

## 基于腰痛宁胶囊的中药有效部位组方抗炎镇痛活性评价与筛选

倪力军<sup>1</sup>, 赵雯雯<sup>1</sup>, 马 骏<sup>2</sup>, 史万忠<sup>3</sup>, 张立国<sup>1\*</sup>

1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237

2. 上海中医药大学 核医学实验室, 上海 201203

3. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021

**摘要:** 目的 设计包含腰痛宁胶囊全方 10 味中药在内的 13 个有效部位单方或组合共计 10 个样品, 评价各样品的体内外抗炎镇痛活性, 寻找以中药有效部位组合为基础的风湿骨病候选组方。方法 采用液闪发光分析仪测量计数, 以同位素 <sup>3</sup>H 的含量为评价指标, 分别检测各样品抑制 <sup>3</sup>H-缓激肽与其受体结合的能力及与 <sup>3</sup>H-纳洛酮竞争结合阿片受体的能力, 以评价各组方的体外抗炎、镇痛活性。对体外实验筛选出的组方, 采用二甲苯致小鼠耳肿胀实验、热刺激痛阈实验及醋酸致扭体实验进一步评价样品的体内抗炎及镇痛活性。**结果** 腰痛宁胶囊全方具有较好的体外及体内抗炎、镇痛作用; 由腰痛宁组方生物碱+黄酮+皂苷有效部位组合的拆方减少 90%马钱子生物碱的量所得的腰痛宁减毒拆方(样品 VIII)以及由麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮等质量比混合的样品 VI 的体外抗炎、镇痛效果优于腰痛宁全方; 但样品 VI 小鼠体内镇痛活性不明显, 样品 VIII 小鼠体内抗炎、镇痛效果显著优于腰痛宁全方, 且其对小鼠醋酸致扭体反应实验中的镇痛活性显著优于对照药阿司匹林。**结论** 腰痛宁减毒拆方可作为风湿骨病新药候选药物; 减少腰痛宁处方药材及有效部位种类以及马钱子生物碱的量可提高腰痛宁胶囊的抗炎镇痛活性、药物安全性及质量可控性。

**关键词:** 腰痛宁胶囊; 缓激肽; 纳洛酮; 抗炎; 镇痛; 组方筛选; 腰痛宁减毒拆方

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)18-3255-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.019

## Evaluation and screening of anti-inflammatory and analgesic activities of active fraction prescriptions in Chinese materia medica based on Yaotongning Capsule

NI Li-jun<sup>1</sup>, ZHAO Wen-wen<sup>1</sup>, MA Jun<sup>2</sup>, SHI Wan-zhong<sup>3</sup>, ZHANG Li-guo<sup>1</sup>

1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. Nuclear Medicine Laboratory, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

3. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China

**Abstract: Objective** According to the results of preliminary cellular pharmacological experiments, 13 active fractions, including Yaotongning Capsule (YTNC) whole formula, were designed to evaluate their *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory and analgesic activities to look for candidate prescriptions for rheumatism treatment. **Methods** The *in vitro* anti-inflammatory and analgesic effects of the prescriptions were estimated by detecting their ability to inhibit <sup>3</sup>H-bradykinin binding to its receptor and ability to inhibit <sup>3</sup>H-naloxone binding to opioid receptors, respectively. And the tests were conducted by a liquid scintillation counter to check the content of the isotope <sup>3</sup>H as evaluating indicator. Ear edema model in mice induced by dimethylbenzene test, hot plate test, and acetic acid writhing test in mice were conducted to evaluate the *in vivo* anti-inflammatory and analgesic activities of the prescriptions. **Results** YTNC whole formula had good *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory and analgesic effects. However, the prescription containing equal amount of *Ephedra sinica* alkaloids, *Glycyrrhiza uralensis* aponins, and *Carthamus tinctorius* flavones (Sample VI) as well as the optimized and decomposed formula of YTNC (Sample VIII), which was designed by reducing 90% of *Strychnos nux-vomica* alkaloids from YTNC's decomposed formula composed by alkaloids, flavonoids, and saponins in YTNC, performed more excellent *in vitro* anti-inflammatory and analgesic effects than whole formula of YTNC. However, Sample VI did not exhibit obvious *in vivo* analgesic effect, but the *in vivo* anti-inflammatory and analgesic activities of the optimized and decomposed formula of YTNC (Sample VIII)

收稿日期: 2016-02-28

基金项目: 上海市科学技术委员会支撑项目(13401901100)

作者简介: 倪力军(1963—), 女, 博士, 教授, 从事天然药物研究。Tel: (021)64253694 E-mail: nljfy@163.com

\*通信作者 张立国, 男, 博士, 副教授, 从事新药研发研究。Tel/Fax: (021)64253045 E-mail: zlgfy@163.com

were more significantly better than those of YTNC whole formula. It also had significantly better analgesic effect than aspirin (the positive control drug) in acetic acid writhing test. **Conclusion** The optimized and decomposed formula of YTNC could be a candidate drug for rheumatism treatment. The anti-inflammatory and analgesic effects, safety, and quality control ability of YTNC could be improved by reducing the varieties of material medicines and active fractions and the content of *S. nux-vomica* alkaloids in YTNC.

