

利尿合剂抗炎镇痛及体外抑菌作用研究

郭文贤, 戴卫波*, 梅全喜, 李红念

广州中医药大学附属中山医院, 广东 中山 528400

摘要: **目的** 研究利尿合剂的抗炎镇痛及体外抑菌作用, 为临床用药提供科学的理论依据。 **方法** 采用二甲苯致耳肿胀实验、冰醋酸致小鼠扭体反应实验、冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加实验及福尔马林致痛实验, 观察利尿合剂高、中、低剂量组(以生药计 18.0、9.0、4.5 g/kg)的抗炎镇痛作用; 采用 K-B 纸片扩散法研究利尿合剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的体外抑菌作用。 **结果** 利尿合剂高剂量组可明显减轻小鼠耳廓肿胀度 ($P < 0.01$), 高、中、低剂量明显减少冰醋酸致小鼠扭体反应次数 ($P < 0.01$), 明显抑制冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低福尔马林致痛实验的第 I 时相的疼痛强度 ($P < 0.01$), 对第 II 时相的疼痛强度没有明显影响; 利尿合剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 95.04%、37.44%。 **结论** 利尿合剂具有较好的抗炎镇痛作用, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有体外抑菌作用。

关键词: 利尿合剂; 抗炎镇痛; 体外抑菌; 耳肿胀; 扭体反应; 毛细血管通透性

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)02-0201-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.02.011

Anti-inflammatory and analgesic effects *in vivo* and bacteriostasis effect *in vitro* of diuretic mixture

GUO Wen-xian, DAI Wei-bo, MEI Quan-xi, LI Hong-nian

Zhongshan Hospital, Guangzhou University of TCM, Zhongshan 528400, China

Abstract: **Objective** To investigate the analgesic and anti-inflammatory effects of diuretic mixture and its bacteriostasis effect *in vitro*, and to provide scientific basis for clinical application. **Methods** Ear swelling test induced by xylene, twisting reaction test induced by acetic acid, capillary permeability increase in abdominal cavity of mice induced by acetic acid, and pain test induced by formalin were used to observe the analgesic and anti-inflammatory effects of diuretic mixture at high, middle and low doses (crude drug 18.0, 9.0, and 4.5 g/kg). Bacteriostatic activities of diuretic mixture were tested by K-B paper disc diffusion method. **Results** Diuretic mixture alleviated ear edema in mouse model at high dose ($P < 0.01$). Diuretic mixture at high, middle, and low dose could effectively decrease the twisting reaction ($P < 0.01$), inhibit capillary permeability ($P < 0.05$ or 0.01), and ease the ache degree of mice induced by formalin in the first phase ($P < 0.01$), but there was no significant difference in the degree of pain intensity of phase II. The inhibitory rates of diuretic mixture on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were 95.04% and 37.44%, respectively. **Conclusion** Diuretic mixture has significant effects on analgesia and anti-inflammation and against *S. aureus* and *E. coli* *in vitro*.

Key words: diuretic mixture; analgesic and anti-inflammation; bacteriostasis effect *in vitro*; ear swelling; twisting reaction; capillary permeability

利尿合剂为中山市中医院制剂(粤药制字 Z20071008), 由叶下珠、白花蛇舌草、金沙藤、一点红等中药组成, 具有清热去湿、解毒通淋的功效, 用于泌尿系统感染、慢性肾炎、膀胱炎、肾炎水肿、下焦不利。临床报道其对妊娠期^[1]和骨髓损伤^[2]引

发的泌尿系感染, 以及对慢性肾炎、膀胱炎、肾炎水肿、下焦不利等泌尿系感染^[3]均有较好的作用, 可缓解泌尿系感染患者尿频、尿急、尿痛、小腹坠胀等症状, 缩短患者白细胞、红细胞好转时间, 缩短患者中段尿细菌清除率^[4]。但一直以来对本制剂

收稿日期: 2016-06-03

基金项目: 中山市科技计划项目(20132A166, 2015B1049)

作者简介: 郭文贤(1983—)男, 硕士, 主要从事老年病和泌尿肾病研究。E-mail: 119329190@qq.com

*通信作者 戴卫波(1984—)男, 硕士, 主要从事广东地产药材开发研究。Tel: 0760-88815106 E-mail: daiweibo007@163.com

