

竹叶花椒水提物抗炎镇痛作用及机制研究

李沛霖^{1,2}, 朱翔³, 赵麟³, 尤霜³, 桑春艳^{1*}, 杨军丽^{1*}

¹中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000; ²中国科学院大学, 北京 100049;

³么麻子食品股份有限公司, 眉山 620360

摘要: 本实验旨在探讨竹叶花椒水提物抗炎镇痛活性, 并探讨其可能的作用机制。通过建立胶质细胞脂多糖刺激疼痛炎症模型, 以塞来昔布作为阳性对照, 观察不同剂量的竹叶花椒水提物对细胞炎症模型的逆转作用; 昆明小鼠足底注射完全弗氏佐剂, 建立小鼠足趾疼痛炎症模型, 实验选取 60 只雌性昆明小鼠, 随机分为 6 组, 包括空白对照组、模型对照组、阳性对照组以及竹叶花椒水提物低、中、高剂量组 (25、50 和 100 mg/kg)。Von Frey 测痛仪测定小鼠机械疼痛阈值; ELISA 方法测定实验小鼠血清中的炎症因子 (TNF- α 、IL-1 β 和 β -EP) 水平变化; HE 染色观察实验小鼠足趾病理变化; HE 染色观察实验小鼠心、肝、脾、肺、肾组织变化; 免疫荧光实验观察小鼠脊髓组织中 CD11b、CD45、NeuN 蛋白表达变化。实验发现与模型组比较竹叶花椒水提物促进体外细胞存活 ($P < 0.05$); Von Frey 测痛仪结果显示不同竹叶花椒水提物提高了小鼠炎症部位的机械疼痛阈值 ($P < 0.001$)。ELISA 检测表明竹叶花椒水提物降低了小鼠血清中促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 的含量, 增加了抗炎因子 β -EP 的表达水平 ($P < 0.001$); 竹叶花椒水提物能够降低炎症疼痛过程中脊髓组织关键标志蛋白因子 CD11b 和 CD45 表达。同时, NeuN 是一种神经元核蛋白, 免疫荧光结果显示其表达减少, 揭示竹叶花椒水提物的抗炎作用可能与神经系统的调控有关。数据表明竹叶花椒水提物对炎症细胞的抵抗作用, 增加了机体炎症部位的疼痛耐受阈值, 该作用与其调控 TNF- α 、IL-1 β 和 β -EP 因子水平以及抑制炎症通路中相关蛋白 CD11b、CD45 和 NeuN 的表达有关。

关键词: 竹叶花椒; 水提物; 抗炎; 炎症因子; 机械疼痛阈值

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0028-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.004

Study on the anti-inflammatory and analgesic activities and mechanism of *Zanthoxylum armatum* water extract

LI Pei-lin^{1,2}, ZHU Xiang³, ZHAO Lin³,

YOU Shuang³, SANG Chun-yan^{1*}, YANG Jun-li^{1*}

¹Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences (CAS), Lanzhou 730000, China;

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³Yaomazi Food Co., Ltd., Meishan 620360, China

Abstract: The purpose of the study is to investigate the anti-inflammatory and analgesic activity of *Zanthoxylum armatum* water extract (ZWE) and mechanism of action. To establish a glial cell lipopolysaccharide-stimulated model, with celecoxib as positive control, and to observe the reversal effect of different doses of ZWE. Establishment of mice planta pain inflammation model by injection of complete Freund's adjuvant in Kunming mice. Sixty female Kunming mice were selected and randomly divided into six groups, including blank control group, model control group, positive control group and low (25 mg/kg), medium (50 mg/kg) and high dose groups (100 mg/kg) of ZWE. Determination of mechanical pain thresholds in mice by Von Frey filaments; ELISA was used to determine changes of the levels of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and β -EP) in the serum of mice; Pathological changes in the planta of mice observed by HE staining; HE staining was used to observe the changes of heart, liver, spleen, lung and kidney tissues in mice; Changes in the expression of CD11b, CD45 and NeuN proteins in mice

收稿日期: 2022-12-21

接受日期: 2023-05-05

基金项目: 四川省科技计划项目重点研发项目 (2022YFN0019)

* 通信作者 Tel: 86-931-4968385; E-mail: yangjl@licp.cas.cn, sangcy@licp.cas.cn

spinal cord observed by immunofluorescence assay. The results showed compared with the model group, ZWE improved the survival rate of glial cells *in vitro* ($P < 0.05$); Von Frey tests indicated that different doses of ZWE increased mechanical pain thresholds in inflammatory mice ($P < 0.001$); ELISA results showed that ZWE decreased the levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β and increased the expression level of anti-inflammatory cytokines β -EP in mice serum ($P < 0.001$); Expression of CD11b and CD45 in mice spinal cord was reduced by ZWE. Meanwhile, NeuN, a neuronal nuclear protein, showed its expression was decreased by immunofluorescence results, revealing that the anti-inflammatory effect of ZWE is involved in the regulation of the nervous system. These data indicated ZWE showed resistance to inflammatory cells, increased the pain tolerance threshold in inflammatory tissues of mice, and this effect was associated with its modulation of TNF- α , IL-1 β and β -EP levels and inhibition of the expression of the related proteins CD11b, CD45 and NeuN in the inflammatory pathway.

