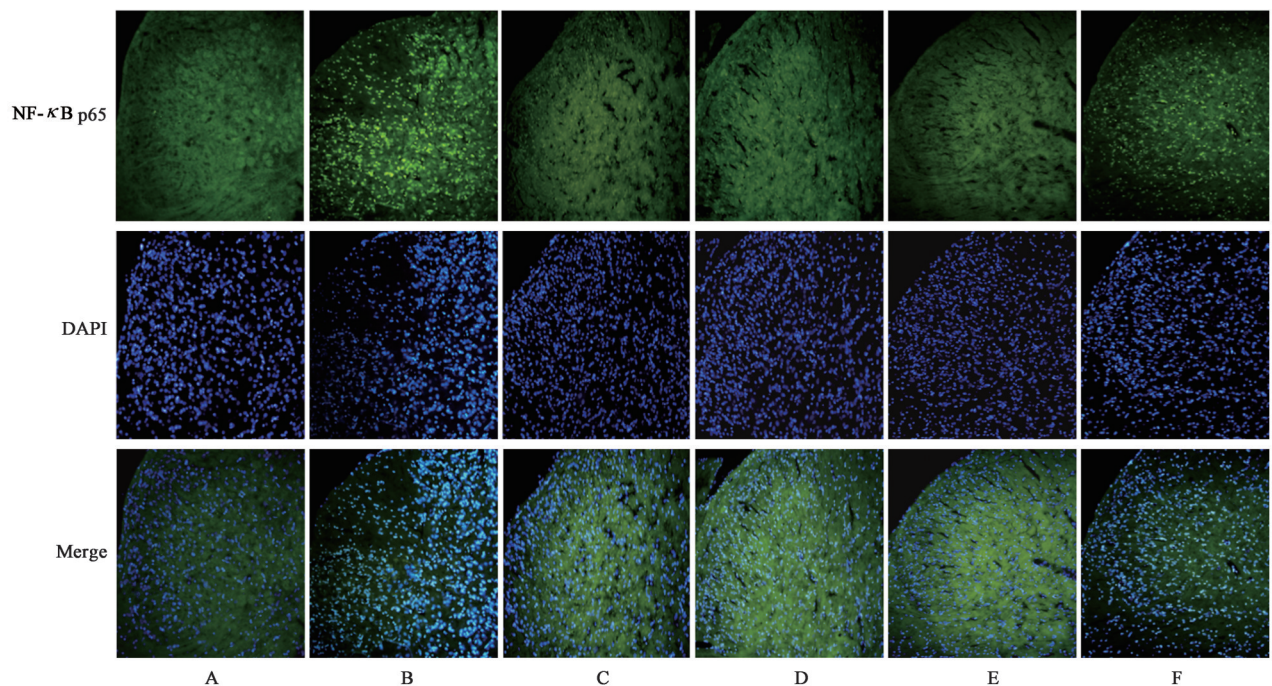
组别	剂量/g·kg ⁻¹	PGE ₂			IL-1β	
		血清	致炎足	脊髓	血清	致炎足
正常	-	436.53±51.64	72.81±20.22	58.27±28.37	88.24±14.99	84.27±9.25
模型	-	794.89±95.29 ²⁾	126.30±24.46 ²⁾	91.66±9.25 ²⁾	262.93±10.62 ²⁾	497.98±15.89 ²⁾
盘龙七片	0.16	728.01±137.07	113.72±16.86	71.29±14.15	119.75±7.50 ⁴⁾	482.31±5.55
	0.32	645.28±55.45 ³⁾	82.94±5.32 ³⁾	83.60±21.18	102.54±10.02 ⁴⁾	351.52±3.25 ⁴⁾
	0.64	543.23±66.0 ⁴⁾	75.27±33.08 ³⁾	62.07±18.69 ³⁾	78.42±8.75 ⁴⁾	296.74±23.94 ⁴⁾
布洛芬	0.05	592.78±69.52 ⁴⁾	90.76±20.54	70.32±12.46	115.61±7.50 ⁴⁾	281.43±10.34 ⁴⁾

