

柴黄复方颗粒抗炎镇痛作用及机制研究

魏安祥^{1,2}, 杨士友², 阚红卫^{2*}, 徐鹏夫², 于东安^{1,2}, 靳 康^{1,2}

(1. 安徽大学生命科学学院, 安徽 合肥 230039;

2. 安徽省药物研究所, 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230022)

[摘要] 目的: 观察柴黄复方颗粒抗炎镇痛作用及其作用机制。方法: 采用角叉菜胶致大鼠足肿胀法、醋酸致小鼠毛细血管通透性增加法、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)致小鼠腹腔白细胞数增多法评价药物的抗炎作用及其机制; 采用热板致痛法和醋酸致痛法评价药物的镇痛作用; 用 Elisa 法测定炎症组织中白介素 1(IL-1)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量, 放免法检测前列腺素 E₂(PGE₂)的含量, 紫外分光光度法测定丙二醛(MDA)含量。结果: 柴黄复方颗粒能抑制大鼠足肿胀程度和 CMC-Na 所致小鼠腹腔白细胞游走, 降低肿胀足中 IL-1、TNF- α 、PGE₂ 和 MDA 的含量及小鼠毛细血管通透性, 对抗热板和醋酸刺激引起的小鼠疼痛反应。结论: 柴黄复方颗粒具有一定的抗炎和镇痛作用, 其作用机制与降低炎症组织中的 IL-1、TNF- α 、PGE₂ 和 MDA 的含量有关。

[关键词] 柴黄复方颗粒; 抗炎; 镇痛; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0081-04

Anti-inflammatory and Analgesic Effects of Chaihuang Compound Granule and Its Mechanism

WEI An-xiang^{1,2}, YANG Shi-you², KAN Hong-wei^{2*}, XU Pengfu², YU Dong-an^{1,2}, JIN Kang^{1,2}

(1. School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China;

2. Anhui Institute of Materia Medica, Hefei 230022, China)

[Abstract] Objective: To observe anti-inflammatory and analgesic effects of Chaihuang Compound Granule

[收稿日期] 2008-12-15

[通讯作者] * 阚红卫, Tel: (0551) 3669825; E-mail: khw@ada.gov.cn

(CHCG) and its mechanism. **Methods:** Carrageenan-induced rat paw edema model in rat, acetic acid-induced capillary permeability increase in mouse and sodium carboxy-methylcellulose (CMC-Na)-induced leukocytes increase in mouse were used to study the anti-inflammatory effects. The analgesic effects of CHCG were tested by counting body twisting induced by acetic acid and measuring the latent period of licking hind foot with the hot plate method in mice. The content of IL-1, TNF- α , PGE₂ and MDA were measured by ELISA, radioimmunity method and ultraviolet spectrophotometry respectively. **Results:** CHCG significantly suppressed the carrageenan-induced rat paw edema and leukocyte migration caused by CMC-Na; The content of IL-1, TNF- α , PGE₂ and MDA in the inflammatory tissue extracts was significantly decreased, the capillary permeability of mice was also decreased. CHCG also improved the pain threshold of hot-plate test in mice and those injected with acetic acid. **Conclusion:** The anti-inflammatory and analgesic effects of CHCG are obvious and it might be associated with the decrease of IL-1, TNF- α , PGE₂ and MDA.

[**Key words**] Chaihuang Compound Granule; anti-inflammatory; analgesia; cytokines