Key words: *Zanthoxylum armatum*; water extract; anti-inflammatory; inflammatory cytokines; mechanical pain threshold

疼痛作为多种临床疾病的常见症状之一,其中最重要的类型之一就是炎症性疼痛。而急性炎症疼痛通常是由于机体受到外界刺激所引发的局部毛细血管通透性增加,并释放各种炎症因子与介质^[1],炎症作为机体的一种自我保护机制,是机体恢复平衡的一种自我调节手段,但是过度炎症会引起机体损伤^[2]。神经病理性疼痛是躯体感觉神经受损而导致的慢性疼痛^[3],也是造成全球疾病负担的主要因素之一^[4]。人体免疫细胞中小胶质细胞的异常活化在炎症中发挥着重要作用,而小胶质细胞的异常刺激激活会引发机体炎症^[2,5]。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)是由巨噬细胞分泌的调节系统炎症的促炎细胞因子,能够促使机体发热,引起细胞凋亡^[6], β -内啡肽(β -EP)是一种存在于神经系统、内分泌器官等中具有镇痛活性的内源性物质,作为抗炎因子在机体免疫调节中起着关键作用^[7]。胶质纤维酸性蛋白(GFAP)作为星形胶质细胞活化的标志物以单体形式存在^[8];小胶质细胞标记物(CD11b)是白细胞整合素家族的成员,通常在骨髓系统中表达,在细胞间粘附和炎症反应中发挥生物学作用^[9];白细胞共同抗原(CD45)通常存在于白细胞膜表面,在细胞的信息传导中发挥重要作用^[10],神经元细胞核(NeuN)与神经元核蛋白的成熟和分化有关,这些蛋白在细胞间粘附并和炎症的发生发展中起着重要作用^[11]。竹叶花椒是一种传统的药食两用资源,因为其成熟的干果壳具有独特的椒麻风味,在亚洲、欧洲、美洲等地常用作调味品和香料,使用广泛^[12]。此外,竹叶花椒具有一定的镇痛作用,并且在非洲、美洲等地被用作治疗感冒和牙痛,具有悠久的药用历史^[13]。已有研究证明花椒属中酰胺类物质是花椒麻味的主要来源,对神经性腰椎病大鼠具有抗炎作用,可以显著减少大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 含量,可以降低大鼠疼痛行

为,提高大鼠机械疼痛阈值^[14-16]。花椒提取物中主要含有挥发油、生物碱、苯丙素、黄酮和酚酸等^[17,18],对花椒属植物中醇提物的体内抗炎活性研究主要基于卡拉胶、完全弗氏佐剂(CFA)或二甲苯所致的小鼠足跖或者耳朵肿胀模型^[19,20],Tezuka等^[21]研究发现,花椒甲醇提取物可以显著抑制脂多糖(LPS)诱导的巨噬细胞一氧化氮(NO)产生,但是还未见竹叶花椒水提物的抗炎活性报道^[22,23]。本研究基于竹叶花椒的传统药食两用物质基础^[24-27],评估了竹叶花椒水提物的抗炎镇痛活性,探讨了竹叶花椒水提物抗炎作用的可能机制,为竹叶花椒作为一种天然活性植物的开发利用提供了理论基础^[28-30]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级昆明小鼠,雌性,体质量18~22g,兰州大学动物房提供(合格证号:SCXK-甘-2020-0002)。饲养条件为 22 ± 2 °C,湿度(70 \pm 5)% ,喂养标准颗粒饲料,自由饮水和摄食。适应性饲养1周后进行试验。本实验经过中国科学院兰州化学物理研究所伦理委员会批准实施,伦理审批号:D-2023-015。

1.1.2 实验细胞

人小胶质细胞(HMC3)由上海富衡生物科技有限公司-富衡细胞库提供。

1.1.3 实验试剂

竹叶花椒壳(四川么麻子食品股份有限公司);完全弗氏佐剂(美国Sigma公司,批号:MFC00131105);DMSO(二甲基亚砜)(中国北京索莱宝公司,批号:D8370);无水乙醇(西安天茂化工有限公司,批号:MFC00003568);苏木精染色液(中国上海碧云天公司,批号:C0107);多聚甲醛(中国北京索莱宝公司,批号:P1110);Dulbecco's modified eagle medium培养基(DMEM)(美国Gibco公

司,批号:12430054);胎牛血清(FBS)(中国杭州四季青公司,批号:70220-8615);脂多糖(中国北京索莱宝公司,批号:L8880);MTT(3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2-H-四唑溴化物,日本 Kumamoto 公司,批号:PB180519);塞来昔布胶囊(中国石药集团,批号:H20203297);肝素钠(上海金畔生物科技有限公司,批号:085-00134);戊巴比妥钠(上海通善生物科技有限公司,批号:Tc-P8410);ELISA 试剂盒(中国江苏酶标生物科技有限公司,批号:MB-6426B);兔抗 GFAP 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:80788T);鼠抗 CD11b(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:17800S);CD45(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:13917T);NeuN 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号:36662);FITC 标记山羊抗兔 IgG 和 TRITC 标记的山羊抗鼠 IgG(美国 Proteintech 公司,批号:80003-1-RR);抗荧光淬灭剂(中国北京索莱宝公司,批号:S2100);DAPI 染色液(中国北京索莱宝公司,批号:C0060);Triton X-100(中国北京索莱宝公司,批号:T8200)。

1.1.4 实验仪器

Von Frey 纤维丝测痛仪(中国上海玉研科学仪器有限公司);小鼠足底测试笼(中国上海玉研科学仪器有限公司);细胞培养箱(美国赛默飞世尔科技公司);电热恒温水浴箱(中国上海玉研科学仪器有限公司);酶联免疫检测仪(中国南京德铁实验设备有限公司);荧光倒置显微镜(中国广州 Mshot 公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品的制备

竹叶花椒果壳干燥后粉碎研磨,将 500 g 粉末在 2 L 蒸馏水中浸泡 1 h,文火煎煮 2 h,滤过,滤渣加 2 L 蒸馏水文火煎煮 2 h,滤过,合并 2 次滤液,用 0.22 μm 滤菌膜过滤除菌,20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2.2 细胞培养