的药理作用缺乏研究,本课题组对利尿合剂的抗炎、镇痛及体外抑菌作用进行了初步研究。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

利尿合剂(由中山市中医院制剂室提供,批号20150903,含0.90 g生药/mL,规格100 mL/瓶);吲哚美辛肠溶片(消炎痛,广东华南药业股份有限公司,批号140401,含吲哚美辛25 mg/片,规格100片/瓶)。

二甲苯、冰醋酸(广州化学试剂厂,批号分别为970302-2、20070902-2);伊文思兰(中国医药公司,批号871225);甲醛(分析纯)、70%乙醇(AR)、蒸馏水、即用MH琼脂培养基(江门市凯琳贸易有限公司);营养肉汤(广东环凯生物科技有限公司);药敏纸片(OXOID,广州纳特生物科技有限公司)。

1.2 菌株

革兰阳性菌:金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, ATCC29213;革兰阴性菌:大肠埃希菌 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC25922;两种标准菌株均为国家卫生计生委临床检验中心提供。

1.3 实验动物

SPF级昆明种小鼠,体质量(20±2)g,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(粤)2013-0034。饲养于广东省中山市中医院中药药理实验室,环境温度(22±2)℃,相对湿度50%~60%。根据实验性质和性别分笼喂养,自由采食饮水。

1.4 主要仪器

YLS-Q4耳肿打耳器(直径8 mm,山东省医学科学院设备站);UV-754型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂);微量移液器(上海求精生化试剂仪器有限公司);TD25-WS48孔多管架自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);JA1203电子天平(上海天平仪器厂);LRH-250A生化培养箱(广东省医疗器械厂);XSW-CJ-2A标准型净化工作台(吴江市津化设备总厂);LMQR-4060型立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);DL-ZD1浊度仪(珠海迪尔生物工程有限公司)。

2 方法

2.1 小鼠分组及给药

取小鼠50只,按体质量随机分成空白对照组、吲哚美辛(阳性药)组和利尿合剂高、中、低剂量组,每组10只,雌雄各半。空白对照组ig给予生

理盐水;利尿合剂高、中、低剂量组分别ig给予18.0、9.0、4.5 g/kg(以生药计),低、中、高剂量为临床等效剂量的1、2、4倍,每天1次,连续给药7d;第7天吲哚美辛组ig 0.013 g/kg吲哚美辛混悬液1次^[5-6];给药体积均为20 mL/kg。

2.2 二甲苯致小鼠耳肿胀实验

末次给药60 min后,各组小鼠右耳用精密移液器均匀涂以二甲苯30 μL/只双面致炎,左耳对照。20 min后脱颈椎处死动物,沿耳廓基线剪下两耳,剪去毛,叠加完整,用直径为8 mm打孔器在同一部位打下两圆耳片,精确称重。以左右耳片质量之差为肿胀度,计算肿胀抑制率。

肿胀抑制率=(空白对照组平均肿胀度-给药组平均肿胀度)/空白对照组平均肿胀度

2.3 冰醋酸致小鼠扭体反应模型镇痛实验

最后一次给药后60 min,每只小鼠ip 0.6%冰醋酸溶液0.1 mL/10 g体质量致炎,记录20 min内扭体次数,并计算抑制率。

抑制率=(对照组平均扭体次数-给药组平均扭体次数)/对照组平均扭体次数

2.4 冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加模型抗炎实验

取小鼠52只,按体质量随机分成空白对照组、吲哚美辛(阳性药)组和利尿合剂高、中、低剂量组,空白对照组和吲哚美辛组11只,其余各组10只,雌雄各半。给药方式同“2.1”项,最后一次给药后60 min,每只小鼠尾iv 0.5%伊文思兰溶液0.1 mL/10 g,随即ip 0.6%冰醋酸溶液0.1 mL/10 g。注射醋酸50 min后脱颈椎处死小鼠,打开小鼠腹腔用5 mL冰生理盐水冲洗,并将冲洗液转移至10 mL容量瓶中加入生理盐水定容至10 mL,所得定容液转移至试管中并3000 r/min离心10 min,取上清液,在紫外可见分光光度计590 nm波长处测吸光度(*A*)值,以*A*值表示腹腔液中的伊文思兰水平^[19]。计算抑制率。