柴黄复方颗粒(CHCG)来源于民间治疗胆囊炎的有效验方,由柴胡、黄芩、大黄、虎杖、郁金、枳实、川楝子、延胡索、白芍和甘草 10 味药组成,具有疏肝解郁、清热利胆、通腑泻下之功效,能改善胆囊结石、慢性胆囊炎、胆管结石、慢性胆管炎等病的胁痛、胆胀。其提取工艺的实验研究工作目前已经完成^[1],本文拟观察其抗炎镇痛作用及其机制,为临床的进一步应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 柴黄复方颗粒,由安徽省药物研究所提供,批号:070506,处方组成药材柴胡、黄芩、大黄、虎杖、郁金、枳实、川楝子、延胡索、白芍和甘草均购自安徽省合肥市义和堂中药饮片有限责任公司,并经其鉴定。各味药在方中比例为:2:1.5:1:1.5:1.5:1.5:2:2:1.5:1,大黄、虎杖和延胡索以大黄素含量和出膏率为指标,用乙醇回流法提取;柴胡、郁金和枳实用水蒸汽蒸馏法提取其中的挥发油成分;黄芩、川楝子、白芍和甘草以黄芩苷含量和出膏率为指标,用水煎煮法提取;阿司匹林,南京恒生制药厂生产,批号:070312,各药均用蒸馏水配成相应浓度。大鼠白介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) Elisa 试剂盒,上海森雄科技实业公司产品,批号:0705026;前列腺素 E₂(PGE₂)放射免疫分析试剂盒,苏州大学血液研究所产品,批号:20070210;丙二醛(MDA)试剂盒,南京建成生物工程研究所产品,批号:20070110。

1.2 动物 SPF 级 SD 大鼠,体重(220~250)g,雄性,合格证号 SCXK(沪)2004-0003,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供;SPF 级昆明小鼠,体重(18~22)g,雌雄兼有,合格证号 SCXK(皖)2007-

0001,由安徽省实验动物中心提供。

1.3 主要仪器 MK3 型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;TG-328B 型电光分析天平,上海天平仪器厂;UV265FW 型紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;GC-911 型放射免疫计数器,中国科学技术大学科技实业公司。

2 方法

2.1 抗炎作用

2.1.1 对角叉菜胶致大鼠足肿胀的影响 取体重 220~250 g 雄性大鼠 50 只,按体重随机分成 5 组,分组及给药剂量见表 1,其中 CHCG 剂量均为生药 g·kg⁻¹。各组分别 ig 受试药物或等体积生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。末次给药 30 min 后,于右后足 sc 1% 角叉菜胶生理盐水溶液 0.1 mL,分别在致炎前和致炎后 1, 2, 3, 4 h 测量足爪容积,以致炎前后足爪容积的差值表示肿胀度^[2]。测量后处死动物,截取右后足称重,冰浴条件下剪碎、匀浆,按所购试剂盒的操作步骤测定 IL-1, TNF- α , PGE₂ 和 MDA 含量。

2.1.2 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响^[3] 选取 18~22 g 雄性昆明小鼠 50 只,随机分成 5 组,分组及给药剂量见表 3。各组分别 ig 受试药物或等体积生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。末次给药 30 min 后,尾静脉 iv 0.5% 依文思兰生理盐水溶液 0.2 mL,随后 ip 0.6% 醋酸 0.2 mL,20 min 后处死动物。用生理盐水清洗腹腔 3 次,合并腹腔洗液,加生理盐水至 10 mL,混匀后离心,于 590 nm 处测光密度值。

2.1.3 对 CMC-Na 致小鼠腹腔白细胞游走的影响^[4]

取 18~22 g 雄性昆明小鼠 60 只,随机分成 6 组,分组及给药剂量见表 4。除正常对照组外,其余各组 ig 受试药物,模型组给等体积生理盐水,每日 1

次,连续 7 d。末次给药 30 min 后,除正常对照组外,其余各组小鼠 ip 1% CMC-Na 溶液 0.5 mL,3 h 后颈椎脱臼法处死动物,ip 生理盐水 5 mL,轻揉腹部,抽取腹腔液滴于白细胞计数板上,显微镜下白细胞计数。

2.2 镇痛作用

2.2.1 对醋酸致小鼠扭体反应的影响^[5] 取 18~22 g 昆明小鼠 50 只,雌雄各半,随机分成 5 组,分组及给药剂量同 2.1.2。各组分别 ig 受试药物或等体积生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。末次给药 30 min 后,各小鼠 ip 0.6% 醋酸 0.2 mL,记录注射醋酸后 15~25 min 内小鼠扭体次数。

2.2.2 对热板刺激小鼠疼痛反应的影响^[5] 取 18~22 g 雌性小鼠放于 55℃ 金属热板上,记录每只自投入至出现舔后足时间作为该鼠给药前痛阈值,5~30 s 为合格。取合格小鼠 50 只,随机分成 5 组,分组

及给药剂量同 2.1.2。分别 ig 受试药物或等体积生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。于末次给药后 30,60 min 测各小鼠痛阈值。

