芍药甘草汤镇痛作用及机理的实验研究

凤良元, 鄢顺琴, 吴愫清, 张陆军 (安徽中医学院, 合肥 230038)

摘要: 应用福尔马林致痛法研究芍药甘草汤镇痛作用, 并测定冰醋酸致痛小鼠血清和脊髓中一氧化氮(NO, 催化光度法)、前列腺素 E_2(PGE_2)含量及超氧化物歧化酶(SOD, 紫外分光光度法)的活性, 以分析其镇痛作用机理。结果显示: (1) 福尔马林法致痛实验中, Ⅰ相和Ⅱ相反应结果, 揭示芍药甘草汤既能抑制外周神经末梢引起的疼痛又能抑制继发的炎性反应所致的疼痛; (2) 芍药甘草汤能明显降低造模小鼠血清和脊髓中 NO、PGE_2 含量, 增强 SOD 活力。结论: (1) 芍药甘草汤对中枢和外周神经末梢均有镇痛作用; (2) 芍药甘草汤镇痛作用与 NO、PGE_2 和 SOD 均有关。

关键词: 芍药甘草汤; 镇痛作用; 一氧化氮; 前列腺素; 超氧化物歧化酶

中图分类号: R285.5 **文献标识码**: B **文章编号**: 1005-9903(2002)01-0023-03

Experimental Study on the Analgesia Mechanism of Paeornia and Glycyrrhiza Dicoction

FENG Liang-yuan, YAN Shun-qin, WU Shu-qin, ZHANG Lu-jun

(*Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei* 230038, *China*)

Abstract: The analgesia action was investigated in the pain model caused by formalin, and the content of NO, PGE_2 and SOD of serum and spinal cord of mice with pain model caused by glacialaceticacid were also detected to study analgesia mechanism of Paeonia and Glycyrrhiza Decoction(PGD). The results indicate: (1) In Formalin pain experiment, PGD could restrain peripheral nerve twig action, and inhibit subesequent inflammatory reaction to ease pain in Ⅰ and Ⅱ phase reaction; (2) PGD could decrease the content of NO and PGE_2 of serum and spinal cord of the mice and distinctly enhance the activity of SOD.

Key words: Paeonia and Glycyrrhizae Decoction; Analgesia effect; Nitric Monoxide; Prostaglandin E; Superoxide Dismutase

芍药甘草汤为常用的经典名方, 源于医圣张仲景的《伤寒论》, 主治筋脉挛急、脘腹疼痛等症[1]。现代临床常用其治疗腰腿痛、胃烷痛以及伴有腰椎病变的坐骨神经痛、面肌痉挛、三叉神经痛等多种疼痛症。本实验采用福尔马林致痛模型研究芍药甘草汤

收稿日期: 2001-08-07

基金项目: 安徽省教育厅资助课题 No: 98JL088

的镇痛作用及其机理,着重探讨冰醋酸致痛小鼠灌服芍药甘草汤后,血清和脊髓中一氧化氮(NO)、前列腺素 E_2(PGE_2)、超氧化物歧化酶(SOD)的变化。初步揭示了芍药甘草汤镇痛的部分机制,为芍药甘草汤的古方今用提供了一些科学理论依据。现将实验报告如下。

1 实验材料

1.1 药品 (1)白芍(*Radix Paeonia* Alba)经鉴定为毛茛科植物芍药(*Paeonia Lactiflora* Pall.)的干燥根,产地:安徽亳州。(2)甘草(*Radix Glycyrrhizae*)经鉴定为豆科植物(*Glycyrrhiza Uralensis* Fisch.)的干燥根及根茎,产地:新疆。(3)芍药甘草汤的制备:芍药酒炒、甘草蜜炙,按 1∶1 比例,用 75% 乙醇抽提(50g 药材用 70% 乙醇,分 3 次抽提,每次 300ml,前 2 次各 0.5h,第 3 次 1h,回收乙醇,浓缩成 1ml 含生药 4g 备用。

