

止痛、促进骨折愈合的功效，这可能为消定膏促进骨折愈合的机制。

参考文献:

[1] 任可, 张春才, 赵建宁, 等. 持续动态压应力对实验性骨折愈合的影响及相关信号转导通路研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2010, 18(4): 327-332.

[2] 董万涛, 宋敏, 吕泽斌, 等. 消定膏对 Colles 骨折早期疼痛、肿胀的疗效观察[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 204-206.

[3] 董万涛, 宋敏, 刘保健, 等. 消定膏治疗桡骨远端骨折的临床研究[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2378-2382.

[4] 袁兵, 卞俊, 任锐, 等. 家兔胫骨骨折模型的建立[J]. 海军医学杂志, 2012, 33(4): 222-223.

[5] 高小恒, 陈达艳, 薛进. 无名异本草考证[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(8): 555.

[6] 柴林巧, 孙燕萍, 王科钦, 等. 无名异药理学研究概况[J].

辽宁中医药大学学报, 2012, 14(6): 59-61.

[7] 井玥, 赵余庆, 倪春雷. 儿茶的化学、药理与临床研究[J]. 中草药, 2005, 36(5): 790-792.

[8] 张娟娟, 张勇, 康文艺. 紫荆属植物化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(20): 1782-1784.

[9] 祝婷婷, 刘晓, 汪小莉, 等. 大黄不同方法炮制后药理作用及化学成分变化研究进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(8): 883-887.

[10] Cherian P P, Cheng B, Gu S, et al. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP<sub>2</sub> receptor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(44): 43146-43156.

[11] 张陈彦, 郭影. 环氧合酶-2 在骨代谢中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(5): 719-721.

[12] 陈秉雄, 宋敏, 陈秉虎, 等. 环氧合酶-2/前列腺素 E<sub>2</sub> 信号转导通路对骨折愈合的影响及相关药物研究进展[J]. 医药导报, 2014, 33(9): 1197-1201.

## 飞龙掌血醇提物的抗炎镇痛作用

陆怡<sup>1</sup>, 朱元章<sup>2</sup>, 郭晨旭<sup>2</sup>, 韩聪<sup>2</sup>, 钱雅新<sup>3</sup>, 朱国福<sup>2\*</sup>, 潘颖宜<sup>2\*</sup>

(1. 上海市浦东医院, 上海 201399; 2. 上海中医药大学, 上海 201203; 3. 上海市普陀区中心医院, 上海 200333)

**摘要:** 目的 研究飞龙掌血醇提物的抗炎镇痛作用及其机制。方法 大鼠用角叉菜胶致炎及福尔马林致痛, 研究飞龙掌血醇提物的镇痛作用; ELISA 试剂盒检测角叉菜胶实验大鼠血清中  $\beta$  内啡肽 ( $\beta$ -EP)、前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、5-羟色胺 (5-HT) 的含有量, 炎症大鼠皮肤组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 的含有量, 以及福尔马林实验小鼠血清中白三烯 B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 的含有量; 免疫组化法观察大鼠脊髓 FOS 及 P 物质 (SP) 蛋白表达。**结果** 飞龙掌血醇提物能明显降低足趾肿胀率; 福尔马林实验中, 飞龙掌血醇提物能明显减少舔足累积时间, 降低 PGE<sub>2</sub> 的含有量, 高剂量组尤为明显; 3 个剂量组均能降低血清中 5-HT 的含有量, 高剂量和低剂量效果显著, 高剂量组还能升高血清中  $\beta$ -EP 的含有量。各剂量组均能降低皮肤组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含有量, 中、高剂量组抑制 FOS 蛋白表达; 高剂量组明显降低血清中 LTB<sub>4</sub> 的含有量。**结论** 飞龙掌血醇提物具有抗炎镇痛作用, 其作用机制可能是与通过增加血清中  $\beta$ -EP, 降低 PGE<sub>2</sub>、5-HT、LTB<sub>4</sub> 含有量, 降低皮肤组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含有量, 以及下调脊髓 SP 及 FOS 蛋白表达有关。

**关键词:** 飞龙掌血醇提物; 抗炎镇痛; 作用机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)01-0026-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.005

收稿日期: 2017-08-01

基金项目: 上海市博士点基金 (K120309)

作者简介: 陆怡 (1990—), 女, 硕士, 初级中药师, 从事中药及复方的药理学研究工作。Tel: 18918355795, E-mail: liulixiang@163.com