小胶质细胞(HMC3)在含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,保持培养箱环境的湿润,在培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 下进行培养,炎症胶质细胞的活化采用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LPS 提前处理 24 h^[31,32]。

1.2.3 MTT 实验

采用 MTT 法检测细胞存活率。取对数生长期状态良好的 HMC3 细胞,调整细胞浓度为 5×10^3 个/mL,每孔 100 μL 同时接种于 96 孔板,待细胞贴壁后 24 h 吸去原培养液,模型组加入 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂多糖活化小胶质细胞,100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 塞来昔布(cele-

coxib,Cel)为阳性对照,竹叶花椒水提物滤过并用 DMEM 培养基调整浓度为 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。细胞分组为对照组(control,Con)、模型组(model,Mod)、阳性对照组(Cel)、竹叶花椒水提物组 25 mg/kg(ZWE-L)、50 mg/kg(ZWE-M)、100 mg/kg(ZWE-H)。每孔加入培养液 200 μL ,同时每个浓度组设 3 个复孔,培养 24 h 后每孔加入 MTT 100 μL (0.5 mg/mL),孵育 4 h;再每孔加入 DMSO 100 μL ,震荡 20 min,使甲瓖完全溶解。采用酶标仪测定 570 nm 处光密度(OD)值。按照公式:细胞存活率 = $(OD_{\text{实验}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$ 计算各组细胞存活率。

1.2.4 小鼠足趾肿胀实验

雌性昆明小鼠随机分为 6 组,每组 10 只。给每只实验小鼠右后足垫皮下注射 CFA 20 μL 诱导小鼠足底炎症^[19],后续对各实验组小鼠进行灌胃给药周期为 10 d,小鼠足底注射 CFA 后每天固定时间使用 Von Frey 测痛仪测试各组小鼠足底机械疼痛阈值^[33],每只实验小鼠放置于底部为铁丝网的笼子里,可以完全接触到后爪,开始测试前小鼠提前适应 30 min 后每根 Von Frey 细丝重复 5 次,每次刺激之间的间隔为 5 s。阳性反应被定义为突然抽出爪子、跳动、舔舐。机械疼痛阈值被量化为 EF₅₀,即产生 50% 反应频率的机械力。按照公式(1)计算 50% 的反应阈值。

$$EF_{50} = (10^{[Xf + k\delta]}) / 10000 \quad (1)$$

Xf = 最终使用 Von Frey 细丝的值(对数单位); k = 正/负反应模式的表格值; δ = 刺激之间的平均差异(对数单位)(此处为 0.224)。10 d 后处死小鼠,取小鼠足底发炎组织进行 HE 染色处理。

1.2.5 HE 染色实验

摘取小鼠足底病理组织和各器官用 4% 多聚甲醛固定过夜,之后进行梯度脱水(乙醇浓度为 70%、85%、95%、99%),每次脱水时间为 1 h,脱水后进行烘干干燥,使用二甲苯进行切片透明处理,然后组织材料放置于 1:1 石蜡和二甲苯的等量混合液浸渍 1 h,用少许热蜡液将其底部迅速贴附于包埋盒内,然后置于速冻台,进行蜡固定。制备病理切片。所得切片经二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,滴加苏木精染色液中充分染色 10 min,双蒸水冲洗干净后 1% 盐酸乙醇分化 10 s,伊红染色 3 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察小鼠病理组织变化。

1.2.6 免疫荧光实验

各组小鼠足底组织取材后、固定、包埋、切片,切片样品置于切片盒中敞开放干,将切片置于修复液中加热煮沸,温度控制在 96 ~ 98 °C,然后将切片放入热锅中 15 min,最后自然冷却室温。PBS 洗 5 min,3 次,之后加入 0.3% Triton X-100 透化处理 10 min,PBS 洗 5 min,3 次,用滤纸擦去标本外的 PBS,滴加封闭血清,湿盒内室温封闭 10 min,用滤纸擦去封闭液,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入兔抗 GFAP (1:80) 在 4 °C 湿盒中孵育过夜,次日用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,加入 CD11b、CD45、NeuN (1:80) 在 4 °C 湿盒中孵育过夜,次日 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,用 FITC 结合的山羊抗兔 (1:100) 和 TRITC 标记的山羊抗鼠 (1:100) 在室温下孵育 2 h,然后用 DAPI 对核 DNA 室温下进行染色 5 min,加入抗荧光淬灭剂进行封片,在共聚焦显微镜下进行分析。

1.2.7 ELISA 实验

小鼠最后一次灌胃给药 24 h 后,小鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠进行麻醉,剂量为 80 mg/kg,之后右手抓住小鼠尾巴,按住小鼠头部,右手用力向后上方拉尾,使得小鼠脊柱断开,小鼠立即死亡。之后小鼠仰卧位固定,剪去胸前区被毛,皮肤消毒后,用左手食指在左肋间触摸到心搏处,右手持带有 5 号针头的注射器,选择心搏最强处穿刺,当刺中心脏时,血液会自动进入注射器,采集的血液放置于含有肝素的 2 mL 离心管中,3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,-20 °C 下保存备用。采用 ELISA 试剂盒检

测各组小鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 β -EP 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行分析及制图,组间比较采用 ANOVA 单因素方差分析。认为 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 竹叶花椒水提取物抗 LPS 诱导的小胶质细胞炎症作用