**Key words:** Yaotongning Capsule; bradykinin; naloxone; anti-inflammatory; analgesic; screening of prescriptions; decomposed formula of YTNC

风湿骨病是一种对肌肉、骨骼及软组织造成损伤的慢性疾病，难以根治、反复发作，中医将这类疾病统称为“痹症”，抗炎镇痛是对此类疾病的常用治则。腰痛宁胶囊作为治疗风湿骨病的大品种复方中药，以马钱子为君药，并与具有活血化瘀、抗炎镇痛、增强免疫等功效的麻黄、甘草、苍术、乳香、没药、川牛膝及土鳖虫、全蝎、僵蚕 9 味药材，按照一定比例打粉制成胶囊，伴以黄酒吞服。具有祛寒止痛、通经活络、消肿化瘀等功效<sup>[1-2]</sup>。其处方药材多且未经纯化精制，影响药物吸收；且其君药马钱子是一种毒性很强的药材，全粉入药存在毒副作用大等问题。对复方中药的药理作用进行系统研究有助于复方中药的改进及在此基础上研发新型中药。

本课题组前期在总结 153 个风湿骨病处方的基础上，选取腰痛宁胶囊处方中 10 味药材以及红花、骨碎补、三七、淫羊藿、人参、独活、桂枝、桑寄生等 8 味风湿骨病处方常用药材，提取这 18 味药材中的有效部位，根据腰痛宁组方原则和组合化学理念设计了 27 个不同有效部位组合配方，并进行体外细胞药理学研究<sup>[3-11]</sup>。结果发现甘草皂苷、红花黄酮、三七皂苷的抗炎、增强免疫及促进软骨细胞增殖等活性优于其他同类有效部位，并且由 25%生物碱+25%黄酮+50%甘草皂苷组合的有效部位配方样品在多个细胞模型下均有良好的或优于腰痛宁全方的药理活性。为降低马钱子生物碱带来的毒副作用，本研究在此基础上，筛选出麻黄生物碱、红花黄酮、甘草皂苷、三七皂苷构成 7 个中药有效部位组方，比较其与腰痛宁全方及由腰痛宁处方药材生物碱+黄酮+皂苷组成的腰痛宁拆方及其减毒拆方在缓激肽、纳洛酮受体模型下的体外抗炎、镇痛活性。对体外抗炎镇痛效果较优的组方采用二甲苯致耳肿胀模型、热刺激痛阈模型及醋酸扭体模型评价其体内抗炎镇痛活性<sup>[12-13]</sup>，以探究腰痛宁处方的抗炎、镇痛作用机制及其组方优化的可行性，为风湿骨病中药新药的研发提供候选组方。

## 1 材料

### 1.1 动物

SD 大鼠，SPF 级，体质量 180~200 g，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司，许可证号 SCXK (沪) 2013-0016；昆明种小鼠，清洁级，120 只，体质量 (20±1) g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，许可证号 SCXK (沪) 2012-0002，实验动物质量合格证号 2007000561421。动物分组分笼饲养于 12 h 明暗交替的环境中，温度为 18~25 °C，相对湿度为 (50±5) %，标准饲料喂养，可自由摄食、饮水。

### 1.2 试剂

<sup>3</sup>H-纳洛酮 (American Radiolabeled Chemicals 公司，批号 31003)；盐酸纳洛酮注射液 (北京凯因科技股份有限公司，批号 20130801)；蔗糖 (国药试剂有限公司，批号 ART 070192-02-03)；氯化钠 (南汇彭镇营房化工厂，批号 20100321)；WhatmanGF/B 滤膜 (Perkin Elmer 公司，批号 476-12241)；<sup>3</sup>H-缓激肽 (American Radiolabeled Chemicals 公司，批号 ART0139-131003)；缓激肽 (批号 SLBH1330V)、牛血清白蛋白 (批号 A1933)、三羟甲基甲胺基乙磺酸 (TES) 缓冲液 (批号 T1375-25g)、杆菌肽锌 (批号 B5150)、卡拉普利 (批号 C8856)、二硫苏糖醇 (DTT，批号 43816)，Sigma 公司；二甲苯 (国药集团化学试剂有限公司，批号 20130713)；醋酸 (上海天莲精细化工有限公司，批号 20130218)；羧甲基纤维素钠 (东京化成工业株式会社，批号 C0045)。三羟甲基氨基甲烷 (Tris，国药集团化学试剂有限公司，批号 20130516)。

### 1.3 仪器

Bioc-45R 低速离心机 (Thermo 公司)；LE-80K 超速离心机 (Beckman 公司)；液闪发光分析仪 (Perkin Elmer, Inc.)；ML104 分析天平 (德国 Metter Toledo 公司)；QL-901 漩涡混合器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)；CELL150 CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermo)；CKX41 倒置显微镜 (OLYMPUS)；TDZ4-WS 离心机 (湖南赛特湘仪)；CLASS II 生物

安全柜 (Labconco)。

### 1.4 药材

马钱子 *Strychnos nux-vomica* L. (制马钱子, 批号 Y302-09091-10)、苍术 *Atractylode slancea* (Thunb.) DC. (批号 Y002-101001-2)、麻黄 *Ephedra sinica* Stapf. (批号 Y412-100601-12)、土鳖虫 *Eupolyphaga sinensis* Walker (批号 Y803-110101-5)、川牛膝 *Cyathula officinalis* Kuan. (批号 Y012-110401-1)、僵蚕 *Bombyx Batryticalus* (批号 Y805-1011054)、甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fishch. (批号 Y013-110301-1)、乳香 *Baswellia carterii* Birdw. (批号 110301-2)、没药 *Commiphora myrrha* Engl. (批号 110401-1)、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen (批号 Y81111706-2)、红花 *Carthamus tinctorius* L. (批号 Y80910401-6)、全蝎 *Buthus martensii* Karsch (批号 Y804-11302-4) 由颈复康药业集团有限公司提供, 经颈复康药业集团有限公司执业药师王春民鉴定, 样本保存于华东理工大学化学与分子工程学院分析化学实验室。

