

膜翅目昆虫提取物 Ento-II 涂膜剂的镇痛及活血化瘀作用研究

张枝雪^{1,3}, 黄茜^{1,3}, 李玥^{1,2,3}, 杨志斌^{1,2,3}, 何亚楠^{1,2}, 巫秀美^{1,2,3}, 赵海荣^{1,2,3*}

1. 大理大学 昆虫生物医药研究院 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000

2. 大理大学 中国西南药用昆虫及蛛形类资源开发利用 2011 协同创新中心, 云南 大理 671000

3. 药用特种昆虫开发国家地方联合工程研究中心, 云南 大理 671000

摘要: 目的 研究膜翅目昆虫提取物 Ento-II 涂膜剂的镇痛及活血化瘀作用, 为相关药物的开发提供科学依据。方法 采用经典热板法和扭体法作为镇痛实验模型, 观察 Ento-II 涂膜剂对小鼠的镇痛作用; 大鼠 sc 大剂量盐酸肾上腺素后, 施以冰水浸泡制备急性血瘀模型, 采用线栓法复制大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤模型, 测定血液流变学相关指标。结果 在镇痛实验中, 与对照组比较, Ento-II 涂膜剂 20、10、5 mg/kg 能显著延长小鼠给药后 30、60、90 min 的痛阈值, 明显减少小鼠 15 min 内的扭体次数, 显著延长小鼠扭体的潜伏期 ($P < 0.01$)。在血瘀合并脑缺血实验中, 与模型组比较, Ento-II 涂膜剂 6.67、3.33、1.67 mg/kg 组 24 h 时大鼠神经功能评分和全血黏度显著降低 ($P < 0.01$); 3.33 mg/kg 组大鼠血浆黏度和红细胞聚集指数显著降低 ($P < 0.05$); 6.67、3.33 mg/kg 组大鼠卡松黏度显著降低 ($P < 0.01$)。结论 Ento-II 涂膜剂具有明显的镇痛作用和活血化瘀作用。

关键词: 膜翅目昆虫; Ento-II 涂膜剂; 镇痛; 脑缺血; 活血化瘀; 穴位给药

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2108-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.020

Exploration of Ento-II plastic on analgesic and promoting blood circulation and removing stasis

ZHANG Zhi-xue^{1,3}, HUANG Xi^{1,3}, LI Yue^{1,2,3}, YANG Zhi-bin^{1,2,3}, HE Ya-nan^{1,2}, WU Xiu-mei^{1,2,3}, ZHAO Hai-rong^{1,2,3}

1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical R&D, Institute of Entomocutics Research, Dali University, Dali 671000, China

2. Yunnan Provincial 2011 Collaborative Innovation Center for Entomocutics, Dali University, Dali 671000, China

3. National-Local Joint Engineering Research Center of Entomocutics, Dali 671000, China

Abstract: Objective To study the analgesic, activating blood and resolving stasis effect of Ento-II plastic. **Methods** Hot plate procedure and torsion body method were used as analgesic experimental model to observe the analgesic effect of Ento-II plastic. The acute blood stasis rats experimental model was established through rat subcutaneous injection of high-dose adrenaline hydrochloride and soaked in ice water. Then, the blood stasis focal cerebral ischemia-reperfusion models were established by suture method on the rats. The hemorrheologic indicators were determined. **Results** Compared with control group, Ento-II plastic could significantly prolong pain thresholds in mice at 30, 60, and 90 min after final administration ($P < 0.01$). Ento-II plastics 20, 10, and 5 mg/kg dose groups could reduce acetic acid-induced mice writhing times and prolong the incubation period ($P < 0.01$). The experimental result of rats blood stasis focal cerebral ischemia-reperfusion at 24 h after reperfusion showed that Ento-II plastics 6.67, 3.33, and 1.67 mg/kg dose groups could obviously reduce the neurological function score and whole blood viscosity ($P < 0.01$). 3.33 mg/kg dose group could significantly reduce plasma viscosity, erythrocyte aggregation index, and casson viscosity ($P < 0.05$). The effect were similar to that of ligustrazine. 6.67 and 3.33 mg/kg dose groups could significantly reduce casson viscosity ($P < 0.01$). **Conclusion** Ento-II plastic has obvious analgesic effect and activating blood and resolving stasis effect.