如图 1A 所示,首先采用 MTT 法检测不同剂量下竹叶花椒水提取物对细胞毒性的影响,用不同剂量的 0、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的竹叶花椒水提取物处理 HMC3 小胶质细胞 24 h,竹叶花椒水提取物在 0、25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量范围内对 HMC3 小胶质细胞的活力没有明显影响 ($P > 0.05$)。因此,在下面的实验中使用竹叶花椒水提取物剂量 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行研究。如图 1B 所示,MTT 实验结果表明,与对照组相比,经过 LPS 处理后细胞存活率极显著降低 ($P < 0.001$),成功建立 LPS 活化小胶质细胞的炎症模型,与模型组比较,阳性组极显著增加了细胞存活率 ($P < 0.001$),抗小胶质细胞炎症作用显著。高剂量竹叶花椒水提取物组与模型组相比细胞存活率极显著性增加 ($P < 0.001$),具有抗 LPS 诱导的胶质细胞炎症作用,而低、中剂量竹叶花椒水提取物未能显著性提高细胞存活率。实验结果表明高剂量竹叶花椒水提取物 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 对细胞未产生毒性作用同时,增加了炎症小胶质细胞的存活率,具有抗小胶质细胞炎症作用。

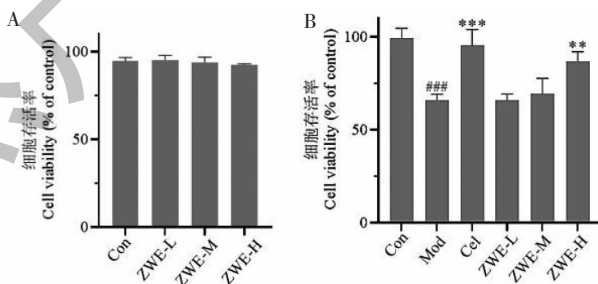


图 1 不同剂量竹叶花椒水提取物对于小胶质细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of different doses of ZWE on microglia viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与空白对照组比较,### $P < 0.001$;与模型组比较,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。Note:Compared with control,### $P < 0.001$;Compared with model,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

2.2 竹叶花椒水提取物缓解小鼠足跖肿胀炎症性疼痛效果

Von Frey 测痛仪测试小鼠足底机械疼痛阈值的

变化,与空白对照组相比,CFA 处理的小鼠足底机械疼痛阈值极显著降低 ($P < 0.001$),CFA 诱导小鼠足底炎症疼痛肿胀发生;与模型组比较,阳性药物塞

来昔布(100 mg/kg)显著增加了小鼠炎性部位的疼痛耐受阈值($P < 0.001$),同时竹叶花椒水提取物高剂量组(100 mg/kg)将小鼠机械疼痛阈值从 2.0 g 提高到 6.0 g,极大程度缓解了小鼠炎症组织的炎性肿

胀,显著抑制了小鼠足跖炎性肿胀发生($P < 0.001$),其中竹叶花椒水提取物高剂量组对于小鼠足跖肿胀的抑制效果与阳性药物塞来昔布接近(见图 2)。

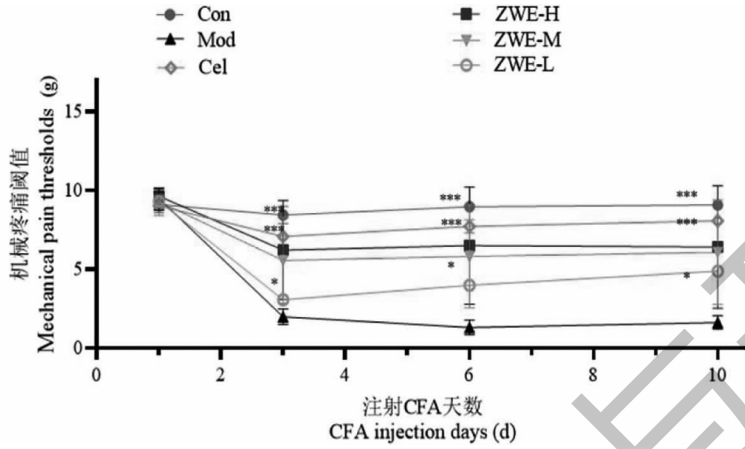


图 2 竹叶花椒水提取物对于 CFA 致炎后小鼠足底机械疼痛阈值的变化趋势比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Comparison of the trends of ZWE on plantar mechanical pain thresholds in mice after CFA-inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with model, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

2.3 竹叶花椒水提取物对于 CFA 诱导后小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、 β -EP 含量的影响

图 3 数据显示,与空白组相比,经过 CFA 诱导后小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 含量极显著增加($P < 0.001$) (见图 3A、3B), β -EP 含量极显著降低($P < 0.001$) (见图 3C);与模型组相比,竹叶花椒水提取物低、中剂量组血清中 TNF- α 含量显著降低($P < 0.05$),竹叶花椒水提取物高剂量组小鼠血清中 TNF- α 含量极显著降低($P < 0.001$) (见图 3A);竹叶花椒水提取物低剂量组血清中 IL-1 β 含量显著降低($P < 0.05$),竹叶花椒水提取物中剂量组血清中 IL-1 β 含量

显著降低($P < 0.01$),高剂量组血清中 IL-1 β 含量极显著降低($P < 0.001$) (见图 3B);竹叶花椒水提取物低剂量组血清中 β -EP 含量显著增加($P < 0.01$),竹叶花椒水提取物中剂量组小鼠血清中 β -EP 含量显著增加($P < 0.01$),其中竹叶花椒水提取物高剂量组小鼠血清中 β -EP 含量极显著增加($P < 0.001$) (见图 3C)。说明竹叶花椒水提取物降低了小鼠血清中促炎因子的含量,增加了抗炎因子的水平,并且竹叶花椒水提取物对于炎症因子的调节作用呈剂量依赖趋势,竹叶花椒水提取物通过调节小鼠血清中炎症因子的水平而起到抗炎效果。

