

羟基积雪草酸的镇痛活性及其作用机制研究

白溪山, 邓超锐, 李育晓, 李红锐, 李艳红, 黄相中*

(云南民族大学 民族医药学院 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 昆明 650504)

摘要 目前对积雪草的功效成分研究主要集中在三萜皂苷类成分, 对其他成分的药理活性研究较少。本研究采用小鼠醋酸扭体实验、热板法实验和福尔马林实验, 对羟基积雪草酸的镇痛活性进行探究。实验分为对照组、阳性药阿司匹林组和低 (10 mg/kg)、中 (20 mg/kg)、高 (40 mg/kg) 剂量的羟基积雪草酸 (MA) 组。同时, 还采用阿片受体阻断实验, 辣椒素和谷氨酸诱导的小鼠舔爪实验, 对其镇痛机制进行研究。结果显示: MA 在醋酸扭体实验和福尔马林实验的 II 阶段表现出显著的镇痛活性; 在醋酸扭体实验和福尔马林实验中, MA 的镇痛活性没有被纳洛酮明显减弱; 中、高剂量的 MA 均能有效地减轻由辣椒素所引起的疼痛, 抑制率分别为 29.5% 和 64.4%, 还能有效地缩减由谷氨酸所引起的舔爪时间, 抑制率分别为 30.9% 和 56.1%。研究结果表明: MA 可通过作用于外周神经系统发挥较好的镇痛作用; 该化合物产生的镇痛活性可能涉及谷氨酸能系统和 TRPV1 的调节, 但不涉及阿片能系统。

关键词 羟基积雪草酸; 镇痛; TRPV1; 谷氨酸能系统

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2024)02-0230-06

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023103002

引用本文 白溪山, 邓超锐, 李育晓, 等. 羟基积雪草酸的镇痛活性及其作用机制研究 [J]. 中国药科大学学报, 2024, 55(2): 230–235.

Cite this article as: BAI Xishan, DENG Chaorui, LI Yuxiao, *et al.* Anti-nociceptive effect and mechanism of madecassic acid[J]. *J China Pharm Univ*, 2024, 55(2): 230–235.

Anti-nociceptive effect and mechanism of madecassic acid

BAI Xishan, DENG Chaorui, LI Yuxiao, LI Hongrui, LI Yanhong, HUANG Xiangzhong*

State Ethnic Affairs Commission-Ministry of Education Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, School of Ethnic Medicine, Yunnan Minzu University, Kunming 650504, China

Abstract To date, the investigation of the functional composition of *Centella asiatica* (L.) Urban has been mainly focused on the triterpenoid saponins, with little research on the other compositions. The acetic acid-induced writhing, Eddy's hot plate and formalin tests were employed to investigate the anti-nociceptive effects of madecassic acid (MA). The experiment was divided into normal control group, acetylsalicylic acid (ASA) group, and the MA groups of low (10 mg/kg), medium (20 mg/kg) and high (40 mg/kg) dosage. Meanwhile, the anti-nociceptive effect of MA on the acetic acid and formalin-induced nociceptive models in the absence and presence of NAL (naloxone hydrochloride) was evaluated. To have an insight into the anti-nociceptive mechanisms of MA, the capsaicin- and glutamate-induced paw licking tests were also employed to evaluate the involvement of the vanilloid and glutamatergic systems, respectively. Results showed that MA exhibited good anti-nociceptive activity in the acetic acid-induced writhing test and the second phase of formalin test; the anti-nociceptive effect of MA in both the acetic acid and formalin-induced nociception was not effectively removed by NAL; MA (20 mg/kg and 40 mg/kg) effectively reduced the duration of biting/licking the capsaicin-injected paw with inhibition rates of 29.5% and 64.4%, respectively; MA (20 mg/kg and 40 mg/kg) distinctly shortened the time spent in biting/licking the glutamate-injected paw by 30.9% and 56.1%, respectively. In summary, MA induces significant peripheral anti-nociceptive effect, and the anti-nociceptive activities probably involve the modulation of glutamatergic systems and vanilloid systems (TRPV1) instead of the opioidergic system.

