

# 芫花对热敏通道瞬时感受器电位香草素受体1的影响

殷茵<sup>1</sup>, 刘珍洪<sup>1</sup>, 高蔚<sup>1</sup>, 佟海英<sup>1</sup>, 郭蓉<sup>1</sup>, 韩雪珍<sup>1</sup>, 安致君<sup>1</sup>, 杨桢<sup>1\*</sup>, 赵红霞<sup>2\*</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 通过电生理全细胞膜片钳技术和动物行为学实验观察芫花对热敏通道瞬时变体电位香草素受体1 (TRPV1) 的影响,并探讨其机制。**方法:** 以电生理全细胞膜片钳技术检测不同浓度中药芫花的75%乙醇提取物对瞬染人源TRPV1的HEK293细胞(hTRPV1/HEK293细胞)诱导产生的跨膜电流,运用TRPV1特异性拮抗剂辣椒平,观察其是否可以抑制中药芫花诱导产生的跨膜电流;行为学检测使用雄性C57BL/6小鼠30只,将其分为空白组6只,芫花高剂量组6只,芫花中剂量组6只和芫花低剂量组6只,布洛芬组6只。芫花治疗组以低、中、高(0.195, 0.39, 0.78 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)3个剂量进行灌胃,1h后,观察在(0±2)℃冷板和(55±1)℃热板中小鼠冷痛、热痛行为潜伏期的变化。**结果:** 全细胞膜片钳实验显示在hTRPV1/HEK293细胞上芫花75%乙醇提取物可以激活TRPV1通道产生明显的跨膜电流,该跨膜电流与TRPV1激动剂辣椒素诱发的电流在电流密度和电流-电压关系各方面均类似;量效实验显示,与细胞外液对比,10 g·L<sup>-1</sup>芫花醇提物能够激活hTRPV1/HEK293细胞诱导其产生明显的跨膜电流( $P < 0.01$ )。10 g·L<sup>-1</sup>芫花醇提物产生的跨膜电流 $> 3$  g·L<sup>-1</sup>( $P < 0.01$ )。TRPV1特异性拮抗剂辣椒平可以完全抑制10 g·L<sup>-1</sup>芫花醇提物诱导产生的跨膜电流;小鼠冷热板实验中,芫花延长小鼠的冷痛和热痛行为潜伏期,与剂量呈现一定的量效关系。冷板实验中,与空白组小鼠比较,芫花中剂量组小鼠冷痛行为潜伏期延长( $P < 0.01$ ),与空白组比较,芫花高剂量组冷痛时间也显著延长( $P < 0.01$ ),布洛芬组小鼠冷痛行为潜伏期较空白组延长( $P < 0.01$ )。在热板实验中,与空白组比较,芫花高剂量组热痛行为潜伏期显著延长( $P < 0.01$ ),布洛芬组的热痛行为潜伏期明显延长( $P < 0.05$ )。**结论:** 芫花的75%乙醇提物中含有TRPV1的激动剂,芫花所具备的温性、止痛和抗炎功效可能是热敏通道TRPV1活化后产生的系列效应。

**[关键词]** 芫花; 瞬时感受器电位香草素受体1; 抗炎; 止痛

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0056-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20192002

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190705.1344.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-07-08 09:31

## Effect of Genkwa Flos on Transient Receptor Potential Vanilloid 1 of Thermosensitive Channel

YIN Yin<sup>1</sup>, LIU Zhen-hong<sup>1</sup>, GAO Wei<sup>1</sup>, TONG Hai-ying<sup>1</sup>, GUO Rong<sup>1</sup>, HAN Xue-zhen<sup>1</sup>,

AN Zhi-jun<sup>1</sup>, YANG Zhen<sup>1\*</sup>, ZHAO Hong-xia<sup>2\*</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of Genkwa Flos on the thermosensitive channel, transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by electrophysiological whole cell patch clamp technique and animal

**[收稿日期]** 20190325(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81573847);北京中医药薪火传承“3+3”工程李庆业名老中医工作站项目(2009-JC-31);中国中医科学院自主选题项目(YZ-1534)