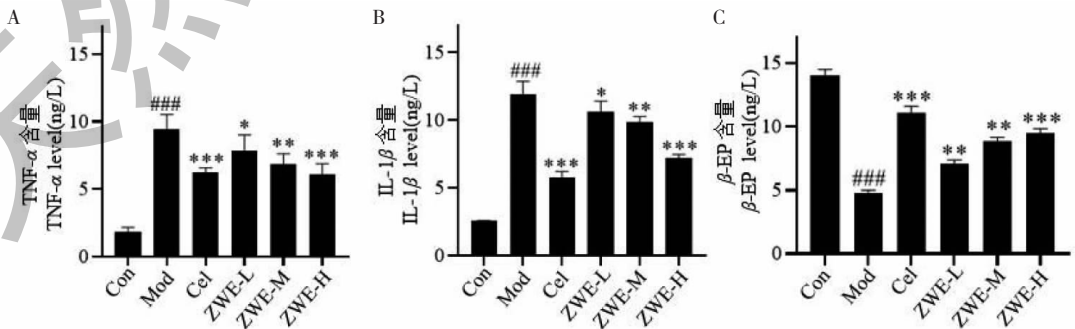


图 3 竹叶花椒水提取物对于 CFA 诱导后小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、 β -EP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of ZWE on the serum levels of TNF- α , IL-1 β , β -EP in mice after CFA induction ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:与空白组比较, ### $P < 0.001$;与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with control, ### $P < 0.001$; Compared with model, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.4 小鼠病理组织的观察结果分析

观察不同竹叶花椒水提取物剂量作用下小鼠足底组织的 HE 染色切片, 经过 CFA 诱导后小鼠足底组织炎症细胞染色较明显, 表现出嗜碱性; 对碱性染料 (即: 苏木精) 具有亲和力, 显示为紫色, 从图 4 中黑色矢量箭头指向的紫色圆点明显观察到, 病理组织周围的炎症细胞明显减少, 并且在竹叶花椒水提取物高剂量给药 (100 mg/kg) 条件下, 小鼠足底病理组

织中炎症细胞浸润的改善程度与阳性药物塞来昔布的效果相当。并且与对照组相比不同剂量竹叶花椒水提取物对实验组小鼠的各个器官中未造成明显的组织损伤信号, 通过对小鼠不同器官包括心、肝、脾、肺和肾组织器官的 HE 染色发现, 对照组小鼠组织结构清晰, 轮廓完整, 给药组和空白组的病理特征无显著性差异, 表明竹叶花椒水提取物对于小鼠未产生显著毒性 (见图 5)。

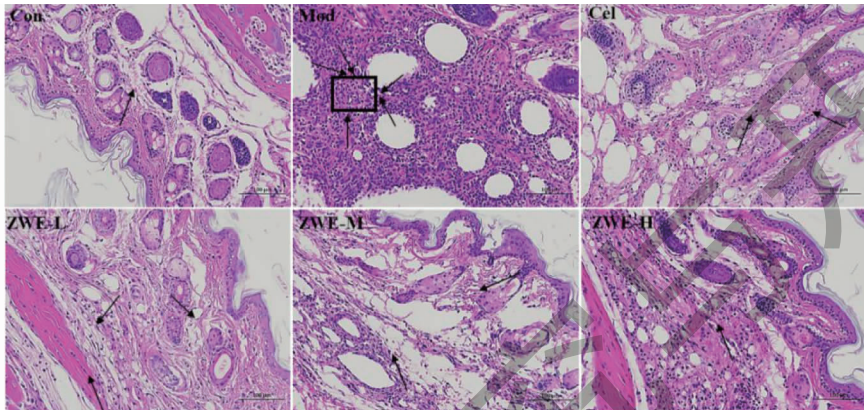


图 4 CFA 诱导的小鼠的足底 HE 染色图像 (比例尺为 200 μm) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Images of CFA-induced plantar HE staining in mice (Scale bar is 200 μm) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