收稿日期 2023-10-30 * 通信作者 Tel: 0871-65952171 E-mail: xiangzhongh@126.com

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 81960783); 云南省重大科技专项 (No. 202102AA100018); 云南省基础研究计划重点项目 (No. 202201AS070012); 云南省基础研究计划青年项目 (No. 202201AU070045)

Key words madecassic acid; analgesia; transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1); glutamatergic systems

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81960783), the Major Scientific and Technological Special Project of Yunnan Province (No. 202102AA100018), the Key Project of Yunnan Fundamental Research Program (No. 202201AS070012), and the Youth Project of Yunnan Fundamental Research Program (No. 202201AU070045)

疼痛是一个复杂的医学问题, 涉及多种途径^[1]。迄今为止, 已有许多药物被用于疼痛症状的临床治疗, 如非甾体抗炎药、阿片类药物和抗抑郁药物, 其中阿片类镇痛药是治疗中、重度疼痛最有效的药物。然而使用该类药物严重或慢性疼痛会产生一系列副作用^[2], 且长期使用可能导致耐受性^[3]、成瘾性^[4]和依赖性^[2]。因此, 高效、副作用小的镇痛药物的研发成为了研究的热点。

积雪草 [*Centella asiatica* (L.) Urban] 是一种多年生匍匐草本植物, 气味微弱, 属于伞形科积雪草属, 通常生长在潮湿的草地或水沟边, 其植株全草在临床上被用作治疗传染性肝炎、流行性脑脊髓炎、跌打损伤等^[5]。积雪草作为一味重要的彝药, 还被广泛用于治疗普通感冒和头痛症状。羟基积雪草酸 (MA, 结构式见图 1) 作为积雪草的重要活性成分表现出了很好的生物活性, 如: 抗癌^[6]、抗糖尿病^[7]、抗炎^[8]等生物活性。因此, 为了发掘积雪草中的有效镇痛活性成分, 本研究通过醋酸诱导的小鼠扭体模型、热板法实验模型和福尔马林诱导的小鼠疼痛模型对从积雪草中分离得到的 MA 进行镇痛活性研究。同时还采用阿片受体阻断实验, 辣椒素和谷氨酸诱导的小鼠舔爪实验, 对其镇痛机制进行研究, 为镇痛药物的研发和药理学研究提供参考依据。

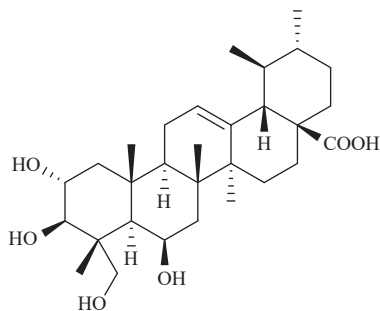


Figure 1 Chemical structure of madecassic acid (MA)

1 材料

1.1 药品与试剂

积雪草于 2018 年 9 月采自云南省昆明市, 经云南民族大学杨青松教授鉴定为积雪草 [*Centella*

asiatica (L.) Urban], 该植物标本 (No. C.A.20180909) 现存于云南民族大学民族医药学院标本室。从积雪草全草的乙醇提取物中分离得到 MA。

冰醋酸 (天津市致远化学试剂有限公司); L-谷氨酸 (上海韶远试剂有限公司); 盐酸纳洛酮 (NAL, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 辣椒平 (Capsz, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 阿司匹林 (ASA)、辣椒素、福尔马林购自北京百灵威科技有限公司。

1.2 动物

SPF 级昆明小鼠, 雌性, 体重 (20 ± 2) g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0008, 饲养环境保持在 (23 ± 3) °C, 相对湿度 40%~70%, 每 12 小时明暗交替, 饲养期间自由饮水进食, 实验前 12 h 禁食不禁水。所有动物研究均遵循国际医学伦理规范并经云南民族大学动物伦理委员会批准。

