

功能的作用强弱趋势是: 山茱萸/ 丹皮> “三补”方> 熟地/ 泽泻> 全方> “三泻”方> 山药/ 茯苓; 由 ADP 激活后 $[Ca^{2+}]_i$ 与对 ADP 诱导的家兔血小板聚集的 IC_{50} 成正相关, 即药物对 Ca^{2+} 释放的抑制越强, 其抑制血小板聚集的作用越强, 提示该方及其配伍抑制血小板的 Ca^{2+} 释放功能, 是其抑制血小板聚集的机制之一。

综上所述, 六味地黄方及其配伍均具有抗血小板聚集的作用, 其中山茱萸/ 丹皮药对的作用较其他配伍更显著。

参考文献:

- [1] 邓红, 王新, 徐芳, 等. 六味地黄汤对糖尿病大鼠肾功能及细胞凋亡的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(10): 1679-1682
- [2] 唐庆, 胡慧, 王全胜, 等. 六味地黄加味胶囊对糖尿病

- 肾病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性及结缔组织生长因子的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 77-81
- [3] 龚婕宁, 卞慧敏, 魏凯峰, 等. 六味地黄方抗血栓作用机理研究 [J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3-4): 10-12
- [4] 叶宏军, 卞慧敏, 张启春, 等. 六味地黄汤对阴虚血瘀证模型大鼠血液流变性的影响 [J]. 中国血液流变学杂志, 2008, 18(1): 14-16
- [5] 徐叔云, 卞如瀛, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002
- [6] Heemskerk J W M, Willems G M, Rook M B, *et al.* Ragged spiking of free calcium in ADP-stimulated human platelets: regulation of puff like calcium signals *in vitro* and *ex vivo* [J]. *Physiology*, 2001, 535: 625-635
- [7] Nesbitt W S, Giuliano S, Kulkarni S, *et al.* Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth [J]. *Cell Biol*, 2003, 160: 1151-1161
- [8] Offermanns S. Activation of platelet function through G protein coupled receptors [J]. *Circ Res*, 2006, 99: 1293-1304

1-甲氧基钩吻碱抗慢性疼痛作用

黄志毅, 刘铭, 沈洁, 苏燕评, 许盈, 俞昌喜*
(福建医科大学药学院 药理学系, 福建 福州 350004)

摘要:目的 1-甲氧基钩吻碱对福尔马林足底注射所致炎性痛及小鼠坐骨神经慢性压榨性损伤 (CCI) 所致神经病理性疼痛的作用。方法 建立小鼠福尔马林炎性疼痛模型, 以注射福尔马林后 1 h 内小鼠舔足时间为指标, 观察 1-甲氧基钩吻碱对炎性痛第二相痛反应的影响; 建立小鼠 CCI 模型, 于术后第 3 天至术后第 9 天 *sc* 1-甲氧基钩吻碱, 每天 2 次, 连续 7 d, 以双足热痛缩足潜伏期比值为指标, 观察 1-甲氧基钩吻碱对小鼠足底热痛缩足潜伏期的影响。结果 1-甲氧基钩吻碱具有显著对抗小鼠福尔马林致炎性疼痛第二相痛反应作用, 作用呈剂量依赖性, ED_{50} 为 4.59 mg/kg。1-甲氧基钩吻碱具有显著的抗 CCI 小鼠热辐射痛敏的作用, 镇痛效应呈剂量依赖性; 高剂量组小鼠给药后 2 d 显效, 镇痛疗效持续至停药后 36 h; 术后第 9 天, 1-甲氧基钩吻碱镇痛效应 ED_{50} 为 3.84 mg/kg。结论 1-甲氧基钩吻碱具有抗炎性疼痛作用与抗神经病理性疼痛作用。

关键词: 钩吻; 1-甲氧基钩吻碱; 炎性疼痛; 神经病理性疼痛

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2034-04

严重的急、慢性疼痛困扰着数以千万计的患者, 又以慢性疼痛最为多见、最为严重。慢性疼痛主要有两种类型: 炎性疼痛和神经病理性疼痛。药物镇痛是目前临床上减轻病人疼痛的主要手段之一, 吗啡等阿片类镇痛药和阿司匹林等解热镇痛抗炎药最为常用。但阿片类镇痛药易产生耐受性、成瘾性以及呼吸抑制、减少胃肠蠕动等副作用; 阿司匹林等解热镇痛抗炎药镇痛效力弱, 胃肠道反应、胃溃疡、胃出血等不良反应严重, 其临床应用受限, 效果不甚理想^[1]。因此, 寻找能有效控制疼痛的新型镇痛药是