2.3 数据统计与分析 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 软件,利用 ANOVA 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 抗炎作用

3.1.1 对角叉菜胶致大鼠足肿胀的影响 与模型组比较,CHCG 小剂量组在致炎后 3 h,大、中剂量组在致炎后 1~4 h 内,大鼠足肿胀均有减轻,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 1。同时,CHCG 各剂量组均可明显降低肿胀足中 IL-1 的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而 TNF- α , PGE₂ 和 MDA 的含量在 CHCG 大、中剂量组中亦有明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 2。

表 1 CHCG 对角叉菜胶致大鼠足肿胀的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	足肿胀度(mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
模型组	—	0.52±0.22	0.79±0.23	1.09±0.19	0.99±0.21
阿司匹林组	0.16	0.37±0.21	0.52±0.16 ¹⁾	0.86±0.15 ¹⁾	0.84±0.27
CHCG 组	3.97	0.44±0.16	0.54±0.24	0.85±0.14 ¹⁾	0.83±0.22
	7.93	0.23±0.18 ²⁾	0.32±0.20 ²⁾	0.70±0.21 ¹⁾	0.62±0.18 ²⁾
	15.87	0.19±0.17 ²⁾	0.31±0.22 ²⁾	0.66±0.23 ¹⁾	0.55±0.16 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (下同)

表 2 CHCG 对大鼠肿胀足中 IL-1, TNF- α , PGE₂ 和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	IL-1 (ng·L ⁻¹)	TNF- α (ng·L ⁻¹)	PGE ₂ (A·g ⁻¹)	MDA (nmol·mgprot ⁻¹)
模型组	—	126.1±24.77	523.2±109.11	9.47±2.66	114.45±38.67
阿司匹林组	0.16	65.5±14.33 ²⁾	413.6±114.05 ¹⁾	6.32±2.14 ¹⁾	32.86±35.72 ²⁾
CHCG 组	3.97	96.6±22.41 ¹⁾	462.7±101.64	9.02±1.31	75.21±31.42
	7.93	77.8±15.31 ²⁾	411.5±69.33 ¹⁾	6.12±2.12 ¹⁾	44.77±33.71 ²⁾
	15.87	61.9±13.76 ²⁾	388.1±76.43 ²⁾	5.35±1.27 ²⁾	32.82±24.43 ²⁾

3.1.2 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响 CHCG 各剂量组与模型组比较能明显降低小鼠腹腔毛细血管通透性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 3。

表 3 CHCG 对小鼠腹腔毛细血管通透性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	小鼠腹腔毛细血管通透性(OD)
模型组	—	0.441±0.186
阿司匹林组	0.22	0.167±0.122 ²⁾
CHCG 组	5.7	0.263±0.169 ¹⁾
	11.3	0.209±0.139 ²⁾
	22.7	0.130±0.105 ²⁾

3.1.3 对 CMC-Na 致小鼠腹腔白细胞游走的影响 CHCG 大、中剂量组与模型组比较能明显抑制 CMC-Na 所致的小鼠腹腔白细胞游走 ($P < 0.05$),结果见表 4。

表 4 CHCG 对小鼠腹腔白细胞游走的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(g·kg ⁻¹)	白细胞数($\times 10^5 \cdot L^{-1}$)
正常对照组	—	97.3±16.1 ¹⁾
模型组	—	154.4±14.3
阿司匹林组	0.22	102.7±23.1 ¹⁾
CHCG 组	5.7	111.4±21.2
	11.3	104.5±13.3 ¹⁾
	22.7	99.1±13.8 ¹⁾

3.2 镇痛作用

3.2.1 对醋酸致小鼠扭体反应的影响 CHCG 各剂量组与模型组比较,能明显减少醋酸所致的小鼠扭体次数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 5。

表 5 CHCG 对醋酸致小鼠扭体反应的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	扭体次数(次)
模型组	—	17.6 ± 5.6
阿司匹林组	0.22	$11.1 \pm 4.3^{(2)}$
CHCG 组	5.7	$11.2 \pm 7.0^{(1)}$
	11.3	$9.6 \pm 5.1^{(2)}$
	22.7	$7.6 \pm 5.9^{(2)}$

