

- seng Nees.) on blood sugar in rat [J]. *J Taishan Univ* (泰山学院学报), 2003, 25(3): 75-76.
- [2] Su W L, Gao F, Yu S L, et al. The pharmacological research of Renshen Jiangtang Capsule [J]. *Ginseng Res* (人参研究), 1994 (2): 16-18.
- [3] Liu J P, Lu D, Li P Y, et al. Effect of Shenguo Xiaoke Capsule on diabetic rats [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(2): 248-251.
- [4] Liu J P, Lu D, Li P Y, et al. Effect of Yangshenguo Xiaoke Capsule on diabetic rabbits [J]. *Chin J Comp Med* (中国比较医学杂志), 2005, 15(1): 25-28.
- [5] Xu S Y, Bian R L, Chen X. *Methodology in Pharmacological Experiment* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1991.
- [6] Huang C Y, Xie S R, Huang S Y. Effect of anemam on rabbit blood glucose [J]. *J Dalian Univ* (大连大学学报), 2004, 25(4): 98-99.
- [7] Chen Q. *Methodology in Pharmacological Study on Chinese Materia Medica* (中药药理研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.

静脉应用川芎嗪对 P2X 受体激动剂引起足底伤害性反应的影响

梁尚栋¹, 高云¹, 徐昌水¹, 徐文苑², 李桂林¹, 张爱霞¹, 王云霞¹

(1. 南昌大学医学院 生理学教研室, 江西南昌 330006; 2. 南昌大学医学院第一附属医院 神经内科, 江西南昌 330006)

Holton 发现在刺激外周神经引起逆行性血管扩张时感觉末梢有三磷酸腺苷 (ATP) 释放, 首次提示 ATP 参与感觉神经的信息传递。“嘌呤能神经”学说创立者英国科学家 Burnstock 于 1996 年提出, 不同类型细胞释放的 ATP 作用于感觉神经末梢的嘌呤受体引发疼痛^[1]。分子克隆技术显示 ATP 作用的 P2X₃ 受体选择性表达于与伤害性感受有关的小直径背根神经节 (DRG) 细胞^[2]; 清醒鼠足底注射 ATP 等 P2X 受体激动剂引起急性伤害性反应 (缩足反应)^[3,4]; 用电离子透入法将 ATP 注入到健康志愿者的皮肤内引发痛反应^[5]。这些实验结果均支持 Burnstock 提出的假设。嘌呤受体分为 P1 (腺苷) 和 P2 (腺嘌呤核苷酸) 受体两大类。目前又将 P2 受体分为 P2X (配体门控性离子通道受体) 和 P2Y (G 蛋白耦联受体)。

川芎具有活血化瘀、消肿止痛的作用。川芎嗪 (tetramethylpyrazine, TMP) 是川芎所含的一种生物碱, 对心、脑血管疾病有广泛的药理作用。文献报道 TMP 有抗炎作用^[6], 明显抑制白细胞和小胶质细胞的浸润及激活^[7], 由此提示它可能具有抗伤害性作用。本实验室以前的工作观察到 TMP 可抑制 ATP 兴奋交感神经节细胞 P2X 受体诱发的去极化电位^[8]。本实验观察静脉应用 TMP 对 ATP 等 P2X 受体激动剂引起大鼠足底伤害性反应的影响, 从而了解 TMP 的抗伤害性作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂: TMP, 批号 971102, 质量分数 99%, 无锡第七制药有限公司产品; ATP、 α, β -亚甲三磷酸腺苷 (α, β -methylene ATP, α, β -me ATP)、前列腺素 E₂ (PGE₂) 均为 Sigma 公司产品。

