

天蟾胶囊外周和中枢镇痛效应差异实验研究

傅 斌, 范 姝, 万 军

江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344000

摘 要: **目的** 探究天蟾胶囊的外周和中枢系统镇痛效应差异。**方法** 首先采用甩尾方法将基础痛阈差距较小的 64 只 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、天蟾组、天蟾纳洛酮腹腔组、天蟾纳洛酮脊髓组、天蟾纳洛酮脑室组、天蟾 β -氟硝胺 (β -fluorine nitramine, β -FNA) 组、天蟾纳曲多尔组和天蟾诺比替啶组, 除对照组外, 其余各组分别 ig 42.60 g/kg 天蟾胶囊, 连续给药 1 周, 给药结束后, 各组分别以不同给药途径给予各阻断剂, 30、60、90、120、150 和 180 min 后观察小鼠的痛阈变化。**结果** 给予天蟾胶囊后, 小鼠疼痛阈值升高, 镇痛起效时间为给药后 30 min ($P < 0.001$), 作用峰值为给药后 120 min ($P < 0.05$)。天蟾纳洛酮腹腔组给药后 30、60 min, 小鼠痛阈明显高于天蟾胶囊脊髓和脑室给药组 ($P < 0.05$), ip μ 阿片受体拮抗剂的小鼠给药 30、60 min 痛阈显著高于注射 δ 、 κ 阿片受体拮抗剂 ($P < 0.05$)。**结论** 天蟾胶囊具有较好的镇痛作用, 其镇痛效应对外周的阿片系统依赖程度高于中枢阿片系统, 其作用的受体主要是外周 μ 阿片受体。

关键词: 天蟾胶囊; 镇痛; μ 阿片受体拮抗剂; 中枢神经系统; 外周神经系统

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)03-0783-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.018

Experimental study on difference between peripheral and central analgesic effects of Tianchan Capsule

FU Bin, FAN Shu, WAN Jun

Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 344000, China

Abstract: Objective To investigate the difference of analgesic effect between peripheral and central system of Tianchan Capsule (天蟾胶囊). **Methods** First, 64 male C57BL/6 mice without significant basal pain threshold difference by tail flapping method were randomly divided into control group, Tianchan group, Tianchan naloxone intraperitoneal group, Tianchan naloxone spinal cord group, Tianchan naloxone ventricle group, Tianchan β -fluorine nitramine (β -FNA) group, Tianchan naltrexone group and Tianchan norbinazine group. Except the control group, the other groups were administered Tianchan Capsule dose of 42.60 g/kg by gavage for one week. After the one week administration of Tianchan Capsule, each group was given blockers by different administration routes, and the changes of pain threshold were observed 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min later. **Results** After administration of Tianchan Capsule, the pain threshold of mice was increased. The onset time of analgesia was 30 minutes after administration ($P < 0.001$) and the peak time was 120 min after administration ($P < 0.05$). At 30 and 60 min after intraperitoneal administration, the pain threshold of mice in Tianchan naloxone intraperitoneal group was significantly higher than that in Tianchan naloxone spinal cord group and Tianchan naloxone ventricle group ($P < 0.05$). The pain threshold of mice treated with μ opioid receptor antagonist at 30 and 60 min was significantly higher than that of mice injected with δ and κ opioid receptor antagonist ($P < 0.05$). **Conclusion** The analgesic effect of Tianchan Capsule in peripheral opioid system is better than that of central opioid system. It mainly targets μ opioid receptor.

Key words: Tianchan Capsules; analgesia effects; μ opioid receptor antagonist; central nervous system; peripheral nervous system

国际疼痛学会 (International Association for the Study of Pain, IASP) 将疼痛定义为是一种与实际或潜在的组织损伤相关的不愉快的感觉和情绪体验,

