

## 消癌舒抗炎镇痛作用及机制研究

金凤<sup>1\*</sup>, 金海<sup>2</sup>, 雷恋<sup>3</sup>, 熊慧江<sup>4,5</sup>, 吴芹<sup>1</sup>, 杨丹莉<sup>1</sup>, 王井洪<sup>5</sup>

- (1. 遵义医学院药理学教研室暨贵州省基础药理重点实验室, 贵州 遵义 563000;  
2. 遵义医学院附属医院消化病研究所, 贵州 遵义 563000; 3. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563000;  
4. 六枝特区人民医院中药房, 贵州 六枝 553400;  
5. 贵州景红生物科技有限责任公司, 贵州 六枝 553400)

**[摘要]** 目的: 观察消癌舒(XAS)的抗炎镇痛作用并分析其作用机制。方法: 昆明种小鼠随机分为模型组, 阿司匹林组(0.2 g·kg<sup>-1</sup>), XAS 低、中、高剂量组(0.375, 0.75, 1.5 g·kg<sup>-1</sup>), 连续灌胃给药 7 d。采用二甲苯致小鼠耳廓肿胀及角叉菜胶致小鼠足肿胀实验评价 XAS 的抗炎作用; 采用冰醋酸致痛法及热板致痛法评价 XAS 的镇痛作用; 采用 Real time RT-PCR 法测定炎症组织中肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 及白介素  $1\beta$ (IL- $1\beta$ ) mRNA 的表达。结果: XAS 能明显抑制小鼠耳廓肿胀及足肿胀程度( $P < 0.05$ ); 对抗热板及醋酸刺激所致的小鼠疼痛反应( $P < 0.05$ ); 降低炎症组织中 TNF- $\alpha$  及 IL- $1\beta$ mRNA 的表达( $P < 0.05$ )。结论: XAS 具有显著的抗炎、镇痛作用, 其作用机制与抑制炎症组织中 TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ mRNA 的表达有关。

**[关键词]** XAS; 抗炎; 镇痛; 细胞因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)14-0199-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013140199

## Research of Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Xiaoaishu

JIN Feng<sup>1\*</sup>, JIN Hai<sup>2</sup>, LEI Lian<sup>3</sup>, XIONG Hui-jiang<sup>4,5</sup>, WU Qin<sup>1</sup>, YANG Dan-li<sup>1</sup>, WANG Jing-hong<sup>5</sup>

(1. Department of Pharmacology and the Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province,

**[收稿日期]** 20130302(001)

**[基金项目]** 贵州省科技厅中药现代化专项(黔科合中药字 20115008 号); 贵州省教育厅自然科学类科研项目(黔教科 2011056 号); 贵州省科技厅自然科学基金(黔科合 J 字 20092147 号); 贵州省中医药管理局项目(QZYY2010-59)

**[通讯作者]** \* 金凤, 硕士, 副教授, 从事神经药理学研究及新药研发, Tel: 0852-8609623, E-mail: jinfeng1115@yahoo.com.cn

- [17] 于淼, 孙晓江. 急性缺血性脑卒中颅内、外动脉粥样硬化狭窄的相关因素 [J]. 上海医学, 2009, 32(4):304.
- [18] Holy E W, Tanner F C. Tissue factor in cardiovascular disease pathophysiology and pharmacological intervention [J]. Adv Pharmacol, 2010, 59:259.
- [19] Cole M, Bromberg M. Tissue factor as a novel target for treatment of breast cancer [J]. Oncologist, 2013, 18(1):14.
- [20] de Waard V, Hansen H R, Spronk H H, et al. Differential expression of tissue factor mRNA and protein expression in murine sepsis. The role of the granulocyte revisited [J]. Thromb Haemost, 2006, 95(2):348
- [21] Ghosh S, Hayden M S. New regulators of NF-kappa B in inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(11): 837.
- [22] Ridder D A, Schwaninger M. NF- $\kappa$ B signaling in cerebral ischemia [J]. Neuroscience, 2009, 158(3):995
- [23] Chen Z B, Huang D Q, Niu F N, et al. Human urinary kallidinogenase suppresses cerebral inflammation in experimental stroke and downregulates nuclear factor-kappaB [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(7):1356.
- [24] Arderiu G, Peña E, Aledo R, et al. Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(9):1895.
- [25] Song Y S, Narasimhan P, Kim G S, et al. The role of Akt signaling in oxidative stress mediates NF-kappaB activation in mild transient focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(12):1917.