当前新药研发热点之一。

目前, 国内外许多科学家致力于从动植物取材, 开发新型镇痛药。我国中草药资源丰富, 富含药用天然活性成分。钩吻 *Gelsemium elegans* (Gardn. et Champ.) Benth. 为马钱科植物胡蔓藤的全草, 俗称断肠草, 盛产于我国闽、粤、桂等地。钩吻提取物的主要有效成分为吲哚类生物碱, 包括钩吻素子、甲、寅、卯、辰、丙、丁、戊、己、庚以及胡蔓藤碱甲、乙、丙、丁等 10 多种单体, 其毒性大小不同^[2]。临床和基础研究表明^[3,4], 钩吻总生物碱具有显著的镇痛作

收稿日期: 2010-03-18

基金项目: 福建省改革与发展委员会产业技术开发项目 (2009); 福建医科大学重大科研项目 (ZD009)

作者简介: 黄志毅 (1984—), 男, 福建省厦门市人, 硕士研究生, 主要研究方向为神经精神药物药理学。

Tel: 15880268730 E-mail: hzybj@163.com

* 通讯作者 俞昌喜 Tel: (0591) 83569311 Fax: (0591) 83569311 E-mail: changxiyu@mail.fjmu.edu.cn

用,作用机制可能不同于阿片类或阿司匹林类镇痛药,效能仅次于吗啡,且无成瘾性、耐受性,无明显副作用;虽然其无累积性毒性,但治疗剂量却与中毒剂量较接近,因而临床应用受到限制。但其显著的临床疗效,使国内外对其普遍关注。近年对其研发日趋活跃,开始瞄准其中的单体。本实验室新近分离得到 1-甲氧基钩吻碱 (gelsevirine, GV) 单体^[5],本研究探讨 GV 对小鼠坐骨神经慢性压榨性损伤所致神经病理性疼痛及福尔马林足底注射所致炎性痛的作用,为其开发应用提供理论依据。

1 材料

1.1 药品与试剂:GV,本实验室制备,质量分数为 97.3%。注射用赖氨匹林,上海新亚药业有限公司提供。福尔马林溶液,浙江省温州助剂厂产品。

1.2 动物:昆明种雄性小鼠,体质量 18~22 g,清洁级,由上海斯莱克实验动物有限公司提供。光暗周期 12/12 h 的实验室饲养,自由饮食。

1.3 仪器:小鼠活动观察箱(自制):48 cm × 32 cm × 26 cm,上下无盖,共分为 12 格,材料为不透明黑色硬质塑料;透明观察板(自制)52 cm × 44 cm,材料为透明有机玻璃。PL-200 热刺激仪,成都泰盟科技有限公司产品。

2 方法

2.1 药物的配制:精密称取 GV 55 mg,加入 3.5 mL 0.2 mol/L HCl 溶解,以 5 mol/L NaOH 100 μ L 调 pH 值至 7,生理盐水定容至 50 mL,配制成终质量浓度为 10 mg/mL 溶液;再以生理盐水稀释。

2.2 福尔马林致小鼠炎性疼痛实验:参照文献方法^[6],建立小鼠福尔马林致炎性疼痛模型。实验环境温度 (22±1) °C,湿度 (55±10)%。实验小鼠置于观察箱内适应 3 d,每天 30 min。60 只小鼠随机分为生理盐水对照组,GV (10、2、0.4 mg/kg) 3 个剂量组,赖氨匹林 (100 mg/kg) 阳性对照组,每组 10~14 只动物。各组 sc 生理盐水或药物 0.5 h 后,小鼠左足底 sc 5% 福尔马林溶液 10 μ L,随即录像记录注射福尔马林后 60 min 内小鼠的活动情况。录制完毕后,回放录像,观察到小鼠后爪足底注射福尔马林溶液后,均表现出咬舔注射侧后爪、注射侧肢体抬高、抽搐等行为反应。每组动物观察时间内咬舔注射侧后爪反应明显分为两个时段,第一时段从注射福尔马林溶液后至注射后 10 min (第一相),第二时段为注射后 10~60 min (第二相);以 5 min 为一单元统计各小鼠舔足时间 (福尔马林注射足),并合计第一相 (1~10 min) 和第二相 (10~60 min)

