

## Reverse Pharmacology and the R&D of Modern Analgesic Based on Traditional Medicines\*

Su Chen, Xianju Huang, Xiangming Liu<sup>#</sup>

Institute of Ethnodrug Neuropharmacology, South-Central University for Nationalities, Wuhan  
Email: <sup>#</sup>liu.xiangming@263.com

Received: Jan. 24th, 2012; revised: Jan. 30th, 2012; accepted: Feb. 7th, 2012

**Abstract:** Pain is a major symptom in many medical conditions, and can significantly interfere with a person's quality of life and general function. To relieve pain, people are unwearied to look for the analgesic drugs. Nowadays, the most popular analgesics in clinic practice are opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), both of which have some adverse reactions. Although the antagonists of some painful factor such as 5-HT, ATP, BK, His, PGE2 and SP receptors can relieve pain to some extent, they have some unpleasant side-effects and low selectivity for analgesic sites due to the wide distribution of them. Therefore, the focus of the research was concentrated on tetrodotoxin-resistant (TTX-R) sodium channel and transient potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) distributed in small-to-medium-sized primary sensory neurons. However, little breakthrough has been made for the past many years. The plentiful plant-derived national traditional medicine are potential resource of international pharmaceutical market nowadays. Based on the research framework of reverse pharmacology, combined with advanced science technique and methods, shaping into feasible methodology of discovering lead compounds, a new approach of developing analgesics is to extract and separate various monomers from traditional medicine which have been confirmed significant efficacy and low side effect in clinic practice for a long period. The monomers will then be investigated systematically and developed into new analgesics with identified chemical construction, clear-cut mechanism and high security. Our study discovered that two ethnodrugs, Dragon's Blood Resin and Stauntonia chinensis DC., could interfere with pain messages and modulate TTX-R sodium and TPVR1 channels. They could produce excellent analgesic therapy in clinic without drug addiction. Moreover, the material basis for the modulation on TTX-R sodium channel and TPVR1 of Dragon's Blood Resin was successfully validated to be the effective combination of cochinchinenin A, cochinchinenin B and loureirin B.

**Keywords:** Dragon's Blood Resin; Stauntonia Chinensis DC.; Tetrodotoxin-Resistant Sodium Channel; Transient Potential Vanilloid Receptor1; Reverse Pharmacology

## 反向药理学和基于传统药物的现代镇痛药的研发\*

陈素, 黄先菊, 刘向明<sup>#</sup>

中南民族大学民族药物神经药理研究所, 武汉  
Email: <sup>#</sup>liu.xiangming@263.com

收稿日期: 2012年1月24日; 修回日期: 2012年1月30日; 录用日期: 2012年2月7日

**摘要:** 疼痛是许多急慢性疾患中皆可出现的症状, 它是危及人类健康及妨碍正常生活的主要问题之一。为了抗御疼痛, 人类一直在孜孜不倦地寻求镇痛药物。目前临床上使用最多的镇痛药是以吗啡为代表的阿片生物碱类及其合成代用品(或称阿片类药物——opioids)和非甾体抗炎药(Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, NSAIDs), 它们都有较为严重的毒、副作用。一些致痛因子和炎性介质, 如 5-HT, ATP, BK, His, PGE2, SP 等, 其相应的受体阻断剂的应用对于镇痛虽有一定效应, 但由于此等受体分布广泛, 故选择性作用部位不强而且副作用也较多。因此关注的焦点主要集中在探索表达于中、小直径的初级感觉神经元的河豚毒素不敏感型(tetrodotoxin-

\*基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号 30973961)。

<sup>#</sup>通讯作者。

resistant, TTX-R)钠通道和瞬时感受器电位香草酸受体 1(transient potential vanilloid receptor1, TRPV1)。遗憾的是多年来在这方面并无突破性进展。以植物为本的各民族传统药物是当今国际药品市场的潜在丰富来源。遵循“反向药理学”的研究模式,形成先导物发现可践行的方法学,结合先进的科学技术和方法,从长期临床应用证实具有较显著镇痛功效和较少毒、副作用的传统药物中提取、分离多种单体化学成分,对其进行系统的药理研究,开发出化学结构和镇痛机理明确、安全性高的新型镇痛药物,将是镇痛药研发中具有较高效率的新途径。在我们的研究中,发现了两种对 TTX-R 钠通道和 TRPV1 均具有调制作用的民族药物——龙血竭和野木瓜。这两种药物在临床上都有较好的镇痛疗效,并且无成瘾性方面的记录。我们还确定了龙血竭调制 TTX-R 钠通道和 TRPV1 的药效物质基础是其化学成分剑叶龙血素 A、剑叶龙血素 B 和龙血素 B 的组合。