1.2 动物: 雄性 SD 大鼠, 200~220 g, 江西医学院实验动物科学部提供。

1.3 行为学实验^[3]: 实验前 1 周大鼠置于实验室饲养, 保证水和饲料供应, 实验室温度保持在 19~25 °C。实验时将大鼠放在透明有机玻璃盒 (20 cm × 30 cm × 30 cm) 内, 用一支架使透明有机玻璃盒高于实验台便于清楚观察大鼠足底。用小儿头皮静脉注射针进行大鼠尾静脉 iv 给药。大鼠随机分组: 对照组, 大鼠尾静脉 iv 生理盐水, 大鼠左足底 sc 注入 P2X 受体激动剂 (ATP 或 α, β -meATP); 实验组, 大鼠尾静脉 iv TMP (20、40、80 mmol/L), 大鼠左足底 sc 注入 P2X 受体激动剂 (ATP 或 α, β -meTAP) 或 α, β -meTAP 加 PGE₂。各组实验药物取较高浓度药液折算后 (保持为各组所需用药浓度) 混为 100 μ L 剂量 1 次注射, 所有药物用生理盐水配制。大鼠足底急性伤害性反应的观察指标为每 5 min 内的缩足反应次数或抬足和舔足时间, 连续观察 30 min, 每只大鼠仅做 1 次实验。

1.4 全细胞膜片钳实验: 有关大鼠 DRG 神经元标本的急性分离方法见文献方法^[9]。将大鼠击昏、断头

收稿日期: 2006-04-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30260030)

作者简介: 梁尚栋 (1957—), 男, 江苏镇江人, 教授, 博士生导师, 曾赴英国伦敦大学及匈牙利科学院实验医学研究所研修, 主要从事神经生理和神经药理研究。Tel: (0791) 6360552 E-mail: liangsd@hotmail.com

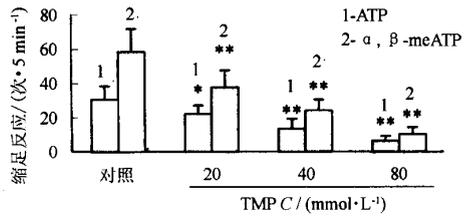
后迅速切开背部皮肤,沿脊柱两侧剪断与之相连的肋骨,取出胸腰段脊柱,由脊柱正中剖开成两半,置 O₂ 饱和的 DMEM 液内, pH 值 7.40, 溶液渗透压为 887.4 kPa。由剖开的椎管内侧取出神经节及相连的神经根(腹、背根)和脊神经,在解剖显微镜下用精细角膜剪及游丝镊仔仔细剪除相连神经和周围结缔组织被膜,将清除干净的 DRG 尽可能地剪碎,置培养瓶内并加入胰蛋白酶 (type III, Sigma) 0.5 g/L, 胶原酶 (type I A, Sigma) 1.0 g/L 在恒温振荡水浴器 (35 °C、80 次/min) 中孵育 20~30 min, 完成后加入适量的大豆胰蛋白酶抑制剂 (type II-s, Sigma) 以终止酶的消化作用。将上述酶和机械分离的 DRG 细胞转移至 35 mm 培养皿内, 放在倒置显微镜的载物台上换细胞外液静置 30 min。然后应用全细胞膜片钳技术^[9]记录 TMP 对 P2X 受体激动剂激活电流的影响。全细胞膜片钳记录所用的仪器为 CEZ-2400 型膜片钳放大器 (日本 Nihon-Kohden)。玻璃微电极内液成分为 (mmol/L): KCl 140、CaCl₂ 1、MgCl₂ 2、HEPES 10、EGTA 11、ATP 4, 电极电阻 2~5 MΩ。灌流液成分为 (mmol/L): NaCl 150、KCl 5、CaCl₂ 2.5、MgCl₂ 1、HEPES 10、D-Glucose 10。在电极与细胞膜之间形成高阻 (1~10 GΩ) 封接后进一步将膜吸破, 形成全细胞记录模式, 调节电容和串联电阻补偿。置保持电压于 -60 mV, 膜电流应用低通滤波 (1 kHz, -3 dB), 刺激脉冲 10 mV, 频率 10 ms。实验结果由记录仪 (LMS-2B, 成都) 描记。给药系通过微操纵器移动快速换药装置的排管进行, 每管直径为 0.2 mm, 管口距记录的细胞约 100 μm。室温 20~30 °C 进行。