**[第一作者]** 殷茵,在读硕士,从事中医四气五味学研究,E-mail:916093950@qq.com

**[通信作者]** \* 杨桢,博士,教授,从事中医四气五味学研究,Tel:010-64286992,E-mail:for3000yz@aliyun.com;

\* 赵红霞,硕士,副研究员,从事经典名方中医理论论释及中医四气五味学研究,E-mail:zhaohongxia7000@163.com

behavior experiment, in order to explore its mechanism. **Method:** The whole-cell patch clamp technique was used to measure transmembrane currents induced by 75% ethanol extract from different concentrations of Genkwa Flos in HEK293 cells that expressed human TRPV1. TRPV1 specific antagonist capsaicin was used to observe whether it could inhibit the transmembrane current induced by Genkwa Flos. Totally 30 C57BL/6 mice were taken for behavioral detection, and divided into blank group (6 mice), high-dose group (6 mice), medium-dose group (6 mice), low-dose group (6 mice) and ibuprofen positive control group (6 mice). Genkwa Flos treatment group was given low dose ( $0.195 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), medium dose ( $0.39 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and high dose ( $0.78 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) by gavage. One hour later, the changes of behavioral latency of cold pain and hot pain in mice were observed in cold plate at ( $0 \pm 2$ )  $^{\circ}\text{C}$  and hot plate at ( $55 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$ . **Result:** Whole cell patch clamp experiment showed that 75% ethanol extract of Genkwa Flos in hTRPV1/HEK293 cells could activate TRPV1 channel to generate obvious transmembrane current, which was similar with that generated by the known TRPV1 agonist capsaicin in current density and current-voltage relationship. The dose-effect experiments showed that compared with extracellular fluid,  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ethanol extract of Genkwa Flos could activate hTRPV1/HEK293 cells to induce significant transmembrane current ( $P < 0.01$ ). The transmembrane current generated by  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ethanol extract of Genkwa Flos was more than  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ ). The TRPV1 specific antagonist capsaicin could completely inhibit the transmembrane current induced by  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  ethanol extract of Genkwa Flos. In the experiment of cold plate and hot plate in mice, there was a dose-effect relationship between the latencies of cold pain behavior and hot pain behavior in mice prolonged by Genkwa Flos. In the experiment of cold plate, compared with the blank group, the cold pain behavior latency of mice in the medium-dose group was significantly prolonged ( $P < 0.01$ ), and that of mice in the high-dose group was significantly prolonged ( $P < 0.01$ ). Compared with the blank group, the cold pain behavior latency of mice in the ibuprofen positive control group was significantly prolonged ( $P < 0.01$ ). In the hot plate experiment, the incubation period of hot pain behavior in the high-dose group of Genkwa Flos was significantly longer than that in the blank group ( $P < 0.01$ ), while that in the ibuprofen positive control group was significantly longer than that in the blank group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** More than one TRPV1 agonist was included in 75% ethanol extract of Genkwa Flos. The warm, analgesic and anti-inflammatory effects of Genkwa Flos may be a series of effects after activation of TRPV1.

[ **Key words** ] Genkwa Flos; transient receptor potential vanilloid 1; anti-inflammatory; analgesic

芫花有强烈的刺激性,口感辛辣,苦,辛,性温,有毒。具有泻水逐饮功能,用于水肿胀满,胸腹积水,痰饮积聚,气逆咳喘,二便不利(2015年版《中国药典》)。现代药理研究表明,芫花具有镇痛<sup>[1]</sup>、抗炎<sup>[2]</sup>、抗寄生虫<sup>[3]</sup>、杀虫、抗肿瘤等作用<sup>[4]</sup>。芫花参与组成的方剂作用广泛,其中止痛功效最为常见,如《普济方》中收纳的芫花方,主治小腹疼痛、小肠气,《观聚方要补》载芫花莪术丸可以用于胸胁疼痛;除止痛外《太平圣惠方》所载的芫花散、《大同方剂学》所载芫花散具有杀虫的功效,《伤寒论》载十枣汤以芫花微炒入药,发挥其除上焦之水的作用<sup>[5]</sup>,使全方攻逐水饮之力更峻。

芫花在止痛、抗炎和镇咳方面的作用,符合瞬时变体电位香草酸受体(TRPV1)激动剂的特征。TRPV1是典型的热敏通道(TRPs)之一,该类通道是对温度敏感的一类TRP通道(瞬时受体电位),能被

