

五灵肩周丸镇痛抗炎作用和急性毒性研究

刘霁明, 孔焕育, 石光, 罗超, 曹莹, 谢宝平, 庞建新, 丘玉昌*

(南方医科大学药学院新药评价中心, 广州 510515)

[摘要] **目的:**研究五灵肩周丸的镇痛抗炎作用及急性毒性。**方法:**采用小鼠扭体实验和甲醛致痛模型来观察五灵肩周丸的镇痛作用;抗炎实验采用大鼠棉球肉芽肿实验及小鼠二甲苯致耳廓肿胀模型;采用小鼠单次 ig 的方法测定其 LD₅₀。**结果:**给予 3.8, 7.6 g·kg⁻¹ 的五灵肩周丸能明显减少醋酸所致小鼠的扭体次数 ($P < 0.05$), 抑制二甲苯引起的小鼠耳肿胀 ($P < 0.01$);五灵肩周丸在 3.8, 11.4 g·kg⁻¹ 时能明显减轻甲醛致痛实验中小鼠的 I 相疼痛反应 ($P < 0.01$), 但对甲醛引起的 II 相疼痛反应没有显著影响;剂量为 7.6 g·kg⁻¹ 时对大鼠棉球肉芽肿的形成有明显的抑制作用 ($P < 0.05$);急性毒性试验表明, 其 LD₅₀ 为 148.4 g·kg⁻¹。**结论:**五灵肩周丸具有明显的镇痛抗炎作用, 且具有较高的安全性。

[关键词] 五灵肩周丸;镇痛;抗炎;急性毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)11-0202-03

Analgesic and Anti-inflammatory Effects and Acute Toxicity of Wuling Jianzhou Pellet

LIU Ai-ming, KONG Huan-yu, SHI Guang, LUO Chao, CAO Ying,

XIE Bao-ping, PANG Jian-xin, QIU Yu-chang*

(Center for Preclinical Evaluation of New Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To study the analgesic and anti-inflammatory effects, as well as acute toxicity of the Wuling Jianzhou pellet. **Method:** Writhing method and formalin test were used in mice to evaluate the analgesic effect. Xylene induced ear swelling in mice and formation of cotton ball granuloma in rats were adopted to investigate the anti-inflammatory effect. LD₅₀ was assessed in mice. **Result:** At the dose of 3.8, 7.6 g·kg⁻¹, Wuling Jianzhou pellet significantly reduced the number of writhing induced by acetic acid ($P < 0.05$), as well as mouse ear swelling induced by xylene ($P < 0.01$). In formalin test, pain of phase I but not phase II, was reduced after administration of Wuling Jianzhou pellet at 3.8, 11.4 g·kg⁻¹ ($P < 0.01$). The formation of cotton ball granuloma was inhibited by Wuling Jianzhou pellet at 7.6 g·kg⁻¹ ($P < 0.05$). The LD₅₀ of Wuling Jianzhou pellet was 148.4 g·kg⁻¹. **Conclusion:** Wuling Jianzhou pellet has significant analgesic and anti-inflammatory effects, and exhibits low toxicity.

[Key words] Wuling Jianzhou pellet; analgesic; anti-inflammatory; acute toxicity

五灵肩周散为临床经验方, 由独活、秦艽、威灵

仙和姜黄等组成, 能祛风除湿, 活血通络、行气止痛, 对风湿痹痛作用甚好, 主要用于肩周炎、颈椎痛等的治疗。传统的五灵肩周散为汤剂, 现将其改成丸剂, 免去了煎煮过程, 易于服用且携带方便。但剂型改变后五灵肩周丸的药效学和毒性作用尚未得到考察, 本实验对其镇痛抗炎作用和急性毒性进行了研究。

[收稿日期] 20110113(004)

[第一作者] 刘霁明, 硕士研究生, 从事新药评价及糖尿病药理研究, Tel: 020-61648673, E-mail: share514@163.com

[通讯作者] * 丘玉昌, 博士, 讲师, 从事新药评价研究, Tel: 020-61648591, E-mail: qiuyuchang@yahoo.com.cn

1 材料

1.1 药物与试剂 五灵肩周丸(含独活、威灵仙、姜黄、秦艽、五加皮,组分为8:6:3:5:4),批号20100102,由广州博济医药生物技术有限公司提供,吲哚美辛肠溶片,批号091101,由江苏恩华药业有限公司生产,醋酸泼尼松,批号20090603,由广东华南药业集团有限公司生产。各种药临用前以0.5% CMC-Na配制成相应的浓度(急性毒性实验药物用生理盐水配制为相应浓度)。

1.2 动物 NIH小鼠,SPF级,体重18~22g;昆明小鼠,SPF级,体重18~22g,SD大鼠,SPF级,体重220~250g,许可证号均为SCXK(粤)2006-0015,均由南方医科大学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 醋酸扭体试验^[1] NIH种小鼠按体重随机分为5组,每组10只,雌雄各半。阴性对照组ig 0.5% CMC-Na,阳性对照组ig 吲哚美辛 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,实验组ig 五灵肩周丸 $1.9, 3.8, 7.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (以生药计,下同),各组连续给药3d,每天1次。末次给药后,把小鼠置于 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 室温适应30min,然后ip 0.6%醋酸溶液($0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重),观察每只小鼠在注射醋酸后15min内的扭体次数。

