

胃舒灵 II 抗炎和镇痛作用研究

马凤余^{1,2*}, 鄢顺琴¹, 凤良元¹

(1. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230038;

2. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230038)

[摘要] 目的: 观察胃舒灵 II 抗炎和镇痛作用。方法: 采用小鼠皮肤毛细血管通透性实验, 角叉菜胶致大鼠气囊炎症实验、小鼠福尔马林致痛和热板致痛实验等模型, 观察胃舒灵 II 对实验动物的抗炎和镇痛作用。结果: 胃舒灵 II 能显著抑制组胺引起的小鼠皮肤毛细血管通透性增加, 缩小皮肤蓝染面积, 减少染料渗出量; 可显著减少角叉菜胶诱导的大鼠急性气囊炎症的渗出液量、白细胞游出数和蛋白渗出量, 能明显降低渗出液中一氧化氮(NO) 和前列腺素 E₂(PGE₂) 含量; 可显著抑制福尔马林致痛小鼠第二时相的疼痛反应, 降低其痛阈积分值。结论: 胃舒灵 II 具有明显抗炎镇痛作用, 其抗炎镇痛作用机理可能与抑制 NO 及 PGE₂ 的合成和释放有关。

[关键词] 胃舒灵 II; 抗炎; 镇痛

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)02-0052-03

胃舒灵 II 主要由黄芪、白术、香附、干姜等药物组成, 课题组已在调整胃肠运动功能, 提高胃黏膜保护因子前列腺素 E₂(PGE₂) 水平, 增强胃黏膜内超氧化物歧化酶(SOD) 活力, 促进胃黏膜细胞合成和释放内源性一氧化氮(NO), 降低胃黏膜内丙二醛(MDA) 含量等方面做了大量实验研究。本文主要对胃舒灵 II 抗炎和镇痛作用进行研究, 为该方治疗胃炎提供理论基础和实验依据。

1 实验材料

1.1 动物 SD 大鼠, 雄性, 体重(180~220) g, 由安徽医学研究所实验动物中心提供(皖科动物准字 003 号)。昆明种小鼠, 雌雄兼有, 体重(18~22) g 由安徽医科大学实验动物房提供(皖科动物准字 001 号)。

1.2 药品与试剂 胃舒灵 II 制剂主要由黄芪、白术、香附、干姜组成。均购自合肥市义和堂饮片厂, 并经其鉴定。4 种药物按 12: 9: 6: 6 比例组成, 用 75% 的乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 过滤, 浓缩, 制备成 6 g 生药/g 制剂。萘普生缓释胶囊, 徐州恩华药业, 批号: 20050708; 角叉菜胶, 沈阳药物研究所产品(应用前一天用灭菌生理盐水配成浓度 0.25% 的

胶体溶液, 置 4℃ 冰箱保存); 依文思蓝, Fluka 进口分装, 上海化学试剂采购供应站提供; 甲醛, 上海太平洋化工集团公司溶剂厂; 牛血清白蛋白(SBA), 上海血液制品研究所; 组胺, 中科院上海化学研究所。

1.3 仪器与设备 XS-200 型生物显微镜, 南京江淮光电(集团)有限公司; 7520-G 紫外分光光度计, 上海分析仪器厂; UV-250 分光光度计, 日本岛津公司; 电热恒温干燥箱, 黄石市医疗器械厂; HANDBPING FA2101 电子天平, 上海天平仪器厂; 800 离心沉淀器, 上海手术器械厂。

2 实验方法

2.1 小鼠皮肤毛细血管通透性实验^[1]

2.1.1 依文思蓝标准曲线的制备 将依文思蓝配成 7 个系列浓度, 在 7520 分光光度计 620 nm 处测吸光度(A) 值, 以吸光度(A) 值为横坐标, 浓度为纵坐标, 得回归直线方程: $y = 23.838x - 0.2329$, $r = 0.9952$ 。

2.1.2 小鼠皮肤毛细血管通透性实验 取昆明种小鼠 50 只, 雌雄各半, 随机分成 5 组, 分组及给药剂量见表 1。各给药组连续 ig 7 d, 模型对照组给等容量的 NS。第 6 d 腹部脱毛(2 cm × 2 cm), 第 7 d 给药 1 h 后于每只小鼠尾静脉注射 0.5% 依文思蓝 0.01 mL·g⁻¹, 并立即腹部 sc 20 μL 组胺(以 PBS 盐水 pH 7.7 配成 0.1% 溶液)。20 min 后脱颈椎处死小鼠, 剥皮测着色斑面积, 以长径 × 短径 cm² 表示。将蓝染