或其他相类似的经历^[1-2]。疼痛是临床上最常见的症状之一, 被世界卫生组织列为人体第 5 大生命体征。其机制可以概括为外周机制和中枢机制。

收稿日期: 2021-09-10

作者简介: 傅 斌 (1983—), 男, 硕士研究生, 中西医结合主治医师, 研究方向为中西医结合内科临床与理论研究。

Tel: 18079455150 E-mail: fancy3395@126.com

按照药物作用机制不同,镇痛药主要分为中枢性镇痛药和解热镇痛抗炎药,其中中枢性镇痛药具有较强的镇痛作用,阿片类药物还能消除疼痛引起的不愉快情绪,但容易产生依赖和成瘾性,而解热镇痛抗炎药的镇痛效果弱于中枢性镇痛药,不能消除疼痛引起的不良情绪且有明显的不良反应。中枢镇痛药主要作用于阿片受体,阿片受体广泛分布于人体,在中枢和外周神经系统均有广泛分布。阿片受体存在 μ 、 κ 、 δ 、 $\sigma 4$ 种亚型,纳洛酮为非选择性阿片受体阻断剂, β -氟硝胺(β -fluorine nitramine, β -FNA)为选择性 μ 阿片受体阻断剂,纳曲多尔为选择性 δ 阿片受体拮抗剂,诺比萘啶为选择性 κ 阿片受体拮抗剂^[3]。

中药具有良好的镇痛效果,对人体不良反应小。已有的药理研究表明包括血竭、野木瓜、葛根、延胡索、羌活等中药都具有较好镇痛作用,同时针对疼痛的部位和经络,中药都可以辨证论治,比如颈项痛使用葛根,枕后部头痛用羌活,前额和眉棱疼痛用葛根^[4-5]。

天蟾胶囊由夏天无、制川乌、蟾酥、祖师麻、白屈菜、秦白芷、川芎、白芍等 10 味中药组成,有行气活血、温经止痛的功效,适用于各种类型疼痛,用于治疗肺癌、胃癌、肝癌等引起的轻、中度癌性疼痛属气滞血瘀证者。现代医学已证实,夏天无^[6]、制川乌^[7]、蟾酥^[8]含有镇痛活性成分,同时也有报道称蟾酥含有的蟾蜍二烯内酯类物质具有抑制癌细胞生长的作用^[9]。动物实验研究也证实天蟾胶囊具有显著镇痛效应,能显著提高大鼠三叉神经痛阈^[10]。同时天蟾胶囊在临床中也常常被用于治疗轻、中度癌性疼痛,II 期临床研究显示其对中度癌痛镇痛总有效率 83%;其他相关研究也表明其可以缓解神经性疼痛、内脏痛^[11-13]。为探究天蟾胶囊外周和中枢镇痛效应,本研究采用 3 种不同给药途径干预及不同阿片受体拮抗剂对小鼠热板法和甩尾实验痛阈值的影响,为天蟾胶囊的镇痛机制研究提供一定数据基础。

1 材料

1.1 动物与分组

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠均为 6~8 周龄,体质量 22~24 g,购自集萃药康实验动物公司。小鼠被饲养在一个温度和湿度受控制的环境中,光照/暗循环 12 h,可以获得食物和水以及标准的实验室饮

食。所有动物实验均按照中华人民共和国国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》进行。所有实验均经江西中医药高等专科学校实验动物实验伦理委员会批准(编号 202008A022)。

1.2 药品与仪器

天蟾胶囊购自雷允上药业集团有限公司(批号 TA27007, 0.5 g/粒),盐酸纳洛酮注射液购自康哲(湖南)制药有限公司(批号 031020, 1 mg/mL), β -FNA(不可逆的选择性 μ 阿片受体拮抗剂,批号 0926, CAS 号 72786-10-8),盐酸纳曲多尔(一种选择性的 δ 阿片受体拮抗剂,批号 4335, CAS 号 209808-47-9)和诺比萘啶盐酸盐(选择性 κ 拮抗剂,批号 5519, CAS 号 7488-49-5)均购自 Tocris Bioscience 公司。YLS-12A 型热刺激仪购自北京众实科技有限公司, YLS-3E 型机械痛阈检测设备购自北京众实科技有限公司。

2 方法

2.1 实验分组

在动物分组前,首先采用甩尾和热板的方法剔除基础痛阈差异较大的小鼠。符合本实验要求的小鼠随机分为对照组、天蟾组(TC)、天蟾纳洛酮腹腔组(TCNLTFQ)、天蟾纳洛酮脊髓组(TCNLTJS)、天蟾纳洛酮脑室组(TCNLTNS)、天蟾 β -FNA 组(TCBFN)、天蟾纳曲多尔组(TCNQD)和天蟾诺比萘啶组(TCNBN),各种不同给药途径均设立生理盐水对照组,每组小鼠 8 只。

2.2 天蟾胶囊 ig 给药

TC、TCNLTFQ、TCNLTJS、TCNLTNS、TCBFN、TCNQD 和 TCNBN 组小鼠 ig 给予天蟾胶囊生药量 42.60 g/kg^[9](用超纯水配制成 1.065 g/mL 的混悬液),每只小鼠每次 ig 0.8 mL,连续给药 1 周。