\* 通信作者: 朱国福 (1965—), 男, 教授, 博士生导师, 从事抗肿瘤中药研究。E-mail: gzf@163.com

潘颖宜 (1961—), 女, 副教授, 硕士生导师, 从事中药及复方的药理学研究工作。E-mail: pyyl6@126.com

## Anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of *Toddalia asiatica*

LU Yi<sup>1</sup>, ZHU Yuan-zhang<sup>2</sup>, GUO Chen-xu<sup>2</sup>, HAN Cong<sup>2</sup>, QIAN Ya-xin<sup>3</sup>, ZHU Guo-fu<sup>2\*</sup>, PAN Ying-yi<sup>2\*</sup>

(1. Shanghai Pudong Hospital, Shanghai 201399, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Putuo Central Hospital, Shanghai 200333, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To study the anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. and the mechanism. **METHODS** Both inflammatory rat model induced by carrageenan and pain model induced by formalin were applied to investigating the analgesic effect of extract of *Toddalia asiatica* Lam. ELISA kit was used to detect the contents of  $\beta$ -EP, 5-HT and PGE<sub>2</sub> in serum of carrageenan-treated rats, contents of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in skin tissue of inflammatory rats, and content of LTB<sub>4</sub> in serum of formalin-treated rats; immunohistochemical method was used to observe the SP and FOS protein expressions in rat spinal cord. **RESULTS** The ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. could significantly reduce the rate of toe swelling. In the formalin test, the ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. reduced not only the total licking time, but also the content of PGE<sub>2</sub>, especially in the high dose group. And lowered serum 5-HT contents were observed in all the three dose groups, but a much better performance was found in both the high and low dose groups, and the high dose group's capability in increasing serum  $\beta$ -EP content was also noticed. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  contents in skin tissue were reduced in various dose groups. Middle and high dose groups inhibited FOS protein expression. And the content of LTB<sub>4</sub> in serum was obviously decreased in the high dose group. **CONCLUSION** The anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. may associate with its power in increasing  $\beta$ -EP in serum, decreasing PGE<sub>2</sub>, 5-HT, LTB<sub>4</sub> contents, reducing TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  contents in skin tissue, and lowering SP and FOS protein expressions in spinal cord.

**KEY WORDS:** *Toddalia asiatica* Lam.; anti-inflammatory and analgesic activities; mechanism of action

飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* Lam. 的干燥根, 首载于《植物名实图考》, 又名“血见飞”, 是苗族人民的习用植物药材, 临床上用于跌打伤痛、风湿痹痛等多种痛证的治疗。药理方面, 除了抗菌、抗病毒、保护心肌、抗氧化、增强凝血等作用外, 相对较多的是抗炎镇痛<sup>[1]</sup>, 如有报道飞龙掌血根皮部分的镇痛作用超过或相当于杜冷丁<sup>[2]</sup>。临床研究有复方的也有单味的, 主要集中在治疗腰痛、类风湿性关节炎、骨关节病等, 其中有单味飞龙掌血药液外敷, 具有治疗外伤性肿痛的功效<sup>[3]</sup>。鉴于民间应用和现代研究的基础, 本实验采用角叉菜胶致炎和福尔马林致痛法对飞龙掌血的抗炎镇痛作用展开研究, 并采用酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫组化等方法对血清、皮肤组织、脊髓中的 $\beta$ 内啡肽( $\beta$ -EP)、前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、白介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、P物质(SP)等含有量进行检测, 以探讨其相关的作用机制。另外, 飞龙掌血中的主要成分为白屈菜红碱和氯化两面针碱, 通过对比飞龙掌血醇提物及这2种

主要成分的作用来探讨抗炎镇痛的有效成分, 从而为其深入研究奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级小鼠, 雌雄各半, 体质量18~22 g, 斯莱克公司提供, 合格证号SCXK(沪)2012-0002; 清洁级大鼠, 雌雄各半, 体质量180~220 g, 斯莱克公司提供, 合格证号SCXK(沪)2012-0002。动物适应性饲养2 d, 给药前后, 全价颗粒饲料喂养, 自由饮水, 昼夜明暗交替时间12 h/12 h, 室温25℃, 湿度40%。

1.1.2 药物与试剂 飞龙掌血为芸香科植物飞龙掌血 *Toddalia asiatica* Lam. 的干燥根(购于亳州市四芝堂药业有限责任公司, 经上海中医药大学药教研室李西林教授鉴定为正品)。飞龙掌血醇提物的制备: 称取一定量飞龙掌血饮片, 用8倍量75%乙醇回流提取2次, 挥干后溶于蒸馏水中, 得到1 g/mL浓缩液, 备用。白屈菜红碱(批号20121225, 纯度 $\geq$ 98%)、氯化两面针碱(批号

20121117, 纯度 $\geq 98\%$ ) 对照品(上海源叶生物科技有限公司); 布洛芬(批号130305, 太极西南药业股份有限公司); 角叉菜胶(61K1122, Sigma); PGE<sub>2</sub>、5-HT、 $\beta$ -EP及LTB<sub>4</sub>试剂盒均由上海西唐生物科技有限公司提供。

