

利胆止痛胶囊抗炎镇痛作用及机制研究

马加庆¹, 云宇¹, 郭英¹, 后文俊¹, 杨泳¹, 沈志强^{2*}

(1. 昆明医科大学基础医学院机能实验室, 昆明 650500;

2. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 650500)

[摘要] **目的:**研究利胆止痛胶囊的抗炎、镇痛作用及其作用机制。**方法:**实验动物随机分为生理盐水组、利胆止痛胶囊低、中、高剂量组(小鼠:0.36, 0.72, 1.44 g·kg⁻¹, 大鼠:0.18, 0.36, 0.72 g·kg⁻¹)和阿司匹林组(小鼠0.20 g·kg⁻¹, 大鼠0.10 g·kg⁻¹)。采用小鼠耳廓肿胀法、腹腔液渗出法和大鼠足跖肿胀法研究利胆止痛胶囊的抗炎作用;采用小鼠热板法及醋酸扭体法评价利胆止痛胶囊的镇痛作用;通过测定大鼠肿胀足白介素1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF-α)、前列腺素E₂(PGE₂)和丙二醛(MDA)的含量,分析利胆止痛胶囊的抗炎作用及其可能的抗炎机制。**结果:**中、高剂量组的利胆止痛胶囊明显减轻小鼠耳廓肿胀和大鼠足跖肿胀($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),减少小鼠腹腔液的渗出($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中、高剂量利胆止痛胶囊明显提高小鼠热刺激致痛阈($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显著减少化学刺激致痛的扭体次数($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);利胆止痛胶囊中、高剂量可明显降低肿胀足中IL-1, MDA的含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而高剂量可明显降低肿胀足TNF-α和PGE₂的含量($P < 0.01$)。**结论:**利胆止痛胶囊具有一定的抗炎和镇痛作用,其作用机制可能与降低炎性组织中的IL-1, TNF-α, PGE₂和MDA的含量有关。

[关键词] 利胆止痛胶囊; 抗炎; 镇痛; 细胞因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)02-0148-04

[doi] 10.11653/syjf2014020148

Effects and Mechanism of Lidan Zhitong Capsule on Anti-inflammatory and Analgesia

MA Jia-qing¹, YUN Yu¹, GUO Ying¹, HOU Wen-jun¹, YANG Yong¹, SHEN Zhi-qiang^{2*}

(1. Laboratory of Function, School of Basic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Pharmaceutical School & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate anti-inflammatory and analgesic effects of Lidan Zhitong capsule and its mechanism. **Method:** The experimental animals were randomly divided into five groups, normal saline group, low dose (mice 0.36 g·kg⁻¹, rats 0.18 g·kg⁻¹) group of Lidan Zhitong capsule, middle dose (mice 0.72 g·kg⁻¹, rats 0.36 g·kg⁻¹) group of Lidan Zhitong capsule, high dose (mice 1.44 g·kg⁻¹, rats 0.72 g·kg⁻¹) group of Lidan Zhitong capsule and aspirin group (mice 0.20 g·kg⁻¹, rats 0.10 g·kg⁻¹). The anti-inflammatory effect was evaluated by dimethylbenzene-caused ear swelling, acetic acid induced celiac capillary permeability in mice and carrageenin induced paw edema in rats. The hotplate test and the acetic acid writhing in mice were used to study the analgesic action. The anti-inflammatory mechanism was evaluated by measuring the contents of interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor-α (TNF-α), prostaglandin E₂ (PGE₂) and malon dialdehyde

[收稿日期] 20130520(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30660212);云南省教育厅自然科学基金项目(2012C004)

[第一作者] 马加庆, 硕士, 实验师, 从事药理学教学和相关研究工作, Tel:0871-65922845, E-mail:majiaqing@126.com

[通讯作者] * 沈志强, 博士, 教授, 博士生导师, 从事天然药物与心血管药理学研究, Tel:0871-65922781, E-mail:shzqh21cn@yahoo.com.cn

(MDA) in the inflammatory tissue. **Result:** The middle and high doses of Lidan Zhitong capsule could significantly inhibit the mice ear swelling and rats paw edema ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decrease celiac capillary permeability in mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The middle and high doses of Lidan Zhitong capsule not only could remarkably improve the pain threshold of hot-plate test ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but also obviously decrease writhing times injected with acetic acid in mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Lidan Zhitong capsule could also decrease the contents of interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), prostaglandin E_2 (PGE $_2$) and malondialdehyde (MDA) in the inflammatory tissue. **Conclusion:** Lidan Zhitong capsule has remarkable anti-inflammatory and analgesic effects, which may be related to the inhibition of IL-1, TNF- α , PGE $_2$ and MDA.

