

槐果碱的镇痛、抗炎作用及其对COX-2/PGE₂信号通路的影响[△]

付聪敏^{1*},王敏²,徐松涛³,金少举^{3#}(1.承德护理职业学院涉外护理系,河北承德 067000;2.漯河医学高等专科学校第一附属医院妇产科,河南漯河 462000;3.漯河医学高等专科学校药学系/河南省肿瘤发生与防治创新型科技团队,河南漯河 462002)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1775-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.10

摘要 目的:研究槐果碱(SC)对炎性痛模型小鼠的镇痛、抗炎作用及环氧合酶2/前列腺素E₂(COX-2/PGE₂)信号通路的影响。方法:(1)镇痛实验。将50只小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、阳性对照组(阿司匹林,100 mg/kg)和槐果碱高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg),每组10只,每天灌胃给药1次,连续给药5 d;末次给药后2 h,各组小鼠腹腔注射冰醋酸溶液,记录小鼠15 min内的扭体次数;另取50只小鼠,分组及给药同上,采用智能热板仪测定末次给药15、30、60、120 min后小鼠的反应痛阈值(T_r)。(2)抗炎及机制实验。取60只小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、模型对照组(生理盐水)、阳性对照组(阿司匹林,100 mg/kg)及槐果碱高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg),每组10只,每天灌胃给药1次,连续给药5 d;末次给药后60 min,除空白对照组外,其余各组小鼠均注射1%角叉菜胶致炎,并于致炎1、3、5 h后测定各组小鼠足趾肿胀度。另取60只小鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、模型对照组(生理盐水)、槐果碱组(40 mg/kg),每组10只,每天灌胃给药1次,连续给药5 d;末次给药后60 min,除空白对照组外,其余各组小鼠均注射1%角叉菜胶致炎,5 h后采用生化法检测各组小鼠足趾肿胀组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总抗氧化能力(T-AOC)水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测足趾肿胀组织中PGE₂水平;分别采用逆转录-聚合酶链式反应法(RT-PCR)和Western blot法测定小鼠足趾肿胀组织中COX-1、COX-2 mRNA和蛋白表达水平。结果:在镇痛实验中,与空白对照组比较,各给药组小鼠扭体次数均明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$),末次给药30、60、120 min后T_r值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。在抗炎及机制实验中,与空白对照组比较,模型对照组小鼠致炎1、3、5 h后的足趾肿胀度明显升高($P<0.01$),足趾肿胀组织中SOD、GSH-Px、T-AOC水平明显降低($P<0.01$),MDA、PGE₂水平明显升高($P<0.01$),COX-2 mRNA和蛋白表达水平明显升高($P<0.01$);与模型对照组比较,阳性对照组和槐果碱高、中剂量组小鼠致炎3、5 h后的足趾肿胀度明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),槐果碱组小鼠足趾肿胀组织中SOD、GSH-Px、T-AOC水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA、PGE₂水平明显降低($P<0.01$),COX-2 mRNA和蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),其他指标差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:槐果碱具有较好的抗炎、镇痛作用,其作用机制可能与其抗氧化应激和抑制COX-2/PGE₂信号通路有关。

关键词 槐果碱;氧化应激;环氧合酶2;前列腺素E₂;小鼠

Effects of Analgesic and Anti-inflammatory of Sophocarpine and Related COX-2/PGE₂ Signaling Pathway

FU Congmin¹, WANG Min², XU Songtao³, JIN Shaoju³(1.Dept. of Concerning Foreign Affairs Nursing, Chengde Nursing Vocational College, Hebei Chengde 067000, China; 2.Dept. of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Henan Luohe 462000, China; 3.Dept. of Pharmacy, Luohe Medical College/Tumor Occurrence and Prevention Innovation Team of Henan Province, Henan Luohe 462002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study analgesic and anti-inflammatory effects of sophocarpine (SC) on inflammatory pain model mice and related COX-2/PGE₂ signaling pathway. METHODS: (1) Analgesic experiment. Totally 50 mice were randomly divided into blank control group (normal saline), positive control group (aspirin, 100 mg/kg) and SC high-dose, medium-dose and low-dose groups (40, 20, 10 mg/kg), with 10 mice in each group. They were given relevant medicine once a day intragastrically for consecutive 5 d. 2 h after last medication, mice in each group was given glacial acetic acid solution intraperitoneal injection; writhing times of mice within 15 minutes were recorded. Other 50 mice were collected; they were grouped and given medicine as above. The response pain threshold (T_r) of mice was determined by intelligent hot plate instrument 15, 30, 60, 120 min after last administration. (2) Anti-inflammatory and mechanism experiment. Other 60 mice were randomly divided into blank control group (normal saline), model control group (normal saline), positive control group (aspirin, 100 mg/kg), SC high-dose, medium-dose and low-dose groups (40, 20, 10