1.1.3 仪器 YLS-7B足趾容积测量仪(济南益延科技发展有限公司); 酶标仪(Bio Tek Synergy, Bio Tek Instruments, USA)。

## 1.2 研究方法

1.2.1 角叉菜胶所致大鼠炎性疼痛实验 56只SD大鼠随机分为7组, 即正常组, 模型组, 混合物组(氯化两面针碱7 mg/kg + 白屈菜红碱1.05 mg/kg), 醇提取物低1 g/kg(醇低)、中2 g/kg(醇中)、高4 g/kg(醇高)剂量组, 以及阳性对照布洛芬组(0.014 g/kg), 每组8只。

飞龙掌血醇提取物各剂量组及阳性对照组分别灌胃给予2 mL/100 g药物, 模型组灌胃同容积生理盐水(NS), 正常组不给药, 混合物组腹腔注射1 mL/100 g混合物, 每天1次, 连续给药3 d。第3天给药前, 用足容积测量仪测定大鼠右肢正常足趾容积<sup>[4-5]</sup>。

第3天给药30 min后, 于右侧后肢足底皮下注射1%角叉菜胶100  $\mu$ L, 测定致炎后1、2、3、4、5、6 h的足趾容积, 分别按下式计算肿胀率和抑制率<sup>[6-8]</sup>。

$$\text{肿胀率} = \frac{\text{致炎后足趾容积} - \text{致炎前足趾容积}}{\text{致炎前足趾容积}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率} = \frac{\text{模型组平均肿胀率} - \text{给药组平均肿胀率}}{\text{模型组平均肿胀率}} \times 100\%$$

1.2.2 福尔马林所致小鼠疼痛实验 60只KM小鼠随机分为5组, 每组12只, 分别为正常组、模型组、乙醇提取物组(1、6 g/kg)、阳性对照布洛芬组(0.039 g/kg)<sup>[9-10]</sup>。

各给药组小鼠分别灌胃0.2 mL/10 g药液, 正常组和模型组灌胃同容积NS, 连续5 d。末次给药后, 用微量注射器于小鼠后足底皮下注射5%福尔马林溶液(25  $\mu$ L/只), 立即把小鼠放入平底大烧杯中观察疼痛反应, 以小鼠注射福尔马林后舔足累积时间作为疼痛反应指标。记录0~5 min(第I相)及15~30 min(第II相)小鼠舔足反应累积时间作为疼痛阈值, 计算平均值<sup>[11-12]</sup>。在40 min时, 小鼠眼眶取血于离心管中, 37  $^{\circ}$ C恒温水浴中孵育30 min, 再置于离心机中3 500 r/min离心20 min, 吸取上清液, 分装后置于-80  $^{\circ}$ C保存,

备用<sup>[13-14]</sup>。

1.2.3 角叉菜胶致炎大鼠血清中 $\beta$ -EP、PGE<sub>2</sub>、5-HT含有量检测 取上述角叉菜胶实验结束的动物, 深度麻醉(25%乌来糖), 腹主动脉取血, 37  $^{\circ}$ C恒温水浴中孵育30 min, 再置于离心机中3 500 r/min离心20 min, 吸取上清液, 分装, 均按照试剂盒说明书方法对 $\beta$ -EP、PGE<sub>2</sub>、5-HT含有量进行检测。

1.2.4 角叉菜胶致炎大鼠肿胀皮肤组织中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 含有量测定 对经角叉菜胶实验后的大鼠取足底及足背皮肤组织, 称重, 按比例加入0.9%生理盐水(0.01 g组织加0.5 mL 0.9%生理盐水), 将标本充分混匀, 低温离心, 收集上清液, 分装, 分别用于检测TNF- $\alpha$ 及IL-1 $\beta$ 的含有量, 均采用试剂盒说明书方法。

1.2.5 角叉菜胶致炎大鼠脊髓中SP及FOS的检测 对角叉菜胶实验皮肤组织取材完成后的大鼠打开脊柱, 取脊髓腰段L3~L5节段, 置于4  $^{\circ}$ C含40 g/L多聚甲醛PBS中后固定, 进行免疫组化检测<sup>[15]</sup>。

1.2.6 福尔马林致炎小鼠血清中LTB<sub>4</sub>的含有量检测 取上述福尔马林致痛小鼠的血清于冰上溶解后, 采用试剂盒说明书方法, 对LTB<sub>4</sub>进行检测。

