

实验研究

莲威阿那其颗粒剂抗炎镇痛作用的实验研究

夏尔巴提·吾马尔¹ 金小越²

(1 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐, 830011; 2 新疆医科大第六附属医院药剂科, 乌鲁木齐, 830002)

摘要 目的:研究莲威阿那其颗粒剂对小鼠抗炎及镇痛作用。方法:采用小鼠热板法和醋酸扭体法,检测莲威阿那其颗粒剂的镇痛作用。采用小鼠耳廓肿胀法观察莲威阿那其颗粒剂的抗炎作用。小鼠随机分为 5 组,即空白对照组、莲威阿那其颗粒剂高、中、低剂量组、阿司匹林组。每组小鼠连续灌胃给药 7 d 后,观察莲威阿那其颗粒剂的抗炎、镇痛作用。结果:莲威阿那其颗粒剂能明显抑制二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀,中、高剂量明显提高小鼠的痛阈,对小鼠醋酸扭体法和热板法致痛反应有较好的止痛作用。结论:莲威阿那其颗粒剂有明显的抗炎、镇痛疗效。

关键词 莲威阿那其颗粒剂;抗炎;镇痛;小鼠;耳廓肿胀法;实验研究

Experimental Study on Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Lianwei Anaqi Granules

Xiaerbati · Wumaer¹, Jin Xiaoyue²

(1 School of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2 Department of Pharmacy, the Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830002, China)

Abstract Objective: To investigate the anti-inflammatory and analgesic effects of Lianwei Anaqi granules. **Methods:** The analgesic effect of Lianwei Anaqi granules was determined by hot plate test and acetic acid writhing test in mice. The anti-inflammatory effect of Lianwei Anaqi granules was observed by ear swelling test in mice. Mice were divided into 5 groups randomly, namely blank control group, Lianwei Anaqi granules at high, medium and low doses groups, and Aspirin group. The anti-inflammatory and analgesic effects of Lianwei Anaqi granules were observed after every group mice were orally given correspondence drug (ig) for 7 days. **Results:** Lianwei Anaqi granules could inhibit ear swelling caused by Xylene in mice markedly, and the high and medium doses of Lianwei Anaqi granules could increase pain threshold significantly. In the acetic acid writhing test and hot plate test, Lianwei Anaqi granules showed greater analgesic effects. **Conclusion:** Lianwei Anaqi granules have significant anti-inflammatory and analgesic effects.

Key Words Lianwei Anaqi granules; Anti-inflammatory; Analgesic; Mice; Ear swelling test; Experimental study

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.05.039

莲威阿那其处方来源于新疆医科大学第六附属医院中医科,是我院传统中药自制制剂,主要针对“炎性反应”而立意组方,由雪莲、肉苁蓉、桑椹、阿那其根、骨碎补、鹿衔草、淫羊藿等 12 味药材组成,具有补骨通络、活血化瘀、祛风止痛之功效,可用于治疗各种原因引起的骨关节炎、椎间盘突出、外界损伤性炎症反应和肿胀。莲威阿那其处方以汤剂的剂型临床应用十几年来,疗效确切,取得了很好的治疗效果。本研究采用小鼠热板法和醋酸扭体法考察了莲威阿那其颗粒剂的体外镇痛作用,并通过莲威阿那其颗粒剂对二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀的影响考察了莲威阿那其颗粒剂的抗炎作用,为该药的临床

科学用药提供安全性依据和药理试验研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康昆明种小白鼠,雌雄兼用,体重(20±2)g,由新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供。饲养温度 20~25℃,给予充分的标准饲料和饮用水。

1.1.2 药物 莲威阿那其颗粒剂:由新疆医科大学附属第六医院中医科制剂室提供,生产批号:150301;阿司匹林,由拜耳医药保健有限公司提供,生产批号:BJ32261,规格 100 mg,人体临床用量:1 片/次,1 次/d。

基金项目:新疆维吾尔自治区科技支撑项目(201191257)