收稿日期: 2018-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 景颇族传统昆虫药物胡蜂蜂毒对大鼠 MCAO/R 后 BBB 的保护作用及其潜在机制探索 (81703742); 云南省应用基础研究重点项目: 胡蜂蜂毒抗脑缺血活性及相关物质基础比较研究 (2017FA050)

作者简介: 张枝雪 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为心脑血管药理。Tel: 15087275895 E-mail: dlzhangzhixue@163.com

*通信作者 赵海荣 (1988—), 女, 实习研究员, 研究方向为昆虫药物抗卒中及中枢神经系统疾病研究。E-mail: zhmevergiveup@126.com

Key words: hymenopteran; Ento-II plastic; analgesic effect; cerebral ischemia; activating blood and resolving stasis; acupoint drug administration

缺血性卒中 (ischemic stroke, IS) 指供应大脑血流的主要动脉发生狭窄或闭塞, 导致脑组织 (特别是大脑中动脉区域) 急剧缺血缺氧, 从而引起局部脑组织发生缺血或坏死, 然后出现言语丧失、身体瘫痪、视力障碍和意识错乱等相应的临床症状。IS 归属于中医的“中风”范畴, 正如古代医家所形容: “如矢石之中的, 若暴风之急速”。临床上 IS 治疗药物匮乏, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准和指南中的一线用药仅有组织型纤溶酶原激活剂 (recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA), 其治疗时间窗极小, 有效率不高, 有严格的使用要求, 需要对出血风险进行全面评估, 且获益患者极少, 美国脑梗死患者 rt-PA 溶栓治疗率为 11%, 我国 rt-PA 溶栓治疗率为 1.6%^[1]。在实际临床治疗过程中, 虽然缺少针对 IS 的药物, 临床治疗中仍可根据疾病的状态, 给予一些与病理机制相关的药物进行治疗, 如改善脑血循环和保护神经功能的神经保护剂、抗氧化剂等。而血瘀证是脑缺血的基础证型, 其与血液流变学和血流动力学异常有关, 活血化瘀法是中医治疗脑缺血的基本手段。目前昆虫毒素已发现 60 余种, 毒素昆虫有 700 余种^[2], 大多含有神经毒素、酶类、多肽、萜类、生物活性胺等。昆虫毒素有显著的药效优势, 如蜂毒可以直接从内部抑制艾滋病病毒的产生^[3], 还具有抗炎和镇痛、抗脑缺血的作用^[4-5]。活血化瘀药物一般有行气止痛的效果, Ento-II 源自膜翅目昆虫毒素, 前期研究表明, 与 Ento-II 同源的 Ento-I 具有抗炎、止痛、抗脑缺血作用^[6-8]。根据古籍记载、临床应用和民间经验, 昆虫毒素可治疗卒中偏瘫后遗症患者, 但其活血化瘀作用未见报道。在 Ento-I 的研究基础上, 本研究制备镇痛和血瘀合并脑缺血模型, 初步探讨 Ento-II 的镇痛及其活血化瘀作用, 为相关药物的开发提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器

Ento-II 涂膜剂 [以聚乙烯醇-124 (PVA-124) 为主要原料的涂膜剂空白基质由实验室自制^[9], Ento-II 原料药由昆虫生物医药研究院提供], 载药量为 5%, 采用薄层色谱法进行质量控制^[10]; 阿司匹林肠溶片 (批号 BJ10402), 拜耳医药保健有限公司;

盐酸川芎嗪注射液 (批号 20141010), 深圳市丽晶生化科技有限公司; 冰乙酸 (批号 2015122), 天津市优谱化学试剂有限公司; 盐酸肾上腺素 (批号 10140701)、硫酸阿托品 (批号 03140903), 上海禾丰制药有限公司。PL-200 智能热刺痛仪, 成都泰盟科技有限公司; SA-7000 型全自动血液流变测试仪, 北京赛科希德科技发展有限公司。

1.2 实验动物

健康昆明种小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 昆明医科大学实验动物中心提供, 许可证号 SCXK (滇) 2011-0004。SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠, 体质量 250~300 g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号 SYXK (湘) 2011-0003。实验动物购置后在大理大学实验动物中心实验室适应性饲养 3~5 d 后用于正式实验。饲养条件: 清洁级, 室温 19~25 ℃, 相对湿度 40%~70%, 12 h 明暗交替照明, 自由进食、饮水。

