

乌梅丸及其拆方的镇痛作用

闫曙光^{1,2}, 惠毅¹, 周永学^{1,2*}

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西省胃肠病证方药省级重点实验室, 陕西 咸阳 712046)

[摘要] **目的:**观察乌梅丸及其拆方的镇痛作用。**方法:**实验动物分为对照组、模型组、全方组、寒热并用组、温热组、寒凉组、补益组、收敛组,各组给药依照拆方原则分别给予乌梅丸方 13.3 g·kg⁻¹,寒热并用方 9.0 g·kg⁻¹,温热方 5.33 g·kg⁻¹,苦寒方 3.67 g·kg⁻¹,收敛方 2.67 g·kg⁻¹,补益方 1.67 g·kg⁻¹水煎剂灌胃,空白组、模型组均给予生理盐水 10 mL·kg⁻¹。采用热板法和扭体法,观察乌梅丸及其拆方对小鼠的镇痛作用,三硝基苯磺酸/乙醇复制溃疡性结肠炎动物模型,酶联免疫法检测结肠黏膜前列腺素 E₂(PGE₂)含量。**结果:**与对照组比较,乌梅丸全方组、寒热并用组和温热组药物能有效延长小鼠痛阈,降低小鼠扭体次数,降低溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 PGE₂含量($P < 0.05$),且 3 组间无差异;补益组药物也表现出部分抑制疼痛的作用,但效果要弱于全方组($P < 0.05$)。**结论:**乌梅丸方有明显的镇痛作用,温热组药物为其镇痛的主要药物,补益组药物有部分镇痛作用。

[关键词] 乌梅丸; 拆方; 镇痛; 前列腺素 E₂; 扭体法; 热板法

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0262-04

[doi] 10.11653/syfy2013210262

Analgesic Effect of Wumei Pill and its Disassembled Prescriptions

YAN Shu-guang^{1,2}, HUI Yi¹, ZHOU Yong-xue^{1,2*}

(1. Shaanxi College of Tradition Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Shaanxi Gastrointestinal Disease and Syndrome Formulae Provincial Key Laboratory, Xianyang 712046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the analgesic effect of Wumei pill and its disassembled prescriptions on ulcerative colitis (UC) in rats. **Method:** Experimental animals were divided into control group, model group, Wumei pill group, cold and heat group, heat group, cold group, tonic group, convergence group. According to the decomposition principle, Each group was respectively given water decoction of Wumei pill (13.3 g·kg⁻¹), cold and heat prescription (9.0 g·kg⁻¹), heat prescription (5.33 g·kg⁻¹), cold prescription (3.67 g·kg⁻¹), convergence prescription (2.67 g·kg⁻¹), and tonic prescription (1.67 g·kg⁻¹) by gavage. The control group and model group were given with saline (10 mL·kg⁻¹). Analgesic effect of Wumei pill and its prescriptions were observed by hot plate and writhing. Ulcerative colitis model was established with trinitro-benzene-sulfonic acid (TNBS) /ethanol. The PGE₂ content of colonic mucosa was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. **Result:** Compared with blank group, the Wumei pill group, cold and heat group and heat group could prolong the pain threshold of mice, reduce the writhing times and decrease the PGE₂ content of colonic mucosa in rats ($P < 0.05$). Tonic group had partly analgesic effect but the effect was weaker than Wumei pill group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Wumei pill has obvious analgesic effect, while tonic group has partly analgesic effect. The drug of heat group play an very important role for analgesic effect.

[Key words] Wumei pill; disassembled prescriptions; analgesia; PGE₂; hot plate; writhing

[收稿日期] 20120917(015)

[基金项目] 陕西省胃肠病证方药省级重点实验室培育项目(303060102147)

[第一作者] 闫曙光, 博士, 讲师, 从事方剂学教学、科研工作, Tel:029-38185353, E-mail: ysg2002.student@sina.com

[通讯作者] * 周永学, 教授, 博士研究生导师, 从事教学、科研、管理工作, Tel:029-38185353, E-mail: zhou8521@163.com

乌梅丸为《伤寒论》中治疗厥阴证的经典名方,其组方体现了中医的多种治法,正对“久泻、久利”寒热错杂,虚实夹杂的病机,治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)临床疗效显著,其配伍所体现的寒热并用法为临床治疗 UC 常用治法之一。前期实验研究发现该方有显著的抗炎、止泻作用^[1],而腹痛为 UC 临床主要症状之一,本实验以乌梅丸方所体现的不同治法和药物的寒热属性为依据进行乌梅丸及其拆方的镇痛作用研究,为该方临床治疗 UC 提供依据,为探寻该方发挥镇痛作用的有效药物奠定基础。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,体重(220 ± 20)g,西安交通大学医学院实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK(陕)2007-001;昆明种小鼠,体重(20 ± 2)g,第四军医大学实验动物中心提供,动物许可证号 SCXK-(军)第 2007-007。

