

维药野西瓜醇提物的镇痛作用研究

黄先菊^{1,2} 柯才华¹ 李梅¹ 陈慧¹ 袁琳^{1,*}

(1 中南民族大学 药学院,武汉 430074;2 中南民族大学 实验教学与实验室管理中心,武汉 430074)

摘要 目的:研究野西瓜的镇痛作用,并探讨其作用机制。方法:体内建立福尔马林致小鼠神经性和炎症性双相疼痛、小鼠热板致痛、冰醋酸致小鼠扭体反应动物模型,观察不同实验组效果。体外以 RAW264.7 细胞为研究对象,探讨野西瓜醇提物对脂多糖(LPS)诱导的 RAW264.7 细胞释放一氧化氮(NO)的影响。结果:野西瓜醇提物对福尔马林所致小鼠双相疼痛反应呈剂量依赖性的抑制作用,使小鼠局部炎症组织前列腺素 E₂(PGE₂)含量降低,延长小鼠热板痛阈值,减少醋酸致小鼠扭体次数,抑制 RAW264.7 细胞内 NO 的产生。结论:野西瓜醇提物有很好的抗炎镇痛效果,其作用机制之一可能是通过降低 PGE₂ 含量来发挥作用。

关键词 野西瓜;镇痛作用;一氧化氮;前列腺素 E₂

中图分类号 Q438;R965 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)01-0046-04

Research on Analgesic Effect of the Alcohol Extract of *Capparis spinosa* L.

Huang Xianju, Ke Caihua, Li Mei, Chen Hui, Yuan Lin

(College of Pharmacy, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Objective: To investigate the analgesic effect and mechanism of *Capparis spinosa* L. Methods: Three pain models including acid-induced writhing test, hot-plate test and formalin pain model in mice were used to assess the effect of *Capparis spinosa* L. on nociceptive threshold *in vivo*. The PGE₂ level of the swollen hind paws induced by formalin was then detected. The effects of *Capparis spinosa* L. on nitric oxide (NO) production of RAW264.7 induced by Lipopolysaccharide (LPS) *in vitro*. Results: *Capparis spinosa* L. caused significant decrease in pain responses in the first and second phases of formalin test with altering the PGE₂ production in the hind paw of the mice, increased the pain threshold in hot plate test, inhibited acetic acid induced writhing response, and inhibited NO production of RAW264.7. Conclusion: *Capparis spinosa* L. has analgesic effects, and the analgesic function may be related to its suppression of PGE₂.

Keywords *Capparis spinosa* L.; analgesia effect; NO; PGE₂

野西瓜(*Capparis spinosa* L.)为白花菜科山柑属植物,又名槌果藤、老鼠瓜、刺山柑,在我国主要分布于新疆、甘肃和西藏等地,在国外分布于环地中海及西亚的一些国家^[1]。野西瓜是维吾尔医常用药材,具有清除体内异常体液、畅通阻滞等功效。维药野西瓜其根、果、叶均能入药,功能祛风除湿,止痛消肿^[2,3]。应用多种炎症模型对其醇提物抗炎镇痛作用进行了实验研究,并初步探讨了其作用机制,以期为进一步

开发野西瓜在抗类风湿新药研究上提供实验依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF 级昆明小鼠(18~22 g);购自湖北省实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2008-0005。饲养于中南民族大学药学院 SPF 级动物房,严格按照

收稿日期 2017-09-14 * 通讯作者 袁琳 研究方向:抗菌与抗炎免疫药理学, E-mail: yuanlin@scuec.edu.cn

作者简介 黄先菊(1972-),女,教授,博士,研究方向:民族药药理与毒理研究, E-mail: xianju@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81374064)

《湖北省实验动物质量控制标准》进行,动物房温度为 (22 ± 2) ℃,光照或黑暗条件下让老鼠自由进食。为避免食物干扰,动物在实验前 12 h 停止喂食,只供水。

1.2 药材与试剂

野西瓜果系购于新疆的药材干品,经鉴定为白花菜科山柑属植物野西瓜的果实。阿司匹林泡腾片(中国阿斯利康制药有限公司),吗啡注射液(中国东北制药集团),冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器

旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器公司),循环水多用真空泵、水浴锅(郑州长城科工贸公司),高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司),精密天平(梅特勒-托利多仪器公司),全自动酶标仪(Thermo 公司)。

