

痹复康抗炎和镇痛作用的实验研究

王玉香, 刘青云, 彭代银
(安徽中医学院, 合肥 230038)

摘要: 痹复康能显著减少角叉菜胶诱导的大鼠气囊炎症的渗出液量、白细胞数和蛋白质渗出量, 并能降低渗出液中的 NO 和 PGE₂ 的含量, 显著抑制 His 引起的小鼠毛细血管通透性增加。对热板、甲醛所致疼痛有显著的镇痛作用。

关键词: 痹复康; 抗炎; 镇痛

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)05-0044-03

痹复康系中医治疗类风湿性和风湿性关节炎的经验处方, 由五加皮(*Acanthopanax gracilistylus* W. W. Smith)、当归(*Angelica Sinensis* (Oliv) Diels)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisher)等六味中药组成, 具有益气活血, 除湿通络, 抗炎镇痛等功效, 为验证其功效探讨本品临床应用依据, 本实验初步观察其对实验性炎症和疼痛模型的影响。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 体重 18~22g, 由本院动物房提供(皖实动准第 01 号)。SD 大鼠 180~220g, 由安徽医学研究所实验动物中心提供(皖实动准第 03 号)。

1.2 药品 痹复康, 由本实验室提取, 配制成 0.7, 1.4, 2.8g 生药·kg⁻¹; 雷公藤浸膏片, 上海中药制药二厂产品; 角叉菜胶, 沈阳药科大学中药药理室提供; 牛血清白蛋白(BSA), 实生细胞生物技术有限公司提供; 组胺(His), 上海丽珠东风生物技术有限公司产品; 依文思兰, Fluka 进口分装, 上海化学试剂采购供应站提供; 丙酮, 上海光华化学试剂厂产品; 无水甲醇, 华东试剂工业公司提供; NO 试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器与设备 XS-200 型生物显微镜, 南京江淮光电(集团)有限公司; 80-2 型离心沉淀器, 江苏大地自动化仪器厂产品; 721 分光光度计, 上海分析仪器厂产品; 7520-G 紫外分光光度计, 上海分析仪器厂产品; UV-250 分光光度计, 日本岛津公司产品。

2 方法与结果

2.1 对角叉菜胶致大鼠气囊炎症的影响^[1,2] 取 48 只雄性大鼠随机分成 6 组, 生理盐水(NS)对照组, 模型对照组, 雷公藤浸膏片对照组(0.87g·kg⁻¹), 痹复

康三个剂量组(10.5, 21.0, 42.0g 生药·kg⁻¹)。各组大鼠于背部肩胛区 s. c20ml 空气形成气囊, d₃ 补充注射 10ml, 以防囊腔闭合, d₆ 于囊内注入 0.25% 角叉菜胶 2ml。在造模 0d 开始以北 15ml·kg⁻¹ 体重 ig 给药, 连续给药 7d, 末次给药后 1h 致炎, 致炎 6h 后, 腹腔注射戊巴比妥钠 40mg·kg⁻¹ 进行麻醉, 然后以 NS4ml 灌洗气囊, 收集灌洗液, 并测定下述指标。

2.1.1 渗出液量测定 收集灌洗液于 10ml 刻度试管中, 准确计量, 渗液量 = 灌洗液量 - 4ml。结果见表 1。

2.1.2 白细胞数的测定^[3] 用可调移液器吸取 0.1ml 灌洗液, 加 2ml 白细胞稀释液, 于生物显微镜下计数。结果见表 1。

2.1.3 渗出液中蛋白质含量测定^[4] 蛋白质标准曲线的制备 用蒸馏水将 BSA 配成系列浓度(0.00, 0.125, 0.250, 0.500, 1.00mg·ml⁻¹), 按 lowry 法^[4], 在 650nm 处测吸光度(A)值, 以 BSA 浓度为纵坐标, 吸光度(A)为横坐标, 得回归直线方程: $Y = -0.0535 + 0.6304x$, $r = 0.9901$ 。