## 2 方法

### 2.1 各中药有效部位的制备

腰痛宁 10 味组方药材及红花、三七药材共 13 个有效部位均由本实验室自行提取、纯化, 各有效部位的制备方法及质量控制指标见表 1。

表 1 13 个中药有效部位制备、分析方法及质量控制指标  
Table 1 Preparation, analytical methods, and quality standards of 13 active parts extracted from CMM

| 有效部位         | 质量分数/% | 提取方法                         | 分析方法                          |
|--------------|--------|------------------------------|-------------------------------|
| 马钱子生物碱       | 89.70  | 加热回流法 <sup>[3]</sup>         | HPLC <sup>[3,14-15]</sup>     |
| 麻黄生物碱        | 49.50  | 加热回流法 <sup>[3]</sup>         | HPLC <sup>[3]</sup>           |
| 甘草皂苷         | 78.27  | 加热回流法 <sup>[3]</sup>         | HPLC, UV <sup>[3,16-17]</sup> |
| 红花黄酮         | 41.20  | 加热回流法 <sup>[3]</sup>         | UV <sup>[3]</sup>             |
| 三七皂苷         | 85.00  | 加热回流法 <sup>[3]</sup>         | HPLC, UV <sup>[3,16]</sup>    |
| 川牛膝皂苷        | 15.74  | 加热回流法 <sup>[3]</sup>         | HPLC <sup>[3]</sup>           |
| 麻黄多糖         | 35.30  | 水煮醇沉法 <sup>[2,18]</sup>      | UV <sup>[2,18]</sup>          |
| 川牛膝多糖        | 96.46  | 水煮醇沉法 <sup>[3,18]</sup>      | UV <sup>[3,18]</sup>          |
| 甘草多糖         | 33.00  | 水煮醇沉法 <sup>[3,18]</sup>      | UV <sup>[3,18]</sup>          |
| 苍术多糖         | 62.84  | 水煮醇沉法 <sup>[3,18]</sup>      | UV <sup>[3,18]</sup>          |
| 苍术挥发油        | —      | 提取-精馏耦合 <sup>[3,19-20]</sup> | —                             |
| 乳香、没药挥发油     | —      | 提取-精馏耦合 <sup>[3]</sup>       | —                             |
| 土鳖虫、僵蚕、全蝎水提物 | —      | 超声水提法 <sup>[3]</sup>         | —                             |

### 2.2 有效部位组方

如表 2 所列, 本实验以具有良好药理活性的单一有效部位甘草皂苷、红花黄酮及三七皂苷为样品 (II~IV), 根据腰痛宁组方原则, 以麻黄生物碱为基础 (样品 I), 剔除毒性很强的马钱子生物碱, 构建了腰痛宁中麻黄生物碱+甘草皂苷、麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮及麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮+三七皂苷等 3 个有效部位组方样品 (V~VII), 同时选取前期细胞药理研究中活性优良的腰痛宁拆方样品 IX 以及将样品 IX 中马钱子生物碱的量减少 90% 所得腰痛宁减毒拆方 VIII 和腰痛宁有效部位组方样品 X, 对这 10 个样品进行体外抗炎、镇痛活性评价。

### 2.3 各有效部位体外抗炎镇痛实验<sup>[21-22]</sup>

采用氘标记缓激肽 (简称 <sup>3</sup>H-缓激肽) 受体结合实验评价组方样品体外抗炎活性<sup>[23-25]</sup>; 采用氘标记纳洛酮 (简称 <sup>3</sup>H-纳洛酮) 受体结合实验评价各样品体外镇痛活性<sup>[26]</sup>。

表 2 有效部位组方样品

Table 2 Samples of active fractions formulae

| 样品编号 | 样品组成   |
|------|--|
| I    | 麻黄生物碱  |
| II   | 甘草皂苷   |
| III  | 红花黄酮   |
| IV   | 三七皂苷   |
| V    | 麻黄生物碱+甘草皂苷 (质量比 1:1)   |
| VI   | 麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮 (质量比 1:1:1)  |
| VII  | 麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮+三七皂苷 (质量比 1:1:1:1)   |
| VIII | 麻黄生物碱+马钱子生物碱+甘草黄酮+甘草皂苷+川牛膝皂苷 (腰痛宁减毒拆方: 将马钱子生物碱的量降低至原方的 1/10, 其他有效部位按腰痛宁组方比例配制)               |
| IX   | 麻黄生物碱+马钱子生物碱+甘草黄酮+甘草皂苷+川牛膝皂苷 (腰痛宁拆方, 按腰痛宁组方比例配制)   |
| X    | 麻黄生物碱+马钱子生物碱+甘草黄酮+甘草皂苷+川牛膝皂苷+乳香、没药、苍术挥发油+土鳖虫、全蝎、僵蚕水提物+川牛膝、甘草、苍术、麻黄多糖 (腰痛宁有效部位组方, 按腰痛宁全方比例配制) |

