

## 金丝桃苷对急性炎症疼痛模型小鼠的抗炎镇痛作用研究

史 宁, 郭宏举, 王 欢, 张毓敏, 潘敏翔, 朱友智, 常李荣\*

解放军第306医院药学部, 北京 100101

**摘要:** **目的** 研究金丝桃苷(Hyp)对急性炎症疼痛模型小鼠的抗炎镇痛作用。**方法** 昆明种小鼠随机分为对照组, Hyp低、中、高剂量(50、100、200 mg/kg)组及氢化可的松(阳性药, 20 mg/kg)组, sc给药, 每天给药1次, 连续给药5 d后, 建立二甲苯所致小鼠耳廓肿胀和醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高的急性炎症模型, 观察Hyp对小鼠急性炎症的抗炎作用; 阳性药设置为吗啡(1 mg/kg), 其余分组及给药方式同急性炎症实验, 连续给药5 d后, 建立小鼠醋酸扭体法和热甩尾法模型, 观察Hyp对急性疼痛的镇痛作用。**结果** 100、200 mg/kg的Hyp能够抑制二甲苯所致小鼠耳廓肿胀、降低急性炎症引起的毛细血管通透性增高、减少醋酸扭体次数、提高小鼠热刺激痛阈值, 与对照组比较差异显著( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

**结论** Hyp对小鼠急性炎症疼痛具有抑制作用。

**关键词:** 金丝桃苷; 急性炎症; 疼痛; 小鼠

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2016)05-0768-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2016.05.012

## Effects of hyperin on mice with acute inflammatory pain

SHI Ning, GUO Hong-ju, WANG Huan, ZHANG Yu-min, PAN Min-xiang, ZHU You-zhi, CHANG Li-rong

Department of Pharmacy, The 306th Hospital of P.L.A, Beijing 100101, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the anti-inflammatory and analgesic effects of hyperin (Hyp) in mice with acute inflammatory pain. **Methods** Kunming mice were randomly divided into five groups: control group, Hyp low, medium and high dose (50, 100, and 200 mg/kg) groups, and hydrocortisone (positive drug, 20 mg/kg) group, sc relative drug once daily for 5 d. The anti-inflammatory actions of Hyp were tested by evaluating auricle edema levels induced by xylene and blood capillary leakage of abdominal cavity in mice. The positive drug was set to morphine (1 mg/kg), drug administration of other groups was the same as acute inflammation test. After 5 d, acetic acid writhing and thermal tail-flick tests were used to measure the acute analgesic effects. **Results** Both 100 and 200 mg/kg Hyp inhibited auricle edema levels, reduced blood capillary leakage, decreased the number of writhing, and increased the pain threshold of thermal stimulation. **Conclusion** Hyp has inhibitory effects in mice with acute inflammatory pain.

**Key words:** hyperin; acute inflammatory; pain; mice

金丝桃苷(Hyp), 又名槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷, 属于黄酮醇苷类化合物, 其苷元为槲皮素, 糖基部分为吡喃半乳糖。Hyp在天然植物中分布广泛, 生物活性多样, 具有潜在的应用前景。已有文献报道Hyp具有保肝护肝<sup>[1-2]</sup>、抗氧化<sup>[3-4]</sup>、保护心、脑血管<sup>[5-6]</sup>、保护神经系统<sup>[7-8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9]</sup>、镇痛抗炎<sup>[10]</sup>等多种药理活性。其作用的分子机制可能和抗氧化应激、调节相关免疫分子表达相关。在文献回顾中

发现, 目前尚未见Hyp对急性炎症疼痛作用研究的相关报道, 因此本课题组建立小鼠急性炎症疼痛模型, 考察Hyp对此类模型的抗炎镇痛作用效果, 为Hyp开发与利用提供理论参考和数据补充。

### 1 材料

#### 1.1 动物

SPF级昆明小鼠, 体质量18~22 g, 雌雄各半, 购于北京维通利华公司。动物生产许可证号SCXK

收稿日期: 2016-07-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(3077263)

作者简介: 史 宁(1976—), 女, 江苏人, 主管药师, 硕士。Tel: 010-66356171 18611393976.