2 方法

2.1 野西瓜醇提物制备

野西瓜经过干燥后打碎成粉状,称取适量,放入圆底烧瓶中加入足量 95%乙醇进行提取,回流提取 3 次,抽滤,合并滤液在旋转蒸发器上以低温(45℃)旋转蒸干,制得野西瓜浸膏。实验前用蒸馏水溶解至所需浓度。

2.2 热板法实验

按文献[4]方法进行热板实验,选取痛阈值在 5~30 s 内的 SPF 级小鼠 40 只,分别为空白组、3 组剂量组(50、100、200 mg/kg)和吗啡阳性对照组。阳性对照组给予 10 mg/kg 的吗啡,空白组给予等体积蒸馏水,给药体积按 5 mL/kg 计算。腹腔给药 40 min 后再次测定小鼠的痛阈值,计算最大镇痛效应,公式为: $MPE\% = (\text{给药后痛阈时间} - \text{基础痛阈时间}) / (60 - \text{基础痛阈时间}) \times 100\%$ 。

2.3 冰醋酸所致小鼠扭体反应实验

取小鼠 40 只,雌雄各半,同 2.2 方法分为 5 组,阳性对照组给予 200 mg/kg 的阿司匹林溶液,空白组给予等体积蒸馏水,给药体积按 5 mL/kg 计算。给药 40 min 后各组腹腔注射 0.6%的冰醋酸溶液,给药剂量 10 mL/kg。注射完毕,立即记录小鼠 20 min 内扭体反应的次数,腹部肌肉收缩同时后腿伸展记为一次扭体。

2.4 福尔马林所致小鼠疼痛实验

取小鼠 40 只,雌雄各半,同 2.2 方法分为 5 组。

阳性对照组给予 200 mg/kg 的阿司匹林溶液,空白组给予等体积蒸馏水,给药体积按 5 mL/kg 计算。各组给药 1 h 后,小鼠右后足底注射 5%福尔马林(10 μL/只),以秒表记录小鼠注射后 0~5 min 和 15~30 min 累计舔后足的时间,作为 1 相和 2 相疼痛强度的指示信号。1 相(0~5 min)和 2 相(15~30) min 分别代表小鼠的神经性和炎症性疼痛反应^[5-7]。

2.5 前列腺素 E₂含量测定实验

福尔马林实验结束后,脱颈椎处死小鼠,在踝关节以上 0.5 cm 处剪下致炎肿胀后足,称取左右两足重量,计算差值。然后将剪下的后足绞碎,5 mL 生理盐水浸泡 1 h,3000 r/min 离心 5 min,吸取上清液 0.1 mL,加入 0.5 mol/L 的 KOH-甲醇溶液 2 mL,50℃异构化 20 min,用甲醇稀释至 20 mL,在波长 278 nm 处测吸光度,以每克炎性组织相当的 OD 值表示前列腺素 E₂(PGE₂)的含量。

2.6 NO 浓度测定实验

将密度为 2×10^6 个/mL 的小鼠腹腔巨噬细胞的悬液均匀接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,待细胞贴壁后(约 2 h),加入不同浓度野西瓜醇提物(50、100、200 Mg/mL)和 LPS 1 μg/mL 各 100 μL,并设 LPS 模型组和空白对照组,每个浓度设 6 个复孔,37℃预处理 48 h 后,取培养液上清按 50 μL/孔加入 96 孔板中,室温下,再在各孔中加入 Griess Reagent I 和 Griess Reagent II,以含 10%小牛血清的 DMEM 加显色剂为空白对照组,标准品为 NaNO₂,用含 10%小牛血清的 DMEM 稀释,浓度设定为 1、2、5、10、20、40、60、100 μmol/L,以酶标仪测定各孔在 540 nm 处的吸光度值。根据标准品各浓度所得 OD 值拟合 NO 反应的标准曲线,所得回归方程为: $y = 0.0234x + 0.0452$, y 为 NO 浓度(μmol/L), x 为标准品吸光度值 OD₅₄₀, $R = 0.9993$,线性关系良好。按标准曲线回归方程求出待测样本 NO 浓度。

2.7 统计学处理

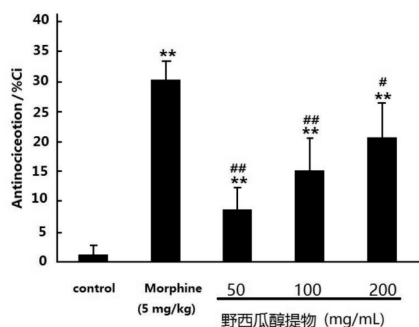
实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 软件进行统计学结果分析,采用 ANOVA 方法进行组间差异比较。

