

## 金叶女贞果实花青素的镇痛作用初探

王静<sup>1</sup>, 王海华<sup>1</sup>, 姜玉新<sup>1</sup>, 周萍萍<sup>1</sup>, 王建安<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 皖南医学院生理教研室, 芜湖 241002, 安徽; <sup>2</sup> 济宁医学院药学院, 日照 276826, 山东

**摘要** 目的: 研究金叶女贞果实花青素的镇痛作用及其可能机制。方法: 实验动物分为 5 组: 生理盐水对照组, 阿司匹林对照组, 花青素高、中、低剂量组。通过小鼠热板法和醋酸扭体法, 观察不同浓度花青素的镇痛作用; 同时测定小鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)、NO 和前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 水平, 初步分析花青素可能的镇痛机制。结果: 中、高浓度的花青素能提高小鼠痛阈, 减少扭体次数; 花青素处理组小鼠血清 SOD 活性增高, NO 和 PGE<sub>2</sub> 含量降低。结论: 金叶女贞花青素具有镇痛作用, 其机制可能与提高小鼠抗氧化能力增强血清 SOD 活性, 减少 NO 和炎性因子 PGE<sub>2</sub> 的生成有关。

**关键词** 花青素; 镇痛; 超氧化物歧化酶; NO; 前列腺素 E<sub>2</sub>

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-2501(2015)01-0038-05

花青素是一类存在于植物中的黄酮类化合物, 广泛存在于高等植物的果实、花、茎等器官中, 可以随着季节和细胞液酸碱度的变化使花瓣和果实呈现不同颜色<sup>[1]</sup>。已有研究发现花青素具有抗

氧化、抗炎作用, 抑菌作用, 抗衰老、抗癌作用以及对肝脏、心脑血管和视力的保护作用; 此外花青素具有跨越血脑屏障的能力, 可以直接作用于大脑的中枢神经系统; 并已被多个国家作为合成染料的代用品, 广泛应用于食品、制药等行业中<sup>[2-4]</sup>。

目前, 国内外用于食品添加剂、药用价值及镇痛作用研究的天然花青素主要集中于蓝莓、葡萄籽、紫薯等<sup>[5-10]</sup>。金叶女贞(*Ligustrum vicaryi*) 为木犀科女贞属半绿小灌木, 被誉为“金玉满堂”, 性喜光, 稍耐阴, 耐寒能力较强, 抗病力强, 很少有病虫害, 其核果呈紫黑色, 含丰富的天然色素——花色素, 是极具有开发价值的天然色素资源<sup>[11-12]</sup>。本研究拟用两种经典的疼痛模型来观察金叶女贞果实花青素的镇痛作用并初步探讨其可能的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 动物** SPF 级 BALB/c 小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购于扬州大学比较医学中心(许可证号: SCXK 苏 2007-0001)。

**1.2 主要仪器** YLB-6B 小鼠热板仪(成都泰盟科技有限公司); 紫外分光光度计(UV-3200PCS), Model-680 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司)

**1.3 试剂与测定方法** 阿司匹林为 AstraZeneca 公司产品(批号: 1304031)。超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)和前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 试剂盒购自合肥博美生物科技公司。比色法测定血清中 SOD 活性和 NO 浓度, ELISA 法检测血清 PGE<sub>2</sub> 含量, 具体方法按试剂盒说明进行。

**1.4 花青素的提取与纯化** 取金叶女贞果实, 置于 50 °C 烘箱中干燥至恒重, 揉碎取果皮, 粉碎过

2014-04-09 收稿 2015-01-02 修回

国家自然科学基金(81172790); 安徽省自然科学研究重点基金(KJ2013A251); 皖南医学院中青年基金(WK201310); 安徽省质量工程项目(2013jyxm127); 日照市科技发展项目(2011SF006)

王静, 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中药镇痛抗炎机制研究。

E-mail: wangjing518yl@163.com

王建安, 通信作者, 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 药用植物资源与活性研究。

E-mail: anansen@163.com

80 目筛,以 75% 的乙醇做提取溶剂,料液比为 1:15,置于 MCR-3 微电脑微波化学反应器中提取,将提取液抽滤以除去滤渣得粗提液。将花青素粗提液加入已预处理的 DM130 大孔树脂柱进行吸附,待吸附完全,以大量蒸馏水冲柱以除去树脂柱中的糖,再用石油醚萃取以除去提取液中的脂类,即得去糖去脂花青素。将去糖去脂花青素溶液置于冻干机中冻干,最后得到纯花青素粉末。