**2.3.1 受试样品的配制** 根据各有效部位在组方中的比例及各有效部位的质量分数换算出各有效部位提取物的质量,精密称取各有效部位提取物,先取热稳定性有效部位于烧杯中,加入适量磷酸盐缓冲液(PBS)搅拌使之初步溶解,沸水浴加热 10 min,待其完全溶解后,冷却并加入热不稳定性有效部位进行混合,一并超声 20 min,冷却,定容,配成 2.50 mg/mL 母液,0.22 μm 滤膜滤过并稀释至各质量浓度(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 μg/mL),备用。

**2.3.2 受体的制备** (1) 缓激肽受体: 雄性 SD 大鼠(体质量 100~120 g)剖腹,取盲肠上 5 cm 的结肠。将结肠解剖,放入加有蔗糖的冰冷 TES 缓冲液清洗,并用滤纸吸干水分,称质量。加入 50 倍体积的冰冷 TES 缓冲液,剪碎,匀浆。4 ℃,初离心(4 000 r/min, 15 min),弃沉淀。上清置于离心管中,4 ℃,高速离心(27 000 r/min, 15 min),得沉淀 P1。沉淀 P1 加入约 10 mL 新鲜冰冷孵育缓冲液,重新悬浮。得到检测所用的组织质量浓度为 10 mg/mL 的缓激肽受体组织悬浮液。(2) 阿片受体: 4 只雄性 SD 大鼠断颈处死,剪开头颅骨,取大脑,弃小脑。将大脑立即放入冰冷的 Tris+蔗糖缓冲液中清洗。除去血丝,用纸吸干水分,置于分析天平上称质量。将其放入离心管中,匀浆,置于低速离心机中离心(4 000 r/min, 4 ℃, 15 min),弃沉淀。将上清继续高速离心(27 000 r/min, 4 ℃, 15 min)。弃上清,加入 10 mL 冰冷 Tris+NaCl 缓冲液重新悬浮得 M1。将 M1 稀释 10 倍,得 M2。分别取 3 mL 考马斯亮蓝溶液加入 3 个离心管中,每个离心管中分别加入 50 μL Tris+NaCl 缓冲液,50 μL M2 和 50 μL 蛋白标准液。用紫外分光光度仪在 595 nm 处进行检测。根据检测结果,将 M1 稀释至实验所需的 0.125 mg/mL 的受体蛋白溶液 M3,备用<sup>[22]</sup>。

**2.3.3 受试样品与缓激肽的竞争结合** 根据总结合曲线数据,确定 <sup>3</sup>H-缓激肽用量为 25 μL,孵育缓冲液用量为 25 μL,组织悬浮液用量为 100 μL,各质量浓度药物用量为 50 μL,进行药物与缓激肽竞争结合实验。各结合实验步骤相同,所取混合液 4 ℃孵育过夜,用聚乙烯亚胺浸泡 2 h 的 Whatman GF/B 滤膜真空抽滤终止反应。将滤膜置于烘箱中,60 ℃烘干,再放入密封袋中,加入闪烁液,密封。用液闪发光分析仪测量计数(cpm)。根据 cpm 值

计算受试样品对缓激肽受体与 <sup>3</sup>H-缓激肽结合的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

**2.3.4 受试样品与纳洛酮的竞争结合** 根据总结合曲线数据,确定 <sup>3</sup>H-纳洛酮用量为 21 μL, Tris 缓冲液用量为 29 μL,组织悬浮液用量为 100 μL,各质量浓度药物用量为 50 μL,进行药物与纳洛酮竞争结合实验。各结合实验步骤相同,所取混合液 4 ℃孵育 1 h,用 2% BSA 溶液浸泡 2 h 的 Whatman GF/B 滤膜真空抽滤终止反应。将滤膜置于烘箱中,60 ℃烘干,再放入密封袋中,加入闪烁液,密封。用液闪发光分析仪测量计数(cpm)。根据 cpm 值计算受试样品对纳洛酮受体与 <sup>3</sup>H-纳洛酮结合的 IC<sub>50</sub>。

## 2.4 体内抗炎镇痛实验

**2.4.1 有效部位剂量的确定** 根据前期预试验结果确定体内实验受试样品剂量,阿司匹林 250 mg/kg,腰痛宁有效部位组方(样品 X) 360 mg/kg(根据腰痛宁颗粒临床剂量换算出 156~234 mg/kg 的小鼠给药剂量,预试验药效不佳,后根据参考文献报道<sup>[27]</sup>大鼠给药剂量 300 mg/kg,确定小鼠给药剂量),腰痛宁减毒拆方(样品 VIII)低、中、高剂量分别为 37.5、75、150 mg/kg;采用 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液溶解配制受试样品。