1.3 仪器

YLS-6B 智能热板仪 (上海精密仪器仪表有限公司)。

2 方法

2.1 醋酸诱导的小鼠疼痛模型

根据文献 [9] 报道方法, 将 50 只雌性小鼠随机分为 5 个组, 每组 10 只。各组小鼠分别以生理盐水 (对照组), ASA (100 mg/kg, 阳性对照组), 低 (10 mg/kg)、中 (20 mg/kg)、高 (40 mg/kg) 剂量的 MA 进行灌胃处理。在给药 30 min 后, 腹腔注射 0.6% 醋酸溶液 0.2 mL。观察记录注射醋酸后 15 min 内小鼠出现的扭体反应的次数, 扭体反应包括腹部内凹、躯干与后肢伸张和臀部高起。抑制率按以下公式计算: 抑制率 = (对照组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 对照组扭体次数 $\times 100\%$ 。进行 NAL (5 mg/kg) 阻断实验时, 需在灌胃给药前 10 min 进行腹腔注射 NAL。

2.2 热板法致痛模型

根据文献 [9] 报道, 筛选出基础痛阈值在 5~30 s 之间的雌性小鼠 50 只, 并随机分为 5 组, 每组 10 只。各组小鼠分别以生理盐水 (对照组),

ASA(100 mg/kg, 阳性对照组), 低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(40 mg/kg)剂量的 MA 进行灌胃处理。以小鼠舔后足反应的潜伏期为痛阈指标, 在给药后的 0、30、60、90 和 120 min, 分别测定各组小鼠的痛阈值。

2.3 福尔马林诱导的小鼠疼痛模型

根据文献 [9] 报道, 将雌性小鼠 30 只随机分为 5 组, 每组 6 只。各组在注射福尔马林前 1 h 分别以生理盐水(对照组), ASA(100 mg/kg, 阳性对照组), 低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(40 mg/kg)剂量的 MA 进行灌胃处理。给药 1 h 后, 右后爪足底表面注射 2.5% 福尔马林(20 μ L)。记录注射福尔马林后 0~5 min(I 阶段)和 15~30 min(II 阶段)的舔爪时间。进行 NAL(5 mg/kg)阻断实验时, 需在灌胃给药前 10 min 进行腹腔注射 NAL。

2.4 辣椒素诱导的小鼠舔爪实验

根据文献 [10] 报道, 将雌性小鼠 30 只随机分为 5 组, 每组 6 只。各组在注射辣椒素前 1 小时分别以生理盐水(对照组), Capsz(64 mg/kg, 阳性对照组), 低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(40 mg/kg)剂量的 MA 进行灌胃或腹腔注射处理。给药后 1 h, 在左后爪足底间隙注射辣椒素(20 μ L, 每爪 1.6 μ mol), 然后记录注射后 0~5 min 小鼠舔或咬注射辣椒素的爪子的时间。

2.5 谷氨酸诱导的小鼠舔爪实验

根据文献 [10] 报道, 将雌性小鼠 30 只随机分为 5 组, 每组 6 只。各组分别以生理盐水(对照组), ASA(100 mg/kg, 阳性对照组), 低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(40 mg/kg)剂量的 MA 进行灌胃处理。给药后 1 h, 每只小鼠足底注射谷氨酸(20 μ L, 每爪 10 μ mol)。在注射谷氨酸后, 立即记录 15 min 内小鼠舔或咬注射谷氨酸的爪子的持续时间。

2.6 统计学分析

实验所有数据均采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 利用 GraphPad Prism 6.0 软件应用单因素方差分析(One-Way ANOVA)或双因素重复方差分析(Two-Way repeated measure ANOVA)进行统计比较, 其中 NAL 阻断实验数据采用非配对 t 检验进行统计比较, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3 结果