[责任编辑 聂淑琴]

- Zunyi 563000, China; 2. Institute of Digestive Disease of Attached Hospital, Zunyi 563000, China;  
3. College of Pharmacy, Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China;  
4. Traditional Chinese Medicine Pharmacy of Liuzhi Prefecture People's Hospital, Liuzhi 553400, China;  
5. Guizhou Jinghong Biotechnology Limited Liability Company, Liuzhi 553400, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the anti-inflammatory and analgesic effects of Xiaoaishu (XAS) and explore its mechanism. **Method:** The KM mice were randomly divided into model group, aspirin group ( $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and XAS groups ( $0.375, 0.75, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) ig, for 7 d. Carrageenan-induced paw swelling and dimethylbenzene-induced pinna swelling in mice were used to evaluate the anti-inflammatory effects. The analgesic effects of XAS were tested by counting writhing frequency induced by acetic acid and measuring the latent period of licking hind foot with the hot plate method in mice. The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) mRNA was determined by real time RT-PCR. **Result:** XAS significantly suppressed the dimethylbenzene-induced mice auricle swelling and Carrageenan-induced mice paw edema ( $P < 0.05$ ), XAS significantly reduced the acetic acid-induced writhing frequency and pain threshold in mice ( $P < 0.05$ ), real-time RT-PCR showed that XAS could decrease the level of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  mRNA of inflammatory tissue in mice ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** XAS have evident anti-inflammatory and analgesic effects, the mechanism may be related with the inhibition of the expression of TNF- $\alpha$  and IL- $1\beta$  mRNA in the carrageenan-induced mice paw.

**[Key words]** XAS; anti-inflammatory; analgesia; cytokines

消癌舒(XAS)是我省少数民族经验方,由斑蝥、牡蒿和牛蒡 3 味药组成,具有驱瘀散结、消肿止痛、活血化瘀、攻毒蚀疮等功效<sup>[1-2]</sup>,民间主要用于宫颈癌、风湿痛等疾病的治疗,但尚未经过相关动物实验的研究。本实验拟通过观察 XAS 的抗炎镇痛作用并分析其作用机制,为其后续的研发提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠,体重(18~22)g,月龄 2~3 月,雌雄各半,由重庆中药研究院动物中心提供,清洁级,合格证号 SCXK(渝)2007-2006。

**1.2 药品及试剂** XAS 由斑蝥、牡蒿、牛蒡 3 味药按 1:12:7 比例组成。以斑蝥素出膏率为评价指标,用水煎煮法提取,由贵州景红生物科技发展有限公司提供,批号 201001。阿司匹林(亚宝药业太原制药有限公司,批号 100401);RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒(TaKaRa 生物工程公司);SYBR superMix 荧光(美国 Bio-Rad 公司);其他试剂为国产分析纯。

**1.3 仪器** Icyler IQ 实时荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司);MILLI-Q 超纯水纯化系统(Millipore Trading Co. Ltd);Eppend of Mastercycler Gradient PCR 仪, Eppendorf 5417R 冷冻离心机(均为德国 Eppendorf 公司);TU1810 紫外-可见分光光度计(北京普析仪器有限责任公司);电子天平(BP211D);RM-200 智能热板仪(成都泰盟科技有