**1.5 实验分组** 实验共分 5 组:生理盐水对照组(normal saline control group, NS);阿司匹林组(aspirin control group, Asp);花青素高浓度组(high-concentration anthocyanins group, HA);花青素中浓度组(medium-concentration anthocyanins group, MA);花青素低浓度组(low-concentration anthocyanins group, LA)。每天 8:00~9:00 分别对 5 组小鼠灌胃 0.2 mL 生理盐水、阿司匹林(100 mg/kg)、花青素(90、30、10 mg/kg),各组连续给药 7 d 后实验。

**1.6 热板法镇痛实验** 取雌性实验小鼠,置于(55.0±0.5)℃ 智能热板仪的金属板上,测定各鼠从放在金属板上至出现舔后足所需时间(s)作为该鼠的基础痛阈值(测量 2 次取平均痛阈),选取基础痛阈在 5~30 s 的 40 只雌鼠参加实验,每组 8 只,分组如上“1.5”。末次给药后分别在给药后 15、30、60、120、240 min 测小鼠痛阈。实验结束后眼眶取血,3 000 r/min 离心 10 min,取血清检测 PGE<sub>2</sub>、SOD 和 NO。

**1.7 醋酸扭体法镇痛实验** 取实验小鼠 40 只,

雌雄不拘,每组 8 只,分组同“1.5”。末次给药后 1 h,每只小鼠腹腔注射新鲜配制的 0.8% 冰醋酸溶液 0.2 mL,观察小鼠产生“扭体”反应次数,以小鼠腹部内凹、躯干与后肢伸张、臀部高起、后肢伸长等行为反射称为完整扭体反应 1 次。观察 15 min 内扭体次数,计算扭体反应抑制率。抑制率(%)=(空白组扭体数-给药组扭体数)/空白组扭体数×100%。

**1.8 数据分析** 数据以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )来表示,均数比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 花青素对小鼠热板法痛阈的影响** 表 1 结果显示,各组小鼠在实验前基础痛阈没有统计学差异,经 7 d 给药后,生理盐水组痛阈没有出现统计学差异。90 mg/kg 的花青素在给药 15 min 即明显提高痛阈( $P<0.05$ ),至 60 min 与生理盐水组的差异有统计学意义( $P<0.01$ ),其效果持续至 240 min 且痛阈提高值超过阿司匹林组。30 mg/kg 与 10 mg/kg 花青素组分别在给药后 30 min 和 60 min 与对照组的差异出现统计学意义( $P<0.05$ ),它们的药效在给药后 120 min 达高峰。阿司匹林组在给药 120 min 后痛阈提高值达高峰。结果表明花青素与阿司匹林类似,能使小鼠对热刺激的反应时间延长,且高浓度花青素镇痛效果超过阿司匹林,花青素的镇痛作用呈现一定的剂量依赖性。

表 1 花青素对小鼠热板法痛阈的影响( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	剂量 (mg/kg)	基础痛阈值 (s)	用药后痛阈值(s)				
			15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
NS	—	12.25±1.81	12.62±1.94	11.17±2.92	11.52±3.88	11.67±2.36	12.34±3.65
Asp	100	10.42±1.21	12.63±1.32	13.56±3.31	18.75±3.54 <sup>c</sup>	23.45±1.39 <sup>c</sup>	22.85±4.36 <sup>c</sup>
HA	90	11.92±2.88	15.00±4.33 <sup>bc</sup>	17.50±6.71 <sup>bc</sup>	19.83±6.36 <sup>c</sup>	25.67±4.58 <sup>c</sup>	29.00±2.45 <sup>ce</sup>
MA	30	10.75±3.47	13.33±5.64	15.16±6.57 <sup>b</sup>	20.50±5.46 <sup>c</sup>	22.83±7.60 <sup>c</sup>	20.17±5.67 <sup>c</sup>
LA	10	13.25±4.28	12.50±3.20	13.17±3.92	16.83±5.34 <sup>b</sup>	18.00±5.44 <sup>bc</sup>	15.33±5.52 <sup>c</sup>

与 NS 组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与 Asp 组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ ;NS:生理盐水对照组;Asp:阿司匹林组;HA:花青素高浓度组;MA:花青素中浓度组;LA:花青素低浓度组。

**2.2 花青素对小鼠腹腔注射醋酸扭体反应的影响** 表 2 显示,阿司匹林与花青素均减少醋酸所致小鼠扭体反应次数,阿司匹林组、10、30 mg/kg

花青素与生理盐水组差异均有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。90 mg/kg 花青素与生理盐水组、阿司匹林组间差异均有统计学意义( $P<$

