

· 药理 ·

乌头汤对大鼠的镇痛作用及初步机制探讨

王丹华^{1,2}, 刘春芳², 谭淑芳², 仲米存², 林娜^{1,2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 研究乌头汤的镇痛作用及相关机制。方法: 健康 SD 大鼠, 随机分为正常组、模型组、乌头汤高、中、低剂量组以及布洛芬组, 除正常组外其余各组建立慢性炎症痛模型, 造模时在 SD 大鼠右踝关节腔部位注入完全弗氏佐剂 (CFA)。乌头汤高、中、低剂量组于造模当天分别给予乌头汤 4, 2, 1 g·kg⁻¹, ig, 布洛芬组 30 mg·kg⁻¹, ig, 每日 1 次, 连续 6 d。用游标卡尺测量大鼠患足踝关节肿胀度, 冷板仪测量患足冷板痛阈值, 爪触觉测试仪测量机械痛阈值, 热测痛仪测量热辐射痛阈值, 酶联免疫法检测血浆中前列腺素 E₂ (PGE₂) 和 5-羟色胺 (5-HT) 的水平, 免疫组织化学检测背根神经节中瞬时感受器电位香草酸受体 1 (TRPV1)、瞬时感受器电位作用受体蛋白 M8 (TRPM8) 的水平。结果: CFA 致炎后, 大鼠踝关节出现明显肿胀, 冷板痛阈值、机械痛阈值和热辐射痛阈值明显降低; 血浆中 PGE₂, 5-HT 含量明显升高; 背根神经节中 TRPV1 的表达量明显升高, TRPM8 的表达量明显降低。与模型组相比, 乌头汤高、中剂量组能降低大鼠关节肿胀度 ($P < 0.05$), 乌头汤各剂量组能升高冷板痛阈值 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)、高、中剂量组能提高机械痛阈值 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 高剂量组对热辐射痛阈值也有一定的增高作用 ($P < 0.05$), 同时, 能降低血浆中的 PGE₂, 5-HT 和背根神经节中的 TRPV1 表达水平, 提高 TRPM8 表达水平。结论: 乌头汤具有镇痛作用, 其机制可能与降低血浆中 PGE₂ 和 5-HT 水平以及调节背根神经节中 TRPV1 和 TRPM8 的表达有关。

[关键词] 乌头汤; 慢性炎症性疼痛; 镇痛; 瞬时感受器电位香草酸受体 1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)10-0109-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014100109

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000086.html>

[网络出版时间] 2014-03-07 10:55

Analgesic Effects and Mechanism of Wutou Decoction in Rats

WANG Dan-hua^{1,2}, LIU Chun-fang², TAN Shu-fang², ZHONG Mi-cun², LIN Na^{1,2*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study the analgesic effects and mechanism of Wutou decoction. **Method:** Healthy SD male rats were randomly divided into normal group, model group, Wutou decoction high-dose group, Wutou decoction middle dose group, Wutou decoction low-dose group and ibuprofen group. SD rats were injected with complete Freund's adjuvant (CFA) into the right ankle joint cavity to induce chronic inflammatory pain in joint. Wutou decoction at the doses of 4, 2, 1 g·kg⁻¹, ibuprofen at the doses of 30 mg·kg⁻¹ were daily ig administrated to rats from day 1 after the CFA injection for 6 days. Joint swelling, cold pain threshold, mechanical pain threshold and thermal radiation pain threshold of the diseased ankle joints were measured. The level of prostaglandin E₂ (PGE₂) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in plasma were detected by enzyme-linked immunosorbant assay, and the levels of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and transient receptor

[收稿日期] 20140212(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173628, 81374068); 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2011CB505300, 2011CB505305)