两个时相的舔足时间作为痛反应指标^[7]。

2.3 小鼠坐骨神经慢性压榨损伤 (chronic constriction injury of sciatic nerve, CCI) 致神经病理性疼痛实验

2.3.1 热辐射基础痛阈的测定:实验过程中,环境温度 (22±1) °C,湿度 (55±10)%,痛阈测定时间为 9:00—16:00 时。测定前,将实验动物置测试环境中适应 30 min。待动物安静后,分别测定小鼠左右两侧足底对热辐射刺激的缩足反应时间即热辐射缩足反射潜伏期 (paw withdrawal latency, PWL),表示为 L 和 R,以 R/L 值为指标。连续测试 2 d,每天 2 次,筛选 4 次测试结果中 R/L 值接近 1 的 3 次痛阈平均值为基础痛阈。基础痛阈不合格的动物 (R/L 值 > 1.2 或 < 0.8) 被剔除。将基础痛阈合格的动物随机分成假手术组,模型组,GV (10、2、0.4 mg/kg) 3 个剂量组,每组 10~14 只动物。

2.3.2 小鼠 CCI 模型的建立:参照 Bennett 等^[8]方法,建立小鼠 CCI 模型。小鼠 ip 戊巴比妥钠 75 mg/kg 麻醉,俯卧位固定,剃除大腿附近的毛发,酒精消毒。从小鼠右后肢上部切开皮肤,直到接近膝部,钝性分离股二头肌,充分暴露坐骨神经。用 5-0 铬制羊肠线穿过坐骨神经,在神经上打个单结,再轻轻结扎第二个单结,结扎扣的松紧程度以右后肢轻微的颤动为宜。依次再做两个结环,每个结环间隔 1 mm。手术完成后,缝合肌肉和皮肤,ip 青霉素 1.2×10⁴ U/kg 预防感染。假手术组动物仅暴露坐骨神经并进行穿线操作,但不实施结扎。

2.3.3 观察指标与给药方法:CCI 模型建立后第 3 天,测定小鼠左右两侧足底热辐射缩足潜伏期,计算 R/L 值,剔除 R/L > 0.8 的动物。CCI 热痛阈合格的动物于术后第 3 天开始 sc 给药,给药体积为 0.1 mL/10 g,连续给药 7 d,2 次/d;第 1 次注射药物或生理盐水 30 min 后测定各组动物左右两侧足热辐射痛阈,以 R/L 值为评价指标进行统计学分析。测定时间为术后第 3、5、7、9、10、11、13 天。

2.4 统计学处理:采用统计软件 SPSS 16.0,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示;采用 Newmar-Keuls 法进行样本均数两两比较的 q 检验。

3 结果

3.1 GV 抗福尔马林致小鼠炎性疼痛的作用:在福尔马林致痛前 30 min sc 药物,观察药物对小鼠福尔马林诱发的咬/舔足时间的影响,结果见图 1。结果表明,GV 可显著抑制福尔马林致痛第 2 相咬/舔足痛反应,作用呈剂量依赖性 (图 2)。

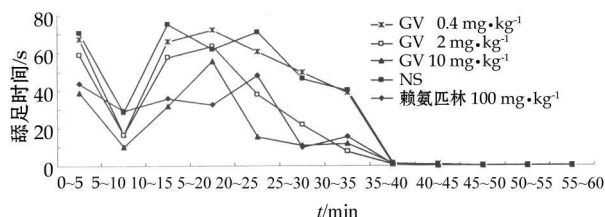


图 1 福尔马林致痛反应时程图

Fig. 1 Time courses of formalin induced biting/licking behaviors

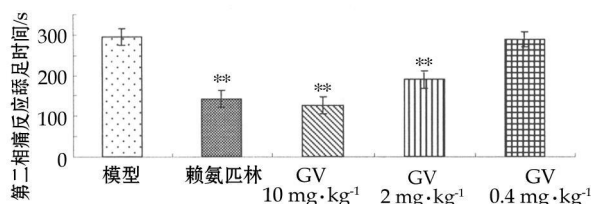
与模型组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 2 GV 对福尔马林致痛反应第 2 相的影响

Fig. 2 Effect of GV against Phase 2 of formalin induced biting/licking behaviors

计算不同剂量药物对小鼠的疼痛抑制率[疼痛抑制率= (对照组舔足时间- 给药组舔足时间)/ 对照组舔足时间 $\times 100\%$], GV 10、2 mg/kg 剂量组的疼痛抑制率分别为 57.14% ($P < 0.01$)、35.94% ($P < 0.01$)。以疼痛抑制率大于 50% 为镇痛有效, Bliss 法计算得到 GV 对第 2 相疼痛抑制作用的 ED_{50} 为 4.59 mg/kg, 95% 可信区间为 3.60~ 5.96 mg/kg。GV 对第 1 相疼痛反应亦有抑制作用, 10、2 mg/kg 剂量组的累计舔足时间与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。