2.2 甲醛致痛实验^[1] NIH种小鼠按体重随机分为4组,每组10只,雌雄各半。模型对照组ig 0.5% CMC-Na,阳性对照组ig 吲哚美辛 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,实验组ig 五灵肩周丸 $3.8, 11.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,各组连续给药3d,每天1次。末次给药后1h,于小鼠左后肢足跖部sc 1%甲醛溶液 $25\text{ }\mu\text{L}$ 后,立即置于直径为20cm的玻璃容器中观察。分别记录注射甲醛溶液后0~5min(I相)和20~30min(II相)内小鼠疼痛反应的累计时间,并进行评分。

评分方法:舔、咬或抖足记3分,提足记2分,跛行/轻触地记1分(不动时足撑地),走动自如记0分,累积分 $= (0\times t_1 + 1\times t_2 + 2\times t_3 + 3\times t_4)$ 。其中 t_1, t_2, t_3, t_4 分别为疼痛评分0,1,2,3分的持续时间(单位s),得出各组小鼠I相和II相的累计分。

2.3 耳肿胀实验^[1] NIH种小鼠按体重随机分为5组,分组与给药同2.1,末次给药30min后,麻醉小鼠,在右耳前后两面涂布二甲苯 $25\text{ }\mu\text{L}$,30min后,用打孔器(6mm)在同一部位打下左右耳相同部位的圆耳片,分别称质量,每鼠右耳质量减去左耳质量即为肿胀度,计算肿胀抑制率。

$$\text{肿胀抑制率} = (\text{模型组耳肿胀度} - \text{给药组耳肿胀度}) / \text{模型组耳肿胀度} \times 100\%$$

2.4 大鼠棉球肉芽肿试验^[1] 将SD大鼠按体重随机分成四组,每组6只,雌雄各半,用乙醚浅麻醉,在左侧腹股沟皮下植入灭菌棉球(50 ± 1)mg/个。术后各组大鼠连续ig给药10d,每天1次。阴性对照组ig 0.5% CMC-Na溶液,阳性对照组ig 醋酸泼尼松($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),实验组ig 五灵肩周丸 $2.55, 7.64\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。末次给药后24h,处死大鼠取出棉球,将棉球放入 $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥48h,称质量,减去原棉球质量即为肉芽肿质量,计算肉芽肿抑制率。

$$\text{肉芽肿抑制率} = (\text{模型组肉芽肿质量} - \text{给药组肉芽肿质量}) / \text{模型组肉芽肿质量} \times 100\%$$

2.5 急性毒性试验 昆明小鼠,预实验求得最小全数致死量(Dm)为 $216.8\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,最大全不致死量(Dn)为 $96.2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。正式试验时,在此剂量之间按1:0.85设置6个剂量组,另设生理盐水对照组。每组12只小鼠,雌雄各半,以 $40\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ig 1次,连续观察14d,记录各组动物死亡情况,以Bliss法计算药物的半数致死量(LD₅₀)。

2.6 数据统计分析 使用SPSS 11.3软件分析,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较用t检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 醋酸扭体实验 表1的数据表明,吲哚美辛能明显减少小鼠的扭体次数($P < 0.01$),五灵肩周丸 $3.8, 7.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个剂量对醋酸引起的小鼠扭体反应有显著的抑制作用($P < 0.05$)。

表1 五灵肩周丸对醋酸引起的小鼠扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	扭体数/次	镇痛率/%
模型对照	-	43.2 ± 9.55	-
吲哚美辛	0.015	$17.2 \pm 7.51^{(2)}$	60.19
五灵肩周丸	1.9	35.3 ± 8.58	18.29
	3.8	$31.7 \pm 11.8^{(1)}$	26.62
	7.6	$31.4 \pm 9.66^{(1)}$	27.31

注:与模型对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2~5同)。

3.2 甲醛致痛实验 从表2可以看出,吲哚美辛对I相和II相疼痛均有明显的抑制作用($P < 0.01$),五灵肩周丸高、低剂量对甲醛引起的I相疼痛均有明显的镇痛作用($P < 0.01$),但对II相疼痛的作用不明显。

3.3 耳肿胀实验 吲哚美辛对二甲苯引起的耳肿胀具有明显的抑制作用($P < 0.01$),五灵肩周丸 $3.8, 7.6$

$g \cdot kg^{-1}$ 2 个剂量对二甲苯引起的耳肿胀具有显著的抑制作用 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 2 五灵肩周丸对甲醛致痛的镇痛作用 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/g \cdot kg^{-1}$	疼痛表现总积分/分	
		I相	II相
模型对照	-	331.5 ± 30.3	620.3 ± 95.7
吡哌美辛	0.025	174.5 ± 32.7 ²⁾	320.5 ± 100.8 ²⁾
五灵肩周丸	3.8	198.5 ± 12.6 ²⁾	694.0 ± 63.1
	11.4	176.6 ± 11.9 ²⁾	712.1 ± 53.9

