

芪桂痛风片对痛风性关节炎动物模型的镇痛研究

邓奕^{1,2,3}, 张红^{1,2,3}, 曹亮^{1,2,3}, 丁岗^{1,2,3}, 王振中^{1,2,3}, 萧伟^{1,2,3*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

3. 江苏省企业院士工作站, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 观察芪桂痛风片对大鼠关节炎模型、小鼠热板和醋酸致小鼠扭体模型的影响。方法 给予芪桂痛风片5 d后, 观察芪桂痛风片对尿酸钠致大鼠关节炎模型痛阈改变的影响; 采用小鼠热板模型, 观察小鼠给予芪桂痛风片后舔足潜伏期的变化; 小鼠 ip 0.7%醋酸, 观察给予芪桂痛风片后对小鼠扭体反应次数和扭体潜伏期的影响。结果 大鼠关节炎模型造模1 h后, 芪桂痛风片8.10 g/kg 剂量组大鼠痛阈降低值和降低率与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$); 造模3、5 h后, 芪桂痛风片4.05、8.10 g/kg 剂量组大鼠痛阈降低值和降低率较模型组低, 且差异均具有显著性 ($P < 0.05$ 、0.01)。末次给药60、90、120 min后, 芪桂痛风片各剂量(11.70、5.85、2.93 g/kg)组小鼠舔足潜伏期均比模型组延长。芪桂痛风片各剂量(11.70、5.85、2.93 g/kg)组小鼠扭体次数和扭体率均低于模型组, 小鼠扭体潜伏期高于模型组。结论 芪桂痛风片能够减轻尿酸钠注射引起的大鼠关节痛阈降低, 并减轻小鼠热板和醋酸引起的疼痛, 提示芪桂痛风片具有抗实验性痛风性关节炎作用。

关键词: 芪桂痛风片; 痛风性关节炎; 关节炎试验; 热板试验; 醋酸扭体试验

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)06-0589-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.06.002

Analgesic effects of Qigui Tongfeng Tablets on rats and mice with gouty arthritis

DENG Yi^{1,2,3}, ZHANG Hong^{1,2,3}, CAO Liang^{1,2,3}, DING Gang^{1,2,3}, WANG Zhen-zhong^{1,2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

3. Jiangsu Enterprise Academician Workstation, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To investigate the effects of the Qigui Tongfeng Tablets on monosodium urate crystal-induced arthritis in rats and mice, as well as to observe the analgesic effects in mice. **Methods** Pain threshold changes of rats with arthritis model induced by intra-articular injection of monosodium urate crystal suspension inside the ankle joint were observed after administrated Qigui Tongfeng Tablets for 3 d. The latency of licking foot was measured after being administrated Qigui Tongfeng Tablets in hot-plate model mice. The writhing times and writhing latency of mice with pain model induced by ip 0.7% acetic acid were observed after administrated Qigui Tongfeng Tablets. **Results** There was significant difference ($P < 0.01$) between the model group and 8.10 g/kg Qigui Tongfeng Tablets group in the value and rate of pain threshold changes after 1 h arthritis model being made, and there was also significant difference ($P < 0.05$, 0.01) between the model group and 4.05, 8.10 g/kg Qigui Tongfeng Tablets groups after 3, 5 h. The latency of licking foot of mice in Qigui Tongfeng Tablets (11.70, 5.85, 2.93 g/kg) groups was longer than that of mice in the model group after 60, 90, and 120 min since last administration. The writhing times and writhing rats of mice in Qigui Tongfeng Tablets (11.70, 5.85, 2.93 g/kg) groups were lower than those of mice in the model group, while writhing latency opposite. **Conclusion** Qigui Tongfeng Tablets have the effects of reducing pain threshold decrease of arthritis model of rats induced by intra-articular injection, relieving the mice pain induced by hot-plate and acetic acid. It suggests that Qigui Tongfeng Tablets could exert the effect in the treatment of acute gouty arthritis.