\*通信作者 常李荣, 男, 北京市安翔北路9号306医院药学部。Tel: 010-66354564 E-mail: changlirong@126.com

(京) 2011-0011。

## 1.2 药品与试剂

Hyp, 购自中国食品药品管理研究院, 批号 111521-201507; 氢化可的松注射液, 购自天津金耀药业有限公司, 批号 151106, 使用时用生理盐水配制; 盐酸吗啡注射液, 购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司, 规格 1 mL : 10 mg, 批号 160105-1; 伊文思蓝, 购自 Sigma 公司, 批号 E2129, 实验时用生理盐水配制; 二甲苯, 批号 20150506; 冰醋酸, 批号 20140529, 均购自国药集团化学试剂有限公司。

## 1.3 仪器

电子天平, AL204 Mettler Toledo 公司; TU-1810 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Z52 型医用离心机, 白洋离心机制造有限公司; 甩尾仪, YLS-12A 山东省医学科学院设备站。

## 2 方法

### 2.1 抗炎实验

#### 2.1.1 剂量设置及给药方式

参考已发表的相关文献数据<sup>[11]</sup>和预试实验结果, 本实验采用 sc 给药方式, 实验低、中、高 3 个剂量浓度分别设置为 50、100、200 mg/kg。昆明种小鼠 50 只, 根据体质量和性别随机分为 5 组: 对照组, Hyp 低、中、高剂量组, 氢化可的松 (20 mg/kg) 组, 每组 10 只。每天给药 1 次, 连续给药 5 d。

#### 2.1.2 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀炎症模型的作用

最后一次给药 40 min 后, 10  $\mu$ L 二甲苯均匀涂于小鼠右耳内外侧, 左耳涂以同样体积的蒸馏水作对照。40 min 后重复一次, 再过 40 min 后脱颈处死小鼠, 沿耳廓基线剪下双耳, 用直径 8 mm 的打孔器分别在两耳同一部位打下圆耳片, 迅速用电子天平称质量, 每只小鼠右耳片减去左耳片质量即为耳片炎症肿胀度, 计算耳肿胀率和耳肿胀抑制率。

耳肿胀率 = (右耳片质量 - 左耳片质量) / 左耳片质量

耳肿胀抑制率 = (对照组平均肿胀率 - 给药组平均肿胀率) / 对照组平均肿胀率

#### 2.1.3 对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高的作用

小鼠分组、给药方式、给药时间同“2.1.1”项。各组给药 40 min 后, 小鼠尾 iv 1%伊文思蓝生理盐水溶液, 给药体积为 5 mL/kg; 同时 ip 浓度为 1.2%的醋酸生理盐水, 给药体积为 5 mL/kg。40 min 后脱颈椎处死小鼠, 打开腹腔, 10 mL 生理盐水冲洗腹腔数次, 收集洗液, 离心取上清液, 紫外分光光

度计测定 610 nm 处各组吸光度 (A) 值。

## 2.2 镇痛实验

### 2.2.1 对冰醋酸所致小鼠扭体次数的影响

昆明种小鼠 50 只, 根据体质量和性别随机分为 5 组: 对照组, Hyp 低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组, 吗啡 (1 mg/kg) 组, 每组 10 只。每天给药 1 次, 连续给药 5 d。各组给药 40 min 后, 小鼠 ip 0.6%新鲜配制的冰醋酸溶液, 给药体积为 5 mL/kg。实验在温度 25  $^{\circ}$ C, 光线较暗, 安静的条件下进行, 观察人员分别记录 15 和 30 min 内各组小鼠出现扭体反应的次数, 计算各组药物扭体次数抑制率。

扭体次数抑制率 = (对照组扭体反应次数 - 给药组扭体反应次数) / 对照组扭体反应次数

### 2.2.2 对小鼠光热辐射甩尾痛阈值的影响

正式分组前剔除未经任何处理对光热辐射刺痛超敏感和极不敏感的小鼠 (在 26 W 的刺痛功率下, 淘汰痛阈值小于 3 s, 和痛阈值大于 12 s 小鼠)。取用符合实验条件的小鼠, 分组、给药方式、给药时间均同“2.2.1”项。甩尾仪实验功率设定为 26 W, 最大光照刺痛时间设置为 16 s。以小鼠甩尾反应潜伏期作为痛阈, 给药前每只小鼠测定痛阈值 3 次, 3 次的平均值作为基础痛阈。各组给药 40 min 后再测定其痛阈值, 计算甩尾痛阈提高值。

甩尾痛阈提高 = (给药组痛阈值 - 基础痛阈值) / 给药组痛阈值

## 2.3 统计学处理

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验进行统计学处理分析, 对所测定结果进行方差齐性检验, 各组间比较使用单因素方差分析检验。

## 3 结果

### 3.1 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀炎症模型的影响

与对照组比较, 氢化可的松组, Hyp 100、200 mg/kg 组对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀具有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表明 Hyp 可以剂量依赖性的改善二甲苯所致小鼠耳廓肿胀, 结果见表 1。

### 3.2 对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高模型的作用

与对照组比较, 氢化可的松组, Hyp 100、200 mg/kg 组对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高具有明显的抑制作用 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 表明 Hyp 可以剂量依赖性的改善醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高, 结果见表 2。