[第一作者] 王丹华, 硕士研究生, 从事中药药理研究, E-mail: 754295004@qq.com

[通讯作者] * 林娜, 博士, 研究员, 博导, 主要从事中药药性理论与中药药理研究, Tel: 010-64014411-2869, E-mail: linna88@163.com

potential melastatin 8 (TRPM8) protein in dorsal root ganglion (DRG) measured by immunohistochemistry. **Result:** The ankle joints of rats in model group were obviously swollen, and the cold pain threshold, mechanical pain threshold and thermal radiation pain threshold were significantly decreased compared to the rats in normal group. The levels of PGE₂ and 5-HT in plasma and the expression level of TRPV1 in DRG were significantly increased too, and production of TRPM8 in DRG is decreased. Compared with the model group, Wutou decoction high-dose group and middle dose group reduced the joint swelling ($P < 0.05$), all dose group significantly increased cold pain threshold ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), high-dose group and middle dose group increased mechanical pain threshold ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and high-dose group reduced thermal radiation pain threshold ($P < 0.05$). The levels of PGE₂, 5-HT and TRPV1 are decreased while the level of TRPM8 is increased after the treatment of Wutou decoction. **Conclusion:** Wutou decoction has the analgesic effect, and the mechanism may be related to inhibiting the level of PGE₂ and 5-HT in plasma and regulating the expression of TRPV1 and TRPM8 in DRG.

[Key words] Wutou decoction; chronic inflammatory pain; analgesic; transient receptor potential vanilloid 1

乌头汤,始见于张仲景《金匮要略》“病历节不可屈伸,疼痛,乌头汤主之”,乃治疗寒湿痹证之经方。现代临床中,常用于治疗类风湿关节炎及各种疼痛病症^[1-3],然而相关的作用研究少见报道。本文拟采用大鼠慢性关节炎疼痛模型进行乌头汤干预治疗研究,观察乌头汤对炎症痛大鼠冷板痛、机械痛、热辐射痛等痛阈值的影响,并采用酶联免疫法(ELISA)检测血浆中前列腺素 E₂(PGE₂)、5-羟色胺(5-HT)水平,免疫组化法检测背根神经(DRG)中瞬时感受器电位香草酸受体1(TRPV1)、瞬时感受器电位作用受体蛋白 M8(TRPM8)水平,探讨其镇痛作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,48只,清洁级,体重180~220g,购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物许可证号 SCXK(京)2007-004。

1.2 药品 制川乌 *Aconitum carmichaelii* Debx. 产于四川江油(批号 101021),白芍 *Paeonia lactiflora* Pall. 产于安徽亳州(批号 111061),甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 产于内蒙古乌拉(批号 100801),黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge. 产于内蒙古(批号 101107),麻黄 *Ephedra sinica* Stapf 产于内蒙古(批号 101005)。以上药材均购于北京华邈中药工程技术开发中心;经中国中医科学院中药研究所王孝涛研究员鉴定。布洛芬(哈尔滨凯程制药有限公司,批号 130922)。

1.3 试剂 完全弗氏佐剂(CFA, Chondrex, 批号 7001),兔抗鼠 TRPV1 抗体(Alomone Labs, 批号 ACC-029),兔抗鼠 TRPM8 抗体(Alomone Labs, 批号

ACC-049),PGE₂ ELISA 试剂盒(R&D 公司,批号 201302201),5-HT ELISA 试剂盒(R&D 公司,批号 201302242),HRP 标记山羊抗兔抗体(批号 K4002),二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(批号 K3467)均为西雅金桥生物公司。

1.4 仪器 35100 型冷板仪,37360 型热测痛仪,37450 型爪触觉测试仪(意大利,均为 UGO BASILE 公司),数显游标卡尺(广陆数字测控股份有限公司),图像分析仪、脱水机、生物组织包埋机、石蜡切片机、展片机、烤片机(德国,均为 Leica 公司),光学显微镜(日本,Olympus 公司)。

2 方法

2.1 药物制备 乌头汤(制川乌-白芍-麻黄-炙甘草-黄芪的比例为 6:9:9:9:9)各单味药混合,进行 2 次煎煮,煎煮时间均为 1.5 h,过滤,合并 2 次滤液。旋蒸浓缩至所需体积,以 0.4 g·mL⁻¹放入 4℃ 冰箱备用。

2.2 造模和给药 大鼠 48 只,随机分为 6 组,每组 8 只,组别如下:正常组,模型组,乌头汤高、中、低剂量组(分别为 4, 2, 1 g·kg⁻¹,约等效于成人 1, 1/2, 1/4 临床用量),布洛芬组(30 mg·kg⁻¹,约等效于成人 1/8 临床用量)。除正常组外,对其余组造模。在大鼠踝关节腔内,注入 CFA 50 μL。各给药组从造模当天开始 ig 给药,连续给药 5 d。

