

· 药理 ·

从MAPKs信号通路探讨健脾通络方的消肿镇痛作用机制

明瑞蕊, 方罗昌婷, 王潇潇, 胡智星, 杨超, 徐腾腾, 王宏洁, 刘春芳*, 林娜*

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:观察健脾通络方的消肿和镇痛作用,并初步探索其作用机制。方法:120只ICR小鼠,分为正常组、模型组、健脾通络方低、中、高剂量组(5、10、20 g·kg⁻¹)、阳性药塞来昔布组(0.03 g·kg⁻¹),每组10只,每天1次经口灌服,采用小鼠完全弗氏佐剂(CFA)诱导慢性炎性痛模型、二甲苯诱导耳肿胀实验、热板实验和乙酸扭体实验4种急、慢性模型观察不同剂量的健脾通络方的消肿和镇痛作用;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测慢性炎性痛小鼠血清和致炎足中前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的含量表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测慢性炎性痛小鼠致炎足中水通道蛋白(AQP)1、AQP3、环氧化酶(COX)1、COX2、丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族的蛋白表达情况,探索健脾通络方的初步作用机制。结果:与正常组比较,二甲苯所致模型小鼠耳肿胀度显著升高,热板实验小鼠热缩足潜伏期缩短($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方能显著提高二甲苯所致小鼠耳肿胀度抑制率($P<0.05$, $P<0.01$),延长小鼠乙酸致扭体潜伏期和减少扭体反应次数($P<0.05$, $P<0.01$)。与正常组比较,慢性炎性痛小鼠足肿胀度显著升高,机械痛阈值降低同时冷敏痛阈值升高($P<0.05$, $P<0.01$),致炎足中的AQP1和AQP3的蛋白含量增加,血清和(或)致炎足中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂及致炎足COX2含量升高,致炎足p-p38 MAPK、p-JNK、p-ERK的蛋白表达水平升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方显著降低慢性炎性痛小鼠的足肿胀度、升高机械痛阈值并降低冷敏痛阈值,镇痛持续4 h,且给药后2 h为镇痛最佳时间点($P<0.05$, $P<0.01$);进一步,健脾通络方下调慢性炎性痛小鼠致炎足中AQP1和AQP3的蛋白含量,降低血清和(或)致炎足中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、PGE₂及致炎足COX2含量,但对COX1无明显影响,同时降低致炎足p-p38 MAPK、p-JNK、p-ERK的蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:健脾通络方具有消肿和镇痛作用,其机制与下调MAPKs信号通路抑制细胞因子和炎症介质产生有关,为其临床应用提供实验依据。

[关键词] 健脾通络方; 消肿; 镇痛; 抗炎; 水通道蛋白; 炎症介质; 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0085-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20222443

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221207.1607.001.html>

[网络出版日期] 2022-12-08 11:21:38

Anti-swelling and Analgesic Mechanism of Jianpi Tongluo Prescription from MAPKs Signaling Pathway

MING Ruirui, FANG-LUO Changting, WANG Xiaoxiao, HU Zhixing, YANG Chao, XU Tengting,

WANG Hongjie, LIU Chunfang*, LIN Na*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicine Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-swelling and analgesic effects of Jianpi Tongluo prescription (JPTL) and to explore its mechanism initially. **Method:** A total of 120 ICR mice were divided into normal group, model group, JPTL low-, medium- and high-dose groups (5, 10, 20 g·kg⁻¹) and positive drug (celecoxib, 0.03 g·kg⁻¹) group, with 10 in each group (po, once a day). Complete freund's adjuvant (CFA) was

[收稿日期] 2022-07-01

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(C12021A03808);国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731-002)

[第一作者] 明瑞蕊, 硕士, 从事中药药理研究, E-mail: mingrui921@163.com

[通信作者] * 刘春芳, 博士, 研究员, 从事中药药理研究, E-mail: chunfang666@126.com;

* 林娜, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理研究, E-mail: linna888@163.com

used to induce the model of chronic inflammatory pain, and xylene-induced ear swelling test, hot plate test and acetic acid writhing test were performed to observe the anti-swelling and analgesic effects of different doses of JPTL in these four acute and chronic models. Further, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expressions of prostaglandin E₂ (PGE₂), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum and inflammatory paw of mice with chronic inflammatory pain, and the expressions of aquaporin 1 (AQP1), aquaporin 3 (AQP3), cyclooxygenase 1 (COX1), cyclooxygenase 2 (COX2) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in inflammatory paw were detected by Western blot, to explore the preliminary mechanism of JPTL. **Result:** Compared with the conditions in the normal group, there was a significant increase in the ear swelling of xylene-induced model mice, a shortened paw withdrawal latency in the hot plate test ($P<0.01$). Compared with the model group, JPTL remarkably increased the inhibition rate of xylene-induced ear swelling ($P<0.05$, $P<0.01$), prolonged the latency period of writhing caused by acetic acid and reduced the number of writhing ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with normal group, the degree of feet swelling in chronic inflammatory pain mice was significantly increased, the threshold of mechanical pain was decreased and the threshold of cold pain was increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the protein contents of AQP1 and AQP3 in inflammatory feet were increased, and the contents of IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE₂ and COX2 in inflammatory feet were increased in serum and/or inflammatory feet. The protein expression levels of p-p38 MAPK, p-JNK and p-ERK in inflammatory feet were increased ($P<0.01$). Compared with the model group, JPTL relieved paw swelling of mice with chronic inflammatory pain, elevated mechanical withdrawal threshold while decreased cold withdrawal threshold, with analgesia lasting for 4 h and the optimal time point for analgesia being 2 h after administration ($P<0.05$, $P<0.01$). Moreover, JPTL down-regulated AQP1, AQP3, COX2, p-p38 MAPK, p-JNK and p-ERK in inflammatory paw of mice with chronic inflammatory pain and reduced IL-1 β , IL-6, TNF- α , and PGE₂ in serum and/or inflammatory paw, but it had no significant effect on COX1 ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** JPTL has anti-swelling and analgesic effects, and its mechanism is related to inhibiting the production of cytokines and inflammatory mediators via the down-regulation of MAPKs signaling pathway, which provides an experimental basis for the clinical application of JPTL.

