

·基础研究·

本文引用:王希斌,杨斌,刘华钢.两面针中木脂素化合物结晶-8对疼痛大鼠中枢PGE<sub>2</sub>、NO、MDA水平的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(7):743-745.

## 两面针中木脂素化合物结晶-8对疼痛大鼠中枢 PGE<sub>2</sub>、NO、MDA水平的影响

王希斌<sup>1</sup>,杨斌<sup>2</sup>,刘华钢<sup>2\*</sup>

(1.广西医科大学第一附属医院药学部,广西南宁 530021;2.广西医科大学药学院,广西南宁 530021)

**[摘要]** 目的 观察两面针中木脂素化合物结晶-8(简称Crys-8)对甲醛致痛大鼠中枢一氧化氮(NO)、前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、丙二醛(MDA)水平的影响。方法 建立福尔马林疼痛模型,并给予Crys-8治疗,采用比色法测定大鼠脑组织中的NO、PGE<sub>2</sub>、MDA水平。结果 模型组大鼠脑组织PGE<sub>2</sub>、NO、MDA分别为(0.82±0.09)A值,(17.53±4.50) μmol/L,(119.72±26.30) nmol/mL,与正常对照组比较,模型组可以显著升高中枢PGE<sub>2</sub>、NO、MDA表达(P<0.01),差异有统计学意义。Crys-8低剂量组PGE<sub>2</sub>、NO分别为(0.44±0.05)A值,(13.06±0.80) μmol/L,Crys-8高剂量组MDA为(74.14±16.89) nmol/mL,与模型组比较,Crys-8可以显著降低中枢PGE<sub>2</sub>、NO、MDA表达(P<0.05),差异有统计学意义。结论 Crys-8镇痛机制可能与抑制中枢的PGE<sub>2</sub>、NO、MDA的释放,提高其抗氧化能力有关。

**[关键词]** 两面针;木脂素化合物;结晶-8;镇痛机制;一氧化氮;前列腺素E<sub>2</sub>;丙二醛

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标志码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.07.006

### Effect of the Lignan Compound Crystal-8 from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC. on the Expression of Prostaglandin E<sub>2</sub>, Nitric Oxide, and Malondialdehyde in Rats with Pain

WANG Xibin<sup>1</sup>, YANG Bin<sup>2</sup>, LIU Huagang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China;

2. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of crystal-8 (Crys-8), a lignan compound from *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC., on the levels of nitric oxide (NO), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), and malondialdehyde (MDA) in the central nervous system in rats with pain caused by formaldehyde. **Methods** A model of pain caused by formaldehyde was established in rats, and Crys-8 treatment was given. Colorimetry was used to measure the levels of NO, PGE<sub>2</sub>, and MDA in the brain tissue of rats. **Results** Compared with the normal control group, the model group had significantly higher levels of PGE<sub>2</sub> (0.82±0.09) A, NO (17.53±4.50) umol/L, and MDA (119.72±26.30 nmol/mL) in brain tissue (P<0.01). Compared with the model group, the low-dose Crys-8 group had significantly lower levels of PGE<sub>2</sub> (0.44±0.05 A) and NO (13.06±0.8 umol/L) (P<0.05), and the high-dose Crys-8 group had a significantly lower level of MDA (74.14±16.89 nmol/mL) (P<0.05). **Conclusion** Crys-8 exerts an analgesic effect possibly by inhibiting the release of PGE<sub>2</sub>, NO, and MDA in the central nervous system and increasing their antioxidant capacity.

**[Keywords]** *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC.; lignan compound; crystal-8; analgesic mechanism; nitric oxide; prostaglandin E<sub>2</sub>; malondialdehyde