**2.4.2 二甲苯致小鼠耳肿胀实验** 取小鼠 60 只,随机分为 6 组,每组 10 只。分别 ig 生理盐水(模型组)、阿司匹林、样品 X 及样品 VIII,给药剂量按“2.4.1”项,每天 1 次,连续给药 5 d。末次给药 0.5 h 后,于小鼠左耳两面均匀涂二甲苯(40 μL/只)致炎,右耳不涂为正常耳。1 h 后脱颈椎处死小鼠,用 7 mm 打孔器打下左耳和右耳同一部位的圆片,于分析天平上称质量。计算耳肿胀率及肿胀抑制率,比较药物的抗炎作用。

$$\text{肿胀率} = (\text{左耳质量} - \text{右耳质量}) / \text{右耳质量}$$

$$\text{肿胀抑制率} = (\text{模型组肿胀率} - \text{给药组肿胀率}) / \text{模型组肿胀率}$$

**2.4.3 小鼠热刺激痛阈实验** 预选 30 s 内有痛反应的小鼠,将小鼠置于水浴锅中烧杯内,温度(55.0±0.5) ℃,测定小鼠的痛阈值,测定 2 次,每隔 5 min 测量 1 次,以小鼠舔后足作为观察指标,分组及给药同“2.4.2”项。每组给药前重复测定痛阈值,取 2 次痛阈平均值作为正常痛阈值。连续给药 5 d,分别于第 5 天给药后 0.5、1、2、3 h 测量小鼠的痛阈值,若小鼠 60 s 内无痛反应,立即取出,

按 60 s 计算。记录结果，计算各组痛阈提高率。

痛阈提高率 = (给药后痛阈 - 给药前痛阈) / 给药前痛阈

**2.4.4 醋酸致小鼠扭体反应实验** 取小鼠 60 只，雌性，随机分为 6 组，每组 10 只，分组及给药方法同“2.4.2”项，均于末次给药后 30 min，各小鼠 ip 0.7% 的醋酸 10 mL/kg，观察记录 15 min 内每只小鼠出现扭体反应（腹部收缩内凹、伸展后肢、臀部抬高、蠕行）的次数，计算抑制率。

抑制率 = (模型组扭体次数 - 给药组扭体次数) / 模型组扭体次数

**2.5 数据处理**

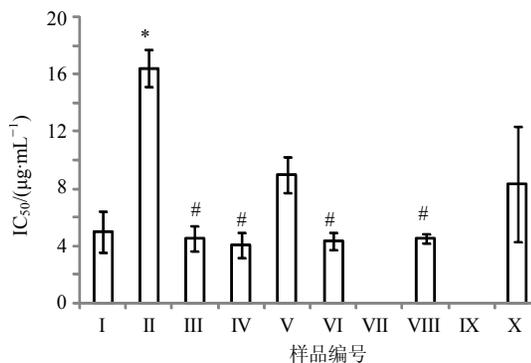
数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示，各样品的 IC<sub>50</sub> 值由量效曲线结合 Origin7.5 软件作图计算得到，并均采用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析。将各有效部位单独的 IC<sub>50</sub> 值与其在配方中所占比例的乘积之和定义为叠加值。

**3 结果**

**3.1 各样品体外抗炎及镇痛活性比较**

**3.1.1 各样品对 <sup>3</sup>H-缓激肽与缓激肽受体结合的影响** 图 1 为各样品抑制缓激肽受体与 <sup>3</sup>H-缓激肽结合的 IC<sub>50</sub> 值，单方样品 II 的 IC<sub>50</sub> 值显著高于样品 I、III、IV (P<0.05)，说明在受体模型中甘草皂苷的抗炎效果弱于其他 3 个有效部位，样品 V 的 IC<sub>50</sub> (9 μg/mL) 小于样品 I 与样品 II 的 IC<sub>50</sub> 叠加值 (10.7 μg/mL)，说明麻黄生物碱与甘草皂苷之间产生了一定的协同增强抑制缓激肽受体与 <sup>3</sup>H-缓激肽结合的作用；样品 VI 的 IC<sub>50</sub> (4.3 μg/mL) 显著低于样品 V 的 IC<sub>50</sub> (P<0.05)，说明麻黄生物碱、甘草皂苷与红花黄酮之间产生了极强的协同增效作用，红花黄酮的加入显著改善了组方 V 在受体模型下的抗炎活性，这与细胞模型下红花黄酮抗炎效果最佳的结果一致<sup>[3]</sup>。样品 VII 在该模型中未得到 IC<sub>50</sub> 值，表明尽管三七皂苷自身具有良好的抗炎活性，但与其与麻黄生物碱、甘草皂苷和红花黄酮组合后产生了很强的拮抗作用。样品 VIII 的抗炎效果优于样品 X 及样品 IX (该样品在此模型下未得到 IC<sub>50</sub> 值)，提示在受体模型下组方的抗炎效果并不与马钱子生物碱的量成正比，从药物配伍及抗炎活性角度分析，样品 VIII (腰痛宁减毒拆方) 与样品 III、IV、VI 抗炎活性相当并显著优于样品 X (腰痛宁全方)。

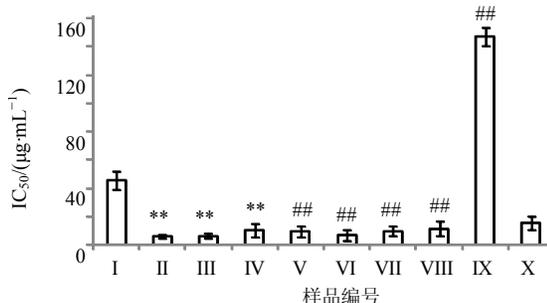
**3.1.2 各样品对 <sup>3</sup>H-纳洛酮与阿片受体结合的影响** 图 2 表明样品 I 的 IC<sub>50</sub> 值显著高于样品 II、样品 III



