

独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛作用 及血清中5-HTP,5-HIAA的影响

车萍¹, 季旭明¹, 梁粟², 张颖颖¹, 韩涛^{1*}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 济南市妇幼保健院, 济南 250012)

[摘要] 目的: 观察独活寄生汤对佐剂性关节炎模型大鼠免疫器官脏器系数和血清中5-羟色氨酸(5-HTP)和5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)含量的影响。方法: 实验设对照组、模型组、阿司匹林组(0.20 g·kg⁻¹)、独活寄生汤低、中、高剂量组(0.85, 1.7, 3.4 g·kg⁻¹); 除对照组外, 其余各组左后肢踝关节腔注射完全弗氏佐剂(FCA)制作佐剂性关节炎模型。ig给药14 d, 对照组及模型组灌服羧甲基纤维素钠(CMC-Na)。ELISA法测定血清中5-HTP和5-HIAA的含量。结果: 独活寄生汤能显著增加大鼠胸腺质量, 明显降低佐剂性关节炎大鼠血清中5-HTP和5-HIAA的含量, 与模型组比较有显著性差异($P < 0.05$)。结论: 独活寄生汤对大鼠起到抗炎镇痛的作用, 其作用机制可能与降低大鼠血清5-HTP和5-HIAA有关。

[关键词] 独活寄生汤; 佐剂性关节炎; 5-羟色氨酸; 5-羟吲哚乙酸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)19-0170-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014190170

Anti-inflammatory and Analgesic Effects and Change of Serum 5-HTP and 5-HIAA by Duhuo Jisheng Decoction on Adjuvant Arthritis Rats

CHE Ping¹, JI Xu-ming¹, LIANG Su², ZHANG Ying-ying¹, HAN Tao^{1*}

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

2. Jinan Maternity and Child Health Care Hospital, Ji'nan 250012, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of the anti-inflammation and analgesia and the change of the serum 5-hydroxytryptophan (5-HTP) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) by Duhuo Jisheng decoction on adjuvant arthritis rats. **Method:** The experiment set up blank group, model group, positive group, low, middle and high dose groups of Duhuo Jisheng decoction. Except the blank group, other groups were injected Complete Freund's adjuvant (FCA). In the administration for 14 days, the blank group and model group were perfused with carboxymethyl cellulose sodium (CMC-Na), Duhuo Jisheng decoction low, middle and high dose groups were fed with Duhuo Jisheng decoction 0.85, 1.7, 3.4 g·kg⁻¹ and the positive group were given aspirin 0.20 g·kg⁻¹. Determination of serum 5-HTP and 5-HIAA by ELISA method. **Result:** Duhuo Jisheng decoction can significantly increase the thymus weight, and can obviously reduce the content of the serum 5-HTP and 5-HIAA compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Duhuo Jisheng decoction has a good anti-inflammatory and analgesic function, and the mechanism of Duhuo Jisheng decoction curing the adjuvant arthritis may relate with its reducing the content of the serum 5-HTP and 5-HIAA.

[Key words] Duhuo Jisheng decoction; adjuvant arthritis; 5-hydroxytryptophan; 5-hydroxyindole acetic acid

[收稿日期] 20140306(021)

[基金项目] 山东省中医药科学技术研究项目(2011-006)

[第一作者] 车萍, 讲师, 博士研究生, 从事方剂作用机制及药效物质基础研究, E-mail: cheping200380@163.com

[通讯作者] * 韩涛, 教授, 博士研究生导师, 从事方剂作用机制及临床疗效研究, E-mail: ht526@sina.com

类风湿性关节炎是一种高致残率的慢性全身性自身免疫性疾病,严重影响患者的生活质量。目前临床上治疗该种疾病主要采用西药^[1]。独活寄生汤由独活、寄生、防风、当归等祛风湿药组成。近年来研究发现,该方具有镇痛,抗炎以及免疫调节作用^[2]。血中 5-羟色氨酸(5-HTP)和 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)分别是 5-羟色胺(5-HT)的前体和代谢产物,而 5-HT 在疼痛过程中参与了致痛和镇痛两方面的作用^[3]。现通过观察独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠免疫器官脏器系数和血清中 5-HTP 和 5-HIAA 含量的影响,进而对独活寄生汤治疗类风湿性关节炎的作用机制做进一步的探讨。

