

野罂粟总生物碱镇痛作用与 Ca^{2+} 和 NO 的关系

杨宇杰¹, 袁亚非¹, 刘豫安¹, 王春民^{2*}, 佟继铭¹

(1. 承德医学院, 河北 承德 067000; 2. 承德颈复康药业集团有限公司, 河北 承德 067000)

野罂粟总生物碱 (total alkaloids of *Papaver nudicaule*, TAPN), 是从罂粟科植物野罂粟中提取出来的总生物碱, 作为一种新型镇痛药具有良好的开发前景。前期研究工作已初步确定了 TAPN 镇痛作用部位主要在外周, 同时也具有中枢镇痛作用, 且在脊髓以上水平^[1]; 进一步研究表明 TAPN 抑制前列腺素 (PGs) 的合成, 可能是其发挥外周镇痛作用的主要机制, 且其中枢镇痛作用与阿片受体无关^[2]。 Ca^{2+} 及 NO 作为重要的信息物质, 其对疼痛的影响近年来颇受关注。 Ca^{2+} 与疼痛及镇痛之间关系的深入研究表明, Ca^{2+} 在疼痛和镇痛方面起着非常重要的作用^[3,4]。NO 是近年发现的一种不同于传统的信息传递分子, 目前已有大量证据表明 NO 在外周及中枢的不同水平的痛觉调制中起重要作用^[5~7]。本实验着重探讨 TAPN 的镇痛作用与 Ca^{2+} 和 NO 的关系, 进一步探讨 TAPN 的镇痛作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂: TAPN (质量分数 59.3%), 承德医学院中药研究所提供; 维拉帕米 (Verapamil, Ver), 上海第十制药厂生产, 批号 010201; 醋酸, 化学纯, 上海化学试剂厂出品, 批号 980425; CaCl_2 , 化学纯, 上海泗联化工厂出品, 批号 990402; 乙二胺四乙酸 (EDTA), 分析纯, 上海试剂一厂生产, 批号 960806。NO 试剂盒, 南京建成生物工程研究所产品, 批号 20020410。

1.2 仪器: 岛津 260 紫外-可见分光光度计, 日本; DT-100A 分析天平, 北京光学仪器厂; XHF-1 高速分散器, 上海金达生化仪器厂; TLL-D 台式冷冻离心机, 军事医学科学院实验仪器厂。

1.3 动物: 昆明种小鼠, 18~22 g, 由河北省实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 04056 号。

2 方法与结果

2.1 数据处理: 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间的差异性比较采用方差分析, 结合 Student *t* 检验。

2.2 TAPN 镇痛作用与 Ca^{2+} 的关系: 采用小鼠热

板法观察 CaCl_2 、EDTA 及 Ver 对 TAPN 镇痛作用的影响。把小鼠放到预先加热至 55 ℃ 的恒温金属铜板上, 以舔后足为痛反应指标。实验动物均为雌性、基础痛阈在 30 s 内的小鼠 (给药前间隔 5 min 测得小鼠两次痛反应潜伏期, 以两次的均值作为基础痛阈)。给药后痛反应潜伏期延长一倍以上者, 作为有效镇痛作用, 最长测定时间不超过 60 s。取雌性小鼠 70 只, 随机分为 7 组, 每组 10 只, 各组 ip 给予生理盐水 (NS) 或 TAPN 后 15 min icv 给予 NS、 CaCl_2 或 EDTA, 15 min 后以热板法测各组小鼠痛阈。各组给药途径、剂量及结果见表 1。可见, icv EDTA 降低中枢 Ca^{2+} 浓度有一定的镇痛作用, 并可显著增强 TAPN (ip) 的镇痛作用; icv CaCl_2 升高中枢 Ca^{2+} 浓度对小鼠痛阈无明显影响, 但可显著拮抗 TAPN 的镇痛作用, 而 icv Ver 又可部分逆转 CaCl_2 对 TAPN 镇痛作用的拮抗。

表 1 CaCl_2 、EDTA 和 Ver (icv) 对 TAPN (ip) 在小鼠体内镇痛作用的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of CaCl_2 , EDTA, and Ver (icv) on analgesia of TAPN (ip) in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	给药途径	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	痛阈值/s	
			基础	给药后
A NS+NS	ip+icv	—+—	16.8±3.2	17.1±3.4
B NS+ CaCl_2	ip+icv	—+2	18.1±4.1	17.9±4.5
C NS+EDTA	ip+icv	—+0.25	17.3±3.4	39.6±5.2*
D TAPN+NS	ip+icv	74+—	17.5±2.9	48.4±6.1**
E TAPN+ CaCl_2	ip+icv	74+2	18.2±4.1	30.2±3.7*▲▲
F TAPN+EDTA	ip+icv	74+0.25	16.7±3.6	58.6±5.1*△△▲
G TAPN+(CaCl_2 +Ver)	ip+icv	74+(2+0.25)	17.2±3.3	34.5±4.6*△