△基金项目:河南省科技发展计划项目(No.152300410178)

*讲师。研究方向:中药药理学。电话:0314-2156988。E-mail: congminmin@163.com

#通信作者:副教授,博士。研究方向:分子药理学。电话:0395-6716008。E-mail:jinshaoju@163.com

mg/kg), with 10 mice in each group; they were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 5 d. 60 min after last medication, except for blank control group, other groups were given 1% carrageenan to induce inflammation. 1, 3, 5 h after inducing inflammation, the degree of paw swelling were determined in each group. Other 30 mice were randomly divided into blank control group (normal saline), model control group (normal saline), SC group (40 mg/kg), with 10 mice in each group; they were given relevant medicine intragastrically once a day, for consecutive 5 d. 60 min after last medication, except for blank control group, other groups were given 1% carrageenan to induce inflammation in other groups. 5 h later, the levels of SOD, MDA, GSH-Px and T-AOC in paw swelling tissue of mice were determined by biochemical method. The level of PGE₂ in paw swelling tissue was determined by ELISA. The mRNA and protein expressions of COX-1 and COX-2 in paw swelling tissue of mice were detected by RT-PCR and Western blot method. RESULTS: In analgesic experiment, compared with blank control group, writhing times of mice were decreased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), T_r were increased significantly 30, 60, 120 min after last medication ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In anti-inflammatory and mechanism experiment, compared with blank control group, the degree of paw swelling were increased significantly in model control group 1, 3, 5 h after inducing inflammation ($P < 0.01$); the levels of SOD, GSH-Px and T-AOC in paw swelling tissue were decreased significantly ($P < 0.01$); the levels of MDA and PGE₂ were increased significantly ($P < 0.01$), and mRNA and protein expressions of COX-2 were increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model control group, the degree of paw swelling were decreased significantly in positive control group, SC high-dose and low-dose groups 3 and 5 h after inducing inflammation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The levels of SOD, GSH-Px and T-AOC in paw swelling tissue were increased significantly in SC group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the levels of MDA and PGE₂ were decreased significantly ($P < 0.01$) as well as mRNA and protein expressions of COX-2 were decreased significantly ($P < 0.05$). There was no statistical significance in other indexes ($P > 0.05$). CONCLUSIONS: SC possesses good anti-inflammatory and analgesic effects, and its mechanism may be related to anti-oxidative stress and inhibition of COX-2/PGE₂ signaling pathway.

KEYWORDS Sophocarpine; Oxidative stress; COX-2; PGE₂; Mice

槐果碱是从中药苦豆草中提取的一种苦参型生物碱,具有保护心脏、保肝、抗心律失常、抗病毒、抗肿瘤、抗酒精性肝损伤和缓解神经病理性疼痛的药理作用^[1-3]。本课题组前期研究发现,槐果碱可显著缓解坐骨神经慢性缩窄性损伤(CCI)及坐骨神经分支保留性损伤(SNI)所致的神经病理性疼痛,其机制可能与抗氧化应激、抑制 Toll 样受体 4(TLR4)/p38 分裂原激活蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路及上调γ-氨基丁酸(GABA)信号通路等有关^[4-6]。Gao Y 等^[7]研究报道,槐果碱还具有中枢性和外周性抗炎镇痛作用,但关于其作用机制尚未完全阐明。在炎症反应过程中,花生四烯酸在环氧化酶 2(COX-2)的作用下生成前列腺素(Prostaglandin, PG),PG 是一类强的致炎致痛介质,特别是 PGE₂ 其致炎致痛作用更为强烈^[8-9],槐果碱抗炎、镇痛作用是否与 COX-2、PGE₂ 等有关,有待研究。本研究通过小鼠醋酸扭体实验、热板实验及角叉菜胶致小鼠足趾肿胀实验观察槐果碱对小鼠的镇痛、抗炎作用,同时研究其对 COX-2/PGE₂ 信号通路的影响,为槐果碱镇痛、抗炎作用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