[Keywords] Jianpi Tongluo prescription; detumescence; analgesia; anti-inflammation; aquaporins; inflammatory mediator; mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

膝骨关节炎是以关节软骨退变为核心的累及骨质、滑膜、关节囊及关节其他结构的多方位、多层次、不同程度的慢性炎症^[1]。根据关节疼痛、肿胀及功能受限等临床症状表现分为发作期、持续期和缓解期。其中,尤以发作期严重影响患者的生存质量^[2]。目前对于膝骨关节炎发作期尚缺乏有效的治疗方法,西医多采用非甾体类抗炎镇痛药物为主,虽可减轻患者疼痛症状,但可引起严重的肝、肾损害及上消化道出血等不良反应,且容易复发。因此,寻求安全有效的发作期治疗方法是膝骨关节炎的研究热点。

健脾通络方是北京中医药大学第三附属医院陈卫衡教授在长期的临床实践中,根据“诸湿肿满皆属于脾”的中医病机理论及膝骨关节炎发作期的病理特点,对经典名方五苓散与四妙散加减化裁而创建的临床经验方。该方由茯苓、桂枝、苍术、黄

柏、防己、猪苓、骨碎补、延胡索、川牛膝等9味中药组成,具有健脾利湿,祛风清热,通络止痛之功,主治膝骨关节炎发作期或缓解期湿热痹阻证^[3]。前期的临床研究已证明,健脾通络方可明显缓解膝骨关节炎患者疼痛和肿胀症状,显著改善关节功能,提高患者生存质量,延缓膝骨关节炎的病情发展^[4],然而,有关其消肿镇痛的作用特点及相关作用机制尚不清楚。本研究拟采用完全弗氏佐剂(CFA)诱导慢性炎性痛模型和二甲苯诱导耳肿胀实验、热板实验及乙酸扭体实验等急性模型,观察健脾通络方的消肿和镇痛作用,并基于水通道蛋白、炎症介质和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)探讨相关作用机制,以便进一步明确这一临床效验方的药理作用,为其临床合理应用和新药研发提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 ICR小鼠120只,体质量18~22 g,SPF

级,由北京维通利华科技股份有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0002。动物饲养于中国中医科学院基础理论研究所医学实验动物中心,日光灯照明,12 h明暗周期。空调控温,温度22~24 °C。动物饮用屏障级灭菌饮用水。本实验方案符合伦理原则、动物保护和动物福利,伦理编号为2021B009、2021B044。

1.2 药物与试剂 塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司,批号CY9922);冰乙酸、二甲苯(北京化工厂,批号分别为20160906、20190319);完全弗氏佐剂(CFA,美国Chondex公司,批号7001);抗环氧酶1(COX1)、抗水通道蛋白1(AQP1)、抗水通道蛋白3(AQP3)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab109025、ab9566、ab125219);小鼠前列腺素E₂(PGE₂)、小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、小鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)、小鼠白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为ml0375412、ml002095、ml063132、ml002293);p38 MAPK、细胞外蛋白激酶(ERK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化p38(p-p38) MAPK、p-ERK、p-JNK、核转录因子- κ B(NF- κ B)p65抗体、COX2抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为8690、4695、9258、4511、4370、4668S、8242、12282、2118s);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京普利莱基因技术有限公司,批号C2226)。

1.3 仪器 DEQ-2型直径8 mm打孔器(重庆博睿达实验仪器经营部),BIO-CHP-ER型冷热板测痛仪(美国Bioseb公司),Aesthesio型Von-Frey针刺触觉测量套件(美国Danmic Aesthesio公司),BS224S型电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司),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 药物制备和给药 健脾通络方由合肥华润神鹿药液有限公司制备,批号20201217,称取药物,水提取,提取液浓缩,干燥成粉,备用,浸膏粉得率为13.81%。

健脾通络方临床成人用量(按体质量60 kg计算)为66 g·d⁻¹,采用体表面积系数法计算出小鼠的临床等效剂量的0.5、1、2倍(含生药剂量分别为5、

10、20 g·kg⁻¹),阳性药塞来昔布1倍临床等效剂量0.03 g·kg⁻¹。分别称取适量健脾通络方、塞来昔布用蒸馏水配制成混悬液,4 °C保存,用前恢复至室温。实验采用一次性灌胃给药。给药容积40 mL·kg⁻¹;正常组和模型组分别给予等容积的蒸馏水灌胃。

2.2 乙酸扭体法检测小鼠扭体潜伏期和扭体次数

60只小鼠随机分为正常组、模型组、健脾通络方低、中、高剂量组、塞来昔布组。除正常组外,模型组、健脾通络方低、中、高剂量组、塞来昔布组小鼠在分别灌胃给药或给蒸馏水1 h后,按10 mL·kg⁻¹腹腔注射0.7%的乙酸,立即放入扭体笼中,观察并记录15 min内各组小鼠发生扭体的潜伏期和扭体次数(包括腹部收缩和后腿伸展)^[5-6]。