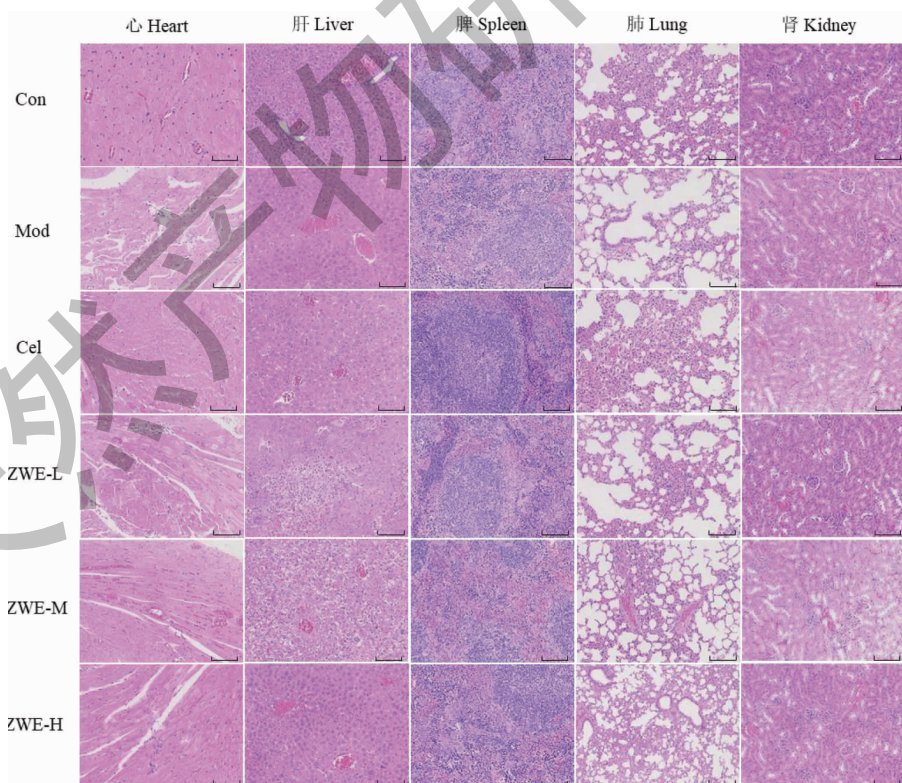


图 5 CFA 诱导炎症后各小鼠组织器官的 HE 染色结果 (比例尺为 200 μm) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

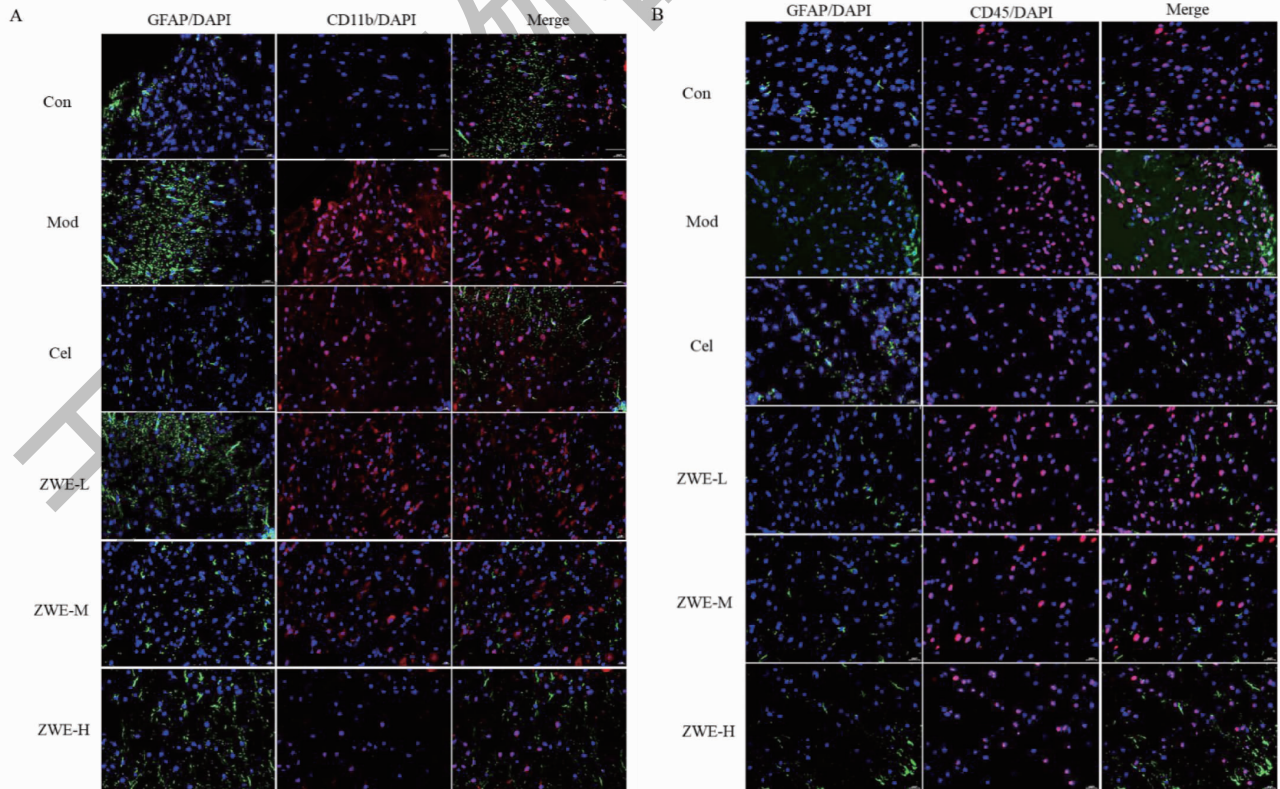
Fig. 5 HE staining results of various mouse tissues and organs after CFA-induced inflammation (Scale bar is 200 μm) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.5 竹叶花椒水提取物对于 CFA 诱导的小鼠脊髓中 CD11b、CD45 和 NeuN 蛋白表达的影响

以绿色荧光标记小胶质细胞活化标记蛋白 GFAP, 该蛋白在活化的小胶质细胞中特异性表达。在显微镜下观察发现, 阳性组绿色荧光较模型组表达增强, 阳性塞来昔布有效的增加了 GFAP 的表达, 表明小鼠脊髓处于炎症应激激活状态, 进而维持机体平衡; CD11b 和 CD45 标记为红色荧光, 与模型组相比, 不同剂量竹叶花椒水提取物对于红色荧光有所减弱, 经过竹叶花椒水提取物给药治疗后小鼠脊髓中 CD11b 和 CD45 的表达有所减少, 荧光强度统计表明竹叶花椒水提取物对小鼠脊髓中 CD11b (见图 6A) 和 CD45 (见图 6B) 蛋白的表达具有一定的抑制作用, 缓解了 CFA 诱导后小鼠的炎性疼痛; 竹叶花椒水提取物对 CFA 诱导后小鼠炎性疼痛的缓解作用与神经元核 NeuN 的调控有关 (见图 6C)。CD11b 和 CD45 的表达较模型组显著减少 ($P < 0.001$) (见图 7A、7B), 而在竹叶花椒水提取物不同剂量组中, 小鼠脊髓中红色荧光标记的 NeuN 蛋白荧光程度随之降低, NeuN 蛋白表达减少, 荧光强度统计表明 CD11b 和 CD45 的表达较模型组显著减少 ($P < 0.001$) (见图 7C)。