0.05,  $P < 0.01$ )。结果表明花青素与阿司匹林能抑制醋酸所致小鼠扭体反应,减少 15 min 内扭体次数,起到镇痛作用,且高浓度花青素镇痛效果超过阿司匹林。

表 2 花青素对小鼠醋酸扭体反应的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	剂量 (mg/kg)	15 min 内扭体次数	抑制率 (%)
NS	—	38.67 ± 5.61	
Asp	100	21.67 ± 3.61 <sup>b</sup>	43.96
HA	90	14.83 ± 4.75 <sup>ce</sup>	61.65
MA	30	22.83 ± 2.64 <sup>b</sup>	40.96
LA	10	24.36 ± 8.09 <sup>b</sup>	37.01

与 NS 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 Asp 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ ; NS:生理盐水对照组; Asp:阿司匹林组; HA:花青素高浓度组; MA:花青素中浓度组; LA:花青素低浓度组。

**2.3 花青素对小鼠镇痛血清 SOD 的影响** 如图 1 所示,与生理盐水对照组比较,10 mg/kg 花青素没有出现统计学差异( $P > 0.05$ ),阿司匹林组和 30 mg/kg 花青素明显提高小鼠血清 SOD 活性( $P < 0.05$ ),90 mg/kg 花青素显著提高 SOD 活性( $P < 0.01$ )。90 mg/kg 花青素组与阿司匹林组在提高血清 SOD 上的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

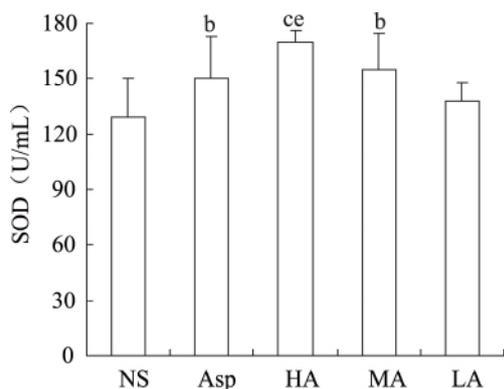


图 1 花青素对小鼠血清中 SOD 的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

与 NS 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 Asp 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ ; NS:生理盐水对照组; Asp:阿司匹林组; HA:花青素高浓度组; MA:花青素中浓度组; LA:花青素低浓度组。

**2.4 花青素对小鼠镇痛血清 PGE<sub>2</sub> 的影响** 如图 2 所示,与生理盐水组比较,阿司匹林组和花青素组的小鼠血清中 PGE<sub>2</sub> 含量均有所下降,阿司匹林组、10、30 mg/kg 花青素组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),90 mg/kg 花青素组达到统计学

差异( $P < 0.01$ )。各浓度花青素组与阿司匹林组的差异没有统计学意义。

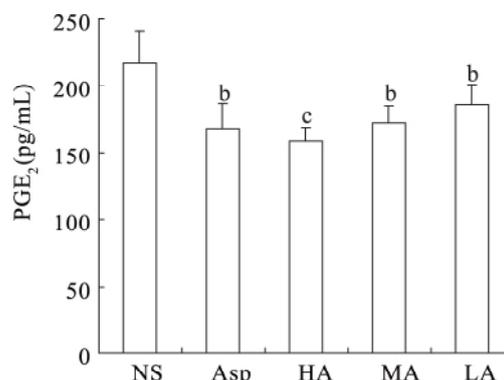


图 2 花青素对小鼠血清中 PGE<sub>2</sub> 的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

与 NS 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; NS:生理盐水对照组; Asp:阿司匹林组; HA:花青素高浓度组; MA:花青素中浓度组; LA:花青素低浓度组。

**2.5 花青素对小鼠镇痛血清 NO 的影响** 如图 3 所示,与生理盐水组比较,阿司匹林和花青素均降低小鼠血清中 NO 含量,阿司匹林组、10、30 mg/kg 花青素组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),90 mg/kg 花青素组达到统计学差异( $P < 0.01$ )。90 mg/kg 花青素组与阿司匹林组在降低血清 NO 作用上的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

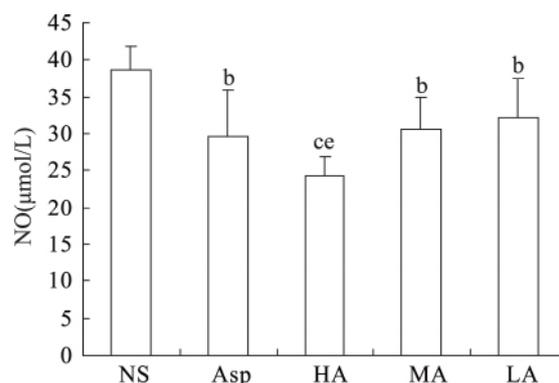


图 3 花青素对小鼠血清 NO 的影响( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

与 NS 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 Asp 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ ; NS:生理盐水对照组; Asp:阿司匹林组; HA:花青素高浓度组; MA:花青素中浓度组; LA:花青素低浓度组。