1.5 统计处理: 实验数据用 $\bar{x} \pm s$, 用统计软件包 SPSS 10.0 以方差分析及 *t* 检验分析各组均值差异的显著性。

2 结果

2.1 静脉应用 TMP 对 P2X 受体激动剂引起足底伤害性反应的影响: 将 ATP (1 μmol/L) 或 α, β-me ATP (0.6 μmol/L) sc 于大鼠足底可产生缩足反应, 单独 sc 生理盐水于足底不产生伤害性反应。与对照组相比, 大鼠尾静脉 iv TMP (20、40、80 mmol/L) 明显减少 ATP (1 μmol/L) 或 α, β-me ATP (0.6 μmol/L) 足底注射引起的大鼠缩足次数 (图 1)。TMP (20、40、80 mmol/L) 呈剂量依赖性地抑制 ATP 或 α, β-me ATP 产生的缩足反应 (图 1)。

2.2 静脉应用 TMP 对 α, β-me ATP 加 PGE₂ 引起的足底伤害性反应的影响: P2X 受体激动剂 α, β-me



与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01
P*<0.05 *P*<0.01 vs control group

图 1 TMP 对 P2X 受体激动剂引起的急性伤害性反应的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Inhibition of TMP on acute nociception induced by P2X receptor agonists ($\bar{x} \pm s, n=8$)

ATP (0.6 μmol/L) 加 PGE₂ (5 μmol/L) 同时 sc 大鼠足底引起的伤害性反应较单独注射 α, β-me ATP 时明显增强, 大鼠出现不间断的抬足和舔足现象。大鼠尾静脉 iv TMP (80 mmol/L) 时使 α, β-me ATP (0.6 μmol/L) 加 PGE₂ (5 μmol/L) 引起的大鼠抬足和舔足时间 [(149.45 ± 23.62) s/5 min, *n*=8] 较对照组 [(229.43 ± 18.35) s/5 min, *n*=8] 减少了 (34.86 ± 8.38)% (*P*<0.01)。

2.3 TMP 对 P2X 受体激动剂激活电流的抑制作用: 外加 P2X 受体激动剂 ATP 和 α, β-me ATP 可引起 DRG 细胞出现激活电流。预加 TMP (1 mmol/L) 30~60 s 后可使 ATP (100 μmol/L)-激活电流减少至 (41.3 ± 7.79)% (*n*=6, 图 2)。TMP (1 mmol/L) 使 α, β-me ATP (10 mmol/L)-激活电流减小至 (43.85 ± 6.20)% (*n*=7, 图 2)。

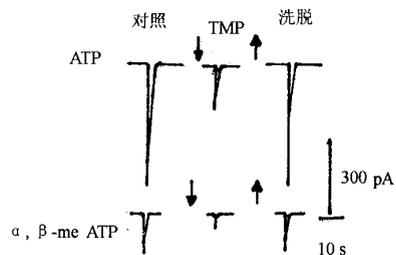


图 2 TMP 对 P2X 受体激动剂-激活电流的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of TMP on P2X receptor agonist-activated currents

4 讨论

当组织损伤、肿大、炎症、血管或内脏扩张, 神经损伤激活交感神经时可导致 ATP 在细胞间隙积聚并激活感觉末梢的 P2X 受体^[10]。注射 P2X 受体激动剂 ATP 或 α, β-me ATP 于大鼠足底可引起急性伤害性反应^[3,4]。当应用辣椒素损坏小直径感觉神经纤维后这种伤害性反应消失^[4], 所以大鼠足底注射

P2X 受体激动剂 ATP 或 α, β -me ATP 引起的伤害性反应与痛觉有关。炎症介质 PGE₂ 可增强伤害性感受器对伤害性刺激的反应,使伤害性感受器敏感。此外, PGE₂ 可上调 P2X 受体水平^[4],使 α, β -me ATP 引起的急性伤害性反应增强。本实验中观察到 iv TMP 对 P2X 受体激动剂 α, β -me ATP 与 PGE₂ 合用引起的伤害性反应具有抑制作用,由此提示 TMP 可阻断炎症介质 PGE₂ 增强 P2X 受体兴奋产生的伤害性信息传递。