**关键词:** 龙血竭; 野木瓜; 河豚毒素不敏感型钠通道; 瞬时感受器电位香草酸受体 1; 反向药理学

## 1. 引言

疼痛是临床上一种常见的自觉症状,在许多急慢性疾患中皆可见此症状。它使得患者在肉体和精神上均遭受很多痛苦,严重影响其工作与生活,因此疼痛是危及人类健康及妨碍正常生活的主要问题之一。为了抗御疼痛,人类一直在孜孜不倦地寻求镇痛药物。从古至今人们曾采用过种种镇痛的方法和措施,但迄今尚无一种满意和理想的办法<sup>[1,2]</sup>。目前临床上最有效的镇痛药是以吗啡为代表的阿片生物碱类及其合成代用品(或称阿片类药物——opioids),但长期应用此类药物会产生成瘾性、耐药性以及抑制呼吸等毒副作用<sup>[3-5]</sup>,造成临床应用此类药物时受到严格管制,从而大大限制了它们的应用。另一类以非甾体抗炎药(Non-steroidal Antiinflammatory Drugs, NSAIDs)为代表的解热镇痛药,通过抑制环氧化酶途径,阻断前列腺素的合成和释放,提高痛阈而起到镇痛作用。此类药物镇痛效果不强而且还会引起胃肠道反应,甚至胃溃疡,胃出血以及变态反应等较为严重的不良反应<sup>[6]</sup>。一些致痛因子和炎性介质,如 5-HT, ATP, BK, His, PGE<sub>2</sub>, SP 等,其相应的受体阻断剂的应用对于镇痛虽有一定效应,但由于此等受体分布广泛故选择性作用部位不强而且副作用也较多。因此关注的焦点主要集中在探索表达于中、小直径的初级感觉神经元之河豚毒素不敏感型(tetrodotoxin-resistant, TTX-R)钠通道和瞬时感受器电位香草酸受体 1(transient potential vanilloid receptor1, TRPV1)。遗憾的是多年来在这方面并无突破性进展。

21 世纪前叶,是疼痛研究迅速发展的时代,研究开发高效、副作用小、无成瘾性的新型镇痛药物已成

为当今临床医学和新药研究的热点方向。以植物为本的各民族传统药物是当今国际药品市场的潜在丰富来源,遵循“反向药理学”的研究模式,形成先导物发现可践行的方法学,结合先进的科学技术和方法,从长期临床应用证实具有显著镇痛疗效的传统药物中提取、分离多种单体化学成分,对其进行系统的药理研究,开发出化学结构和镇痛机理明确、安全性高的新型镇痛药物,将是镇痛药研发中具有一定国际竞争力的新的亮点。在我们的研究中,发现了两种对 TTX-R 钠通道和 TRPV1 均具有调制作用的民族药物——龙血竭和野木瓜。这两种药物在临床上都有较好的镇痛疗效,并且无成瘾性方面的记录。我们还确定了龙血竭调制 TTX-R 钠通道和 TRPV1 的药效物质基础是其化学成分剑叶龙血素 A、剑叶龙血素 B 和龙血素 B 的组合。

## 2. 疼痛、电压门控性钠通道和瞬时感受器电位香草酸受体 1

疼痛(Pain)是从不愉快到难以忍受的一种主观感觉,这种感觉是由于一些物理和化学刺激作用于外周神经末梢而引起的,如高阈机械刺激,过高或过低温度刺激以及多种伤害性化学刺激等。由于这些刺激可导致组织细胞的损伤,因此也称之为伤害性刺激(Nociceptive/Noxious Stimuli)。在生物进化过程中体内有些细胞分化为感觉神经元,其中部分并特化为专门接受伤害性刺激的神经元,这些细胞被归为伤害性感觉神经元(Nociceptor)<sup>[7]</sup>,如专门感受和传递伤害性信息并发出细纤维(A<sub>δ</sub>/C)的小直径的感觉神经节细胞。在这些细胞的膜(特别是其轴索外周端末梢膜)上存在有许多感受疼痛刺激的膜蛋白(膜受体/通道蛋白)分

子<sup>[8]</sup>。现已知的有:

电压门控性钠通道(voltage gated sodium channel, VGSC)<sup>[9]</sup>——主要是表达于小直径感觉神经节(如 DRG/TG)细胞的,具有高激活阈和缓慢激活/失活时程的 TTX-R 类的钠通道 Nav1.8/1.9,河豚毒素敏感型(tetrodotoxin-sensitive, TTX-S)的钠通道 Nav1.3/1.7 在伤害信息传导中也起一定的作用;

TTX-R 钠通道在神经病理性疼痛和炎症介质所致的伤害性感受器致敏中扮演重要角色。生理状态下,含有 TTX-R 钠通道的 DRG 神经元,是伤害性感受器神经元。Nav1.8 主要分布在伤害性感受器神经元上。在炎性痛模型上,Nav1.8 mRNA 表达和 Nav1.8 电流均增加<sup>[10]</sup>; Wood 小组发现 Nav1.8 基因缺失的小鼠对伤害性机械性刺激表现出明显的痛觉缺失,对伤害性温度感受轻微缺乏,炎性痛觉过敏延迟发展<sup>[11]</sup>。这些都表明 Nav1.8 参与了疼痛通路,阻断 Nav1.8 的表达或功能可能会产生无副作用的镇痛。用反义寡核苷酸的方法选择性降低 Nav1.8 蛋白的表达后,有效的阻止了由慢性神经或组织损伤引起的痛觉过敏和异常性疼痛,并且可以逆转脊神经损伤所致的神经病理性疼痛<sup>[12]</sup>,这些资料提供了 Nav1.8 与神经病理性疼痛相关的直接证据。Nav1.9 是小直径 DRG 神经元持续性 TTX-R 电流的基础,对初级伤害性感受神经元的电生理性质有重要的影响<sup>[13]</sup>,其可能促成了神经损伤后 DRG 神经元的高兴奋性以及周围炎症后持续性热觉过敏和自发性疼痛等行为。