### 3 讨论

疼痛是机体受到伤害性刺激后产生的一种保护性反应,经常伴有恐惧、紧张不安等情绪活动。目前,最常用的镇痛药是非甾体类抗炎药(如复方

阿司匹林、吲哚美辛、布洛芬等)和阿片类镇痛药(如哌替啶、吗啡、可待因等),虽然在临床上都取得了较好的疗效,但均有不同程度的不良反应,如非甾体类抗炎药有胃肠道反应、胃溃疡、胃出血和变态反应等,阿片类药物则有不同程度的成瘾性,这使得它们在临床上的应用受到了很大的限制<sup>[13-14]</sup>。因此,寻找副作用和依赖性小的止痛中药成为新的趋势。本研究通过两种经典的疼痛模型观察金叶女贞果实中花青素的镇痛效应。小鼠热板实验是通过热刺激引起躯体体表痛,主要用于筛选中枢性镇痛药,小鼠醋酸扭体实验是通过化学刺激引起内脏痛,主要用于筛选外周镇痛药物。

PGE<sub>2</sub> 是一类活性很强的炎性因子,它本身可以致痛,还有疼痛增敏作用,另 PGE<sub>2</sub> 的产生常伴有大量氧自由基的生成,继而引起细胞损伤<sup>[15-16]</sup>。NO 作为细胞间重要的信号分子参与多种生理和病理生理活动,如骨代谢与血管钙化、血小板聚集、胃肠电节律、缺血再灌注损伤等<sup>[17-20]</sup>。NO 可与超氧阴离子迅速反应生成有毒性的过氧亚硝基阴离子,导致膜质过氧化和细胞损伤。另外 NO 作为中枢神经递质,参与中枢及外周痛觉的调制过程,且有痛觉增敏效应,NO 可使自主神经系统兴奋,促使毛细血管舒张,血管壁变薄,通透性增强,局部释放组胺、缓激肽、PGE<sub>2</sub> 等炎性因子,从而使疼痛加剧<sup>[21-23]</sup>。SOD 能清除超氧自由基,减少自由基与 NO 的结合,从而保护细胞免受损伤。本研究发现给予阿司匹林和花青素预处理,小鼠热痛阈明显延长,醋酸致小鼠扭体次数也减少,提示花青素具有与阿司匹林类似的镇痛作用,镇痛机制可能与花青素提高小鼠抗氧化能力增强血清 SOD 活性,减少 NO 和炎性因子 PGE<sub>2</sub> 的生成有关。关于这种镇痛作用的最佳剂量及对动物的给药方法,对其他脏器是否有副作用有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Cooper-driver GA. Contributions of jeffrey harborne and coworkers to the study of anthocyanins [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(3): 229-236.
- [2] 徐春明, 庞高阳, 李婷. 花青素的生理活性研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2013, 25(3): 205-210.
- [3] 杨旸, 文利新. 花青素的生理活性及作用[J]. *湖南农业科学*, 2011, 44(20): 27-28.
- [4] Lule SU, Xia W. Food phenolics, pros and cons: a review[J]. *Food Rev Inter*, 2005, 21(5), 367-388.
- [5] 龚频, 陈福欣, 金赛, 等. 不同给药方式下蓝莓花青素的镇痛作用研究[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(24): 186-188.
- [6] 王静, 马养民, 速文静. 蓝莓花青素的纯化及镇痛、抗炎药效学研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 28(5): 338-340.
- [7] 高杉, 黄春霞, 黄玲玲, 等. 低聚葡萄籽原花青素对异丙肾上腺素诱导心肌细胞肥大的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(5): 497-501.
- [8] 王艳红, 杨孝来, 王莉, 等. 葡萄籽原花青素对复发性结肠炎大鼠血清抗氧化能力及 NO 含量的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2010, 15(1): 47-52.
- [9] 孙健, 王洪云, 钮福祥, 等. 不同品种紫甘薯花青素含量及抗氧化活性差异[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(12): 323-324.
- [10] 李治华, 谢江, 黄驰, 等. 紫甘薯花青素提取纯化技术研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(27): 192-194.
- [11] 王建安, 王慧云, 李艳芝, 等. 金叶女贞果实中齐墩果酸的提取与测定[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(11): 301-303.
- [12] 王建安, 宛光辉, 李艳芝, 等. 超声法提取金叶女贞果实中多糖工艺的研究[J]. *南京师范大学学报: 自然科学版*, 2012, 35(4): 73-75.
- [13] 闵志雪, 黄璐, 孙瑶, 等. 皖南地区眼镜蛇毒活性组分镇痛效应的初步研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(1): 150-154.
- [14] 王海华, 张根葆, 闵志雪, 等. 皖南地区眼镜蛇镇痛组分对大鼠炎性痛作用机制探讨[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(10): 1093-1099.
- [15] 罗小文, 李佳川, 谭睿, 等. 湿生扁蕾对小鼠抗炎镇痛作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(1): 97-99.
- [16] 彭丹. 复方黄柏散的镇痛抗炎作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(14): 1108-1111.
- [17] 苑晓焯, 曾强, 李绍冰, 等. NO/cGMP/PKG 信号通路及血管钙化的关系[J]. *临床荟萃*, 2010, 25(22): 2023-2025.
- [18] 赵晶京, 王振华, 鲁荣, 等. NO/cGMP 信号转导途径对大鼠胃电节律的作用[J]. *基础医学与临床*, 2001, 21: 55(增刊).
- [19] Hayashida N, Tomoeda H, Oda T, et al. Effects of supplemental L-arginine during warm blood cardioplegia[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 19