YLS-6B 智能热板仪、FA1104 电子分析天平、722 可见分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司);ZH-ZZY 足趾容积测量仪(安徽正华生物仪器设备有限公司);H2050R 台式高速冷冻离心机(湖南湘仪离心机仪器有

限公司);T100 聚合酶链式反应(PCR)仪、GelDoc XR+ 凝胶成像系统、Sub-Cell[®] Model 192 Cell 水平电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 药品与试剂

槐果碱对照品(南京泽朗生物科技有限公司,批号:20150915,纯度:≥98%);冰醋酸(东莞市乔科化学有限公司,批号:20160723);阿司匹林对照品(批号:106K0101,纯度:99.0%);角叉菜胶(批号:182K14436)均购自美国 Sigma 公司;超氧化物歧化酶(SOD,批号:20180625)、丙二醛(MDA,批号:20180619)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px,批号:20180529)及总抗氧化能力(T-AOC,批号:20180621)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;小鼠 PGE₂ 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海科顺生物科技有限公司,批号:20180628);RNA 提取试剂盒(批号:12183555)、逆转录试剂盒(批号:K1691)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;兔抗 COX-2(批号:SC-11745)、COX-1(批号:SC-19998)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(批号:SC-81178)均购自美国 Santa Cruz 公司;增强型 RIPA 裂解液(批号:180320)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:180415)均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 动物

健康 SPF 级小鼠 240 只(♂ 85 只、♀ 155 只),体重 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。小鼠自

由饮食,10只/笼,设置室内温度为22~25℃、湿度为55%~65%,适应性饲养1周后进行实验。

2 方法

2.1 小鼠扭体实验

将50只小鼠(♀♂各半)随机分为空白对照组(生理盐水)、阳性对照组(阿司匹林,100 mg/kg,给药剂量参考文献[10]而得,下同)和槐果碱高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg,给药剂量参考文献[4]而得,下同),每组10只,各组小鼠灌胃给予相应的药物,每天1次,连续给药5 d。末次给药后2 h,各组小鼠均腹腔注射0.2 mL 0.6%冰醋酸溶液,记录15 min内小鼠扭体反应次数(扭体反应表现为小鼠出现腹部凹陷、后肢伸直、抬高臀部等行为),并计算小鼠扭体反应抑制率:扭体反应抑制率(%)=(空白对照组小鼠扭体反应次数-给药组小鼠扭体反应次数)/空白对照组小鼠扭体反应次数×100%。

2.2 小鼠热板实验

设置智能热板仪温度为(52±0.5)℃,另取70只小鼠(♀)置于热板上开始计时,记录小鼠出现舔足反应或跳跃反应的潜伏期即为痛阈值,剔除潜伏期小于5 s和大于30 s的小鼠。给药前将每只小鼠测痛阈2次,每次间隔10 min,取其平均值作为初始痛阈值(T_1),将筛选合格并测完 T_1 的50只小鼠随机分为空白对照组(生理盐水,0.01 mL/g)、阳性对照组(阿司匹林,100 mg/kg)和槐果碱高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg),各组小鼠灌胃给予相应药物,于给药后15、30、60、120 min观察记录小鼠的反应痛阈值(T_r)(为防止烫伤小鼠,观察痛阈值时不应超过60 s),并计算给药后60 min小鼠痛阈提高率[痛阈提高率(%)=(T_r-T_1)/ T_1 ×100%]。