2 方法

2.1 Ento-II 涂膜剂的镇痛作用

2.1.1 热板法检测 Ento-II 涂膜剂对小鼠的镇痛作用 参照文献方法^[11], 实验前, 在 (55.0±0.5) ℃ 的热板上测定健康的雌性昆明种小鼠的基础痛阈值, 选基础痛阈值在 5~30 s 的小鼠为合格动物。选取合格小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 即对照组、基质对照组、阿司匹林组 (80 mg/kg, ig) 以及 Ento-II 涂膜剂 5、10、20 mg/kg 组 (小鼠的体质量按 20 g/只计算)。基质对照组于小鼠 2 侧太阳穴位置涂抹 15 μL 涂膜剂基质, Ento-II 涂膜剂组按照相应的剂量, 于小鼠 2 侧太阳穴位置各涂抹 15 μL。每日给药 1 次, 连续给药 5 d。对照组 ig 生理盐水, 阿司匹林组按相应给药方式和剂量给药。末次给药后 30、60、90 min 测定小鼠的痛阈值, 痛阈值超过 60 s 者按 60 s 计。

2.1.2 醋酸扭体法检测 Ento-II 涂膜剂对小鼠疼痛的影响 60 只昆明种小鼠, 雌雄各半, 分组及给药方式同“2.1.1”项下方法。末次给药 1 h 后参照文献方法^[11], 每只小鼠 ip 0.6% 醋酸溶液 2 mL, 观察并记录小鼠扭体反应 (腹部内凹、伸展后肢、臀部抬高) 的潜伏期 (从注射醋酸至发生扭体的间隔时间) 和 15 min 内小鼠的扭体次数。按照公式计算扭体反应抑制率。

抑制率=(对照组扭体次数-给药组扭体次数)/对照组扭体次数

2.2 Ento-II 涂膜剂对血瘀性脑缺血大鼠血液流变学的影响

2.2.1 分组 取 SPF 级 SD 大鼠 70 只, 随机分为 7 组, 每组 10 只, 即对照组、血瘀性脑缺血模型组(模型组)、基质血瘀性脑缺血模型组(基质模型组)、盐酸川芎嗪(8.30 mg/kg, ig)组以及 Ento-II 涂膜剂低、中、高剂量(1.67、3.33、6.67 mg/kg)组。基质模型组和受试药物组于实验前 1 d 使用脱毛膏脱毛, 其余各组不处理。对照组和模型组 ig 等体积生理盐水, 基质模型组于大鼠太阳穴 2 侧分别涂抹涂膜剂基质 30 μ L, Ento-II 涂膜剂组按照相应剂量于大鼠太阳穴 2 侧分别涂抹药物 30 μ L, 盐酸川芎嗪组按相应给药方式和剂量给药, 连续预防给药 5 d, 末次给药 1 h 后制备急性血瘀模型。

2.2.2 大鼠急性血瘀模型的制备 大鼠连续给药 5 d, 末次给药后参照文献方法^[12]造模。除对照组外, 其余各组大鼠均 sc 肾上腺素 0.8 mL/kg, 共 2 次, 间隔时间为 4 h, 第 1 次 sc 肾上腺素 2 h 后, 将大鼠置于 4 $^{\circ}$ C 冰水中游泳 5 min, 2 h 后第 2 次 sc 肾上腺素。各组大鼠禁食不禁水, 次晨按“2.2.3”项下方法制备脑缺血模型。

2.2.3 脑缺血模型的制备 参考 Longa 等^[13]和曹永军等^[14]的方法, 并加以改进。采用线栓法复制大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型, 大鼠 ip 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉, im 阿托品(1 mL/kg)用于抑制呼吸道分泌物, 仰卧固定于直流加热垫上温度控制在 37 $^{\circ}$ C, 颈部剃毛并进行常规消毒, 颈正中处切口约 1.5 cm, 小心分离左侧颈总动脉(CCA), 游离至颈内动脉(ICA)和颈外动脉(ECA)分叉处, 结扎 CCA 近心端, 用微动脉夹暂时夹闭距离