3.1 MA 对小鼠扭体次数的影响

结果如图 2 所示, 与对照组比较, ASA 和 MA 均能显著减少醋酸所致的小鼠扭体次数($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。在 40 mg/kg 剂量下, MA 表现出了很好的抑制活性, 抑制率为 70.8% ($P < 0.001$), 明显高于 ASA 的抑制率(64.2%, $P < 0.001$)。注射 NAL 后, ASA 和 MA 对小鼠扭体次数的抑制作用没有受到明显的影响, 该结果表明阿片系统没有参与 MA 的镇痛作用。

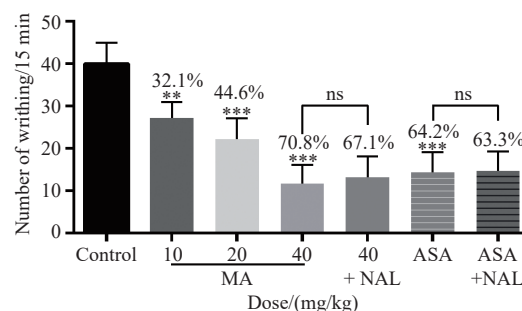


Figure 2 Effects of MA on writhing induced by injection of acetic acid in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

ASA: Acetylsalicylic acid; NAL: Naloxone hydrochloride

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group, ns: $P > 0.05$

3.2 MA 对小鼠痛阈值的影响

结果如表 1 所示, 与对照组比较, ASA 在给药 30、60、90 min 时能有效的延长小鼠的痛阈值($P <$

Table 1 Effects of MA on hot plate-induced nociception in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	Dose/ (mg/kg)	Interval following treatment				
		0	30	60	90	120 min
		Latency time/s				
Control	-	10.15 ± 2.56	11.01 ± 2.71	10.87 ± 1.64	9.92 ± 1.72	10.81 ± 2.68
Acetylsalicylic acid(ASA)	100	11.68 ± 2.26	16.71 ± 2.65**	17.08 ± 1.94**	15.16 ± 2.20*	12.61 ± 2.85
MA	10	11.31 ± 2.03	12.08 ± 2.91	12.26 ± 3.58	11.16 ± 2.89	12.21 ± 2.36
	20	13.37 ± 3.65	13.97 ± 4.02	12.76 ± 3.72	12.38 ± 2.97	11.84 ± 2.86
	40	10.68 ± 3.53	13.76 ± 2.93	12.83 ± 3.57	14.18 ± 4.02	13.23 ± 3.29

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. Two-Way repeated measure ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test

0.05)。在所有剂量下, MA 均不能有效的延长小鼠的痛阈值($P > 0.05$)。

3.3 MA 对福尔马林诱导小鼠舔爪的影响

如图 3 所示, 与对照组相比, 主要作用于外周神经系统发挥镇痛作用的 ASA 在福尔马林实验的 I 阶段不能明显缩短小鼠的舔舐时间, 而在 II 阶段表现出显著的镇痛活性, 抑制率为 62.0% ($P < 0.001$)。与对照组相比, MA 在福尔马林实验的 I 阶段也不能有效缩短小鼠舔足时间。在 II 阶段, 与对照组相比, 中、高剂量的 MA 均能有效的缩短小鼠舔足时间, 抑制率分别为 40.5% ($P < 0.01$) 和 61.9% ($P < 0.001$)。注射 NAL 后, ASA 和 MA 在福尔马林实验各阶段对小鼠舔舐时间的抑制作用没有受到明显的影响, 该结果进一步表明阿片系统没有参与 MA 的镇痛作用。

3.4 MA 对辣椒素诱导小鼠舔爪反应的影响

MA 对辣椒素致小鼠舔足反应的影响, 结果如图 4 所示。与对照组相比, Capsz(辣椒素拮抗剂)能有效的减轻辣椒素所引起的疼痛, 抑制率为 66.3% ($P < 0.001$)。中、高剂量的 MA 也能明显减轻由辣椒素所引起的疼痛, 抑制率分别为 29.5% ($P < 0.05$) 和 64.4% ($P < 0.001$)。