有害刺激如温度( $> 43 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ),酸和辣椒素激活<sup>[6]</sup>,另外发现一些芳香类中药的活性成分也是热敏通道激动剂或抑制剂。本研究使用膜片钳技术,在转染TRPV1的hHEK293细胞上,测试芫花醇提物产生的细胞跨膜电流,以确定芫花对TRPV1通道的作用。同时,在动物行为学上验证其止痛作用。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性小鼠(C57BL/6)共30只,体质量18~21g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。动物饲养于北京中医药大学实验SPF级动物实验室,许可证号SYXK(京)2016-0038,室温( $22 \sim 25$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,湿度60%~65%,每日光照时间12h,自由饮水、饮食。实验通过北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查,符合相关伦理学要求,伦理审查编号BUCM-4-2018121002-4056。

**1.2 药物与试剂** 中药芫花于 2016 年 3 月购自河北保定直隶国医馆,并经北京中医药大学中医学院李兴广教授鉴定为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* 的干燥花蕾。TRPV1 质粒(美国 Origene 公司,批号 RC217653);氯化钾,辣椒素,乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸(EGTA),4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES),二甲基亚砜(DMSO),D-葡萄糖(*D*-glucose),氯化钙(美国 Sigma 公司,批号分别为 P5405, 12084-10 mg-F, E3889, H3375, D2650, G8270, C7902);阳离子脂质体(美国 Invitrogen 公司,批号 11668019);质粒 GFP(北京爱思益普);青/链霉素(美国 Gibco 公司,批号 15140);布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,国药准字 H20013062)。

**1.3 仪器** YLS-21A 型冷热板测痛仪(北京众实迪创生物科技有限公司);EPC-10 型 Quattro 膜片钳放大器, PatchMaster 数据获取软件(德国 Heka 公司);RE-52 型旋转蒸发器(上海虹昕电子仪器仪表有限公司);XL-06B 型 300 g 密封型摇摆式粉碎(广州市旭朗机械设备有限公司);SHZIII 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂);P-97 型拉制仪器(美国 Sutter Instruments 公司);HH-6 型数显恒温水浴锅(常州润华电器有限公司);IGOR-Pro 型分析软件(美国 WaveMetrics 公司)。

## 2 方法

**2.1 芫花醇提物制备** 应用粉碎机将芫花 80 g 粉碎成末,过 80 目筛,与 75% 乙醇(8 倍量)混合后于 95 °C 恒温水浴锅中进行加热提取 2 h,获得提取液后用滤纸过滤 2 次,将过滤后的提取液用旋转蒸发器回收乙醇,取双蒸水将不含有乙醇的膏状物的质量浓度调整至  $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,于 -20 °C 低温冰箱保存备用。

**2.2 细胞培养和转染** 在培养皿内放置直径为 12 mm 的细胞爬片,滴加人胚肾 293 细胞(HEK293)悬液,再将培养皿放置于 37 °C 培养箱内培育 24 h 后进行转染。在室温条件下,将转染试剂 Lipofectamine2000,稀释液 DMEM 与根据 Gen Bank 所载基因构建的质粒(保藏号 NM\_080704.2)平衡 15 min 至 20 °C 左右。在 Lipofectamine2000 加入无血清的 DMEM 使其浓度稀释至转染试剂 5  $\mu\text{L}$  和 DEME 100  $\mu\text{L}$ 。在转染试剂稀释液 100  $\mu\text{L}$  中加入 TRPV1 质粒 2  $\mu\text{L}$  和 GFP 质粒 600 ng,轻柔振荡使其混匀。在 15 ~ 20 °C 条件下,将转染试剂, DNA 复合物静置 15 min 后,将转染液, DNA 复合物滴入细胞

培养皿中,转染完成,4 h 后更换为无抗生素的完全培养基。24 ~ 72 h 内进行电生理检测<sup>[7]</sup>。

**2.3 电生理全细胞膜片钳实验** 在 20 ~ 25 °C 温度下进行,在专门的记录小室内放入细胞爬片,并将浴液电极进行固定。于显微镜视野下选取长杆状细胞,细胞需外形完整、表面光滑,边缘整齐,横纹清晰。膜片钳放大器系统与电脑连接,运用 Patch Master 软件对刺激信号、电流、电压信号进行采集。电极内液灌注至玻璃微电极后与电极夹持器连接,再将两者与探头、放大器连接。在显微镜视野下将电极尖端移至细胞表面,轻轻按压使之发生变形,再用 1 mL 注射器以负压抽吸细胞,封接细胞,并保持 1 G $\Omega$  以上的高阻封接,再行电极电容补偿。观察细胞能否实现自行破膜,若 1 ~ 2 min 内无破膜,可选用注射器抽吸细胞,负压破膜。选择 -80 mV 为细胞维持电压,以 1 s 的时间间隔给细胞一个连续的电压斜坡刺激(-100 ~ 100 mV)或记录维持 -80 mV 电压下的电流<sup>[7]</sup>。