与 A 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 C 组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$; 与 D 组比较: ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs group A; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs group C; ▲ $P<0.05$ ▲▲ $P<0.01$ vs group D

2.3 TAPN 镇痛作用与 NO 的关系: 采用小鼠扭体法研究 NO 对 TAPN 镇痛作用的影响。小鼠 ip 0.7% 醋酸 0.1 mL/10 g, 引起扭体反应 (腹部内凹, 躯干与后腿伸直, 臀部高起), 观察、记录每 10 min 内发生扭体反应的次数。以给药后扭体次数减

收稿日期: 2005-04-16

作者简介: 杨宇杰 (1969—), 女, 医学硕士, 副教授, 研究方向为中药新药开发与研究。

* 通讯作者 王春民 Tel: (0314) 2154520

少 50% 以上为有效镇痛作用指标。

小鼠脑组织中 NO 水平测定 (硝酸还原酶法)^[8]: 将小鼠快速断头取脑, 应用 XHF-1 高速分散器按 NO 试剂盒中提供的方法制成 10% 组织匀浆 (5 r/min, 20 s, 0 ℃), 按照 NO 试剂盒的操作步骤进行, 测定脑组织中 NO 水平 (蛋白定量采用双缩脲法)。

取小鼠 70 只, 随机分为 7 组, 即正常组、NS 组、TAPN (74 mg/kg) 组、CaCl₂ (2 mg/kg) 组、EDTA (0.25 mg/kg) 组、TAPN + CaCl₂ 组和 TAPN + EDTA 组。除正常组外, TAPN 及 NS 组 ip 给药后 15 min ip 0.7% 醋酸 0.1 mL/10 g (EDTA 及 CaCl₂ 在 ip 醋酸时 icv 给药), 5 min 后开始记录各组小鼠 10 min 内的扭体反应次数, 然后将 7 组小鼠快速断头取脑, 制成 10% 脑组织匀浆, 测定脑组织中 NO 水平, 结果见表 2。可见, icv CaCl₂ 升高中枢 Ca²⁺ 浓度对小鼠扭体反应数无明显影响, icv EDTA 降低中枢 Ca²⁺ 浓度可减少小鼠扭体反应数; ip TAPN 可显著减少醋酸所致的扭体反应数, 同时可显著降低醋酸致扭体后小鼠脑组织中升高的 NO 水平, 并且此作用可被 CaCl₂ 拮抗, 被 EDTA 加强。

表 2 醋酸致扭体试验小鼠扭体反应数及脑组织中 NO 水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Writhing response number and NO level in brain tissue of mice in acetic acid-writhing test ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	给药途径	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	扭体反应/ (次 · 10 min ⁻¹)	NO/ (μmol · g ⁻¹)
正常	—	—	—	4.1 ± 0.9**
NS	ip	—	23.2 ± 4.3	9.5 ± 1.2
TAPN	ip	74	3.2 ± 1.4**	6.6 ± 1.1*
CaCl ₂	icv	2	25.4 ± 5.1	10.1 ± 0.8
EDTA	icv	0.25	17.2 ± 3.7*	9.2 ± 1.1
TAPN + CaCl ₂	ip + icv	74 + 2	15.8 ± 3.2*△	9.3 ± 1.0△
TAPN + EDTA	ip + icv	74 + 0.25	1.3 ± 0.5**	4.2 ± 0.7**△

与 NS 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 TAPN 组比较: △ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs NS group

△ $P < 0.05$ vs TAPN group

3 讨论

Hano 等^[9]早期的报道和许多学者的研究表明, Ca²⁺ 在调节细胞内信号释放中起重要作用, 神经细胞中 Ca²⁺ 增多可使痛阈下降, 产生疼痛, 而 Ca²⁺ 减少则有镇痛作用。Kavaiers 等发现钙通道阻滞剂硝苯吡啶有一定的镇痛作用, 而钙通道激动剂 BAYK₈₆₄₄ 则有显著的痛敏作用^[10]。现已发现不少中药镇痛剂 (如粉防己碱、金丝桃苷及刺乌头碱、芦丁