3.2 GV 对 CCI 致神经病理性疼痛小鼠的治疗作用: 以热辐射缩足痛阈为指标, 观察 GV 对 CCI 致神经病理性疼痛小鼠的治疗作用, 结果见图 3、4。图 3 显示, GV 10 mg/kg 剂量组自给药开始, 小鼠热痛敏逐渐减弱, 痛阈逐渐升高, 其中术后第 9 天 R/L 值显著增加 ($P < 0.01$), 停药后 36 h 即术后第 11 天, 小鼠手术侧足热辐射诱发的疼痛依然显著减轻; GV 2 mg/kg 剂量组小鼠术后第 9 天的 R/L 值增加, 与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$)。术后第 9 天, GV 具有显著的抗 CCI 小鼠热辐射痛敏的作用, 镇痛效应呈剂量依赖性 (图 4)。计算不同剂量药物组小鼠的疼痛抑制率[疼痛抑制率= (给药组 R/L 均值- 模型组 R/L 均值)/(假手术组 R/L 均值- 模型组 R/L 均值) $\times 100\%$], GV 10、2、0.4 mg/kg 剂量组疼痛抑制率分别为 54.2%、35.7%、

23.3%。以疼痛抑制率大于 50% 为镇痛有效, 按照 Bliss 法计算得到 GV 的 ED_{50} 为 3.84 mg/kg, 95% 可信区间为 2.73~ 5.07 mg/kg。

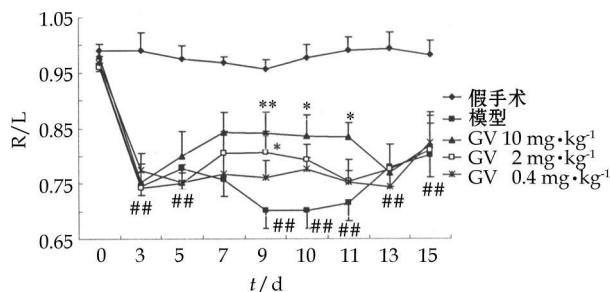
与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 4 同与假手术组比较: ## $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, Fig. 4 is same## $P < 0.01$ vs Sham group

图 3 GV 对 CCI 致痛反应的影响

Fig. 3 Effect of GV on CCI induced thermal hyperalgesia

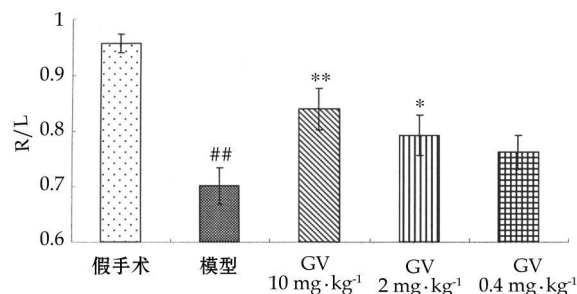


图 4 GV 对术后第 9 天 CCI 致痛反应的影响

Fig. 4 Effect of gelsevirine on CCI induced thermal hyperalgesia on day 9 after operation

4 讨论

研究表明, sc 福尔马林能立即导致 C 纤维自发活动剧增, 经快速的单突触递质传递到脊髓投射神经元, 并继以第二相传入爆发, 反映为扩动力背角神经元激活, 引发疼痛^[5]。该模型能较好模拟临床慢性严重疼痛, 因而应用广泛。第一相反应主要是直接刺激 C 纤维所致, 若药物能减少第一相舔足时间, 则提示该药可能具有中枢性镇痛作用。第二相反应有炎症机制参与, 若药物能降低第二相舔足时间, 则可有具有镇痛抗炎活性。本实验采用该法进行 GV 对慢性炎性疼痛的镇痛作用研究, 结果表明, GV 具有抑制该炎性疼痛第一相痛反应与第二相痛反应的效应, 提示其具有镇痛抗炎活性, 镇痛作用部位可能涉及中枢神经系统。