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β		TNF-α	
		脊髓	血清	致炎足	脊髓
正常	-	37.08±1.87	102.63±10.15	149.80±12.58	60.51±5.89
模型	-	47.24±2.24 ²⁾	250.77±10.89 ²⁾	529.96±15.11 ²⁾	93.83±3.74 ²⁾
盘龙七片	0.16	42.18±1.92	138.93±14.25 ⁴⁾	489.30±12.76 ⁴⁾	75.83±6.25 ⁴⁾
	0.32	38.88±1.34 ⁴⁾	108.19±7.75 ⁴⁾	334.73±18.75 ⁴⁾	64.44±3.62 ⁴⁾
	0.64	38.46±1.25 ⁴⁾	102.94±4.57 ⁴⁾	313.05±17.53 ⁴⁾	58.09±3.75 ⁴⁾
布洛芬	0.05	35.49±1.62 ⁴⁾	124.83±8.73 ⁴⁾	334.82±15.93 ⁴⁾	56.19±4.32 ⁴⁾

背角细胞核内 NF-κB p65 阳性表达量显著增多 ($P<0.01$); 与模型组比较, 盘龙七片各给药组脊髓背角细胞核内 NF-κB p65 阳性表达量减少, 且 0.16, 0.32, 0.64 g·kg⁻¹ 剂量组差异显著 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较, 布洛芬组对 NF-κB p65 阳性表达量的影响无明显差异。见图 1, 表 5。

3.6 对慢性炎症疼痛大鼠脊髓中 p-p38, p-ERK 和 p-JNK 表达水平的影响 与正常组比较, 模型组脊

髓中 p-ERK, p-JNK 和 p-p38 的蛋白表达水平均明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$); 与模型组比较, 0.32, 0.64 g·kg⁻¹ 盘龙七片能明显降低 CFA 诱导大鼠异常升高的 p-ERK, 差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$), 显著降低 p-JNK 的蛋白表达水平 ($P<0.01$), 对 p-p38 则无明显影响。各组间 p38, ERK 和 JNK 的蛋白表达水平无统计学差异。见图 2, 表 6。



A. 正常组; B. 模型组; C. 盘龙七片低剂量组; D. 盘龙七片中剂量组; E. 盘龙七片高剂量组; F. 布洛芬组(图2同)

图1 盘龙七片对慢性炎症痛大鼠脊髓背角中NF-κB p65表达水平的影响

Fig1 Effect of Panlongqi tablet on expression of NF-κB p65 in dorsal horn of spinal cord from rats induced by CFA with chronic inflammatory pain

表5 盘龙七片对慢性炎症疼痛大鼠脊髓背角中NF-κB p65的表达影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Panlongqi tablet on expression of NF-κB p65 in dorsal horn of spinal cord from rats induced by CFA with chronic inflammatory pain($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB p65
正常	-	0.013±0.008
模型	-	5.365±0.667 ²⁾
盘龙七片	0.16	0.642±0.087 ⁴⁾
	0.32	0.090±0.006 ⁴⁾
	0.64	0.024±0.004 ⁴⁾
布洛芬	0.05	4.229±0.776 ³⁾

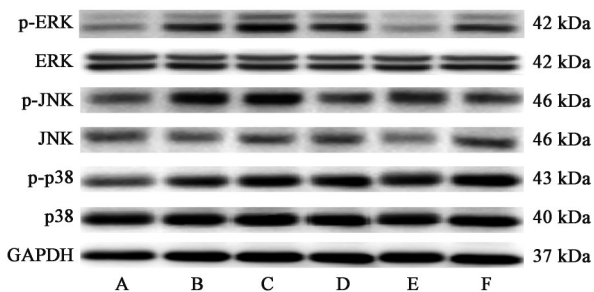


图2 慢性炎症疼痛大鼠脊髓中p-ERK, p-JNK和p-p38蛋白表达电泳

Fig 2 Electrophoresis of p-p38, p-ERK and p-JNK protein expression in rats spinal cord with chronic inflammatory pain