瞬时感受器电位香草酸受体 1,也称辣椒素受体<sup>[14]</sup>——也是表达于中、小直径感觉神经节细胞。TRPV1 为配体门控受体,其通道非选择性通透阳离子,但主要通透 Ca<sup>2+</sup>,其受体结合位点则有多个:包括能与某些内源性配体和体外辣椒素相结合的位点;与 H<sup>+</sup>结合的位点以及对温度(≥43℃)敏感的位点。由此可见 TRPV1 可整合多种物理和化学性伤害性刺激<sup>[15]</sup>。

TRPV1 受体广泛分布于背根神经节、三叉神经节和迷走神经节中的中等和小型神经元上,而正是这些神经元介导了伤害性信息的传入<sup>[16,17]</sup>。激活无髓鞘的 C 类感觉神经元末端的 TRPV1 受体,可直接开启非选择性阳离子通道,引起 Ca<sup>2+</sup>内流,细胞去极化,神经元兴奋,机体感受到如辛辣食物所产生的烧灼感<sup>[18]</sup>,但时间一长也使得降钙素基因相关肽(calcitonin

gene. related peptide, CGRP)、P 物质(substance P, SP)等释放耗竭排空,感觉神经元持续兴奋,对外界刺激不再敏感,从而产生镇痛的效果<sup>[19]</sup>。因此,TRPV1 受体已成为一个开发新型外周镇痛药物的靶点。Davis 等和 Caterina 等进行的小鼠 TRPV1 基因敲除研究显示,TRPV1 受体缺失小鼠对辣椒素和类似物树脂毒素(resiniferatoxin, RTX)不敏感,体外培养的感觉神经元和中枢传入神经纤维对 H<sup>+</sup>刺激敏感性大大下降(pH < 5),伤害性热刺激(>43℃)产生激动电流的几率大大下降,提示 TRPV1 对于感受辣椒素类刺激是必需的,其参与对 H<sup>+</sup>和伤害性热刺激感受的结果都证明了该靶点对镇痛治疗的意义<sup>[20]</sup>。

另外,还有许多膜受体与感受和传递伤害性刺激信息有关,如: P2X2/3R, 5-HTR, BKR, SPR 等,这些受体分子虽然可以直接为相应的化合物所激活,但他们主要是通过胞内转导机制而使痛反应敏感化,从而导致炎性痛/慢性痛,导致痛觉过敏(Hyperalgesia),触诱发痛(Allodynia),自发痛(Spontaneous Pain)等症状的产生。

由初级感觉神经元感受到的伤害性刺激,通过上述相应的膜受体/通道蛋白的换能作用,转换为神经信息(神经冲动/放电)向中枢传导,其突触中枢末端梢与脊髓内的中枢神经元形成突触联系,在此一方面可产生脊髓保护性反射,同时此种伤害性信息经过多重突触联系上传到脊髓以上的脑中枢,进入意识领域从而产生痛觉,并出现更为复杂的保护反射。动物实验中由于动物不能用语言来表达疼痛的性质和程度,因此只能用动物痛模型包括神经性痛,炎性痛和内脏痛模型来进行痛觉研究。

### 3. 反向药理学和源于传统药物的先导化合物

研究痛觉不仅要探讨疼痛的生理和病理机制,其最终目的是要设法缓解和消除疼痛。以吗啡为代表的麻醉性镇痛药和以阿司匹林为代表的解热镇痛抗炎药在解除患者痛苦方面发挥了巨大作用,但还有为数不少的疼痛不能得到有效的控制,同时这两类镇痛药的不良反应也不容忽视。即使针对较新的靶点 TRPV1 作为候选镇痛药所合成的一些高效拮抗剂,也因有引发高热等严重的副作用而退出临床试验。一般说来,尽管高通量筛选、组合合成与非对称合成等生物技术

的进展为药物发现打开了新的局面,由于药物发现过程已变得成本昂贵、更具风险和效率低下,制药业仍面临严重的挑战,畅销药上市后的失败和创新不足是大型制药公司关注的主要问题。因此,出现了基于传统药物知识的有利于从单靶点药物向多靶点药物的显著转变。以天然产物药物发现、民族药理学和传统医药为基础的战略选择被认为有望克服以往药物发现中由时间、成本和毒性这三个因素造成的主要障碍,它作为另一种药物发现引擎正在突现出来。新的战略选择催生了被称为反向药理学的跨学科研究领域,它提供了药物研发中从随机地追踪偶然的发现到形成一条有组织的路线来寻求先导物的范式转变。

反向药理学<sup>[21-23]</sup>指的是药物发现先于对其作用方式和机制了解的研究模式,即以在历史上长期使用来治疗疾病,并已被证实具有很高安全性和功效的传统药物为化合物资源,通过跨学科的探索性研究,整合已证实的临床经验和实验观察,并通过进一步的预临床和临床研究将先导物开发为候选药物的严格科学方法。这一过程中“安全”是最重要的出发点,效应变成有待确认的事情。由传统知识所激发的反向药理学将以往的“实验室—临床”的药物发现过程颠倒为“临床—实验室”的相反路径,这种研究模式的创新性在于将有生命力的传统知识和现代科学技术处理结合起来,更快地提供更好和更安全的先导物。于是,那些在长期临床应用中显示出较高功效和较少毒、副作用的传统植物药作为发现新的先导物的基础受到了较多的关注和研究。

传统药物的化学成分复杂多样,是获得新的先导物的丰富资源。根据以往的临床经验和实验观察,常见的单味止痛药如川芎、延胡索、三七、当归、独活、威灵仙、罂粟壳等<sup>[24]</sup>中具有镇痛效应的主要化学成分有以下三大类:

1) 生物碱类镇痛活性成分:罂粟科延胡索中的延胡索乙素<sup>[25]</sup>、乌头类生物碱<sup>[26]</sup>、青风藤中的生物碱单体青藤碱(simomenine)<sup>[27]</sup>、益母草总生物碱等均有明显的镇痛效应。

2) 黄酮类镇痛活性成分:三棱总黄酮能明显提高小鼠因热刺激引起的疼痛反应的痛阈值<sup>[28]</sup>,雪莲总黄酮对小鼠热刺激甩尾潜伏期有明显的延长<sup>[29]</sup>,银杏叶总黄酮能明显降低小鼠因醋酸刺激引起的扭体反应次数<sup>[30]</sup>。

3) 皂甙类镇痛活性成分:怀牛膝总皂甙,人参皂苷、白芍总皂苷、柴胡皂苷等在对抗炎症的同时,对机体亦有明显的镇痛效应。

然而,这些单味药中具有镇痛活性的成分至今开发极少,究其原因,一是这些药物及其成分虽然有较好的镇痛效应,但其作用机制和靶点却并未在现代科技的水平上得以阐明;二是原药物是具有多种药理效应的多种化学成分的混合物,究竟哪些成分能产生原药物的镇痛效应并未得到确证。

与单一化学实体药物的情形不同,传统药物的药理研究既要阐明其药理作用,又要确定其产生特定药理作用的药效物质;药理作用要通过确定产生它的药效物质来揭示其本质,而药效物质的确定又依赖于药物作用机理的阐明。这既是从药效物质和作用机理二者的相关性来阐明传统药物临床疗效的科学根据的关键问题,也是按照反向药理学研究模式,如何从传统药物获得能体现原药物良好性能的先导物的方法学问题。

上世纪二十年代著名学者陈克恢研究麻黄的方式,即先分离提取出成分然后研究药理作用,取得了很大成就,并受到了国内外的重视。半个多世纪里,大多数学者研究中药时都遵循这种方式。

然而,这种做法往往仅单独研究从原药物中分离的化学成分或原药物本身的效应,没有把原药物的效应和其化学成分的效应联系起来,忽略了传统药物研究中应该给予充分关注的问题:原药物本身所具有的多种药理效应和其成分的效应可能并非完全一致。因此,这种方式的研究很少有助于阐明原药物的药理机制,也不能准确地确定哪些成分在什么程度上产生了原药物特定的药理效应,更难以判定分离出的化学成分之间是否仍然保留着原药物中化学成分之间产生特定药理效应的相互作用关系(很少研究原药物多个成分的联合效应)。

针对传统药物研发中这些基础性的关键问题,从2001年以来我们以确有多种疗效的傣药龙血竭的镇痛效应为生物学背景,提出了以传统药物本身的药理效应为参照,将其成分(组合)的效应与原药物本身的效应作比较,寻求能替代产生原药物本身效应的化学成分(组合)作为研发新药的先导物这一新的方法学的基本原则。

为了实践在新的方法学指导下的药物发现过程,

我们建立了传统药物药效物质的操作型概念<sup>[31,32]</sup>, 针对特定的药理效应, 根据它便于通过传统药物和其成分(组合)的药理效应之间的比较来确定某一成分(组合)是否为原药物的药效物质。将其与反向药理学的研究理念相结合应用于传统镇痛药物的研发, 首先根据痛觉的产生和传导机制, 应用受体、离子通道及酶等多种药物靶点, 确证以往安全使用的镇痛药物的效应, 然后以原药物的整体药理效应为参照, 从有效部位到个别成分, 逐级定向筛选出对该靶点具有药理活性的化学成分或化学成分组合, 通过对药理效应的定性和定量分析确定出的能(近似)替代原药物产生特定药理效应的药效物质; 当药效物质由多种成分构成时, 还需分析这些成分间的交互作用; 再结合组织器官或整体动物模型对所确定的药效物质进行更深入的药理和药效学研究。遵循上述独特的方法学, 我们对两种临床镇痛疗效较好的传统植物药物龙血竭和野木瓜开展了下述一系列的药理研究。

## 4. 两种传统药物对 VGSC 和 TRPV1 的调制

### 4.1. 龙血竭及其成分对 VGSC 和 TRPV1 的调制

龙血竭是百合科龙血树属植物剑叶龙血树含脂木材的醇提物, 也是传统药物中的一味常用药材, 具有活血化瘀、消肿止痛、收敛止血等作用, 有“活血圣药”之称。近年来被广泛应用于临床, 并在止血、镇痛方面取得了很好的疗效<sup>[33]</sup>。现代药理学实验表明, 龙血竭对腹腔注射冰醋酸引起的小鼠扭体反应具有明显的抑制作用<sup>[34]</sup>; 急性和慢性毒理学实验则表明, 龙血竭毒性很低<sup>[35]</sup>。因而龙血竭中产生镇痛效应的化学成分极具开发成一种安全有效、成瘾性低的新型镇痛药物的潜能。但在其被制成的各种制剂的使用说明书中, 龙血竭的镇痛机理和药用成分都是不明确的。我们应用膜片钳实验技术, 观察到龙血竭对背根神经节细胞河豚毒素敏感型(TTX-S)钠通道电流具有调制作用<sup>[36]</sup>, 从而提出了有别于以往将龙血竭的镇痛作用简单地归纳为消炎止痛, 而是通过直接干预外周痛觉信息的传导过程来发挥其镇痛效应的新机理。