1.2 药物 乌梅丸方:乌梅 16 g,细辛 6 g,干姜 10 g,桂枝 6 g,附子 6 g,蜀椒 4 g,黄连 16 g,人参 6 g,当归 4 g,黄柏 6 g。各拆方组按此剂量拆方,温热方:干姜、桂枝、附子、蜀椒、细辛;苦寒方:黄连、黄柏;寒热并用方:黄连、黄柏、干姜、桂枝、附子、蜀椒、细辛;收敛方:乌梅;补益方:人参,当归。以上药物经加水浸泡,附子先煎 0.5 h,余常规煎煮、过滤及水浴蒸发制成含生药 1 g·mL⁻¹的水煎液,高温灭菌后 4℃ 冰箱保存备用。各药物购于陕西中医学院第二附属医院中药房。

1.3 试剂和仪器 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma 公司,批号 109k4008),前列腺素 E₂(PGE₂ 试剂盒,陕西永屹生物科技有限公司,批号 20110705)。ELX808 型酶标仪(BioTek 美国伯腾仪器有限公司),JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),RCY-2 型热板测痛仪(上海欣曼科教设备有限公司)。

2 方法

2.1 扭体法镇痛实验 70 只小鼠随机分成 7 组:对照组、全方组、寒热并用组、温热组、寒凉组、收敛组、补益组,每组 10 只。全方组给乌梅丸方水煎剂 13.3 g·kg⁻¹;寒热并用组给寒热并用方水煎剂 9.0 g·kg⁻¹;温热组给温热方水煎剂 5.33 g·kg⁻¹;苦寒组给苦寒方水煎剂 3.67 g·kg⁻¹;收敛组给收敛方 2.67 g·kg⁻¹;补益组给补益方水煎剂 1.67 g·kg⁻¹,以上均为生药量;对照组、模型组均给予生理盐水 10 mL·kg⁻¹,连续 5 d。末次给药 30 min 后,小鼠以

0.6% 乙酸溶液 0.2 mL/只,ip,观察注射后 30 min 内出现扭体反应次数,记录扭体出现时间,计算镇痛率^[3]。

$$\text{镇痛率} = \frac{\text{对照组扭体次数} - \text{各拆方组扭体次数}}{\text{对照组扭体次数}} \times 100\%$$

2.2 热板法镇痛实验 热板(55 ± 0.5)℃,观察雌性小鼠出现舔足的潜伏期,筛选痛阈 5 ~ 30 s 的 70 只小鼠,随机分成 7 组,分组、给药方法和剂量同 2.1。分别记录给药前和给药后 30,60,90 min 出现舔足的潜伏期,连续观察 5 d。

2.3 溃疡性结肠炎造模实验^[2-3] 115 只 SD 大鼠随机分成 8 组:对照组、模型组、全方组、寒热并用组、温热组、寒凉组、补益组、收敛组,对照组 10 只,其余组各 15 只。除空白组外,其余各组先给予大承气汤(大黄、厚朴、枳实、芒硝、先煎厚朴、枳实,后下大黄,浓缩后,溶入芒硝,至含生药 0.95 g·mL⁻¹)ig 诱导脾胃虚寒模型,10 d 后行溃疡性结肠炎造模。大鼠禁食 24 h 后 4% 水合氯醛 5 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,将直径 2.0 mm,长 12 cm 的硅胶管涂肥皂水后由肛门轻缓插入约 8 cm,将 50% 的 TNBS/乙醇溶液按 100 mg·kg⁻¹ 用注射器缓慢推入结肠(约 0.8 mL/只),诱导溃疡性结肠炎形成。为确保 TNBS 能在大结肠内弥散性分布,注入后提起鼠尾,倒置 30 min。造模后 8 h 后开始灌胃给药,剂量同 2.1。连续 10 d。末次给药后,禁食 12 h,快速处死取肛门上约 4 ~ 10 cm 间肠段,冰生理盐水清洗,取 1 g 肠段,制成 10% 匀浆,ELISA 法检测组织 PGE₂ 含量。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 对小鼠扭体反应的影响 与对照组比较,乌梅丸全方组、寒热并用组和温热组扭体出现时间明显延长,平均扭体数降低($P < 0.05$),3 组间比较无明显差异;补益组扭体出现时间无明显变化,平均扭体数降低,但高于全方组($P < 0.01$);寒凉组扭体出现时间和平均扭体数无明显变化。见表 1。