Key words: Qigui Tongfeng Tablets; gouty arthritis; analgesia test; hot-plate test; writhing test

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 国家重大新药创制项目(2013ZX09402203)

作者简介: 邓奕, 理学硕士, 主要从事中药、天然药物临床前药理毒理研究。Tel: (025) 86587935-8212 E-mail: forest623@126.com

*通信作者 萧伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzh-nj@163.net

痛风性关节炎是以高尿酸血症为生化基础, 继发尿酸盐结晶沉积、关节损害、结石形成所致的急性慢性关节炎^[1]。严重者可造成骨质破坏、关节畸形, 表现为关节红、肿, 疼如刀绞, 痛剧难忍。目前治疗药物如非甾体类抗炎药普遍具有难以承受的副作用, 如胃肠毒性、肾毒性或胃肠道出血等^[2]。中药和天然药物具有多靶点治疗、副作用小的特征, 因此从中药和天然药物中寻找能够治疗痛风性关节炎的有效低毒药物具有重要意义。芪桂痛风片来源于临床经验方, 由黄芪、五加皮、桂枝、浙贝母、刘寄奴、秦皮等 8 味中药组成, 具有扶正祛邪、通络止痛的功效, 用于慢性痛风性关节炎, 症见脏腑气弱、痰瘀阻滞、经络不通导致的轻、中度疼痛。本研究以注射尿酸钠致大鼠关节炎模型观察芪桂痛风片治疗痛风性疼痛的作用效果, 并以小鼠热板及醋酸扭体模型, 验证芪桂痛风片的镇痛效果。

1 材料和仪器

1.1 药品与试剂

芪桂痛风片, 含生药 5.95 g/片, 拟临床人日用量为以生药计 0.64 g/kg, 江苏康缘药业股份有限公司, 批号 20111020; 阿司匹林泡腾片, 含阿司匹林 0.5 g/片, 临床人日用量以阿司匹林计 0.03 g/kg, 阿斯利康制药有限公司, 批号 1111134; 痛风定胶囊, 临床人日用量以内容物计 0.07 g/kg, 成都中汇制药有限公司, 批号 100805; 尿酸, 美国 Alfa 公司, 批号 10137154; 氢氧化钠, 南京化学试剂有限公司, 批号 11121911646; 盐酸, 南京化学试剂有限公司, 批号 09091030448; 聚山梨酯 80, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 F20050324; 冰醋酸, 南京化学试剂有限公司, 批号 11082511054。

尿酸钠混悬液的配制: 194 mL 蒸馏水加 1 mol/L NaOH 6 mL, 煮沸, 加 1 g 尿酸, 用 1 mol/L 盐酸调 pH 7.2, 搅拌冷却。4 °C 冰箱保存 24 h, 去上清液, 用滤纸将沉淀物水分吸干, 放入干燥箱, 70 °C 烘 2 h, 取出, 刮下粉末, 放入研钵内研成细末, 用 60 目的金属网筛过筛, 装瓶备用。250 mg 尿酸钠结晶加 9 mL 生理盐水, 再加 1 mL 聚山梨酯 80, 加热搅拌, 配成 10 mL 尿酸钠混悬液。

1.2 仪器

YLS—3E 电子压痛仪, 济南益延科技发展有限公司; MP12001 型电子天平, 上海市恒平科学仪器有限公司; YLS—6B 智能热板仪, 山东省医学科学院设备站。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠, 雄性, 体质量 180~220 g, 由苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司提供, 生产许可证 SCXK (苏) 2009-0001; 清洁级 ICR 小鼠, 体质量 18~22 g, 由南通大学实验动物中心提供, 生产许可证 SCXK (苏) 2008-0010, 使用许可证号 SYXK (苏) 2003-0029。