2.3 二甲苯致小鼠耳肿胀法检测小鼠耳肿胀抑制率

各组小鼠灌胃给药或蒸馏水1 h后,移液枪在小鼠左耳耳廓内外分别涂抹二甲苯20 μ L(右耳为对照),1 h后脱颈椎处死,迅速沿耳廓基线剪下两耳,用8 mm直径打孔器在两耳廓相同部位打下圆耳片,立即称重。每鼠的左耳片质量减去右耳片质量,以两耳片的差值作为耳肿胀度^[5,7],并计算耳肿胀抑制率,耳肿胀抑制率=(模型组肿胀度平均值-给药组肿胀度平均值)/模型组肿胀度平均值 \times 100%。

2.4 热板法检测小鼠热缩足潜伏期

实验前24 h将小鼠分别放入热板仪,温度设定为(55 \pm 0.5) °C,进行筛选排除舔足时间或跳跃潜伏时间<4 s或>14 s的小鼠,将筛选合格小鼠随机分正常组、健脾通络方低、中、高剂量组和塞来昔布组共5组,分别观察小鼠给药前0 h和给药后0.5、1、1.5、2、3 h在放入热板后第1次舔足时间或跳跃时间(痛阈值),每隔5 min测量1次,共计2次,取平均值,以30 s作为截止时间以防组织烫伤^[5,8]。

2.5 CFA诱导慢性炎性痛法检测小鼠机械痛敏和冷痛超敏反应

ICR小鼠,60只,雌性,20~22 g,将小鼠置于仰卧位,固定其右后足,右后足跖皮内缓慢注射20 μ L(5 g·L⁻¹)的完全弗氏佐剂诱导小鼠慢性炎性疼痛模型,24 h后,小鼠右后足与左后足比较出现明显的红肿,与正常组比较其活动行为明显减少,提示CFA小鼠模型制备成功^[9]。

模型制备成功后,给药前及给药第1天的0、0.5、1、2、3、4 h及给药的3、5、7 d给药后最佳镇痛时间点检测机械痛敏。小鼠于测痛笼中适应30 min,用Von-Frey机械刺激针垂直刺激小鼠右后足跖中部,若小鼠在刺激时间内出现迅速的缩足、弹足、舔

足活动则记为阳性反应,若小鼠没有此类的反应则记为阴性^[10]。同时,给药前及给药第2天的0、0.5、1、2、3、4 h筛选确定最佳时间点及给药的4、6、8 d给药后最佳镇痛时间点检测冷痛敏。以丙酮0.2 mL喷射小鼠右后足,观察小鼠的应激反应情况,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、搔爪或大叫者为3分^[11-12]。实验结束小鼠摘眼球取血后,快速剪取双后足精确称量,以右足的质量减去左足的质量作为足跖炎性肿胀度,并计算足肿胀抑制率,足肿胀抑制率=(对模型肿胀度平均值-给药组肿胀度平均值)/模型组肿胀度平均值×100%。

2.6 ELISA 检测 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 含量
慢性炎性痛小鼠取血后,3 000 r·min⁻¹离心 10 min (离心半径 15.7 cm)取血清备用。致炎足液氮研磨,提取上清备用。ELISA 检测血清和致炎足上清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 PGE₂ 的含量,具体操作参考试剂盒说明书操作进行。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 AQP1、AQP3、COX1、COX2、p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK 的含量
取慢性炎性痛小鼠致炎足,用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液研磨组织并提取蛋白,进行 Bradford 法定量后变性后样本保存备用。配制 12% 浓度 SDS-PAGE 上样凝胶,上样、电泳、转膜、封闭、一抗 4 °C 孵育过夜 (AQP1、AQP3、COX1、COX2、p38 MAPK、p-p38 MAPK、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK, 1:1 000; p-ERK, 1:2 000; GAPDH, 1:10 000)、洗涤、二抗以 1:10 000 比例稀释后室温孵育 2 h,显影,凝胶成像仪成像,利用 Image J 软件对结果进行分析。

2.8 统计学分析 利用 GraphPad Prism 8.0 统计软件对实验数据进行分析,采用单因素方差分析进行组间比较,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对二甲苯致小鼠耳肿胀和慢性炎性痛小鼠足肿胀度的影响 与正常组比较,模型组二甲苯所致小鼠耳肿胀度显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,健脾通络方各剂量组均明显减轻二甲苯所致小鼠耳肿胀度 ($P < 0.05, P < 0.01$);塞来昔布组也可显著降低二甲苯所致小鼠耳肿胀度 ($P < 0.01$)。见表 1。

与正常组比较,慢性炎性痛模型组小鼠致炎足

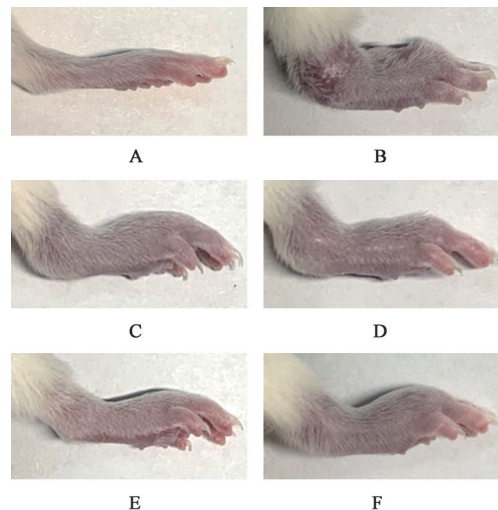
表 1 健脾通络方对二甲苯致小鼠耳肿胀的影响 ($n=10$)

