

# 都梁丸提取液镇痛作用及对外周组织 c-fos 基因表达影响的实验研究

韩 笑<sup>1</sup>, 刘 文<sup>2</sup>, 邱德文<sup>2</sup>, 许建阳<sup>3</sup>

(1 中国中医研究院西苑医院实验研究中心, 北京 100091; 2 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002;  
3 武警总医院, 北京 100039)

**摘要:** 目的: 研究都梁丸提取液对炎性疼痛动物模型的镇痛作用及其对外周组织 c-fos 基因表达的影响, 为其镇痛作用机理提供依据。方法: 测定完全福氏佐剂(FCA)所致大鼠疼痛模型的痛阈值, 免疫组织化学法检测外周组织 c-fos 的表达情况。结果: 都梁丸提取液能提高炎性疼痛模型痛阈值, 抑制外周组织 c-fos 的表达, 与模型组相比具显著性差异( $P < 0.05$ )。结论: 都梁丸提取液具镇痛作用, 其作用可能与抑制外周组织 c-fos 基因的表达有关。

**关键词:** 都梁丸; 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(2003)04-0034-03

## Study on Analgesic Effect of Duliang Pill (DLP) Extract and Its Effect on C-fos Gene Expression of Periphery Tissue

HAN Xiao<sup>1</sup>, LIU Wen<sup>2</sup>, QIU De-wen<sup>2</sup>, XU Jian-yang<sup>3</sup>

(1 Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese, Beijing 100091, China;

2 Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, 550002;

3 Chinese Armed Police Forces General Hospital, Beijing, 100039)

**Abstract:** Objective: To study the analgesic mechanism of DLP extract on FCA-induced pain model. Methods: Experiment detected the pain threshold, pain grade and the expression of c-fos gene in periphery tissue by using the methods of immunohistochemistry. Results DLP extract showed obvious effects, compared with model group ( $P < 0.05$ ), on enhancing the pain threshold and restraining the Fos expression of periphery tissue. Conclusion: DLP extract has analgesic effect and its analgesic effect was probably associated with its effect on restraining the Fos expression of periphery tissue.

**Key words:** Duliang Pill; Analgesic; C-fos gene

都梁丸首载于宋·王缪《是斋百一选方》。现都梁丸由白芷、川芎(4∶1)配伍而成<sup>[1]</sup>, 具祛风散寒、活血通络之功, 广泛应用于风寒头痛、鼻渊头痛、胸痹及西医之感染性发热性疾病初期、颅内肿瘤、神经性头痛、偏头痛、冠心病、肋间神经痛等, 为临床常用镇痛药。现代研究表明, 白芷、川芎中挥发油、香豆素类、生物碱类化合物具镇痛解痉、抗炎解热作用。

近来研究表明, 伤害性刺激可诱发早快基因家族中 c-fos 的表达, 本实验提取白芷、川芎有效镇痛部分, 制成都梁丸提取液, 在观察其对完全福氏佐剂所致之炎性疼痛动物模型镇痛效应的同时, 观察其对原癌基因 c-fos 在外周组织中的表达情况, 现将实验结果报告如下:

## 1 材料

**1.1 药物** 以超临界流体(SFE-CO<sub>2</sub>)法萃取白芷(*Angelica dahurica Benth. et HooR. f.*, 四川产, 干燥根)、川芎(*Ligusticum Chuanxiong Hort.*, 四川产, 干燥根茎)两药挥发油, 药渣以乙醇渗漉法提取制成浸膏, 将挥发油与浸膏混合而得都梁丸提取液, 浓度为 6.4g/ml(每毫升都梁丸提取液中所含生药克数); 完全福氏佐剂(FCA)由邦定生物制品有限公司提供; 中药阳性药正天丸, 由南方制药厂生产(批号: 20010215), 西药阳性药消炎痛, 由张家口东风制药厂生产(批号: 20010101)