[收稿日期] 2007-08-09

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目(97JL129)

[通讯作者] * 马凤余, Tel: (0551) 5169044; E-mail: mfy492@sohu.com

皮肤剪碎,放入盛有体积比为 7:3 丙酮生理盐水溶液 4 mL 中,浸泡 24 h,离心(2 500 r·min⁻¹, 10 min),取上清液,于 620 nm 处测吸收度(A)值,从标准曲线得出染料渗出量,结果以 μg·mL⁻¹表示。

2.2 角叉菜胶致大鼠气囊炎症实验

2.2.1 大鼠角叉菜胶气囊炎症模型的制备^[2-3] 取 SD 大鼠,雄性,体重(180~220)g,48 只,随机分成 6 组,分组及给药剂量见表 2。第 1 d 于各组大鼠背部肩胛区(局部皮肤消毒)sc 注入无菌空气 20 mL 形成气囊,第 3 d 补充注射无菌空气 10 mL,以防囊腔闭合。各给药组连续 ig 7 d,假手术对照组,模型对照组分别给同容量的 NS,第 7 d 给药 1 h 后,于造模各组大鼠气囊内注入 0.25% 角叉菜胶 2 mL 致炎,假手术对照组则于大鼠气囊内注入等容量的 NS,立即将鼠背朝下徐徐转运,使致炎剂或 NS 与囊壁组织均匀接触。致炎 6 h 后,ip 戊巴比妥钠 40 mg·kg⁻¹ 进行麻醉,然后以 NS 4 mL 灌洗气囊,收集灌洗液于 10 mL 刻度试管中,准确计量,并计算出渗出液量。渗出液量=灌洗液总量-4 mL。将灌洗液离心(2 500 r·min⁻¹, 10 min),取上清液,按渗出液量统一倍数稀释,并测定下述指标。

2.2.2 白细胞数的测定^[1] 将离心(2 500 r·min⁻¹, 10 min)沉淀细胞重悬于 4 mL NS 中,吸取 0.1 mL 灌洗液,加 2 mL 白细胞稀释液,于显微镜下计数。

2.2.3 渗出液中蛋白含量测定^[3] 用蒸馏水将 BSA 配成 5 个系列浓度,在 UV-2500 分光光度计 650 nm 处测吸光度值(A),以吸光度(A)为横坐标,BSA 浓度为纵坐标,得回归直线方程: $y = -0.0091 + 1.0635x$, $r = 0.9986$ 。取稀释上清液 1.0 mL,按上述方法测吸光度值(A)。根据回归曲线得出蛋白浓度,再乘以稀释倍数,即为渗出液的蛋白含量,结果以 mg·mL⁻¹表示。

2.2.4 渗出液中 NO 含量的测定 采取催化光度法^[4]。根据室温下孔雀石绿与溴酸钾在磷酸介质中的退色反应受 NO₂⁻ 的催化而加速,当反应稳定时,孔雀石绿在指示反应中退色速度仅与 NO₂⁻ 成正比,测定此反应体系中孔雀石绿退色反应速度,测出溶液中 NO₂⁻ 的含量,通过测定的 NO₂⁻ 含量,反应渗出液中 NO 水平。

2.2.5 渗出液中 PGE₂ 的含量测定 取稀释上清液 0.5 mL,加入 0.5 mol·L⁻¹ KOH-甲醇液 2 mL,在 50℃ 水浴中,异构化 20 min,然后加甲醇至 5 mL 进行稀

释,在 UV-250 分光光度计 278 nm 紫外光处测值(A)。

2.3 小鼠福尔马林致痛实验^[5] 取昆明种小鼠 50 只,雌雄各半,随机分成 5 组,分组及剂量与 2.1.2 同。各组连续 ig 给药 7 d,末次给药后立即于小鼠左足跖 sc 20 μL 1% 甲醛,观察(0~5) min(第一时相)和(20~30) min(第二时相)的反应。用改良的 Dubuission 加权积分法,对小鼠的痛反应做如下评分:行走自如计 0 分;跛行、不动时足撑地计 1 分;抬足计 2 分;舔足、咬足或抖足计 3 分。分别记录两个时相内各累计分并计算加权值: $(0t_1 + 1t_2 + 2t_3 + 3t_4) / (t_1 + t_2 + t_3 + t_4)$ 。