Table 1 Effect of Jianpi Tongluo prescription on xylene-induced ear swelling in mice ($n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	耳肿胀度/mg($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
正常组		0.00±0.00	-
模型组		12.44±0.03 ²⁾	-
健脾通络方低剂量组	5	8.92±0.60 ³⁾	28.20
健脾通络方中剂量组	10	8.01±0.30 ⁴⁾	40.40
健脾通络方高剂量组	20	5.63±0.37 ⁴⁾	61.00
塞来昔布组	0.03	7.62±0.26 ⁴⁾	50.60

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-表 10 同)

肿胀度评分显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,健脾通络方低、中、高剂量组均显著降低慢性炎性痛小鼠足肿胀度 ($P < 0.01$);与模型组比较,塞来昔布组也可显著减轻慢性炎性痛小鼠足肿胀程度 ($P < 0.01$)。见图 1、表 2。



注:A.正常组;B.模型组;C.健脾通络方低剂量组;D.健脾通络方中剂量组;E.健脾通络方高剂量组;F.塞来昔布组(图 2-图 4 同)

图 1 健脾通络方对慢性炎性疼痛小鼠足肿胀度的影响

Fig. 1 Effect of Jianpi Tongluo prescription on ear swelling in mice caused by xylene and feet swelling in mice with chronic inflammatory pain

3.2 对小鼠热缩足潜伏期、扭体次数和扭体潜伏期的影响 热板实验结果显示,与正常组比较,健脾通络方低、中、高剂量组小鼠热缩足潜伏期在给药后 0.5 h 开始延长,持续 3 h,给药 2 h 作用显著 ($P < 0.01$),塞来昔布组给药后 2 h 也显著延长热缩足潜伏期 ($P < 0.01$)。见表 3。

乙酸扭体实验结果显示,与模型组比较,健脾通络方低、中、高剂量组可减少乙酸所致小鼠扭体

表2 健脾通络方对慢性炎性疼痛小鼠足肿胀度的影响 (n=10)

Table 2 Effect of Jianpi Tongluo prescription on swelling degree of feet in mice with chronic inflammatory pain (n=10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	足肿胀度/mg($\bar{x}\pm s$)	抑制率/%
正常组		0.00±0.00	-
模型组		0.45±0.11 ²⁾	-
健脾通络方低剂量组	5	0.36±0.04 ⁴⁾	36.00
健脾通络方中剂量组	10	0.34±0.02 ⁴⁾	44.00
健脾通络方高剂量组	20	0.31±0.05 ⁴⁾	56.00
塞来昔布组	0.03	0.32±0.06 ⁴⁾	52.00

反应次数,延长扭体潜伏期时间($P<0.05, P<0.01$);塞来昔布组也可显著减少乙酸所致小鼠扭体反应次数的同时延长扭体潜伏期时间($P<0.01$)。见表4。

3.3 对慢性炎性痛小鼠机械痛敏和冷痛觉超敏反应的影响 与正常组比较,模型组机械痛阈值明显降低($P<0.05$),提示慢性炎性痛模型建立成功;与模

型组比较,健脾通络方低、中、高剂量组给药第1天可剂量依赖性的升高机械痛阈值($P<0.01$),给药2 h升高最为显著,随后逐渐减弱,直至给药4 h后消失,提示健脾通络方对慢性炎性痛小鼠机械痛敏有良好的镇痛作用;与模型组比较,塞来昔布组在给药后2 h也可显著提高机械痛阈值,直至给药3 h后消失($P<0.01$)。见表5。

与正常组比较,模型组小鼠痛觉反应评分明显升高($P<0.05, P<0.01$),提示CFA诱导可加剧丙酮诱导小鼠痛觉超敏反应;与模型组比较,健脾通络方低、中、高剂量组给药第2天可剂量依赖性地降低冷痛觉超敏反应评分,高剂量组降低最为显著($P<0.01$),给药2 h降低最为显著,随后作用逐渐减弱,给药4 h后未消失,提示健脾通络方对慢性炎性痛小鼠冷痛觉超敏反应具有较好镇痛作用;与模型组比较,塞来昔布组给药后2 h可明显降低冷痛觉超敏反应评分,给药4 h作用消失,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表6。

表3 健脾通络方对小鼠热缩足潜伏期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Jianpi Tongluo prescription on latency of heat-shrinking feet in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h
正常组		8.15±1.47	8.73±2.17	8.03±3.47	7.50±1.66	7.89±2.80	7.93±2.85
健脾通络方低剂量组	5	8.76±2.04	9.38±3.83	10.71±2.57	9.16±2.58	12.9±4.77 ²⁾	5.60±2.65
健脾通络方中剂量组	10	8.65±2.22	9.67±3.74	11.72±3.91	12.78±4.70	13.22±5.23 ²⁾	6.34±2.81
健脾通络方高剂量组	20	9.06±1.27	11.49±4.95	13.92±6.18	14.60±5.03	18.34±9.00 ²⁾	7.11±2.98
塞来昔布组	0.03	8.20±1.96	8.69±3.75	9.34±3.00	7.83±4.22	11.19±3.16 ²⁾	7.76±3.50

表4 健脾通络方对小鼠扭体次数和扭体潜伏期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Jianshu Tongluo prescription on number of twists and latency of twists in mice ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	扭体次数/次	扭体潜伏期/s
模型组		43.50±13.08	55.71±42.10
健脾通络方低剂量组	5	36.00±11.42 ³⁾	61.25±53.79
健脾通络方中剂量组	10	32.50±12.70 ⁴⁾	88.60±59.85 ⁴⁾
健脾通络方高剂量组	20	23.88±10.28 ⁴⁾	122.10±60.08 ⁴⁾
塞来昔布组	0.03	22.60±13.67 ⁴⁾	197.00±104.60 ⁴⁾

3.4 对慢性炎性痛小鼠模型致炎足中AQP1和AQP3蛋白含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠致炎足中AQP1和AQP3蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方各剂量组、塞来昔布组均能不同程度降低模型小鼠AQP1和AQP3蛋白含量,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见