抑制率=(空白对照组平均*A*值-给药组平均*A*值)/空白对照组平均*A*值

2.5 福尔马林致痛模型镇痛实验

于末次给药1 h于小鼠右后足趾sc 2.5%福尔马林溶液(20 μL/只),立即将小鼠置于小鼠笼中观测。以舔右后足趾时间为小鼠痛反应指标,分别记录小鼠注射后(0~10 min)和(10~30 min)的累计舔足时间,代表第I、II时相疼痛强度。计算疼痛抑制率。

疼痛抑制率 = (空白对照组时间 - 给药组时间) / 空白对照组时间

2.6 K-B 纸片扩散法体外抑菌实验

2.6.1 菌悬液的配制 两种实验标准菌种金黄色葡萄球菌、大肠杆菌经平板分离培养 24 h 后, 用无菌接种环挑选数个菌种置于生理盐水稀释液中, 用浊度仪校正浓度至 0.5 麦氏标准液。

2.6.2 药敏纸片的制备 取利尿合剂 20 mL (0.9 g/mL) 高温高压灭菌后, 用无菌水定容至 20 mL。在净化工作台环境下操作, 用微量移液器吸取 30 μ L 药液均匀涂布于无菌空白药敏纸片, 两面各 15 μ L, 在无菌平皿中晾干备用。另吸取 30 μ L 无菌生理盐水均匀涂布于无菌空白药敏纸片, 两面各 15 μ L, 晾干, 制备成阴性对照纸片。

2.6.3 利尿合剂抑菌作用及抑菌率^[7] 分别取“2.6.1”项菌悬液, 在无菌操作条件下, 用不同无菌棉棒均匀涂抹在琼脂培养基上, 再用无菌镊子将晾干的药敏纸片和阴性对照纸片均匀间隔贴于各琼脂培养基表面, 轻压纸片使接触良好, 将培养基放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 18~24 h 后取出, 测量并记录各抑菌圈直径, 计算平均直径及抑菌率。判断标准: 不敏感 (≤ 6.25 mm, -); 低度敏感 (≤ 7 mm, +); 中度敏感 (> 7 mm, ++); 高度敏感 (≥ 15 mm, +++).

抑菌率 = (给药组抑菌圈平均直径 - 阴性对照滤纸片直径) / 阴性对照滤纸片直径

2.7 统计方法

采用 SPSS 19.0 软件处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 进行 Dunnet-*t* 或 *t'* 检验。

3 结果

3.1 二甲苯致小鼠耳廓肿胀实验

对二甲苯致小鼠耳廓肿胀, 阳性药吲哚美辛组、利尿合剂高剂量组与空白对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$ 、0.01)。结果提示, 利尿合剂在 18 g 生药/kg 剂量下对二甲苯致小鼠耳廓急性炎性肿胀具有显著抑制作用, 抑制作用达 76.65%, 见表 1。

3.2 冰醋酸致小鼠扭体反应镇痛实验

如表 2 所示, 与空白对照组比较, 吲哚美辛组和利尿合剂高、中、低剂量组均能明显减少冰醋酸致小鼠扭体反应次数 ($P < 0.05$ 、0.01); 利尿合剂各剂量组对小鼠扭体反应次数的抑制率均高于吲哚美辛组, 对冰醋酸致小鼠疼痛的抑制率呈剂量相关

表 1 二甲苯致耳肿胀模型抗炎实验 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Anti-inflammatory experiment of ear swelling model induced by xylene ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	肿胀度/mg	抑制率/%
空白对照	—	16.70 $\pm$ 7.12	—
吲哚美辛	0.013	10.60 $\pm$ 6.69*	36.53
利尿合剂	18.0	3.90 $\pm$ 2.38**	76.65
	9.0	11.30 $\pm$ 3.62	32.34
	4.5	12.70 $\pm$ 1.70	23.95