3 讨论与结论

LPS 致小胶质细胞炎症模型和 CFA 致昆明小鼠足底炎性疼痛模型是常见的急性炎症模型, 常用作抗炎活性的评价。本实验中, 高剂量竹叶花椒水提取物 ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) 通过提高细胞存活, 在体外起到一定的抗炎作用。竹叶花椒水提取物中、高剂量组 ($50, 100 \text{ mg}/\text{kg}$) 显著缓解了 CFA 导致的小鼠炎性疼痛, 使得小鼠机械疼痛阈值增加 ($P < 0.05$); 并且竹叶花椒水提取物高剂量组 ($100 \text{ mg}/\text{kg}$) 极显著抑制了小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌 ($P < 0.001$), 极显著增加了小鼠血清中 β -EP 的含量 ($P < 0.001$), 调节了小鼠血清中关键炎症因子的产生达到缓解小鼠炎症的效果; 进一步对小鼠足跖病理组织进行 HE 染色发现, 对照组小鼠足底组织结构正常, 而 CFA 使得小鼠足底表现为大量炎症细胞的浸润, 不同剂量竹叶花椒水提取物可以缓解 CFA 致小鼠足底组织的炎症细胞浸润的程度, 且对小鼠各器官进行 HE 染色发现竹叶花椒水提取物无明显毒性; 并通过免疫荧光方法检测小鼠脊髓中 GFAP、CD11b、CD45 和 NeuN 蛋白的表达, 发现阳性组中小鼠脊髓的 GFAP 表达较模型组有所增加, 小鼠炎症程度得以缓解; CD11b 是中性粒细胞膜上粘附分子成分,



续图 6 (Continued Fig. 6)

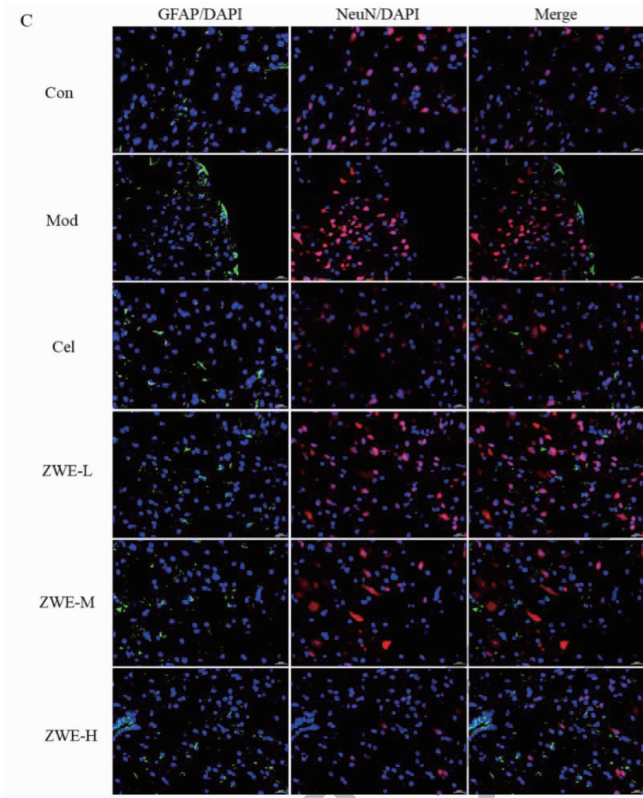


图 6 竹叶花椒水提取物对于 CFA 诱导后小鼠脊髓中蛋白表达的影响 (比例尺为 200 μm) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of *Z. armatum* extract on the expression of proteins in the spinal cord of mice after CFA induction (Scale bar is 200 μm) ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

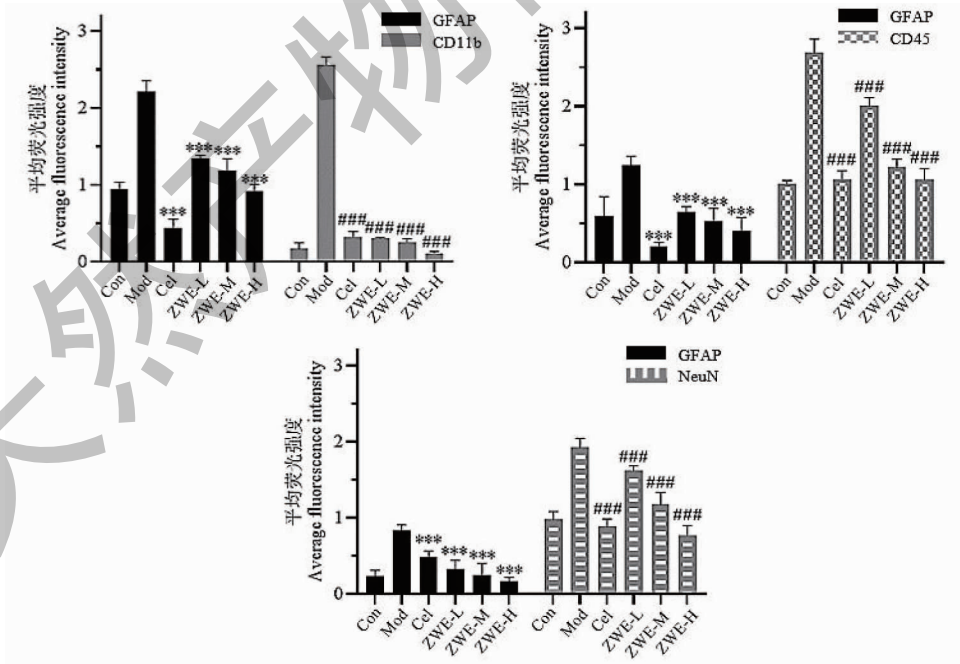


图 7 不同蛋白 CD11b、CD45、NeuN 的平均荧光强度

Fig. 7 Average fluorescence intensity of the different proteins CD11b, CD45, NeuN.