ATP 作为外周疼痛的介质是因为细胞溶解的结果,这时贮存在细胞内的 ATP 大量释放^[11],如膝关节炎关节液中 ATP 浓度较高。TMP 具有钙拮抗作用,通过抑制钙超载,保持线粒体的完整性,对细胞具有保护作用^[7]。iv TMP 产生抗伤害性作用,可能与此有关。但也有文献报道,较大剂量 TMP 具有 L-型钙通道开放剂的作用^[12]。此研究中, TMP 的抗伤害性作用与浓度呈正比,高浓度的 TMP 抗伤害性作用更明显。因此,仅用 TMP 影响钙通道的作用来解释其抗伤害性作用尚不完善。结合全细胞膜片钳实验观察到 TMP 抑制 P2X 受体激动剂 ATP 或 α, β -me ATP 在大鼠背根神经节细胞激活的电位,以及 TMP 抑制交感神经节细胞 ATP 兴奋 P2X 受体诱发的去极化电位^[7],提示 TMP 可通过阻断 P2X 受体兴奋的信号传导抑制 P2X 受体激动剂引起的大鼠足底伤害性反应。

References:

- [1] Burnstock G. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain [J]. *Lancet*, 1996, 347: 1604-1605.
- [2] Chen C C, Akoplan A N, Sivilotti L, et al. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons [J]. *Nature*, 1995, 377: 428-431.
- [3] Blang-Ward P A, Humphrey P P A. Acute nociception mediated by hindpaw P2X receptor activation in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 1997, 122: 366-371.
- [4] Hamilton S G, Wade A, McMahon S B. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behavior induced by ATP analogues in the rat [J]. *Br J Pharmacol*, 1999, 126: 326-332.
- [5] Hamilton S G, Warburton J, Bhattacharjee A, et al. ATP in human skin elicits a dose-related pain response under conditions of hyperalgesia [J]. *Brain*, 2000, 123: 1238-1246.
- [6] Ozaki Y. Anti-inflammatory effect of tetramethylpyrazine and ferulic acid [J]. *Chem Pharm Bull*, 1991, 40: 954-956.
- [7] Wu Z G. The development of tetramethylpyrazine in pharmacology [J]. *J Wuhan Inst Chem Tech* (武汉化工学院学报), 2003, 25: 28-32.
- [8] Liang S D. Modulatory effects of tetramethylpyrazine on membrane response mediated by purinoceptors in the paravertebral sympathetic ganglion of toad [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin* (中国实验动物学报), 1999, 7: 47-51.
- [9] Hu H Z, Li Z W. Substance P potentiates ATP-activated currents in rat primary sensory neurons [J]. *Brain Res*, 1996, 739(1-2): 163-168.
- [10] Chizh B A, Illes P. P2X receptors and nociception [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53: 553-568.
- [11] Hamilton S G, McMahon S B. ATP as a peripheral mediator of pain [J]. *J Auto Nerv Syst*, 2000, 8: 187-194.
- [12] Pang P K, Shan J I, Chiu K W. Tetramethylpyrazine, a calcium antagonist [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 431-435.

泻心汤抗内毒素有效部位的初步筛选

熊玉霞¹, 孟宪丽^{1*}, 张 艺², 何毓敏²

(1. 成都中医药大学 药理教研室, 四川 成都 610075; 2. 成都中医药大学民族药研究所, 四川 成都 610075)

内毒素 (endotoxin, ET) 与临床多种疾病的发生、发展密切相关,近几十年来已发现近百种单味中药、中药复方及中药化学成分有抗内毒素作用,但目前关于中药抗内毒素作用研究主要集中在单味药及其化学成分上,尚缺乏复方有效部位 (群) 抗 ET 的相关研究^[1]。在这一领域,以经方为对象的研究具有十分明显的优势,本课题组选择泻心汤作为研究对象,抓住其清热解毒的主要功效,利用其组方简单的

特点,对其进行化学部位分离,采用甾剂动态凝胶法和内毒素发热动物模型对泻心汤不同提取部位进行内毒素作用的研究。

1 材料

1.1 药材及其极性部位制备: 大黄、黄连和黄芩购自四川省药材公司,大黄、黄连、黄芩按质量比 2:1:1 比例进行常规水提得水煎液 (得率 31.2%); 另取水煎液依次用氯仿和正丁醇萃取,得

收稿日期: 2006-04-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371756)

作者简介: 熊玉霞,女,四川成都人,讲师,在读硕士研究生,主要从事中药药理和毒理研究。E-mail: zyj7525@163.com

* 通讯作者 孟宪丽 Tel: 13540488646 E-mail: xlm999@cdutcm.edu.cn