

新痹痛灵抗炎作用及其机制

朱丰林, 魏刚, 平凡, 刘晏, 景嵘月, 郭云柯, 陆兔林, 郭海英, 汪悦*
(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] **目的:**研究新痹痛灵(New Bitongling, NBTL)的抗炎作用,揭示其抗炎作用及机制。**方法:**体内实验取30只SD雄性大鼠,随机分成模型组、阳性药布洛芬缓释胶囊组($0.054\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)以及新痹痛灵高剂量组($11\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,简称NBTLH)、低剂量组($2.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,简称NBTL);连续ig给药5 d,1次/d;末次给药1 h后,复制组胺致大鼠毛细血管通透性增加模型、采用尾静脉注射伊文斯蓝后提取皮肤中染料、测定提取液590 nm的吸光度反映毛细血管通透性;复制角叉菜胶致大鼠足跖肿胀模型、采用容积测量法观察各组大鼠足跖肿胀度;体外实验以脂多糖(LPS)诱导的RAW 264.7细胞分泌炎症因子复制炎症模型,酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定各组细胞上清液中前列腺素 E_2 (PGE_2)含量。**结果:**与模型组比较,布洛芬缓释胶囊组、NBTLH、NBTL组伊文斯蓝含量明显降低($P < 0.01$);表明均能抑制大鼠毛细血管通透性增加;与模型组相比,在相同时间点,NBTLH组大鼠足跖肿胀度均降低(各时间点 $P < 0.05$),NBTL在各个时间点都有抑制趋势,但无显著性差异;与正常组比较,模型组的 PGE_2 表达水平升高($P < 0.05$);与模型组比较,NBTLH、NBTL组 PGE_2 表达水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$)。**结论:**NBTL对炎症有明显抑制作用,其抗炎作用可能与抑制炎症组织 PGE_2 的合成或分泌有关。

[关键词] 新痹痛灵; 抗炎机制; 前列腺素 E_2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0093-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015210093

Anti-inflammatory Effect of New Bitongling Compound and Its Mechanism ZHU Feng-lin, WEI Gang, PING Fan, LIU Yan, JING Rong-yue, GUO Yun-ke, LU Tu-lin, GUO Hai-ying, WANG Yue* (Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-inflammatory effect and mechanism of New Bitongling compound (NBTL). **Method:** The 30 SD male rats were randomly divided into four groups: the model group, Bloven sustained release capsules positive control group ($0.054\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), New Bitongling high-dose group and low-dose group (NBTLH, NBTL, 11, $2.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Rats were gave ig administered for 5 days, once a day. After 1 h of the last administration, models of increased capillary permeability (induced by histamine) were established, then dye in the skin was extracted after intravenous injection with Evans blue (EB) in tails, and the absorbance of the skins supernatant fluid at 590 nm was determined to react the permeability of skin capillaries indirectly. The pedal swelling model induced by carrageenan were established, and the swelling degree of the paw in various groups was observed using method of volume measurement. Inflammation model *in vitro* was established using RAW264.7 cells secrete inflammatory factors induced by lipopolysaccharide (LPS), and prostaglandin E_2 (PGE_2) content in cell supernatant of various groups was determined using enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) method. **Result:** Compared with model group, the level of EB was decreased in Bloven sustained release capsules group, NBTLH and NBTL groups ($P < 0.01$), indicating that they can inhibit the increase of blood capillary permeability in rats. Compared with model group, the swelling of foot plantar in NBTLH group rats was relieved at the same time points (each time point, $P < 0.05$). While the NBTL group showed tendency of inhibition at various time points, but with out statistical significance. Compared with normal group, the expressions of PGE_2 were elevated in the model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the expressions

[收稿日期] 20150126(011)

[基金项目] 国家中医药管理局中医痹病学重点学科开放基金项目(BBXK2013106);康缘中医药科技创新项目计划(KZ1003KY)

[第一作者] 朱丰林,在读硕士,从事中医风湿病研究,Tel:18252066320,E-mail:zhufenglin09@163.com

[通讯作者] *汪悦,教授,博士生导师,从事中医风湿病研究,Tel:025-51995160,E-mail:wangyuephd@126.com

of PGE₂ were significantly reduced in NBTLH and NBTL groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** NBTL has an anti-inflammatory effect, which may be associated with suppressing synthesis or secretion of PGE₂ in inflammatory tissues.