[**Key words**] Lidan Zhitong capsule; anti-inflammatory; analgesia; cytokines

利胆止痛胶囊是由柴胡(炒)、赤芍、枳壳(炒)、甘草等组成的复方颗粒制剂,具有清热利胆、理气止痛功效。临床用于肝胆湿热所致的胁痛、急慢性肝炎、胆囊炎所致的黄疸等^[1]。本文拟观察其抗炎镇痛作用及其机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 利胆止痛胶囊(云南永孜堂制药有限公司,批号 20091001,临用时将胶囊内容物用生理盐水配制成所需浓度);二甲苯(武汉有机合成工厂,批号 20080607),角叉菜胶(Sigma 公司,批号 122K1444)阿司匹林(Sigma 公司,批号 105K0131),白细胞介素 1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、前列腺素 E_2 (PGE $_2$)和丙二醛(MDA)试剂盒(均购于南京建成生物工程研究所,批号 20101012)。

1.2 动物 ICR 小鼠,SD 大鼠,均由昆明医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(滇) 2005-0008 号。

1.3 仪器 CL-770 型临床生化分光光度计(日本岛津公司),721 型分光光度计(上海分析仪器厂),80-2 型离心沉淀机(江苏新康医疗器械有限公司),JA2003N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 分组与剂量设置 利胆止痛胶囊的临床成人用量为 $3.6 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$,按成人 60 kg 体重计算,折算成动物的等效剂量为:小鼠 $0.72 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,大鼠 $0.36 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,以此为中剂量。本实验剂量设置如下:小鼠 0.36, 0.72, 1.44 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,大鼠 0.18, 0.36, 0.72 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

2.2 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响^[2] 雄性 ICR 小鼠,体重 25 ~ 28 g,随机分成 5 组,每组 10 只,空白组(等体积生理盐水)、利胆止痛胶囊 0.36, 0.72, 1.44 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和阿司匹林 0.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。各组按 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,1 次/d,连续 7 d。末次

给药后 45 min 用微量加样器吸取二甲苯(0.05 mL/只)滴于小鼠右耳,15 min 后处死动物。用直径 9 mm 的打孔器沿左、右耳廓相同部位打孔取耳片。分别称重,以两耳片重差值为肿胀度。

2.3 对醋酸致小鼠腹腔毛细血管渗出的影响^[3] 雄性 ICR 小鼠,体重 25 ~ 28 g,分组、给药剂量和疗程同 2.2。末次给药后 30 min,0.5% 伊文思蓝生理盐水溶液 0.2 mL 尾 iv,随后立即 ip 0.6% 醋酸溶液 0.2 mL,20 min 后处死小鼠,轻揉腹部 30 s,5 min 后剖开腹腔,用适量生理盐水反复冲洗,并收集洗出液,滤纸滤过,调整容积至 6 mL,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液,于分光光度计 590 nm 波长处测定吸光度(A)。

2.4 对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响^[4-5] SD 大鼠,体重 200 ~ 240 g,雌雄各半,随机分为 5 组,每组 10 只,即空白组(等体积生理盐水)、利胆止痛胶囊 0.18, 0.36, 0.72 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和阿司匹林 0.1 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。各组动物均以 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig,1 次/d,连续 7 d。末次给药 45 min 后,大鼠一侧后肢足跖以 1% 角叉菜胶混悬液 0.1 mL sc。于注射角叉菜胶前及注射后 1, 2, 3, 4 h 分别用毛细管放大法测量注射侧足跖容积。以注射后足跖容积与注射前足跖容积的差值作为足跖肿胀度(mL)。测量后处死动物,截取右后足,称重,冰浴条件下剪碎、将剪碎的组织块放入 4 mL 生理盐水中浸泡 1 h 后,将浸泡液离心,取上清液,按试剂盒的操作步骤测定 IL-1, TNF- α , PGE $_2$ 和 MDA 含量。

2.5 对醋酸致小鼠扭体反应的影响^[4] ICR 小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,分组、给药剂量和疗程同 2.2。于末次给药 45 min 后,各鼠 ip 0.6% 的醋酸 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。观察 15 min 内各动物出现扭体反应的次数。

2.6 对小鼠热板法致痛的影响^[3] 将测痛装置(紫铜圆筒)置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴内,每次测试 60 s。