1 材料

1.1 药物与试剂 所需方剂独活寄生汤由独活、桑寄生、白芍、地黄、党参、川续断、川牛膝、当归、茯苓、秦艽、川芎、防风、桂枝、甘草等 14 味中药(3:5:5:5:5:5:10:10:4:3:3:3:3:2)组成^[2];方剂中药物加水煎煮 2 次,合并煎液,滤过,浓缩至约 0.5,1.0,2.0 g·mL⁻¹,放入 4℃ 冰箱备用。阿司匹林(辰欣药业股份有限公司,批号 1211242063);羧甲基纤维素钠(CMC-Na);弗氏完全佐剂(FCA,美国 Sigma 公司,批号 100M8725)。5-HTP 酶联免疫试剂盒(批号 20130510A)5-HIAA 酶联免疫试剂盒(批号 20130500A)均购自上海研辉生物科技有限公司。

1.2 动物 采用 Wistar 大鼠,雄性,体重(180±20)g,由山东中医药大学动物实验中心提供,动物合格证号 SCXK(鲁)20110003。

1.3 仪器 全自动高速离心机, YLS-7B 型足跖容积测量仪(淮北正华生物仪器有限公司),足底温觉测量仪(意大利 UGO BASILE 公司), DZKW-S-4 型电热恒温培养箱(中国北京永光明医疗仪器厂)及 352 型酶标仪(芬兰 Labsystems Multiskan MS 公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组 将 57 只大鼠适应性喂养 3 d,随机分为对照组(7 只),模型组,阿司匹林组,独活寄生汤低,中,高剂量组(各 10 只)6 组。除对照组外,其余各组均于实验前 1 d,于无菌条件下向左后肢足跖部推注 0.1 mL 完全弗氏佐剂,复制炎性模型。以造模后 12 d 左右大鼠对侧足跖明显肿胀,行动不便并且体重明显下降为成功的判断标准,成功率为 86%。

2.2 给药剂量及方法 对照组及模型组分别予 5% CMCNa,独活寄生汤高、中、低剂量组分别给予独活寄生汤 0.85,1.7,3.4 g·kg⁻¹, ig,阿司匹林组

予阿司匹林 0.2 g·kg⁻¹, ig,连续给药 14 d,实验期间正常饲养,自由饮水。

2.3 抗炎镇痛药药效学检测

2.3.1 对大鼠足跖肿胀度的影响 分别在给药前和给药 14 d 后量取大鼠致炎侧足跖的容积,计算肿胀抑制率。

肿胀抑制率 = (造模后足跖容积 - 给药后足跖容积) / 造模后足跖容积 × 100%

2.3.2 对大鼠热痛阈值的影响 热痛阈测定使用足底温觉测量仪,仪器发射红外光照射大鼠左后足底,安静大鼠逃避性抬腿时,仪器自动记录从刺激开始到抬腿时的时间,即对热刺激潜伏期的长度(s)。分别于给药前和给药 14 d 后,分别测 2 次,取给药前平均值作为其基础痛阈值,计算痛阈提高率。

痛阈提高率 = (给药后痛阈值 - 基础痛阈值) / 基础痛阈值 × 100%

2.4 样本采集 摘取肝、脾、肾、胸腺、肾上腺,拭干称重,计算脏器系数(g·kg⁻¹):脏器系数 = 脏器质量 / 大鼠体重,分别记录大鼠体重的变化情况,计算体重增长率。

