

金铁锁总皂苷镇痛作用及其对佐剂性关节炎大鼠 c-fos 基因的表达式的影响

王学勇^{1*}, 张元², 许建阳³, 邱德文⁴

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京联合大学生化技术学院, 北京 10002;
3. 北京武警总医院, 北京 100039; 4. 贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 探讨金铁锁总皂苷(TSPT)镇痛作用及其机制, 进一步揭示金铁锁总皂苷抗类风湿性关节炎的药理作用基础。方法: 采用热板法初步评价 TSPT 的镇痛效果, 建立大鼠佐剂性关节炎(AA)模型, 运用免疫组化研究 TSPT 对 c-fos 基因表达产物 FOS 蛋白水平的影响。结果: TSPT 具有明显的镇痛作用, 大剂量组优于中药阳性对照组; TSPT 还能明显抑制 AA 大鼠炎性疼痛中枢及外周组织中 c-fos 基因的表达。结论: TSPT 具有良好的镇痛效果, 其镇痛作用可能与抑制中枢和外周神经 c-fos 基因的表达有关, 为深入研究其抗类风湿性关节炎作用奠定了基础。

[关键词] 金铁锁总皂苷; 类风湿性关节炎; 佐剂性关节炎; 镇痛; c-fos 基因

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)03-0094-03

The Analgesic Effect of Total Saponins of Psammosilene Tunicoids and its Suppression of c-fos Gene Expression in Adjuvant-induced Arthritis Rats

WANG Xue-yong^{1*}, ZHANG Yuan², XU Jian-yang³, QIU De-wen⁴

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. Biochemical Engineering College of Beijing Uion University, Beijing 100023, China;

3. General Hospital of Armed police forces, Beijing 100039, China;

4. Guiyang College of TCM, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the analgesic effect and possible mechanism of total saponins of Psammosilene tunicoids (TSPT) for further reveal the mechanism of its antiarthritic effects. **Methods:** The method of hot plate was used to value the primary analgesic effect of TSPT and the c-fos gene expression was investigated by immunohistochemical method in tissues from adjuvant-induced arthritis(AA) rats. **Results:** TSPT showed obvious analgesic effects and when administration dose reaching 10 mg/kg, this effect approached alidine and surpassed the positive control of Fengshinin injection. Further more, TSPT could obviously suppress the c-fos gene expression both in center and periphery tissues in adjuvant-induced arthritis rats. **Conduction:** TSPT has good analgesic effects and this effect might closely relate to c-fos gene expression both in center and periphery tissues in AA rats. This study would help to further investigate the possible mechanism of anti-rheumatoid arthritis for TSPT.

[Key words] total saponins of psammosilene tunicoids; rheumatoid arthritis; adjuvant-induced arthritis; analgesic effects; c-fos gene

[收稿日期] 2009-08-18

[通讯作者] * 王学勇, Tel: (010) 84738625; E-mail:
wangxydoctor@yahoo.com.cn

药物镇痛作用及其机制的研究, 对于抗类风湿作用研究具有重要意义。在揭示疼痛机制方面, c-fos 原癌基因是一个非常关键的指标。在慢性疼痛

时,不论是炎性或神经性疼痛,均可使 FOS 增加。当脊髓内 FOS 激活,常伴有内源性啡肽增多,所以 FOS 可作为疼痛在分子水平的标志^[1]。民族药物金铁锁具有良好的抗炎镇痛作用^[2],笔者曾报道了金铁锁总皂苷(TSPT)对佐剂性关节炎大鼠炎性组织液中 IL-1、TNF- α 等炎性细胞因子、丙二醛和皮质醇水平的影响,部分揭示了 TSPT 抗类风湿的作用机制^[3-4]。本文将从 TSPT 对佐剂性关节炎大鼠 c-fos 原癌基因表达影响的角度,深入探讨其镇痛作用的机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 兔抗 c-fos 抗体,SP 试剂盒(北京中山生物技术有限公司),其余为分析纯化学试剂。TSPT(贵阳中医学院制剂教研室提取); Freund's 完全佐剂(sigma 公司产品,定生物技术公司);安痛定注射液(河北华威制药有限公司制药一厂,批号 110065);地塞米松注射液(批号:0206101,天津金辉氨基酸有限公司);风湿宁注射液(批号 504002,罗浮山业提供)。

1.2 动物 昆明种小鼠 78 只,雌性,(20 \pm 2) g; 雄性 wistar 大鼠 70 只,(200 \pm 30) g,均为清洁级二级动物(由军事医学科学院动物中心提供)。

2 方法

2.1 TSPT 的镇痛作用

2.1.1 醋酸扭体法 昆明种小鼠 70 只,分 7 组,每组 10 只,分别为 NS 组,安痛定组、风湿宁组以及 TSPT 4 个剂量组。各给药组小鼠颈背 SC 容量为 10 mL \cdot kg⁻¹ 的药液,NS 组 SC 等体积的生理盐水。1 h 后,ip 0.6% 冰醋酸 0.2 mL/只。观察记录 15 min 以内各鼠的扭体次数,并计算镇痛百分率。