结扎点约 1 cm 的远心端 CCA, 用眼科剪剪 1 个小缺口, 从该缺口插入线栓, 移开 CCA 上的微动脉夹, 将线栓轻轻往颅内方向推进, 检查其进入 ICA, 然后再继续推进, 微遇阻力时停止, 此时栓线插入深度通常为 18~20 mm (ECA 与 ICA 分叉处为起点), 线栓头端已通过大脑中动脉(MCA)起始处, 进入了较细的大脑前动脉(ACA), 即完成 1 侧 MCAO, 缺血 2 h 后, 轻拔出栓线至 ECA 和 ICA 分叉处, 实现大鼠脑缺血再灌注。在 24 h 内进行 2 次行为学评分, 在缺血时注意保持室温在 25~30 $^{\circ}$ C。

2.2.4 大鼠神经功能缺损评分 缺血 2 h 再灌注 6 h 和 24 h, 参照 Longa 等^[13]的方法并加以改进的 5 分制法进行评分。0 分: 无神经功能缺损症状; 1 分: 轻度缺损, 即提尾悬空不能伸展左侧前爪; 2 分: 中度缺损, 即行走向左侧转圈; 3 分: 中度缺损, 即行走困难, 并向左侧倾倒; 4 分: 重度缺损, 不能自发行走, 意识水平下降。造模后, 大鼠清醒时进行首次评分(一般为 2 h 左右)。

2.2.5 血液流变学指标检测 缺血 2 h 再灌注 24 h 后, 以 10%水合氯醛 ip 3.5 mL/kg 麻醉, 使用一次性负压肝素钠抗凝管腹主动脉快速取血 4 mL, 采用全自动血液流变仪分别测定全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度。

2.3 统计学分析

数据用 SPSS 21.0 处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行组间显著性检验, 组间样本均数的多重比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 Ento-II 涂膜剂对小鼠的镇痛作用

热板法测定结果如表 1 所示, 末次给药后 30、60、90 min, 与对照组比较, 基质对照组小鼠痛阈值均无统计学差异, 说明涂膜剂基质本身无镇痛作

表 1 Ento-II 涂膜剂经皮给药对小鼠热板法痛阈值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effect of Ento-II plastic on pain thresholds of mice in hotplate test ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	痛阈值/s		
		给药后 30 min	给药后 60 min	给药后 90 min
对照	—	21.90 $\pm$ 3.73	21.70 $\pm$ 3.86	21.60 $\pm$ 3.50
基质对照	—	20.60 $\pm$ 4.12	21.60 $\pm$ 3.06	22.40 $\pm$ 3.13
阿司匹林	80	33.30 $\pm$ 8.30 ^{▲▲**}	34.10 $\pm$ 8.65 ^{▲▲**}	33.90 $\pm$ 8.14 ^{▲▲**}
Ento-II 涂膜剂	20	33.90 $\pm$ 4.23 ^{▲▲**}	35.80 $\pm$ 5.12 ^{▲▲**}	33.60 $\pm$ 5.70 ^{▲▲**}
	10	34.80 $\pm$ 6.60 ^{▲▲**}	37.30 $\pm$ 4.42 ^{▲▲**}	35.20 $\pm$ 2.49 ^{▲▲**}
	5	28.20 $\pm$ 5.43 ^{▲▲**}	31.10 $\pm$ 6.05 ^{▲▲**}	30.20 $\pm$ 5.49 ^{▲▲**}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$; 与基质对照组比较: ^{**} $P < 0.01$, 表 2 同

[▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs substrate control group, same as table 2

用。末次给药后 30 min, 与对照组比较, 阿司匹林组和 Ento-II 涂膜剂 20、10 mg/kg 组小鼠痛阈值显著延长 ($P<0.01$), Ento-II 涂膜剂 5 mg/kg 组亦能延长小鼠痛阈值 ($P<0.05$)。末次给药后 60、90 min, 与对照组比较, 阿司匹林组和 Ento-II 涂膜剂 3 个剂量组均能明显延长小鼠痛阈值 ($P<0.01$), 90 min 痛阈值较 60 min 有减小的趋势, 说明可能痛阈值在 60 min 达到最大值, 之后开始下降, 但无统计学差异。

