

· 药理 ·

## 瘀血痹片通过抑制外周炎症缓解慢性炎性痛小鼠 痛觉过敏及足肿胀

李佳豪<sup>1,2</sup>, 田聪敏<sup>2</sup>, 池宏宇<sup>2</sup>, 张国鑫<sup>2</sup>, 杨俊<sup>2</sup>, 朱春燕<sup>2\*</sup>, 林娜<sup>1,2\*</sup>

(1. 福建中医药大学药学院, 福州 350108; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:观察瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠痛觉过敏及足肿胀的影响,并探索初步作用机制。方法:使用完全弗氏佐剂(CFA)左侧足底注射建立小鼠慢性炎性痛模型,并分为模型组、阳性药布洛芬组(91 mg·kg<sup>-1</sup>)和瘀血痹片低、中、高剂量组(55, 110, 220 mg·kg<sup>-1</sup>),同时以假手术组作对照。造模后每日剂量等分为早晚2次灌胃给药瘀血痹片或布洛芬,共给药19 d。给药后第18天热板法检测小鼠热痛阈值,第19天标准 Von Frey 纤维针检测小鼠机械痛阈值,并对足肿胀度进行评分和拍照。液相悬浮芯片技术对炎症因子及受体等36种经典广谱炎症相关因子进行定量分析,生物信息学筛选核心靶点,进行酶联免疫吸附测定(ELISA)检测。结果:与假手术组比较,模型组小鼠机械痛阈值、足肿胀评分显著升高( $P<0.01$ ),热痛敏潜伏时间显著降低( $P<0.01$ ),足部30种炎症因子的表达明显增加( $P<0.05$ );与模型组比较,瘀血痹片高剂量组可显著降低慢性炎性痛小鼠的机械痛阈值、足肿胀评分( $P<0.01$ ),热痛敏潜伏时间明显升高( $P<0.05$ ),足部30种炎症因子的表达明显降低( $P<0.05$ ),其中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-17A(IL-17A),CC趋化因子配体2(CCL2)为筛选出的核心靶点,TNF- $\alpha$ , IL-17A, CCL2的表达显著降低( $P<0.01$ )。结论:瘀血痹片具有缓解慢性炎性痛小鼠的痛觉过敏和足肿胀的作用,其机制可能与抑制外周TNF- $\alpha$ , IL-17A和CCL2等炎症因子的表达有关。

**[关键词]** 瘀血痹片; 慢性炎性痛; 抗炎; 痛觉过敏; 肿胀; 促炎因子

**[中图分类号]** R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)10-0031-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20210806

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210318.1143.003.html>

**[网络出版日期]** 2021-3-18 15:04

### Experimental Study of Yuxuebi Tablets by Inhibiting Peripheral Inflammation to Relieve Hyperalgesia and Foot Swelling in Mice with Chronic Inflammatory Pain

LI Jia-hao<sup>1,2</sup>, TIAN Cong-min<sup>2</sup>, CHI Hong-yu<sup>2</sup>, ZHANG Guo-xin<sup>2</sup>, YANG Jun<sup>2</sup>,  
ZHU Chun-yan<sup>2\*</sup>, LIN Na<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,  
Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Yuxuebi tablets on hyperalgesia and foot swelling in mice with chronic inflammatory pain, and to explore the preliminary mechanism of action. **Method:** A mouse model of chronic inflammatory pain was established with left plantar injection of complete Freund's adjuvant (CFA). The mice were divided into model group, positive drug ibuprofen group (91 mg·kg<sup>-1</sup>), Yuxuebi tablets low, medium and high dose groups (55, 110, 220 mg·kg<sup>-1</sup>), with the sham operation group as the control. After

**[收稿日期]** 20210207(005)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2019ZX09731002);中国中医科学院中药研究所技术研发项目(20190316,20200326)