3 结果

3.1 野西瓜醇提物对小鼠基础痛阈值的影响

从实验结果可以看出(图 1),3 个剂量组的野西瓜均有较高的最大镇痛效应,镇痛效果明显,与空白组相比有显著性差异,50~200 mg/kg 的野西瓜引起剂量依赖性镇痛效应。同时,3 个剂量组与阳性对照

组相比,也均具有显著性差异,空白组没有表现出明显镇痛效应。



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 与空白组相比;
$p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 与阳性对照组相比

图 1 野西瓜对小鼠热板实验的镇痛作用

Fig.1 Analgesic effect of *Capparis spinosa* L. on hot plate test in mice

3.2 野西瓜醇提取物对醋酸所致小鼠扭体反应的影响

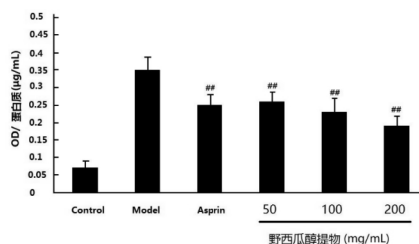
扭体实验数据显示(表 1),3 个剂量组的野西瓜均可不同程度抑制小鼠腹腔注射冰醋酸所致扭体反应.低剂量组野西瓜(50 mg/kg)抑制程度较低,但依然能够显著抑制小鼠腹腔注射冰醋酸所致扭体反应($p < 0.05$),200 mg/kg 和 100 mg/kg 剂量组的镇痛效应较其他给药组更加显著。

表 2 野西瓜对小鼠注射福尔马林后 1 相和 2 相的镇痛作用

Tab.2 Analgesic effect of *Capparis spinosa* L. on 1 and 2 phases after formalin injection in mice

组别	剂量/(mg/kg)	舔足时间 /s		左右足重差/g
		1 相 0~5 min	2 相 15~30 min	
对照组	-	90.5±16.7	97±17.5	0.07±0.01
阿司匹林	200	59.5±16.8**	47.8±9.6**	0.06±0.01*
野西瓜	200	65.9±15.7**	15.8±5.1**	0.06±0.01*
	100	70.9±14	18.5±5.3**	0.07±0.01
	50	87.6±27.1	24.8±8.1**	0.08±0.02*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$;与对照组比较



$p < 0.01$, 与模型组比较

图 2 野西瓜对小鼠注射福尔马林后足 PGE₂ 释放的抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of *Capparis spinosa* L. on the release of PGE₂ in mice after formalin injection

图 2 显示,与空白对照组相比,注射福尔马林

表 1 野西瓜对醋酸所致扭体反应作用

Tab.1 Effect of *Capparis spinosa* L. on writhing induced by ethylic acid

组别	剂量 / (mg/kg)	20 min 内 扭体次数	抑制率 /%
对照组	-	46.2±7.8	
阿司匹林	200	11.9±5.6**	73.6
野西瓜	200	11.5±3.7**	74.3
	100	14.1±4.5**	63.0
	50	18±5.6*#	55.8

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 与对照组比较;# $p < 0.05$ 与阳性对照组比较

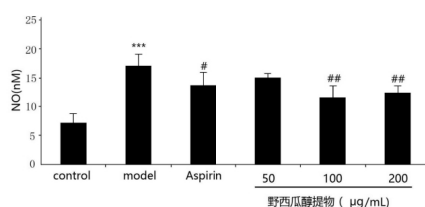
3.3 野西瓜醇提取物对福尔马林致痛小鼠作用及前列腺素 E₂ 释放的影响

野西瓜 50~200 mg/kg 对福尔马林所致小鼠双相疼痛(神经性疼痛和炎症性疼痛)反应均呈剂量依赖性的抑制作用(表 2). 其对 2 相炎症性疼痛的镇痛效果比 1 相更加明显. 同阳性对照组阿司匹林组相比,200 mg/kg 剂量组的野西瓜可以降低左右足的重量差,表明野西瓜具有一定抗炎作用.低剂量组 50 mg/kg 和 100 mg/kg 对 1 相疼痛没有明显的抑制作用($p > 0.05$),但对 2 相疼痛有明显的抑制作用。