渗出液蛋白质含量的测量 将收集到的灌洗液离心, 取上清液 0.5ml, 按上述方法测吸光度值。根据回归曲线得出蛋白质浓度。结果见表 1。

2.1.4 渗出液中一氧化氮(NO)含量的测定 按测定试剂盒说明书进行。NO 的氧化代谢产物有 NO₃⁻、NO₂⁻ 采用硝酸还原酶法, 将 NO₃⁻ 还原为 NO₂⁻, 通过测定 NO₂⁻ 的含量, 反应渗出液中 NO 水平。结果见表 1。

表1 痹复康对大鼠气囊性炎症影响($\bar{x} \pm s$; $n=8$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	渗出液量 (ml)	白细胞总数 $\times 10^7$ (个)	蛋白质总量 (mg)	PGE ₂ 含量 (A)	NO 含量 (μmol)
NS		0.18 $\pm$ 0.17	0.45 $\pm$ 0.20	1.08 $\pm$ 0.39	0.273 $\pm$ 0.135	6.90 $\pm$ 5.63 ^{* *}
模型对照组		1.06 $\pm$ 0.30 ^{△△}	3.92 $\pm$ 0.55 ^{△△}	1.99 $\pm$ 0.16 ^{△△}	0.775 $\pm$ 0.126 ^{△△}	34.24 $\pm$ 6.17 ^{△△}
痹复康	10.50	0.33 $\pm$ 0.28 ^{* *}	2.92 $\pm$ 1.32	1.96 $\pm$ 0.10	0.509 $\pm$ 0.182 [*]	21.12 $\pm$ 6.03 [*]
	21.00	0.30 $\pm$ 0.29 ^{* *}	3.61 $\pm$ 1.15	1.88 $\pm$ 0.28	0.634 $\pm$ 0.307	28.14 $\pm$ 4.03
	42.00	0.34 $\pm$ 0.21 ^{* *}	2.73 $\pm$ 0.53 [*]	1.38 $\pm$ 0.36 [*]	0.629 $\pm$ 0.22	25.29 $\pm$ 7.84 [*]
雷公藤浸膏片	0.87	0.40 $\pm$ 0.30 ^{* *}	2.55 $\pm$ 0.85 [*]	1.72 $\pm$ 0.15 [*]	0.673 $\pm$ 0.126	29.56 $\pm$ 10.60

注:与NS组比较[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较^{*} $P < 0.05$,^{* *} $P < 0.01$ (下同)

2.1.5 渗出液中前列腺素 E₂ (PGE₂) 的含量测定

将收集到的灌洗液离心(2500r·min⁻¹, 10min), 取上清液 0.5ml, 加入 0.5mol·L⁻¹ KOH-甲醇液 2ml, 在 50℃水浴中, 异构化 20min, 然后加 5ml 甲醇进行稀释。在 7520-G 型分光光度计 278nm 紫外光处测 A 值, NS 为空白对照, 结果见表 1。

表 1 显示, NS 对照组与模型组比较, 上述各项指标均有非常显著的差异, 说明模型成功。痹复康可显著减少气囊炎症渗出液量, 白细胞数和渗出液中蛋白质含量, 并能明显减少渗出液中的 PGE₂ 和 NO 的含量, 表明痹复康有抗炎作用。

2.2 对小鼠皮肤毛细血管通透性的影响^[5]

2.2.1 依文思兰标准曲线的制备 将依文思兰配成 5 个系列浓度 (0.00, 0.78125, 1.560, 6.250 $\mu g \cdot ml^{-1}$), 在 721 分光光度计 620nm 处测细光度(A)值, 以吸光度(A)值为横坐标, 浓度为纵坐标, 得回归直线方程: $Y = 0.0064 + 6.4411x$, $r = 0.99998$ 。