图2、表7。

3.5 对慢性炎性痛模型小鼠血清和致炎足IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清和致炎足中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方干预后各剂量组可明显降低慢性炎性痛小鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量($P<0.05, P<0.01$),降低致炎足中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,健脾通络方中、高剂量组对IL-6和TNF- α 的降低作用明显($P<0.05, P<0.01$);塞来昔布组也显著降低小鼠血清中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 及致炎足中IL-6的含量($P<0.01$)。见表8。

3.6 对慢性炎性痛小鼠致炎足或血清PGE₂、COX2和COX1蛋白含量的影响 ELISA结果显示,与正常组比较,模型组小鼠血清和致炎足中PGE₂蛋白含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方干预后各剂量组可显著降低小鼠血清和致炎足中PGE₂含量,除健脾通络方低剂量组致炎足外,差异

表5 健脾通络方对慢性炎性痛小鼠机械痛敏反应的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Jianpi Tongluo prescription on mechanical pain sensitivity in mice with chronic inflammatory pain ($\bar{x}\pm s, n=10$) g

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组		0.95±0.28	0.97±0.08	0.95±0.28	1.01±0.25	0.95±0.28
模型组		0.02±0.00	0.04±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00 ¹⁾	0.02±0.00
健脾通络方低剂量组	5	0.05±0.02	0.03±0.01	0.10±0.05	0.35±0.10 ⁴⁾	0.20±0.09
健脾通络方中剂量组	10	0.05±0.02	0.10±0.10	0.44±0.13	0.61±0.23 ⁴⁾	0.29±0.06
健脾通络方高剂量组	20	0.03±0.01	0.08±0.03	0.52±0.15	0.97±0.06 ⁴⁾	0.59±0.09
塞来昔布组	0.03	0.04±0.01	0.05±0.03	0.28±0.10	0.53±0.00 ⁴⁾	0.05±0.00

组别	剂量/g·kg ⁻¹	4 h	3 d	5 d	7 d
正常组		0.95±0.28	0.93±0.00	0.99±0.14	0.98±0.15
模型组		0.02±0.00	0.05±0.00 ¹⁾	0.03±0.01 ¹⁾	0.03±0.02 ¹⁾
健脾通络方低剂量组	5	0.02±0.00	0.18±0.13 ⁴⁾	0.10±0.02 ⁴⁾	0.16±0.01 ⁴⁾
健脾通络方中剂量组	10	0.05±0.00	0.56±0.11 ⁴⁾	0.51±0.04 ⁴⁾	0.57±0.07 ⁴⁾
健脾通络方高剂量组	20	0.05±0.01	0.88±0.11 ⁴⁾	0.92±0.06 ⁴⁾	0.86±0.15 ⁴⁾
塞来昔布组	0.03	0.05±0.00	0.51±0.05 ⁴⁾	0.49±0.05 ⁴⁾	0.53±0.14 ⁴⁾

表6 健脾通络方对慢性炎性痛小鼠冷痛觉超敏反应的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of Jianpi Tongluo prescription on cold nociceptive hypersensitivity in mice with chronic inflammatory pain ($\bar{x}\pm s, n=10$) 分

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 h	0.5 h	1 h	2 h	3 h
正常组		0.75±0.50	1.00±0.00	0.75±0.50	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组		2.93±0.15	3.00±0.00	2.93±0.15	3.00±0.00 ¹⁾	2.93±0.15
健脾通络方低剂量组	5	2.87±0.18	2.67±0.33	2.73±0.28	2.60±0.28	2.60±0.43
健脾通络方中剂量组	10	2.67±0.33	2.73±0.28	2.40±0.28	2.27±0.28 ³⁾	2.40±0.37
健脾通络方高剂量组	20	2.87±0.18	2.33±0.33	1.87±0.30	1.33±0.24 ⁴⁾	2.33±0.24
塞来昔布组	0.03	2.87±0.18	2.47±0.18	2.53±0.38	2.13±0.18 ⁴⁾	2.27±0.28

组别	剂量/g·kg ⁻¹	4 h	4 d	6 d	8 d
正常组		0.75±0.50	1.00±0.00	0.89±0.19	0.92±0.17
模型组		2.93±0.15	2.83±0.20 ²⁾	2.83±0.20 ²⁾	2.92±0.17 ²⁾
健脾通络方低剂量组	5	2.73±0.15	2.11±0.19 ³⁾	2.00±0.47 ³⁾	2.00±0.27 ³⁾
健脾通络方中剂量组	10	2.42±0.17	1.89±0.51 ⁴⁾	1.83±0.71 ⁴⁾	1.67±0.00 ⁴⁾
健脾通络方高剂量组	20	2.33±1.73	1.25±0.32 ⁴⁾	1.17±0.33 ⁴⁾	1.17±0.19 ⁴⁾
塞来昔布组	0.03	2.73±0.43	1.78±0.51 ⁴⁾	1.67±0.58 ⁴⁾	1.78±0.38 ⁴⁾

图2 慢性炎性痛小鼠模型致炎足中AQP1和AQP3蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of AQP1 and AQP3 proteins in inflammatory feet of chronic inflammatory pain mouse model

均有统计学意义($P<0.05, P<0.01$),塞来昔布组显著降低小鼠血清和致炎足中PGE₂含量($P<0.05,$

$P<0.01$)。

Western blot检测结果显示,模型组小鼠致炎足COX1和COX2蛋白含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方各剂量组、塞来昔布组均能不同程度减低小鼠致炎足COX2的蛋白含量($P<0.01$),而COX1差异无统计学意义。见表9、图3。