组的小鼠后爪中 PGE₂ 含量明显增加.阿司匹林 阳性对照组及剂量组 50~200 mg/kg 均能抑制 PGE₂ 释放,表明野西瓜的抗炎作用是通过抑制环氧酶-2(COX-2)的活性实现。

3.4 野西瓜醇提取物对脂多糖诱导细胞 NO 释放的影响

由图 3 可见,1 μg/mL 的 LPS 作用小鼠腹腔巨噬细胞 48 h 后,能引起细胞 NO 分泌增加($p < 0.01$),100、200 μg/mL 浓度的野西瓜均能抑制 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞 NO 的释放($p < 0.01$)。



** $p < 0.01$ 与对照组比较;## $p < 0.01$ 与 LPS 组比较

图 3 野西瓜对 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞释放 NO 的影响

Tab.3 Effect of *Capparis spinosa* L. on NO release induction by LPS in RAW264.7

4 讨论

从热板实验、冰醋酸扭体实验以及福尔马林致痛实验中观察到,小鼠给药后痛阈时间较基础痛阈时间显著延长,扭体次数明显下降。福尔马林致痛实验给药组中 1 相和 2 相小鼠舔后足的时间均较空白对照组明显减少,表明野西瓜对中枢及外周性的疼痛都具有良好的镇痛效果。

PGE_2 是前列腺素(PG)的一种,当机体细胞受到损伤或机械、物理或化学刺激时,可经过一系列酶促反应生成 PGE_2 。COX 是 PGE_2 合成过程中重要的限速酶,人体内有两种不同的 COX 同工酶,即 COX-1 和 COX-2。普遍认为,COX-1 是体内正常的生理性酶,能够调节组织器官内生理性的 PG;而 COX-2 则是一种经过诱导后产生的诱导或病理性酶,可在炎症部位催化炎性的 PG 合成并能诱发炎症反应。Siegle 等^[8]发现在各类关节炎中,COX-2 有不同程度的增高,而 COX-1 则无明显变化,说明主要是 COX-2 促使 PG 合成增加,进而引起了炎症反应的放大和增强。注射福尔马林组的小鼠后爪中 PGE_2 含量明显增加,而 3 个剂量组的野西瓜能有效抑制 PGE_2 释放,说明野西瓜是通过抑制环氧酶-2(COX-2)的活性实现。

在各种炎性疾病病理过程中,NO 起着重要的作用。适量的 NO 有助于减轻炎症反应、杀灭病原微生物,但巨噬细胞在炎性或免疫性刺激下能够产生大量

的 NO,这些 NO 能够与超氧阴离子等氧自由基发生反应,进而增加其对组织细胞产生的细胞毒效应。Griess 法结果显示野西瓜能够抑制 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞内 NO 的产生,使 NO 不能在细胞内过度释放,从而减轻细胞毒作用。

上述实验结果进一步明确野西瓜具有良好的抗炎镇痛作用,为其开发成为抗炎镇痛类新药提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] 陈锐. 柏子养心丸临床应用解析[J]. 中国社区医师, 2001, (4): 15.
- [2] 何承辉, 田红林, 康小龙. 刺山柑总生物碱对系统性硬皮病小鼠血管内皮生长因子和内皮素-1 及可溶性血管细胞粘附分子-1 的影响[J]. 医药导报, 2017, 36(12): 1367-1370.
- [3] 中国科学院新疆生物土壤沙漠研究所. 新疆药用植物志[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1981.
- [4] 徐叔云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 70-72.
- [5] Potes C S, Neto L, Castro-Lopes J M. Inhibition of pain behavior by GABA_B receptors in the thalamic ventrobasal complex: Effect on normal rats subjected to the formalin test of nociception [J]. Brain Research, 2006, 1115(1): 37-47.
- [6] Sawynok J, Reid A. Antinociception by tricyclic antidepressants in the rat formalin test: differential effects on different behaviors following systemic and spinal administration [J]. Pain, 2001, 93(1): 51-59.
- [7] Xu Y, Ku B, Geng X. Analgesic effects of tetrodotoxin combined with acetylsalicylic acid on acetic acid-induced abdominal constriction and formalin test in mice [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2005, 14(3): 186-192.
- [8] Siegle I, Klein T, Backman J T et al. Expression of cyclooxygenase1 and cyclooxygenase2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases [J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(1): 122-129.

(责任编辑 姚春娜)