表 3 五灵肩周丸对二甲苯引起的耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	耳肿胀度/mg	肿胀抑制率/%
模型对照	-	9.75 ± 1.57	-
吡哌美辛	0.015	3.27 ± 1.54 ²⁾	66.46
五灵肩周丸	1.9	8.05 ± 2.29	17.44
	3.8	7.31 ± 1.30 ¹⁾	25.03
	7.6	5.98 ± 1.35 ²⁾	38.67

3.4 大鼠棉球肉芽肿试验 醋酸泼尼松和五灵肩周丸 $7.6 g \cdot kg^{-1}$ 剂量对大鼠棉球肉芽肿的形成具有显著的抑制作用 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 五灵肩周丸对大鼠棉球肉芽肿的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	肉芽肿质量/mg	肿胀抑制率/%
模型对照	-	82.6 ± 12.4	-
醋酸泼尼松	0.04	53.1 ± 11.9 ¹⁾	35.7
五灵肩周丸	2.5	72.0 ± 7.9	12.8
	7.6	66.1 ± 10.7 ¹⁾	20.0

3.5 急性毒性实验 各组动物死亡情况见表 5。动物死亡前活动减少,对外界的刺激反应减弱,解剖肉眼观察未见脏器异常。采用 Bliss 法计算,小鼠的 $LD_{50} = 148.4 g \cdot kg^{-1}$, 95% 可信区间为 138.1 ~ 159.5 $g \cdot kg^{-1}$; $LD_5 = 110.7 g \cdot kg^{-1}$, 95% 可信区间为 97 ~ 126.3 $g \cdot kg^{-1}$ 。

表 5 五灵肩周丸急性毒性试验 ($n = 12$)

受试物	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	死亡数/只	死亡率/%
生理盐水	-	0	0
五灵肩周丸	216.8	12	100
	184.3	10	83.33
	156.6	8	66.67
	133.1	3	25.00
	113.2	1	8.33
	96.2	0	0

4 讨论

肩周炎,中医亦称“肩凝风”,主要由体虚或劳损,风寒湿邪内侵,经脉受阻所致,正如《济生方》所言:“皆因体虚,腠理空疏,受风寒湿气而成痹也”^[2]。中

医治疗肩周炎,以祛风除湿,活血化瘀,通络止痛为法则。五灵肩周散为经典的经验方,以独活为主药,配合威灵仙与秦艽以温经散寒止痛,佐以姜黄、五加皮活血补虚,临床用于治疗肩周炎、颈椎痛等,标本兼治,效果显著且毒副作用较小^[3]。现代药理学研究表明,五灵肩周散中的五味中药均有显著的镇痛抗炎作用,如独活煎剂能明显延长小鼠热板法造成的动物疼痛反应时间^[4],威灵仙、秦艽及姜黄水提液均能减少醋酸引起的小鼠扭体次数,抑制二甲苯所致的小鼠耳肿胀度等^[5-8]。

本研究结果表明,剂型改变为丸剂后的五灵肩周丸具有明显的镇痛及抗炎作用,对甲醛引起的急性疼痛(I相)有明显的镇痛作用,但对继发性刺激反应(II相)的镇痛作用不显著;药物对醋酸引起的小鼠疼痛反应也有明显的镇痛作用;能显著地抑制二甲苯引起的小鼠耳肿胀并且呈现一定的剂量依赖性。五灵肩周丸成人推荐日用剂量为 50 g 生药,按体重计算(成人平均体重 70 kg),小鼠 LD_{50} 相当于成人日用量的 207 倍,小鼠 LD_5 相当于成人日用量的 155 倍,表明五灵肩周丸具有一定的安全性。与传统的五灵肩周散汤剂比较,五灵肩周丸剂则省去了煎煮过程,便于患者服用、携带和贮藏。

[参考文献]

- [1] 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,1998:508,532.
- [2] 秦萍,王利红. 中医辨证治疗肩周炎 97 例[J]. 陕西中医,2005,26(11):1211.
- [3] 李伟广. 循经辨证论治肩周炎 170 例[J]. 中国针灸,2009(S1):27.
- [4] 林於,刘新,喻录容,等. 制剂工艺对独活寄生汤抗炎镇痛作用的影响[J]. 中药药理与临床,2004,20(5):2.
- [5] 章蕴毅,张宏伟,李佩芬,等. 威灵仙的解痉抗炎镇痛作用[J]. 中成药,2001,23(11):808.
- [6] 王亚,陈彦,孙玉军. 中药威灵仙研究概况[J]. 中药材,2006,29(5):513.
- [7] 穆祯强,于洋,高昊,等. 龙胆属秦艽组植物的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2009,(16):2012.
- [8] 黄勇其,耿晓照,叶世芸,等. 黔产毛郁金与姜黄的抗炎镇痛作用及急性毒性比较[J]. 时珍国医国药,2007,18(5):1053.

[责任编辑 聂淑琴]