2.3 取材和指标检测

2.3.1 肿胀度 造模前(D 0)和造模后第 5 天(D 5)用游标卡尺测量大鼠右后踝关节左右直径,同时计算肿胀增长值(D 5 - D 0)。

2.3.2 冷板痛 大鼠于冷板中适应 5 min,待其探

索性活动基本消失后,记录后 5 min 内的右后足抬足次数。造模前(D 0)以及造模后第 5 天(D 5)测量大鼠抬足次数,同时计算抬足次数增长值(D 5 - D 0)。

2.3.3 机械痛 将大鼠置于金属笼内适应 5 min 后,待其探索性活动消失后,记录痛阈时间。每间隔 10 min 测 1 次,测 3 次,其平均值为测定结果。测定 D 5, D 0 的痛阈时间,同 2.3.2。

2.3.4 热辐射痛 用辐射热光源照射大鼠致炎足,测定其缩爪潜伏期(PWL),每间隔 10 min 测 1 次,测 3 次,其平均值为测定结果。测定 D 5, D 0 的痛阈时间,同 2.3.2。

2.3.5 血浆中 PGE₂ 和 5-HT 含量 末次给药后,禁食 12 h,大鼠麻醉后,腹主动脉取血,取血浆,于 -20 °C 保存。

2.3.6 DRG 中 TRPV1, TRPM8 含量 末次给药后,禁食 12 h,大鼠麻醉后,背中线切口逐层解剖暴露脊椎,剪开椎板,取右侧 L4-L5 DRG,4% 多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片采用免疫组化法检测 DRG 中 TRPV1, TRPM8 的含量以光学显微镜观察,每张切片在 200 倍镜下随机选取 6 个视野进行图片采集,运用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统分析图片,计算吸光度(A)值,并统计各组的平均 A。

2.4 统计学分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 软件的秩和检验或单因素方差进行分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

3 结果

3.1 对慢性关节炎疼痛大鼠关节肿胀度的影响 造模 5 d 后模型组踝关节肿胀增长值较正常组明显升高($P < 0.001$);与模型组相比,乌头汤高、中剂

量组及布洛芬组踝关节肿胀增长值下降($P < 0.05$),低剂量组未见显著变化。见表 1。

表 1 乌头汤对慢性关节炎疼痛大鼠关节肿胀度的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肿胀度/mm		
		D 0	D 5	D 5 - D 0
正常	-	5.38 ± 0.16	5.68 ± 0.20	0.30 ± 0.33
模型	-	5.32 ± 0.15	13.05 ± 0.70	7.73 ± 0.70 ¹⁾
乌头汤	4.00	5.40 ± 0.14	10.60 ± 2.33	5.20 ± 2.46 ²⁾
	2.00	5.34 ± 0.11	10.87 ± 1.58	5.53 ± 1.97 ²⁾
	1.00	5.30 ± 0.33	12.00 ± 1.29	6.70 ± 1.80
布洛芬	0.03	5.26 ± 0.24	10.29 ± 2.14	5.03 ± 2.00 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.001$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对慢性关节炎疼痛大鼠关节疼痛阈的影响

3.2.1 冷板痛实验 与正常组比,模型组冷板右后足的抬足次数增长值明显增多($P < 0.001$);与模型组相比,乌头汤高、中、低剂量组以及布洛芬组的抬足次数增长值显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

3.2.2 机械痛实验 与正常组相比,模型组右后足机械痛抬足时间缩短程度明显升高($P < 0.001$);与模型组相比,乌头汤高、中剂量组以及布洛芬组的抬足时间缩短程度降低($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),而低剂量组变化不明显。见表 2。

3.2.3 热辐射痛实验 与正常组相比,模型组右后足的热辐射痛 PWL 缩短程度明显升高($P < 0.01$);与模型组相比,乌头汤高剂量组和布洛芬组的 PWL 缩短程度降低(均为 $P < 0.05$),乌头汤中剂量组虽有一定的降低趋势,但无统计学意义。见表 2。