**[第一作者]** 李佳豪,在读硕士,从事中药药理学研究,E-mail:lijiahao3695@163.com

**[通信作者]** \*朱春燕,博士,从事中药药理学研究,E-mail:xijiangyue3013@163.com;

\*林娜,博士,研究员,从事中药药理学研究,E-mail:linna888@163.com

successful modeling, the daily dose was divided into two doses in the morning and evening by gavage to give Yuxuebi tablets or ibuprofen to the stomach for a total of 19 days. On the 18<sup>th</sup> day after the administration, the thermal pain threshold was detected by the hot plate method. On the 19<sup>th</sup> day, the standard Von Frey fiber needle was used to detect the mechanical pain threshold of the mice, and the degree of foot swelling was scored and photographed. The liquid-phase suspension chip technology was used to quantitatively analyze 36 classic broad-spectrum inflammation-related factors like inflammatory factors and receptors. Bioinformatics were used to screen core targets and perform enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) detection. **Result:** Compared with the sham operation group, the mechanical pain threshold and foot swelling score of the model group significantly increased ( $P < 0.01$ ), the latent time of heat sensitivity significantly decreased ( $P < 0.01$ ), the expressions of 30 inflammatory factors in the foot increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the high dose of Yuxuebi tablets significantly reduced the mechanical pain threshold and foot swelling score of mice with chronic inflammatory pain ( $P < 0.01$ ), significantly increased the latent time of heat sensitivity ( $P < 0.05$ ), and reduced the expressions of 30 inflammatory factors in the foot ( $P < 0.05$ ), among which tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), interleukin-17A (IL-17A), and C-C chemokine ligand 2 (CCL2) were the core targets screened out, and the expressions of TNF- $\alpha$ , IL-17A, and CCL2 significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Yuxuebi tablets can relieve hyperalgesia and foot swelling in mice with chronic inflammatory pain, and its mechanism may be related to the inhibition of the expressions of peripheral inflammatory factors such as TNF- $\alpha$ , IL-17A, and CCL2.

**[Key words]** Yuxuebi tablets; chronic inflammatory pain; anti-inflammatory; hyperalgesia; swelling; inflammatory factors

持续的炎症可以在局部引起红、肿、热、痛,久而久之形成慢性炎性痛,严重影响患者的生活质量。慢性炎性痛是临床常见的疾病,皮肤、关节和肠道为最易发病的部位<sup>[1]</sup>,其病因复杂,病机为多种促炎因子在炎症部位合成并释放,导致组织损伤而使外周痛觉神经过敏<sup>[2]</sup>。现有药物治疗效果一般,难以同时兼顾止痛、化瘀和消肿等症状,治疗难度较大,而传统中药复方有着多靶点、不良反应少等独特优势,为慢性炎性痛的治疗提供了新的选择。瘀血痹片包括乳香(炙),威灵仙,红花,丹参,没药(炙),川牛膝,川芎,当归,姜黄,香附(炙),黄芪(炙)11味中药,具有活血化瘀,通络定痛的功效。临床报道瘀血痹片在风湿病、类风湿关节炎、下肢动脉硬化闭塞症等疾病中具有抗炎和镇痛疗效,且联用甲氨蝶呤后能降低类风湿关节炎患者血清白细胞介素-1(IL-1),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平,提高总有效率<sup>[3-4]</sup>。近期的动物实验研究也显示瘀血痹片对二甲苯耳肿胀模型小鼠和冰醋酸致腹腔毛细血管通透性增加小鼠有较好的抗炎和镇痛作用<sup>[5]</sup>,但由于缺乏进一步的深入研究,作用机制至今尚不明确。

为探究瘀血痹片对慢性炎性痛的药效和药理机制,本实验采用左侧足底皮下注射完全弗氏佐剂

(CFA)的方法来建立慢性炎性痛小鼠模型,以临床首选药物布洛芬为阳性药<sup>[6]</sup>,观察瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠的镇痛、消肿药效及作用特点,同时通过Luminex液相悬浮芯片技术检测足部36种炎症因子,构建相关炎症因子的网络关系图谱,并筛选出核心靶点,为后续进一步的药理机制研究提供基础,也有利于指导临床合理用药。

## 1 材料

**1.1 动物** 8周龄雄性SPF级ICR小鼠,体质量(30±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。饲养于中国中医科学院中药研究所动物房,维持(25±2)℃恒温,自由进食饮水。本研究获得中国中医科学院中药研究所实验动物伦理委员会批准,伦理审批号2020B042。