1.3 统计学方法 采用SPSS 18.0软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的统计学处理选用非参数检验的Wilcoxon秩和检验及参数检验的one-way ANOVA, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 飞龙掌血醇提取物对角叉菜胶所致大鼠炎性疼痛的影响 由表1可见, 模型组各时间点的肿胀率与正常组比较明显升高( $P < 0.01$ ); 氯化两面针碱和白屈菜红碱混合物组在5 h时, 足肿胀率较模型组有所降低( $P < 0.01$ ); 醇提取物的高剂量组从2 h开始, 与模型组比较就有明显的降低( $P < 0.05$ ), 3、5、6 h时尤为明显( $P < 0.01$ ); 醇提取物中剂量组从3 h起较模型组有所降低( $P < 0.01$ ), 3 h和5 h时更显著( $P < 0.01$ )。

由表2可见, 各给药组的足肿胀抑制率随着时间的延长逐渐增大, 5 h时达到最大值; 醇提取物各剂量之间呈现一定的正相关趋势, 随着剂量的增加, 抑制率也随之升高。

表1 飞龙掌血醇提取物对大鼠足趾肿胀率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab. 1 Effect of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on rats' toe swelling rate ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量	肿胀率/%					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
正常组	-	6.34 ± 6.25	1.28 ± 4.86	-1.09 ± 6.57	-2.89 ± 5.73	2.48 ± 8.36	1.53 ± 5.91
模型组	-	25.21 ± 19.02 <sup>##</sup>	31.32 ± 21.70 <sup>##</sup>	39.13 ± 21.14 <sup>##</sup>	32.97 ± 14.82 <sup>##</sup>	39.88 ± 18.88 <sup>##</sup>	48.82 ± 18.46 <sup>##</sup>
混合物组	7 mg/kg(氯化两面针碱) + 1.05 mg/kg(白屈菜红碱)	19.15 ± 14.06	18.04 ± 6.61 <sup>##</sup>	28.82 ± 11.71 <sup>##</sup>	25.42 ± 9.03 <sup>##</sup>	21.97 ± 12.93 <sup>###</sup>	28.41 ± 11.97 <sup>###</sup>
醇低组	1 g/kg	22.51 ± 20.95	31.42 ± 16.87 <sup>##</sup>	29.06 ± 13.54 <sup>##</sup>	25.73 ± 16.35 <sup>##</sup>	30.82 ± 24.67 <sup>##</sup>	40.99 ± 24.34 <sup>##</sup>
醇中组	2 g/kg	17.01 ± 9.41 <sup>#</sup>	19.58 ± 7.45	19.34 ± 7.01 <sup>###</sup>	18.25 ± 6.51 <sup>###</sup>	17.30 ± 10.74 <sup>###</sup>	27.95 ± 13.36 <sup>###</sup>
醇高组	4 g/kg	12.87 ± 8.16	12.14 ± 9.90 <sup>###</sup>	20.11 ± 7.10 <sup>###</sup>	18.15 ± 6.10 <sup>###</sup>	13.02 ± 6.18 <sup>###</sup>	20.70 ± 10.60 <sup>###</sup>
布洛芬组	0.014 g/kg	19.26 ± 8.98 <sup>##</sup>	12.17 ± 11.74 <sup>##</sup>	14.76 ± 10.14 <sup>###</sup>	15.29 ± 13.40 <sup>###</sup>	11.91 ± 10.17 <sup>**</sup>	20.64 ± 8.38 <sup>###</sup>

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与正常组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

表2 飞龙掌血醇提取物对大鼠足趾肿胀抑制率的影响 ( $n=8$ )

Tab. 2 Effect of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on rats' toe swelling inhibition rate ( $n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	抑制率/%					
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
混合组	7 mg/kg(氯化两面针碱) + 1.05 mg/kg(白屈菜红碱)	24.01	42.41	26.35	22.90	44.90	41.81
醇低组	1	10.70	-0.33	25.75	21.96	22.71	16.04
醇中组	2	32.53	37.46	50.58	44.65	56.62	42.75
醇高组	4	48.93	61.23	48.60	44.96	67.35	57.61
布洛芬组	0.014	23.58	61.13	62.29	53.62	70.15	57.73

2.2 飞龙掌血醇提取物对福尔马林所致小鼠疼痛的影响 表3显示, 0~5 min时, 给药组2个剂量的累积舔足时间均有所下降, 醇高组更明显 ( $P < 0.01$ ); 15~30 min时, 醇提取物高剂量组小鼠的累积舔足时间较模型组显著下降 ( $P < 0.05$ )。

表3 飞龙掌血醇提取物对小鼠累积舔足时间的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

Tab. 3 Effect of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on mice's accumulative licking time ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	累积舔足时间/s	
		0~5 min(I)	15~30 min(II)
正常组	-	-	-
模型组	-	49.50 ± 11.77	56.94 ± 18.67
醇低组	1	39.67 ± 7.15 <sup>*</sup>	49.66 ± 17.40
醇高组	6	22.92 ± 5.40 <sup>**</sup>	40.48 ± 8.77 <sup>*</sup>
布洛芬组	0.039	25.33 ± 7.71 <sup>**</sup>	49.50 ± 19.59