作者简介:夏尔巴提·吾马尔(1989.02—),女,硕士研究生,研究方向:药物分析,E-mail:1477396264@qq.com

通信作者:金小越(1961.05—),女,硕士,主任药师,研究方向:药物分析,E-mail:jinxiao-yue0112@163.com

1.1.3 试剂与仪器 乙酸:天津市致远化学试剂有限公司提供,生产批号:160701;二甲苯:天津市致远化学试剂有限公司提供,生产批号:160810。智能热板测痛仪、打孔器(6 mm)、计时器、AB135-S 电子天平(Mettler-Teledo)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 冰醋酸扭体试验与耳廓肿胀法试验均选取健康,体重(20±2)g 的小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只。热板痛阈试验筛选合格的雌性小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只。

1.2.2 给药方法 根据《中药药理研究方法学》中计量换算方法计算试验中的小鼠给药剂量。在正常饲养基础上,每组灌胃给药 1 次,连续给药 1 周。第 1 组为空白对照组,灌胃生理盐水,20 mL/(kg·d);第 2 组为阿司匹林组,给药剂量为 0.04 g/(kg·d);第 3 组委莲威阿那其颗粒剂高剂量组,给药剂量为 8.1 g/(kg·d);第 4 组为莲威阿那其颗粒剂中剂量组,给药剂量为 2.7 g/(kg·d);第 5 组为莲威阿那其颗粒剂低剂量组,给药剂量为 0.9 g/(kg·d)。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 莲威阿那其颗粒剂对冰醋酸扭体法小鼠扭体次数影响试验 于未测给药后 1 h,各组小鼠腹腔注射 1.1% 冰醋酸 0.01 mL/(g·d)。观察并记录 20 min 内小鼠扭体反应次数(表现为腹部内凹、躯干与后腿伸展、臀部高起)并计算扭体抑制率(%)。扭体抑制率=疼痛抑制率=(空白对照组扭体次数-给药组扭体次数)/空白对照组扭体次数×100%^[1-2]。

1.2.3.2 莲威阿那其颗粒剂对热板痛阈时间影响试验 5 组雌性小鼠,分别放在(55±0.5)℃热板上测小鼠痛阈(注:热板用前预热 10 min)。痛阈=自小鼠放在热板上至出现添足后所需时间(s)^[3-4]。

1.2.3.3 莲威阿那其颗粒剂的小鼠耳廓肿胀法抗

炎、镇痛作用试验 末次给药后 60 min,每鼠左耳正、反两面均匀涂抹二甲苯 0.2 mL,致炎后 60 min 脱颈椎处死小鼠,沿耳廓基线剪下左右耳。用直径 9 mm 打孔器在左右耳相同部位打孔,于分析天平上立即称其质量(mg),以左、右耳片重量差为肿胀度,并计算小鼠耳片肿胀率。肿胀度=左耳耳孔片重-右耳耳孔片重,肿胀抑制率=(空白对照组肿胀度-给药组肿胀度)/空白对照组扭体次数×100%。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据处理,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 莲威阿那其颗粒剂对冰醋酸扭体法小鼠扭体次数影响试验结果 冰醋酸扭体实验结果表明,莲威阿那其颗粒剂能减少因冰醋酸引起的扭体反应,且随着计量的增加其作用增强,存在一定的量效关系。与空白对照组比较,莲威阿那其颗粒剂大、中、低剂量组差异有统计学意义(*P*<0.05),表明莲威阿那其颗粒剂有一定的镇痛作用。见表 1。

表 1 莲威阿那其颗粒剂对醋酸诱发的小鼠扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	20 min 扭体次数	扭体抑制率(%)
空表对照组	等容量	45.40±2.6	
阿司匹林组	0.04 g/kg	11.30±3.3*	75.11
高剂量组	8.1 g/kg	14.50±3.50*	68.06
中剂量组	2.7 g/kg	17.50±3.22**	61.4
低剂量组	0.9 g/kg	23.50±2.24**	48.23