在前述的内容中, 我们已经提及 DRG 细胞膜上存在的河豚毒素不敏感型(tetrodotoxin-resistant, TTX-R)钠通道在疼痛尤其是慢性炎症性痛和神经病性疼痛发生机制中起着比 TTX-S 钠通道更为重要的作用

<sup>[37]</sup>, 因此又应用膜片钳技术, 观察了龙血竭对 DRG 细胞 TTX-R 钠通道电流的影响, 进一步研究龙血竭镇痛作用的药理机制, 并明确其产生镇痛作用的药效成分。实验结果表明, 龙血竭能浓度依赖地抑制 DRG 细胞膜上 TTX-R 钠通道电流峰值, 中、高浓度的龙血竭溶液还能电压依赖地影响通道的激活过程, 使通道电流的半激活电压向去极化方向偏移, 延缓其激活过程<sup>[31]</sup>。由此我们认为, 龙血竭对 TTX-R 钠通道的调制也参与了其直接干预痛觉信息中枢传入的过程, 而由于 TTX-R 钠通道在痛觉产生和传导中的特异性作用, 龙血竭对 TTX-R 钠电流的调制可能在其干预痛觉信息传入中占据了更重要的地位。

基于传统药物中具有镇痛活性的主要是生物碱类、黄酮类和皂甙类成分, 并考虑到龙血竭自身所含各类成分的含量比例, 我们重点对龙血竭的黄酮部位和从黄酮部位中提取分离的 5 种成分(剑叶龙血素 A、剑叶龙血素 B、龙血素 B、黄烷、紫檀芪)及这 5 种成分的各种组合进行了药理研究。这些研究都是按照传统药物药效物质的操作型概念和反向药理学的研究理念来进行的。

我们进行了龙血竭的黄酮部位和从黄酮部位中提取分离的上述 5 种成分及这 5 种成分的各种组合调制 TTX-R 钠电流的膜片钳实验。并以龙血竭对 TTX-R 钠电流调制效应的药理学参数为参照, 将龙血竭黄酮部位、剑叶龙血素 A、剑叶龙血素 B、龙血素 B、黄烷、紫檀芪及这 5 种成分的 9 种组合调制 TTX-R 钠电流的药理学参数与之逐一比较, 最终确定了龙血竭调制 TTX-R 钠电流的有效部位就是其黄酮部位, 药效物质基础则非任何一种单一的化学成分, 而是 3 种化学成分剑叶龙血素 A, 剑叶龙血素 B 和龙血素 B 的组合, 且 3 种成分之间存在协同作用<sup>[31]</sup>, 缺一不可。

为了进一步研究这 3 种成分协同调制钠通道的机理, 我们对其化学结构进行了分析。这 3 种成分有着相似的化学基团。将这 3 种成分与已有的能够调制 DRG 细胞钠通道的药物结构进行对比, 发现 3 种成分的化学结构与目前对钠通道电流有着抑制作用的河豚毒素、蜘蛛毒素、蝎毒素等毒素的化学结构全无相似之处。利多卡因、普鲁卡因等局部麻醉药与这 3 种成分在化学结构上也相差甚远。但这 3 种成分与能够调制钠通道和 TRPV1 受体的辣椒素的结构却有诸多相似之处。

龙血竭 3 种成分中的剑叶龙血素 B<sup>[38]</sup>和辣椒素、其类似物树脂毒素均具有特征基团,即苯环上连接一个甲氧基和一个羟基。这一特征基团也是辣椒素、胡椒碱和姜油酚这一类有着刺激辛辣气味的化合物所共同具有的,且这 3 种化合物在生理上亦具有类似的效应,只是由于与各自特征基团相连的直链烷烃结构和长度的不同而在香辛味和对机体刺激部位或程度上有所不同<sup>[39]</sup>。已有的研究表明,辣椒素对辣椒素敏感型三叉神经节细胞膜上的电压门控性钠通道电流的激活具有抑制效应<sup>[40]</sup>,对大部分小直径 DRG 细胞的电压门控性钠通道电流峰值也具有一定程度的抑制效应。既然辣椒素能够调制初级感觉神经元电压门控性钠通道,也能激活 TRPV1 受体,其类似物树脂毒素则可抑制 VR1 受体的激活,那么龙血竭的 3 种成分是否也能对与疼痛相关的 TRPV1 受体产生药理效应呢?

膜片钳实验结果充分证实了我们的猜测。研究表明,龙血竭能浓度依赖的抑制辣椒素诱发的 TRPV1 受体电流,而且 IC<sub>50</sub>(半数抑制浓度)比抑制 TTX-R 钠通道电流的 IC<sub>50</sub> 要低几个数量级。剑叶龙血素 A、剑叶龙血素 B、龙血素 B 均能够抑制 TRPV1 受体电流,且以龙血素 B 的效果为最优,但仍不及这 3 种成分组合的效果。由此我们推测,与调制钠通道类似,3 种成分在调制 DRG 细胞 TRPV1 受体时也可能存在协同作用。这 3 种成分的组合可能也是龙血竭调制 TRPV1 受体的药效物质基础。不过,这些尚在研究之中。

## 4.2. 野木瓜及其成分对 VGSC and TRPV 1 的调制

野木瓜为木通科(Lardizabalaceae)野木瓜属植物,拉丁学名 *Stauntonia chinensis* DC., 是一种常用中药,其根、茎、叶具有祛风止痛及舒络的功效,目前以其根、茎、叶的粗提物制成了多种制剂,如注射剂<sup>[41]</sup>、片剂、胶囊剂、丸剂等,可以缓解癌性痛、各种神经痛<sup>[42]</sup>、及术后疼痛<sup>[43]</sup>,疗效显著,且具有无耐药性、无成瘾性、毒副作用小等特点。