**1.2 药物与试剂** 瘀血痹片(辽宁华润本溪三药有限公司,批号20190321);布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号344M);CFA(美国Chondex公司,批号7001);羧甲基纤维素钠(北京博奥拓达科技有限公司,批号C2019);Luminex试剂盒(美国Bio-Rad公司,批号L135538);TNF- $\alpha$ ,白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-17A(IL-17A),CC趋化因子配体2(CCL2)酶联免疫吸附测定法

(ELISA)试剂盒(北京成志科为生物科技有限公司,批号均为20210112)。

**1.3 仪器** Aesthesio型 Von Frey 纤维细丝机械刺激针套件(美国 Danmic Aesthesio 公司);BIO-CHPER型冷热板测痛仪(美国 Bioseb 公司);透明有机玻璃盒(美国 IITC 公司);X-200型 Luminex 液相芯片仪、磁力板(美国 Luminex 公司);5424R型离心机(德国 Eppendorf 公司);WD-9405B型摇床(北京市六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备** 根据文献的方法建立小鼠慢性炎性痛模型<sup>[7]</sup>,固定小鼠左后足脚掌部位,皮下注射 CFA 溶液 0.02 mL/只,假手术组注射等体积生理盐水。造模 12 h 后,观察小鼠左后足,若出现红肿说明造模成功,剔除失败个体。

**2.2 分组及给药** 将造模成功的 75 只小鼠按随机数字表法分为模型组,布洛芬组(91 mg·kg<sup>-1</sup>,临床 1 倍等效剂量),瘀血痹低、中、高剂量组(55, 110, 220 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 15 只,另设假手术组 15 只,共 90 只。使用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶解药物,布洛芬、瘀血痹片低、中、高剂量的药物质量浓度为 9.1, 5.5, 11, 22 g·L<sup>-1</sup>,按小鼠体质量以 0.01 mL·g<sup>-1</sup>的体积灌胃,假手术组、模型组小鼠灌胃等体积 CMC-Na。造模后第 1 天,所有药物每日剂量等分为 2 份,早晚 2 次灌胃,连续给药 19 d。

**2.3 Up-down 法检测小鼠机械痛** 根据文献的方法<sup>[8]</sup>,造模后第 19 天的给药后 1 h 检测小鼠机械痛。小鼠在有机玻璃盒适应 1 h 后,使用 Von Frey 纤维针持续刺激小鼠左后足脚掌部位 3 s,累计 6 次,每次间隔 5 min,Up-down 法记录并计算小鼠机械缩足痛阈值。为避免行为学实验重复检测之间干扰,每组 15 只小鼠,8 只进行机械痛检测,其余 7 只进行热痛敏检测。

**2.4 热板法检测热痛敏** 造模后第 18 天的给药后 1 h 检测热痛敏。将小鼠放置于 55 °C 恒温的冷热板测痛仪上,放入瞬间开始计时,直至小鼠出现持续舔左后足或快速拍打动作为止,记录潜伏时间(s)。

**2.5 足肿胀度评分** 依照临床关节评分系统<sup>[9-10]</sup>,稍作修改,取材前对小鼠左后足红肿症状进行评分并拍照。评分依据为足部红肿的程度和范围、肿大、变形情况,0 分,无红斑、肿胀;1~4 分,脚掌单一部位的轻微红斑、肿胀;5~8 分,足部轻微的红斑、肿胀,蔓延至脚踝和脚趾;9~12 分,足部蔓延至脚踝和脚趾的严重红斑、肿胀;13~16 分,足部蔓延至脚踝

和脚趾的严重红斑、肿胀,出现裂口,结痂。

**2.6 Luminex 液相悬浮芯片检测足部炎症因子** 小鼠左后足足底皮肤取材后两倍稀释,根据 Luminex 试剂盒说明书准备标准品, Beads, 抗体复合物, PE-链霉素亲和素、清洗液,每孔加入 Beads, 标准品和样品摇床孵育 2 h,磁力架吸附 Beads;清洗后加入抗体复合物摇床孵育 1 h,磁力架吸附 Beads;清洗后加入 PE-链霉素亲和素摇床孵育 0.5 h,磁力架吸附 Beads;清洗 3 次后清洗液重悬 Beads,摇床孵育 2 min 后使用 Luminex 上机检测。