2.2.2 选用雄性小鼠 50 只, 随机分成 5 组, NS 对照组, 雷公藤浸膏片对照组(0.87g·kg⁻¹) 和痹复康三个剂量组 (10.5, 21.0, 42.0g·kg⁻¹), i. g 给药 7d, 末次给药 1h 后每只鼠尾静脉注射 0.5% 依文思兰 0.1ml·10g, 立即腹部皮内注入 20 μl 组胺(给磷酸缓冲盐水 PH7.4 配成 0.1% 溶液), 20min 后脱颈椎处死, 剥皮测着色皮斑面积(以长径 $\times$ 短径 cm²)表示。将蓝染皮肤剪碎, 放入盛有体积比为 7:3 丙酮生理盐水溶液 4ml 中, 浸泡 24h, 离心(2500r·min⁻¹, 10min), 取上清液, 与 620nm 处测吸收度(A)值, 根据标准曲线得出染料渗出量, 结果 $\mu g \cdot ml^{-1}$ 表示。结果见表 2。

表 2 显示, 痹复康三个剂量组 (10.5, 21.0, 42.0g·kg⁻¹) 可明显抑制 His 所致的小鼠皮肤毛细血管通透性增加, 使皮肤蓝染面积缩小, 染料渗出量减少。表明: 痹复康对 His 增加毛细血管通透性有拮抗作用。

表2 痹复康对小鼠皮肤毛细血管通透性的影响($\bar{x} \pm s$; $n=10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	蓝染面积 (cm ²)	依文思兰浓度 ($\mu g \cdot ml^{-1}$)
NS		6.88 $\pm$ 2.27	1.18 $\pm$ 0.56
痹复康	10.05	2.89 $\pm$ 1.36 ^{* *}	0.46 $\pm$ 0.11 ^{* *}
	21.00	3.05 $\pm$ 1.12 ^{* *}	0.39 $\pm$ 0.24 ^{* *}
	42.00	2.09 $\pm$ 1.03 ^{* *}	0.30 $\pm$ 0.10 ^{* *}
雷公藤浸膏片	0.87	3.51 $\pm$ 1.29 ^{* *}	0.64 $\pm$ 0.36 [*]

2.3 对小鼠福尔马林致痛的影响^[1,6] 取 50 只雄性大鼠随机分成 5 组, 分组及给药同前。连续 i. g 给药 7d, 于末次给药后立即于小鼠左足跖皮下注射 20 μl 1% 甲醛, 观察 5~10min (第一时相) 和 20~30min (第二时相) 的行为反应。用改良的 Dubuission 加权积分法对小鼠的痛反应, 做如下评分: 行走自如计 0 分; 行, 不动时足撑地计 1 分; 抬足计 2 分; 舔足, 咬足或抖足计 3 分。分别记录两个时相内各累计分并计算加权值: $(0t_1 + 1t_2 + 2t_3 + 3t_4)/(t_1 + t_2 + t_3 + t_4)$ 。结果见表 3。

表3 痹复康对小鼠福尔马林致痛的影响($\bar{x} \pm s$; $n=10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	分数		疼痛抑制率(%)	
		第一时相	第二时相	第一时相	第二时相
NS		5.48 $\pm$ 3.68	4.87 $\pm$ 2.27		
痹复康	10.50	1.72 $\pm$ 2.88 [*]	0.88 $\pm$ 0.72 ^{* *}	68.8	79.0
	21.00	2.01 $\pm$ 2.02 [*]	1.59 $\pm$ 1.55 [*]	63.3	61.7
	42.00	0.96 $\pm$ 1.24 ^{* *}	0.58 $\pm$ 0.91 ^{* *}	82.4	85.7
雷公藤浸膏片	0.87	2.11 $\pm$ 1.39 [*]	2.43 $\pm$ 1.31 [*]	61.8	41.1

表 3 结果表明, 痹复康三个剂量组均可降低第一时相和第二时相的疼痛的痛反应评分, 与对照组比较差异显著, 说明痹复康对甲醛致痛有明显抑制作用。

2.4 对小鼠热板致痛的影响^[7] 按热板法, 将雌性小鼠置于 55 $\pm$ 0.5℃恒温水浴 1000ml 烧杯内, 以小鼠舔后足为指标, 筛选痛阈平均值大于 5S 小于 30S

的小鼠 50 只, 分组及给药同前, 连续 i. g 给药 7d, 末次给药后 15min, 30min, 60min, 90min, 120min, 依次测

量各小鼠的痛阈值, 结果表 4。

表 4 痹复康对热板法致痛的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 8$)