**[收稿日期]**2017-03-14

**[基金项目]**高等学校博士学科点专项科研基金课题(20050598003)。

**[作者简介]**王希斌,男,副主任药师,主要从事中药药理、医院药学研究。

**[通讯作者]**\*刘华钢,女,教授,博士研究生导师,E-mail:46669073@qq.com。

两面针为芸香科植物两面针 (*Zanthoxylum nitidum*(Roxb.)DC)干燥的根,其性苦,辛,平,有小毒,归肝、胃经,具有行气止痛、活血化瘀、祛风通络的功效。临床外用治疗烫伤,内服治疗跌打损伤、风湿痹痛、胃痛、牙痛,毒蛇咬伤等。结晶-8(以下简称 Crys-8)是两面针中提取的木脂素化合物,前期采用国际通用的镇痛实验醋酸热板法,扭体法,福尔马林法,辐射热刺激法观察 Crys-8 用药后痛阈变化,Crys-8(15、30、60 mg/kg)均可延长小鼠舔足后的潜伏期,减少小鼠的扭体反应次数,抑制福尔马林致痛动物的 I 和 II 相疼痛反应,并延长小鼠甩尾潜伏期,Crys-8 有显著的镇痛作用<sup>[1]</sup>,Crys-8 通过侧脑室注射(ICV)给药途径能提高疼痛大鼠痛阈,表明 Crys-8 镇痛作用可能有中枢机制的参与,且与调整疼痛大鼠脑内  $\beta$ -内啡肽、Fos 基因的表达有关<sup>[2-3]</sup>。本研究通过观察 Crys-8 对疼痛模型大鼠中枢自由基的影响,进一步探讨其镇痛机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

SR-6N 型脑立体定位仪(日本成茂公司),TDL-5 型离心机(上海安亭科学仪器厂),超低温离心机(德国 Eppendorf);紫外分光光度计(日本岛津),Model-450 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.2 试剂

注射用 Crys-8 乳剂由广西医科大学药学院提供,批号 070315。考马斯亮兰蛋白试剂测定盒、一氧化氮(NO)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒,南京建成生物公司生产,批号依次是:20080808,20080606,20080925。甲醛溶液,成都市科龙化工试剂厂生产,批号:0601032。罗通定注射液,广东博罗先锋药业生产,批号:070801。

### 1.3 动物

清洁级雌性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,购自广西医科大学实验动物中心。实验动物生产许可证号:SCXKG 桂 2003-2003,实验动物使用许可证号 SYKG 桂 2003-005 号。

### 1.4 实验方法

1.4.1 分组干预及组织匀浆的制备 清洁级 SD 雌性大鼠 40 只,随机编号,按编码随机分为正常对照组,模型组,阳性对照组,Crys-8 高、低剂量组。除正常对照组外,其他 4 组建立福尔马林疼痛模型,即大鼠左足趾皮下注射 5%甲醛 100  $\mu$ L,造模后 1 h 给药。NS 组、模型组按侧脑室注射(ICV)与药物等体积的 0.9%氯化钠溶液。Crys-8 高剂量组、低剂量组:ICV Crys-8 (2 mg/kg、1 mg/kg),阳性对照组:ICV 罗通定注射液 (2 mg/kg)。各组于给药后 0.5 h 断头取脑,迅速用冰生理盐水冲洗血迹,滤纸吸干

水分,迅速称质量后,玻璃匀浆器中匀浆,制成 10%的组织匀浆液。

1.4.2 组织蛋白的测定前处理 将 10%的组织匀浆液用冰生理盐水稀释至 1%,离心(3 000 r/min,5 min),取上清液用于测定。取出相应试剂盒,其中空白管:加 0.05 mL 蒸馏水,3.0 mL 显色剂;标准管:加 0.05 mL 0.563 g/L 标准液,3.0 mL 显色剂;测定管:加 0.05 mL 上清液,3.0 mL 显色剂。各管混匀,静置 10 min,测各管的 OD 值,并计算脑组织匀浆的蛋白含量,用于 NO、MDA 的含量计算。

1.4.3 紫外分光光度法测定脑组织前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 取上清液 0.3 mL,加 0.5 mol/L KOH-甲醇溶液 2 mL,在 50 °C 水浴箱中异构化 20 min,然后加甲醛 2 mL,用紫外分光光度计测定其吸光度值,计算 PGE<sub>2</sub>。

1.4.4 硝酸还原法测定脑组织 NO 取出试剂盒,空白管:加 0.5 mL 蒸馏水,0.5 mL 混合试剂;标准管:加 0.4 mL 蒸馏水,0.1 mL 100  $\mu$ mol/L 标准液,0.5 mL 混合试剂;测定管:加 0.5 mL 上清液,0.5 mL 混合试剂。各管混匀,37 °C 准确水浴 60 min。各管加入配套的试剂 3、试剂 4 各 0.2 mL,0.1 mL。充分涡旋混匀 30 s,室温静置 40 min,3 500 r/min,离心 10 min,取上清液 0.8 mL,加上显色 0.6 mL。混匀,室温静置 10 min,蒸馏水调零,550 nm,测定管吸光度值,并计算 NO 含量。