以雌性 ICR 小鼠(体重 18 ~ 22 g) 舔后足为痛反应指标,挑选在 5 ~ 30 s 内出现舔足反应者为合格小鼠,并记录给药前小鼠舔后足的开始时间。合格小鼠随机分为 5 组,每组 10 只,分组、给药、剂量和疗程同 2.2。末次灌胃后 60 min,将动物置上述测痛装置内,分别记录给药后 60, 90, 120 min 小鼠自放入圆筒到舔后足的时间。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计的单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 与空白组比较,利胆止痛胶囊中、高剂量明显减轻小鼠耳廓肿胀度 ($P < 0.01$),见表 1。

3.2 对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管渗出的影响 与空白组比较,利胆止痛胶囊中、高剂量明显降低小鼠腹腔毛细血管渗出液的 A ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 2。

3.3 对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响 与同时点的空白组比较,利胆止痛胶囊中、高剂量于给药后 1 h 起效,作用至少可持续 4 h ($P < 0.05, P < 0.01$),低剂量无统计学差异。同时,利胆止痛胶囊

中、高剂量可明显降低肿胀足中 IL-1, MDA 的含量 ($P < 0.05, P < 0.01$),而高剂量组 TNF- α 和 PGE₂ 含量明显降低 ($P < 0.01$),中、低剂量组有下降趋势,但无统计学意义,见表 3, 4。

表 1 利胆止痛胶囊对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肿胀度/mg
空白	-	20.2 ± 4.6
利胆止痛胶囊	0.36	17.7 ± 6.0
	0.72	13.6 ± 4.7 ²⁾
	1.44	10.1 ± 5.8 ²⁾
阿司匹林	0.20	7.6 ± 3.9 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 6 同)。

表 2 利胆止痛胶囊对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管渗出的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	A
空白	-	0.434 ± 0.055
利胆止痛胶囊	0.36	0.398 ± 0.038
	0.72	0.382 ± 0.034 ¹⁾
	1.44	0.288 ± 0.091 ²⁾
阿司匹林	0.20	0.215 ± 0.052 ²⁾

表 3 利胆止痛胶囊对角叉菜胶致大鼠足跖肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	足跖体积/mL				
		0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
空白	-	1.21 ± 0.18	1.77 ± 0.26	1.98 ± 0.34	2.17 ± 0.26	2.29 ± 0.21
利胆止痛胶囊	0.18	1.21 ± 0.10	1.86 ± 0.12	1.95 ± 0.13	2.10 ± 0.23	2.24 ± 0.15
	0.36	1.14 ± 0.17	1.60 ± 0.11 ¹⁾	1.78 ± 0.21 ¹⁾	1.94 ± 0.22 ¹⁾	2.11 ± 0.17 ¹⁾
	0.72	1.31 ± 0.27	1.51 ± 0.16 ²⁾	1.60 ± 0.18 ²⁾	1.72 ± 0.25 ²⁾	2.02 ± 0.23 ²⁾
	阿司匹林	0.10	1.14 ± 0.10	1.42 ± 0.14 ²⁾	1.59 ± 0.17 ²⁾	1.59 ± 0.23 ²⁾

表 4 利胆止痛胶囊对大鼠肿胀足中 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/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	TNF- α / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	PGE ₂ / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/nmol·mg ⁻¹
空白	-	122.13 ± 11.21	476.08 ± 31.51	50.10 ± 5.83	110.36 ± 16.29
利胆止痛胶囊	0.18	113.90 ± 10.52	466.34 ± 31.11	48.50 ± 5.56	102.67 ± 12.34
	0.36	108.90 ± 14.22 ¹⁾	454.58 ± 27.87	45.71 ± 4.53	95.95 ± 7.24 ¹⁾
	0.72	84.71 ± 14.63 ²⁾	417.94 ± 23.52 ²⁾	38.95 ± 5.32 ²⁾	63.46 ± 10.22 ²⁾
阿司匹林	0.10	71.04 ± 8.93 ²⁾	394.16 ± 24.98 ²⁾	34.46 ± 4.55 ²⁾	42.29 ± 12.20 ²⁾

3.4 对醋酸致小鼠扭体次数的影响 与空白组比较,阿司匹林和利胆止痛胶囊中、高剂量明显减少小鼠扭体次数 ($P < 0.05, P < 0.01$),见表 5。

3.5 对热板法致小鼠疼痛反应时间的影响 与给药前或空白组比较,利胆止痛胶囊中、高剂量于给药后 60 ~ 120 min 均显著延长小鼠置入圆筒至开始舔

表5 利胆止痛胶囊对醋酸致小鼠扭体次数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	扭体数/次
空白	-	42.8 ± 9.1
利胆止痛胶囊	0.36	39.6 ± 5.3
	0.72	31.3 ± 7.1 ¹⁾
	1.44	25.8 ± 6.7 ²⁾
阿司匹林	0.20	19.1 ± 5.9 ²⁾