2.3 小鼠足趾肿胀实验

另取60只小鼠(♀♂各半)随机分为空白对照组(生理盐水)、模型对照组(生理盐水)、阳性对照组(阿司匹林,100 mg/kg)及槐果碱高、中、低剂量组(40、20、10 mg/kg),每组10只,各组小鼠灌胃给予相应的药物,每天1次,连续给药5 d。末次给药后60 min,用足趾容积测量仪测定小鼠足趾容积作为基础容积,然后空白对照组小鼠足底皮下注射20 μL生理盐水,其余各组均足底皮下注射20 μL 1%角叉菜胶生理盐水溶液致炎,于足底皮下注射后1、3、5 h测定小鼠足趾容积作为测定容积,计算小鼠足趾肿胀度:足趾肿胀度=小鼠足趾测定容积-小鼠足趾基础容积,并计算给予角叉菜胶后5 h小鼠足趾肿胀率[足趾肿胀率(%)=足趾肿胀度/给药前足趾容积×100%]。

2.4 小鼠足趾肿胀组织中SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC及PGE₂水平的测定

另取60只小鼠(♀♂各半)随机分为空白对照组(生理盐水)、模型对照组(生理盐水)及槐果碱组(40 mg/kg),每组10只,各组小鼠灌胃给予相应的药物,每天1次,连

续给药5 d。末次给药后60 min,空白对照组小鼠足底皮下注射20 μL生理盐水,其余各组均足底皮下注射20 μL 1%角叉菜胶生理盐水溶液致炎,5 h后将各组小鼠颈椎脱臼处死,各组分别取10只小鼠的足趾肿胀组织制成匀浆(其余小鼠用于后续实验),按试剂盒说明书操作要求检测SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC及PGE₂水平。

2.5 小鼠肿胀足趾组织中COX-1、COX-2 mRNA表达水平的检测

采用逆转录-PCR法。取“2.4”项下剩余30只小鼠的足趾肿胀组织约50 mg,置于研钵中,加入适量液氮充分研磨至粉末状,按相关试剂盒说明书操作提取总RNA、合成cDNA并进行PCR反应。待测基因引物序列如下:COX-1上游引物为5'-GGCATTGCACATCCATCCAC-3',下游引物为5'-GCGCATGAGTACTTCTCGGA-3',基因长度为378 bp;COX-2上游引物为5'-TTTTGTGCTGGCCTGGTACT-3',下游引物为5'-CACATGACATGGGGCCTTCT-3',基因长度为209 bp; β -actin上游引物为5'-GTTGGAGCAAACATCCCCCA-3',下游引物为5'-CGCGACCATCCTCCTCTTAG-3',基因长度为186 bp。PCR扩增反应条件为:反应体系25 μL;95℃预变性3 min;95℃变性30 s,60℃退火40 s,72℃延伸45 s,共35个循环;72℃延伸15 min。将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶(2.0%)电泳,于凝胶成像分析系统下拍照,记录条带光密度值,以 β -actin条带为内参分析COX-1、COX-2 mRNA相对表达水平。

2.6 小鼠肿胀足趾组织中COX-1、COX-2蛋白表达水平的检测

采用Western blot法取“2.5”项下各组小鼠足趾肿胀组织约100 mg,用组织剪剪碎,置于匀浆器中,加1.5 mL RIPA裂解液,于冰上充分裂解匀浆,然后于4℃下12 000 r/min离心15 min,收集上清即为蛋白提取液,立即用BCA试剂盒测定蛋白浓度并调整各样本浓度一致,按照Western blot操作步骤依次进行蛋白变性、上样、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳、转膜、抗原封闭、一抗(COX-1抗体,1:1 500;COX-2抗体,1:1 500; β -actin抗体,1:3 000)、二抗(1:5 000)孵育、洗膜及显色,最后置于凝胶成像分析系统下显色拍照,以 β -actin条带灰度值为内参分析COX-1、COX-2蛋白相对表达水平。

2.7 统计学处理

应用SPSS 18.0统计软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠扭体实验结果

与空白对照组比较,各给药组小鼠扭体次数均明显

减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; 扭体反应抑制率分别为 69.94%、58.96%、34.68%、20.81%。各组小鼠扭体次数及扭体反应抑制率测定结果见表 1。

表 1 各组小鼠扭体次数及扭体反应抑制率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Determination result of rithing times and inhibitory rate of writhing in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	扭体次数	扭体反应抑制率, %
空白对照组		34.60 ± 4.51	
阳性对照组	100	10.40 ± 2.97**	69.94
槐果碱高剂量组	40	14.20 ± 3.70**	58.96
槐果碱中剂量组	20	22.60 ± 4.04**	34.68
槐果碱低剂量组	10	27.40 ± 3.51*	20.81