与样品 I 组比较: \*P<0.05; 与样品 X 组比较: #P<0.05  
\*P < 0.05 vs Sample I group; #P < 0.05 vs Sample X group

图 1 各样品对 <sup>3</sup>H-缓激肽与缓激肽受体结合的影响

Fig. 1 Effect of samples on binding of <sup>3</sup>H-bradykinin with its receptors



与样品 I 组比较: \*\*P<0.01, 与样品 X 组比较: ###P<0.01  
\*\*P < 0.01 vs Sample I group; ###P < 0.05 vs Sample X group

图 2 各样品对 <sup>3</sup>H-纳洛酮与阿片受体结合的影响

Fig. 2 Effect of samples on binding of <sup>3</sup>H-naloxone with opioid receptors

及样品 IV 的 IC<sub>50</sub> (P<0.01)，说明麻黄生物碱在受体模型中的镇痛效果弱于其他 3 个单方有效部位。组方 V、VI 及 VII 均表现出良好的镇痛效果且各组间 IC<sub>50</sub> 值不存在显著性差异；此外，这 3 个样品的 IC<sub>50</sub> 值均显著小于各样品的 IC<sub>50</sub> 叠加值，表明这些样品的各有效部位之间存在很强的协同镇痛作用。组方 IX 中的马钱子生物碱的量在 3 个腰痛宁组方中最高，其 IC<sub>50</sub> 值显著大于腰痛宁减毒拆方样品 VIII 与腰痛宁全部有效部位组方 X 的 IC<sub>50</sub>，说明马钱子生物碱的镇痛效果不及其他有效部位，其量越高越不利于其他有效部位发挥镇痛作用。样品 VIII 的镇痛效果优于样品 IX 及样品 X，并且其镇痛活性与样品 II~VII 相当。

**3.1.3 各样品体外抗炎、镇痛活性的综合评价** 由“3.1.1”项与“3.1.2”项可知，由麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮等比例组成的样品 VI 与腰痛宁减毒拆方样品 VIII 的抗炎、镇痛效果优于其他组

方, 可进一步开展其体内药效学研究。因样品 VI 中麻黄生物碱过多, 占组方总量 1/3, 远高于目前含麻黄制剂 (如泰诺中盐酸伪麻黄碱的量为 8%) 中麻黄生物碱的量, 故将该方配比改为甘草皂苷-麻黄生物碱-红花黄酮 2:1:1 进行小鼠体内镇痛实验, 并未产生显著镇痛活性。故本实验未对该方进行进一步体内药效评价。最终以阿司匹林为阳性对照药, 对受体模型下抗炎、镇痛效果均较优的腰痛宁全方 X 及腰痛宁减毒拆方 VIII 进行体内药效学评价验证, 同时探究腰痛宁处方中君药马钱子生物碱在腰痛宁抗炎镇痛活性的作用。

### 3.2 样品 VIII 和样品 X 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响

由表 3 可知, 各给药组均可不同程度抑制二甲苯致小鼠耳廓肿胀, 样品 VIII 高、中剂量组肿胀率显著低于模型组与样品 X 组 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 说明其可以有效抑制二甲苯导致的小鼠耳廓肿胀, 在该模型下有良好的抗炎活性, 且效果优于阳性对照药阿司匹林, 显著优于样品 X。同时, 样品 VIII 3 个剂量组的肿胀抑制率之间存在量效关系。

表 3 样品 VIII 和样品 X 对二甲苯致小鼠耳廓肿胀的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of Sample VIII and Sample X on ear edema of mice model induced by dimethylbenzene ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 肿胀率/%                | 肿胀抑制率/% |
|---------|---------------------------|----------------------|---------|
| 模型      | —                         | 125.53               | —       |
| 阿司匹林    | 250                       | 98.27                | 21.71   |
| 样品 X    | 360                       | 121.73               | 3.02    |
| 样品 VIII | 150                       | 60.00 <sup>***</sup> | 52.20   |
|         | 75                        | 73.84 <sup>**</sup>  | 41.17   |
|         | 37.5                      | 118.36               | 5.71    |

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与样品 X 组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs Sample X group

### 3.3 样品 VIII 和样品 X 对热刺激小鼠痛阈值的影响

由表 4 可知, 受动物行为学影响, 模型组的痛阈值也会随时间变化有一定增加, 但各给药组的痛阈提高率均大于模型组, 表明各药物均有不同程度的镇痛效果。其中阳性对照药阿司匹林组在给药 2 h 后可显著增加痛阈值 ( $P < 0.05$ ), 样品 X 在各时间段均表现出镇痛趋势但其各时间段的痛阈提高率与模型组比较差异不显著。样品 VIII 各剂量组在大部分时间点下均表现出比样品 X 更好的镇痛效果, 其高剂量组在给药后 0.5 h 表现出显著的镇痛活性

表 4 样品 VIII 和样品 X 对热刺激小鼠痛反应的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effect of Sample VIII and Sample X on hot plate test of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 用药后痛阈提高率/%          |                    |                    |                    |
|---------|-------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|         |                               | 0.5 h               | 1 h                | 2 h                | 3 h                |
| 模型      | —                             | 9.05                | 7.28               | 9.02               | 9.42               |
| 阿司匹林    | 250                           | 11.16               | 10.30              | 48.93 <sup>*</sup> | 21.46              |
| 样品 X    | 360                           | 25.49               | 37.25              | 31.27              | 45.29              |
| 样品 VIII | 150                           | 67.50 <sup>*</sup>  | 20.83              | 42.08              | 46.25              |
|         | 75                            | 76.15 <sup>**</sup> | 59.63 <sup>*</sup> | 30.73              | 29.27              |
|         | 37.5                          | 31.58               | 42.58              | 33.01              | 74.64 <sup>*</sup> |