2 方法

2.1 对尿酸钠致急性关节炎大鼠痛阈的影响

SD 大鼠 72 只, 适应性饲养 3 d 后, 称定质量, 按照体质量随机分为 6 组, 每组 12 只, 即模型组, 阳性药阿司匹林组, 痛风定胶囊组, 芪桂痛风片高、中、低剂量组。模型组 ig 给予蒸馏水 10 mL/kg, 阿司匹林组 ig 给予阿司匹林 0.18 g/kg, 痛风定胶囊组 ig 给予痛风定胶囊 0.43 g/kg, 芪桂痛风片组分别 ig 给予芪桂痛风片 8.10、4.05、2.03 g/kg (以生药计, 相当于临床等效剂量 2、1、1/2 倍)。各组给药容积均为 10 mL/kg, 1 次/d, 连续给药 5 d。使用尿酸钠造模前, 各组大鼠使用电子压痛仪进行大鼠右踝关节基础痛阈测定, 为防止机械损伤, 机械压力控制在 500 g 以内, 并在痛阈测定前 2 d 对大鼠进行训练。末次给药后, 各组大鼠用足跖容积测定仪测定造模前大鼠右后足足跖容积, 给药 1 h 后用 6 号注射针在各大鼠右侧踝关节背侧从 45°方向插入胫骨肌腱内侧, 将 0.2 mL 尿酸钠溶液注入到踝关节腔^[3]。各组大鼠在尿酸钠造模后 1、3、5 h 测定大鼠右踝关节痛阈, 计算痛阈降低值和痛阈降低率。

痛阈降低值=造模前大鼠右踝关节痛阈-造模后大鼠右踝关节痛阈

痛阈降低率=(造模前大鼠右踝关节痛阈-造模后大鼠右踝关节痛阈)/造模前大鼠右踝关节痛阈

2.2 对热板致小鼠舔足的影响

ICR 小鼠 130 只, 雌性, 适应性饲养 3 d。第 4 天筛选在 5~30 s (痛阈) 内发生舔足的小鼠用于实验 (记录痛阈合格动物的痛阈时间)。将筛选合格的小鼠按痛阈值高低随机分为 5 组, 每组 20 只, 即对照组, 痛风定胶囊组, 芪桂痛风片高、中、低剂量组。对照组 ig 给予蒸馏水 20 mL/kg, 痛风定胶囊组 ig 给予痛风定胶囊 0.62 g/kg; 芪桂痛风片组分别 ig 给予芪桂痛风片 11.70、5.85、2.93 g/kg (以生药计, 相当于临床等效剂量的 2、1、1/2 倍)。各组给药容积均为 20 mL/kg, 1 次/d, 连续给药 5 d。末次给药后 60、90、120 min, 将小鼠放在预热 (52±0.5)

℃的金属板上, 观察并记录小鼠舔后足反应的潜伏期作为痛阈指标(以 30 s 作为小鼠添足潜伏期上限, 以免烫伤小鼠皮肤)^[4]。

2.3 对醋酸致小鼠扭体的影响

ICR 小鼠 112 只, 雄性, 适应性饲养 3 d 后, 将小鼠随机分为 5 组, 每组 20 只, 即对照组, 痛风定胶囊组, 芪桂痛风片高、中、低剂量组。对照组 ig 给予蒸馏水 2.0 mL/kg, 痛风定胶囊组 ig 给予痛风定胶囊 0.62 g/kg; 芪桂痛风片组分别 ig 给予芪桂痛风片 11.70、5.85、2.93 g/kg (以生药计, 相当于临床等效剂量的 2、1、1/2 倍)。各组给药容积均为 20 mL/kg, 1 次/d, 连续给药 5 d。末次给药后 1 h, 各组小鼠 ip 0.7%醋酸 0.2 mL/只, 观察 15 min 内各

组小鼠扭体反应次数和扭体潜伏期^[4]。

2.4 统计方法

资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 量反应资料统计方法采用 *t* 检验, 质反应资料统计方法采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对尿酸钠致急性关节炎大鼠痛阈的影响

造模 1 h 后, 芪桂痛风片高剂量组大鼠痛阈降低值和降低率与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$); 造模 3、5 h 后, 大鼠右踝关节痛阈降低较为明显, 各药物组大鼠右踝关节痛阈改变较模型组低, 其中芪桂痛风片高、中剂量组痛阈降低值和降低率与模型组比较差异均具有显著性 ($P < 0.05、0.01$)。结果见表 1。