注:与空白对照组比较 **P*<0.05, ***P*<0.01

2.2 莲威阿那其颗粒剂对热板痛阈时间影响试验结果 在测定时间内,阿司匹林组,莲威阿那其颗粒剂高、中剂量组小鼠痛阈值随观察时间而发生变化,给药 30 min 后,莲威阿那其高、中剂量组镇痛作用表现明显(*P*<0.05),痛阈值明显延长,90 min 内均有镇痛作用,60 min 左右出现作用高峰期,与空白对照组比较 30 min、60 min 差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 莲威阿那其颗粒剂对小鼠热板法镇痛的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	痛阈/值			
		用药前	30 min	60 min	90 min
空白对照组	等容量	15.58±2.34	20.02±3.13	16.03±1.16	15.16±1.34
阿司匹林组	0.04 g/kg	15.62±2.21	25.07±0.62**	23.92±1.80*	22.14±1.62**
高剂量组	8.1 g/kg	15.76±1.25	26.35±2.64**	24.36±1.46*	21.1±1.48**
中剂量组	2.7 g/kg	15.64±1.24	23.16±1.45**	22.14±1.34**	21.7±1.86**
低剂量组	0.9 g/kg	15.75±1.26	20.34±1.25	18.68±2.23	19.71±2.30

注:与空白对照组比较 ***P*<0.05, **P*<0.01

2.3 莲威阿那其颗粒剂对二甲苯胺所致的小鼠耳廓肿胀的影响试验结果 莲威阿那其颗粒剂能抑制二甲苯致炎性反应引起的小鼠耳肿胀作用,莲威阿那其颗粒剂高、中剂量组与空白对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),但中、高剂量组疼痛抑制作用较阿司匹林弱,阿司匹林组疼痛抑制作用与空白对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$),结果表明莲威阿那其颗粒剂能抑制二甲苯致炎性反应引起的小鼠耳肿胀作用,对急性炎性肿胀具有抑制作用。见表 3。

表 3 莲威阿那其颗粒剂对小鼠耳廓肿胀的影响($\bar{x}\pm s,n=10$)			
组别	剂量	耳肿胀率	肿胀抑制率(%)
空白对照组	等容量	0.89±0.08	
阿司匹林组	0.04 g/kg	0.38±0.06*	59.55
高剂量组	8.1 g/kg	0.46±0.02**	48.31
中剂量组	2.7 g/kg	0.68±0.04**	23.59
低剂量组	0.9 g/kg	0.73±0.07	17.97

注:与空白对照组比较** $P<0.05$,* $P<0.01$

3 讨论

莲威阿那其处方临床用于治疗椎间盘突出,骨关节的软骨、韧带等软组织的变形、退化、外界损伤性炎性反应和疼痛以及各种原因引起的骨关节炎的治疗^[7],而这些病症都会出现不同程度的炎性反应和疼痛症状,运用《中华人民共和国药典》相关质量标准规定和现代药理学研究已经可以证实莲威阿那其处方中的多种中药成分具有较强的抗炎和镇痛作用,如处方中天山雪莲、桑葚、阿那其根、淫羊藿、诱骨草等药材在有效成分基础上具有补肾通络、活血化瘀、祛风止痛等功效^[8-11],其中天山雪莲、阿那其根在维医药临床治疗中抗炎、镇痛作用明显。方中天山雪莲、桑葚、阿那其根、肉苁蓉等药材同时含有黄酮类、多糖和生物碱类成分,而多糖和芦丁等黄酮类化合物具有良好的抗炎、镇痛和活血化瘀作用^[12-14]。

小鼠热板法和醋酸扭体法是镇痛药物外周镇痛效果的评价和筛选中常用的经典模型,分别属于物理致痛法和化学致痛法,使用于观察药物对急性非特异性炎性反应的抗炎及镇痛作用,二甲苯引起的小鼠耳廓肿胀试验观察外周镇痛药物对炎性反应早期的渗出和肿胀的影响。本研究中莲威阿那其颗粒剂的抗炎、镇痛药理学研究使用小鼠热板法和醋酸扭体法观察莲威阿那其颗粒剂的镇痛作用,以二甲苯作为小鼠耳廓致炎因子,观察了小鼠炎性反应早期的耳廓肿胀情况^[15-17]。

本研究中莲威阿那其颗粒剂的低剂量组的剂量

是由人的常用剂量折算出来的小鼠给药剂量,其抗炎镇痛效果低于中、高剂量组,研究结果显示,莲威阿那其颗粒剂对化学致痛和物理致痛具有良好的镇痛效果,莲威阿那其颗粒剂高、中、低剂量组镇痛抑制率分别为 68.06%、61.4% 和 48.23%,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),并且镇痛作用和剂量之间存在量效依赖性关系,中、高剂量能明显提高小鼠的痛阈值。小鼠耳廓肿胀试验结果表明,莲威阿那其颗粒剂中、高剂量对小鼠耳廓肿胀程度有良好的抑制作用,肿胀抑制率分别为 48.31% 和 23.59%,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),抑制耳廓肿胀效果随剂量的增加而增强,但高剂量组的抑制作用相对阿司匹林组弱,能有效地对抗急性炎性反应引起的肿胀。