**2.7 生物信息学筛选瘀血痹片作用的核心靶点** 将有显著改变的炎症因子导入 STRING 网站<sup>[11]</sup>,进行蛋白互作分析,互作标准设定为 Medium Confidence (0.4);将导出的蛋白互作关系导入 Cytoscape 软件<sup>[12]</sup>,进行拓扑分析;根据拓扑分析结果中的自由度 (degree), 中介度 (betweenness centrality) 参数绘制网络图。图中连线代表蛋白间存在互作关系,每一个蛋白靶点所在圈的宽径大小与自由度呈正相关,高度与中介度呈正相关。

**2.8 ELISA 验证核心靶点** 取小鼠左后足足底皮肤,研磨组织提取蛋白,Bradford 法蛋白定量,根据生物信息学筛选结果和 ELISA 试剂盒说明书的方法检测 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A 和 CCL2。

**2.9 统计学方法** 采用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计学分析,所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对慢性炎性痛小鼠机械痛的影响** 在给药 19 d 后,与假手术组比较,模型组小鼠机械痛阈值显著降低 ( $P < 0.01$ ),提示慢性炎性痛模型建立成功;与模型组比较,布洛芬组小鼠机械痛阈值明显升高 ( $P < 0.05$ ),瘀血痹低剂量组小鼠的机械痛阈值无显著变化,瘀血痹中、高剂量组小鼠机械痛阈值明显升高 ( $P < 0.01$ )。对小鼠机械痛阈值和瘀血痹片的剂量进行线性回归分析,发现瘀血痹片缓解慢性炎性痛小鼠机械痛的作用呈剂量依赖性 ( $P < 0.01$ ,  $R^2 = 0.7159$ )。见表 1。

**3.2 对慢性炎性痛小鼠热痛敏的影响** 与假手术组比较,模型组小鼠在第 18 天热痛敏实验的潜伏时间显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,布洛芬组、瘀血痹中、高剂量组小鼠的潜伏时间明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),瘀血痹低剂量组小鼠的潜伏时间无显著差异。对小鼠热痛敏实验的潜伏时间和瘀血

表 1 瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠机械痛阈值的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 1 Effect of Yuxuebi tablets on mechanical pain threshold of mice with chronic inflammatory pain ( $\bar{x}\pm s, n=8$ ) g

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	第 19 天机械痛阈值/g
假手术		0.160±0.031
模型		0.019±0.001 <sup>2)</sup>
布洛芬	91	0.065±0.012 <sup>3)</sup>
瘀血痹片	50	0.032±0.004
	110	0.102±0.014 <sup>4)</sup>
	220	0.141±0.006 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P<0.05$ ,<sup>4)</sup> $P<0.01$ (表 2~4 同)。

痹片的剂量进行线性回归分析,发现瘀血痹片缓解慢性炎性痛小鼠的热痛敏的作用呈剂量依赖性( $P<0.01, R^2=0.394$  1)。见表 2。

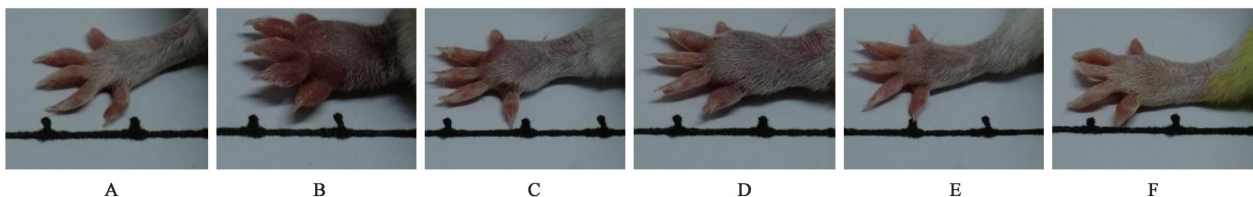
3.3 对慢性炎性痛小鼠足肿胀的影响 与假手术组比较,模型组小鼠的第 19 天足肿胀度评分显著升

表 2 瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠热痛敏的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