表 1 芪桂痛风片对尿酸钠致急性关节炎大鼠右踝关节痛阈降低值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)
Table 1 Effect of Qigui Tongfeng Tablets on pain threshold in arthritis model of rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	基础痛阈/g	痛阈降低值/g			痛阈降低率/%		
			1 h	3 h	5 h	1 h	3 h	5 h
模型	—	367.59±61.38	27.58±11.13	53.53±15.89	71.59±20.85	7.45±2.56	14.64±4.09	19.63±5.56
阿司匹林	0.18	364.44±63.54	16.32±11.47*	36.12±14.31**	53.16±22.17*	4.50±3.19*	9.69±3.56**	14.56±5.33*
痛风定胶囊	0.43	371.89±66.40	23.73±8.34	45.06±12.93	64.58±16.10	6.79±3.23	12.61±4.50	18.12±6.24
芪桂痛风片	2.03	375.38±57.90	21.51±9.77	47.01±17.30	70.93±34.48	5.99±3.48	12.70±4.87	19.00±8.76
	4.05	373.55±56.65	19.01±10.66	39.88±12.42*	54.80±16.70*	5.31±3.23	10.90±3.74*	14.91±4.58*
	8.10	379.56±35.42	12.11±22.46*	28.03±18.94**	42.77±19.55**	3.22±5.90*	7.49±5.35**	11.34±5.35**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3.2 对热板致小鼠舔足的影响

实验结果显示, 给药后各组小鼠舔足潜伏期均比模型组延长。给药 60 min 后, 芪桂痛风片高剂量组与对照组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$); 给药 90 min 后, 芪桂痛风片各剂量组与

对照组比较差异均具有显著性 ($P < 0.05、0.01$); 给药 120 min 后, 芪桂痛风片中、高剂量组与对照组比较差异均具有显著性 ($P < 0.05$); 提示芪桂痛风片能减轻小鼠由热板引起的疼痛。结果见表 2。

表 2 芪桂痛风片对小鼠热板舔足潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)
Table 2 Effect of Qigui Tongfeng Tablets on hot-plate test in mice ($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	舔足潜伏期/s		
		60 min	90 min	120 min
对照	—	14.01±3.12	14.34±3.67	14.18±3.71
痛风定胶囊	0.62	16.27±5.49	18.98±6.04**	17.47±4.55**
芪桂痛风片	2.93	16.20±6.58	18.26±6.08*	15.43±4.43
	5.85	16.64±5.92	19.83±5.82**	16.85±3.97*
	11.70	18.48±4.89**	21.07±5.06**	17.36±3.78*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs normal group

3.3 对醋酸致小鼠扭体的影响

对小鼠扭体的 χ^2 检验结果可见, 各给药组小鼠扭体率均低于模型组, 其中芪桂痛风片高剂量组与模型组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$); 对小鼠扭体次数的 t 检验结果可见, 各给药组小鼠扭体次数低于模型组, 其中芪桂痛风片高、中剂量组与模型

组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$); 对小鼠扭体潜伏期的 t 检验结果可见, 各给药组小鼠扭体潜伏期高于模型组, 其中芪桂痛风片高、中剂量组与模型组比较差异均具有显著性 ($P < 0.05$ 、 0.01)。提示芪桂痛风片能减轻小鼠由醋酸引起的疼痛。结果见表 3。

表 3 芪桂痛风片对小鼠扭体的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of Qigui Tongfeng Tablets on hot-plate test in mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	扭体动物数/只	扭体率/%	扭体次数/次	扭体潜伏期/s
模型	—	18	90	23.35 ± 11.35	299.50 ± 218.29
痛风定胶囊	0.62	17	85	16.05 ± 12.07	377.90 ± 241.87
芪桂痛风片	2.93	17	85	19.10 ± 11.78	412.20 ± 232.40
	5.85	15	75	12.90 ± 10.41**	486.45 ± 286.54*
	11.70	12	60*	10.60 ± 9.65**	568.90 ± 288.78**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

痛风性关节炎是痛风病的中期阶段, 西医认为该病的发病机制与遗传因素和环境因素有关, 由于基因突变等原因引发酶的结构改变和/或尿酸盐转运蛋白功能改变导致尿酸合成增多和排泄减少, 同时在高嘌呤饮食、酗酒、肥胖等饮食习惯和生活方式影响下出现高尿酸血症。而高尿酸血症是否引发痛风性关节炎的发作还有诱发因素, 如全身因素包括精神紧张、疲劳、酗酒、感染等, 局部因素包括温度、pH 值、创伤, 均可诱使尿酸盐结晶沉积引起急性痛风发作^[5]。