2.3 不同阻断剂注射给药

2.3.1 纳洛酮注射给药 天蟾胶囊给药结束后,将纳洛酮溶解于无菌 0.9% NaCl,TCNLTFQ、TCNLTJS、TCNLTNS 组小鼠分别以 1 mg/kg 的剂量 ip 50 μ L、100 ng/kg 的剂量注入脊髓腔 5 μ L 和 20 ng/kg 的剂量注射入脑室 1 μ L^[12],生理盐水对照组与上述相似的方式注射相同体积的生理盐水。

2.3.2 β -FNA、盐酸纳曲多尔和诺比萘啶盐酸盐注射给药 同样天蟾胶囊结束给药后,TCBFN、TCNQD 和 TCNBN 组小鼠分别 ip β -FNA (40 mg/kg)、盐酸纳曲多尔 (0.5 mg/kg) 和诺比萘啶

盐酸 (10 mg/kg) 50 μ L, 生理盐水对照组注射相同体积的生理盐水。

2.4 镇痛行为学检测

2.4.1 甩尾试验 使用热刺激仪对 1 只轻度束缚小鼠的尾巴施加有害辐射热。从保温温度到截止温度, 热量呈线性增加。将热刺激仪产生的热刺激强度设为 30 W, 并记录尾回缩的潜伏期。为避免组织损伤, 若 10 s 内没有出现甩尾反应, 实验将自动终止。

给药前记录小鼠痛阈基线, 分别在给予阻断剂后 30、60、90、120、150 和 180 min 检测小鼠给药后痛阈, 计算最大可能效能 (maximal possible effect, MPE)。

$$\text{MPE} = (\text{给药后痛阈} - \text{痛阈基线}) / (10 - \text{痛阈基线})$$

2.4.2 机械痛阈检测 机械性诱发痛测试时, 小鼠放置在金属网格架上方的塑料盒中适应 30 min 后开始检测^[11-12]。用系列 Von-Frey 细丝 (0.02~2.56 g) 刺激小鼠足底, 垂直刺激 5 次, 每次 2~3 s。如果有 3 次以上的抬爪或舔爪反应, 即为阳性反射。每隔 30 min 检测 1 次, 检测 6 次。最终用机械缩足阈值表示, 其数值根据序贯法的 up-down 计算方法得出, 机械缩足阈值越低说明机械性诱发疼痛越严重。

2.5 数据统计

使用 GraphPad Prism v.7.0 软件对数据进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。动物行为数据采用单因素或双因素方差分析, 随后采用 Bonferroni 事后校正、Newman-Keuls 多重比较检验或双尾、配对或非配对的 Student *t* 检验。

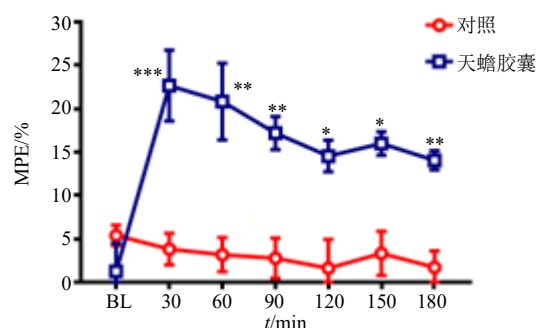
3 结果

3.1 天蟾胶囊的镇痛作用

天蟾胶囊给药 1 周后, 间隔 30 min 检测 6 次热激光辐射诱发的痛阈, 与对照组小鼠相比, 天蟾胶囊均能明显升高 MPE, 具有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 结果如图 1 所示。

3.2 ip 阿片受体阻断剂纳洛酮对天蟾胶囊镇痛作用的影响

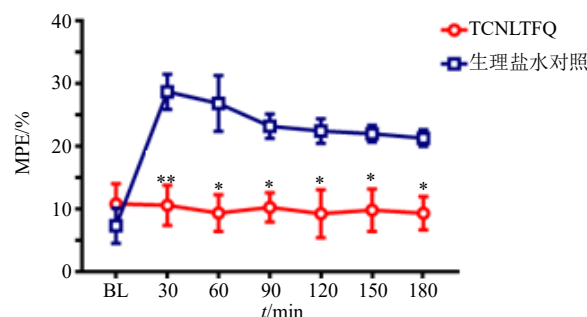
天蟾胶囊给药 1 周后, ip 给予纳洛酮, 间隔 30 min 检测 6 次热激光辐射诱发的痛阈, 与生理盐水对照组小鼠相比, MPE 均明显降低, 几乎与图 1 的对照组接近, 表明外周的阿片受体在天蟾胶囊镇痛中发挥了较为重要的作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 如图 2 所示。