Table 2 Effect of Yuxuebi tablets on thermal hyperalgesia of mice with chronic inflammatory pain ( $\bar{x}\pm s, n=7$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	潜伏时间/s
假手术		48.57±5.41
模型		7.86±2.21 <sup>2)</sup>
布洛芬	91	31.86±5.27 <sup>4)</sup>
瘀血痹片	50	15.14±2.06
	110	26.86±3.89 <sup>3)</sup>
	220	26.43±3.82 <sup>3)</sup>

高( $P<0.01$ );与模型组比较,布洛芬组、瘀血痹中、高剂量组小鼠的足肿胀度评分显著降低( $P<0.01$ ),瘀血痹低剂量组小鼠的足肿胀度差异无统计学意义。对小鼠足肿胀度评分和瘀血痹片的剂量进行线性回归分析,发现瘀血痹片缓解慢性炎性痛小鼠的足肿胀的作用呈剂量依赖性( $P<0.01, R^2=0.363$  4)。见图 1,表 3。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 布洛芬组; D. 瘀血痹低剂量组; E. 瘀血痹中剂量组; F. 瘀血痹高剂量组

图 1 瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠足肿胀的影响

Fig. 1 Effect of Yuxuebi tablets on foot swelling in mice with chronic inflammation pain

表 3 瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠足肿胀的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 3 Effect of Yuxuebi tablets on foot swelling in mice with chronic inflammation pain ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	足肿胀评分/分
假手术		0
模型		14.71±0.52 <sup>2)</sup>
布洛芬	91	7.29±0.71 <sup>4)</sup>
瘀血痹片	50	9.14±1.43
	110	6.43±1.29 <sup>4)</sup>
	220	5.86±1.34 <sup>4)</sup>

3.4 对慢性炎性痛小鼠足部炎症因子的影响

Luminex 液相悬浮芯片技术对慢性炎性痛小鼠足部的 36 种经典广谱炎症相关因子进行定量分析,结果显示,其中 30 个炎症相关因子具有明显差异,包括 TNF- $\alpha$ , 肿瘤坏死因子受体 1(TNF-R1), 肿瘤坏死因子受体 2(TNF-R2), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-16, IL-17A, IL-33, CXC 趋化因子配体 1(CXCL1), CXC 趋化因子配体 2(CXCL2), CCL2,

CCL3, CCL4, CCL5, CCL12, CCL20, CCL22, 金属蛋白酶-12(MMP-12), 金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP1), 血管生成素-2(ANGPT2), 血管内皮生长因子(VEGF), 成纤维细胞生长因子-21(FGF21), 碱性成纤维细胞生长因子(FGF2), 粒细胞集落刺激因子(CSF3), 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF), 补体 C1q 受体(CD93),  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )。与假手术组比较,模型组 30 个炎症因子的表达明显升高( $P<0.05$ );与模型组比较,瘀血痹高剂量组 30 个炎症因子的表达明显降低( $P<0.05$ )。见图 2。

3.5 瘀血痹片干预慢性炎性痛小鼠足部炎症因子的核心靶点筛选 蛋白互作分析结果显示,共有 24 个炎症因子之间有互作关系;进一步拓扑分析结果显示,有自由度、中介度进行排序后, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, CCL2 和 IL-1 $\beta$  是排名靠前的核心炎症因子。根据现有文献报道,进一步选择其中的 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A 和 CCL2 进行 ELISA 实验验证。见图 3。