**2.4 小鼠冷板实验** 使用设定在(0  $\pm$  2) °C 的冷板装置进行冷板实验。按照 2015 年版《中国药典》70 kg 成人芫花每日最大剂量 3 g,根据“人和动物按体表面积折算的等效剂量比值表”折算,给小鼠灌以 0.5% CMC-Na 稀释的芫花醇提物  $0.39 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,此为中剂量组,低剂量组和高剂量组则以中剂量的 1/2 和 2 倍计算,分别灌予  $0.195 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $0.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  芫花醇提物,布洛芬组按  $0.104 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  进行灌胃。空白组灌予等量 0.5% CMC-Na,1 h 后测量各组小鼠冷痛潜伏期(抬/舔后爪或者跳跃)。在该测定中,建立 60 s 的截止时间以避免小鼠爪组织损伤,并且将 60 s 内没有反应的动物从装置中移除并且得分为 60 s<sup>[8]</sup>。

**2.5 小鼠热板实验** 使用设定在(55  $\pm$  1) °C 的热板装置进行热板实验。各组灌胃 1 h 后(灌胃剂量同冷板实验)测量小鼠热痛潜伏期(抬/舔后爪或者跳跃),为避免小鼠爪组织损伤选定 30 s 为操作截止时间,若小鼠 30 s 内未作出反应判定其得分为 30 分<sup>[9]</sup>。

**2.6 统计学方法** 图像处理和数据分析使用 GraphPad Prism 7.0 和 SPSS 20.0 统计软件,多组数据行单因素方差分析后,多组间比较采用 LSD 检验,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 芫花醇提取物对 hTRPV1/HEK293 细胞的影响** TRPV1 细胞外液将芫花醇提物稀释成  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

观察其对 TRPV1 转染细胞上跨膜电流所产生的影响,阴性对照为细胞外液所引起的电流,阳性对照为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  辣椒素 (capsaicin, caps) 所引起的电流。实验操作过程中,先将细胞外液缓慢加入,观测电流的基线水平的变化,待到基线水平呈稳定状态后将芫花醇提物缓慢加入,加样品的同时观测电流变化,电流达峰值并出现下降时加入细胞外液进行洗脱,洗脱过程中密切观察电流情况,待电流恢复到基线水平后加入  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  辣椒素测试其诱导细胞产生的跨膜电流,最后对比两者电流的变化差异。与细胞外液比较,芫花醇提物能够激活 hTRPV1/HEK293 细胞诱导其产生明显的跨膜电流,该跨膜电流与 TRPV1 激动剂辣椒素诱发的电流在电流密度和电流-电压关系各方面均类似。见图 1。

图 1,2。  $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  芫花醇提物产生的跨膜电流大于  $3 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $P < 0.01$ )。见图 2,表 1。

表 1 不同浓度芫花醇提物对 hTRPV1/HEK293 细胞诱导产生跨膜电流的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of transmembrane currents induced by different concentrations of Genkwa Flos ethanol extracts on hTRPV1/HEK293 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	电流密度
细胞外液	-	$50.39 \pm 24.01$
芫花醇提物	3	$103.78 \pm 24.43$
	10	$327.98 \pm 70.05^{(2)}$
辣椒素	$10^{(3)}$	$351.17 \pm 67.96^{(1)}$

注:与细胞外液比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与  $3 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  芫花醇提物比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; <sup>3)</sup> 表示单位为  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