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

表4 飞龙掌血醇提取物对β-EP、5-HT、PGE<sub>2</sub>含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab. 4 Effects of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on contents of β-EP, 5-HT and PGE<sub>2</sub> ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	β-EP/(pg·mL <sup>-1</sup> )	5-HT/(pg·mL <sup>-1</sup> )	PGE <sub>2</sub> /(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常组	-	55.44 ± 4.88	9.52 ± 0.53	185.75 ± 21.65
模型组	-	50.13 ± 3.77 <sup>#</sup>	10.19 ± 1.02 <sup>#</sup>	239.66 ± 22.35 <sup>##</sup>
混合组	7 mg/kg(氯化两面针碱) + 1.05 mg/kg(白屈菜红碱)	50.82 ± 3.49	8.85 ± 0.66 <sup>###</sup>	229.46 ± 33.24 <sup>#</sup>
醇低组	1	52.89 ± 4.20	9.31 ± 0.45 <sup>**</sup>	229.31 ± 48.89 <sup>#</sup>
醇中组	2	53.96 ± 3.12	9.40 ± 0.53 <sup>*</sup>	218.85 ± 37.79
醇高组	4	55.22 ± 7.65 <sup>*</sup>	9.26 ± 0.49 <sup>**</sup>	198.22 ± 23.32 <sup>*</sup>
布洛芬组	0.014	53.20 ± 3.75	9.32 ± 0.53 <sup>**</sup>	201.15 ± 39.71 <sup>*</sup>

注:与模型组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与正常组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

2.3 飞龙掌血醇提取物对炎性疼痛大鼠血清中β-EP、PGE<sub>2</sub>及5-HT含量的影响 血清中β-EP含量的检测结果见表4。与正常组比较, 模型组β-EP的含有量有一定程度的降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 醇提取物各剂量组β-EP的含有量均有所上升, 醇高组β-EP的含有量明显升高 ( $P < 0.05$ )。血清中5-HT含量的检测结果显示, 与正常组比较, 模型组的5-HT含有量有所升高 ( $P < 0.05$ ), 混合物组的5-HT含有量则呈现下降趋势 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 各给药组的5-HT含有量均有不同程度的下降, 其中混合物组、醇低组、醇高组及阳性药组尤为明显 ( $P < 0.01$ )。血清中PGE<sub>2</sub>含量的检测结果可见, 与正常组比较, 混合物组和醇低组的PGE<sub>2</sub>含有量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 模型组更为明显 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 醇高组和阳性药组的PGE<sub>2</sub>含有量明显下降 ( $P < 0.05$ )。

2.4 飞龙掌血醇提物对大鼠肿胀皮肤组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含有量的影响 角叉菜胶致炎后,与正常组比较,模型组大鼠皮肤组织中 TNF- $\alpha$  明显升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,飞龙掌血醇提物的各剂量组均能明显减少皮肤组织中 TNF- $\alpha$  的含有量,差异显著 ( $P < 0.01$ ),结果见表 5。

表 5 飞龙掌血醇提物对 TNF- $\alpha$  含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Tab. 5 Effect of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on content of TNF- $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	TNF- $\alpha$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常组	-	697.20 $\pm$ 85.32
模型组	-	965.76 $\pm$ 152.65 <sup>##</sup>
混合组	7 mg/kg(氯化两面针碱) + 1.05 mg/kg(白屈菜红碱)	577.75 $\pm$ 180.23 <sup>**</sup>
醇低组	1	363.78 $\pm$ 97.83 <sup>##**</sup>
醇中组	2	547.89 $\pm$ 159.61 <sup>##**</sup>
醇高组	4	461.16 $\pm$ 134.86 <sup>##**</sup>
布洛芬组	0.014	428.26 $\pm$ 128.73 <sup>##**</sup>

注:与模型组比较,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>##</sup>  $P < 0.01$

由表 6 可知,模型组大鼠皮肤组织中的 IL-1 $\beta$  在致炎后有所升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,飞龙掌血醇提物的各剂量组均能降低皮肤组织中 IL-1 $\beta$  的含有量,具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

表 6 飞龙掌血醇提物对 IL-1 $\beta$  含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Tab. 6 Effect of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on content of IL-1 $\beta$  ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	IL-1 $\beta$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常组	-	19.77 $\pm$ 4.39
模型组	-	25.81 $\pm$ 8.01 <sup>#</sup>
混合组	7 mg/kg(氯化两面针碱) + 1.05 mg/kg(白屈菜红碱)	20.68 $\pm$ 6.28
醇低组	1	18.91 $\pm$ 5.24 <sup>**</sup>
醇中组	2	16.99 $\pm$ 5.22 <sup>**</sup>
醇高组	4	14.45 $\pm$ 2.93 <sup>**</sup>
布洛芬组	0.014	15.95 $\pm$ 4.33 <sup>**</sup>