表 1 Hyp 对二甲苯所致小鼠耳廓肿胀的拮抗作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 1 Antagonism action of Hyp for auricle edema levels induced by xylene ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 两耳质量差/mg  | 耳肿胀率/%        | 耳肿胀抑制率/% |
|-------|---------------------------|-----------|---------------|----------|
| 对照    | —                         | 12.4±1.9  | 124.98±22.98  | —        |
| 氢化可的松 | 20                        | 5.6±3.3** | 59.78±34.03** | 52.17    |
| Hyp   | 50                        | 11.9±1.7  | 122.22±20.04  | 2.21     |
|       | 100                       | 9.6±3.0*  | 98.23±30.76*  | 21.40    |
|       | 200                       | 6.6±2.9** | 62.66±28.74** | 49.86    |

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ , 下同\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group, same as below表 2 Hyp 对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 2 Inhibition of Hyp on increase of blood capillary leakage of abdominal cavity in mice induced by acetic acid ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别    | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | A值             |
|-------|---------------------------|----------------|
| 对照    | —                         | 0.575±0.0531   |
| 氢化可的松 | 20                        | 0.231±0.0389** |
| Hyp   | 50                        | 0.558±0.0705   |
|       | 100                       | 0.406±0.0612*  |
|       | 200                       | 0.301±0.0380** |

### 3.3 对冰醋酸所致小鼠扭体的作用

在 15 min 的观察时间内, 与对照组比较, Hyp 200 mg/kg 组对小鼠扭体次数有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ ); 在 30 min 的观察时间内, 与对照组比较, Hyp 100、200 mg/kg 组对小鼠扭体次数具有显著抑制作用 ( $P < 0.05$ 、0.01)。表明 Hyp 可以剂量依赖性的减少冰醋酸所致小鼠扭体次数, 结果见表 3。

### 3.4 对小鼠热甩尾痛阈值的作用

与对照组比较, 吗啡组, Hyp 100、200 mg/kg 组小鼠甩尾痛阈值明显提高 ( $P < 0.05$ 、0.01)。结果见表 4。

表 3 Hyp 对冰醋酸所致小鼠扭体次数的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 3 Effect of Hyp on number of writhing induced by acetic acid ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 扭体数/次      |            | 抑制率/%  |        |
|-----|---------------------------|------------|------------|--------|--------|
|     |                           | 15 min     | 30 min     | 15 min | 30 min |
| 对照  | —                         | 48.3±5.3   | 27.4±3.1   | —      | —      |
| 吗啡  | 1                         | 25.5±4.2** | 8.6±4.1**  | 47.2   | 68.6   |
| Hyp | 50                        | 46.2±2.5   | 24.7±6.9   | 4.3    | 9.8    |
|     | 100                       | 40.3±4.6   | 15.9±2.8*  | 16.5   | 42.0   |
|     | 200                       | 34.2±3.3*  | 10.5±4.4** | 29.2   | 61.7   |

表 4 Hyp 对小鼠甩尾痛阈值的作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )Table 4 Effect of Hyp on pain threshold of thermal stimulation ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别  | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 痛阈值/s        | 痛阈提高值/% |
|-----|---------------------------|--------------|---------|
| 对照  | —                         | 7.66±2.65    | —       |
| 吗啡  | 1                         | 14.68±3.76** | 91.6    |
| Hyp | 50                        | 8.65±2.34    | 12.9    |
|     | 100                       | 10.65±5.23*  | 39.0    |
|     | 200                       | 12.54±4.21** | 63.7    |

## 4 讨论

Hu 等<sup>[12]</sup>研究发现, 在慢性炎性小鼠疼痛模型中, Hyp 能够下调中脑导水管周围灰质中 NMDA 受体 NR2B 亚型水平, 从而发挥持久的抗炎镇痛作用; Lee 等<sup>[13]</sup>采用大鼠腹腔巨噬细胞炎性模型, 发现 Hyp 通过降低 p44/p42 MAPK、p38 MAPK 和 JNK 分子的表达而下调 iNOS 表达, 减少 NO 产生, 发挥抗炎作用; Kim 等<sup>[14]</sup>研究发现, Hyp 可抑制小鼠腹腔巨噬细胞炎症模型中的 NF- $\kappa$ B 活性, 产生系列生理效应, 达到抗炎作用; 以上研究结果表明 Hyp 在调节

慢性炎症免疫反应方面确可发挥积极作用。

在以血管通透性为主要改变的急性炎症模型实验中,本实验以小鼠急性炎症模型为研究对象,100、200 mg/kg 的 Hyp 对二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀的急性炎症具有明显的抑制作用,抑制率分别为21.40%、49.86%;在 Hyp 对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性增高模型的作用中,100、200 mg/kg 的 Hyp 对醋酸引起的腹腔毛细血管通透性增高有明显的抑制作用,且随着剂量增大,抑制作用越明显。本研究结果表明, Hyp 不仅对慢性炎症疼痛起到抗炎镇痛的作用,对于急性炎症模型也有较好的抑制作用。