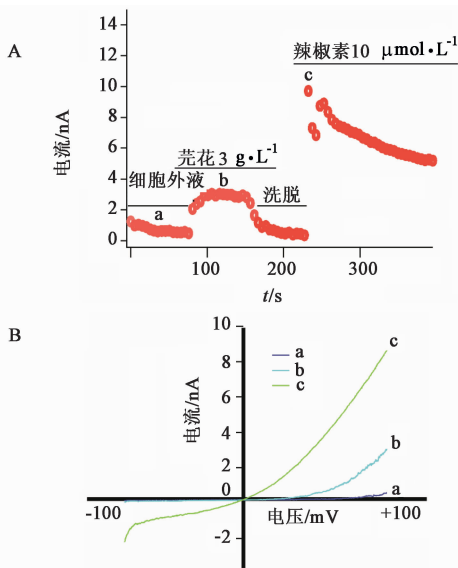


图 1 芫花醇提物对 TRPV1/HEK293 细胞诱导产生跨膜电流时程  
Fig.1 Time history of transmembrane current induced by ethanol extract of Genkwa Flos on TRPV1/HEK293 cells

3.2 芫花醇提物对 hTRPV1/HEK293 细胞诱导跨膜电流的量效关系 在对芫花醇提物诱导跨膜电流的量效关系的研究中,测试芫花醇提物被细胞外液稀释成 3,  $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  条件下芫花醇提物对 hTRPV1/HEK293 细胞跨膜电流的影响。与细胞外液相比较,  $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  芫花醇提物能够激活 hTRPV1/HEK293 细胞诱导其产生明显的跨膜电流 ( $P < 0.01$ ), 见图 2,表 1。  $3 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  芫花醇提物虽然诱导的跨膜电流与细胞外液比较无明显统计学差异,但是趋势明显,见

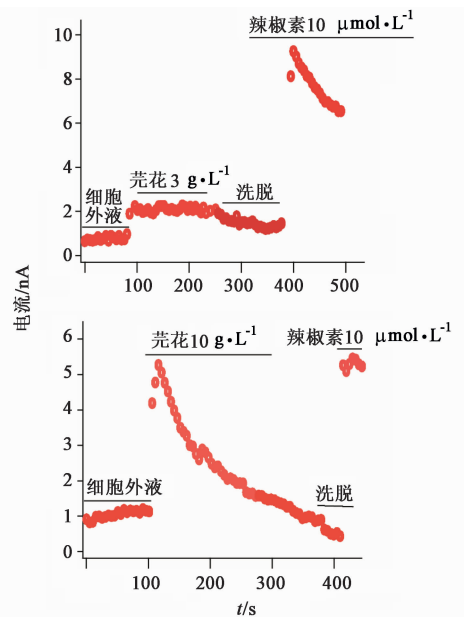


图 2 +100 mV 电压下不同浓度芫花醇提物诱导的跨膜电流时程  
Fig.2 Time history of transmembrane current induced by ethanol extract of Genkwa Flos with different concentrations under +100 mV voltage

3.3 TRPV1 抑制剂辣椒平对芫花醇提物诱导的跨膜电流的抑制作用 为了进一步证明芫花醇提物对 TRPV1 的作用,使用 TRPV1 的竞争性拮抗剂辣椒平 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与芫花醇提物共用,证明其可完全抑制  $10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  芫花醇提物诱导的跨膜电流,见图 3。

3.4 芫花醇提物对小鼠冷痛行为潜伏期的影响 在小鼠冷板实验中,测试芫花醇提物对小鼠冷痛行为的影响,评估小鼠对冷痛的敏感性,结果显示芫花延长小鼠的冷痛行为潜伏期与剂量呈现一定的量效关系。芫花中、高剂量组给药 1 h 后,与空白组比

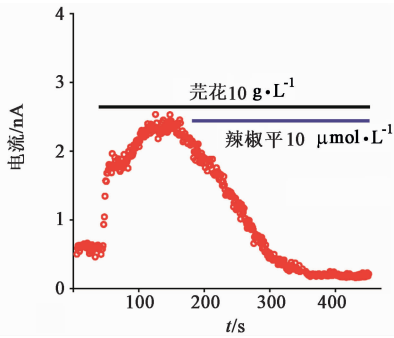


图 3 辣椒平抑制芫花醇提取物诱导的跨膜电流历程

Fig. 3 Time history diagram of inhibition of transmembrane current induced by alcohol extract of Genkwa Flos by capsaicin