表 2 乌头汤对慢性关节炎疼痛大鼠痛阈的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	冷板痛抬足数/次			机械痛抬足时间/s			热辐射痛 PWL/s		
		D 0	D 5	D 5 - D 0	D 0	D 5	D 5 - D 0	D 0	D 5	D 5 - D 0
正常	-	0.8 ± 1.0	1.0 ± 1.1	0.3 ± 0.5	17.3 ± 1.3	19.0 ± 1.7	1.6 ± 2.4	16.9 ± 0.8	16.8 ± 1.2	-0.1 ± 0.3
模型	-	0.6 ± 0.9	4.6 ± 1.1	4.0 ± 1.2 ¹⁾	17.2 ± 1.2	10.4 ± 0.6	-6.8 ± 0.9 ¹⁾	15.8 ± 1.0	13.3 ± 1.0	-2.5 ± 1.4 ²⁾
乌头汤	4.00	0.8 ± 0.4	1.6 ± 1.3	0.8 ± 1.3 ³⁾	16.1 ± 1.8	13.9 ± 1.1	-2.1 ± 3.3 ³⁾	15.9 ± 1.0	15.0 ± 1.1	-0.9 ± 0.8 ⁴⁾
	2.00	0.7 ± 0.8	2.2 ± 0.5	1.5 ± 1.4 ⁴⁾	16.1 ± 1.0	13.6 ± 2.8	-2.6 ± 3.8 ⁴⁾	15.8 ± 0.4	13.8 ± 1.0	-2.0 ± 0.6
	1.00	0.8 ± 0.5	2.9 ± 0.8	2.1 ± 1.2 ⁴⁾	17.2 ± 1.0	12.0 ± 0.6	-5.1 ± 1.7	16.0 ± 0.9	13.9 ± 0.5	-2.1 ± 1.2
布洛芬	0.03	0.8 ± 0.8	2.0 ± 0.8	1.2 ± 0.8 ³⁾	17.0 ± 1.9	14.9 ± 1.4	-2.1 ± 3.0 ³⁾	16.5 ± 0.9	15.7 ± 0.9	-0.8 ± 0.8 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.001$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 4 同)。

3.3 对慢性关节炎疼痛大鼠血浆中疼痛介质 PGE₂ 和 5-HT 含量的影响 与正常组比较,模型组血浆中 PGE₂ 和 5-HT 含量均明显升高($P < 0.001$, $P < 0.01$);与模型组比较,乌头汤高剂量组血浆中 PGE₂ 和 5-HT 表达量均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 3。

3.4 对慢性关节炎疼痛大鼠 DRG 中冷敏痛感受器 TRPV1 和热敏痛感受器 TRPM8 表达的影响 与正常组比较,模型组 DRG 中 TRPV1 表达明显升高($P < 0.001$),TRPM8 表达显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,乌头汤高剂量组 DRG 中 TRPV1 的表

表 3 乌头汤对慢性关节炎疼痛大鼠血浆中 PGE₂ 和 5-HT 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	PGE ₂ /ng·L ⁻¹	5-HT/μg·L ⁻¹
正常	-	57.72 ± 11.05	2.55 ± 0.56
模型	-	88.53 ± 14.21 ¹⁾	3.56 ± 0.63 ²⁾
乌头汤	4	65.57 ± 16.99 ⁴⁾	2.22 ± 0.73 ³⁾

达明显降低 ($P < 0.05$) 和 TRPM8 表达显著升高 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 乌头汤对慢性关节炎疼痛大鼠 DRG 中 TRPV1 和 TRPM8 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TRPV1/A × 10 ⁴	TRPM8/A × 10 ⁴
正常	-	5.77 ± 0.83	11.20 ± 1.60
模型	-	11.55 ± 1.53 ¹⁾	6.49 ± 1.04 ¹⁾
乌头汤	4	8.89 ± 0.61 ⁴⁾	8.27 ± 1.11 ⁴⁾

4 讨论

本实验在 CFA 模型上,灌胃乌头汤进行干预治疗,以布洛芬为对照,用冷板仪、热测痛仪、爪触觉测试仪测量各痛阈值,评价乌头汤的镇痛效果。结果表明,CFA 致炎后,大鼠患足对冷板、机械和热辐射等刺激的痛阈值明显下降。乌头汤口服后能明显提高炎性痛大鼠各痛阈值,特别是冷板和机械痛的阈值,提示乌头汤具有镇痛作用。

