

## 元胡止痛滴丸对硝酸甘油诱导大鼠实验性偏头痛的镇痛作用及其机制研究

冯 玥<sup>1</sup>, 胡金芳<sup>1</sup>, 邸志权<sup>1</sup>, 许 浚<sup>2</sup>, 张铁军<sup>2</sup>, 申秀萍<sup>1</sup>

1. 天津药物研究院新药评价有限公司, 天津 300301

2. 天津药物研究院, 天津 300193

**摘要:** **目的** 研究元胡止痛滴丸对大鼠实验性偏头痛的镇痛作用及其作用机制。**方法** Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、正天丸 (3.0 g/kg) 组以及元胡止痛滴丸 0.4、0.8、1.6 g 生药/kg 组, 每组 10 只, ig 给药, 给药体积 0.5 mL/100 g, 1 次/d, 连续给药 3 d。对照组和模型组给予等体积的去离子水。末次给药后 30 min, 除对照组外, 其余各组大鼠 sc 硝酸甘油注射液 10 mg/kg, 复制大鼠实验性偏头痛模型。立即记录大鼠搔头潜伏期以及 60 min 内的搔头次数, 计算搔头潜伏期延长率和搔头次数抑制率。测定大鼠脑组织和血清中多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)、 $\beta$ -内啡肽( $\beta$ -EP)、降钙素基因相关肽(CGRP)、NO 水平。**结果** 与模型组比较, 元胡止痛滴丸 0.8、1.6 g 生药/kg 组偏头痛大鼠的搔头次数显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01), 并呈剂量相关性。与模型组比较, 元胡止痛滴丸 0.8 g 生药/kg 组 DA、NO 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 1.6 g 生药/kg 组 5-HT、DA、NO 水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、0.001),  $\beta$ -EP 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 但对 CGRP 水平基本无影响。**结论** 元胡止痛滴丸在 0.8~1.6 g 生药/kg 对大鼠实验性偏头痛具有显著的镇痛作用, 其作用机制可能与调节 5-HT、NO、DA、 $\beta$ -EP 等与疼痛相关的血管活性物质及神经递质的水平有关。

**关键词:** 元胡止痛滴丸; 实验性偏头痛; 镇痛作用

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2016)04 - 0423 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.04.004

## Analgesic effect of Yuanhu Zhitong Dropping Pills on experimental migraine in rats induced by nitroglycerin and its mechanism

FENG Yue<sup>1</sup>, HU Jin-fang<sup>1</sup>, DI Zhi-quan<sup>1</sup>, XU Jun<sup>2</sup>, ZHANG Tie-jun<sup>2</sup>, SHEN Xiu-ping<sup>1</sup>

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To study analgesic effect of Yuanhu Zhitong Dropping Pills on experimental migraine in rats induced by nitroglycerin and explore its mechanism. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, model group, Zhengtian Pills (3.0 g/kg) group, and Yuanhu Zhitong Dropping Pills (0.4, 0.8, and 1.6 crude drug g/kg) groups, and each group had 10 rats. Rats were ig administered with corresponding drugs 0.5 mL/100 g except the control group and model group, once daily, and treated for 3 d. Rats except in the control group were sc administered with Nitroglycerin Injection 10 mg/kg to make migraine model after last administration 30 min. The latent periods and frequencies in 60 min of scratching head reaction were observed, and the prolonged rate of latent period and inhibitory rate of scratching head were calculated. The levels of DA, 5-HT,  $\beta$ -EP, CGRP, and NO in brain tissues and serum were determined. **Results** Compared with the model group, the frequency of scratching head of rats in Yuanhu Zhitong Dropping Pills (0.8 and 1.6 crude drug g/kg) groups were significantly reduced ( $P < 0.05$ , 0.01), and showed dose dependent. Compared with the model group, levels of DA and NO in Yuanhu Zhitong Dropping Pills (0.8 crude drug g/kg) group were markedly decreased ( $P < 0.05$ ). The levels of DA and NO in Yuanhu Zhitong Dropping Pills (1.6 crude drug g/kg) group were significantly decreased ( $P < 0.01$ , 0.001), but the level of  $\beta$ -EP was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and there was no difference on the level of CGRP between the model group and Yuanhu Zhitong Dropping Pills (1.6 crude drug g/kg) group. **Conclusion** Yuanhu Zhitong Dropping Pills has significantly analgesic effect on experimental migraine model of rats, which may be related to the levels of vasoactive substances and neurotransmitters related to pain, such as 5-HT, NO, DA, and  $\beta$ -EP.