陈志武等<sup>[15]</sup>以蛙坐骨神经疼痛模型为研究对象,发现 Hyp 能够抑制氯化钾诱发的钙离子内流,其镇痛作用可能与减少感觉神经末梢钙离子内流有密切关系。宋必卫等<sup>[16]</sup>以 Hyp 5  $\mu\text{g/mL}$  侧脑室注射的方式,在小鼠甩尾试验和热板法实验中证实了 Hyp 具有镇痛作用。本实验采用 sc 给药方式,以小鼠急性甩尾试验和醋酸扭体为研究模型,结果显示100、200 mg/kg 的 Hyp 明显提高激光热刺激引起的小鼠的疼痛阈值,痛阈提高分别为39.0%、63.7%;能够明显抑制冰醋酸所致小鼠扭体的次数,其15 min 的抑制率分别为16.5%、29.2%,30 min 的抑制率分别为42.0%、61.7%。本实验结果显示, Hyp 对于急性疼痛也具有一定的抑制作用。

醋酸扭体是一种经典的炎剂所致内脏疼痛模型,多用于评价和筛选甾体类抗炎药镇痛作用效果;辐射热刺激甩尾法模拟的是脊髓反射刺激,常用于麻醉性镇痛药物的评价和筛选。本研究中 Hyp 可能是抑制和下调了外周组织中的 TNF- $\alpha$ 、COX-2、NF- $\kappa\text{B}$  等相关炎症因子的表达,降低了炎症的侵害和发展,从而起到了抗炎镇痛的作用;其对于热辐射刺激甩尾镇痛机制,推测是抑制了中枢系统某些神经递质的表达,但其确切的作用机制目前尚不十分明确。有关 Hyp 的镇痛、抗炎机制方面,特别是对于其中枢镇痛作用机制,本课题组还将进一步做深入研究。

#### 参考文献

- [1] 黄明春, 陈剑鸿, 胡小刚, 等. 金丝桃苷对  $\text{CCl}_4$  诱导大鼠急性肝损伤抗氧化应激研究 [J]. 局解手术学杂志, 2013, 22(6): 588-590.
- [2] Choi J H, Kim D W, Yun N, *et al.* Protective effects of

hyperoside against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice [J]. *J natprod*, 2011, 74(5): 1055-1060.

- [3] Piao M J, Kang K A, Zhang R, *et al.* Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect [J]. *Biochim Biophys Acte*, 2008, 1780(12): 1448-1457.
- [4] Xing H Y, Liu Y, Chen J H. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(4): 759-765.
- [5] 邹毅清, 聂海贵, 张福清, 等. 金丝桃苷预处理对大鼠全脑缺血再灌注后神经行为学的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(12): 1340-1342.
- [6] 王启海, 陈志武. 金丝桃苷对离体大鼠腹主动脉的舒张作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 766-770.
- [7] Haas J S, Stolz E D, Betti A H. The anti-immobility effect of hyperoside on the forced swimming test in rats is mediated by the D2-like receptors activation [J]. *Planta Med*, 2011, 77(4): 334-339.
- [8] Zhang X N, Li J M, Yang Q. Anti-apoptotic effects of hyperoside via inhibition of NR2B-containing NMDA receptors [J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(5): 949-955.
- [9] 王丽敏, 江清林, 毕士有, 等. 金丝桃苷对体外肿瘤细胞增殖的抑制作用研究 [J]. 黑龙江医药科学, 2010, 33(1): 73-74.
- [10] 章家胜, 陈志武, 王 瑜, 等. 金丝桃苷脊髓镇痛作用及机制的研究 [J]. 安徽医学, 1998, 19(5): 3-5.
- [11] 白雪莲. 苹果渣多酚分离鉴定与体外抗氧化和抗炎活性初步研究 [D]. 西北农林科技大学, 2011.
- [12] Hu J, Wang Z, Guo Y Y. A role of periaqueductal grey NR2B-containing NMDA receptor in mediating persistent inflammatory pain [J]. *Mol Pain*, 2009, 5(1): 1-10.
- [13] Lee S, Park H S, Notsu Y. Effects of hyperin isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(11): 1552-1556.
- [14] Kim S J, Um J Y, Lee J Y. Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  activation in mouse peritoneal macrophages [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 171-181.
- [15] 陈志武, 马传庚, 徐叔云. 金丝桃苷镇痛作用的机制 [J]. 药理学杂志, 1989, 24(5): 326-330.
- [16] 宋必卫, 陈志武, 马传庚, 等. 金丝桃苷对中枢神经系统的一般药理作用 [J]. 安徽医科大学学报, 1995, 30(4): 253-255.