3.2.2 对热板刺激小鼠疼痛反应的影响 与正常对照组比较,CHCG 各剂量组在给药后 30, 60 min 能明显升高小鼠痛阈值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表 6。

表 6 CHCG 对热板刺激小鼠疼痛反应的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	给药前痛阈值(s)	给药后不同时间痛阈值(s)	
			30 min	60 min
正常对照组	—	18.7 ± 2.1	19.1 ± 3.5	19.3 ± 3.7
阿司匹林组	0.22	19.2 ± 3.2	$29.3 \pm 2.5^{(2)}$	$27.8 \pm 3.2^{(1)}$
CHCG 组	5.7	19.1 ± 2.4	$26.6 \pm 2.8^{(1)}$	25.6 ± 3.4
	11.3	18.6 ± 3.5	$27.2 \pm 3.1^{(1)}$	$28.7 \pm 2.3^{(1)}$
	22.7	18.9 ± 2.7	$31.8 \pm 3.4^{(2)}$	$32.8 \pm 3.7^{(2)}$

注:与正常对照组比较⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

4 讨论

炎症反应是各种类型胆囊炎共同存在的病理生理过程,在炎症早期,病变引起黏膜水肿、充血及白细胞浸润,随后逐渐波及胆囊壁全层甚至周围组织发生粘连,胆囊腔内含脓性渗出物,并由此可发展成各种并发症,严重时可致胆囊壁层组织缺血、坏死或出血、穿孔^[6]。IL-1 和 TNF- α 是重要的炎症介质,低浓度时主要在炎症的局部起作用,对中性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞有激活、趋化作用,增加中性粒细胞、嗜酸性粒细胞的游走,通过多种途径引起肝胆损伤^[7]。PGE 可与缓激肽等炎症介质起协同作用,加剧炎症反应。当神经受到炎症等刺激时,神经末梢

及其所属区域的前列腺素(PG)释放增多,通过扩张小血管,增强微血管通透性,形成炎性水肿,痛觉过敏,白细胞趋化及发热作用,因此它既是一种炎症介质,也是一种直接致痛的内分泌性物质。MDA 是自由基引发的脂质过氧化反应的一种产物,可以激活环氧化酶(COX),一方面促进花生四烯酸生成 PG,导致细胞代谢紊乱形成炎症,另一方面可影响白三烯代谢形成炎症^[8]。因此对胆囊炎的治疗原则之一就是能够消除炎症反应,延缓病情的发展,减少由于炎症物质所引起的胆囊的疼痛痉挛。

本实验研究发现,CHCG 可明显抑制大鼠的足肿胀,并可有效降低肿胀组织中的 IL-1、TNF- α 、PGE₂ 和 MDA 含量,对 CMC-Na 所致的小鼠腹腔白细胞游走亦具有一定的抑制作用,表明 CHCG 的抗炎作用与降低炎症组织中的炎症因子含量有关。CHCG 中延胡索和川楝子两味中药具有很好的镇痛效果,多种已用于临床治疗胆囊炎的中药复方中都有使用。本实验研究发现 CHCG 可以明显缓解醋酸和热板所致的小鼠疼痛反应,提示 CHCG 具有一定的镇痛作用,但其缓解疼痛的作用是否也与抑制 IL-1 和 TNF- α 等炎症因子的释放有关尚有待于研究。

[参考文献]

- [1] 王章姐,陈师农,张毅,等.利胆消炎颗粒提取工艺的实验研究[J].安徽医药,2008,12(2):113-115.
- [2] 李仪奎.中药药理实验方法学[M].上海:上海科学技术出版社,1991:300.
- [3] 陈奇.中药药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:370-371.
- [4] 徐叔云.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1991:253.
- [5] 徐叔云,芑如濂,陈修.药理实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002:886,882-883.
- [6] 高建平,金若敏,朱培庭,等.养肝利胆颗粒抗炎镇痛解痉作用实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(3):59-61.
- [7] 孙明瑜,谢鸣,张娜.动物实验探明小柴胡汤抗炎机制[J].中国医药报,2005,6(21):1-2.
- [8] 邹堂斌,刘娟.中药抗炎作用及其机制研究进展[J].中国兽医医药杂志,2006,6:24.