**Key words:** Yuanhu Zhitong Dropping Pills; experimental migraine; analgesic effect

收稿日期: 2015-12-31

作者简介: 冯 玥 (1986—), 女, 助理研究员, 硕士, 从事药理、毒理学研究。Tel: (022)84845247 E-mail: fengyue8@tjipr.com

\*通信作者 申秀萍, 女, 研究员。

元胡止痛滴丸收录于《中国药典》2015 年版一部，处方由延胡索、白芷组成，具有理气、活血、止痛之功效<sup>[1]</sup>，对胃痛、痛经、胁痛和偏头痛的疗效在临床上已经得到证实，能明显缓解头痛程度，减少头痛发作次数，具有临床应用价值<sup>[2]</sup>。本实验通过皮下注射硝酸甘油复制大鼠实验性偏头痛模型，进一步探讨元胡止痛滴丸预防偏头痛的作用及其可能的机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠 60 只，体质量 180~200 g，雌雄各半，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物使用合格证号 SYXK（京）2012-0024，动物质量合格证编号 11400700073120，动物饲养于屏障环境，温度范围 20~26 °C，湿度范围 40%~70%，全新风换气次数不少于 15 次/h，光照 12 h 明暗交替。

### 1.2 药物与试剂

元胡止痛滴丸，棕褐色粉末，每克粉末相当于 2 g 生药，产品批号 20131209，天津药物研究院中药现代研究部提供；正天丸，华润三九医药股份有限公司生产，水丸，6 g/袋，批号 1407024H；硝酸甘油注射液，北京益民药业有限公司生产，规格 1 mL:5 mg，批号 20130314；5-羟色胺（5-HT，批号 C2300610127）、多巴胺（DA，批号 F10019859）、 $\beta$ -内啡肽（ $\beta$ -EP，批号 C1309610126）、降钙素基因相关肽（CGRP，批号 D27019860）Elisa 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司；NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所，批号 20141127。

### 1.3 仪器

BT224S 型电子天平，北京赛多利斯仪器系统有限公司；LXJ-II B 型多管离心机，上海安亭科学仪器有限公司；Varioskan Flash 酶标仪，Thermo Scientific；PRO 电动匀浆仪，PRO Scientific Inc.。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及给药

元胡止痛滴丸人日剂量 4.5 g（9 g 生药），正天丸人日剂量 18 g，根据人体质量 70 kg、大鼠体质量 200 g 换算，大鼠等效剂量分别为元胡止痛滴丸 0.4 g/kg（0.8 g 生药）、正天丸 1.5 g/kg。

将 60 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组，即对照组、模型组、正天丸（3.0 g/kg）组以及元胡止痛滴丸 0.4、0.8、1.6 g 生药/kg 组，每组 10 只，雌雄各半。

ig 给药，给药体积 0.5 mL/100 g，1 次/d，连续给药 3 d。对照组和模型组给予等体积的去离子水。

### 2.2 偏头痛模型的制备<sup>[3]</sup>

末次给药后 30 min，除对照组外，其余各组大鼠 sc 硝酸甘油注射液 10 mg/kg，复制大鼠实验性偏头痛模型。

### 2.3 大鼠搔头反应的考察

立即记录大鼠因头痛而产生搔头现象的潜伏期以及 60 min 内的搔头次数，计算搔头潜伏期延长率和搔头次数抑制率。

搔头潜伏期延长率 = (给药组出现搔头反应的时间 - 模型组出现搔头反应的时间) / 模型组出现搔头反应的时间

搔头次数抑制率 = (模型组 60 min 内搔头次数 - 给药组 60 min 内搔头次数) / 模型组 60 min 内搔头次数

### 2.4 大鼠脑组织及血清指标的测定

记录结束后腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，腹主动脉取血，3 000 r/min 离心 10 min，取血清，-80 °C 保存备用；同时迅速分离脑组织，-20 °C 保存备用。脑组织临用前解冻，各组大鼠取相同脑部位，用生理盐水制备 10% 匀浆，置于 -20 °C 过夜。经过反复冻融 2 次处理，破坏细胞膜后离心，取上清，作为样本，测定脑组织匀浆中 DA 水平。按 Elisa 试剂盒说明书测定各组大鼠血清中 5-HT、 $\beta$ -EP、CGRP、NO 水平。

### 2.5 数据处理

数据用 SPSS 18.0 软件进行处理，数据以  $\bar{x} \pm s$  表示，组间比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 元胡止痛滴丸对实验性偏头痛大鼠搔头反应的影响