BL-基线(下同); 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
BL-baseline (same as below); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 1 天蟾胶囊对小鼠热刺激甩尾痛阈的影响 ($n=8$)

Fig. 1 Effect of Tianchan Capsule on pain threshold of tail flapping induced by heat stimulation in mice ($n=8$)



与生理盐水对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal saline control group

图 2 ip 纳洛酮对天蟾胶囊致小鼠热刺激甩尾痛阈的影响 ($n=8$)

Fig. 2 Effect of ip naloxone on pain threshold of tail flapping induced by heat stimulation in mice induced by Tianchan Capsule ($n=8$)

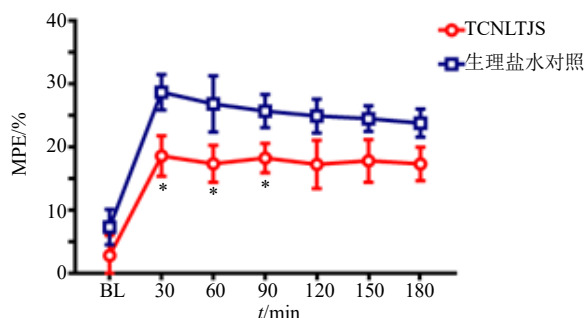
3.3 脊髓腔注射阿片受体阻断剂纳洛酮对天蟾胶囊镇痛作用的影响

天蟾胶囊给药 1 周后, 脊髓腔注射给予纳洛酮后, 间隔 30 min 检测 6 次热激光辐射诱发的痛阈, 与脊髓注射生理盐水对照组小鼠相比, 30、60、90 min MPE 明显降低, 差异具有统计学差异 ($P < 0.05$); 120、150、180 min MPE 有下降趋势, 但无统计学意义, 如图 3 所示。

3.4 脑室注射阿片受体阻断剂纳洛酮对天蟾胶囊镇痛作用的影响

天蟾胶囊给药 1 周后, 脑室注射给予纳洛酮, 间隔 30 min 检测 6 次热激光辐射诱发的痛阈, 与脑

室注射生理盐水对照组小鼠相比, 30、60、180 min MPE 明显降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 90、120、150 min MPE 有下降趋势, 但无统计学意义, 如图 4 所示。

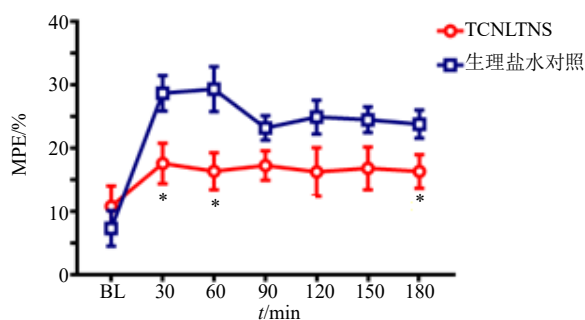


与生理盐水对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal saline control group

图 3 脊髓腔注射纳洛酮对天蟾胶囊致小鼠甩尾痛阈的影响 ($n=8$)

Fig. 3 Effect of spinal injection naloxone on pain threshold of tail flapping induced by heat stimulation in mice induced by Tianchan Capsule ($n=8$)



与生理盐水对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs normal saline control group

图 4 脑室注射纳洛酮对天蟾胶囊致小鼠热刺激甩尾痛阈的影响 ($n=8$)

Fig. 4 Effect of intraventricular injection naloxone on pain threshold of tail flapping induced by heat stimulation in mice induced by Tianchan Capsule ($n=8$)