3.7 对慢性炎性痛模型小鼠致炎足中p-p38 MAPK、p-JNK和p-ERK蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠致炎足p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-JNK/JNK和p-ERK/ERK显著升高($P<0.01$);与模型组比较,健脾通络方各剂量组、塞来昔

表7 健脾通络方对慢性炎性痛小鼠模型致炎足中AQP1和AQP3蛋白含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Jianpi Tongluo prescription on AQP1 and AQP3 proteins in inflammatory feet in mice with chronic inflammatory pain ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	AQP1 /GAPDH	AQP3 /GAPDH
模型组		2.40±0.31 ²⁾	1.52±0.16 ²⁾
健脾通络方低剂量组	5	2.27±0.30	1.43±0.04
健脾通络方中剂量组	10	1.77±0.29 ³⁾	1.05±0.10 ⁴⁾
健脾通络方高剂量组	20	1.09±0.17 ⁴⁾	1.01±0.03 ⁴⁾
塞来昔布组	0.03	0.61±0.11 ⁴⁾	0.80±0.08 ⁴⁾

注:设正常组各指标蛋白表达量均为1

表8 健脾通络方对慢性炎性痛小鼠模型致炎足中IL-1β、IL-6和TNF-α含量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 8 Effect of Jianpi Tongluo prescription on IL-1β, IL-6 and TNF-α in mice with chronic inflammatory pain ($\bar{x}\pm s, n=10$) ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β		IL-6		TNF-α	
		血清	致炎足	血清	致炎足	血清	致炎足
正常组		9.56±1.68	5.03±1.28	7.47±1.56	5.05±1.07	56.04±8.01	42.73±7.74
模型组		17.12±2.83 ²⁾	11.50±2.39 ²⁾	18.28±1.61 ²⁾	14.06±2.58 ²⁾	120.83±2.77 ²⁾	96.67±6.60 ²⁾
健脾通络方低剂量组	5	12.17±2.26 ⁴⁾	10.01±2.30	13.45±1.51 ³⁾	9.77±1.33	89.91±8.17 ⁴⁾	83.11±9.75
健脾通络方中剂量组	10	11.95±1.29 ⁴⁾	9.85±1.19	12.29±1.97 ⁴⁾	9.53±1.31 ³⁾	88.3±12.41 ⁴⁾	67.13±4.29 ⁴⁾
健脾通络方高剂量组	20	10.99±1.03 ⁴⁾	9.42±1.37	11.34±3.35 ⁴⁾	8.60±2.12 ⁴⁾	82.27±4.25 ⁴⁾	62.56±13.75 ⁴⁾
塞来昔布组	0.03	10.72±2.96 ⁴⁾	8.94±2.01	10.76±2.54 ⁴⁾	8.77±2.47 ⁴⁾	75.82±14.93 ⁴⁾	80.52±3.74

表9 健脾通络方对慢性炎性痛小鼠模型血清或致炎足中PGE₂、COX2和COX1蛋白含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 9 Effect of Jianpi Tongluo prescription on content of PGE₂, COX2 and COX1 proteins in serum or inflammatory feet in mice with chronic inflammatory pain ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PGE ₂ /ng·L ⁻¹		COX1/GAPDH		COX2/GAPDH	
		血清(n=10)	致炎足(n=3)	致炎足(n=3)	致炎足(n=3)		
正常组		34.15±3.01	25.74±3.58	1.00±0.00	1.00±0.00		
模型组		67.71±0.71 ²⁾	50.39±11.54 ²⁾	1.45±0.11 ²⁾	1.43±0.02 ²⁾		
健脾通络方低剂量组	5	51.40±3.46 ³⁾	44.78±4.80	1.30±0.01	1.32±0.01 ⁴⁾		
健脾通络方中剂量组	10	48.87±3.44 ⁴⁾	32.51±7.86 ⁴⁾	1.26±0.13	1.14±0.00 ⁴⁾		
健脾通络方高剂量组	20	43.87±8.98 ⁴⁾	32.58±4.08 ⁴⁾	1.26±0.04	0.96±0.01 ⁴⁾		
塞来昔布组	0.03	44.60±8.19 ⁴⁾	34.81±3.60 ³⁾	1.40±0.11	1.30±0.03 ⁴⁾		

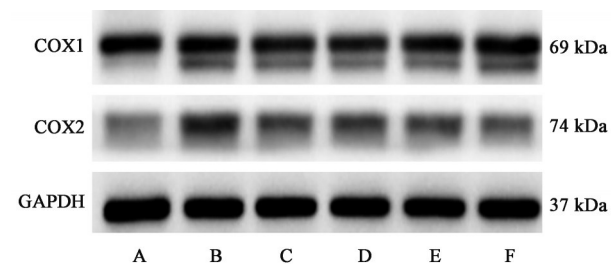


图3 慢性炎性痛小鼠模型血清或致炎足中PGE₂、COX2和COX1蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PGE₂, COX2 and COX1 proteins in serum or inflammatory feet in mice with chronic inflammatory pain

布组 p-p38 MAPK/p38 MAPK、p-JNK/JNK 和 p-ERK/ERK 均显著降低 ($P<0.01$)。见表10、图4。

4 讨论

肿胀和疼痛是膝骨关节炎的临床常见症状,在其急性发作期表现尤为突出。CFA 诱导的动物慢性炎性痛可以模拟临床膝骨关节炎的慢性炎症肿胀和疼痛过程。为了观察健脾通络方对慢性炎性痛的消肿和镇痛作用,本实验采用CFA 诱导慢性炎性痛小鼠模型进行研究。结果显示,健脾通络方降低慢性炎性痛小鼠足肿胀度、冷敏痛评分的同时提高机械痛阈值,给药2 h 为最佳镇痛时间点,且对机械痛和冷敏痛的镇痛时间分别持续4 h 和4 h 以上,