与空白对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs blank control group, same as below

表 2 冰醋酸致小鼠扭体反应模型镇痛实验 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Experimental model of mouse body twisting reaction induced by glacial acetic acid ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i> /只	剂量/(g·kg ⁻¹)	扭体次数	抑制率/%
空白对照	10	—	33.70 $\pm$ 14.71	—
吲哚美辛	10	0.013	18.30 $\pm$ 10.07*	45.70
利尿合剂	9	18.0	15.56 $\pm$ 8.67**	53.82
	10	9.0	16.30 $\pm$ 9.89**	51.63
	10	4.5	17.50 $\pm$ 10.75**	48.07

性, 以 18 g/kg 剂量抑制率最高, 为 53.82%。结果提示, 利尿合剂能对抗冰醋酸所致小鼠的疼痛性反应。其中利尿合剂高剂量组雌性 5 号动物 ig 第 4 天操作失误死亡。

3.3 冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加模型抗炎实验

实验结果表明, 吲哚美辛阳性对照组和利尿合剂高、中、低剂量组腹腔洗液的 *A* 值与空白对照组比较, 在统计学上均有显著性差异 ($P < 0.05$ 、0.01), 提示利尿合剂对炎性过程中毛细血管通透性增加具有一定的抑制作用。结果见表 3。

表 3 冰醋酸致小鼠腹腔毛细血管通透性增加模型抗炎实验 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Capillary permeability increase model in mice induced by glacial acetic acid ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i> /只	剂量/(g·kg ⁻¹)	<i>A</i> 值	抑制率/%
空白对照	11	—	1.60 $\pm$ 0.31	—
吲哚美辛	11	0.013	0.60 $\pm$ 0.20**	62.50
利尿合剂	10	18.0	0.84 $\pm$ 0.41**	47.50
	10	9.0	1.05 $\pm$ 0.50*	34.38
	10	4.5	0.99 $\pm$ 0.37**	38.13

3.4 福尔马林致痛模型镇痛实验

与空白对照组比较, 吡哌美辛组可显著减少第 I、II 时相的疼痛强度 ($P<0.05$ 、 0.01), 利尿合剂高、中、低剂量组均可显著降低第 I 时相的疼痛强

度 ($P<0.01$), 且 3 个剂量对第 I 时相的疼痛抑制率均相当, 分别为 45.74%、47.18%、47.43%, 利尿合剂 3 个剂量对第 II 时相的疼痛强度没有显著降低作用作用。见表 4。

表 4 福尔马林致痛模型镇痛实验 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Analgesic effects of Faure Marin induced pain model ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	累计舔足时间/s		疼痛抑制率/%	
		第 I 时相	第 II 时相	第 I 时相	第 II 时相
空白对照	—	95.13±38.03	184.45±97.46	—	—
吡哌美辛	0.013	58.96±27.08**	89.26±67.24*	38.02	51.61
利尿合剂	18.0	51.62±26.50**	123.98±82.10	45.74	32.78
	9.0	50.25±14.75**	125.24±50.58	47.18	32.10
	4.5	50.01±26.37**	107.32±75.48	47.43	41.82

3.5 K-B 纸片扩散法体外抑菌实验

利尿合剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌均有不同程度的体外抑菌作用, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 95.04%、37.44%。结果见表 5 和图 1。

4 讨论

本研究采用醋酸致小鼠疼痛扭体反应、福尔马

林致小鼠疼痛舔足反应、二甲苯引起小鼠耳廓炎性肿胀反应及醋酸引起小鼠腹腔毛细血管炎性通透性反应, 对利尿合剂的镇痛抗炎作用进行了观察。炎症是机体对损伤所产生的防御反应, 二甲苯作用于小鼠耳廓, 刺激肥大细胞释放组织胺、5-羟色胺等血管活性胺类, 引起耳廓组织微血管扩张和通透性升高, 组织液外渗, 引发水肿^[8]。而稀醋酸中的 H⁺可刺激腹腔毛细血管, 使得其通透性增高, 引发体液向腹腔内渗。伊文思兰可与血浆蛋白瞬间结合, 随体液渗入腹腔, 从而可通过检测腹腔内渗出的染料量推测出炎症物质的渗出量^[9]。本研究显示利尿合剂对二甲苯致小鼠耳肿胀有显著抑制作用, 使冰醋酸致炎后小鼠腹腔洗液伊文思兰 A 值显著降低, 表明利尿合剂有显著的抗炎作用。