1.4.5 TBA 法测定脑组织中 MDA 的含量 取出试剂盒,空白管:加 0.2 mL 无水乙醇,0.2 mL 试剂 1;标准管:加 0.2 mL 10 nmol/mL 标准品,0.2 mL 试剂 1;测定管:加 0.2 mL 上清液,0 mL 试剂 1。混匀后,各管加入 3 mL 试剂 2,1 mL 试剂 3。各管涡旋混匀器混匀以后,试管口用保鲜薄膜扎紧,用针头刺一个小口,95 °C 水浴 40 min,取出冷却,然后离心(4 000 r/min,10 min),取上清液 0.2 mL,蒸馏水调零,532 nm,1 cm 光径,测定管吸光度值,并计算 MDA 含量。

### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计分析,实验数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间均值比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 2 结果

与正常对照组比较,PGE<sub>2</sub>、NO、MDA 含量升高,差异显著( $P < 0.01$ ),说明造模成功。与模型组比,罗通定组、两个剂量组的 Crys-8 均可以显著降低疼痛大鼠中枢的 PGE<sub>2</sub> 的含量( $P < 0.01$ ),高剂量组 Crys-8 降低模型组 PGE<sub>2</sub> 较为明显( $P > 0.05$ )。与模型组比,低剂量组的 Crys-8 可以降低疼痛大鼠中枢的 NO 的含量( $P < 0.05$ ),而高剂量组的 Crys-8 未改变疼痛

大鼠中枢NO的含量( $P>0.05$ )。与模型组比,罗通定组、高剂量组Crys-8可以显著降低疼痛大鼠中枢MDA的含量,差异显著( $P<0.01$ ),而低剂量组未改变疼痛大鼠中枢MDA的含量( $P>0.05$ )。结果见表1。

表1 各组大鼠脑组织PGE<sub>2</sub>、NO、MDA的测定 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	n	PGE <sub>2</sub>		NO		MDA	
			A值	n	/μmol·L <sup>-1</sup>	n	/nmol·L <sup>-1</sup>	
正常组		8	0.48±0.11	7	8.54±1.37	6	94.91±10.38	
模型组		8	0.82±0.09 <sup>▽</sup>	7	17.53±4.50 <sup>▽</sup>	8	119.72±26.30 <sup>▽</sup>	
Crys-8组	1	8	0.44±0.05**	6	13.06±0.80*	8	101.43±6.57	
Crys-8组	2	8	0.29±0.06**	6	14.42±0.98	8	74.14±16.89**	
罗通定组	2	8	0.47±0.08**	6	15.48±2.85	8	66.02±17.79**	

注:与正常组比较,▽ $P<0.01$ ,与模型组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

### 3 讨论

福尔马林疼痛模型是目前国内外公认的、可靠的疼痛模型,通过刺激足底可引起动物持续性躯体痛,已普遍应用于镇痛药的筛选及疼痛机制的研究<sup>[4]</sup>,福尔马林疼痛分为两个时相,第一时相疼痛是直接刺激外周神经末梢引起,第二时相疼痛是炎症介质的产生、释放引起,是外周炎症反应和中枢反应的综合结果,因此本实验采用福尔马林疼痛模型用于Crys-8疼痛机制的研究。前期研究表明,采用侧脑室注射给药方式,ICV Crys-8后,显示其具有良好的镇痛作用,表明镇痛作用至少有中枢机制的参与;同样采用福尔马林疼痛模型,ICV Crys-8可抑制伤害性疼痛模型大鼠脑干、下丘脑、脊髓C-FOS基因表达;ICV Crys-8可以明显提高疼痛大鼠海马、下丘脑β-内啡肽的表达,调整中枢神经递质<sup>[2-3]</sup>。

疼痛形成的机制非常复杂,疼痛发生时,体内的炎症介质如前列腺素、组织胺、5-TH、NO等氧自由基都参与到疼痛中,其中一部分成为镇痛物质,一部分成为致痛物质,这些物质与疼痛密不可分。

炎症和疼痛密切相关,当组织发生损伤,产生炎症时,局部可以释放前列腺素、白三烯、组胺等致炎因子,其中前列腺素是一种活性很强的炎症因子<sup>[5]</sup>,通常PGE<sub>2</sub>的产生会伴随着大量的氧自由基生成,从而引起细胞损伤,表现出强烈的疼痛增敏作用<sup>[6-8]</sup>,本实验显示,ICV Crys-8可以明显降低脑组织中PGE<sub>2</sub>的水平,提示了抑制PGE<sub>2</sub>的合成是Crys-8发挥镇痛作用的机制之一。