4 讨论

当人体肌表经络遭受风、寒、湿邪侵袭后, 气血运行不畅, 引起筋骨、肌肉、关节疼痛、麻木、伸屈不利等“痹症”, 治以祛风通络为主、佐以散寒祛湿。盘龙七片由盘龙七、川乌、当归、杜仲、丹参等29味中药组成, 组方中当归、丹参活血、养血、祛瘀, 重楼、牛膝活血祛瘀、消肿, 红花、乳香、没药活血祛瘀、行气止痛, 秦艽、络石藤祛风湿、止痹痛, 五加皮、缬草祛风湿、止痹痛且芳香通络, 杜仲、壮筋丹强筋壮骨、祛风湿, 佐以木香行气止痛, 支柱蓼、八里麻、竹根七、羊角七、过山龙祛风湿、舒筋活络、消肿镇痛, 配伍伸筋草祛风除湿、舒筋活络, 老鼠七、白毛七、祖师麻理气活血、消肿止痛, 增强祛风湿、散瘀之力。诸药相伍, 共奏活血化瘀、消肿止痛、通经活络、强筋壮骨之效^[1], 恰好切中“痹证”之要害, 故临床能有效治疗骨关节炎、类风湿关节炎, 尤其在缓解疼痛、消肿、改善关节功能方面作用显著。本研究在CFA诱导的慢性炎症疼痛模型基础上, 灌服盘龙七片进行干预, 以布洛芬为阳性对照, 用爪触觉测试仪、丙酮刺激测量不同时间点的机械痛阈值和冷刺激反应评分, 评价盘龙七片的镇痛作用特点。结果表明, CFA致炎后1~8 d都可观察到大鼠致炎足机械痛阈值降低、丙酮冷刺激超敏反应评分

表 6 盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠脊髓中 p-ERK, p-JNK 和 p-p38 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Panlongqi tablet on expression of p-ERK, p-JNK and p-p38 in rats spinal cord with chronic inflammatory pain ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-ERK/GAPDH	ERK/GAPDH	p-JNK/GAPDH	JNK/GAPDH	p-p38/GAPDH	p38/GAPDH
正常	-	0.964±0.012	0.978±0.031	0.863±0.021	0.881±0.149	0.966±0.012	0.963±0.010
模型	-	1.191±0.014 ²⁾	0.996±0.032	1.013±0.005 ²⁾	0.884±0.037	0.978±0.014	0.972±0.029
盘龙七片	0.16	1.135±0.013	0.983±0.015	0.969±0.024	0.895±0.112	0.985±0.012	0.978±0.009
	0.32	1.062±0.022 ³⁾	0.979±0.014	0.882±0.011 ⁴⁾	0.893±0.024	0.979±0.022	0.971±0.027
	0.64	0.924±0.024 ⁴⁾	0.984±0.004	0.899±0.010 ⁴⁾	0.883±0.090	0.973±0.024	0.967±0.022
布洛芬	0.05	1.001±0.006 ⁴⁾	0.993±0.027	0.906±0.011 ⁴⁾	0.891±0.082	0.989±0.006	0.977±0.021

明显升高,经 0.16~0.64 g·kg⁻¹的盘龙七片治疗后,能剂量依赖地抑制 CFA 诱导的慢性炎性疼痛大鼠的机械痛和丙酮诱发痛,最佳镇痛时间为给药后 4 h,镇痛作用可以持续到给药 6 h,且 0.64 g·kg⁻¹剂量组与布洛芬的作用相近,提示盘龙七片对慢性炎性疼痛具有良好的镇痛作用。

大量研究表明,多种外周和中枢化学物质参与了慢性炎性疼痛的形成及发展过程^[6]。PGE₂由花生四烯酸代谢形成,是一种重要的炎症介质,不仅有致痛作用,还能抑制局部组织镇痛因子的释放,提高痛觉感受器的敏感性,从而在炎性痛的外周及脊髓水平痛觉信息传递中发挥着重要作用^[7]。促炎细胞因子如 IL-1 β 和 TNF- α ,不仅直接或间接参与外周炎症反应,还参与中枢神经炎症的发生和发展,而神经炎症是启动和维持慢性疼痛的重要原因^[8]。为了观察盘龙七片的镇痛作用是否与炎症细胞因子的表达水平有关,笔者检测了外周和中枢 PGE₂, IL-1 β 和 TNF- α 的含量变化。结果显示,0.16~0.64 g·kg⁻¹的盘龙七片能显著降低慢性炎症痛大鼠血、致炎足和脊髓中异常升高的 PGE₂, IL-1 β 和 TNF- α 的含量。提示,盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠具有抗炎作用。

NF- κ B 通路是参与炎症反应调控的重要信号系统,其在慢性炎性疼痛的发生与发展过程中也扮演着重要的角色,抑制 NF- κ B 通路能够抑制疼痛^[9-11]。为了解盘龙七片的镇痛作用是否与调控 NF- κ B 信号通路有关,观察了脊髓背角中 NF- κ B p65 的表达情况。免疫荧光检测结果显示, NF- κ B p65 在模型大鼠脊髓背角中大量表达,经 0.16~0.64 g·kg⁻¹盘龙七片治疗后能显著降低,尤其是中、高剂量组几乎不见阳性表达,提示盘龙七片对慢性炎性疼痛的镇痛作用机制与抑制脊髓背角中 NF- κ B p65 的异常表达密切相关。