莲威阿那其颗粒剂的小鼠膜性实验结果对莲威阿那其颗粒剂的中医治疗理论上的抗炎、镇痛作用提供了试验研究基础,为该药的临床应用提供了药理学依据和指导。中药复方制剂成分多,成分之间的相互作用比较复杂,难以定性和定量,指令控制是一个难题,并且作用部位不一致,通过主要活性成分的药效研究也不能完全说明问题,莲威阿那其颗粒剂的抗炎、镇痛作用机制缺乏完整的依据。因此莲威阿那其颗粒剂的抗炎、镇痛作用和机制还需要进一步的去研究和探讨。

参考文献

[1] Pinto L, Borrelli F, Bombardelli E, et al. Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Effects of Glaucine in Rats and Mice[J]. Pharmacy & Pharmacology Communications, 2011, 4(10): 502-505.

[2] 沙爱龙, 段秀华, 瓦依提, 等. 小新塔花水提物抗炎镇痛作用的试验研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011, 35(22): 104-105.

[3] Valério DA, Cunha TM, Arakawa NS, et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 562(1-2): 155-163.

[4] 钟璐, 纪宏宇, 王树圆, 等. 乳癖消颗粒抗炎镇痛作用实验研究[J]. 中国药师, 2015, 18(1): 149-151.

[5] Mota MA, Landim JS, Targino TS, et al. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic effects of green tea (Camellia sinensis) in mice[J]. Acta Cir Bras, 2015, 30(4): 242-246.

[6] 梁生林, 梁琼, 钟卫华, 等. 荭草提取物抗炎镇痛作用实验研究[J]. 中草药, 2014, 45(21): 3131-3135.

[7] 金小越, 帕提古丽·玉苏普, 王华洋, 等. 莲威阿那其处方药材水提工艺优化[J]. 中国药房, 2015, 26(25): 3551-3553.

[8] 杨浩, 佳娜提·达吾列提, 金小越. 阿那其根醇提取物对小鼠抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 北方药学, 2016, 13(10): 125-125.

[9] 翟科峰, 段红, 邢建国, 等. 天山雪莲提取物纯化前后各部位抗炎镇痛作用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(5): 374-377.

明显改善,这提示针刺曲池穴及足三里穴地阻止了缺血度脑组织的损害,发挥了脑保护效应。

对了探讨针刺曲池穴及足三里穴的作用机制我们检测了3组大鼠脑组织 TGF- β 1 蛋白表达情况,结果显示2组造模组大鼠脑组织 TGF- β 1 表达明显高于假手术组,经过一阶段干预后针刺组大鼠 TGF- β 1 表达有所下降。TGF- β 1 在正常机体中表达较少,当脑组织受到缺血缺氧破坏时 TGF- β 1 表达逐渐增多,脑缺血发生时脑组织逐渐无法耐受缺血而逐渐坏死,从而产生大量的 TGF- β 1 以抵御由此导致的神经功能障碍^[18],此外,TGF- β 1 还可通过提高机体的免疫能力,调节炎性反应效应,减轻脑水肿程度,同时促进微血管的生成而发挥修复脑组织的目的,结果显示针刺曲池穴及足三里穴可提高 TGF- β 1 浓度,增强机体的自我保护能力以抵抗脑缺血带来的致命性打击。