与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs model group

( $P < 0.05$ ), 中剂量组在给药后 0.5 h 镇痛效果极显著 ( $P < 0.01$ ), 并在给药 1 h 仍有显著镇痛活性 ( $P < 0.05$ ), 其低剂量组则在给药后 3 h 表现出显著的镇痛活性 ( $P < 0.05$ )。综合评价, 样品 VIII 中剂量组对热刺激小鼠痛反应的镇痛作用最佳。

### 3.4 样品 VIII 和样品 X 对醋酸致小鼠扭体反应的影响

表 5 结果显示各样品组与模型组的扭体数均有显著性差异, 提示阳性药阿司匹林、样品 VIII 和样品 X 均能显著抑制醋酸致小鼠扭体反应, 镇痛活性显著。样品 VIII 各组间扭体反应次数差异不显著, 且均显著少于样品 X 组与阿司匹林组 ( $P < 0.01$ ), 说明腰痛宁减毒拆方样品对于醋酸扭体的镇痛活性显著优于腰痛宁全方及阿司匹林。

表 5 样品 VIII 和样品 X 对醋酸致小鼠扭体反应的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 5 Effect of Sample VIII and Sample X on acetic acid writhing test of mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

| 组别      | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 扭体次数                         | 抑制率/% |
|---------|-------------------------------|------------------------------|-------|
| 模型      | —                             | 15.80 ± 3.17                 | —     |
| 阿司匹林    | 250                           | 8.70 ± 4.96 <sup>**</sup>    | 44.93 |
| 样品 X    | 360                           | 11.60 ± 4.68 <sup>***▲</sup> | 26.58 |
| 样品 VIII | 150                           | 1.33 ± 0.30 <sup>***▲▲</sup> | 91.56 |
|         | 75                            | 5.75 ± 1.88 <sup>***▲▲</sup> | 63.61 |
|         | 37.5                          | 4.33 ± 1.63 <sup>***▲▲</sup> | 72.57 |

与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与样品 X 组比较: <sup>###</sup> $P < 0.01$ ; 与阿司匹林组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.01$   
\*\* $P < 0.01$  vs model group; <sup>###</sup> $P < 0.01$  vs Sample X group; <sup>▲▲</sup> $P < 0.01$  vs Aspirin group

#### 4 讨论

在缓激肽与纳洛酮受体模型下,麻黄生物碱、甘草皂苷、红花黄酮、三七皂苷 4 个有效部位均表现出良好的抗炎、镇痛活性,其中三七皂苷的抗炎效果最好,甘草皂苷的镇痛效果最好。将 4 个有效部位依次叠加配制的组方中,麻黄生物碱与甘草皂苷、红花黄酮的依次组合在缓激肽受体模型中表现出了明显的协同抗炎作用;在纳洛酮受体模型中,4 个有效部分的依次叠加均表现出了显著的协同镇痛作用。麻黄生物碱+甘草皂苷+红花黄酮的等比例组合配方(样品 VI)及腰痛宁生物碱+甘草黄酮+甘草皂苷+川牛膝皂苷的减毒拆方(样品 VIII)在受体抗炎和镇痛模型下活性最佳且无显著性差异,这两个组方的受体抗炎和镇痛活性均优于腰痛宁全方。

预试验中样品 VI 并未表现出明显的体内镇痛活性而样品 VIII 有显著镇痛效果,表明这 2 个组方虽然都是生物碱+黄酮+皂苷的组合,在体外均有相同的抗炎与镇痛活性,但组方中有效部位种类及其比例的差异造成 2 个组方体内药效实验结果差别很大。考虑到样品 VI 中高剂量的麻黄生物碱限制了其作为候选风湿骨病中药组方的前景,本实验对体外抗炎活性优良并且预实验中有显著体内镇痛活性的腰痛宁减毒拆方样品 VIII 进行动物体内药效学实验,并与腰痛宁胶囊、阿司匹林进行比较。小鼠体内抗炎、镇痛药效学实验结果表明腰痛宁减毒拆方样品 VIII 的抗炎、镇痛活性显著优于腰痛宁全方,该减毒拆方在二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验中表现出了抗炎效果与给药剂量的量效关系,且其对小鼠扭体镇痛活性显著优于阿司匹林。上述结果表明马钱子生物碱对腰痛宁处方及其拆方的抗炎、镇痛作用贡献不大,降低马钱子生物碱在腰痛宁拆方中的用量、减少腰痛宁中处方药材及有效部位种类有助于优化腰痛宁处方、提高其安全性、质量可控性及药效。本课题组进一步研究表明,样品 VIII 在大鼠佐剂关节炎模型下亦表现出优于腰痛宁胶囊全方的药效<sup>[28]</sup>。综上,本研究提出的腰痛宁减毒拆方可作为风湿骨病新药候选组方,值得深入研究。

#### 参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.  
 [2] 刘艳平,李引刚. 腰痛宁胶囊治疗寒湿瘀阻型坐骨神经痛临床疗效观察 [J]. 中草药, 2015, 46(19): 2916-2918.