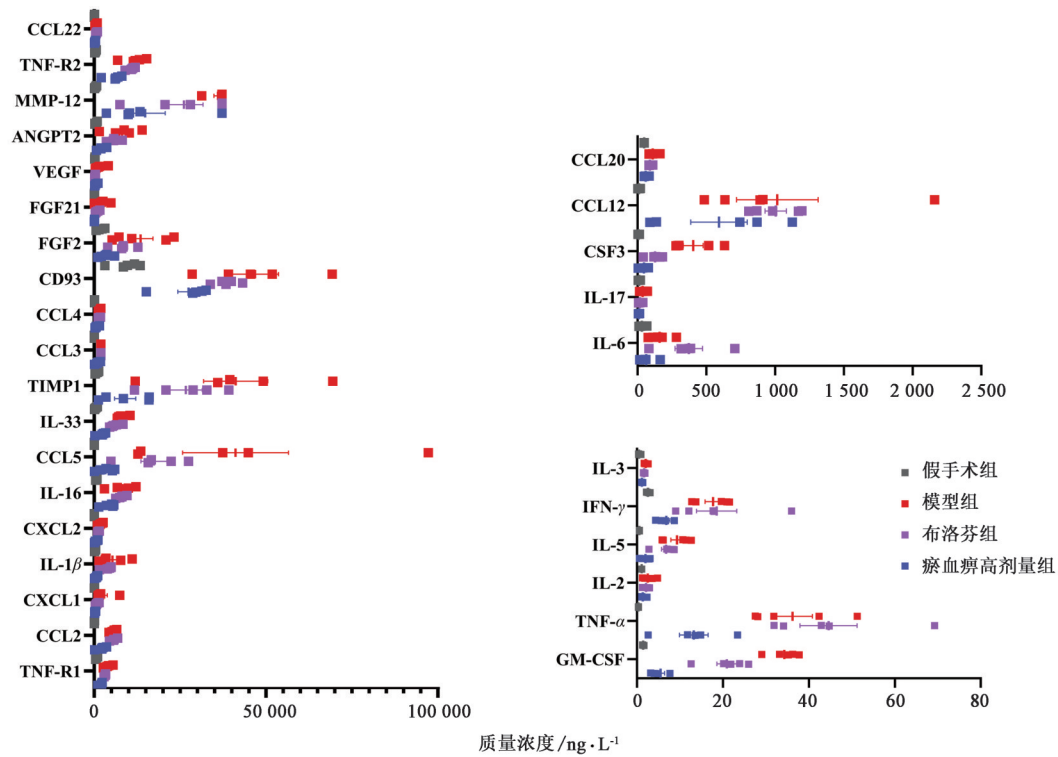


图2 瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠足部炎症因子的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 2 Effect of Yuxuebi tablets on foot inflammatory factors in mice with chronic inflammation pain ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

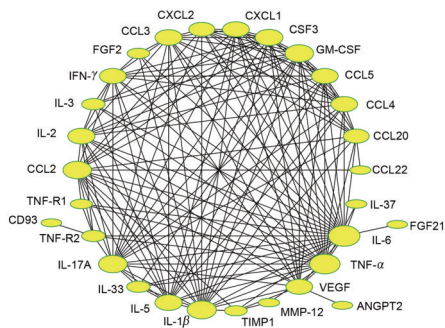


图3 瘀血痹片干预慢性炎性痛小鼠足部炎症因子的网络关系谱  
Fig. 3 Network diagram of inflammatory factors in feet of mice with chronic inflammatory pain by Yuxuebi tablets

3.6 对慢性炎性痛小鼠足部 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, CCL2 含量的影响 与假手术组比较,模型组小鼠足部 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, CCL2 含量显著升高 ( $P <$

0.01);与模型组比较,布洛芬组小鼠足部 IL-17A 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ),瘀血痹中剂量组小鼠足部 IL-17A, CCL2 含量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),瘀血痹高剂量组小鼠足部 TNF- $\alpha$ , IL-17A, CCL2 含量显著降低 ( $P < 0.01$ ),瘀血痹低剂量组均无显著变化。见表4。

#### 4 讨论

慢性炎性痛由多种炎症因子在局部累积形成,现有治疗药物多为单靶向设计<sup>[13]</sup>,短期内可以迅速取得疗效,但当药效达到平台期后,难以继续累加至病症完全缓解,成为目前临床治疗慢性炎性痛的主要瓶颈。CFA 模型是慢性炎性痛的经典动物模型,可以在局部引发长期的炎症反应,形成严重的红肿与瘀血,故常应用于抗炎镇痛消肿药物的研