总之,本研究证实针刺曲池穴及足三里穴可明显缩小 MCAO 大鼠的脑梗体积,改善其超微结构,我们认为该方法是通过上调 TGF- β 1 浓度而实现神经保护目的。

参考文献

- [1] Sato C. An experience note in attending Global Aging Initiative[J]. Nihon Ronen Igakkai Zasshi, 2013, 50(5): 669-670.
- [2] 洪震. 脑卒中的流行病学及其危险因素[J]. 中国卒中杂志, 2006, 1(8): 559-563.
- [3] 涂雪松. 缺血性脑卒中的流行病学研究[J]. 中国临床神经科学, 2016, 24(5): 594-599.
- [4] Matsuoka K, Yasuno F, Taguchi A, et al. Delayed atrophy in posterior cingulate cortex and apathy after stroke[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2015, 30(6): 566-572.
- [5] Sihvonen AJ, Ripollés P, Leo V, et al. Neural Basis of Acquired Amusia and Its Recovery after Stroke[J]. J Neurosci, 2016, 36(34): 8872-8881.
- [6] Zavaglia M, Forkert ND, Cheng B, et al. Mapping causal functional contributions derived from the clinical assessment of brain damage af-

ter stroke[J]. Neuroimage Clin, 2015, 9: 83-94.

- [7] 游咏梅, 薛偕华, 陶静, 等. 电针曲池穴及足三里穴对脑缺血再灌注损伤大鼠神经细胞线粒体凋亡途径的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2014, 36(10): 745-750.
- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 242.
- [10] 罗玲, 王静, 任玉兰, 等. 古代针灸治疗中风穴位处方配伍规律研究[J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33(4): 1-4.
- [11] Hendriks WT, Eggers R, Ruitenberg MJ, et al. Profound differences in spontaneous long-term functional recovery after defined spinal tract lesions in the rat[J]. J Neurotrauma, 2006, 23(1): 18-35.
- [12] Salazar DL, Uchida N, Hamers FP, et al. Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in an early chronic spinal cord injury NOD-scid mouse model[J]. PLoS One, 2010, 5(8): e12272.
- [13] Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, et al. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries[J]. J Neurotrauma, 2001, 18(2): 187-201.
- [14] Vrinten DH, Hamers FF. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing[J]. Pain, 2003, 102(1-2): 203-209.
- [15] Gabriel AF, Marcus MA, Honig WM, et al. The CatWalk method: a detailed analysis of behavioral changes after acute inflammatory pain in the rat[J]. J Neurosci Methods, 2007, 163(1): 9-16.
- [16] Bozkurt A, Scheffel J, Brook GA, et al. Aspects of static and dynamic motor function in peripheral nerve regeneration: SSI and CatWalk gait analysis[J]. Behav Brain Res, 2011, 219(1): 55-62.
- [17] Hoffmann MH, Hopf R, Niederreiter B, et al. Gait changes precede overt arthritis and strongly correlate with symptoms and histopathological events in pristane-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(2): R41.
- [18] 陶海泉, 王振宇, 杨立庄, 等. 高压氧治疗对高血压性脑出血患者血清神经元特异性烯醇化酶、转化生长因子 β 1、血管内皮功能及免疫功能的影响[J]. 国际免疫学杂志, 2017, 40(4): 391-395.

(2017-11-17 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 1207 页)

- [10] 陈虎, 蒲俊松, 向仲怀, 等. 药桑葚总黄酮的提取工艺及其抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(12): 7-12.
- [11] 金小越, 王智颖, 郭世民. 维药阿那其根醇提物及原粉胶囊的急性毒性试验[J]. 中国药物经济学, 2013, 13(S3): 31-32.
- [12] 何平, 邹佳峻, 费士杰. 连钱草水提物抗炎镇痛实验研究[J]. 云南中医中药杂志, 2014, 35(2): 63-64.
- [13] 韦健全, 罗莹, 黄健, 等. 槲藤的镇痛抗炎及急性毒性的实验研究[J]. 华西药理学杂志, 2012, 27(4): 461-463.
- [14] 曹婉鑫, 唐瑶, 陈洋. 曲克芦丁药理作用的研究进展[J]. 中国食

物与营养, 2015, 21(9): 73-75.

- [15] Wei JL, Fu W, Ding YJ, et al. Progranulin derivative Atsttrin protects against early osteoarthritis in mouse and rat models[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 280.
- [16] Ahmad NS, Waheed A, Farman M, et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of Pistacia integerrima extracts in mice[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129(2): 250-3.
- [17] 龚新荣, 何华琼, 李红月, 等. 不同产地黄芩抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中国医药指南, 2013, 11(12): 82-83.

(2018-01-12 收稿 责任编辑: 王明)