表 2 Ento-II 涂膜剂经皮给药对冰醋酸诱导的小鼠扭体反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Ento-II plastic on body torsion induced by glacial acetic acid ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	扭体潜伏期/s	15 min 内扭体次数	扭体抑制率/%
对照	—	172.38 ± 21.30	27.13 ± 7.74	—
基质对照	—	176.63 ± 34.12	27.75 ± 6.41	—
阿司匹林	80	541.63 ± 71.43 ^{▲▲▲}	15.13 ± 5.44 ^{▲▲▲}	44.24
Ento-II 涂膜剂	20	289.88 ± 55.55 ^{▲▲▲}	16.13 ± 4.70 ^{▲▲▲}	41.89
	10	344.25 ± 34.73 ^{▲▲▲}	12.75 ± 3.73 ^{▲▲▲}	53.00
	5	257.50 ± 63.96 ^{▲▲▲}	18.38 ± 4.10 ^{▲▲▲}	33.78

3.2 Ento-II 涂膜剂对血瘀性脑缺血再灌注大鼠神经功能缺损的影响

结果如表 3 所示, 与对照组比较, 大鼠血瘀性脑缺血再灌注后, 模型组大鼠出现明显的神经功能缺失, 提示造模成功。基质模型组与模型组比较无统计学差异, 说明涂膜剂基质对大鼠血瘀性脑缺血再灌注后神经功能无直接影响。在缺血 2 h, 再灌注 6 h 时, 与模型组比较, Ento-II 涂膜剂 6.67、3.33 mg/kg 组大鼠的神经功能评分明显降低, 差异显著 ($P<0.01$)。在缺血 2 h, 再灌注 24 h 时, 与模型组比较, Ento-II 涂膜剂 3 个剂量组均能显著降低大鼠神经功能评分, 差异显著 ($P<0.01$); 川芎嗪组无统计学差异。

3.3 Ento-II 涂膜剂对血瘀性脑缺血大鼠血液流变学的影响

如表 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠全血黏度、血浆黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度均升高, 差异显著 ($P<0.01$), 说明大鼠急性血瘀性脑缺血模型造模成功。基质模型组与模型组比较无统计学差异, 说明涂膜剂基质本身对模型大鼠血液流变学无影响。与模型组比较, 川芎嗪能显著降低血瘀性脑缺血大鼠的全血黏度 ($P<0.01$)、血浆黏度 ($P<0.05$) 和卡松黏度 ($P<0.01$), 红细胞聚集指数有降低的趋势。与模型组比较, Ento-II 涂膜剂 6.67、3.33、1.67 mg/kg 组大鼠全血黏度显著降低 ($P<0.01$);

醋酸扭体法检测结果如表 2 所示, 与对照组比较, 基质对照组小鼠扭体潜伏期和 15 min 内扭体次数均无统计学差异, 说明涂膜剂基质本身无镇痛作用。与对照组比较, 阿司匹林、Ento-II 涂膜剂 3 个剂量均能显著延长醋酸致小鼠发生扭体反应的潜伏期 ($P<0.01$), 减少 15 min 内小鼠发生扭体反应次数 ($P<0.01$)。Ento-II 涂膜剂 10 mg/kg 对小鼠扭体反应的抑制率为 53.00%, 高于阿司匹林组的 44.24%。

表 3 Ento-II 涂膜剂经皮给药对血瘀性脑缺血大鼠神经功能评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Ento-II plastics on neurological functional scores of blood stasis in cerebral ischemia rat models ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	缺血 2 h 再灌注后神经功能评分	
		再灌注 6 h	再灌注 24 h
对照	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	—	1.85 ± 0.46 ^{##}	2.00 ± 1.07 ^{##}
基质模型	—	1.91 ± 0.54 ^{##}	1.93 ± 0.47 ^{##}
川芎嗪	8.30	1.71 ± 0.49	1.86 ± 1.07
Ento-II 涂膜剂	6.67	1.43 ± 0.79 ^{***▲}	1.00 ± 0.58 ^{***▲}
	3.33	1.50 ± 0.84 ^{***▲}	1.00 ± 0.89 ^{***▲}
	1.67	1.78 ± 0.82	1.56 ± 0.76 ^{***▲}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与基质模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$; 与模型组比较: [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$, 表 4 同

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs substrate model group; [▲] $P<0.05$ ^{▲▲} $P<0.01$ vs model group, same as table 4

Ento-II 涂膜剂 3.33 mg/kg 剂量组血浆黏度和红细胞聚集指数显著降低 ($P<0.05$); Ento-II 涂膜剂 6.67 和 3.33 mg/kg 剂量组卡松黏度显著降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

我国传统医药常用“以毒攻毒”来治疗人类的疑难杂症。根据《黄帝内经》记载, 膜翅目昆虫多肽毒素可以治疗顽疾, 现代医学研究发现其可用于缓解卒中后遗症^[15], Ento-II 为其主要活性成分之