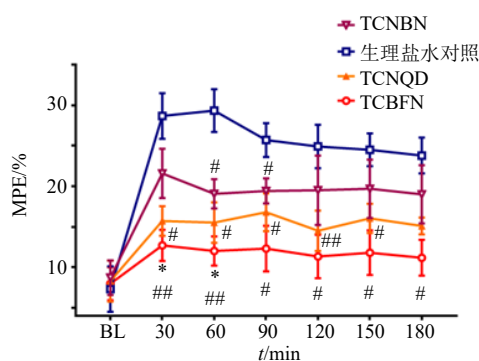
3.5 ip 不同类型阿片受体阻断剂对天蟾胶囊致小鼠热刺激甩尾痛阈的影响

天蟾胶囊给药 1 周后, 分别 ip μ 阿片受体拮抗剂 β -FNA (TCBFN)、 δ 阿片受体拮抗剂盐酸纳曲多尔 (TCNQD) 和 κ 阿片受体拮抗剂诺比替啶盐酸盐 (TCNBN), 间隔 30 min 检测 6 次热激光辐射诱发的痛阈与生理盐水对照组小鼠相比, 注射 β -FNA

的小鼠 30、60 min 的痛阈被阻断最为显著, 注射盐酸纳曲多尔和诺比替啶盐酸盐的小鼠也有显著差异, 且各时间点均有统计学差异 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与 TCNBN 相比, 注射 β -FNA 30、60 min 痛阈有统计学差异 ($P < 0.05$), 如图 5 所示。

3.6 ip 不同类型阿片受体阻断剂对天蟾胶囊致小鼠机械痛阈的影响

天蟾胶囊给药 1 周后, 也分别检测了上述阻断剂对小鼠机械痛阈的影响。结果显示 TCBFN 组小鼠的机械痛阈均被阻断剂 β -FNA 严重干扰 ($P < 0.05$), 其他各阻断剂对小鼠机械痛阈也具有一定干扰作用, 但并无统计学差异, 如图 6 所示。



与生理盐水对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 TCNBN 组比较:

* $P < 0.05$

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs normal saline control group; * $P < 0.05$ vs TCNBN group

图 5 ip 不同类型阿片受体阻断剂对天蟾胶囊致小鼠热刺激甩尾痛阈的影响 ($n=8$)

Fig. 5 Effect of ip different types of opioid receptor blockers on pain threshold of tail flapping induced by heat stimulation in mice induced by Tianchan Capsule ($n=8$)

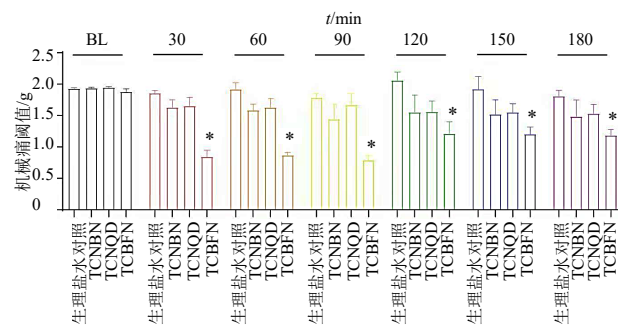


图 6 ip 不同类型阿片受体阻断剂对天蟾胶囊致小鼠机械痛阈的影响 ($n=8$)

Fig. 6 Effects of ip different types of opioid receptor blockers on mechanical pain threshold induced by Tianchan Capsule in mice ($n=8$)

4 讨论

疼痛是临床常见症状,临床中急慢性疼痛按照发病原因可分为急性炎症引起的疼痛、慢性炎症引起的疼痛、神经病理性疼痛和癌痛等。同时,疼痛按照发病部位可分为内脏痛、肌肉痛和肢体关节痛。各类疼痛发病率高,复发性强,临床有药物疗法和非药物疗法等治疗措施。药物治疗中分为非甾体类药物、水杨酸类药物、苯胺类药物等,该类药物对轻中度疼痛有效,且长期应用会有胃肠道反应和其他毒副作用;临床中应用最广的为阿片类镇痛药物,如吗啡、哌替啶、芬太尼、阿芬太尼、美沙酮、喷他左辛、羟氢可待酮等,该类药物镇痛作用较强,但长期应用可引起药物成瘾、耐受、呼吸抑制、皮肤瘙痒和便秘等并发症。因此,疼痛虽然为临床最常见的症状,临床治疗中却尚无可长期应用的药物。