而阳性药塞来昔布则分别为3 h 和4 h,提示健脾通络方对慢性炎性痛小鼠具有良好的消肿和镇痛作用,且与塞来昔布相比镇痛持续时间长。二甲苯致动物耳肿胀实验、热板实验和乙酸扭体实验等急性炎症和疼痛模型,可以模拟膝骨关节炎急性发作时肿胀和疼痛的临床表现。故本实验采用甲苯致小鼠耳肿胀实验、热板实验和乙酸扭体实验,进一步观察健脾通络方对骨关节炎急性期的消肿和镇痛作用。结果显示,健脾通络方干预后可呈剂量依赖性的降低二甲苯致小鼠耳肿胀度,延长小鼠热缩足

表10 健脾通络方对慢性炎症痛小鼠致炎足中 p-p38、p-JNK 和 p-ERK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Jianpi Tongluo on p-p38, p-JNK and p-ERK protein of inflammatory feet in mice with chronic inflammatory pain ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-p38 MAPK/GAPDH	p-ERK/GAPDH	p-JNK/GAPDH
模型组		1.26±0.05 ²⁾	6.78±0.27 ²⁾	3.17±0.03 ²⁾
健脾通络方低剂量组	5	1.00±0.05 ⁴⁾	2.42±0.06 ⁴⁾	3.03±0.06
健脾通络方中剂量组	10	0.88±0.08 ⁴⁾	2.00±0.06 ⁴⁾	2.73±0.07 ⁴⁾
健脾通络方高剂量组	20	0.79±0.06 ⁴⁾	1.83±0.04 ⁴⁾	2.47±0.08 ⁴⁾
塞来昔布组	0.03	0.85±0.16 ⁴⁾	0.93±0.06 ⁴⁾	2.69±0.10 ⁴⁾

注: 设正常组各指标蛋白表达量均为1

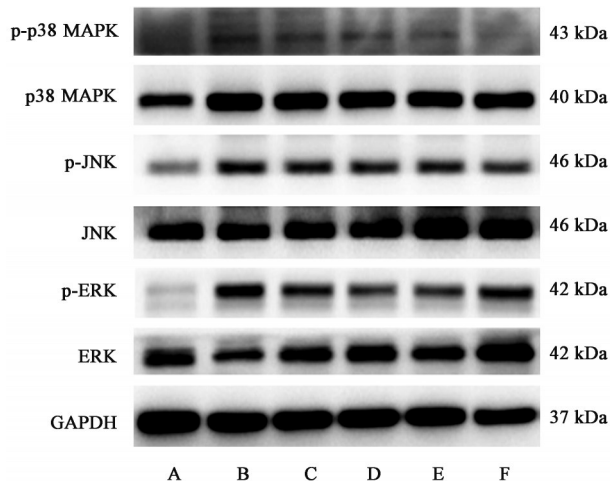


图4 慢性炎症痛小鼠致炎足中 p-p38 MAPK、p-JNK 和 p-ERK 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-p38 MAPK, p-JNK and p-ERK protein expression of inflammatory feet in mice with chronic inflammatory pain

潜伏期、乙酸致扭体潜伏期和减少扭体反应次数,提示其对具有急性肿胀和疼痛具有消肿和镇痛(外周和中枢)作用。同时,还发现1倍临床等效剂量的健脾通络方在延长小鼠热缩足潜伏期方面的作用要明显优于1倍临床等效剂量的阳性药塞来昔布,提示其中枢镇痛作用强度优于塞来昔布。

研究表明水通道蛋白 AQP 家族介导不同类型细胞膜的跨膜水转运,其中 AQP1 和 AQP3 主要富集于骨组织和皮肤等组织参与液体平衡过程,且在关节炎滑膜中的表达随炎症程度加重而增强^[13-14]。同时, AQP1 还是炎性痛和冷敏痛感知的重要分子^[15],与致炎因子 TNF- α 等变化呈正相关^[15-17]。为了观察膝痛颗粒的消肿和镇痛作用是否与外周调节水代谢有关,本文观察了慢性炎症痛小鼠致炎足中 AQP 的表达水平,结果显示 AQP1 和 AQP3 在致炎足中阳性表达明显升高,经健脾通络方各剂量给药后呈剂量依赖性的降低慢性炎症痛小鼠致炎足

中 AQP1 和 AQP3 的蛋白含量,提示健脾通络方可通过抑制致炎足 AQP1 和 AQP3 的含量而发挥消肿和镇痛作用。

已知促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 经刺激活化后释放炎症介质,引起炎症反应和疼痛^[14,18]。在病理状态下, COX2 分解花生四烯酸而生成 PGE₂, 是主要的促炎和致痛因子,当 PGE₂ 表达增加时会直接刺激神经末梢引起疼痛,同时还可着增强痛觉感受器对其他致痛因子的敏感性等^[19-20]。为了进一步观察健脾通络方的消肿和镇痛作用是否与抑制外周促炎细胞因子和炎症介质的表达有关,本实验观察了慢性炎症痛小鼠血清和致炎足的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 和 PGE₂ 的含量,降低致炎足中 COX2 含量的同时对 COX1 表达无明显影响,与阳性药塞来昔布的作用相似,提示其可能通过抑制外周细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 和下调 COX2/PGE₂ 发挥消肿镇痛作用,同时不具有 COX1 抑制剂样作用。