3.2 对热板法所致小鼠疼痛的影响 给药前各组小鼠的痛阈无差异,给药 30,60,90 min 后与对照组比较,乌梅丸全方组、寒热并用组、温热组小鼠痛阈显著升高($P < 0.05$),3 组间无明显差异;补益组 60,90 min 后与对照组比较,小鼠痛阈显著升高($P < 0.05$),但增高痛阈的作用明显不如全方组

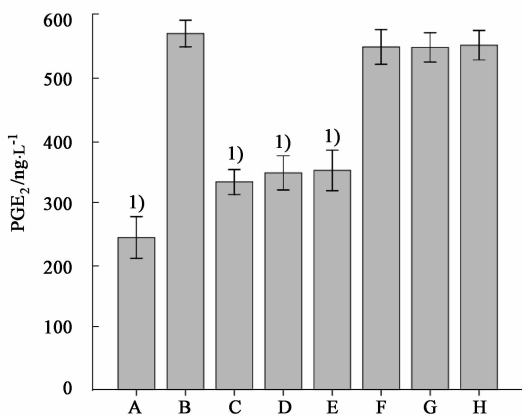
表 1 乌梅丸及各拆方对小鼠扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	扭体出现时间 / min	扭体数 / 次	镇痛率 / %
对照	-	4.02 ± 0.74	53.5 ± 6.4	0
全方	13.3	14.50 ± 5.19 ¹⁾	5.3 ± 1.9 ¹⁾	90
寒热并用	9.0	16.00 ± 2.45 ¹⁾	4.8 ± 1.7 ¹⁾	91
温热	5.33	18.12 ± 3.57 ¹⁾	4.8 ± 3.4 ¹⁾	91
寒凉	3.67	4.00 ± 0.57	48.5 ± 9.8	9
收敛	2.67	7.60 ± 1.14 ^{1,3)}	10.0 ± 3.9 ^{1,3)}	81
补益	1.67	4.98 ± 0.97 ³⁾	22.5 ± 3.3 ^{1,3)}	57

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与全方组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 乌梅丸及其各拆方对小鼠热板反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	给药前痛阈	给药 5 d 后痛阈		
			30 min	60 min	90 min
对照	-	14.40 ± 1.14	16.00 ± 1.22	16.06 ± 1.78	15.60 ± 1.51
全方	13.3	15.00 ± 1.58	25.40 ± 2.07 ¹⁾	35.00 ± 2.23 ¹⁾	36.80 ± 1.92 ¹⁾
寒热并用	9.0	14.60 ± 2.07	26.00 ± 1.58 ¹⁾	34.80 ± 1.92 ¹⁾	36.40 ± 1.67 ¹⁾
温热	5.33	13.60 ± 1.14	25.20 ± 2.38 ¹⁾	35.20 ± 1.94 ¹⁾	36.00 ± 1.87 ¹⁾
寒凉	3.67	14.00 ± 1.58	15.60 ± 1.14	15.40 ± 1.15	16.20 ± 1.30
收敛	2.67	14.80 ± 1.48	16.00 ± 1.58	16.57 ± 1.54	16.28 ± 1.93
补益	1.67	14.34 ± 1.47	17.48 ± 2.07	24.40 ± 1.61 ^{1,3)}	25.40 ± 1.33 ^{1,3)}



A. 对照组; B. 模型组; C. 全方组 13.3 g·kg⁻¹;
D. 寒热并用组 9.0 g·kg⁻¹; E. 温热组 5.33 g·kg⁻¹;
F. 寒凉组 3.67 g·kg⁻¹; G. 收敛组 2.67 g·kg⁻¹;
H. 补益组 1.57 g·kg⁻¹
与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 1 乌梅丸及各拆方对溃疡性结肠炎

大鼠结肠组织 PGE₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

激,引起黏膜下的肠神经系统的感觉异常所导致。柳瑞凤^[4]通过对 UC 患者临床症状分析,发现有腹痛症状的患者占 77.8%。梁丽娜^[5]等发现 UC 患者

($P < 0.05$),见表 2。

3.3 对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织 PGE₂ 含量的影响 UC 造模后,与对照组比较,模型组大鼠结肠组织 PGE₂ 含量显著升高($P < 0.05$);给药后,与模型组比较,乌梅丸全方组、寒热并用组和温热组大鼠结肠组织 PGE₂ 含量显著降低($P < 0.05$),已较接近对照组水平,寒凉组、收敛组和补益组的影响不明显。见图 1。