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.2 小鼠热板实验结果

给药前, 各组小鼠痛阈值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药后, 与空白对照组比较, 阳性对照组和槐果碱高、中、低剂量组小鼠在给药 30、60 及 120 min 后痛阈值明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; 给药后 120 min 痛阈提高率分别为 150.07%、148.00%、79.59%、50.03%。各组小鼠痛阈值及痛阈提高率测定结果见表 2。

表 2 各组小鼠痛阈值及痛阈提高率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Determination result of pain threshold and its improvement rate of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	给药前痛阈, s	给药后痛阈值, s				给药后 120 min 痛阈提高率, %
			15 min	30 min	60 min	120 min	
空白对照组		20.22 ± 3.78	21.91 ± 5.16	25.38 ± 4.31	24.06 ± 3.27	24.70 ± 3.09	22.11
阳性对照组	100	21.26 ± 5.20	31.28 ± 5.82*	44.05 ± 5.25**	49.44 ± 3.47**	53.17 ± 4.84**	150.07
槐果碱高剂量组	40	20.58 ± 4.05	28.21 ± 5.72	37.04 ± 3.87**	43.78 ± 4.49**	51.05 ± 4.72**	148.00
槐果碱中剂量组	20	24.17 ± 5.13	24.64 ± 3.85	33.83 ± 6.13*	38.65 ± 4.76**	43.41 ± 3.83**	79.59
槐果碱低剂量组	10	22.64 ± 5.31	23.25 ± 3.36	31.99 ± 4.35*	35.20 ± 4.55**	33.97 ± 3.56*	50.03

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 小鼠足趾肿胀实验结果

造模前, 各组小鼠基础足容积差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后, 与空白对照组比较, 模型对照组小鼠致炎 1、3、5 h 的足趾肿胀度明显升高 ($P < 0.01$) , 致炎 5 h 的足趾肿胀率为 56.97% ; 与模型对照组比较, 阳性对照组和槐果碱高、中剂量组小鼠致炎 3、5 h 的足趾肿胀度明显降低 ($P < 0.01$) , 致炎 5 h 的足趾肿胀率分别为 21.31%、31.08%、45.49%。各组小鼠足趾肿胀度及足趾肿胀率测定结果见表 3。

3.4 各组小鼠足趾肿胀组织中 SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC 及 PGE₂ 水平测定结果

与空白对照组比较, 模型对照组小鼠足趾肿胀组织中 SOD、GSH-Px、T-AOC 水平明显降低 ($P < 0.01$) ,

表 3 各组小鼠足趾肿胀度及足趾肿胀率测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 3 Determination result of degree and rate of paw swelling of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	基础足趾容积, μL			足趾肿胀度, μL			给予角叉菜胶后 5 h 足趾肿胀率, %
		μL	1 h	3 h	5 h	3 h	5 h	
空白对照组		171.19 ± 5.94	3.66 ± 1.66	4.53 ± 2.42	2.57 ± 0.56		1.50	
模型对照组		170.50 ± 5.32	28.72 ± 4.70**	32.93 ± 6.33**	97.14 ± 7.65**		56.97	
阳性对照组	100	169.73 ± 6.50	21.60 ± 3.19**	24.83 ± 3.10**	36.18 ± 4.33**		21.31	
槐果碱高剂量组	40	168.45 ± 7.32	24.83 ± 4.40**	45.29 ± 7.25**	52.35 ± 5.87**		31.08	
槐果碱中剂量组	20	172.86 ± 5.19	26.33 ± 3.10**	64.70 ± 4.91**	78.64 ± 4.71**		45.49	
槐果碱低剂量组	10	168.93 ± 7.43	26.89 ± 4.30**	86.78 ± 10.54**	90.68 ± 8.66**		53.68	

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

MDA、PGE₂ 水平明显升高 ($P < 0.01$) ; 与模型对照组比较, 槐果碱组小鼠足趾肿胀组织中 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) , MDA、PGE₂ 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组小鼠足趾肿胀组织中 SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC、PGE₂ 水平测定结果见表 4。