[**Key words**] New Bitongling; anti-inflammatory mechanism; prostaglandins

对于炎症治疗,现代中医多从热、毒辨证,以苦寒清解之剂为要,然临床上炎症尤其是慢性炎症并非都为热证,“温法”亦具有较高的临床价值,徐红日等证实辛温药能降低感染小鼠肺组织白介素-6(interleukin-6, IL-6)表达,升高白介素-10(interleukin-10, IL-10),血清干扰素- γ (interferon- γ , INF- γ)表达^[1],施晓芬等证实运用温经通络能改善活动性类风湿性关节炎症状^[2]。本课题组前期研究也证实以“温经通络法”立方的新痹痛灵(New Bitongling, NBTL)具有较好的抗炎、镇痛作用及临床疗效^[3,4],然其机制尚不明确。本研究通过建立组胺致皮肤血管通透性增加模型、角叉菜胶致大鼠足跖肿胀模型、脂多糖诱导 RAW 264.7 细胞炎症模型,研究 NBTL 对炎症影响及机制,为后续研究奠定基础。

1 材料

1.1 动物与细胞株 SD 雄性大鼠(180 ± 20) g,北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,动物在 SPF 级动物房常规饲养。小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞由南京中医药大学肖平老师惠赠。

1.2 药品与制备

1.2.1 NBTL 浸膏制备 NBTL 由麻黄,制川乌,桂枝,防风等 6 味中药组成,中药饮片购于江苏省中医院门诊部药房,经中药炮制学陆兔林教授鉴定合格,浸膏制作程序由南京中医药大学中药炮制教研室研制,江苏省中医院制剂部加工而成。NBTL 浸膏主要制备工艺:取桂枝等提取挥发油、麻黄等醇提、制川乌等水提,减压回收乙醇至无醇味的浸膏,浸膏得率为 9.3%。

1.2.2 药品 雷公藤多苷片(浙江得恩德制药有限公司,批号 14031113),布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号 3201501)。

1.3 试剂 角叉菜胶(批号 1408463),组胺(批号 H7125),脂多糖(LPS,批号 A02687976),均为 Sigma 公司,改良型 RPMI-1640 培养基(上海立菲生物科技有限公司,批号 C11875500BT),新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 131007),胰蛋白酶(北京经科公司,批号 15332C13),前列腺素 E₂(PGE₂)检测试剂盒(R&D 公司,批号 201405)。

1.4 仪器 EnSpire® 型多模式微孔板检测仪(美国 PerkinElmer 公司),HWS26 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司),YLS-7B 型足跖容积测量仪(济南益延科技发展有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

2.1.1 动物分组 取 30 只 SD 雄性大鼠随机分成模型组、阳性药组、以及 NBTL 高、低剂量组(按生药量计,下同)分别予生理盐水 10 mL·kg⁻¹,布洛芬缓释胶囊 0.054 g·kg⁻¹,NBTL 高(NBTLH),低(NBTL)剂量组(11,2.75 g·kg⁻¹);连续 ig 给药 5 d,1 次/d。

2.1.2 制备含药血清 含药血清制作参考文献[5]方法,取健康成年 SD 雄性大鼠 8 只,随机分成空白组、雷公藤多苷片组(8 mg·kg⁻¹)以及 NBTL 高、低剂量组(11,2.75 g·kg⁻¹);连续 ig 给药 3 d,1 次/d。禁食 12 h 后行末次给药,给药后 1 h 麻醉、采血;血液放置 1 h 后 3 000 r·min⁻¹离心 10 min, -20 °C 冰箱冻存备用。临用前于 56 °C 30 min 水浴灭活补体,0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,无菌分离并混合血清,用不含血清的 1640 培养基以体积比 1:9 稀释各组血清,再向稀释后的血清中加入脂多糖(LPS 终质量浓度为 50 mg·L⁻¹[6])即含药血清混悬液。

2.1.3 细胞实验分组 将细胞随机分为正常组、对照组、模型组、雷公藤多苷片含药血清组以及 NBTL 高、低剂量含药血清组等 6 组,分别予含血清的 1640 培养基,含血清的 1640 培养基 + LPS,NS 组大鼠含药血清 + LPS,雷公藤多苷片组含药血清 + LPS,NBTLH 组含药血清 + LPS,NBTL 组含药血清 + LPS,每组平行设 6 个复孔,各孔分别加入 10% 体积分数的含药血清混悬液 100 μL,其中 LPS 溶液的终质量浓度为 50 mg·L⁻¹。

2.2 对组胺致大鼠皮肤毛细血管通透性增高的影响 组胺致大鼠皮肤毛细血管通透性增高炎症模型制作参照文献[7]方法,**2.1.1** 中大鼠末次给药前 1 d 除净大鼠背部毛;末次给药 1 h 后,向鼠背中部 sc 200 μg 组胺混悬液(质量浓度为 1 g·L⁻¹)后,立即尾静脉注射 1% Evans 蓝 4 mL·kg⁻¹,20 min 后脱颈