等), 其镇痛作用与拮抗 Ca²⁺ 有关^[11,12], 这无疑对开发研究新的镇痛药有一定意义。本研究结果表明, icv CaCl₂ 造成中枢高钙状态可显著拮抗 TAPN 的镇痛作用, 而 icv Ca²⁺ 络合剂 EDTA 造成中枢低钙状态则可显著增强 TAPN 的镇痛作用, 并且 CaCl₂ 对 TAPN 镇痛作用的拮抗可被钙内流阻滞剂 Ver 部分逆转 (预试验表明 Ver 本身无明显的镇痛作用), 说明 Ca²⁺ 对 TAPN 镇痛作用的拮抗与 Ca²⁺ 内流有关, 由于 Ver 仅对 L 型通道的 Ca²⁺ 内流有阻滞作用, 而对经 N、T 型通道的 Ca²⁺ 内流无影响, 因此, Ver 的逆转作用仅是部分的, 同时也说明 TAPN 的镇痛作用与中枢性钙拮抗有关。

NO 不仅是一种自由基, 更是一种神经递质, 在疼痛中枢传递中有着重要作用^[13~15]。与慢性痛有关的痛觉过敏和异动现象 (Allodynia) 的机制问题近年来引起了人们的兴趣。在人类, 痛觉过敏是指机体对痛的敏感性提高。机体周围感受器对活性炎症调节物质起反应时会发生过敏现象, 这种敏化过程的周围机制已被阐明, 痛觉过敏的形成主要与此有关。但是不断积累的证据提示, 中枢本身亦参与痛觉过敏状态的形成和维持。已经证明机体一些伤害感受性反应的产生有赖于 N-甲基 D-天门冬氨酸 (NMDA) 受体的激活和 NO 的生成, 最近亦有资料表明 NO 可增敏痛觉感受器的反应性, 并可介导前列腺素 (PG) 合成及释放过程^[16], 研究证实脊髓 NMDA 受体、神经激肽 1 (NK1) 受体的激活可能在中枢敏化化的形成过程中发挥着重要作用^[17], 外周伤害性刺激的传入可引起初级传入末梢释放 P 物质、谷氨酸等痛觉递质, 激活 NK1 受体、NMDA 受体等引起 Ca²⁺ 大量内流, 从而导致 Ca²⁺ 依赖性细胞内过程。神经细胞中的 NO 合成酶系一种 Ca²⁺ 依赖性的结构酶, 疼痛过程中细胞内 Ca²⁺ 浓度增高, 可促进 NO 的合成。本研究结果表明, TAPN 在镇痛时, 能显著降低醋酸致扭体后小鼠脑组织中增高的 NO, 并且此作用可被 EDTA 加强, 被 CaCl₂ 拮抗, 提示 TAPN 的镇痛作用也与 NO 有关, NO 机制参与了 TAPN 的中枢镇痛作用。

References:

- [1] Yang Y J, Wang C M, Yuan Y F, et al. Analgesic sites of total alkaloids in *Papaver nudicaule* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 554-557.
- [2] Yang Y J, Tong J M, Yuan Y F, et al. Relationship between analgesic effect of total alkaloids in *Papaver nudicaule* and prostaglandins with opium receptors [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(7): 1038-1041.
- [3] Contesras E, Tamayo L, Amigo M. Calcium channel antagonists increase morphine tolerance [J]. *Eur J Pharmacol*,