1.2 试剂 冰醋酸:上海试剂四厂昆山分厂,批号 931018;阿斯匹林:西安西达公司秦虹制药厂,批号 990304;甲醛:上海太平洋化工集团公司溶剂厂,批号 960212;阿拉伯树胶:上海化学试剂采购供应站经销(配成 $20g \cdot L^{-1}$ 备用);亚硝酸钠:上海化学试剂采购供应站经销,批号 850902;溴酸钾:上海试剂二厂;孔雀石绿(生物染色素 BS)上海标本模型厂;磷酸:芜湖化工总厂,批号 99403016;抗坏血酸:上海化学试剂采购供应站分装厂,批号 850401;肾上腺素:Fluka 02250;氢氧化钠:上海试剂四厂;酒石酸钾钠:安徽省萧县葡萄酒厂;L—酪氨酸(分析纯):中国科学院生物化学研究所。

1.3 仪器 PHSJ-4A 型实验室 PH 计:上海精密科学仪器有限公司雷磁实验仪器厂;SHA-C 水浴恒温振荡器:金坛市恒丰仪器厂;800 型沉淀器:上海手术器械厂;MICROCENTRIFUGE:Denver Instrument Company;751G 型紫外分光光度计:上海分析仪器厂。

1.4 实验动物 昆明种小白鼠,Wistar 大鼠,由安徽医科大学实验动物室提供。

2 实验方法

2.1 芍药甘草汤对福尔马林致大鼠疼痛的影响[2]

选取 200~ 250g 健康 Wistar 大白鼠,雌雄不拘,均分为对照组、阿斯匹林组,芍药甘草汤大、中、小剂量组,各组给药剂量见表 1。各组给药前于左后肢足跖部皮下注射 50ul2.5% 甲醛溶液并计时,然后立即置于 Φ40cm 的玻璃容器中,分别记录大白鼠注射甲醛后 1~ 5min(Ⅰ相)和 15~ 35min(Ⅱ相)内痛反应的累积时间。进行评分,其评分方法:第一部分为抬起注射甲醛足时间,第二部分为舔、咬、抖动注射甲醛足时间,按下式分别得出各组累积分值。累积分值计算方法:累积分值=(第一部分时间 × 1+ 第二部分时间 × 2)/300。

一周后,各组大白鼠如表 1 所述,分别连续灌胃给药 3d,于第 4d 给药 1h 后,右后肢足跖部皮下注射 50ul2.5% 甲醛溶液,同前法计算累积分值,按下式得出给药后镇痛评分值:(给药后累计分值/给药前累计分值) × 100%,统计实验结果,进行 q 检验,比较Ⅰ相和Ⅱ相各组之间显著性差异。

2.2 冰醋酸致痛小鼠血清,脊髓中 NO[2]、PGE_2[4] 和 SOD[5] 的测定 选取 18~ 22g 健康昆明种小白鼠,分为正常对照组、模型组、阳性组和大、中、小剂量组,各组给药剂量见表 2,连续 ig 给药 3d,于第 4d 给药 1h,对照组腹腔注射生理盐水 $10ml \cdot kg^{-1}$,其它各组腹腔注射 0.6% 冰醋酸 $10ml \cdot kg^{-1}$,5min 后眼球后静脉丛采血[6],分离血清,测 NO 浓度(催化光度法)、SOD 活性和 PGE_2 含量(紫外分光光度法)。采血后脱颈椎处死,从椎管取出脊髓,称取湿重,按 $20mg \cdot 1ml^{-1}$ 加入生理盐水,匀浆,匀浆液离心(10000r·min^{-1},10min),取上清液按上述方法分别测定各项指标。统计方法同前。