限公司)。

## 2 方法

### 2.1 抗炎作用

**2.1.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验<sup>[3-4]</sup>** 小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组(10 只/组):模型组,阿司匹林组( $0.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),XAS 低、中、高剂量组( $0.375, 0.75, 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。实验前用蒸馏水将受试药配成混悬液,每日灌胃给药 1 次,模型组给予等体积蒸馏水,连续给药 7 d。末次给药后将 0.02 mL 二甲苯涂于小鼠右耳廓前后两面致炎,左耳作为对照,致炎 4 h 后将小鼠颈椎脱臼处死,沿耳廓基线剪下两耳,用直径为 9 mm 打孔器在相同的部位,称重,计算肿胀度

$$\text{肿胀度} = \text{致炎侧耳片质量} - \text{对照侧耳片质量}$$

**2.1.2 角叉菜胶致小鼠足肿胀实验<sup>[5-6]</sup>** 小鼠 50 只,分组及给药方法同 2.1.1。末次给药前,用记号笔在每只大鼠右后足趾同一部位划一清晰标记线,并用游标卡尺测量标记处小鼠正常足趾厚度,各组给药后 40 min,分别在小鼠右后肢足爪皮下注射 0.1% 角叉菜胶 0.05 mL 致炎,于致炎后第 1, 2, 3, 4 h 分别测量每只小鼠足趾标记处的厚度,计算肿胀度。

$$\text{肿胀度} = \text{致炎后足掌厚度} - \text{致炎前足掌厚度}$$

### 2.2 镇痛作用

**2.2.1 热板法镇痛实验<sup>[3-4]</sup>** 实验前,将智能热板仪的温度升至( $55.0 \pm 5.0$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,恒温 10 min 后,把

小鼠置于智能热板仪中进行筛选,以小鼠舔后足反应的潜伏期为痛阈指标,(5~30)s为合格。筛选出合格的小鼠50只,雌性,随机分为5组(10只/组),分组及给药方法同2.1.1。末次给药1h后测定其在30,60,120min的痛阈值,如果给药后小鼠痛阈值超过60s,应该立即取出,以免将小鼠烫伤,其痛阈值以60s计算。

**2.2.2 扭体法镇痛实验<sup>[7-8]</sup>** 小鼠50只,雌雄各半,随机分为5组(10只/组):分组及给药同2.1.1。末次给药后1h后,每只小鼠腹腔注射0.6%的冰醋酸0.2mL,记录各组小鼠给药后15min内的扭体次数(腹部收缩内凹、伸展后肢、臀部抬高、爬行)。扭体抑制率的公式为:

$$\text{扭体抑制率} = (\text{对照组扭体次数} - \text{实验组扭体次数}) / \text{对照组扭体次数} \times 100\%$$

表1 RT-PCR的引物

基因	NCBI ID	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
TNF- $\alpha$	NM_013693.2	TGAGCACAGAAAGCATGATC	TACAGGCTTGTCACTCGAATT
IL-1 $\beta$	NM_008361.3	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC
$\beta$ -actin	NM_007393.3	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

**2.4 统计学处理** 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0统计软件进行分析,比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 抗炎作用

**3.1.1 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响** 与模型组比较,XAS各剂量组对二甲苯致小鼠耳廓肿胀均有明显抑制作用( $P < 0.01$ ),见表2。

表2 XAS对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	肿胀度/g	抑制率/%
模型	-	5.83 $\pm$ 1.27	-
XAS	0.375	3.06 $\pm$ 1.05 <sup>2)</sup>	47.53
	0.75	2.56 $\pm$ 1.24 <sup>2)</sup>	56.02
	1.5	2.26 $\pm$ 0.66 <sup>2)</sup>	61.19
阿司匹林	0.2	1.65 $\pm$ 0.84 <sup>2)</sup>	71.66