中医认为本病病因复杂, 涉及先天后天、气血津液、内因外因、饮食、情志等多种因素。其中禀赋不足、脏腑功能下降是发病之本, 外感、内生之邪是发病的主要条件, 饮食失节是本病诱发和加重的重要因素^[6]。源于此, 芪桂痛风片处方以黄芪建中汤之意为基础, 结合临床证候特点和多年临床经验配伍组合而成, 临床应用表明疗效确切。此外处方所含药材中五加皮有抗关节炎和镇痛作用^[7], 桂枝、浙贝母、刘寄奴均在实验性疼痛模型中表现出良好镇痛作用^[8-10], 秦皮具有抗炎镇痛和降低血尿酸的作用^[11], 进一步提示处方配伍的合理性。

本研究中采用尿酸钠结晶注射法造成急性大鼠关节炎模型, 模拟痛风性关节炎的急性发作过程。关节腔内的尿酸盐结晶被白细胞吞噬后, 细胞膜破裂, 产生氧自由基, 释放出溶酶体酶、激肽、组胺、

趋化因子等物质, 引起局部血管扩张和渗透性增加、血浆渗出、白细胞聚集等炎症反应; 炎细胞释放白细胞介素-1、肿瘤坏死因子等细胞因子, 激活环氧化酶-2、合成前列腺素, 使炎症进一步扩大, 组织被溶解侵蚀, 从而表现出急性痛风性关节炎的典型症状^[12]。造模后大鼠关节出现明显的红肿热痛等炎症反应, 在压痛检测中表现为痛阈降低、痛觉敏感, 与临床上痛风的急性发作症状相似。

给予芪桂痛风片之后, 大鼠的痛阈降低值和痛阈降低率有所下降, 即痛觉过敏有所改善, 且呈现一定的剂量相关性, 提示芪桂痛风片对尿酸钠所致的关节炎性疼痛有一定的治疗作用。同时芪桂痛风片对小鼠热板和醋酸注射所致的疼痛均有一定的抑制作用, 该结果与芪桂痛风片对大鼠关节炎的镇痛作用趋势一致。提示芪桂痛风片对于痛风引起的关节炎具有良好的镇痛作用, 同时避免了化学镇痛药物的副作用, 值得进一步深入研究其镇痛作用机制, 并考察其对痛风疾病其他相关药效的作用。

参考文献

- [1] Richette P, Bardin T. Gout [J]. *Lancet*, 2010, 375(9711): 318-328.
- [2] Martin W J, Herst P M, Chia E W, et al. Sesquiterpene dialdehydes inhibit MSU crystal-induced superoxide production by infiltrating neutrophils in an *in vivo* model of gouty inflammation [J]. *Free Rad Bio Med*, 2009, 47(5): 616-621.

- [3] Coderre T J, Wall P D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant [J]. *Pain*, 1987, 28(3): 379-393.
- [4] 徐叔云, 卞如濂, 陈修, 等. 药理实验方法学 [M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 882-884.
- [5] 周莉. 痛风的发病机制 [J]. 医学综述, 2007, 13(21): 1626-1628.
- [6] 杨保林, 丁岗. 痛风性关节炎中医论治浅析 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2010, 8(8): 201-203.
- [7] 高月来, 沈烈行. 五加皮成分和药理作用研究进展 [J]. 山东中医药大学学报, 2000, 24(5): 392-393.
- [8] 赵耀. 桂枝的现代药理与临床应用浅议 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(9): 77.
- [9] 方修贵, 郑益清, 王桂林. 六月霜及其饮品的开发研究 [J]. 食品工业科技, 2001, 22(1): 61-62.
- [10] 张明发, 沈雅琴, 朱自平, 等. 辛温(热)合归脾胃经中药药性研究 IV. 镇痛作用 [J]. 中药药理与临床, 1996, 12(4): 2-5.
- [11] 方莲花, 吕扬, 杜冠华. 秦皮的药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2732-2736.
- [12] Sabina E P, Rasool M, Mathew L, *et al.* 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation-an *in vivo* and *in vitro* study [J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(1): 229-235.