与对照组比较，模型组大鼠的搔头潜伏期显著缩短，搔头次数显著增加 ( $P < 0.001$ )。与模型组比较，元胡止痛滴丸 0.8、1.6 g 生药/kg 组偏头痛大鼠的搔头次数显著减少 ( $P < 0.05$ 、0.01)，并呈剂量相关性，搔头次数抑制率最高可达 49.7%。元胡止痛滴丸 1.6 g 生药/kg 组搔头反应的潜伏期延长率明显延长，能够可达 104%，由于标准差较大，未见统计学差异，见表 1。结果表明，元胡止痛滴丸在 0.8~1.6 g 生药/kg 剂量下对大鼠偏头痛具有显著的镇痛作用。

### 3.2 元胡止痛滴丸对实验性偏头痛大鼠脑组织及血清指标的影响

与对照组比较，模型组  $\beta$ -EP 水平显著降低，

5-HT、DA、NO 水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。与模型组比较,元胡止痛滴丸 0.8 g 生药/kg 组 DA、NO 水平显著降低( $P < 0.05$ ),1.6 g 生药/kg 组 5-HT、DA、NO 水平显著降低 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ),  $\beta$ -EP 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 但对 CGRP 水平基本无影响, 见表 2。

表 1 元胡止痛滴丸对偏头痛大鼠搔头反应的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of Yuanhu Zhitong Dropping Pills on scratching head in migraine model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	潜伏期/min	潜伏期延长率/%	搔头次数/次	搔头次数抑制率/%
对照	—	—	—	0	—
模型	—	8.01 ± 2.56 <sup>***</sup>	0	57.90 ± 24.32 <sup>***</sup>	0
正天丸	3.0	15.56 ± 15.79	94.3	26.60 ± 21.29 <sup>△△</sup>	54.1
元胡止痛滴丸	0.4	8.32 ± 3.08	3.9	44.10 ± 14.72	23.8
	0.8	9.89 ± 3.76	23.5	38.90 ± 10.87 <sup>△</sup>	32.8
	1.6	16.34 ± 15.53	104.0	29.10 ± 19.19 <sup>△△</sup>	49.7

与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$

<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs model group

表 2 元胡止痛滴丸对偏头痛大鼠血清及脑组织各指标的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of Yuanhu Zhitong Dropping Pills on indicators of serum and brain tissue in migraine model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	5-HT/(ng·mL <sup>-1</sup> )	$\beta$ -EP/(pg·mL <sup>-1</sup> )	CGRP/(pg·mL <sup>-1</sup> )	DA/(ng·mL <sup>-1</sup> )	NO/( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> )
对照	—	12.58 ± 4.64	218.53 ± 68.78	49.95 ± 1.64	2.17 ± 0.19	6.77 ± 2.98
模型	—	21.80 ± 5.34 <sup>***</sup>	123.07 ± 35.68 <sup>**</sup>	52.05 ± 3.46	2.44 ± 0.13 <sup>**</sup>	30.29 ± 7.19 <sup>***</sup>
正天丸	3.0	17.84 ± 4.92	145.83 ± 42.89	49.30 ± 2.12 <sup>△</sup>	2.41 ± 0.12	27.76 ± 6.30
元胡止痛滴丸	0.4	19.23 ± 5.91	144.24 ± 47.50	51.12 ± 4.48	2.37 ± 0.12	28.19 ± 5.51
	0.8	17.37 ± 4.70	156.59 ± 46.99	52.49 ± 2.97	2.33 ± 0.11 <sup>△</sup>	23.17 ± 6.83 <sup>△</sup>
	1.6	11.22 ± 6.57 <sup>△△△</sup>	175.53 ± 47.32 <sup>△</sup>	52.04 ± 2.10	2.28 ± 0.13 <sup>△△</sup>	21.10 ± 6.90 <sup>△△</sup>

与对照组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$  <sup>△△△</sup> $P < 0.001$

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  <sup>△△</sup> $P < 0.01$  <sup>△△△</sup> $P < 0.001$  vs model group

#### 4 讨论

偏头痛是一种临床常见的慢性神经血管性疾病。与四肢瘫痪、精神障碍和痴呆一样,偏头痛已经成为最严重的慢性功能性障碍性疾病。多数学者认为,偏头痛是由于血管的舒缩功能失调而出现的发作性痉挛或持续扩张造成血流障碍所引起的头痛,而偏头痛的发生与 NO、5-HT、DA 等单胺类递质的水平密切相关<sup>[4-6]</sup>。5-HT 是偏头痛发作中重要的神经递质,是中枢内源性镇痛系统中的重要神经活性物质之一,是脑循环中最强烈的血管收缩胺。在偏头痛发作前期,血小板的 5-HT 释放因子水平升高,使血小板释放 5-HT,血清中 5-HT 水平增加,引起颅内血管收缩,引起偏头痛先兆的前驱症状。在头痛期,水平升高的 5-HT 被单胺氧化酶 A 不断分解,使 5-HT 耗竭,因 5-HT 减少不能维持血管收缩,故引起头皮血管扩张,导致发作期的血管扩张性头痛<sup>[7-8]</sup>。