3 实验结果

3.1 对福尔马林致大鼠疼痛的影响 由表 1 显示,Ⅰ相镇痛评分值,芍药甘草汤大剂量组较模型组明显减少($P < 0.01$);Ⅱ相镇痛评分值,阳性组、芍药甘草汤大、中剂量组均较模型组明显减少($P < 0.01$)。

表 1 芍药甘草汤对福尔马林致大鼠Ⅰ相和Ⅱ相疼痛的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	动物数 (只)	Ⅰ相 (镇痛评分值)	Ⅱ相 (镇痛评分值)
模型组	$10ml \cdot kg^{-1}$	10	94.79 ±9.44	98.30 ±1.82
阳性组 (ASP)	0.20	11	87.83 ±16.30	75.93 ±11.70$^{\Delta\Delta}$
芍药甘草汤大剂量组	39.37	10	82.91 ±5.29$^{\Delta\Delta}$	52.80 ±13.36$^{\blacktriangle\blacktriangle\Delta\Delta}$
芍药甘草汤中剂量组	19.29	11	93.63 ±8.90	71.17 ±16.51$^{\Delta\Delta}$
芍药甘草汤小剂量组	9.45	10	90.96 ±7.02	91.68 ±13.39

注:与模型组比较 $^{\Delta}P < 0.05$;$^{\Delta\Delta}P < 0.01$;与阳性组比较 $^{\blacktriangle}P < 0.05$;$^{\blacktriangle\blacktriangle}P < 0.01$。(下同)

3.2 芍药甘草汤对冰醋酸致痛小鼠血清、脊髓中 NO、PGE_2 和 SOD 的影响 表 2 显示,在血清和脊髓中,模型组和各给药组 NO 和 PGE_2 浓度较正常对照组明显增加,有显著性差异($P < 0.01$)模型组和各给

药组 SOD 较正常对照组明显减少, 但仅芍药甘草汤大剂量组较模型明显增加($P < 0.01$) 。

4 讨论

目前认为福尔马林致痛实验中, Ⅰ相是福尔马林直接刺激外周神经末梢引起的, Ⅱ相则可能是福尔马林注射后继发的炎性反应所致[7] 。实验结果显示, 在Ⅰ相, 芍药甘草汤镇痛评分值只有大剂量组较对照组明显减小, 说明服用芍药甘草汤大剂量时可抑制福尔马林直接刺激外周神经末梢引起的疼痛; 在Ⅱ相, 大、中剂量组和阿斯匹林组镇痛评分值较对照组明显减小, 有明显镇痛作用, Ⅰ相和Ⅱ相结果说明: 较大剂量服用芍药甘草汤, 既能抑制外周神经末梢作用而减轻疼痛, 又能抑制继发的炎性反应所致疼痛 。

目前认为疼痛与 PGE_2、NO 和 SOD 有关。已知前列腺素 PG 在疼痛的产生与传递中起着重要作用, 现代研究已经证实, 组织受损伤或炎症时, 局部可以产生释放 PG、白三烯、组胺等致炎致痛因子, 其中 PG 是很强的致炎致痛因子[8], 本研究显示, 芍药甘草汤既可显著镇痛又可明显降低动物血清和脊髓中 PGE_2 浓度, 提示抑制 PG 合成是芍药甘草汤镇痛机制之一。NO 是近年来发现的一种新的第二信使神经递质, 是细胞间信息传递的重要调节因子。NO 作为信使分子的最大特点是, 它不需要任何中介机制而快速地扩散通过生物膜, 将一个细胞产生的信息传递到其它周围的细胞中去。大量证据也表明 NO 在外周及中枢的不同水平的痛觉调制中起重要作用[7] 。本研究工作表明芍药甘草汤在产生镇痛作用的同时降低血液和脊髓中 NO 含量, NO 机制可能参与芍药甘草汤的镇痛作用 。