注:与模型组比较,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$

2.5 飞龙掌血醇提物对大鼠脊髓中 SP 及 FOS 的影响 图 1~2 显示,正常组几乎没有棕黄色颗粒,模型组的脊髓背角浅层布满了棕黄色颗粒,飞龙掌血醇提物低剂量组有大量的棕黄色颗粒,中剂量组有一定量的棕黄色颗粒,高剂量组有少量的棕黄色颗粒。表 7 显示,醇提物低剂量组的 SP 免疫反应阳性细胞数较模型组有所下降 ( $P < 0.01$ );醇提物中剂量和高剂量组的 SP 和 FOS 免疫反应阳性细胞数较模型组均明显减少 ( $P < 0.01$ )。

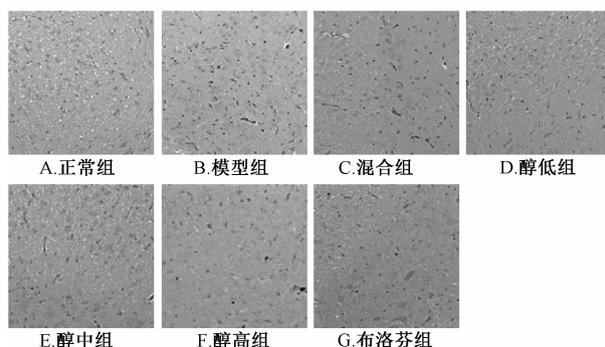


图 1 各组大鼠脊髓 FOS 表达 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 1 Expressions of FOS in the spinal cord of rats in various groups (HE,  $\times 100$ )

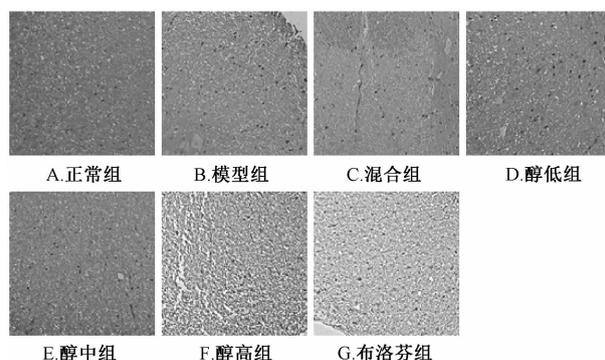


图 2 各组大鼠脊髓 SP 表达 (HE,  $\times 100$ )

Fig. 2 Expressions of SP in the spinal cord of rats in various groups (HE,  $\times 100$ )

表 7 飞龙掌血醇提物对 SP 及 FOS 含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Tab. 7 Effects of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on contents of SP and FOS ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	阳性细胞数	
		SP	FOS
正常组	-	87 $\pm$ 7	76 $\pm$ 20
模型组	-	279 $\pm$ 32 <sup>##</sup>	237 $\pm$ 44 <sup>##</sup>
混合组	7 mg/kg(氯化两面针碱) + 1.05 mg/kg(白屈菜红碱)	227 $\pm$ 22 <sup>##*</sup>	224 $\pm$ 9 <sup>##</sup>
醇低组	1	204 $\pm$ 10 <sup>##**</sup>	227 $\pm$ 26 <sup>##</sup>
醇中组	2	147 $\pm$ 27 <sup>##**<math>\Delta\Delta</math></sup>	120 $\pm$ 9 <sup>#**<math>\Delta\Delta</math></sup>
醇高组	4	114 $\pm$ 20 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>	89 $\pm$ 23 <sup>**<math>\Delta\Delta</math></sup>
布洛芬组	0.014	119 $\pm$ 21 <sup>**</sup>	115 $\pm$ 9 <sup>##**</sup>

注:与模型组比较,<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ;与醇低组比较, <sup>$\Delta\Delta$</sup>   $P < 0.01$

2.6 飞龙掌血醇提物对福尔马林致痛小鼠血清中 LTB<sub>4</sub> 含有量的影响 表 8 显示,在小鼠右足皮下注射福尔马林后,血清中的 LTB<sub>4</sub> 含有量与正常组比较显著升高 ( $P < 0.05$ );飞龙掌血醇提物的各剂量组均能减少小鼠血清中 LTB<sub>4</sub> 的含有量,醇提物高剂量组下降尤为明显,与模型组比较,差异显