体重增长率 = (给药后体重 - 造模前体重) / 造模前体重 × 100%

2.5 血清 5-HTP 和 5-HIAA 含量测定 采用酶联免疫试剂盒,实验步骤参照说明书,用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(A),计算样品浓度。

2.6 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组一般情况比较 注射弗氏完全佐剂后 3~4 h,大鼠左后足即可出现红、肿、热等急性炎症表现;2 d 左右达到高峰;4~5 d 后炎症逐渐消退;约 10~13 d,除左后足关节炎可再次出现或加重外,其他肢体亦渐出现继发性关节肿胀,并呈进行性加重。受累关节畸形,严重者不能负重,伴有懒动,食欲下降,消瘦,直立脱毛等全身表现。阿司匹林组及独活寄生汤高剂量组继发性关节炎肿胀明显较轻,进食、活动较多,全身情况较好。

3.2 各组足跖肿胀度比较 给药 14 d,模型组与对照组比较有统计学差异(*P* < 0.05);独活寄生汤低、中剂量组与模型组比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05);独活寄生汤高剂量组及阿司匹林组与模型组比较有显著性差异(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 独活寄生物对佐剂性关节炎大鼠原发性足跖肿胀度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肿胀度/mL		抑制率/%
			造模后	给药 14 d	
对照	7	-	1.05 ± 0.19	0.98 ± 0.56	-
模型	7	-	1.10 ± 0.23	1.47 ± 0.23 ¹⁾	-
阿司匹林	9	0.20	1.08 ± 0.13	0.93 ± 0.30 ³⁾	32.46 ± 0.34
独活寄生汤	9	0.85	1.09 ± 0.16	1.19 ± 0.18 ²⁾	19.05 ± 0.21
	9	1.70	1.13 ± 0.18	1.17 ± 0.16 ²⁾	20.40 ± 1.35
	9	3.40	1.07 ± 0.21	0.99 ± 0.21 ³⁾	30.24 ± 0.19

注:与对照组比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.3 各组热痛阈值比较 与对照组比较,模型组给药 14 d 痛阈值明显降低($P < 0.05$);给药 14 d 后,独活寄生汤低、中、高剂量组与模型组比较,其痛阈值有较明显的提高($P < 0.05$);阿司匹林组与模型组比较,给药 14 d 后其痛阈值有显著性提高($P < 0.01$)。见表 2。

3.4 各组体重增长率比较 与对照组比较,模型组大鼠体重明显下降($P < 0.05$);与模型组比较,阿司匹林组和独活寄生汤高剂量组大鼠体重明显增加($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 各组脏器系数比较 结果示与模型组比较,高剂量独活寄生汤较模型组大鼠胸腺系数有明显的增

表 2 独活寄生物对佐剂性关节炎大鼠热痛阈值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	基础痛阈	给药 14 d	痛阈
			/s	痛阈/s	提高率/%
对照	7	-	13 ± 2	14 ± 2	-
模型	7	-	14 ± 2	9 ± 1 ¹⁾	-
阿司匹林	9	0.2	14 ± 2	18 ± 2 ³⁾	26 ± 2.7
独活寄生汤	9	0.85	14 ± 2	17 ± 3 ²⁾	16 ± 4.2
	9	1.70	12 ± 2	16 ± 2 ²⁾	29 ± 3.5
	9	3.40	14 ± 2	17 ± 2 ²⁾	20 ± 2.0