近来的药理研究已证实,野木瓜片对小鼠热板法、扭体法疼痛模型和大鼠三叉神经痛模型均有显著的镇痛作用。蜜蜂毒(bee venom, BV)模型和福尔马林(formalin, F)模型两种持续性痛动物实验模型研究也

表明,野木瓜注射液能缓解大鼠足底皮下化学组织损伤诱致的自发痛、痛敏和炎症,但是纳洛酮不能翻转野木瓜注射液对自发痛反应的镇痛作用,提示其镇痛作用并非由内源性阿片受体所介导<sup>[44]</sup>。叶文博等人发现野木瓜注射液对大鼠隐神经传导<sup>[45]</sup>、爪蟾坐骨神经传导<sup>[46]</sup>和牛蛙坐骨神经传导<sup>[47]</sup>,具有可逆的阻滞作用;野木瓜注射液中的皂苷成分,可使大鼠隐神经 C 类纤维轴膜膨胀、边界模糊, A $\delta$  类纤维髓鞘出现较多的大空洞和解髓鞘;并推测野木瓜皂苷可通过破坏髓鞘和轴突膜,引起神经纤维内的钾离子外流,使膜电位超极化,膜兴奋性下降,从而发生神经传导阻滞<sup>[48]</sup>,产生镇痛作用。

在上述药理实验中,野木瓜注射液破坏髓鞘和轴突膜的起效时间最少也要 10~15 min,且是在神经干上直接给药;浓度较低的野木瓜皂苷起效时间则更长,约在 44 min 以后。而临床上应用野木瓜注射液肌注治疗疼痛的起效时间也是 10~15 min<sup>[43]</sup>,如果野木瓜的镇痛效果与其神经传导阻滞作用相关,则该作用应在其到达神经干,破坏髓鞘和轴突膜之前就已产生。此外,神经轴突膜和髓鞘的损伤,除了引起神经纤维内的钾离子外流,发生传导阻滞外,也会引起钠通道的重新分布,使细胞膜处于对刺激的超敏状态,产生自发重复放电,甚至引起病理性疼痛<sup>[49,50]</sup>。然而,野木瓜的临床镇痛维持时间较长,一般其治疗慢性疼痛的疗程都在 10~20 日以上<sup>[43]</sup>。因此,野木瓜产生神经传导阻滞作用的机理可能有其它更直接的途径。

为了确定野木瓜对与神经传导密切相关的重要离子通道——电压门控性钠通道是否有直接的抑制作用,我们应用膜片钳实验技术,观察了野木瓜水煎醇沉液(其提取方法类似于野木瓜注射液制法)对大鼠背根神经节电压门控性钠通道(voltage gated sodium channel, VGSC)的调制作用。全细胞膜片钳实验结果表明,野木瓜水煎醇沉液能显著抑制 DRG 神经元 TTX-S 和 TTX-R 钠电流峰值,较高浓度的野木瓜水煎醇沉液还能影响其激活和失活过程。计算机仿真结果也表明,野木瓜水煎醇沉液作用后,DRG 细胞膜产生动作电位的阈刺激强度提高,产生的动作电位幅值也有所降低,说明野木瓜水煎醇沉液对 VGSC 的影响确实对 DRG 细胞膜动作电位的产生和传导起了阻滞作用。这些结果证实了我们关于野木瓜可能通过直接干预初级感觉神经元细胞膜上的钠离子通道,干预动



作电位的产生,阻滞痛觉信息的中枢传入,产生镇痛效应的推测。且在膜片钳实验过程中,加药后钠电流的记录是在向距 DRG 神经元 100  $\mu\text{m}$  处喷射药物 8 s 后进行的,可见,野木瓜水煎醇沉液直接对神经元细胞膜钠离子通道给药起效很快,这与临床上肌注或穴位注射野木瓜注射液 10 min~15 min 的起效时间也是相一致的。

继此项研究之后,我们开始对野木瓜镇痛效应的有效部位和药效物质基础进行探索。现今,我们已从野木瓜原药中提取分离了 3 个有效部位(正丁醇层、水层和乙酸乙酯层),并从正丁醇层中分离出单体化合物 34 个,其中 13 种化学物的结构已被鉴定。但是,在这 34 个单体化合物中,含量较高,能够分离纯化后用于药理实验的只有 2 种成分。其中 1 种成分,已经被证实对瞬时感受器电位香草酸受体 1(TRPV1)具有调制作用。另 1 种成分和野木瓜正丁醇层提取物调制 TRPV1 受体的膜片钳实验尚在进行之中。

与此同时,我们也开展了野木瓜正丁醇层提取物的在体动物实验,来观察其是否具有镇痛作用。实验结果表明野木瓜正丁醇层提取物能明显延长小鼠舔足、甩尾的痛阈反应时间,并减少醋酸致小鼠扭体次数,而且这些效应不能被纳洛酮所拮抗,这些结果与之前文献[43]中关于野木瓜注射液的实验结果是一致的。