表6 利胆止痛胶囊对热板法致小鼠疼痛的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	小鼠开始舔后足时间/s			
		给药前	给药后		
			60 min	90 min	120 min
空白	-	16.7 ± 3.8	17.8 ± 3.3	17.0 ± 2.9	16.8 ± 2.6
利胆止痛胶囊	0.36	17.3 ± 4.0	21.8 ± 7.1	18.1 ± 3.1	17.9 ± 4.2
	0.72	17.1 ± 3.6	25.6 ± 6.8 ¹⁾	23.6 ± 7.2 ¹⁾	24.9 ± 8.2 ¹⁾
	1.44	16.2 ± 4.0	25.9 ± 4.4 ²⁾	32.2 ± 5.3 ²⁾	43.2 ± 7.4 ²⁾
阿司匹林	0.20	16.8 ± 3.3	29.8 ± 5.1 ²⁾	38.3 ± 8.2 ²⁾	41.6 ± 7.2 ²⁾

粘连,胆囊腔内出现脓性渗出、组织发生坏死,导致胆囊组织发生供血不足、缺血坏死或胆囊壁出血甚至胆囊穿孔。炎症反应与疼痛反应的关系非常密切,当炎症反应发生时,血管的通透能力升高,血液中的成分透过血管壁进入到周围的组织中,组织中的感觉神经末梢受到炎症介质的刺激就会发生疼痛反应^[5]。IL-1, TNF- α , PGE₂ 均为重要的炎症介质和疼痛介质, PGE₂ 且能增强组胺、5-羟色胺、缓激肽等其他炎症、疼痛介质的协同作用。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产前列腺素(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^[6-8]。因此,治疗胆囊炎的药物最好在能够消除炎症反应的同时,具有良好的镇痛作用,以缓解病人的疼痛状况。

本实验结果显示,利胆止痛胶囊中、高剂量明显减轻小鼠耳廓肿胀和大鼠足趾肿胀,明显降低小鼠腹腔毛细血管渗出;同时,利胆止痛胶囊中、高剂量可明显降低肿胀足中 IL-1, MDA 的含量,而 TNF- α 和 PGE₂ 含量在高剂量组中也有明显降低,表明利胆止痛胶囊具有良好的抗炎作用,其抗炎机制可能与其能够降低炎症组织中的主要炎症因子的含量,并能有效清除体内的自由基有关。利胆止痛胶囊中、高剂量能明显减少小鼠扭体次数,热板法显示在给药后 60 ~ 120 min 均显著延长小鼠从置入圆筒至开始舔后足时间。表明利胆止痛胶囊对化学和物理刺激造成的疼痛反应均有明显的镇痛效果,有利于

后足时间($P < 0.05, P < 0.01$),见表 6。

4 讨论

急、慢性胆囊炎的发生和发展过程中都有炎症反应的存在。炎症反应释放的炎症因子以及本身所造成的刺激直接作用于胆囊组织的内壁,而使组织发生水肿、血管充血及白细胞大面积的浸润。继续发展则会使整个胆囊壁和胆囊周围的组织慢慢出现

发挥其防治胁痛之功效,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进一步研究。

[参考文献]

- [1] 马加庆,陈鹏,沈志强,等. 利胆止痛胶囊对小鼠抗抑菌炎、镇痛和利胆作用研究[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(1): 10.
- [2] 范晓东,王俊平,范纯富. 锦黄咽炎片主要药效学观察[J]. 实用药物与临床, 2007, 10(2): 66.
- [3] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1993: 370.
- [4] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1982: 934.
- [5] 周蓓. 鬼针草镇痛机制的初步研究[J]. 中国现代中药, 2007, 9(2): 21.
- [6] Proost P, Wuyts A, Van Damme J. The role of chemokines in inflammation[J]. Int J Clin Lab Res, 1996, 26(4): 211.
- [7] Shibata T, Nagata K, Kobayashi Y. The mechanism underlying the appearance of late apoptotic neutrophils and subsequent TNF- α production at a late stage during Staphylococcus aureus bioparticle-induced peritoneal inflammation in inducible NO synthase-deficient mice [J]. BBA-mole Basis Dis, 2010, 1802(11): 1105.
- [8] Wheeler M A, Yoon J H, Olsson L E, et al. Cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E₂ production are up-regulated in a rat bladder inflammation model[J]. Eur J Pharmacol, 2001, 417(3): 239.

[责任编辑 李玉洁]