组别	剂量	给药前痛阈(s)	给药后痛阈(s)				
			15min	30min	60min	90min	120min
NS		23.2±4.3	23.4±7.6	24.60±10.7	31.0±9.4	34.0±8.8	35.5±14.7
痹复康	10.05	22.4±4.0	31.4±9.7 ^{△△}	38.9±16.6 ^{△△△}	46.5±15.4 ^{# # △△}	41.5±17.1 ^{# #}	46.7±15.3 ^{§ §}
	21.00	21.4±3.8	35.4±11.1 ^{# # △△}	42.3±13.3 ^{# # △△}	39.5±12.1 ^{# #}	41.0±14.3 ^{# #}	37.2±13.9 ^{# #}
	42.00	20.7±5.6	41.0±13.6 ^{# # △△}	38.7±11.9 ^{# # △△}	39.2±15.1 ^{# # △}	38.4±17.2 ^{# #}	42.9±17.9 ^{# #}
雷公藤浸膏片	0.87	21.9±4.9	30.5±14.0	31.4±11.7 [#]	44.2±13.4 ^{# # △△}	44.5±14.3 ^{# #}	51.5±8.2 ^{△△}

注: 自身前后对照: [#] $P < 0.05$, ^{# #} $P < 0.01$

表 4 结果表明, 与 NS 对照组比较, 痹复康三个剂量组对小鼠的疼痛反应有很好的抑制作用, 且以大剂量为佳, 自身对照, 各个时段痛阈值均有显著提高, 雷公藤对照组对小鼠的前两个时段的痛阈值影响较小, 在后三个时段可显著提高小鼠痛阈。

3 讨论

大鼠气囊性炎症模型通过对大鼠背部皮下注射空气造成皮下组织的分离。形成的囊壁类似滑膜结构, 其气囊壁的组织学与生化改变与类风湿性关节炎相似^[1]。利用此模型可定性定量地研究药物对炎性渗出, 白细胞游走, 炎症介质的生成以及多种与炎症有关的生化指标的影响。本文研究表明, 痹复康可显著减少角叉菜胶诱导的气囊炎症的渗出液量、白细胞数和蛋白质渗出量, 说明本品具有较好的抗炎作用。痹复康三种剂量(10.5, 21.0, 42.0g·kg⁻¹)对 His 引起的小鼠皮肤毛细血管通透性增加有明显的抑制作用, 提示其减少炎性渗出可能与抑制 His 的作用有关。

NO 是一种不稳定的气态自由基, 具有多种生理功能, 同时也介导局部炎症反应组织损伤, 类风湿性关节炎患者及动物实验性关节炎体内 NO 代谢产物 NO₂⁻/NO₃⁻ 浓度升高, 痹复康可明显减少 NO 的生成, 提示其对 RA 的治疗可能具有一定的意义。

PGE₂ 既是炎症介质, 又是免疫调节物, 现已证

实, 其在风湿性及类风湿性关节炎患者体内的含量均明显升高, PGE₂ 参与多种生理病理过程, 如: 发热, 炎症, 疼痛及凝血等, 其中致热和致痛作用最强。痹复康能够提高热板法小鼠的痛阈值和抑制福尔马林致小鼠两个时相的疼痛反应, 这可能与减少 PGE₂ 生成有关。

参考文献:

[1] 杨沁, 陈敏珠, 王斌, 等. 黄芪总提取物的抗炎作用及其机制[J]. 中国药理学通讯, 1998, 15(4): 38.

[2] 何凤莹, 唐汝曼, 姚丹凡, 等. 粉防己碱对急性炎症血管通透性和嗜中性白细胞功能的影响[J]. 1989, 10(3): 249-251.

[3] 李洛生. 临床检验基础[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990. 76-80.

[4] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1990. 48-51.

[5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 370-371, 362-363.

[6] Dubuission D, Rennis SC The formalin test: A Quantitation study of the anllgesid effects of morphine, meperidine and brain stem stillatorl in rats and cats[J]. Pain 1977, 4: 161-168.

[7] 项其正, 彭代银, 刘青云. 风湿骨痛胶囊的药效和毒性研究[J]. 中成药, 1996, 19(3): 32-35.