较,小鼠冷痛行为潜伏期明显延长( $P < 0.01$ ),布洛芬组可明显延长小鼠的冷痛行为潜伏期( $P < 0.01$ ),芫花低剂量组则未能显著延长小鼠的冷痛行为潜伏期。见表 2。

表 2 不同浓度芫花醇提取物对小鼠冷痛行为潜伏期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of cold pain behavior latency of different concentrations of Genkwa Flos in mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	冷痛行为潜伏期/s
空白	-	31.30 ± 5.90
芫花	0.195	37.53 ± 9.04
	0.39	44.37 ± 10.07 <sup>2)</sup>
	0.78	56.57 ± 3.93 <sup>2)</sup>
布洛芬	0.104	46.67 ± 9.00 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 3 同)。

### 3.5 芫花醇提取物对小鼠热痛行为潜伏期的影响

在小鼠热板实验中,测试芫花醇提取物对小鼠热痛行为的影响,结果显示芫花延长小鼠的热痛行为潜伏期也与剂量呈现一定的量效关系,芫花低、中剂量组热痛行为潜伏期虽然与空白组对比差异无统计学意义,但是趋势明显。与空白组比较,芫花高剂量组和布洛芬组热痛行为潜伏期明显延长( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3。

## 4 讨论

《神农本草经》记载芫花主咳逆上气,喉鸣、喘、咽肿、短气、蛊毒、鬼疟、疝瘕、痈肿、杀虫鱼。《名医别录》载其能治疗“腰痛”。《本草纲目》李时珍认为其有“治水饮痰癖,胁下痛”的作用。可见芫花作用广泛,在镇痛、利尿、镇咳等领域具有明显疗效。

已知芫花中的主要成分瑞香烷型二萜在镇痛方面功效显著,其镇痛机制可能是通过抑制前列腺素

表 3 不同浓度芫花醇提取物对小鼠热痛行为潜伏期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of hot pain behavior latency of different concentrations of Genkwa Flos in mice( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	热痛行为潜伏期/s
空白	-	13.52 ± 1.99
芫花	0.195	18.10 ± 7.13
	0.39	17.88 ± 6.20
	0.78	26.57 ± 2.95 <sup>2)</sup>
布洛芬	0.104	19.35 ± 2.18 <sup>1)</sup>

$E_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) 和白细胞介素- $1\beta$  ( $\text{IL-1}\beta$ ) 的形成、降低脑组织诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的活性从而减少 NO 的生成,以及增强超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性以抑制脂质过氧化反应来实现的<sup>[10]</sup>,另外现代研究显示黄酮类成分在抗炎、镇痛方面也有一定的作用<sup>[11]</sup>,其镇痛机制与瑞香烷型二萜相似。本研究采用全细胞膜片钳技术旨在从细胞分子层面了解芫花发挥其功效可能作用的分子靶点。

本研究通过测量芫花醇提取物应用于 TRPV1 细胞上细胞膜上电流产生的变化,尝试了解芫花镇痛、抗炎、止咳喘以及利尿作用的分子靶点,通过研究发现芫花醇提取物能激活 TRPV1,TRPV1 作为一种非选择性阳离子通道,对钙离子具有通透性,激活后可以导致细胞质中游离的钙离子浓度增高<sup>[12]</sup>,在有伤害性感受器类型的感觉神经元及神经末梢的细胞膜上广泛分布,可以被多种外源化学激活剂(包括香草酸)、内源性激活剂质子激活<sup>[13]</sup>,其作为一个在外周感觉神经元强有力的热传感器,而表现出对热的高度灵敏性<sup>[6]</sup>,是 43 °C 以上有害温度的探测器。在病理状态下,组织酸化、身体发热、多种炎症因子的产生也能引起 TRPV1 通道的活化,造成炎症痛<sup>[14]</sup>,脱敏或者拮抗 TRPV1 可以产生镇痛作用。现代动物行为学研究和临床研究也表明 TRPV1 和疼痛关系密切<sup>[15-17]</sup>,TRPV1 激动剂和拮抗剂治疗疼痛疗效显著,例如 TRPV1 激动剂甘草是首批国医大师治疗胃脘痛使用频数最高的前五位药之一<sup>[18]</sup>,激动剂冰片可以用于咽喉肿痛<sup>[19]</sup>,激动剂辣椒碱可以用于骨关节炎、类风湿性关节炎所引起的疼痛等<sup>[20]</sup>。TRPV1 激动剂和拮抗剂所具有的抗炎、镇痛作用,使之成为镇痛抗炎药物研究的新靶点。芫花止咳、利尿功能也可能是 TRPV1 活化的结果。芫花中的二萜类化合物属于瑞香烷型二萜。瑞香烷型二萜因