表 4 各组小鼠足趾肿胀组织 SOD、MDA、GSH-Px、T-AOC、PGE₂ 表达水平测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 4 Determination result of SOD, MDA, GSH-Px, T-AOC and PGE₂ in paw swelling tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量, mg/kg	SOD, U/mg	MDA, nmol/mg	GSH-Px, U/mg	T-AOC, U/mg	PGE ₂ , pg/mg
空白对照组		40.80 ± 4.42	1.55 ± 0.28	167.55 ± 9.57	2.46 ± 0.43	70.69 ± 7.93
模型对照组		25.84 ± 5.03**	3.61 ± 0.27**	131.01 ± 7.69**	1.07 ± 0.24**	129.96 ± 9.94**
槐果碱组	40	35.49 ± 5.57*	2.47 ± 0.46**	155.80 ± 8.24**	2.14 ± 0.21**	89.64 ± 11.64**

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.5 各组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1、COX-2 mRNA 表达水平测定结果

与空白对照组比较, 模型对照组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) , COX-2 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.01$) ; 与模型对照组比较, 槐果碱组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) , COX-2 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。各组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1、COX-2 mRNA 表达电泳图见图 1, 测定结果见表 5。

3.6 各组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1、COX-2 蛋白表达水平测定结果

与空白对照组比较, 模型对照组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,

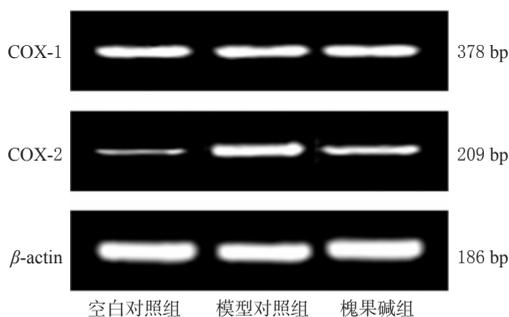


图1 各组小鼠足趾肿胀组织 COX-1、COX-2 mRNA 表达电泳图

Fig 1 Electrophoregrams of mRNA expression of COX-1 and COX-2 in paw swelling tissue of mice in each group

表5 各组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1、COX-2 mRNA 表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 5 Determination result of mRNA expressions of COX-1 and COX-2 in paw swelling tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	光密度值	
		COX-1/ β -actin	COX-2/ β -actin
空白对照组		0.251 \pm 0.037	0.142 \pm 0.029
模型对照组		0.245 \pm 0.043	0.316 \pm 0.037**
槐果碱组	40	0.229 \pm 0.041	0.246 \pm 0.034**

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, # $P < 0.05$

COX-2 蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$);与模型对照组比较,槐果碱组小鼠组织肿胀组织中 COX-1 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),COX-2 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)。各组小鼠足趾肿胀组织中 COX-1、COX-2 蛋白表达电泳图见图2,测定结果见表6。

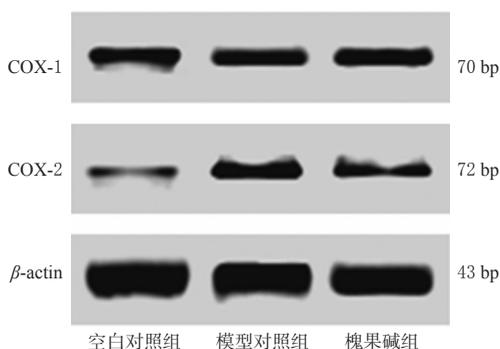


图2 各组小鼠足趾肿胀组织 COX-1、COX-2 蛋白表达电泳图

Fig 2 Electrophoregrams of protein expression of COX-1 and COX-2 in paw swelling tissue of mice in each group

4 讨论

炎症和疼痛是临床上常见的病症,各种原因都可能

表6 各组小鼠足趾肿胀组织 COX-1、COX-2 蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 6 Determination result of protein expressions of COX-1 and COX-2 in paw swelling tissue of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	灰度值	
		COX-1/ β -actin	COX-2/ β -actin
空白对照组		0.332 \pm 0.055	0.115 \pm 0.029
模型对照组		0.343 \pm 0.040	0.366 \pm 0.063**
槐果碱组	40	0.358 \pm 0.052	0.237 \pm 0.040***