PGE₂ 由环氧化酶促花生四烯酸代谢而形成,不仅有致痛作用,还能抑制局部组织镇痛因子的释放,提高痛觉感受器的敏感性。5-HT 是一种前炎性化学介质,在组织中的含量变化是反映神经递质生物合成、释放、摄取、失活等过程的生化指标。TRPV1 是一种非选择性的阳离子通道,它在中枢神经系统末端,脊髓背根神经节和三叉神经中枢的感觉神经元表达最高^[4-5],引起疼痛的多种因素都能激活 TRPV1 并引起各种痛觉,尤其是热敏痛和炎性痛^[6]。TRPM8 是一种冷激活的温度觉 TRP 通道, Bautista 等^[7]剔除基因得到 TRPM8 缺陷小鼠,发现它对 icilin 或薄荷醇敏感性神经元缺失,对冷反应的能力降低。本实验在 CFA 模型血浆中检测到了明显升高的 PGE₂ 和 5-HT,背根中检测到了升高的 TRPV1 和降低的 TRPM8,口服乌头汤在使大鼠痛阈值提高同时,也使 PGE₂, 5-HT 和 TRPV1 含量显著下降,TRPM8 含量显著上升,提示乌头汤的镇痛作用可能与降低 PGE₂, 5-HT 水平和对 TRPV1 和 TRPM8 表达的有效调节有关。

本实验观察到乌头汤对冷板和机械痛具有较好的镇痛作用,而对热板的效果稍差,这也在一定程度

上体现了乌头汤以其温热之性取效的特点,与文献和临床报道的治疗方向相符合^[8-10]。先前研究曾提示乌头汤有对急性痛有镇痛作用,也具抗炎、抗氧化和免疫调节的生物活性^[11-14],本研究进一步证明乌头汤对慢性炎症痛的镇痛作用,且观察到这个作用与疼痛相关细胞因子以及背根神经节中 TRPs 的表达有关,这为进一步阐明乌头汤镇痛机制以及指导临床应用提供了初步的实验依据。

[参考文献]

- [1] 张淑英, 刘杰. 加味乌头汤治疗活动性类风湿关节炎 26 例[J]. 中国中医药科技, 2010 (4):326.
- [2] 唐小儒. 加减乌头汤治疗腰椎间盘突出症 49 例[J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(6):76.
- [3] 刁洪亮. 乌头汤加减治疗痛痹 47 例[J]. 实用中医药杂志, 2008, 24(4):220.
- [4] Mezey é, Tóth Z E, Cortright D N, et al. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human[J]. Proc Nat Acad Sci, 2000, 97(7):3655.
- [5] Sanchez J F, Krause J E, Cortright D N. The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat[J]. Neuroscience, 2001, 107(3):373.
- [6] Alawi K, Keeble J. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation[J]. Pharmacol Ther, 2010, 125(2):181.
- [7] Bautista D M, Siemens J, Glazer J M, et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold [J]. Nature, 2007, 448(7150):204.
- [8] 宋志刚. 加减乌头汤外敷治疗寒痹体会[J]. 新疆中医药, 1997, 15(1):45.
- [9] 秦玮. 加减乌头汤治疗寒湿痹证 56 例[J]. 湖南中医杂志, 1994, 10(3):036.
- [10] 毛理纳, 罗予. 加温和乌头汤改善微循环和抗炎作用的观察[J]. 浙江中医杂志, 2000, 35(7):312.
- [11] 毛理纳, 洪素兰, 罗予, 等. 乌头汤的镇痛抗炎作用[J]. 河南医学研究, 1994, 3(4):325.
- [12] 毛理纳, 罗予, 洪素兰. 乌头汤合并局部加温的镇痛抗炎作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(S1):289.
- [13] 刘伟栋, 施旭光, 旷永强, 等. 乌头汤对 RA 大鼠相关细胞因子影响的研究[J]. 中药材, 2009, 32(8):1267.
- [14] 李世哲, 陈瑞战, 齐瑶, 等. 配伍禁忌半夏, 贝母对乌头汤抗氧化活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):198.

[责任编辑 聂淑琴]