加作用($P < 0.05$),其他脏器系数值无统计学意义。见表 3。

表 3 独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠体重增长率及脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肝/ $g \cdot kg^{-1}$	脾/ $g \cdot kg^{-1}$	肾/ $g \cdot kg^{-1}$	胸腺/ $g \cdot kg^{-1}$	肾上腺/ $g \cdot kg^{-1}$	体重增长率/%
对照	7	-	39.43 ± 0.86	4.40 ± 2.44	3.26 ± 0.10	2.66 ± 0.75	0.09 ± 0.01	72.78 ± 22.20
模型	7	-	38.62 ± 5.85	4.17 ± 1.22	3.52 ± 0.47	2.16 ± 0.57	0.10 ± 0.03	64.49 ± 8.04 ¹⁾
阿司匹林	9	0.20	41.50 ± 4.38	3.76 ± 1.18	3.51 ± 0.27	2.55 ± 0.49	0.08 ± 0.04	71.18 ± 5.85 ²⁾
独活寄生汤	9	0.85	39.02 ± 2.77	4.04 ± 1.41	3.38 ± 0.31	2.17 ± 0.47	0.10 ± 0.02	65.92 ± 19.64
	9	1.70	41.57 ± 3.05	3.84 ± 0.77	3.83 ± 0.27	2.32 ± 0.47	0.09 ± 0.03	51.29 ± 11.34
	9	3.40	37.60 ± 2.33	4.24 ± 0.91	3.29 ± 0.42	2.61 ± 0.54 ²⁾	0.10 ± 0.03	70.99 ± 25.11 ²⁾

3.6 血清中 5-HTP 和 5-HIAA 的浓度 模型组大鼠血清中 5-HTP 含量显著比对照组高($P < 0.05$),经独活寄生汤治疗后,大鼠血清中 5-HTP 含量显著比模型组低($P < 0.05$),呈明显剂量依赖性。模型组大鼠血清中 5-HIAA 含量显著比对照组高($P < 0.05$);与模型组比较,阿司匹林阳性组与独活寄生汤组大鼠血清中 5-HIAA 含量显著降低($P < 0.05$),但仍高于对照组血清中 5-HIAA 的浓度;独活寄生汤组大鼠血清中 5-HIAA 含量与模型组比较显著降低,且呈明显剂量依赖性关系。见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 5-HTP 和 5-HIAA 的浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	5-HTP/ $\mu g \cdot L^{-1}$	5-HIAA/ $\mu g \cdot L^{-1}$
对照	7	-	37.91 ± 3.369	16.47 ± 0.93
模型	7	-	89.18 ± 5.431 ¹⁾	32.10 ± 2.18 ¹⁾
阿司匹林	9	0.2	50.85 ± 4.242	18.46 ± 1.14 ²⁾
独活寄生汤	9	0.85	76.09 ± 4.107 ²⁾	27.74 ± 1.05 ²⁾
	9	1.70	64.40 ± 3.644 ²⁾	23.75 ± 1.15 ²⁾
	9	3.40	55.91 ± 3.153	19.99 ± 0.84

4 讨论

独活寄生汤在临床上应用广泛。中医学认为,独活寄生汤具有祛风湿、止痹痛、益肝肾、补气血的功效,可用来治疗痹证日久,肝肾两虚,气血不足证,关节屈伸不利或麻木不仁,腰膝疼痛,心悸气短,畏寒喜温等证。现代实验研究认为其具有镇痛、抗炎和改善微循环作用^[2,4]。该方首载于《备急千金方》,为治疗痹证日久方剂,现有不少用于类风湿性关节炎的报道。

动物脏器质量和脏器系数是生物医学研究的重要基础指标,是科学研究和临床医学的重要依据。免疫器官质量与脏器系数在一定程度上可以反映免疫器官内巨噬细胞和淋巴细胞等免疫活性细胞的数量,可作为辅助性的免疫检测手段,了解体内淋巴细胞总体水平^[5-6]。药物对动物脾脏、胸腺质量的影响,可作为免疫药理机制的初步指标^[7]。本实验研究结果显示,独活寄生汤高剂量组的胸腺系数高于模型组($P < 0.05$),表明高剂量独活寄生汤能够促进免疫器官胸腺的发育,这对于增强大鼠机体免疫机能具有积极意义。但是,对脾脏和肾上腺系数无明显作用,还有待进一步研究讨论。