- 1988, 148(3): 463.
- [4] Chen Z W, Fang M, Ma C G, *et al.* The studies on analgesic action of brain natriuretic peptide and its mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1997, 13(6): 538-540.
- [5] Kawabata A, Manabe S, Manabe Y, *et al.* Effect of topical administration of L-arginine on formaline-induced nociception in the mouse; A dual role of peripherally formed NO in pain modulation [J]. *Br J Pharmacol*, 1994, 112: 547-550.
- [6] Malmberg A B, Yaksh T L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats [J]. *Pain*, 1993, 54: 291-300.
- [7] Yang Q, Lu J T, Zhou A W, *et al.* Antinociceptive effect of astragalosides and its mechanism of action [J]. *Acta Pharm Sin* (中国药理学报), 2001, 22(9): 809-812.
- [8] Luo X Y, Zhang X M, Gao W, *et al.* Studies on site of analgesic action of matrine and its mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(1): 41-43.
- [9] Hano K, Kaneto H, Kakunaga T. Significance of calcium ion in the morphine analgesia [J]. *JPN J Pharmacol*, 1964, 14(3): 227.
- [10] Kavaliers M, Ossenkopp K P. Calcium channel involvement in magnetic field inhibition of morphine-induced analgesia, Naunyn-Schmiedeberg's [J]. *Arch Pharmacol*, 1987, 336: 308.
- [11] Du X, Gao K B, Liu S Y, *et al.* Study on the analgesic mechanism of the traditional Chinese medicine Qinglongyi [J]. *J Haerbin Med Univ* (哈尔滨医科大学学报), 1995, 29(4): 314-316.
- [12] Song B W, Tian W, Chen Z W, *et al.* Central analgesic activity and possible mechanism of rutin [J]. *Acta Univ Med Anhui* (安徽医科大学学报), 1996, 31(1): 1-2.
- [13] Snyder S H. Nitric oxide; First in a new class of neurotransmitters [J]. *Science*, 1992, 257: 494-496.
- [14] Culotta E, Koshland D E. NO news is good news [J]. *Science*, 1992, 258: 1862-1865.
- [15] Zhu X Z, Luo L G. Effects of nitroprusside (nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices [J]. *J Neurochem*, 1992, 59: 932-935.
- [16] Haley J E, Dickenson A H, Schachter M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat [J]. *Neuropharmacology*, 1992, 31: 51-58.
- [17] Millan M J. The induction of pain: an integrative review [J]. *Prog Neurobiol*, 1999, 57: 159-164.

化州柚提取物的抗炎作用

李沛波, 马 燕, 杨宏亮, 贾 强, 王永刚, 苏薇薇

(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

化州柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck var. *to-mentosa* Hort. 又称化州仙橘, 系芸香科柑桔属植物, 为柚 *Citrus grandis* (L.) Osbeck 的栽培变种, 主产于广东化州, 是广东的地道药材。化州柚的未成熟或近成熟的干燥外层果皮经加工即为中药化橘红, 习称“毛橘红”, 具有化痰、理气、健胃、消食之功效, 用于治疗胸中痰滞, 咳嗽气喘, 呕吐呃逆, 饮食积滞等症。为进一步开发化州柚, 本实验对化州柚提取物进行抗炎作用的动物实验研究。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂: 化州柚(全果实)提取物(采用水提醇沉法自制, 黄酮类成分占 70% 以上); 阿司匹林片, 河北石家庄制药集团生产, 批号 041114; 乌拉坦, 国药集团化学试剂有限公司生产, 批号 E60521; 二甲苯, 广东光华化学厂有限公司生产, 批号 20050218。

1.2 动物: 昆明种小鼠, 雄性, 体重 18~22 g, SPF 级, 由南方医科大学实验动物中心提供, 动物合格证

号: 2004A063; SD 大鼠, 雄性, 体重 130~170 g, 清洁级标准, 由中山大学实验动物中心提供, 动物合格证号: 粤检证字 2003A070。

1.3 仪器: 大鼠足跖容积测定装置: 参照文献方法^[1]定制。

1.4 方法

1.4.1 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响^[1]: 取昆明种小鼠 72 只, 随机分为 6 组, 即正常组、模型组、化州柚提取物低、中、高剂量 (20、40、80 mg/kg) 组、阳性对照药物 (阿司匹林 200 mg/kg) 组, 每组 12 只。实验前小鼠禁食不禁水 12 h, 然后各组小鼠按 0.1 mL/10 g ig 给药, 每天 1 次, 共 7 d, 其中正常组和模型组给等体积蒸馏水。末次给药后 30 min, 除正常组外, 其余各组小鼠于左耳正反两面涂上二甲苯 50 μ L 致炎, 致炎 1 h 后脱颈椎处死动物, 用直径 9 mm 打孔器冲下左耳和右耳同一部位的圆片, 于分析天平上称质量, 以两耳片质量差值为炎症肿胀度, 并计算肿胀抑制率。

收稿日期: 2005-06-10

基金项目: 广东省科技计划项目 (2004A30103006)

作者简介: 李沛波 (1973—), 男, 湖南涟源人, 博士, 2004 年毕业于中山大学药理学专业, 现为中山大学生命科学学院讲师, 主要研究方向为中药新药研究与心血管药理学。Tel: (020) 84112398 E-mail: lipb73@yahoo.com.cn