## 5. 结束语

半个世纪以来,疼痛医学有了长足的发展,这与该学科具有的两个基本特征是分不开的,即多学科融合、基础与临床密切配合。90 年代,分子生物学的大发展对疼痛医学产生了极大的推动作用,人们开始在神经系统中寻找痛觉传递系统特有的分子,即该系统有别于其它感觉(如触觉、温觉)系统的特定的分子,将其作为研究靶子(称为“靶分子”),企图通过抑制其功能来治疗疼痛,作为发展新型镇痛药的契机<sup>[51]</sup>。与此同时,人们也逐渐认识到西医的局限性和西药的毒副作用,而出现了回归自然、采用天然药物的潮流。特别是传统药物在数千年的发展历史中已经肯定具有明显和确切的镇痛作用,且毒副作用极小,麻沸散就是典型的代表。于是,从传统药物中研发抑制痛觉传递系统特有的靶分子的新型镇痛药的理念,应运而生。

在我们的研究中,十分幸运地从傣药龙血竭中找到了对这种靶分子——TTX-R 钠通道和 TRPV1 受体,均具有调制作用的 3 种有效成分的组合。这说明,在传统药物的多种化学成分中找到少数几种能够对这些“靶分子”产生调制作用的化合物,是可以做到的。重要的是,我们在找寻到这样的 3 种单体化合物后,并没有只专注于这些化合物成药性的研究而掘弃了传统药物本身,而是将这些化合物的药理效应、相互作用、化学构成与龙血竭本身的药理效应紧密的结合起来进行研究,从而才能观察到,这 3 种成分在共同调制 TTX-R 钠通道和 TRPV1 受体时具有协同作用,产生与龙血竭同等的药理效应时,3 种成分的组合的 IC<sub>50</sub> 剂量均小于其中任何一种成分单独产生此种效应的 IC<sub>50</sub> 剂量。

对传统医学或民间疗法中使用的药物和方剂进行深入的调查研究,以现代科学方法发现和确定传统药物的镇痛作用靶点与药效物质基础,深入阐明传统药物的镇痛作用机制,为传统药物镇痛作用的研究与开发拓展了极大的空间,也为镇痛药的研发指明了一个新的方向。值得注意的是,这个方向所进行的研究,需要的不仅仅是新的研究对象和新的研究技术,还需要新的方法学的指导——反向药理学、传统药物药效物质的操作性定义及相应的研究策略。好运气的垂青很重要,但没有方法学的指导很可能会错过好运气。

## 参考文献 (References)

- [1] J. M. Bjordal, A. Klovning, A. E. Ljunggren and L. Slordal. Short-term efficacy of pharmacotherapeutic interventions in osteoarthritic knee pain: A meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. *European Journal of Pain*, 2007, 11(2): 125-138.
- [2] R. A. Moore, S. Derry, G. T. Makinson and H. J. McQuay. Tolerability and adverse events in clinical trials of celecoxib in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: Systematic review and meta-analysis of information from company clinical trial reports. *Arthritis Research & Therapy*, 2005, 7(3): R644-R665.
- [3] E. Kalso, J. E. Edwards, R. A. Moore and H. J. McQuay. Opioids in chronic non-cancer pain: Systematic review of efficacy and safety. *Pain*, 2004, 112(3): 372-380.
- [4] R. Chou, G. J. Fanciullo, P. G. Fine, J. A. Adler; et al. Clinical guidelines for the use of chronic opioid therapy in chronic non-cancer pain. *Journal of Pain*, 2009, 10(2): 113-130.
- [5] R. S. Gregorian Jr, A. Gasik, W. J. Kwong, S. Voeller and S. Kavanagh. Importance of side effects in opioid treatment: A trade-off analysis with patients and physicians. *Journal of Pain*, 2010, 11(11): 1095-1098.
- [6] C. Scarpignato, R. H. Hunt. Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: Clinical picture, pathogenesis, and prevention. *Gastroenterological Clinical of North America*, 2010, 39(3): 433-464.