表 4 Ento-II 涂膜剂经皮给药对血瘀性脑缺血模型大鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effects of Ento-II plastics on hemorheology of blood stasis in cerebral ischemia rat models ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	全血黏度/(mPa·s)	血浆黏度/(mPa·s)	红细胞聚集指数	卡松黏度/(mPa·s)
对照	—	28.91 ± 4.53	1.34 ± 0.06	6.42 ± 0.80	2.99 ± 0.11
模型	—	56.16 ± 7.47 ^{###}	1.71 ± 0.25 ^{###}	8.88 ± 0.62 ^{###}	4.13 ± 0.54 ^{###}
基质模型	—	55.34 ± 7.38 ^{###}	1.63 ± 0.10 ^{###}	9.44 ± 1.33 ^{###}	3.99 ± 0.38 ^{###}
川芎嗪	8.30	36.95 ± 4.07 ^{**▲▲}	1.54 ± 0.11 [▲]	7.97 ± 0.40 ^{**}	3.45 ± 0.42 ^{**▲▲}
Ento-II 涂膜剂	6.67	36.85 ± 3.33 ^{**▲▲}	1.57 ± 0.12	7.88 ± 1.45 ^{**}	3.56 ± 0.20 ^{**▲▲}
	3.33	34.51 ± 5.10 ^{**▲▲}	1.53 ± 0.13 [▲]	7.70 ± 1.22 ^{**▲}	3.48 ± 0.30 ^{**▲▲}
	1.67	38.64 ± 6.15 ^{**▲▲}	1.63 ± 0.09	8.06 ± 1.34 [*]	3.99 ± 0.31

一。但多肽药物稳定性差、体内半衰期短、不易透过生物膜、脂溶性差、口服生物利用度低^[16]。本课题组前期研究也发现, Ento-II ig 给药会引起小鼠鼻腔出血且生物利用度低, iv 给药溶血严重而导致小鼠死亡。穴位是经脉气血接受体内外刺激的反应点, 中医上采用针刺经外奇穴治疗卒中后遗症^[13]。太阳穴是经外奇穴之一, 又称之为“翼点”, 是额骨、顶骨、颞骨和蝶骨相交处所形成的“H”形骨缝^[14]。太阳穴深层颅内血管丰富, 其浅层有上颌神经等, 深层有下颌神经肌支和颞浅动脉肌支^[17]。太阳穴解剖位置独特, 对其经皮给药, 可以使气直达病所, 从而达到疏通经络、活血止痛的功效。为此, 本课题组结合中医传统理论和现代经皮给药技术, 对 Ento-II 涂膜剂太阳穴经皮给药进行相关研究。

脑血管疾病患者一般伴有疼痛症状, 前期可能发生头痛、偏头痛^[18]。热板法和扭体法是评价药物镇痛作用的 2 种方法, 实验中发现热板法中小鼠的爪趾对热刺激非常敏感, 有跳跃、缩足和舔后足的现象, ip 冰醋酸刺激腹膜, 小鼠因疼痛而表现出扭体反应。本实验结果显示, Ento-II 涂膜剂各剂量能显著延长小鼠给药后 30、60、90 min 的痛阈值, 减少小鼠 15 min 内的扭体次数和延长小鼠扭体的潜伏期 ($P < 0.01$)。提示 Ento-II 涂膜剂具有较强的镇痛功效, 同时通过中枢神经和外周神经镇痛起效。但 2 个镇痛药效模型中, 均显示 Ento-II 涂膜剂中剂量效果最好, 推测可能与药物为多组分混合物有关, 为不同作用靶点的多种组分协同作用, 使结果呈现非线性关系^[19], 本课题组将在后期进一步深入研究。

本实验所用急性血瘀证动物模型是依据中医理论关于血瘀证的“暴怒”“寒邪”病因、病机所设计。通过给大鼠 sc 大剂量肾上腺素使 α 受体激动, 再施以冰水浸泡模拟寒邪侵袭, 二者综合复制大鼠