2.4 小鼠热板致痛实验^[5] 按热板法,取体重(18~22)g 雌性小鼠置于(55±0.5)℃ 恒温水浴 1 000 mL 烧杯内,测小鼠痛阈值,筛选痛阈平均值大于 5 s 小于 30 s 的小鼠 50 只,随机分成 5 组,分组及剂量与 2.1.2 相同。各组连续 ig 给药 7 d,于末次给药 15, 30, 60, 90, 120 min,依次测量各小鼠的痛阈值(s)。

2.5 数据处理与统计学检验 各组实验数据均以均值加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用 student' t 检验,两变量间相互关系采用直线相关分析和直线回归分析。

3 结果

3.1 对小鼠皮肤毛细血管通透性的影响 胃舒灵 II 大、中剂量组(2.64, 1.76 g·kg⁻¹) 能明显抑制组胺所致的小鼠皮肤毛细血管通透性增加,使皮肤蓝染面积缩小,染料渗出量减少。结果见表 1。

表 1 胃舒灵 II 对小鼠皮肤毛细血管通透性的影响($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	蓝染面积 (cm ²)	Evans 蓝染浓度 (μg·mL ⁻¹)	抑制率 (%)
NS	-	3.17±0.70	2.61±0.96	-
胃舒灵 II	2.64	2.08±0.49 ²⁾	1.48±0.49 ²⁾	43.2
	1.76	2.44±0.57 ¹⁾	1.70±0.61 ¹⁾	34.7
	0.88	2.74±0.78	2.30±0.81	11.6
萘普生胶囊	0.065	1.82±0.69 ²⁾	1.33±0.39 ²⁾	49.1

注:与 NS 组比较¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01

3.2 对角叉菜胶致大鼠气囊渗出液量及渗出液中白细胞数、蛋白、NO 及 PGE₂ 含量的影响 模型对照组大鼠角叉菜胶致炎 6 h 后,气囊渗出液量,渗出液的白细胞数、蛋白质含量均明显增多,与假手术对照组比较均有非常显著差异。胃舒灵 II 3 个剂量组与

模型对照组比较能明显减少气囊炎症渗出液量、渗出液的白细胞数和蛋白含量,并能显著减少渗出液

中 NO 和 PGE₂ 含量。提示胃舒灵 II 有明显的抗炎作用。结果见表 2。

表 2 胃舒灵 II 对角叉菜胶致大鼠气囊渗出液量及渗出液中白细胞数、蛋白、NO 及 PGE₂ 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	渗出液量 (mL)	白细胞数 (×10 ⁷ ·mL ⁻¹)	蛋白含量 (mg·mL ⁻¹)	NO 含量 (nmol·mL ⁻¹)	PGE ₂ 含量 (A)
假手术对照	-	0.59 ± 0.18 ³⁾	2.02 ± 0.41 ³⁾	2.08 ± 0.31 ¹⁾	23.12 ± 10.03 ²⁾	2.259 ± 0.743 ¹⁾
模型对照	-	1.51 ± 0.30	3.80 ± 0.58	2.54 ± 0.27	38.40 ± 5.27	3.334 ± 0.930
胃舒灵 II	1.84	0.89 ± 0.15 ²⁾	2.43 ± 0.58 ²⁾	1.78 ± 0.52 ¹⁾	25.76 ± 4.82 ²⁾	2.293 ± 0.838 ¹⁾
	1.23	1.07 ± 0.19 ²⁾	2.85 ± 0.31 ²⁾	1.99 ± 0.24 ¹⁾	25.53 ± 4.44 ²⁾	2.380 ± 0.617 ¹⁾
	0.61	0.82 ± 0.55 ¹⁾	2.97 ± 0.28 ¹⁾	2.42 ± 0.18	20.22 ± 3.87 ³⁾	3.134 ± 1.217
萘普生胶囊	0.045	0.74 ± 0.34 ²⁾	1.67 ± 0.27 ³⁾	1.49 ± 0.40 ²⁾	23.80 ± 6.15 ²⁾	2.297 ± 0.799 ¹⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01, ³⁾ P < 0.001(下同)