表4 瘀血痹片对慢性炎性痛小鼠足部 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, CCL2 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-17A	CCL2
假手术		8.4 $\pm$ 3.3	17.2 $\pm$ 3.5	57.0 $\pm$ 12.8	16.3 $\pm$ 9.4
模型		1 479.0 $\pm$ 298.6 <sup>2)</sup>	211.9 $\pm$ 38.7 <sup>2)</sup>	265.3 $\pm$ 41.9 <sup>2)</sup>	13 257.0 $\pm$ 2 272.0 <sup>2)</sup>
布洛芬	91	1 203.0 $\pm$ 262.8	147.7 $\pm$ 28.6	83.0 $\pm$ 14.6 <sup>4)</sup>	9 991.0 $\pm$ 598.7
瘀血痹片	50	1 119.0 $\pm$ 228.6	190.2 $\pm$ 10.5	230.3 $\pm$ 9.0	9 930.0 $\pm$ 1 038.0
	110	880.7 $\pm$ 141.4	209.5 $\pm$ 30.9	145.1 $\pm$ 13.0 <sup>4)</sup>	7 926.0 $\pm$ 551.4 <sup>3)</sup>
	220	369.1 $\pm$ 51.9 <sup>4)</sup>	136.5 $\pm$ 14.2	102.1 $\pm$ 6.9 <sup>4)</sup>	6 017.0 $\pm$ 411.4 <sup>4)</sup>

究<sup>[14]</sup>。为了探索瘀血痹对于慢性炎性痛的作用以及作用特点,本研究构建了经典的CFA小鼠模型,并选择以非甾体抗炎药布洛芬为阳性药,重点比较了2种药物对慢性炎性痛小鼠痛觉过敏和足肿胀的干预效果。前期对瘀血痹的给药剂量进行研究发现,当剂量降低到类风湿关节炎临床治疗等效剂量的1/5(220 mg·kg<sup>-1</sup>)时,对慢性炎性痛依然能够表现出显著的止痛和消肿疗效,因此在本实验中选择55, 110, 220 mg·kg<sup>-1</sup>作为低、中、高剂量。结果显示,给药19 d后,瘀血痹片能够剂量依赖性地缓解慢性炎性痛小鼠的机械痛敏、热痛敏和足肿胀。比较之下,给药19 d后临床等倍剂量(91 mg·kg<sup>-1</sup>)的布洛芬仅热痛敏缩足潜伏期高于瘀血痹各剂量组,机械痛缩足阈值和足肿胀评分均低于瘀血痹中、高剂量组。联系到课题组前期研究发现<sup>[14]</sup>的布洛芬具有前期镇痛和消肿作用显著且起效迅速,但在长期给药的中后期药效增长缓慢的特点,推测瘀血痹片所具有的良好镇痛消肿作用,可能与其在长期用药过程中可以持续累加药效有关。值得注意的是,瘀血痹发挥这一作用的最高剂量只是0.2倍临床等效剂量,据此可以反映出瘀血痹片在缓解慢性炎性疼痛方面的高效和安全优势。

炎症因子的复杂多样是慢性炎性痛治疗失败的主要原因<sup>[15-16]</sup>。为了进一步探索瘀血痹抗炎作用的相关机制,本研究使用Luminex液相悬浮芯片技术系统地检测了慢性炎性痛小鼠足部36种炎症因子的表达情况。结果显示,瘀血痹片对于慢性炎性痛小鼠足部30种炎症因子的表达均有明显的抑制作用,初步提示了瘀血痹片可以通过多靶点缓解CFA模型小鼠的炎症。进一步,通过蛋白互作及网络关系图谱分析,筛选并发现TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A和CCL2是候选的关键炎症因子。已知TNF- $\alpha$ 是炎症反应过程中最早出现也是最重要的促炎细胞因子,能够促使白细胞聚集于炎症部位,增加炎症部位血管内皮细胞的通透性从而引发水肿,并间接引起发热<sup>[17-18]</sup>,还能够刺激单核巨噬细胞等分泌细胞因子,包括IL-1, IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$ 等。而IL-6, IL-17A都是早期炎症反应的启动因子,通过释放前炎性细胞因子来激活各类免疫细胞如B细胞和T细胞,持续不断地放大炎症反应<sup>[19]</sup>。CCL2等趋化因子能够在炎症反应发生后引导细胞定向迁移,调动免疫细胞聚集于炎症部位释放炎症因子,引发炎症风暴,并形成恶性循环<sup>[20]</sup>。故此,笔者又采用ELISA对上述细胞因子进行验证研究,结果显示,

瘀血痹片可以明显降低TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A和CCL2在CFA模型小鼠足部的表达,高剂量组对TNF- $\alpha$ , IL-6和CCL2的抑制效果均优于布洛芬组,尤其对于TNF- $\alpha$ 的抑制效果十分显著,提示了瘀血痹片具有良好的抗炎作用,且这一作用可能是其缓解慢性炎性痛的关键。