**1.2 动物** 健康 SD 大鼠, 体重 200 ± 20 g, 由军事医学科学院动物中心提供。

**1.3 试剂** 兔抗 c-fos 抗体及 SP 试剂盒、DAB(20

×)均由北京中山生物有限公司提供;其余化学试剂均为国产分析纯。

**1.4 仪器** 痛阈测定仪(自制),WQ-10C型多用电子穴位治疗仪,LEICA CM1850型冰冻切片机,隔水式恒温培养箱。

## 2 方法

**2.1 分组 造模 给药** 取SD大鼠32只,随机分为生理盐水组(NS)、模型组、都梁丸提取液大、中、小剂量组、中药阳性药正天丸组、西药阳性药消炎痛组、电针组;除NS组外,其余各组鼠均于右足垫部皮内注射完全福氏佐剂(FCA)复制炎性疼痛模型(0.1ml/只),按下表中剂量给药,按组灌胃给药5d(1ml/100g);电针组以鼠夹固定大鼠,选取右后肢的“太溪”、“足三里”,以0.5寸毫针直刺0.3-0.5cm,连接电针仪,选用疏密波,频率20Hz-100Hz,电压2V-4V,强度以大鼠右后肢出现明显抽动为度,电针时间20min为治疗一次。

**2.2 痛阈的测定** 末次给药后1h,保证动物安静,于右后足掌心处选一固定点,以自制痛阈测定仪均匀下压,直至动物发生缩腿反应,每隔5min测一次,共测3次,取其平均值做为该鼠的痛阈值。

**2.3 免疫组织化学法检测外周组织 c-fos 表达<sup>[2]</sup>**

**2.3.1 灌注、取材、切片** 于末次给药1h后,乙醚麻醉,仰卧固定开胸,剪开右心耳心尖,主动脉插管,迅速灌注无菌生理盐水冲净血液、4%多聚甲醛(PFA)缓冲液,待固定完全后,取肾上腺、心脏、皮肤入4%PFA缓冲液中固定6h,然后入20%蔗糖-PFA

中保存。恒冷切片机-20℃切片,片厚5um,切片入丙酮固定。

**2.3.2 c-fos 检测**(按试剂盒说明书操作) 切片入3%过氧化氢孵育10min;蒸馏水冲洗,PBS浸泡5min;滴加正常羊血清,室温孵育15min,倾去;滴加兔抗c-fos抗体(1◇1500),37℃孵育2h;PBS冲洗,3×3min;滴加生物素化二抗(Biotin-GoatAnti-Rabbit IgG),37℃孵育15min;PBS冲洗,3×3min;滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(Streptavidin peroxidase),37℃孵育15min;PBS冲洗,3×3min;显色剂;DAB显色;自来水充分冲洗,复染,封片。

**2.3.3 免疫组化对照试验** 非特异性对照:用正常羊血清代替c-fos抗体,其它步骤与免疫组化SP法程序相同。阴性对照:用PBS代替c-fos抗体,其它步骤与免疫化SP法程序相同。

**2.3.4 Fos 样免疫反应性(FLI)计数** 抽取各组各鼠各组织切片8张,选取同一部位左上、左下、右上、右下、中央五个视野进行阳性颗粒计数分析。

**2.4 统计方法** 实验数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间显著性差异行t检验。

## 3 结果

都梁丸提取液升高炎性疼痛模型痛阈值,抑制各组织原癌基因c-fos的表达,与模型组相比具显著性差异( $P < 0.05$ ),其中高剂量组各组织中c-fos阳性颗粒与西药组及电针组相比无显著差异( $P > 0.05$ ),见下表。