3.3 对小鼠福尔马林致痛的影响 胃舒灵 II 大、中、小剂量组与模型对照组比较显著降低致痛小鼠第二时相(20~30) min 的痛阈积分值(P < 0.05, P < 0.01);对福尔马林致痛小鼠第一时相(0~5) min 的痛阈积分值影响无统计学意义。结果见表 3。

表 3 胃舒灵 II 对小鼠福尔马林致痛的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 (g·kg ⁻¹)	痛阈积分值		疼痛抑制率(%)	
		第一时相	第二时相	第一时相	第二时相
模型对照组	-	2.93 ± 0.96	2.69 ± 0.87	-	-
胃舒灵 II	2.64	2.45 ± 0.95	1.55 ± 0.85 ¹⁾	16.4	42.4
	1.76	2.38 ± 1.07	1.18 ± 0.78 ²⁾	18.8	56.1
	0.88	2.49 ± 1.15	1.30 ± 0.59 ²⁾	15.0	51.7
萘普生组	0.065	2.16 ± 0.89	0.78 ± 0.42 ³⁾	26.3	71.1

3.4 对小鼠热板致痛的影响 胃舒灵 II 各剂量组与 NS 组比较,对致痛小鼠各时点的痛阈值有一定程度的提高,但无统计学意义。

4 讨论

本文采用小鼠皮肤毛细血管通透性实验和大鼠气囊炎症实验,结果胃舒灵 II 能显著抑制组胺所致的小鼠皮肤毛细血管通透性,使皮肤蓝染面积缩小,染料渗出量减少;能明显减少大鼠气囊炎症渗出液量、渗出液的白细胞数和蛋白质含量,并显著减少渗出液中 NO 和 PGE₂ 含量。表明,胃舒灵 II 有明显的抗炎作用。其抗炎作用机理可能与降低毛细血管通透性,减少蛋白渗出,抑制白细胞游走,减少 PGE₂ 及 NO 等炎症介质的生成有关。

福尔马林致痛模型是目前公认的一种较好的研究药物镇痛作用的模型,可用于筛选弱镇痛药^[6]。其疼痛刺激持久,因而与某些临床疼痛具有良好的相似性,且其疼痛反应分为两个时相,分别代表不同类型的疼痛,第一时相为直接刺激神经末梢所致,第

二时相为炎症介质的产生、释放引起。本文结果表明,胃舒灵 II 3 个剂量组均可显著降低福尔马林致痛后第二时相的痛反应评分,对第一时相无影响。已知 NO 在外周和中枢水平参与痛觉的调制^[7]。PGE₂ 作为一种重要的炎症介质,参与疼痛反应的介导。其对炎症性疼痛的影响可能是通过对缓激肽或组胺的痛觉增敏作用实现的^[8]。胃舒灵 II 能使大鼠炎症气囊渗出液中 NO, PGE₂ 含量明显减少,提示胃舒灵 II 对外周炎症疼痛部位 NO, PGE₂ 的合成和释放有抑制作用,这可能是其镇痛作用机理之一。

[参考文献]

[1] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,1992.693-696.

[2] J. C. W. Edwards, A. D. Sedgwick, D. A. Willoughby. The formation of a structure with the feature of synovial lining by subcutaneous injection of air; an vivo tissue culture system [J]. *Athology*, 1981, 134: 147-156.

[3] 马凤余,鄢顺琴,凤良元,等.胃舒灵 II 抗炎作用与机制研究[J]. *安徽中医学院学报*, 2003, 22(3): 41-44.

[4] 旁战军.自由基医学研究方法[M].北京:人民卫生出版社,2000.239.

[5] 王玉香,刘青云,彭代银.痹复康抗炎和镇痛作用的实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2001, 7(5): 44-46.

[6] Hunskaar. S, Fasmer. O. B, Hole. K. Formalin test in mice a useful technique for evaluating mild analgesics [J]. *J Neurosci Methel*, 1985, 14: 69-76.

[7] 田今华,王晓民,韩济生.一氧化氮与痛觉调制[J]. *生理科学进展*, 1996, 27(2): 161-163.

[8] 见毕涉,高骥授.炎症与抗炎症药[M].北京:人民卫生出版社,1993.12-20.