- [7] D. Julius, A. L. Basbaum. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 2001, 413: 203-210.
- [8] G. R. Lewin, Y. Lu and T. J. Park. A plethora of painful molecules. *Current Opinion in Neurobiology*, 2004, 14(2): 443-449.
- [9] M. D. Baker, J. N. Wood. Involvement of Na<sup>+</sup> channel in pain pathways. *Trends in Pharmacological Science*, 2001, 22(1): 27-31.
- [10] M. Tanaka, T. R. Cummins, K. Ishikawa, et al. SNS Na<sup>+</sup> channel expression increases in dorsal root ganglion neurons in the carageenan inflammatory pain model. *Neuroreport*, 1998, 9(6): 967-972.
- [11] A. N. Akopian, V. Souslova, S. England, et al. The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience*, 1999, 2(6): 541-548.
- [12] J. Lai, M. S. Gold, C. S. Kim, et al. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain*, 2002, 95(1-2): 143-152.
- [13] X. Fang, L. Djouhri, J. A. Black, et al. The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *Journal of Neuroscience*, 2002, 22(17): 7425-7433.
- [14] H. Wang, C. J. Woolf. Pain TRPs. *Neuron*, 2006, 46: 9-12.
- [15] I. Nagy, P. Santha, G. Jancso and L. Urban. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 50: 351-369.
- [16] M. Petersen, R. H. LaMotte. Effect of protons on the inward current evoked by capsaicin in isolated dorsal root ganglion cells. *Pain*, 1993, 54(1): 37-42.
- [17] H. U. Zeihofer, M. Kress and D. Swandulla. Fractional Ca<sup>2+</sup> currents through capsaicin- and proton-activated ion channels in rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of Physiology*, 1997 503(1): 67-78.
- [18] G. Jancso, S. Karcsu, E. Kiraly, et al. Neurotoxin induced nerve cell degeneration: Possible involvement of calcium. *Brain Research*, 1984, 295(2): 211-216.
- [19] A. Szallasi, P. M. Blumberg. Vanilloid receptors: New insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain*, 1996, 68(2-3): 195-208.
- [20] J. B. Davis, J. Gray, M. J. Gunthorpe, et al. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 2000, 405(6783): 183-187.
- [21] B. Patwardhan, A. D. B. Vaidya and M. Chorghade. Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, 2004, 86(6): 789-799.
- [22] Y.-J. Surh. Reverse pharmacology applicable for botanical drug development-inspiration from the legacy of traditional wisdom. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2011, 1(1): 5-7.
- [23] G. H. Du. Application of high throughput screening in the field of drug discovery. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2001, 21(4): 289-293.
- [24] 才亚贤. 止痛中药介绍[J]. 陕西中医函授, 1991, (5): 17-18.
- [25] 彭援. 植物药镇痛作用的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2005, 24(1): 20-22.
- [26] 陈昕. 乌头类中药的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2002, 13(12): 758-759.
- [27] 汪倪萍. 中药活性成分的抗炎免疫和镇痛作用[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(4): 366-369.
- [28] 邱鲁婴. 三棱总黄酮镇痛作用研究[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(4): 291-292.
- [29] 杨伟鹏. 野生雪莲和培养雪莲总黄酮主要药效作用比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(1): 32-35.
- [30] 吴承艳. 止痛中药的研究与思考[J]. 中华实用中西医杂志, 2005, 18(22): 1633-1635.
- [31] X. M. Liu, S. Chen, Y. X. Zhang and F. Zhang. Modulation of dragon's blood on tetrodotoxin-resistant sodium currents in dorsal root ganglion neurons and identification of its material basis for efficacy. *Science in China Series C-Life Sciences*, 2006, 49(3): 274-285.
- [32] 刘向明, 陈素. 龙血竭外周镇痛效应的药理研究和反向药理学[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2008, 27(3): 40-46.
- [33] 陈婷, 廖天安. 血竭胶囊对拔牙术后止血、镇痛疗效观察[J]. 海南医学, 2002, 13(10): 48.
- [34] 向金莲, 张路晗, 程睿等. 血竭消炎止痛作用研究[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(2): 110-111.
- [35] 曾雪瑜, 何飞, 李友娣等. 广西血竭的消炎止痛作用及毒性研究[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 171-173.
- [36] X. M. Liu, S. Chen, S. J. Yin and Z. N. Mei. Effects of dragon's blood and its component loueirir B on tetrodotoxin-sensitive voltage-gated sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Science in China Series C-Life Sciences*, 2004, 47(4): 340-348.
- [37] M. S. Gold, D. B. Reichling, M. J. Shuster, et al. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current in nociceptors. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 1996, 93: 1108-1112.
- [38] W. J. Lu, X. F. Wang, J. Y. Chen, et al. Studies on chemical constituents distilled from *Draacaena cochinchinensis* with chloroform. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1998, 33(10): 755-758.
- [39] J. Hahn, S. Y. Nah, J. J. Nah, et al. Ginsenosides inhibit capsaicin-activated channel in rat sensory neurons. *Neuroscience Letters*, 2000, 287(1): 45-48.
- [40] J. J. Clare, S. N. Tate, M. Nobbs, et al. Voltage-gated sodium channels as therapeutic targets. *Drug Discovery Today*, 2000, 5(11): 506-520.
- [41] 吴一福. 中药镇痛新药——精制野木瓜注射液[J]. 世界药品信息, 2001, 3(1): 50.
- [42] 吴波, 李祚雯. 野木瓜注射液穴位注射治疗坐骨神经痛 52 例[J]. 湖北中医杂志, 2004, 26(2): 48.
- [43] 吴淑兰, 彭慧. 野木瓜注射液用于术后镇痛 72 例[J]. 医药导报, 2002, 21(9): 570.
- [44] 彭小莉, 高喜玲, 陈军等. 鸡矢藤注射液和野木瓜注射液对大鼠足底皮下化学组织损伤诱致自发性痛、痛敏和炎症的作用[J]. 药理学报, 2003, 55(5): 516-524.
- [45] 叶文博, 刘强, 叶青等. 野木瓜注射液对大鼠隐神经传导的影响[J]. 中草药, 1995, 26(1): 20-21.
- [46] 叶文博, 刘强, 李晶. 野木瓜注射液对爪蟾坐骨神经传导的影响[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 1995, 24(3): 64-68.
- [47] 叶文博, 薛韶萍, 李劲. 野木瓜注射液对牛蛙坐骨神经传导的影响[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 1997, 26(4): 49-53.
- [48] 叶文博, 戴素梅, 姜芳. 野木瓜注射液对大鼠隐神经内的轴膜和髓鞘的影响[J]. 神经解剖学杂志, 1999, 15(4): 390-392.
- [49] J. M. Zhang, D. F. Donnelly, X. J. Song, et al. Axotomy increases the excitability of dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *Journal of Neurophysiology*, 1997, 78(5): 2790-2794.
- [50] J. D. England, F. Gamboni, S. R. Levinson, et al. Changed distribution of sodium channels along demyelinated axons. *Proceeding of the National Academy of Science*, 87: 6777-6780.
- [51] 郭世民, 马克坚. 中药镇痛研究新思路[J]. *Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy*, 2008, 17(9): 44-46.