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表3,5~6同)。

**2.3 炎症组织中TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  mRNA表达测定** 角叉菜胶致小鼠足肿胀实验结束后,颈椎脱臼法处死小鼠,在冰上快速取下小鼠右后足组织,加入TRIzol试剂提取总RNA,引物由宝生物工程大连有限公司合成,见表1。逆转录反应体系20 $\mu\text{L}$ ,其中5 $\times$ M-MLV Buffer 4 $\mu\text{L}$ ,dNTP Mixture(各10mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )1 $\mu\text{L}$ ,Oligo dT Primer(50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )1 $\mu\text{L}$ ,M-MLV RTase(200U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )0.5 $\mu\text{L}$ ,RNase Inhibitor(40U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )0.5 $\mu\text{L}$ ,RNase free dH<sub>2</sub>O 9 $\mu\text{L}$ ,Total RNA 4 $\mu\text{L}$ ;反应条件为25 $^{\circ}\text{C} \times 10\text{min}$ ,42 $^{\circ}\text{C} \times 30\text{min}$ ,95 $^{\circ}\text{C} \times 2\text{min}$ 。PCR反应体系20 $\mu\text{L}$ ,其中SYBR superMix荧光10 $\mu\text{L}$ ,模板混合液(上游、下游引物)1 $\mu\text{L}$ ,超纯水5 $\mu\text{L}$ ,稀释2倍cDNA 4 $\mu\text{L}$ ;反应步骤为第一步:95 $^{\circ}\text{C} \times 8.5\text{min}$ ,第2步:95 $^{\circ}\text{C} \times 15\text{s}$ ,58 $^{\circ}\text{C} \times 1\text{min}$ ,循环45次。

**3.1.2 对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响** 与模型组比较,XAS低剂量组在致炎后3~4h,中剂量组在致炎后2~4h,高剂量组在致炎后1~4h均能抑制小鼠足肿胀( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见表3。

#### 3.2 镇痛作用

**3.2.1 对小鼠痛阈值的影响** 与空白组比较,XAS各剂量组在不同时间点均能提高小鼠的痛阈值( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见表4。

**3.2.2 对醋酸致小鼠扭体反应的影响** 与模型组比较,XAS各剂量组明显减少醋酸致小鼠的扭体次数( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),见表5。

**3.3 对炎症组织中TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$  mRNA表达的影响** 与模型组比较,XAS中、高剂量组明显降低炎症组织中TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ mRNA的表达( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。见表6。

表3 XAS对角叉菜胶致小鼠足肿胀的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	不同时间足肿胀度/mm			
		1 h	2 h	3 h	4 h
模型	-	1.37 $\pm$ 0.29	1.58 $\pm$ 0.27	1.47 $\pm$ 0.28	1.26 $\pm$ 0.28
XAS	0.375	1.17 $\pm$ 0.17	1.38 $\pm$ 0.16	1.25 $\pm$ 0.11 <sup>1)</sup>	0.98 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>
	0.75	1.15 $\pm$ 0.17	1.36 $\pm$ 0.18	1.22 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>	0.93 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>
	1.5	1.08 $\pm$ 0.34	1.29 $\pm$ 0.24 <sup>1)</sup>	1.13 $\pm$ 0.17 <sup>2)</sup>	0.82 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>
阿司匹林	0.2	1.04 $\pm$ 0.27 <sup>1)</sup>	0.91 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	0.73 $\pm$ 0.21 <sup>2)</sup>	0.28 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>