瘀血痹片临床常用于治疗瘀血阻络所致的痹证。先前研究已知瘀血痹具有一定的抗炎、止痛、扩张血管和改善微循环等作用,本实验首次通过慢性炎性痛模型小鼠,证明了瘀血痹片对慢性炎性小鼠痛觉过敏和足肿胀明显的缓解作用,以及相较于非甾体抗炎药的剂量和药效等方面的优势。进一步通过广谱炎症因子的筛查,发现瘀血痹片改善慢性炎性痛的机制可能与抑制外周TNF- $\alpha$ , IL-17A和CCL2等炎症因子的表达有关,这将为后续分子机制的深入研究提供实验基础和候选靶标,也有利于瘀血痹片功效科学内涵的揭示和完善。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] MULEY M M, KRUSTEV E, MCDUGALL J J. Preclinical assessment of inflammatory pain[J]. CNS Neurosci Ther, 2016, 22(2): 88-101.
- [2] JI R R, NACKLEY A, HUH Y, et al. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain [J]. Anesthesiology, 2018, 129(2): 343-366.
- [3] 董君君, 胡家才, 杨娜. 瘀血痹片治疗下肢动脉硬化闭塞症临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(13): 1381-1384, 1388.
- [4] 方志远, 李华, 柏立群, 等. 瘀血痹片联合甲氨蝶呤治疗对类风湿性关节炎患者Lysholm、VAS和ADL评分及血清IL-1、TNF- $\alpha$ 、ICMAM-1水平影响[J]. 中国药师, 2019, 22(11): 2062-2065.
- [5] 李汝卓, 潘韬文, 李斌, 等. 瘀血痹片抗炎镇痛药效作用研究[J]. 吉林医药学院学报, 2020, 41(4): 268-270.
- [6] BARBAGALLO M, SACERDOTE P. Ibuprofen in the treatment of children's inflammatory pain: a clinical and pharmacological overview [J]. Minerva Pediatr, 2019, 71(1): 82-99.
- [7] 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.

- [ 8 ] 吴红艳,师钰琪,李佳豪,等. 雷公藤红素对神经病理性疼痛模型小鼠的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(13):97-103.
- [ 9 ] NZOU G, WICKS R T, VANOSTRAND N R, et al. Multicellular 3D neurovascular unit model for assessing hypoxia and neuroinflammation induced blood-brain barrier dysfunction[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1):9766.
- [10] 马帅,佟继铭,梅爱敏,等. 赤菴根总皂苷对CIA模型大鼠的治疗作用及对CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T细胞表达的影响[J]. *中药药理与临床*,2017,33(4):70-74.
- [11] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1):D607-D613.
- [12] LI Z, XU D, JING J, et al. Network pharmacology-based study to explore the mechanism of the Yiqi Gubiao pill in lung cancer treatment [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(4):321.
- [13] GREIG S L, GARNOCK-JONES K P. Loxoprofen: a review in pain and inflammation [J]. *Clin Drug Investig*, 2016, 36(9):771-781.
- [14] 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.
- [15] SERHAN C N, DALLI J, COLAS R A, et al. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(4):397-413.
- [16] NEES T A, ROSSHIRT N, REINER T, et al. Inflammation and osteoarthritis-related pain [J]. *Schmerz*, 2019, 33(1):4-12.
- [17] ZELOVA H, HOSEK J. TNF-alpha signalling and inflammation; interactions between old acquaintances [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(7):641-651.
- [18] AMARAL F A, BASTOS L F, OLIVEIRA T H, et al. Transmembrane TNF-alpha is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout[J]. *Eur J Immunol*, 2016, 46(1):204-211.
- [19] JORDAN S C, CHOI J, KIM I, et al. Interleukin-6, a cytokine critical to mediation of inflammation, autoimmunity and allograft rejection: therapeutic implications of IL-6 receptor blockade [J]. *Transplantation*, 2017, 101(1):32-44.
- [20] SCANZELLO C R. Chemokines and inflammation in osteoarthritis: Insights from patients and animal models [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(4):735-739.
- [责任编辑 周冰冰]