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,# $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, # $P < 0.01$

引发炎症或疼痛,两种症状往往相互伴随同时出现。临床常用的抗炎镇痛药具有解热镇痛抗炎作用,主要用于缓解关节炎、风湿性疾病、发热及疼痛等慢性炎性痛病症,但在应用的过程中易产生消化道出血、肝肾损伤等不良反应,影响了其在临床上的应用^[11-12]。因此寻找抗炎镇痛效果好、不良反应少的抗炎镇痛药物一直是医学研究的重要任务之一。槐果碱是从中药苦豆子中提取的一种重要生物碱,本课题组前期研究发现其对神经病理性疼痛具有很好的缓解作用^[4-6],为进一步证实是否具有抗炎、镇痛作用,笔者进行了本研究。结果发现,槐果碱 40、20 mg/kg 槐果碱可明显减少冰醋酸致小鼠扭体次数、提高热板致小鼠疼痛的痛阈值及抑制角叉菜胶致小鼠足趾肿胀的肿胀度,并且可抑制炎症部位氧化应激反应,提示槐果碱具有较好的抗炎、镇痛和抗氧化应激作用^[1]。

炎性痛是在各种致炎、致痛因子等刺激下产生的反应,可促使大量活性氧簇(ROS)及脂质过氧化产物等生成,SOD 及 GSH-Px 的水平及活性降低,机体的 T-AOC 显著减弱,使线粒体功能出现障碍,溶酶体及脂质膜遭到破坏,加重组织器官损伤,进一步加重和放大炎症和疼痛反应,产生恶性循环。因此,控制氧化应激反应是缓解炎性痛的重要措施之一^[10,13]。相关研究报道,在炎性痛发生发展过程中,COX-2/PGE₂ 信号通路参与其中^[14]。COX 是花生四烯酸代谢合成 PGs 的关键酶,目前发现主要有 COX-1 和 COX-2 两种同工酶亚型^[15],COX-1 为结构型酶,主要参与血管、肾、胃等组织的正常生理活动,其水平在体内相对稳定,对保持机体内环境稳态至关重要,如果其活性被抑制,则可能诱发相应组织器官功能紊乱;COX-2 为诱导型酶,各种损伤因素如化学、物理、外伤和细胞因子等可诱发其生成和活性增加,可催化花生四烯酸生成 PGs^[16]。PGs 为一类强的炎性介质,其中 PGE₂ 致炎作用更为强烈,可诱导炎性细胞趋化聚集,扩张毛细血管使其通透性增加,促进炎性渗出,导致发热及增加其他炎症介质如白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及白三烯等的致炎致痛作用,诱导产生

爆发式炎症级联反应,进一步增强和放大炎症反应,加重疼痛等级^[17-20]。在本研究中,为了保证实验设计及动物模型选择的合理性,在进行小鼠行为学观察时,笔者选择阿司匹林作为阳性药物进行实验。在研究槐果碱抗炎、镇痛作用机制时,由于阿司匹林抑制 COX 活性、减少 PG 的合成的镇痛机制已经明确^[21],且笔者主要研究待测药物的作用机制,因此在此部分实验中只选择了槐果碱 40 mg/kg 这一有效剂量进行研究,未再设置阳性对照。槐果碱的抗炎镇痛作用除了本研究所涉及的抗氧化应激和抑制 COX-2/PGE₂ 信号通路外,可能还涉及其他的分子机制,笔者将在今后的研究中作进一步探讨。

综上所述,槐果碱可明显升高角叉菜胶致小鼠足趾肿胀组织中 SOD、GSH-Px 和 T-AOC 的水平,降低 MDA、PGE₂ 和 COX-2 mRNA 及蛋白的水平,提示槐果碱抗炎、镇痛作用与其抗氧化应激和抑制 COX-2/PGE₂ 信号通路有关。

参考文献

[1] 季宇彬,赵贺,王福玲.槐果碱药理作用研究进展[J].中草药,2018,49(20):4945-4948.