2.1.2 热板法 给药前测定每只小鼠的痛阈,挑选痛阈在 5 ~30 s 之间的合格小鼠 78 只,均分为 6 组,分别为 NS 组,安痛定组、风湿宁组以及 TSPT 大、中、小 3 个剂量组。给药容量和方法同 2.1.1。药后 1 h,热板(500 mL 玻璃烧杯杯底)置于(55 \pm 5) $^{\circ}$ C 水浴中作为热板进行实验观察。

2.2 TSPT 对 c-fos 基因表达的影响

2.2.1 分组及建模 70 只 wistar 雄性大鼠,随机分为 7 组。分别为生理盐水组(NS)、模型组、西药阳性对照组(地塞米松注射液)、中药阳性对照组(风湿宁注射液)组和 TSPT 大、中、小剂量组。除 NS 组外,其余各组于每只大鼠右后足跖皮内注射 Freund's

完全佐剂 0.1 mL 造模。

2.2.2 给药 于造模后第 9 天,颈背 sc 给药,连续 12 d,末次给药后 1 h 处死大鼠。

2.2.3 取材及冰冻切片 用戊巴比妥钠 30 mg \cdot kg⁻¹ 麻醉大鼠后,将大鼠仰卧,开胸,心脏取血后,经左心室行主动脉插管,迅速灌注 100 mL 灭菌生理盐水,然后灌注 250 mL 4% 多聚甲醛固定液,取大鼠下丘脑、脑干、脊髓、滑膜等组织继续于上述固定液固定 6 ~12 h,然后浸入 20% 蔗糖 PBS 液中直至组织块下沉。冰冻连续切片,片厚 4 ~8 μ m,切片再入上述固定液中固定 4 ~6 h 备用。

2.2.4 免疫组织化学 SP 法 冷冻切片,3% 过氧化氢孵育 5 ~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min,滴加试剂 1(蓝色液体)室温抚育 10 ~15 min,倾去,勿洗,滴加适当比例稀释的一抗(1:1500),37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~15 min,PBS 冲洗,3 min \times 3 次,滴加试剂 2(生物素化二抗工作液),室温或 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~15 min,PBS 冲洗,3 min \times 3 次,滴加试剂 C(辣根酶标记链霉素卵白素工作液),室温或 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~15 min,PBS 冲洗,3 min \times 3 次,显色剂显色(DAB),自来水充分冲洗,复染,封片,暗处保存备用;非特异性对照用正常羊血清代替 c-fos 抗体。阴性对照用 PBS 代替 c-fos 抗体,其它步骤与 SP 法程序相同。

2.2.5 Fos 样免疫反应阳性细胞计算方法 在每一动物的组织切片中随机抽样 4 张,脊髓选取后角,其它各组织均选取同一部位,左上、左下、右上、右下、中央 5 个视野采用 CMIA98A 图像分析仪进行阳性颗粒计数分析。

2.3 统计学分析 实验数据采用 SPSS10.0 统计软件 One-Way ANOVA 进行统计分析,结果用($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 TSPT 镇痛作用

3.1.1 醋酸扭体法 结果表明,与生理盐水组比较,TSPT 10.0,5.0 和 2.5 mg \cdot kg⁻¹,3 个剂量组镇痛效果明显($P < 0.05$, $P < 0.01$),存在一定的剂量依赖关系。TSPT 大剂量组镇痛百分率达 77.29%,明显高于风湿宁组,但低于安痛定组。TSPT 小剂量镇痛作用不明显,见表 1。

3.1.2 热板法 结果表明,药后 60 ~120 min,TSPT 各给药组与 NS 组比,均具有显著性差异,见表 2。说明 TSPT 具有明显的镇痛作用。

表 1 TSPT 对小鼠扭体次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	扭体次数	镇痛百分率 / %
NS	—	23.12 \pm 11.41	—
安痛定	25.97	1.75 \pm 2.43 ³⁾	92.43
风湿宁	7.10	9.38 \pm 5.45 ²⁾	59.43
TSPT	10.00	5.25 \pm 5.57 ²⁾	77.29
	5.00	7.50 \pm 7.54 ²⁾	67.56
	2.50	10.12 \pm 7.64 ¹⁾	56.23
	1.25	12.62 \pm 11.1	45.42

注:与 NS 组比较: ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$; 安痛定组剂量按所含安替比林的量来表示; 风湿宁剂量以氯化两面针碱的量表示(风湿宁注射液中氯化两面针碱含量为: $19.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

表 2 TSPT 对小鼠热刺激痛阈的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 13$)