表1 都梁丸提取液镇痛效应及其对外周组织 c-fos 基因表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	痛阈(个刻度)	皮肤(颗)	肾上腺(颗)	心(颗)
NS	-	144.75 ± 0.96	56.50 ± 5.04	79.38 ± 10.03	41.62 ± 4.63
模型组	-	9.00 ± 0.82	209.13 ± 43.82	148.50 ± 21.92	94.88 ± 12.78
都梁丸大剂量	9.300	15.50 ± 0.58***	124.63 ± 24.62**	90.00 ± 6.89***	58.50 ± 7.75***
都梁丸中剂量	4.650	14.00 ± 0.82***	145.75 ± 8.94**	111.00 ± 8.98**	69.25 ± 8.46**
都梁丸小剂量	2.320	11.25 ± 0.96	155.88 ± 8.73*	125.13 ± 8.51*	81.88 ± 7.66*
正天丸	1.100	11.50 ± 0.58*	140.38 ± 17.82**	117.88 ± 4.97**	68.88 ± 7.20***
消炎痛	0.005	16.00 ± 0.81***	117.75 ± 8.18***#	88.00 ± 3.63***	55.87 ± 8.25***#
电针组	-	14.00 ± 0.82**	134.38 ± 14.35**	98.25 ± 6.69***	67.25 ± 6.82**

注:与模型组比\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$ ;与电针组比#  $P < 0.05$  ##  $P < 0.01$  ###  $P < 0.001$

## 4 讨论

c-fos 为胞内快速反应基因(cellular immediately early gene, IEG),能对外界刺激在数十分钟内作出反应,研究结果证实疼痛与c-fos 基因表达存在某种内在联系。FOS 是原癌基因c-fos 的表达的产物,在慢

性疼痛时,不论是炎性或神经性疼痛,尽管伤害性刺激的传入部位不同,均可使FOS 增加,FOS 是疼痛在分子水平的标志<sup>[3]</sup>,具有自调节作用(autoregulation),即c-fos 诱导后新合成的FOS 蛋白可抑制进一步的c-fos 转录<sup>[4]</sup>。此伤害性刺激不仅诱导IEG 表

达<sup>[5][6]</sup>,而且也激活了阿片肽基因的表达,提示阿片肽可能与 IEG 有关。

疼痛是人类特有的感觉,就动物的痛与镇痛模型而言,实际上是测量其伤害性感受和抗伤害性感受,而非真正意义上的痛与镇痛的测量<sup>[7]</sup>。因此,本实验给予炎性疼痛模型机械性伤害刺激,测定其痛阈值,同时观察都梁丸提取液对中枢组织  $c-fos$  表达的影响。结果表明,都梁丸提取液能提高炎性疼痛阈值,抑制 FOS 在肾上腺、心脏、皮肤上的表达,从分子水平提示都梁丸提取液镇痛机理。都梁丸提取液对  $c-fos$  调控的作用途径可能有如下几种。1 都梁丸提取液促进  $c-fos$  蛋白的自调节,使其表达受到抑制;2 都梁丸提取液抑制炎性刺激所诱导的  $c-fos$  表达并且使其阿片肽表达增强;3 阿片肽增加后又抑制  $c-fos$  的表达。但对于都梁丸提取液是否真的促进了阿片肽表达的增强,且阿片肽是否又反过来抑制  $c-fos$  的表达将有待于今后进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 冷方南. 中国基本中成药(一部)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 5.
- [2] 韩济生. 神经科学纲要[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1993. 14.
- [3] 张亚军. 疼痛在分子水平的标志[J]. 国外医学·麻醉学与复苏分册, 1996, 17(4): 202-204.
- [4] 纪如荣, 张勤, 韩济生. 电针可促进前脑啡肽原 RNA 在大鼠脊髓和延髓的表达[J]. 生理学报, 1993, 45: 395-399.
- [5] Sonnberg JL, Rauscher FS, BD, Morgan JL, et al. Regulation Proenkephalin by Fos and Jun[J]. Science, 1989, 246: 1622.
- [6] Pennypacker KR, Walczak D, Thai L, et al. Kainate-induced changes in opioid peptide genes and AP-1 protein expression in the rat hippocampus[J]. J. Neurochem, 1993, 60: 240.
- [7] 赵志奇. 疼痛及其脊髓机理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2000. 195.