注:与空白对照组比较,*** $P < 0.001$;与模型组比较,### $P < 0.001$ 。Note:Compared with control,*** $P < 0.001$;Compared with model,### $P < 0.001$.

模型组小鼠脊髓中 CD11b 表达增加显示了局部炎症活动与分布,高剂量竹叶花椒水提物抑制了小鼠脊髓中 CD11b 表达,改善了 CFA 诱导后的小鼠炎症;CD45 参与多种免疫功能,在炎症信号转导的过程中起着关键作用,竹叶花椒水提物抑制了小鼠脊髓中 CD45 的表达,改善 CFA 诱导的小鼠炎症反应。NeuN 神经元核抗原是一种特异性蛋白质,常表达于机体神经系统中,从模型组发现小鼠脊髓中 NeuN 显著表达,而在中、高剂量组竹叶花椒水提物中 NeuN 蛋白表达水平明显降低,提示竹叶花椒有可能通过神经元核改善 CFA 诱导引起的组织炎症。本实验在初步判断竹叶花椒水提物具有抗细胞炎症基础上,建立了小鼠足底炎症模型,探讨了竹叶花椒水提物改善小鼠炎症的可能机制。结果表明竹叶花椒对 CFA 引起的炎性疼痛具有抑制作用,提高了小鼠对于炎性疼痛的耐受阈值,降低了小鼠血清中促炎因子 TNF- α 和 IL-1 β 的水平,增加了抗炎因子 β -EP 的含量,并且对于小鼠炎症部位的病理组织起到了改善作用,为竹叶花椒的进一步开发利用提供了重要参考。

参考文献

- Knowles RG. Development of anti-inflammatory drugs—the research and development process [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 114: 7-12.
- Ji RR, Berta T, Nedergaard M. Glia and pain: is chronic pain a gliopathy [J]. *Pain*, 2013, 154: S10-S28.
- Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS. Neuropathic pain: from mechanisms to treatment [J]. *Physiol Rev*, 2021, 101: 259-301.
- Scholz J, Finnerup NB, Attal N, et al. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain [J]. *Pain*, 2019, 160: 53-59.
- Stewart AG, Beart PM. Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 631-634.
- Tsuchiya K. Switching from apoptosis to pyroptosis: gasdermin-elicited inflammation and antitumor immunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 426.
- Floege J, Lüscher B, Müller-Newen G. Cytokines and inflammation [J]. *Eur J Cell Biol*, 2012, 91: 427.
- Amalia L. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): neuroinflammation biomarker in acute ischemic stroke [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 7501-7506.
- Benimetskaya L, Loike JD, Khaled Z, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein [J]. *Nat Med*, 1997, 3: 414-420.
- Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in human physiology and clinical medicine [J]. *Immunol Lett*, 2018, 196: 22-32.
- Tian X, Liu T, Fang B, et al. NeuN-specific fluorescent probe revealing neuronal nuclei protein and nuclear acids association in living neurons under STED nanoscopy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 31959-31964.
- Luo J, Ke J, Hou X, et al. Composition, structure and flavor mechanism of numbing substances in Chinese prickly ash in the genus *Zanthoxylum*: a review [J]. *Food Chem*, 2022, 373: 131454.
- Bader M, Stark TD, Dawid C, et al. All-trans-configuration in *Zanthoxylum alkylamides* swaps the tingling with a numbing sensation and diminishes salivation [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 2479-2488.
- Zhang HY, Huang CC, Yang DB, Hu GZ, Xiao J, Xu L. Study on the anti-inflammatory effect of pepper amide on rats with neurogenic cervical spondylosis and its mechanism [J]. *Emerg Chin Med (中国中医急症)*, 2016, 25: 1552-1554.
- Hatano T, Inada K, Ogawa TO, et al. Aliphatic acid amides of the fruits of *Zanthoxylum piperitum* [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65: 2599-2604.
- Zhang KF, He PY, He DH. Isobutylamide compounds from pepper and their inhibitory effect on iron death in HT22 hippocampal neurons [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 18-22.
- Omosa LK, Nchiozem-Ngnitedem VA, Mukavi J, et al. Cytotoxic alkaloids from the root of *Zanthoxylum paracanthum* (mildbr) Kokwaro [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36: 2518-2525.
- Samir AR, Mounirah AA, Kesnapalli SK, et al. Alkamides from the leaves of *Zanthoxylum syncarpum* [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68: 1297-1299.
- Raghavendra V, Flobert YT, Joyce AD. Complete Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation evokes glial activation and proinflammatory cytokine expression in the CNS [J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20: 467-473.
- Ngoumfo RM, Jouda JB, Mouafo FT, et al. *In vitro* cytotoxic activity of isolated acridones alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr [J]. *Biomedicines*, 2010, 18: 3601-3605.
- Tezuka Y, Irikawa S, Kaneko T, et al. Screening of Chinese herbal drug extracts for inhibitory activity on nitric oxide production and identification of an active compound of *Zanthoxylum bungeanum* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2001, 77: 209-217.