其广泛的生物活性受到关注<sup>[21]</sup>,具有抗肿瘤、抗炎的功效<sup>[22]</sup>。二萜类化合物难溶于水,易溶于醇。

含芫花的方剂治疗疼痛的范围广泛,如《外台秘要》中的芫花丸治疗“呕逆头痛”,《古今医统》中的芫花散治疗“牙痛”,《圣惠方》中的芫花散治疗产后腹痛,《圣惠方》中的芫花丸治疗“妇人癥痞,心腹胀硬疼痛。”《观聚方要补》中的芫花菝葜丸治疗胸痞胁痛。现代行为学研究、临床研究表明芫花有很好的止痛作用<sup>[10, 22]</sup>。

作为伤害性感受器,TRPV1 通道传递、调节痛觉,尤其是对炎症介质诱导的热痛觉过敏<sup>[23]</sup>。TRPV1 在炎症诱导的热痛觉过敏和异常性疼痛中的关键作用已被其他研究证实<sup>[24-25]</sup>。TRPV1 通道参与外周伤害感受器和脊髓背角神经元的疼痛敏化<sup>[26]</sup>。痛觉敏化是指正常的情况下人体能够觉察出痛觉刺激并且痛觉感受出现增强的过程。外周或神经组织损伤后产生各种炎性介质的释放,包括缓激肽, PGE<sub>2</sub>, 神经生长因子和 ATP, 他们与神经末梢中的 TRPV1 结合后导致动作电位增强, 神经末梢电位出现异常导致瀑布式反应发生, 出现细胞膜兴奋性增强的现象, 引起疼痛阈值降低, 从而出现痛觉敏化<sup>[27-28]</sup>。

TRPV1 作为疼痛性刺激的整合器,被认为参与调控热敏疼痛和炎性疼痛,能够通过初级传入神经元把伤害性刺激传递到伤害感受器的末端,从而引起痛觉过敏的产生。在疼痛感知方面,TRPV1, TRPM8 和 TRPA1 具有温度和化学刺激激活感觉神经元产生急性或持续性疼痛的分子探测器的作用,这些受体的激动剂或抑制剂扮演着不可或缺的角色。

辛温药物的辛味和温性是 TRPV1 致敏后产生的感觉,比如少量辣椒和生姜产生的口感,是一种促炎诱痛状态。而辛温药物的止痛作用是 TRPV1 受激动剂持续刺激后脱敏的结果,比如持续大量食用辣椒和生姜产生的口腔麻木感,是一种消炎镇痛状态。这样就可以理解芫花对冷板和热板诱导的疼痛都有效。芫花对冷板诱导的疼痛的脱敏作用是交叉脱敏实现的,而对热板诱导的疼痛是通过自脱敏实现的,因此止痛效果存在差异。

本实验的全细胞膜片钳测试证明芫花醇提取物含有 TRPV1 激动剂。小鼠冷热板行为学证明芫花有止痛效果。行为学测试是在小鼠给药 1 h 后进行,对冷热板诱导的疼痛退宿行为均有抑制,表明 TRPV1 通道已经充分脱敏。芫花高剂量组对冷敏

感性疼痛的抑制作用更优,说明寒者热之的交叉脱敏在 1 h 左右作用更好;小鼠对热敏感性疼痛的耐受弱,中高剂量组的芫花依然对热痛有明显的抑制作用,而高剂量组效果更优。在本研究中,首先报道芫花的醇提取物能激活 TRPV1,且呈量效相关性,在细胞和分子层面上对芫花的药效有了进一步的了解。