[2] ZHANG PP, WANG PQ, QIAO CP, et al. Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma by inhibiting the activity of AKT/GSK-3 β / β -catenin axis and TGF- β induced EMT with sophocarpine[J]. *Cancer Lett*, 2016, 376(1): 95-103.

[3] YIFENG M, BIN W, WEIQIAO Z, et al. Neuroprotective effect of sophocarpine against transient focal cerebral ischemia via down-regulation of the acid-sensing ion channel 1 in rats[J]. *Brain Res*, 2011.DOI: 10.1016/j.brainres.2011.01.004.

[4] 金少举,王蓉,李海龙,等.槐果碱对CCI致神经病理性疼痛小鼠氧化应激水平及 Caspase-3/Bax/Bcl-2 信号通路的影响[J].中药药理与临床,2018,34(2):39-43.

[5] 金少举,王蓉,李海龙,等.槐果碱对SNI致神经病理性疼痛小鼠脊髓组织TLR4/p38 MAPK的影响[J].中国药理学通报,2017,33(9):1266-1271.

[6] 金少举,任雨平,马奔晖,等.槐果碱对神经病理性疼痛小鼠GABA信号通路的影响[J].中药药理与临床,2016,32(3):24-28.

[7] GAO Y, LI G, LI C, et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of sophocarpine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 125(2): 324-329.

[8] SONG Q, FAN C, WANG P, et al. Hippocampal CA1 β CaMK II mediates neuroinflammatory responses via COX-2/PGE₂ signaling pathways in depression[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 338-354.

[9] YAO C, NARUMIYA S. Prostaglandin-cytokine crosstalk

in chronic inflammation[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(3):337-354.

[10] 任亮,任翔,刘金宝,等.大蒜素对模型小鼠的抗炎性痛作用及机制研究[J].中国药房,2018,29(18):2479-2483.

[11] MYERS MJ, DEEVER CM. Identification of swine protein biomarkers of inflammation-associated pain[J]. *Res Vet Sci*, 2019.DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.11.029.

[12] GUIDA F, LUONGO L, DI CML. New targets for treating chronic pain and inflammation[J]. *Curr Med Chem*, 2018, 25(32):3828-3829.

[13] 徐宵寒,许力,黄宇光.炎症反应和自身免疫在复杂性区域疼痛综合征中作用[J].中国疼痛医学杂志,2016,22(11):847-850.

[14] YE Z, ZHANG M, DING N, et al. Antinociceptive effects of dezocine on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5469-5474.

[15] JAFARNEZHAD AF, YEKANINEJAD MS, JAMSHIDI AR, et al. The effects of β -D-mannuronic acid (M2000), as a novel NSAID, on COX1 and COX2 activities and gene expression in ankylosing spondylitis patients and the murine monocyte/macrophage, J774 cell line[J]. *Inflammopharmacology*, 2018, 26(2): 375-384.

[16] YU T, LAO X, ZHENG H. Influencing COX-2 activity by COX related pathways in inflammation and cancer[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(15): 1230-1243.

[17] 梁晓玲,马利,赖月花,等.蛇葡萄素F对脂多糖致炎模型细胞的抗炎作用及其机制研究[J].中国药房,2018,29(14):1927-1930.

[18] BANSAL M, SINGH N, ALAM S, et al. Alternariol induced proliferation in primary mouse keratinocytes and inflammation in mouse skin is regulated via PGE₂/EP2/cAMP/p-CREB signaling pathway[J]. *Toxicology*, 2019. DOI:10.1016/j.tox.2018.11.013.

[19] AIKAWA J, UCHIDA K, TAKANO S, et al. Regulation of calcitonin gene-related peptide expression through the COX-2/mPGES-1/PGE₂ pathway in the infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1):215-231.

[20] CHEN J, SI M, WANG Y, et al. Ginsenoside metabolite compound K exerts anti-inflammatory and analgesic effects via downregulating COX2[J]. *Inflammopharmacology*, 2018.DOI: 10.1007/s10787-018-0504-y.

[21] 王海华,王海珍,曾瑾,等.水溶性蜂胶联合阿司匹林对大鼠炎性痛作用[J].中成药,2015,37(6):1157-1164.

(收稿日期:2019-01-04 修回日期:2019-02-19)

(编辑:唐晓莲)