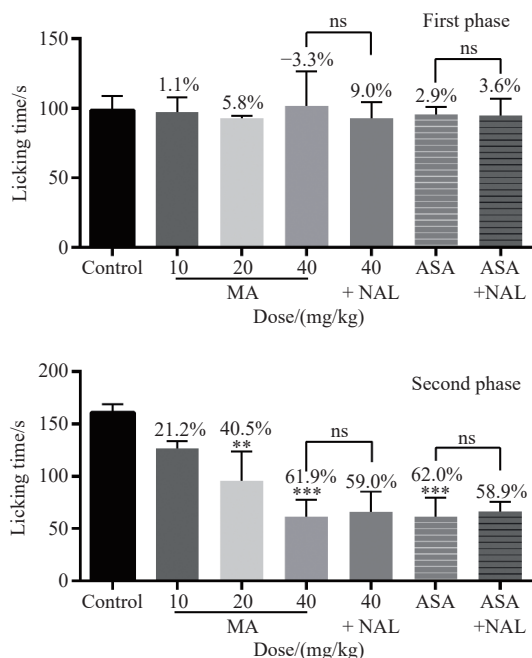


Figure 3 Effect of MA on formalin-induced nociception in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

NAL: Naloxone hydrochloride

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; ns: $P > 0.05$

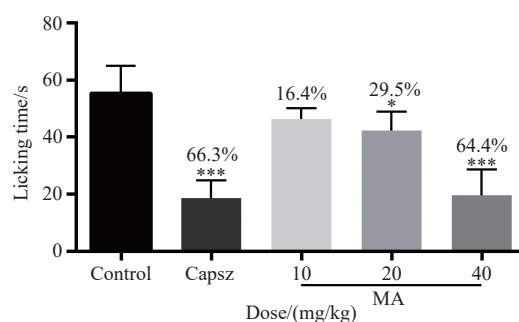


Figure 4 Effect of MA on the capsaicin(Capsz)-induced paw licking response in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.5 MA 对谷氨酸诱导小鼠舔爪的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 中、高剂量的 MA 能明显地缩减由谷氨酸所引起的舔爪时间, 抑制率分别为 30.9% ($P < 0.01$) 和 56.1% ($P < 0.001$)。ASA 也能有效的抑制由谷氨酸所引起疼痛, 抑制率为 57.3% ($P < 0.001$)。

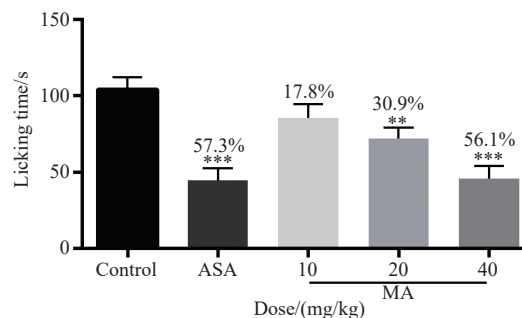


Figure 5 Effect of MA on the glutamate-induced paw licking response in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

4 讨论

积雪草具有悠久的药用历史, 其药理学活性包括抗抑郁、保护神经细胞、抗神经细胞凋亡、镇痛及改善记忆^[11]。然而关于积雪草提取物中有效镇痛成分及作用机制的研究却少有报道。MA 作为积雪草的重要活性成分表现出了很好的生物活性。因此, 为了探讨积雪草提取物中的有效镇痛成分及其作用机制, 本研究通过醋酸诱导的小鼠扭体实验模型、热板法实验模型和福尔马林实验模型对从积雪草中分离得到的 MA 进行镇痛活性评价, 进而对其镇痛机制进行探讨。