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族(MAPKs)主要包

括 ERK, JNK, p38 3 个亚群,其通路在慢性炎性疼痛的发生发展中发挥重要的作用^[12-13]。研究显示,星形胶质细胞中 ERK, p38, JNK 可被 LPS 激活,并进一步激活 NF- κ B,促进细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 的分泌^[12]。为进一步了解盘龙七片的镇痛作用是否与调控 MAPKs 信号通路有关,观察了脊髓中 p-ERK, p-JNK, p-p38 的表达情况。结果显示, p-ERK, p-JNK, p-p38 在模型大鼠脊髓背角中大量表达,经 0.16~0.64 g·kg⁻¹盘龙七片治疗后 ERK 和 JNK 磷酸化水平显著降低,且具有一定的量效依赖关系,但对 p-p38 无明显影响,提示盘龙七片对慢性炎性疼痛发挥镇痛作用的机制可能与抑制脊髓背角 ERK 和 JNK 的异常活化有关。

综上,本研究采用 CFA 诱导的慢性炎性疼痛模型证明了盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠具有良好的镇痛作用,且这一作用可能与其对脊髓背角中 NF- κ B 和 MAPKs 信号通路的有效抑制有关。相关研究结果将为这一中成药治疗慢性疼痛的深入研究提供实验基础,也有利于指导临床的合理用药和进一步研发。

[参考文献]

- [1] 耿维凤. 盘龙七片的药理作用与临床评价[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(18): 130-131.
- [2] 张秀梅, 赵文平, 刘星芳, 等. 脊髓 HMGB1/NF- κ B 参与雷公藤红素对慢性炎症痛大鼠的镇痛作用[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(12): 891-896.
- [3] 刘春芳, 王靖霞, 李逸群, 等. 风湿祛痛胶囊对完全弗氏佐剂致慢性炎症痛小鼠的镇痛作用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(4): 916-922.
- [4] DIXON W J. Efficient analysis of experimental observations [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1980, 20(1): 441-462.
- [5] JING X H, TIE J S, ISABELLA S X, et al. Intrathecal galanin alleviates allodynia-like behaviour in rats after partial peripheral nerve injury [J]. Eur J Neurosci,

- 1999, 11(2):427-32.
- [6] 李娜. 针刺缓解大鼠完全弗氏佐剂性外周慢性炎症痛的作用及其机制[D]. 上海:复旦大学, 2008.
- [7] 杨怀祖. 阻断前列腺素合成引起炎症大鼠痛觉减退的机制的初步研究[D]. 福州:福建师范大学, 2014.
- [8] 宋明娟. 脊髓白介素-1 β 在大鼠炎症痛及电针镇痛中的作用及其机制研究[D]. 上海:复旦大学, 2007.
- [9] ZANGY, HE X H, XIN W J, et al. Inhibition of NF-kappaB prevents mechanical allodynia induced by spinal ventral root transection and suppresses the re-expression of Nav1.3 in DRG neurons *in vivo* and *in vitro*[J]. Brain Res, 2010, 1363:151-158.
- [10] ZHANG Y P, FU E S, SAGEN J, et al. Glial NF-kappaB inhibition alters neuropeptide expression after sciatic nerve injury in mice[J]. Brain Res, 2011, 1385:38-46.
- [11] CHOU C W, WONG G T, LIN G, et al. Peripheral nerve injury alters the expression of NF-kappaB in the rat's hippocampus[J]. Brain Res, 2011, 1378:66-71.
- [12] FAN Y F, GUAN S Y, LUO L, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside relieves the chronic inflammatory pain by inhibiting neuronal apoptosis, microglia activation, and GluN2B overexpression in anterior cingulate cortex [J]. Mol Pain, 2018, doi: 10.1177/1744806918814367.
- [13] ZHANG T, ZHANG N, ZHANG R, et al. Preemptive intrathecal administration of endomorphins relieves inflammatory pain in male mice via inhibition of p38 MAPK signaling and regulation of inflammatory cytokines[J]. J Neuroinflammation, 2018, 15(1):320.

[责任编辑 孙丛丛]