血瘀模型。而血瘀证只是脑缺血的基础证型, 为研究 Ento-II 涂膜剂是否对血瘀性脑缺血具有保护作用, 实验通过制备血瘀性脑缺血模型, 评价神经功能损伤和血液流变学。川芎嗪是由植物川芎中提取的一种生物碱单体, 是一种新型钙离子拮抗剂, 具有活血化瘀、抗血小板聚集的作用^[20-21], 在临床上被广泛应用于治疗和预防缺血性心脑血管性疾病, 故选川芎嗪作为血瘀性脑缺血实验的阳性对照药。但在神经功能评分中, 川芎嗪并没有改善神经功能损伤的作用, 之后的研究对阳性药的选择会慎重考虑。

综上所述, Ento-II 涂膜剂可改变大鼠脑缺血后的神经功能缺损, 具有促进神经功能恢复的作用; 能明显改善血瘀性脑缺血模型大鼠的血液流变学作用, 推测其有活血化瘀作用。

志谢: 大理大学昆虫生物医药研究院药理药效学研究平台提供条件完成此实验。

参考文献

- [1] 高峰, 徐安定. 急性缺血性卒中血管内治疗中国指南 2015 [J]. 中国卒中杂志, 2015, 10(7): 590-606.
- [2] 严善春. 资源昆虫学 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2001.
- [3] Keyes K A, Mann L, Sherman M, et al. LY317615 decreases plasma VEGF levels in human tumor xenograft-bearing mice [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2004, 53(2): 133-140.
- [4] Tsai L C, Lin Y W, Hsieh C L. Effects of bee venom injections at acupoints on neurologic dysfunction induced by thoracolumbar intervertebral disc disorders in canines: A randomized, controlled prospective study [J]. *Biomed Res Int*, 2015, doi: 10.1155/2015/363801.
- [5] Danielisová V, Gottlieb M, Némethová M, et al. Effects of bradykinin postconditioning on endogenous antioxidant

- enzyme activity after transient forebrain ischemia in rat [J]. *Neurochem Res*, 2008, 33(6): 1057-1064.
- [6] 金凡茂, 张枝雪, 王 音, 等. Ento-I 涂膜剂对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 504-508.
- [7] 冯 锐, 王 音, 朱 凤, 等. Ento-I 涂膜剂的镇痛及其抗凝抗血栓形成作用 [J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(3): 509-513.
- [8] 肖培云, 李贵轲, 张成桂, 等. 侧异腹胡蜂属昆虫镇痛抗炎有效部位的制备及用途: 中国, CN103655634A [P]. 2014-03-26.
- [9] 刘 珍, 李富贤, 贾小民, 等. 痛可舒涂膜剂制备工艺研究 [J]. 中药材, 2010, 33(4): 632-633.
- [10] 邱小玲, 林 绥, 阙慧卿. 涂膜剂的研究概述 [J]. 海峡药学, 2009, 21(8): 16-18.
- [11] 叶和杨, 熊小琴, 邱 伟, 等. 瑞香素对醋酸、热板及电刺激致痛小鼠的镇痛作用 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(27): 174-175.
- [12] 韩淑燕, 李海霞, 屠鹏飞. 三七总皂苷和红花总黄酮配伍对急性血瘀大鼠血液流变学的改善作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2011, 25(1): 62-66.
- [13] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [14] 曹勇军, 程彦斌. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血/再灌注模型的改进与探讨 [J]. 中国应用生理学杂志, 2001, 17(2): 95-97.
- [15] Lim S M, Lee S H. Effectiveness of bee venom acupuncture in alleviating post-stroke shoulder pain: A systematic review and meta-analysis [J]. *J Integr Med*, 2015, 13(4): 241-247.
- [16] 王 浩, 侯惠民. 多肽与蛋白质类药物给药系统的研究现状 [J]. 中国医药工业杂志, 1994, 25(9): 421-426.
- [17] 于姗姗. 电针四神聪与太阳穴刺血联合应用治疗瘀血型偏头痛的临床观察 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2016.
- [18] 张安富, 吴 驹, 邓玉霞, 等. 应用中医理论治疗脑血管神经性头痛的观察 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(56): 113.
- [19] 秦华珍, 刘 磊, 王晓倩, 等. 中药剂量与量效关系的思考 [J]. 四川中医, 2011, 9(6): 48-49.
- [20] 姜宇懋, 王丹巧. 川芎嗪药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2016, 18(10): 1364-1370.
- [21] 张廷伟. 盐酸川芎嗪的药理作用及其临床应用 [J]. 医药导报, 2006, 25(11): 1179-1181.