表 4 XAS 对小鼠痛阈的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	痛阈值/s			
		给药前	0.5 h	1 h	2 h
空白	-	19.10 ± 3.81	19.05 ± 9.93	19.33 ± 3.68	19.57 ± 5.77
XAS	0.375	18.96 ± 4.09	26.43 ± 6.76 <sup>1)</sup>	25.22 ± 5.56 <sup>1)</sup>	24.94 ± 2.55 <sup>1)</sup>
	0.75	19.05 ± 4.93	27.01 ± 3.60 <sup>2)</sup>	31.59 ± 7.63 <sup>2)</sup>	31.18 ± 4.40 <sup>1)</sup>
	1.5	19.01 ± 5.15	29.33 ± 3.21 <sup>2)</sup>	32.09 ± 4.20 <sup>2)</sup>	31.86 ± 5.88 <sup>2)</sup>
阿司匹林	0.2	19.02 ± 4.11	32.19 ± 4.14 <sup>2)</sup>	31.07 ± 5.17 <sup>2)</sup>	27.30 ± 4.72 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 5 XAS 对醋酸致小鼠扭体次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	扭体数/次	抑制率/%
模型	-	35.83 ± 8.20	-
XAS	0.375	17.50 ± 5.23 <sup>2)</sup>	51.18
	0.75	15.00 ± 4.90 <sup>2)</sup>	58.12
	1.5	12.83 ± 3.27 <sup>2)</sup>	64.19
阿司匹林	0.2	3.25 ± 1.91 <sup>2)</sup>	90.93

表 6 XAS 对炎症组织中  
TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA 相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -action	IL-1 $\beta$ / $\beta$ -action
模型	-	149.83 ± 18.84	103.85 ± 7.05
XAS	0.375	143.85 ± 9.28	93.09 ± 11.53
	0.75	122.66 ± 7.83 <sup>1)</sup>	86.83 ± 5.06 <sup>2)</sup>
	1.5	98.68 ± 9.19 <sup>2)</sup>	77.37 ± 8.93 <sup>2)</sup>
阿司匹林	0.2	86.74 ± 10.06 <sup>2)</sup>	66.70 ± 1.77 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

消癌舒是由斑蝥、牡蒿、牛蒡等 3 味药组成的我省少数民族经验方,方中的斑蝥可用于癌症、神经性皮炎、鼻炎、甲沟炎、牙痛、风湿痛、神经痛等的治疗<sup>[9-10]</sup>,牡蒿具有抗菌、消炎、清热、解毒等功效<sup>[11]</sup>。本实验研究发现,XAS 有显著的抗炎作用,其显著减轻由于二甲苯和角叉菜胶引起的炎症反应,明显降低炎症组织中 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  mRNA 的表达 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),提示其抗炎机制与降低炎症组织中的炎症因子 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  mRNA 的表达有关;此外,镇痛实验结果表明 XAS 有明显的镇痛效应,与模型组比较,各剂量组均显著缓解醋酸和热板致小鼠的疼痛反应,提高痛阈值,其镇痛作用机制有待进一步研究;在上述抗炎、镇痛作用中,XAS 高剂量

组的作用效果最佳,但各剂量组之间无剂量依赖性。本研究确证了 XAS 的抗炎、镇痛作用,并初步分析其抗炎作用机制,本室正在进行后续的深入研究,为其临床开发应用提供可靠的实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 邹建军,张胜强,冯瑞祥.斑蝥素毒性及其药(毒)动力学研究[J].中国药科大学学报,2002,33(5):393.
- [2] 张德华,王玲,赵宁.牡蒿总黄酮提取方法的研究[J].生物学杂志,2008,25(3):59.
- [3] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2005:906.
- [4] 莫佳佳,徐慕蝶,杨丹丹,等.侗族药羊耳菊醇提物抗炎镇痛作用的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(21):258.
- [5] 钱海兵,孙宜春,黄婕,等.芭蕉根不同提取物的抗炎镇痛作用研究[J].时珍国医国药,2010,21(4):780.
- [6] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,2006:55.
- [7] 董珍珍,高源,蔡润兰,等.原生痛的镇痛抗炎作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(23):265.
- [8] 陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:732.
- [9] 赵丽娜,张振豪.中药斑蝥的现代研究进展[J].中国民族民间医药,2010:33.
- [10] 季宇彬.抗癌中药药理与应用[M].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1999:1154.
- [11] 张德华,王玲,赵宁.牡蒿总黄酮提取方法的研究[J].生物学杂志,2008,25(3):59.

[责任编辑 聂淑琴]