DA 在偏头痛发病中是仅次于 5-HT 的重要神经递质,脑血管和脑膜血管均由中枢 DA 能神经末梢支配,其上有 DA 受体,提示中枢神经系统中的 DA 能神经对脑血管活动有直接影响。研究表明无先兆偏头痛发作间歇期,DA 水平明显升高,发作期血小板 NE 水平上升<sup>[9]</sup>。现代药理研究表明,NE 水平的变化及 DA 的超敏均与偏头痛有直接或间接的关系<sup>[10]</sup>。

$\beta$ -EP 是一种内源性阿片肽,与其他内源性阿片肽一样,与阿片受体结合后对机体产生广泛的影响,特别是对疼痛的调节作用尤为突出。 $\beta$ -EP 可通过影响中枢疼痛通路的传递起到镇痛作用。在中枢神经系统存在着调整疼痛信号传递的机制, $\beta$ -EP 是对疼痛通路进行调节的抑制性递质,它通过突触前抑制影响中枢疼痛通路的传递,其水平的降低可减弱这种抑制作用。同时, $\beta$ -EP 与血管舒缩功能之间也有密切的关系,血管舒缩功能障碍是偏头痛发病的直

接原因。

硝酸甘油是 NO 的供体, 在体内生成 NO, NO 可强烈扩张脑血管, 也可协同其他神经递质触发神经源性炎症, 易化伤害痛觉冲动的中枢传递<sup>[2]</sup>; 另一方面 NO 具有神经毒性作用, 可激发三叉神经-血管反射, 诱发实验性偏头痛<sup>[11]</sup>。本实验采用皮下注射硝酸甘油复制了大鼠实验性偏头痛模型, 观察了元胡止痛滴丸不同剂量对实验性偏头痛模型大鼠的行为及血清、脑组织中各相关因子的影响, 结果表明, 元胡止痛滴丸在 0.8~1.6 g 生药/kg 剂量下对实验性偏头痛模型大鼠具有显著的镇痛作用, 通过调节 5-HT、NO、DA、 $\beta$ -EP 等与疼痛相关的血管活性物质及神经递质的水平, 从而改善了血管舒缩功能障碍, 是其有效预防偏头痛的可能机制。

#### 参考文献

- [1] 吴雪松, 许 浚, 张喜民, 等. 元胡止痛方的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1081-1095.
- [2] 李 浩, 张 磊, 杨晓平. 元胡止痛滴丸联合氟桂利嗪胶囊治疗偏头痛 42 例 [J]. 中国药业, 2013, 22(16): 96-97.
- [3] 郭 琳, 洪治平. 硝酸甘油型实验性偏头痛模型原理与研究现状 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2004, 10(6): 357-364.
- [4] 董世芬, 陈 红, 孙建宁, 等. 镇脑宁胶囊治疗偏头痛作用研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2012, 14(5): 2050-2053.
- [5] 曾贵荣, 马 丽, 郭建生, 等. 芎麻汤不同提取物对小鼠偏头痛模型的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 162-164.
- [6] 楼招欢, 黄月芳, 吕圭源, 等. 天麻钩藤颗粒对利血平致偏头痛模型小鼠的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1412-1414.
- [7] 秦旭华, 李祖伦, 金沈锐. 白芷总香豆素对偏头痛模型小鼠 5-HT 和 MAO 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2190-2191.
- [8] Lance J W, Lambert G A, Goadsby P J, *et al.* Brainstem influences on the cephalic circulation: experimental data from cat and monkey of relevance to the mechanism of migraine [J]. *Headache*, 1983, 23(6): 258.
- [9] 谢 炜, 陈宝田, 朱成全. 无先兆偏头痛患者血 DA、NE 变化的初步研究 [J]. 中华神经科杂志, 1999, 32(6): 346.
- [10] 黄月芳, 楼招欢, 余 芳. 天麻钩藤颗粒对硝酸甘油致偏头痛模型大鼠的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 227-230.
- [11] 龙 军, 方泰惠. 实验性偏头痛动物模型研究进展 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(2): 187-188.