[3] Ni L J, Xu X L, Zhang L G, *et al.* Quantitative evaluation of the *in vitro* effect and interactions of active fractions in Yaotongning-based formulae on prostaglandin E<sub>2</sub> production [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014(154): 807-817.  
 [4] Zhang L G, Ouyang X W, Wu T T, *et al.* Quantitative evaluation of *in vitro* effects and interactions of active fractions in a Chinese medicinal formula (Yaotongning Capsule) on rat chondrocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014(155): 1424-1432.  
 [5] 张立国, 欧阳霄雯, 吴婷婷, 等. 腰痛宁胶囊药材活性部位不同组合对大鼠软骨细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 151-155.  
 [6] 倪力军, 郭燕子, 徐晓玲, 等. 腰痛宁胶囊及其拆方对 Ana-1 细胞免疫功能的影响 [J]. 中成药, 2014, 36(11): 2252-2257.  
 [7] 倪力军, 徐晓玲, 史万忠, 等. 腰痛宁胶囊活性部位组合对 PGE<sub>2</sub>、IL-2、NO 细胞因子的影响及其相互作用 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3424-3431.  
 [8] 张立国, 程佳佳, 倪力军, 等. 以生物碱为主要部位的 7 种腰痛宁衍生方的细胞抗炎、免疫活性比较及优选组方的体内药效评价 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 963-969.  
 [9] 倪力军, 朱婷婷, 王南南, 等. 腰痛宁胶囊组方不同有效部位细胞药理活性评价 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(5): 963-970.  
 [10] 张立国, 赵丽丽, 倪力军, 等. 以多糖为主要部位的 6 种腰痛宁衍生方对巨噬细胞中炎症因子表达及软骨细胞增殖的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3710-3716.  
 [11] Ni L J, Wang N N, Zhang L G, *et al.* Evaluation of the effects of active fractions of Chinese medicine formulas on IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  release from ANA-1 murine macrophage [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016(179): 420-431.  
 [12] 马毅敏, 李娜, 刘承伟, 等. 板蓝根不同提取部位抗炎镇痛活性比较研究 [J]. 中草药, 2014, 45(17): 2517-2521.  
 [13] 陈素, 吴水才, 曾毅, 等. 龙血竭总黄酮抗炎镇痛作用及其镇痛机制探讨 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(5): 1030-1032.  
 [14] 倪力军, 盖群, 陈露, 等. 不同粒径马钱子粉中马钱子碱、士的宁的含量分析与比较 [J]. 华东理工大学学报: 自然科学版, 2012, 38(2): 195-199.  
 [15] Ni L J, Zhao W W, Zhang L G, *et al.* Microstructure, content and *in vitro* release of brucine and strychnine of *Strychnos nux-vomica* powder with different particle sizes [J]. *Trans Tianjin Univ*, 2014, 20(6): 444-450.  
 [16] Zhang L G, Fang C Y, Ouyang X W, *et al.* Simultaneous determination of saponins in *Radix Glycyrrhizae*, *Notoginseng* and ginseng by high performance liquid chromatography [J]. *Trans Tianjin Univ*, 2013, 19(6):

- 430-435.
- [17] 张立国, 闫志慧, 陈露, 等. 粒径对甘草粉末中甘草酸、甘草苷的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3328-3333.
- [18] 倪力军, 王媛媛, 何婉瑛, 等. 8 种多糖的单糖组成、活性及其相关性分析 [J]. 天津大学学报, 2014, 47(4): 326-330.
- [19] Zhang L G, Zhang C, Ni L J, *et al.* Rectification extraction of Chinese herbs' volatile oils and comparison with conventional steam distillation [J]. *Sep Purif Technol*, 2011, 77(2): 261-268.
- [20] Zhang L G, Ouyang X W, Ni L J, *et al.* Preparation and evaluation of the microcapsule containing volatile oil of *Herba Schizonepetae* by emulsion solvent diffusion method [J]. *Trans Tianjin Univ*, 2014, 20(2): 103-111.
- [21] Yang C M, Tsai Y J, Pan S L, *et al.* Pharmacological and functional characterization of bradykinin receptor sinin rat cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Signal*, 1999, 11(12): 853-862.
- [22] Mansour A, Lewis M E, Khachaturian H, *et al.* Pharmacological and anatomical evidence of selective  $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$  opioid receptor binding in rat brain [J]. *Brain Res*, 1986, 399(1): 69-79.
- [23] 刘伯一, 张海林. 缓激肽、离子通道与炎症性疼痛 [J]. 药学报, 2009, 44(10): 1066-1071.
- [24] Leeb-Lundberg L M, Marceau F, Muller-Esterl W, *et al.* International union of pharmacology XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences [J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(1): 27-77.
- [25] 沃格尔 H G. 药理学实验指南——新药发现和药理学评价 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [26] 詹玲. 外周阿片受体研究进展 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2013, 19(5): 289-293.
- [27] 杨金声. 腰痛宁胶囊治疗类风湿关节炎对比疗效观察及实验研究 [A] // 第四届全国中西医结合风湿类疾病学术会议 [C]. 长沙: 中国中西医结合学会, 2000.
- [28] 史万忠, 吴婷婷, 张立国, 等. 风湿骨病候选复方祛风四味方对大鼠佐剂性关节炎治疗作用及机制研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(2): 205-210.