#### [参考文献]

- [1] 张英福,邱小青,田治锋,等. 芫花对豚鼠膀胱逼尿肌收缩活动的影响[J]. 中药药理与临床,1999,15(5): 36-38.
- [2] 郑维发,王莉,石枫. 芫花根乙醇提取物的抗炎活性(英文)[J]. 中草药,2004,35(11):66-73.
- [3] 莫建初,刘志茹,王海,等. 芫花杀虫活性成分的结构鉴定[J]. 中南林业科技大学学报,2001,21(4):5-10.
- [4] 李玲芝,宋少江,高品一. 芫花的化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(9): 587-592.
- [5] 李振岚,张桥,楼坚伟,等. 十枣汤研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(17):221-226.
- [6] Caterina M J, Schumacher M A, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. Nature, 1997, 389(6653): 816-824.
- [7] 刘珍洪,高琳,汪文来,等. 羌活提取物对热敏通道 TRPV1 的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2017, 23(4):553-557.
- [8] Salat K, Furgala A, Salat R. Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain [J]. Inflammopharmacology, 2018, 26(2): 361-374.
- [9] Borghi S M, Carvalho T T, Staurengo-Ferrari L, et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines[J]. J Nat Prod, 2013, 76(6): 1141-1149.
- [10] 郑维发,石枫,王莉. 芫花根乙醇提取物的镇痛活性[J]. 中草药,2006,37(3):398-402.
- [11] 马锐,吴胜本. 中药黄酮类化合物药理作用及作用机制研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(5): 286-290.
- [12] 陈茂剑,蒋玮,覃庆洪,等. 辣椒碱抗肿瘤作用分子机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019, 25(7):100-108.
- [13] 隋峰,霍海如,姜廷良,等. 痛觉感受相关的 TRP 离子通道蛋白研究进展[J]. 中国疼痛医学杂志,2009, 15(1):50-53.

- [14] 隋峰,霍海如,姜廷良,等. TRPV1 通道蛋白介导的生理病理机制[J]. 医学分子生物学杂志,2008,5(1):55-58,64.
- [15] 尹业辉,李思婷,王少军,等. 针刺可调控酵母聚糖诱导的高敏感模型结肠部位 TRPV1 与 NGF 的表达[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(7):1529-1533.
- [16] 项璇儿,杜俊英,房军帆,等. 不同病理痛早期电针镇痛频率优选及其脊髓背角 TRPV1 活化机制研究[J]. 中华中医药杂志,2018,33(5):1707-1712.
- [17] 李春静,张晓宁,马玉侠. 脐疗对寒凝血瘀型痛经大鼠子宫 TRPV 受体表达的影响[J]. 中华中医药杂志,2018,33(3):1085-1088.
- [18] 李娟娟,王凤云,吕林,等. 国医大师治疗胃脘痛的处方用药规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019, doi:10.13422/j.cnki.syfjx.20191455.
- [19] 熊科元,胡志文,邵峰,等. 不同采收期龙脑樟挥发油的得率及质量分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(20):45-49.
- [20] 肖潺潺,陈茂剑,梅凡彪,等. 辣椒碱对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭的影响及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):124-129.
- [21] 邵泽艳,商倩,赵娜夏,等. 芫花中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物及其肿瘤细胞毒活性[J]. 中草药,2013,44(2):128-132.
- [22] 和蕾,史琪荣,柳润辉,等. 芫花条中抗炎活性成分 [J]. 第二军医大学学报,2008,29(10):1221-1226.
- [23] ZHU Y, WANG D H. Segmental regulation of sodium and water excretion by TRPV1 activation in the kidney [J]. J Cardiovasc Pharmacol,2008,51(5):437-442.
- [24] Fischer M J, Btsh J, Mcnaughton P A. Disrupting sensitization of transient receptor potential vanilloid subtype 1 inhibits inflammatory hyperalgesia [J]. J Neurosci,2013,33(17):7407-7414.
- [25] Walder R Y, Radhakrishnan R, Loo L, et al. TRPV1 is important for mechanical and heat sensitivity in uninjured animals and development of heat hypersensitivity after muscle inflammation [J]. Pain, 2012,153(8):1664-1672.
- [26] 秦培忠. 在小鼠背根神经节中与 TRPV1 通道互作蛋白的筛选及 PI3K-p85 $\beta$  对 TRPV1 通道功能调节的研究[D]. 武汉:华中科技大学,2015.
- [27] Cesare P, Mcnaughton P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(26):15435-15439.
- [28] ZHANG X, LI L, Mcnaughton P A. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150 [J]. Neuron,2008,59(3):450-461.

[责任编辑 周冰冰]