中医药对疼痛的干预是源远流长,也是中医药的一大治疗优势和特色。本研究旨在明确天蟾胶囊的镇痛作用以及可能的作用靶标。天蟾胶囊由夏天无、制川乌、蟾酥、祖师麻、白屈菜、秦艽、白芷、川芎、白芍、甘草组成,具有行气活血和通络止痛的功效。已有研究表明夏天无^[14]、川乌^[15]、白屈菜^[16]、白芷^[17]具有阿片类药物样作用,本研究进一步观察其可能的作用靶标。因为本研究重点是明确天蟾胶囊的中枢镇痛效应,因此未建立急性炎症、神经病理性疼痛和癌痛等模型,直接观察了生理状态下其镇痛效应对阿片系统的依赖作用。首先观察了给予天蟾胶囊后对小鼠痛阈的影响,结果显示天蟾胶囊对小鼠生理状态下的痛阈具有明显提升作用,在此基础上,本研究采用阿片受体阻断剂通过 ip、脊髓腔注射、脑室注射 3 种给药途径干预其镇痛效应,结果显示天蟾胶囊的镇痛效应对阿片系统的依赖主要体现在外周系统,而对中枢阿片系统,如脊髓和脑部也具有依赖性,但对外周的阿片系统依赖程度最强。

为了进一步阐明阿片系统中 μ 阿片受体、 κ 阿片受体和 δ 阿片受体在天蟾胶囊外周镇痛效应中的作用,又分别使用其特异性阻断剂干预天蟾胶囊的镇痛,结果发现其对 μ 阿片受体的依赖程度最高,这一结果与目前临床常用的中枢类镇痛药物作用类似。

综上,天蟾胶囊主要体现在外周镇痛,且对 μ 阿片受体依赖性高。该研究虽然阐明了阿片类受体在天蟾胶囊镇痛中的作用,但先前根据其药物组成

及临床研究,在临床应用中,天蟾胶囊更适用于癌痛的治疗,其可能在发挥镇痛效应的同时,具有一定程度肿瘤抑制作用,但是对哪一种类型的肿瘤有这样的效应需要进一步深入研究,具体相关的分子机制也需要进一步后续研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Raja S N, Carr D B, Cohen M, et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: Concepts, challenges, and compromises [J]. *Pain*, 2020, 161(9): 1976-1982.
- [2] 宋学军,樊碧发,万有,等. 国际疼痛学会新版疼痛定义修订简析 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2020, 26(9): 641-644.
- [3] 聂登云,吕志刚. 调节阿片受体 MOR 胞内信号转导的分子机制研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2019, 25(10): 725-731.
- [4] 陈玉立. 龙血竭及其成分龙血素 B 镇痛机理的研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2010.
- [5] 李仲康, 安建雄, 倪家骧. 临床疼痛治疗学 [M]. 第 3 版. 天津: 天津科学技术出版社, 1994: 127-128.
- [6] 徐子金, 杨章坚, 叶颖俊. 不同厂家夏天无胶囊中 4 种活性成分的含量及镇痛作用比较 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(A4): 56-57.
- [7] 李双, 黎锐, 曾勇, 等. 川乌的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2433-2443.
- [8] 陈瀛澜, 郝艳艳, 郭夫江, 等. 蟾酥化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2579-2588.
- [9] Gao H M, Popescu R, Kopp B, et al. Bufadienolides and their antitumor activity [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28(5): 953-969.
- [10] 颜博, 王尊荣, 张永斌, 等. 天蟾胶囊镇痛作用的实验研究 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(8): 660-663.
- [11] 高娴, 梅家转, 李洪智. 天蟾胶囊联合羟考酮治疗中度癌痛的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(11): 2201-2205.
- [12] 魏琳, 杨晨光, 苗文红. 天蟾胶囊治疗癌性疼痛 II 期临床研究 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(8): 663-665.
- [13] 赵怡, 罗皓, 王春雷. 天蟾胶囊治疗轻、中度癌性疼痛 241 例有效性与安全性的临床观察 [J]. 黑龙江医药, 2015, 28(5): 1040-1042.
- [14] 陈芳, 李倩, 李学英. 高效液相色谱法测定复方夏天无片中原阿片碱和苯甲酰乌头原碱含量 [J]. 中国药业, 2020, 29(5): 130-132.
- [15] 郑春松, 林洁, 付长龙, 等. 基于计算机模拟乌头汤治疗疼痛的药效物质基础与分子作用机制 [J]. 康复学报, 2016, 26(1): 33-37.
- [16] 赵胜男, 李瑞海, 贾天柱. 21 个批次白屈菜 6 种成分含量测定研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(11): 207-209.
- [17] 汤建, 赵康琦, 张腾腾, 等. 白芷挥发油抗炎镇痛活性成分的虚拟筛选 [J]. 中医药信息, 2021, 38(2): 35-39.

[责任编辑 潘明佳]