著 ( $P < 0.01$ )。

表8 飞龙掌血醇提物对  $LTB_4$  含有量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Tab. 8 Effect of ethanol extract of *Toddalia asiatica* Lam. on content of  $LTB_4$  ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	$LTB_4$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常组	-	85.06 ± 40.60
模型组	-	104.71 ± 42.77 <sup>#</sup>
醇低组	1	83.04 ± 34.27
醇高组	6	63.94 ± 21.06 <sup>**</sup>
布洛芬组	0.039	60.61 ± 25.65 <sup>**</sup>

注:与模型组比较,<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ ;与正常组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.05$

### 3 讨论

飞龙掌血作为苗族、土家族等少数民族药物志中的常用民族药,有祛风止痛、活血散瘀、解毒消肿、止血等功效。本实验通过角叉菜胶致炎法和福尔马林致痛法,研究飞龙掌血醇提物对炎症及化学刺激引起疼痛的镇痛作用,并通过检测相关因子探讨其抗炎镇痛机制。

角叉菜胶致炎实验结果显示,飞龙掌血醇提物能明显降低由角叉菜胶所致的足肿胀,且剂量与抑制率呈正相关,表明飞龙掌血醇提物对炎症引起的疼痛具有镇痛作用,且剂量越大,作用越明显。福尔马林致痛实验结果显示,飞龙掌血醇提物对小鼠的累积舔足时间均有所降低,提示其对化学刺激和炎症引起的疼痛均有镇痛作用。

原癌基因 c-fos 是存在于正常神经元细胞核内的即刻早期基因 (IEG), FOS 则为其蛋白表达产物。正常情况下, c-fos 基因很少表达,当产生外周伤害性刺激等因素时,可激活脊髓内 c-fos 基因并表达 FOS。FOS 是疼痛在分子水平的标志,可作为伤害性刺激的标志物<sup>[16-17]</sup>; SP 被认为是脊髓伤害性信息传递物质,也是导致在伤害性刺激停止作用后持久性疼痛和痛觉过敏的主要物质,持续的电、热、化学等多种外周性刺激可引起脊髓背角 SP 的释放<sup>[18-20]</sup>。

实验结果表明,飞龙掌血醇提物能减少大鼠脊髓中 SP 和 FOS 免疫反应阳性细胞数,可能是通过降低脊髓中 SP 及 FOS 蛋白的表达,从而减少脊髓背角神经元对传入的伤害性刺激的反应来发挥镇痛作用的。

$\beta$ -EP 是体内产生的一类具有类似吗啡作用的内源性肽类物质,是机体抗痛系统的重要组成部分。其镇痛作用主要体现在中枢神经系统上,但目前已有研究证实,在外周受损组织中含有大量的阿

片肽类镇痛物质,主要包括  $\beta$ -EP 和脑啡肽<sup>[21]</sup>。实验结果显示,飞龙掌血醇提物高剂量组能升高血清中  $\beta$ -EP 的含有量,提示其镇痛作用可能是通过增加血清中  $\beta$ -EP 的含有量来实现的。

降低产生痛觉的阈值称为痛觉过敏,致痛觉过敏的物质有前列腺素 (PG)、LT、5-HT、IL-1、组胺、SP 等。PG 被认为是典型的致敏物质,其对伤害感受器的致敏作用是非常重要的,因为它能增强伤害感受器对其他炎症介质的反应性; IL-1 诱导非神经元细胞内 E-型 PG 的合成,并且 IL-1 引起的痛觉过敏可能也是由 PG 介导的; SP 通过引起血管扩张、增加血管通透性、PGE<sub>2</sub> 和 IL-1 的释放等产生炎症反应; TNF- $\alpha$  也能诱导痛觉过敏,其产生能启动一个引起其他细胞因子释放的级联反应;从活化的血小板中释放出的 5-HT 也明显地增加炎症渗出,但因其具有极短的潜伏期,并独立于交感神经节后神经元、中性粒细胞和前列腺素的合成,所以 5-HT 的作用是直接的。总之,有数种炎症介质对炎症性疼痛产生起到作用,并有采用激活交感神经节后神经元和产生 PG 的共同机制<sup>[22-23]</sup>。

飞龙掌血醇提物在一定程度上降低了大鼠血清中 PGE<sub>2</sub> 的含有量,提示其缓解炎症引起的疼痛可能是通过降低 PGE<sub>2</sub> 的含有量达到的,但其起作用的成分可能不是氯化两面针碱和白屈菜红碱,还包括其他生物碱或香豆素类等成分。飞龙掌血醇提物能降低血清中 5-HT 的含有量,混合物组 5-HT 的含有量降低亦尤为明显,表明氯化两面针碱和白屈菜红碱可能起到了决定性作用,故这 2 个单体混合物的作用比飞龙掌血醇提物 3 个剂量组均显著。飞龙掌血醇提物能减少小鼠血清中  $LTB_4$ 、大鼠肿胀足趾皮肤组织中 TNF- $\alpha$  含有量,提示飞龙掌血醇提物对福尔马林所致炎症模型的止痛作用可能是通过降低血清中  $LTB_4$  的含有量来完成的,其抗炎镇痛作用的机制可能与降低皮肤组织中 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  的含有量有关。