4.1 MA 的镇痛活性研究

醋酸扭体实验被广泛地应用于具有外周镇痛

活性化合物的镇痛活性评估^[10]。腹腔注射醋酸引起外周组织损伤,从而导致各种炎症介质和前列腺素的释放,使其腹部疼痛,进而产生扭体反应^[12]。本研究中 MA 能有效抑制醋酸所引起的疼痛,显示该化合物能在外周水平有效的缓解疼痛。其中 MA 表现出了比阳性药 ASA 更好的镇痛作用。该实验结果也暗示 MA 诱导外周镇痛的机制可能与作用于外周神经系统的药物类似,如非甾体抗炎药。

热板法实验模型是一个被广泛应用于具有中枢镇痛活性化合物的镇痛活性评估^[10]。实验结果显示,所有剂量下,MA 均不能显著地延长小鼠的痛阈值,表明其不能作用于中枢神经系统发挥镇痛作用。

MA 的镇痛活性还被福尔马林实验模型进一步的评估。在福尔马林实验的 I 阶段,MA 不能有效缩短小鼠舔足时间。在 II 阶段,中、高剂量的 MA 均能有效地缩短小鼠舔足时间。福尔马林实验通常被用于验证新药或天然衍生化合物参与外周和中枢镇痛活动。在足底注射福尔马林后,小鼠会立即产生异常的重复舔或咬注射的爪子行为,该行为可在两个阶段中观察到。由于福尔马林直接激活伤害感受器,持续约 5 min^[13],I 阶段(非炎症/神经性)在给药后立即发生。由于缓激肽、前列腺素和组胺的释放,II 阶段(炎症)发生在福尔马林给药后 15~30 min。中枢作用的药物,如阿片类药物和麻醉药,可以在测试的 I 阶段发挥镇痛作用,中枢和外周作用的药物都可以在 II 阶段发挥镇痛作用^[14]。因此,MA 只在实验的 II 阶段才能有效地缩减小鼠的舔舐时间表明其具有外周作用的镇痛活性。上述 3 种疼痛模型的实验结果表明,MA 可表现外周镇痛活性,并可减轻炎症介导的疼痛。

4.2 MA 的镇痛作用机制研究

本研究还采用纳洛酮阻断实验,辣椒素和谷氨酸诱导的小鼠舔爪实验,对其镇痛机制进行探讨。NAL 可以消除阿片类药物的镇痛活性。然而,在醋酸扭体实验和福尔马林实验中,给药 NAL 后,MA 的镇痛活性并没有被明显减弱,这表明阿片能系统不参与它的镇痛活性。中、高剂量的 MA 能有效的抑制辣椒素诱导的小鼠舔爪行为。众所周知,辣椒素能刺激瞬时感受器电位香草酸亚型 1 (transient receptor potential vanilloid subfamily 1,TRPV1),触发 A δ 或 C 类传入纤维,进而能引起 Ca²⁺和 Na⁺等

阳离子内流,从而引发神经源性疼痛^[15-16]。除辣椒素外,TRPV1 还可被低 pH 和高于 43 °C 的高温激活^[17]。足底注射辣椒素会引起小鼠快速的舔爪反应,然而小鼠缺乏 TRPV1 受体时对辣椒素诱导的舔爪行为反应会显著降低^[18]。另外,辣椒素拮抗剂辣椒平也能显著的减轻辣椒素产生的疼痛反应^[16]。因此,本实验中 MA 对小鼠舔爪行为的抑制活性表明其镇痛作用可能与 TRPV1 的调节有关。

通过谷氨酸诱导的舔爪反应来评估 MA 在谷氨酸能通路中的疼痛调节作用。结果表明,中、高剂量的 MA 能显著减弱谷氨酸诱导的舔爪行为。谷氨酸是一种广泛分布于中枢神经系统的兴奋性氨基酸。Beirith 等^[19]对谷氨酸引起的疼痛机制进行研究,发现其可作用于外周、脊髓和脊椎水平上的特定谷氨酸受体引起疼痛反应,该疼痛反应涉及外周和中枢神经系统。这种神经递质的受体由两大类组成,即离子型谷氨酸受体 (iGluRs) 和代谢型谷氨酸受体 (mGluRs)。iGluRs 是配体门控离子通道,包括 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA)、 α -氨基-3-羟基-5-甲基异噻唑-4-丙酸和红藻氨酸受体^[20]。iGluRs 被谷氨酸激活后,离子通道受体就会被激活,从而释放出启动膜电位的阳离子^[19]。NMDA 受体的激活会触发细胞内酶的活性,产生 NO 和其他 NO 衍生物,从而引发疼痛^[19]。另外,mGluRs 可通过次级信使间接激活膜电位,进而产生动作电位^[20]。因此,本研究结果表明 MA 可能通过调节 iGluRs 或 mGluRs 产生镇痛作用。