在扭体反应中, 利尿合剂能显著抑制醋酸所致小鼠的疼痛扭体反应。sc 福尔马林可通过刺激 C 纤维激活广动力背角神经元, 引发疼痛, 由此第 I 相 (0~10 min) 时为直接刺激 C 纤维而引发疼痛, 第 II 相 (10~30 min) 则有炎症机制的参与而引发疼痛^[8]。本实验研究发现利尿合剂能显著抑制第 I 时相的疼痛, 对第 II 相疼痛没有显著抑制作用, 但整体 3 个剂量均能减少第 II 时相的舔足累计时间, 呈疼痛抑制作用趋势, 具体原因仍有待进一步研究。

在体外抑菌实验中, 利尿合剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌率分别为 95.04%、37.44%, 由此表明, 利尿合剂具有较好的抗炎镇痛作用, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌具有体外抑菌作用。

利尿合剂在我院临床用于肾炎、膀胱炎等泌尿

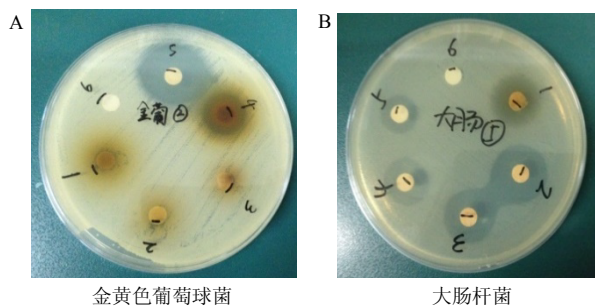


图 A 中标记 4 为利尿合剂组, 6 为阴性对照; 图 B 中标记 1 为利尿合剂, 6 为阴性对照

Mark 4 in picture A is diuretic mixture group, and mark 6 is negative control group; maker 1 in figure B is diuretic mixture group, and maker 6 is negative control group

图 1 利尿合剂对实验菌的抑菌作用

Fig. 1 Effect of diuretic mixture on test bacteria

表 5 利尿合剂抑菌作用及抑菌率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Inhibitory effect and antibacterial rate of diuretic mixture ($\bar{x} \pm s, n=3$)

实验菌	阴性对照纸片直径/mm	抑菌圈平均直径/mm	抑菌率/%
金葡球菌	6.25	12.19±2.31	95.04
大肠杆菌	6.25	8.59±1.26	37.44

系感染疾病治疗, 本研究揭示了其在抗炎、镇痛及抑菌方面的药理作用, 可为该制剂应用于临床提供药理依据。

参考文献

- [1] 黄新凯, 杨林华. 利尿合剂治疗妊娠期泌尿系感染疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(11): 1228.
- [2] 潘佩婵, 高 恒. 利尿合剂在预防脊髓损伤后泌尿系感染中的作用 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(14): 1758-1759.
- [3] 雷素云, 罗 清, 钟 亮, 等. 利尿合剂的制备及临床疗效观察 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(7): 1364.
- [4] 戴卫波, 黄新凯, 郭文贤, 等. 利尿合剂用于泌尿系感染患者临床疗效的评价 [J]. 抗感染药学, 2015, 12(1): 103-105.
- [5] 曾聪彦, 梅全喜, 高玉侨, 等. 布渣叶水提物镇痛药效学的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(8): 1757-1758.
- [6] 彭伟文, 谭泳怡, 梅全喜, 等. 黑面神水提物抗炎作用实验研究 [J]. 今日药学, 2012, 22(3): 145-147.
- [7] 戴卫波, 吴凤荣, 肖文娟, 等. 叶下珠甲醇提取物抗炎镇痛及体外抑菌作用研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(4): 978-981.
- [8] 徐叔云, 卞如濂, 陈 修, 等. 药理实验方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882.
- [9] 陈 奇. 中药药理研究方法学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 305-306.