表 2　芍药甘草汤对冰醋酸致痛小鼠血清和脊髓中 NO、PGE_2 和 SOD 的影响($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	NO($nmol \cdot L^{-1}$)		PGE_2(OD 值)		SOD($U \cdot L^{-1}$)	
		血清	脊髓	血清	脊髓	血清	脊髓
对照组	40mlkg	0.59 ±0.13	1.25 ±0.26	0.07 ±0.02	0.08 ±0.01$^{\triangle\triangle}$	52.33 ±12.08	48.82 ±16.13
模型组	/	2.39 ±0.37**	2.81 ±0.49**	0.36 ±0.04**	0.35 ±0.06**	27.30 ±5.18**	26.43 ±3.19**
阳性组	0.04	1.12 ±0.19$^{** \triangle\triangle}$	1.74 ±0.23$^{** \triangle\triangle}$	0.25 ±0.04$^{** \triangle\triangle}$	0.22 ±0.07$^{** \triangle\triangle}$	33.15 ±7.17**	33.19 ±5.42**
芍药甘草汤大剂量组	72.38	0.61 ±0.15$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle **}$	1.40 ±0.21$^{\triangle\triangle\blacktriangle **}$	0.10 ±0.03$^{\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle **}$	0.12 ±0.04$^{* \blacktriangle\blacktriangle\triangle\triangle}$	41.11 ±7.50$^{* \blacktriangle\triangle\triangle}$	37.61 ±1.99$^{** \triangle\triangle}$
芍药甘草汤中剂量组	36.19	1.44 ±0.25$^{** \triangle\triangle}$	1.97 ±0.32$^{** \triangle\triangle}$	0.26 ±0.07$^{** \triangle\triangle}$	0.25 ±0.05$^{** \triangle\triangle}$	32.54 ±5.80$^{** \star}$	33.24 ±9.53**
芍药甘草汤小剂量组	18.10	2.28 ±0.50**	2.56 ±0.41**	0.32 ±0.07**	0.31 ±0.06**	29.45 ±5.42$^{** \star\star}$	28.85 ±5.78$^{** \star}$

注: 与正常对照组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与大剂量组比较$^{\star}P < 0.05$, $^{\star\star}P < 0.01$ 。

氧自由基(OFR) 对疼痛过程亦有重要影响, OFR 在外周和脊髓均有致痛作用, 而自由基清除剂如 SOD、VitE 则可以拮抗此致痛作用。机体自然存在清除自由基的酶系统, 以保护细胞免遭损害。非甾体抗炎药阿斯比林能不可逆地灭活环氧合酶, 而不影响过氧化酶的活性。其中较重要的是 SOD, 其清除自由基的能力与该酶的活性成正比例, 能不断地清除多余的自由基, 保证人体代射平衡[9], 所以 SOD 活性的大小反映了机体对抗自由基的能力。芍药甘草汤能使 SOD 的活力增强, 说明其镇痛作用与抑制 OFR 生成有关。

参考文献:

[1] 白刚. 中药方剂研究与应用大全[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995. 396.

[2] 胡文辉. NOS 抑制剂的镇痛致痛和致瘫作用[J]. 中国药理学通报, 1996, 12(4): 309-312.

[3] 庞战军. 周玫, 陈瑗. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 239.

[4] 陈奇主编. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 370.

[5] 葛春华. 超氧化物歧化酶活性的肾上腺素自氧化紫外测定法[M]. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(3): 228-231.

[6] 黄国平, 马传庚, 徐叔云. 维拉帕米、硝苯碇和粉防己碱加强吲哚美辛的镇痛作用[J]. 中国药理学通报, 1993, 9(1): 36-39.

[7] 田金华, 王晓民, 韩济生. 一氧化氮与痛觉调制[J]. 生理科学进展, 1996, 27(2): 161-164.

[8] 吴宇群. 一氧化氮与前列腺素[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(5): 385-388.

[9] 王洁, 宋必卫, 马传庚, 等. 氧自由基与疼痛[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(2): 107-109.