现代医学认为5-HT作为一种神经介质,能直接致痛,在疼痛过程中参与了致痛和镇痛两方面的作用。在外周是一种致痛因子,通过第二信使(环核苷酸、钙离子)作用于局部旁分泌,刺激感觉神经末梢产生疼痛^[8]。血中色氨酸在色氨酸羟化酶(TPH)催化作用下,在5位羟化成5-羟色胺酸(5-HTP),然后再经5-羟色胺酸脱羧酶(5-HTP-DC)催化脱羧成5-HT^[3]。在5-HT的代谢过程中5-HTP是5-HT的前体,5-HTP的含量可以反映5-HT的含量^[9]。另外,5-HT主要在单胺氧化酶的作用下代谢为5-HIAA进入血液。腹腔注射5-HT释放剂可显著增强电针镇痛效应,并进一步增加PAG内5-HT,5-HIAA含量^[10]。实验研究发现中枢及外周5-HT和5-HIAA参与了针刺镇痛的即时效应和后效应^[11]。

本实验表明,独活寄生汤对大鼠佐剂性关节炎足跖肿胀度具有良好的抑制作用,对热痛阈具有良好的延长作用,即对大鼠佐剂性关节炎具有良好的抗炎镇痛作用。另外,实验结果显示模型组大鼠血

清中5-HTP与5-HIAA含量与正常组对比显著性升高;给予独活寄生汤低、中、高级剂量后,大鼠血清5-HTP和5-HIAA含量与模型组对比显著性降低,表明独活寄生汤能显著降低佐剂性关节炎大鼠血清中5-HTP和5-HIAA的含量。提示独活寄生汤发挥抗炎镇痛的作用机制可能与降低大鼠血清中5-HTP和5-HIAA的含量有关。有关独活寄生汤对佐剂性关节炎大鼠的抗炎镇痛的机制还不完善,仍有待进一步的实验研究。

[参考文献]

- [1] 孟敏,刘丽春,葛斌,等.塞来昔布治疗类风湿性关节炎或骨关节炎疗效和安全性的Meta分析[J].中国循证医学杂志,2011,11(5):560.
- [2] 王爱武,刘娅,雒琪,等.独活寄生汤抗炎、镇痛的药效学研究[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(12):61.
- [3] 胡一冰,张元,鲁燕侠,等.复方天麻制剂镇痛的中枢和外周神经递质作用机理实验研究[J].时珍国医国药,2008,19(9):2262.
- [4] 陈成然.独活寄生汤现代药理研究及临床应用[J].现代中西医结合杂志,2004,13(21):2927.
- [5] 贺显晶,和翀翼,王建发,等.鱼油对断奶大鼠脏器指数和肠道菌群影响的研究[J].中国微生态学杂志,2008,20(6):555.
- [6] 杨龙圣,胡元亮,薛家宾,等.中药成分复方对兔外周血淋巴细胞增殖、IFN- γ 和IL-10的mRNA表达以及兔出血症疫苗免疫效果的影响[J].中国农业科学,2008,41(11):3809.
- [7] 李春艳,李先辉,昌江明,等.黄瓜香对小鼠免疫功能调节的实验研究[J].时珍国医国药,2008,19(1):40.
- [8] 乔治·阿德尔曼.神经科学百科全书[M].上海:上海科学技术出版社,1992:310.
- [9] 张焱,回世洋.中医五脏调控系统和神经内分泌免疫调节网络的关系[J].中华中医药学刊,2009,27(1):188.
- [10] 梁宜,方剑乔.5-羟色胺痛觉调制与针灸镇痛相关研究[J].上海针灸杂志,2009,28(8):492.
- [11] 陈瑾,刘光谱,唐勇.中枢及外周5-HT,5-HIAA在针刺镇痛后效应中的作用[J].中医药学刊,2003,21(9):1446.

[责任编辑 聂淑琴]