处死,剥取背部皮肤;以组胺进针孔为圆心用 2 cm 直径打孔器取等面积的蓝染皮片,剪碎,置于 4 mL 丙酮混悬液(丙酮-生理盐水混合液,体积比为 7:3)中,分 2 次浸泡,每次 2 h;合并浸液,加入上述混合液至 5 mL,震荡恒温培养箱 65 °C 孵育 24 ~ 36 h,直至皮肤蓝色完全消失;1 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,于 590 nm 处测吸光度 A。

2.3 NBTL 对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响
角叉菜胶致大鼠足跖肿胀模型制作参考文献[8]方法,2.1.1 中大鼠末次给药前用足跖肿胀仪测定右足足跖的容积;末次给药 1 h 后向各鼠右后足垫中部(先向上再转向下)皮下注射 0.1 mL 1% 角叉菜胶;于注射后 30,60,120,240,360 min 分别测定各鼠右后足跖容积,计算各组致炎后不同时间点的足跖肿胀率。

$$\text{肿胀率} = (\text{致炎后右后足容积} - \text{致炎前右后足容积}) / \text{致炎前右后足容积} \times 100\%$$

2.4 NBTL 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞分泌 PGE₂ 的影响 细胞培养取生长状态良好的 RAW264.7 细胞株,胰酶消化后,用含体积分数为 10% 新生牛血清的 1640 培养液调整细胞密度至 4 × 10⁴/孔,按 2.1.3 分组接种于 96 孔板内,150 μL/孔,置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,贴壁 24 h 后,弃上清液,加入不含血清的新鲜的 1640 培养液,稳定 2 h 后,向各组分别加入 100 μL/孔的含药血清混悬液,继续培养 24 h 后,收集上清液,按 ELISA 试

剂盒说明书测定上清液中 PGE₂ 含量。

2.5 统计方法 所有实验数据均采用 SPSS 19.0 统计处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用 *t* 检验或单因素方差分析,*P* < 0.05 为有显著差异。

3 结果

3.1 对组胺致大鼠皮肤毛细血管通透性增高的影响 与模型组比较,布洛芬缓释胶囊组,NBTLH,NBTLL 组 Evans 蓝含量明显降低(*P* < 0.01);与阳性对照组比较,NBTLH 组 Evans 蓝含量水平无明显差异。见表 1。

表 1 新痹痛灵对组胺所致大鼠毛细血管通透性增高的影响($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of NBTL on increasing skin vascular permeability induced by histamine in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	Evans 蓝含量/A
模型	-	8	0.275 ± 0.051
布洛芬缓释胶囊	0.054	6	0.076 ± 0.013 ¹⁾
新痹痛灵	2.75	8	0.138 ± 0.037 ¹⁾
	11	8	0.107 ± 0.039 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾*P* < 0.01。

3.2 对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响 与模型组相比,相同时间点的 NBTLH 组大鼠足跖肿胀度均降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01);NBTLL 在各个时间点都有抑制趋势,60,360 min 有显著性差异(*P* < 0.05),见表 2。

表 2 NBTL 对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of NBTL on paw edema caused by carrageenan in rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	注射角叉菜胶后足跖肿胀率/%				
			30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
模型	-	6	23.4 ± 6.3	33.8 ± 8.0	40.4 ± 6.8	50.4 ± 5.0	43.9 ± 7.3
布洛芬缓释胶囊	0.054	8	13.4 ± 2.3 ¹⁾	23.1 ± 6.9 ²⁾	32.0 ± 7.6	28.3 ± 5.8 ¹⁾	25.0 ± 9.8 ¹⁾
新痹痛灵	2.75	8	20.0 ± 6.5	24.4 ± 8.4 ¹⁾	33.1 ± 9.7	48.5 ± 14.8	31.2 ± 18.9 ¹⁾
	11	8	13.4 ± 4.8 ²⁾	19.2 ± 7.4 ¹⁾	25.7 ± 10 ¹⁾	34.5 ± 9.7 ¹⁾	25.2 ± 9.7 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾*P* < 0.05, ²⁾*P* < 0.01。

3.3 NBTL 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞分泌 PGE₂ 的影响 与正常组比较,对照组与模型组 PGE₂ 表达水平均升高(*P* < 0.05);与模型组比较,NBTLH,NBTLL 组 PGE₂ 表达水平降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01),见表 3。