NO是活性氧的一种,作为重要的递质,参与了重要的生理、病理过程,通过NO-cGMP途径,提高细胞的cGMP水平从而发挥镇痛作用<sup>[9]</sup>。NO在外周和中枢这两个系统参与疼痛的调控<sup>[10]</sup>。NO在疼痛调控中扮演双面角色,有报道NO有痛敏作用,可以促使炎症因子的释放,对细胞产生毒性,疼痛加剧,镇痛

药可以抑制NO的合成和炎症因子的释放<sup>[11-12]</sup>;但有报道认为提高其体内的NO水平可以产生镇痛作用<sup>[13]</sup>。本实验显示,Crys-8的镇痛机制可能与抑制疼痛大鼠中枢NO的水平有关。

炎症发生时,氧自由基能诱发脂质过氧化,产生MDA,引起细胞的损伤,表现出致痛作用,所以通过测定MDA水平可以体现体内自由基产生的程度。文献报道<sup>[14-16]</sup>,氧自由基在外周或者中枢产生致痛作用,一些抗氧化酶可以清除氧自由基,对抗致痛作用。本实验中,Crys-8可以对抗疼痛大鼠的MDA异常增高,提示了Crys-8的中枢镇痛作用可能与抗氧化途径有关。

综上所述,Crys-8镇痛机制可能与抑制中枢的PGE<sub>2</sub>、NO、MDA的表达有关,本结果为两面针在临床上治疗各种痛症提供实验依据。

### 参考文献:

- [1] 王希斌,刘华钢,杨斌,等.两面针中木脂素化合物结晶-8的镇痛作用[J].广西医科大学学报,2010,27(3):363-365.
- [2] 王希斌,刘华钢,杨斌,等.两面针中木脂素化合物结晶-8对致痛大鼠脑内B-内啡肽表达的影响[J].中国药理学通报,2009,25(9):1256-1257.
- [3] 王希斌,刘华钢,杨斌,等.两面针中木脂素化合物结晶-8对伤害性疼痛大鼠c-fos基因表达的影响[J].医药导报,2012,31(9):1113-1115.
- [4] 林雪梅,王泉云,朱琳,等.福尔马林致痛对大鼠行为学及脊髓NO、Fos的影响[J].四川大学学报:医学版,2003,34(3):523-546.
- [5] MALINBERG A B, YAKSH T L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spiral release of excitatory amino acid and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats[J]. British J of pharmacology, 1995, 114(5):1069-1071.
- [6] 罗小文,李佳川,谭睿,等.湿生扁蕾对小鼠抗炎镇痛作用的研究[J].中药药理与临床,2013,29(1):774-777.
- [7] 付昆,付文君,魏江平,等.正天丸的镇痛作用及机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2017,23(3):401-403.
- [8] 吴德松,赵道强,柴琇琰,等.复方通痹胶囊对类风湿关节炎的影响研究[J].云南中医学院学报,2016,39(5):7-10.
- [9] 田今华,王晓民,韩济生.一氧化氮与痛觉调制[J].生理科学进展,1996,27(2):161-164.
- [10] 阮洪生,刘树民.身痛逐瘀胶囊对醋酸致痛小鼠血清中NO、SOD、MDA、PGE<sub>2</sub>的影响[J].中药药理与临床,2013,29(5):5-7.
- [11] 冯玥,朱振娜,王磊,等.六经头痛片镇痛作用特点与比较优势研究[J].中草药,2017,48(20):4181-4184.
- [12] 王静,王海华,姜玉新,等.金叶女贞果实花青素的镇痛作用初探[J].中国临床药理学与治疗学,2015,20(1):38-41.
- [13] 陈志武,马传庚,方明,等.小鼠疼痛过程中丙二醛及抗氧化酶的变化[J].中国疼痛医学杂志,1997,3(3):182-185.
- [14] 王洁,宋必卫,马传庚,等.氧自由基与疼痛[J].中国药理学通报,1998,14(2):107-109.
- [15] 白鹭.骨痛方对膝骨性关节炎患者NO、SOD、MDA的影响[J].河南中医,2016,36(8):1439-1442.
- [16] 曹良顺,刘天宇,蔡春辉.山茶油对乙醇和消炎痛致小鼠胃溃疡的影响[J].海南医学,2018,29(7):895-898.