(1): 27-33.

[20] Brunner F, Maier R. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(1): 55-62.

[21] 杜瑞兰, 张敏, 杨黎江, 等. 大鼠蛛网膜下腔微量注射 NO 前体物质和 NOS 抑制剂对痛觉的调制[J]. *中国疼痛医学杂志*, 1998, 4(3): 168-172.

[22] 刘凌云, 吴迪, 李清君, 等. 甲醛炎性痛增强大鼠海马 NOS 表达和 NO 生成[J]. *中国应用生理学杂志*, 2007, 23(1): 30-34.

[23] 宋媛媛, 李媛, 张洪泉. 丁香苷抗炎镇痛作用及部分机制研究[J]. *中国野生植物资源*, 2010, 29(4): 27-30.

## Exploration on analgesia effect of anthocyanins from *Ligustrum vicaryi* fruit

WANG Jing<sup>1</sup>, WANG Hai-hua<sup>1</sup>, JIANG Yu-xin<sup>1</sup>, ZHOU Ping-ping<sup>1</sup>, WANG Jian-an<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Physiology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;* <sup>2</sup> *College of Pharmacy, Jining Medical College, Rizhao 276826, Shandong, China*

**ABSTRACT AIM:** To investigate the analgesic effect mechanism of anthocyanins from *Ligustrum vicaryi*. **METHODS:** Experimental animals were divided into 5 groups ( $n=8$ ): normal saline control group (NS); aspirin control group (Asp); high-concentration anthocyanins group (HA); medium-concentration anthocyanins group (MA); low-concentration anthocyanins group (LA). We observed the analgesia effect of different concentration anthocyanins by hot-plate test and acetic acid writhing test. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the contents of nitric oxide (NO) and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) in blood serum were determined to analysis the

analgesia mechanism. **RESULTS:** The pain threshold of mice was enhanced and the times of twist body was decreased by medium-concentration and high-concentration anthocyanins. The activity of SOD was increased and the contents of NO and PGE<sub>2</sub> were reduced in blood serum. **CONCLUSION:** Anthocyanins of *Ligustrum vicaryi* has definite analgesic effect, which was related to increasing the activity of SOD and decreasing the contents of NO and PGE<sub>2</sub>.

**KEY WORDS** anthocyanins; analgesic; SOD; NO; PGE<sub>2</sub>

本文编辑: 储冀汝

读者 · 作者 · 编者

### 2015 年本刊一些常用词汇可直接用缩写

磷酸盐缓冲液 (PBS)	尿素氮 (BUN)	收缩压 (SBP)
核因子-κB (NF-κB)	肌酐 (Cr)	曲线下面积 (AUC)
酶联免疫吸附测定 (ELISA)	干扰素 (IFN)	抑制浓度 (IC <sub>50</sub> )
一氧化氮 (NO)	白细胞介素 (IL)	最小抑菌浓度 (MIC)
总胆固醇 (TC)	肿瘤坏死因子 (TNF)	半数致死量 (LD <sub>50</sub> )
甘油三酯 (TG)	二甲基亚砷 (DMSO)	体质量指数 (BMI)
丙氨酸转氨酶 (ALT)	四唑盐比色法 (MTT 法)	糖化血红蛋白 (HbA <sub>1c</sub> )
天冬氨酸转氨酶 (AST)	舒张压 (DBP)	