MAPK 可被细胞因子、激素、细胞应激及神经递质等激活^[21]。多项研究显示, MAPK 家族中不同信号通路之间存在着连通性和相对独立性,信号能被活化的 MAPK 从细胞表面传递到细胞核,增加相关炎症基因的表达,促进多种炎症因子如 COX2、PGE₂、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等的分泌^[22-23]。为了进一步观察健脾通络方抑制细胞因子和炎症介质产生的作用是否与调控 MAPK 有关,笔者检测了 CFA 诱导的慢性炎症痛小鼠致炎足中 p38 MAPK、p-JNK 和 p-ERK 中的表达水平。结果显示,经健脾通络方给药后,可呈剂量依赖性降低慢性炎症痛小鼠致炎足中 p-p38 MAPK、p-JNK 和 p-ERK 的表达水平,提示健脾通络方可能通过调控 MAPK 家族发挥抗炎作用。

健脾通络方为临床用治膝关节炎发作期或缓解期湿热痹阻证的经验方,与之前的补肾壮骨治

则治法不同,该方侧重于健脾利湿、通络止痛,临床对膝骨关节肿胀、疼痛明显、关节功能障碍的改善作用显著。本研究通过慢性炎性痛小鼠模型配合急性炎症实验证实了健脾通络方具有显著的抗炎消肿镇痛作用及相较于非甾体类抗炎药塞来昔布的药效优势。进一步,通过初步的分子机制探索,发现健脾通络方改善慢性炎性痛的机制可能与抑制外周水通道蛋白、炎症因子和MAPK信号通路因子的表达有关。相关研究结果将为健脾通络方的功效科学内涵揭示及临床合理用药提供实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 万晓旭,王均玉,周宇,等. 健脾通络方治疗膝关节炎性骨性关节炎临床观察[J]. 中医临床研究,2013,5(5):7-10.
- [2] 陈卫衡. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020年版)[J]. 中医正骨,2020,32(10):1-14.
- [3] 何海军,王荣田,陈卫衡,等. 健脾通络方治疗发作期髌骨关节炎的临床研究[J]. 中国中医骨伤科杂志,2017,25(1):9-13.
- [4] 万晓旭,王均玉,周宇,等. 健脾通络方治疗膝关节炎性骨性关节炎临床观察[J]. 中医临床研究,2013,5(5):7-10.
- [5] 张艳晓,张怡,姬陪震,等. 附子理中汤抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中医学报,2015(4):542-544.
- [6] 王娟,胡倩,刘铃,等. 合萌水提物抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国野生植物资源,2019,38(1):13-16.
- [7] 梁生林,梁琼,钟卫华,等. 荳蔻提取物抗炎镇痛作用实验研究[J]. 中草药,2014,45(21):3131-3135.
- [8] 翟建英,杨海润,靳冉,等. 补肾舒脊颗粒的抗炎镇痛作用研究[J]. 中医药导报,2019,25(16):36-39.
- [9] WANG J, ZHAO Q, ZHOU Y, et al. Subanesthetic dose of ketamine improved CFA-induced inflammatory pain and depression-like behaviors via caveolin-1 in mice [J]. J Neurosurg Anesthesiol, 2020, 32 (4) : 359-366.
- [10] WANG C, LIU C, WAN H, et al. Wu-tou decoction inhibits chronic inflammatory pain in mice: Participation of TRPV1 and TRPA1 ion channels [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015:328707.
- [11] 贾可欣,刘春芳,王金霞,等. 盘龙七片对慢性炎性疼痛大鼠的镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(15):61-68.
- [12] 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性痛小鼠的镇痛作用[J]. 中国中药杂志,2020,45(4):916-922.
- [13] 唐进,吉明,徐立新. 探讨AQP1、AQP3及IL-1 β 在膝关节炎滑膜中的表达及意义[J]. 陕西医学杂志,2017,46(12):1749-1750,1752.
- [14] 梁瑞峰,李兵杰,葛文静,等. 防风不同提取部位的燥性差异及其对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜水通道蛋白的影响[J]. 中草药,2021,52(11):3312-3320.
- [15] 康道林,陈长春,曾思玉,等. Nav1.8在疼痛中的研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2017,23(9):691-695.
- [16] 谢婧,周祎青,郑锋玲,等. 温病湿热证动物模型中炎症因子与水通道蛋白表达的实验研究[J]. 中华中医药学刊,2018,36(9):2163-2166.
- [17] CAI L, CHEN W N, LI R, et al. Therapeutic effect of acetazolamide, an aquaporin 1 inhibitor, on adjuvant-induced arthritis in rats by inhibiting NF- κ B signal pathway [J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2018, 40(2):117-125.
- [18] SUN Y, ZHAO D, LIU Z, et al. Inhibitory effect of salvianolic acid on inflammatory mediators of rats with collagen-induced rheumatoid arthritis [J]. Exp Ther Med, 2018, 16(5):4037-4041.
- [19] 李鸿洋. 大蒜素的抗炎活性及其对TLR4/NF- κ B/MAPKs信号通路的影响[D]. 锦州:锦州医科大学,2021.
- [20] 刘雅清,刘滨,马旭冉,等. 黄芩汤对LPS诱导的RAW264.7炎症细胞的抗炎作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(7):20-28.
- [21] ZHANG X, WANG Y, XIAO C, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced mice mastitis through attenuating the MAPK and NF- κ B signaling pathway [J]. Microb Pathog, 2017, 107:462-467.
- [22] BOUTROS T, CHEVET E, METRAKOS P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: Roles in cell growth, death, and cancer [J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(3):261-310.
- [23] 甘苴榕,桂雄斌,俞渊,等. 大黄灵仙方调控TAK1与TRAF6相互作用及其定位对胆管细胞炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(6):92-99.

[责任编辑 孙丛丛]