综上所述,从积雪草中分离得到的 MA 具有较好的镇痛作用,该化合物产生的镇痛活性可能涉及谷氨酸能系统和 TRPV1 的调节,但不涉及阿片能系统。本研究结果为探索积雪草中有效镇痛活性成分及作用机制奠定了理论基础,也为镇痛药物的发现提供实验依据。

References

- [1] Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain[J]. *Curr Opin Support Palliat Care*, 2014, 8(2): 143-151.
- [2] Benyamin R, Trescot AM, Datta S, et al. Opioid complications and side effects[J]. *Pain Physician*, 2008, 11(2 Suppl): S105-S120.
- [3] Dumas EO, Pollack GM. Opioid tolerance development: a pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective[J]. *AAPS J*, 2008,

- 10(4): 537-551.
- [4] Savage SR. Long-term opioid therapy: assessment of consequences and risks[J]. *J Pain Symptom Manage*, 1996, 11(5): 274-286.
- [5] Yang Y, Ding Y, Xia Y. Advances in the study of analytic methods and pharmacological actions of *Centella asiatica* L.[J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), 2010, 29(3): 6-9.
- [6] Kraft O, Hartmann AK, Hoenke S, et al. Madecassic acid-a new scaffold for highly cytotoxic agents[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4362.
- [7] Hsu YM, Hung YC, Hu LH, et al. Anti-diabetic effects of madecassic acid and rotundic acid[J]. *Nutrients*, 2015, 7(12): 10065-10075.
- [8] Won JH, Shin JS, Park HJ, et al. Anti-inflammatory effects of madecassic acid via the suppression of NF-kappaB pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells[J]. *Planta Med*, 2010, 76(3): 251-257.
- [9] Bai XS, Li YH, Li YX, et al. Antinociceptive activity of doliroside B[J]. *Pharm Biol*, 2023, 61(1): 201-212.
- [10] Ayumi RR, Mossadeq WMS, Zakaria ZA, et al. Antinociceptive activity of asiaticoside in mouse models of induced nociception[J]. *Planta Med*, 2020, 86(8): 548-555.
- [11] Wu P. Research progress on the influence of *Centella asiatica* (L.) Urban on nervous system[J]. *J Med Pharm Chin Minorities* (中国民族医药杂志), 2009, 15(11): 71-72.
- [12] Berkenkopf JW, Weichman BM. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: its role in the writhing response[J]. *Prostaglandins*, 1988, 36(5): 693-709.
- [13] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response[J]. *Pain*, 1989, 38(3): 347-352.
- [14] Sulaiman MR, Zakaria ZA, Mohamad AS, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Alpinia conchigera* rhizomes in various animal models[J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(8): 861-868.
- [15] Jaio ES, Rahman SA, Ching SM, et al. Possible mechanisms of antinociception of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves[J]. *Rev Bras De Farmacogn*, 2016, 26(5): 586-594.
- [16] Sakurada T, Matsumura T, Moriyama T, et al. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 75(1): 115-121.
- [17] Cortright DN, Szallasi A. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271(10): 1814-1819.
- [18] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor[J]. *Science*, 2000, 288(5464): 306-313.
- [19] Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw[J]. *Brain Res*, 2002, 924(2): 219-228.
- [20] Zhuo M. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 112 (Pt A): 228-234.