组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	基础痛阈 / min	给药后不同时间痛阈 / min			
			30	60	90	120
NS	—	21.50 \pm 4.17	18.88 \pm 4.26	19.50 \pm 4.21	19.25 \pm 3.20	19.00 \pm 4.72
安痛定	25.97	21.62 \pm 3.42	26.75 \pm 3.84 ²⁾	27.75 \pm 4.10 ²⁾	31.62 \pm 6.07 ³⁾	27.25 \pm 5.12 ²⁾
风湿宁	7.10	20.12 \pm 3.4	23.50 \pm 5.76	26.50 \pm 3.50 ²⁾	28.38 \pm 6.63 ³⁾	30.10 \pm 8.95 ²⁾
TSPT	10.00	18.75 \pm 4.27	22.50 \pm 4.44	30.12 \pm 5.33 ³⁾	31.88 \pm 6.27 ³⁾	29.00 \pm 7.52 ²⁾
	5.00	20.88 \pm 4.67	22.88 \pm 3.64	27.12 \pm 2.47 ³⁾	25.62 \pm 4.78 ²⁾	25.75 \pm 4.03 ²⁾
	2.50	23.62 \pm 3.58	26.25 \pm 5.09 ²⁾	30.25 \pm 5.85 ³⁾	32.50 \pm 6.55 ³⁾	29.00 \pm 7.03 ³⁾

注:同表 1

表 3 TSPT 对炎性疼痛模型大鼠原癌基因 c-fos 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

组别	剂量 / ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	下丘脑	脊髓	心肌
NS	—	44.86 \pm 2.67	8.00 \pm 1.30	40.00 \pm 3.06
模型	—	79.10 \pm 9.2	17.28 \pm 1.50	72.14 \pm 11.91
地塞米松组	2.00	58.14 \pm 4.10 ²⁾	10.14 \pm 1.95 ²⁾	58.14 \pm 3.85 ²⁾
风湿宁组	5.00	77.71 \pm 7.91	14.14 \pm 3.80 ¹⁾	65.14 \pm 3.53 ¹⁾
TSPT	7.10	61.57 \pm 2.57 ^{2,4)}	10.29 \pm 3.04 ²⁾	58.57 \pm 4.47 ^{2,3)}
	3.55	72.43 \pm 5.29 ¹⁾	12.14 \pm 3.89 ²⁾	63.57 \pm 2.44 ²⁾
	1.78	73.29 \pm 6.95 ¹⁾	14.00 \pm 2.65 ¹⁾	65.14 \pm 3.98 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与风湿宁组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

疼痛是类风湿关节炎(AA)伴随的一个严重症状,临床上往往采用甾体类抗炎镇痛药物配合治疗。本研究结果发现 TSPT 有明显的镇痛作用且存在明显的剂量依赖性,大剂量组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)优于风湿宁组,但弱于安痛定组;TSPT 能明显抑制 AA 大鼠炎性疼痛中枢及外周各组织中 c-fos 基因的表达,从分子蛋白水平部分提示了 TSPT 抗炎镇痛作用机制。

类风湿性关节炎发病机制极为复杂。目前金铁

3.2 TSPT 对 c-fos 基因表达的影响 在实验过程中,由于灌注取材及冰冻切片损失等原因,各组实验出现 3 只左右的损失,因此,有效数据每组 7 只大鼠。结果表明与模型组比较,TSPT 大,中,小剂量组能有效抑制模型大鼠 c-fos 基因蛋白在下丘脑、脊髓、心肌等器官组织中的表达,且存在一定剂量依赖关系。其中 TSPT 大剂量组作用强度与地塞米松组接近,作用效果优于风湿宁组($P < 0.05$),见表 3。表明 TSPT 能明显抑制 AA 大鼠炎性疼痛中枢及外周各组织中 c-fos 基因的表达,从分子蛋白水平部分提示了 TSPT 的抗炎镇痛作用机制。

锁总皂苷抗类风湿性关节炎的研究,已进行了细胞免疫^[5]、炎性细胞因子^[3]、丙二醛及皮质醇^[4]等类风湿相关指标的研究和考察。本文从镇痛和抗炎性疼痛作用机制方面进行了进一步的探讨,并与前期研究一道,为系统揭示 TSPT 抗类风湿性关节炎的作用机制奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 张亚军. 疼痛在分子水平的标志. 国外医学[J]. 麻醉学与复苏分册, 1996, 17(4): 202.
- [2] 宋烈昌. 金铁锁总皂甙的药理研究[J]. 云南植物研究, 1981, 3(3): 287.
- [3] 王学勇, 许建阳, 邱德文, 等. 金铁锁总皂苷抗炎镇痛作用及作用机理研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(5): 56.
- [4] 王学勇, 张元, 许建阳, 等. 金铁锁总皂苷抗类风湿性关节炎作用及其作用基质研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(5): 419.
- [5] 郑维发, 石枫, 王莉. 金铁锁总甙对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 武警医学, 2003, 14(10): 598.