4 讨论

腹痛为 UC 患者临床重要表现之一,其发生的主要原因是炎症以及炎症介质对肠道神经的刺激,引起肠道的蠕动能异常以及对肠道黏膜创面的刺

有腹痛者占 75.0%。临床报道应用乌梅丸^[6]加减治疗溃疡性结肠炎后,患者除腹泻等消化道症状明显改善外,腹痛也明显减轻直至消失。

乙酸腹腔注射诱导的小鼠腹痛出现扭体反应,其主要机制是由于乙酸对肠道神经的刺激,引起的肠神经系统的感觉异常所导致,溃疡性结肠炎腹痛的产生机制为炎症介质对肠神经的刺激所致,两者发病机制基本相同。从表 2 可知,全方组、寒热并用组和温热组药物能延长小鼠扭体出现时间,降低扭体次数,有显著的镇痛作用,收敛组和补益组药物仅能降低平均扭体次数,也表现出了镇痛作用,而寒凉组对两者的影响均不明显,无镇痛作用。根据镇痛率分析,镇痛作用最强的是全方组、寒热并用组和温热组,其次为收敛组和补益组。根据组间比较可以推断,乌梅丸方中有镇痛作用的主要为温热类药物,有学者^[7]认为小鼠腹腔注射乙酸后出现的皮毛松散,活动减少、卷曲拱背等表现与中医“畏寒”的症状相似,这些表现在 UC 大鼠造模过程中亦可见到。中医认为,寒邪凝滞,不通则痛,温热类药物具有扩张血管,促进血液循环的作用,因此能散寒止痛,主要用于寒性疼痛或冷痛。本次实验结果也表明温热

组药物具有良好的镇痛作用,而寒凉组对乙酸诱导的腹痛无明显作用,从方剂配伍的角度分析,乌梅丸方中寒热配伍没有降低其镇痛效能,同时乌梅和补益组药物有助于增强镇痛作用,体现了其配伍的合理性。

前列腺素是参与 UC 发病的主要炎症介质,它能增加血管通透性引起组织水肿,能使白细胞趋化、聚集,直接加重炎症反应^[8],同时它又能提高末梢感受器对伤害刺激的敏感性,导致疼痛的持续发生^[9]。通过对 PGE₂ 的检测,可反映药物的抗炎、镇痛作用。实验结果表明乌梅丸全方组、寒热并用组和温热组药物能有效降低 UC 大鼠结肠组织 PGE₂ 水平,显示出抗炎镇痛作用,而 3 组药物中均含有温热组药物,因此初步推断,温热组药物是该方降低 PGE₂,发挥镇痛作用的主要药物。

本次研究结果显示,乌梅丸方能显著的提高热板法所致疼痛的痛域值,减少醋酸所致小鼠的扭体反应次数,降低 UC 大鼠结肠组织 PGE₂ 含量,有显著的止痛作用,拆方研究发现温热组药物为该方发挥止痛作用的主要药物,补益组药物有轻微的止痛作用,寒热并用的配伍方式并没有降低该方的镇痛作用。

[参考文献]

[1] 闫曙光,周永学,惠毅,等. 乌梅丸拆方对 TNBS 诱导

大鼠溃疡性结肠炎治疗作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2012,27(4):890.

[2] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:366.

[3] Min Zhang, Yin Long, Yang Sun. Evidence for the complementary and synergistic effects of the three-alkaloid combination regimen containing berberine, hypaconitine and skimmianine on the ulcerative colitis rats induced by tri-nitro benzene-sulfonic acid[J]. Eur J Pharmacol, 2011,651(1):187.

[4] 柳瑞凤. 194 例溃疡性结肠炎临床分析[J]. 宜春学院学报,2010,32(8):62.

[5] 梁丽娜,刘丽娜. 溃疡性结肠炎 140 例临床分析[J]. 大连医科大学学报,2010,32(5):531.

[6] 谭英. 乌梅丸加味治疗慢性非特异性溃疡性结肠炎 48 例总结[J]. 湖南中医杂志,2008,24(6):7.

[7] 李振吉,于文明,张先恩,等. 973 计划中医理论基础研究专项实施概要[M]. 北京:中国中医药出版社,2011:85.

[8] 李恒华,陈国庆,张毅,等. 四乙酰葛根素抗炎作用及机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):177.

[9] Jiang J, Ganesh T, Du Y, et al. Small molecule antagonist reveals seizure-induced mediation of neuronal injury by prostaglandin E₂ receptor subtype EP₂ [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2012,109(8):3149.

[责任编辑 李玉洁]