本实验室建立的小鼠慢性坐骨神经结扎模型, 于术后第 3 天出现痛反应, 术后第 9、10 天疼痛效应最为明显, 疼痛反应维持至术后 2 周以上, 与文献报

道的 CCI^[8] 模型特点相吻合。本实验采用该模型进行 GV 对神经病理性疼痛的镇痛作用研究, 结果表明, GV 具有抗神经病理性疼痛所致热痛敏作用。

综上所述, GV 具有显著对抗小鼠神经病理性疼痛作用与炎性疼痛作用。GV 的结构与钩吻素甲、*N*-甲基钩吻素甲极为相似, 因此推测 GV 的半数致死量可能与钩吻素甲、*N*-甲基钩吻素甲相近 (钩吻素甲和 *N*-甲基钩吻素甲对小鼠的 LD₅₀ 分别为 56.2、63.1 mg/kg^[10])。但本实验研究表明, GV 抗炎性疼痛第二相痛反应与抗神经病理性痛反应的 ED₅₀ 分别为 4.59、3.84 mg/kg, 提示 GV 用于治疗慢性疼痛的治疗指数远大于钩吻总生物碱, 安全性强, 具有开发应用前景。其作用机制有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 赵序利, 赵松云, 王瑞楠. 慢性疼痛的治疗 [J]. 中国临床医生, 2005, 33(9): 6-7.

- [2] 刘浩, 俞昌喜. 钩吻的研究进展 [J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(5): 469-472.
- [3] 谭建权, 邱成之, 郑林忠. 钩吻碱的镇痛作用和无依赖性 [J]. 中药药理与临床, 1988, 4(1): 24-28.
- [4] 周名璐, 黄聪, 杨小平. 钩吻总碱的镇痛、镇静及安全性研究 [J]. 中成药, 1998, 20(1): 35-36.
- [5] 沈洁, 苏燕萍, 许盈, 等. 高速逆流色谱分离纯化钩吻中钩吻素己和 1-甲氧基钩吻碱 [J]. 中草药, 2009, 40(9): 1392-1395.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理试验方法学 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 227-228.
- [7] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response [J]. *Pain*, 1989, 38(3): 347.
- [8] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man [J]. *Pain*, 1988, 33: 87-107.
- [9]Coderre T J, Katz J, Vaccarino A L, *et al.* Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence [J]. *Pain*, 1993, 52(3): 25.
- [10] 任引津. 实用急性中毒全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003.

苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的影响

郭斌¹, 申洪波², 李智³

(1 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121000; 2 辽宁医学院附属第二医院, 辽宁 锦州 121000;

3 中国医科大学天然药物研究室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 研究苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的作用, 并初步探讨其作用机制。方法 建立小鼠 Lewis 肺癌模型, 实验分为模型组、不同剂量苦参碱组、环磷酰胺组, 计算原发瘤抑制率及肺转移灶数; 采用 Western blotting 检测原发瘤组织基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 蛋白表达。结果 苦参碱各剂量组小鼠原发瘤抑制率、肺转移灶数与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$, 0.01); 与模型组比较, 苦参碱各剂量组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。结论 苦参碱明显抑制小鼠 Lewis 肺癌原发瘤的生长和转移, 可能与其抑制肿瘤组织 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达有关。

关键词:苦参碱; Lewis 肺癌; MMP-2; MMP-9

中图分类号:R286.91; R979.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)12-2037-03

苦参碱 (matrine) 是从苦豆子中提取的一种生物碱。多年来的研究证明, 苦参碱具有广泛的药理学作用, 除了具有抗心律失常、抗炎、抗病毒等作用外, 体内外的抗肿瘤活性受到极大关注^[1-4]。研究表明, 苦参碱能抑制人肺癌 SPC-A-1 细胞的生长和人肺癌 A549 细胞的增殖, 抑制作用呈浓度依赖性^[5-7], 但仅局限于体外研究。本实验研究了苦参碱对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用, 进一步研究其对

Lewis 肺癌原发瘤组织基质金属蛋白酶 2 (Matrix metalloproteinases 2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白表达的影响, 以探讨苦参碱对实体瘤的抑制作用, 并初步揭示其体内抗癌作用的分子机制, 为苦参碱应用于肺癌临床治疗提供实验基础及理论依据。

1 材料

1.1 试药: 苦参碱 (自制, 质量分数 98.3%); 环磷

收稿日期: 2010-04-09

基金项目: 辽宁省科技厅第二批药物源头创新研究课题 (2006226031-217)

作者简介: 郭斌 (1969—), 男, 辽宁锦州人, 副主任药师, 博士, 硕士生导师, 辽宁医学院附属第一医院药学部主任, 主要从事药用资源开发和筛选研究, 已发表论文 5 篇。Tel: (0416) 4197079 E-mail: jyguobin@126.com