此外,飞龙掌血醇提物中除了氯化两面针碱及白屈菜红碱外,其他物质有无镇痛作用还有待进一步研究。

综上所述,飞龙掌血醇提物发挥抗炎镇痛作用的外周机制可能是通过增加血清中  $\beta$ -EP、降低血清中 PGE<sub>2</sub>、 $LTB_4$  和 5-HT 的含有量来实现的,降低皮肤组织中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的含有量亦为其可能的抗炎镇痛机制之一。另外,发挥抗炎镇痛作用的中枢机制可能与降低脊髓中 SP、FOS 蛋白的表达有关。

参考文献:

- [1] 胡世斌, 杨诗飞. “见血飞”药液外敷治疗外伤性肿痛的体会[J]. 湖北中医杂志, 1990(2): 22.
- [2] 王顺祥, 魏经建, 王奕鹏. 9种中草药镇痛作用的筛选实验[J]. 河南中医, 2006, 26(1): 37-39.
- [3] 郝小燕, 彭琳, 叶兰, 等. 飞龙掌血生物总碱抗炎镇痛作用的研究[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(6): 450-452.
- [4] George A, Chinnappan S, Chintamaneni M. Anti-inflammatory effects of *Polygonum minus* (Huds) extract (Lineminus™) in *in-vitro* enzyme assays and carrageenan induced paw edema[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 355.
- [5] Ruth A F, Olaide A O, Oluwatoyin S M. The aqueous root extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) *Aristolochiaceae* inhibits chemically-induced inflammation in rodents[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(6): 1885-1889.
- [6] Hummig W, Kopruszinski C M, Chichorro J G. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain[J]. *J Oral Facial Pain Headache*, 2014, 28(4): 350-359.
- [7] Metcalf C S, Klein B D, McDougle D R. Analgesic properties of a peripherally acting and GalR2 receptor-preferring galanin analog in inflammatory, neuropathic, and acute pain models[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 352(1): 185-193.
- [8] Lee S S, Tan N H, Fung S Y. Anti-inflammatory effect of the sclerotium of *Lignosus rhinocerotis* (Cooke) Ryarden, the Tiger Milk mushroom[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14: 359.
- [9] 宋利萍, 赵春颖, 佟继铭. 赤霄根总皂苷镇痛作用部位研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 200-202.
- [10] 王婷, 陈菲, 李溯, 等. 吴茱萸提取物乳膏镇痛作用及其机制探讨[J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(2): 106-110.
- [11] 曾万玲, 林敏, 喻微, 等. 龙香散镇痛作用及作用机制[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 14-18.
- [12] 孙爱静, 徐先祥, 黄晓东, 等. 七叶莲花抗炎镇痛作用及机制研究[J]. 中药材, 2014, 37(2): 311-315.
- [13] Przemyslaw R, Emilia G, Slawomir M. Antinociceptive properties of esculetin in non-inflammatory and inflammatory models of pain in rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(2): 213-219.
- [14] Filgueiras L R, Brandt S L, Wang S. Leukotriene B4-mediated sterile inflammation promotes susceptibility to sepsis in a mouse model of type 1 diabetes [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(361): ra10.
- [15] 王学勇, 张元, 许建阳, 等. 金铁锁总皂苷镇痛作用及其对佐剂性关节炎大鼠 c-fos 基因的表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(3): 94-96.
- [16] Bullitt E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat[J]. *J Comp Neurol*, 1990, 296(4): 517-530.
- [17] Hunt S P, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation[J]. *Nature*, 1987, 328(6131): 632-634.
- [18] Presley R W, Menetrey D, Levine J D, et al. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord[J]. *J Neurosci*, 1990, 10(1): 323-335.
- [19] Henry J L. Effects of substance P on functionally identified units in cat spinal cord [J]. *Brain Res*, 1976, 114(3): 439-451.
- [20] Kantner R M, Kerby M L, Goldstein B D, et al. Increase in substance P in the dorsal horn during a chemogenic nociceptive stimulus[J]. *Brain Res*, 1985, 338(1): 196-199.
- [21] 洪庚辛. 镇痛药研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 306-308.
- [22] 俞珊, 秦志丰, 施俊, 等. 中药镇痛机理的研究概述[J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(5): 667-668.
- [23] Patrick D W, Ronald M. 疼痛学[M]. 赵宝昌, 崔秀云, 译. 沈阳: 辽宁教育出版社, 2000: 19-39.