4 讨论

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)滑膜炎具有炎症反应基本特征:在炎症介质刺激下前列腺

素类产物生成增加,导致发热疼痛、微血管通透性升高、白细胞渗出及局部肿胀。注射炎症介质组胺后可刺激花生四烯酸释放而催化 PGE₂ 合成致毛细血管通透性升高,从而形成早期炎症病理模型^[7],根据皮肤被 Evans 蓝浸润的程度可间接了解毛细血管通透性、推测早期炎症轻重。大鼠足跖注射角叉菜胶,造成炎症部位组胺、前列腺素等多种炎症介质合成增加,其中以 PGE₂ 升高为主导,是理想的炎症反

表3 NBTL 10%含药血清对LPS诱导的RAW 264.7细胞分泌PGE₂的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of 10% serum containing NBTL on PGE₂ production in LPS-stimulated RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LPS /mg·L ⁻¹	剂量 /g·kg ⁻¹	PGE ₂ /ng·L ⁻¹
正常	-	-	2 450 ± 162
对照	50	-	3 253 ± 769 ¹⁾
模型	50	-	3 912 ± 395 ¹⁾
雷公藤多苷含药血清	50	0.054	2 364 ± 231 ²⁾
新痹痛灵含药血清	50	2.75	2 430 ± 161 ²⁾
	50	11	2 704 ± 483 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ P < 0.05;与模型组比较²⁾ P < 0.01,³⁾ P < 0.05。

应肿胀模型,因此通过干预此模型可了解对炎症尤其是PGE₂的影响。由表1,表2结果可说明NBTL对2种炎症模型均具有较好的抑制作用,由此推测,NBTL具有抗炎作用,其机制与前列腺素合成或分泌有很大关联。本文选用LPS诱导RAW 264.7细胞分泌PGE₂实验,结果证实了NBTL能抑制LPS诱导的RAW 264.7细胞PGE₂表达水平,进一步印证了NBTL抑制组胺致毛细血管通透性升高、角叉菜胶致大鼠足跖肿胀度等炎症模型可能与抑制PGE₂的表达有关。

然炎症属现代医学概念,祖国医学认为炎症性疾病需分寒、热、虚、实。基于此全国名老中医汪履秋教授提出寒湿痹阻是痹证重要病机之一,并为此创立了痹痛灵(Bitongling, BTL)方,汪悦教授研究证实BTL可有效治疗寒湿痹阻型类风湿关节炎^[9],然此方药味多、药效稳定性差,继而在辨证与辨病结合的原则指导下,对主药、辅药交互作用及剂量进行正交t值法分析,精简成疗效相当、以辛温药物组成的NBTL,仍具散寒除湿、祛瘀通络作用^[10-11]。既往研究证实BTL有抑制佐剂型关节炎大鼠血小板聚集、改善血液流变学异常的作用^[12],本研究又发现NBTL能抑制PGE₂的表达、具有抗炎作用,以此推断临床中“温经通络”功效发挥机制可能与抑制

炎症反应有关。因此,有必要进一步研究NBTL的抗炎机制与温经通络功效的确切关系及机制,为“温经通络法”治疗寒湿痹阻型痹证提供现代生物学理论依据。

[参考文献]

[1] 徐红日,王成祥,王兰,等. RT-PCR法分析两种解表法中药对FM1感染小鼠肺中炎症细胞因子的影响[J]. 环球中医药,2013,6(11):805-810.

[2] 施晓芬,陈湘君. 内服益气温阳、外用温经通络法内外合治活动性类风湿性关节炎的临床研究[J]. 中医外治杂志,2012,21(2):5-7.

[3] 覃仕化. 新痹痛灵颗粒对胶原诱导性关节炎大鼠血清及滑膜组织中IL-2和TNF-α的影响[D]. 南京:南京中医药大学,2012.

[4] 景嵘月. 新痹痛灵颗粒剂治疗类风湿关节炎寒湿痹阻证的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2012.

[5] 杨奎,周明眉,姜远平,等. 中药血清药理学的方法学研究——给药方案的研究[J]. 中药药理与临床,1999,22(3):44-45.

[6] Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, et al. Propionibacterium acnes and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes[J]. Microbes Infect, 2006,8(8):2195-2205.

[7] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,1993:72-73.

[8] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2002:882.

[9] 耿元卿,汪悦. 痹痛灵颗粒治疗类风湿性关节炎寒湿阻络证30例临床研究[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(2):111-113.

[10] 李广清,汪悦,夏卫军. 痹痛灵抗炎作用处方筛选正交t值法实验研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(11):2159-2160.

[11] 李爱民,汪悦. 痹痛灵拆方剂量的正交t值法实验研究[J]. 实用中西医结合临床,2008,08(1):86-87.

[12] 孙丽霞,袁冬平,周玲玲,等. 痹痛灵颗粒对佐剂性关节炎大鼠血液流变学的影响[J]. 药品评价,2009,6(2):51-52.

[责任编辑 聂淑琴]