

转化理念指导下的芍药甘草汤 抗炎止痛实验研究*

□隋 峰** 李兰芳 李 珊 郭淑英 霍海如 姜廷良**

(中国中医科学院中药研究所唐氏中药研究中心 北京 100700)

摘 要:目的:揭示芍药与甘草的配伍机理,评价芍药、甘草以及芍甘 1:1 组对佐剂性关节炎的疗效和药效学特征。方法:采用完全佛氏佐剂复制大鼠关节炎模型,分别给予芍药、甘草以及芍药甘草汤灌胃治疗,观察并分析大鼠的行为学、足温、痛阈以及关节肿胀度的变化。结果:大鼠注射完全佛氏佐剂后,体重明显减轻,足温升高,痛阈降低,关节肿胀明显;各给药组对上述指标均有不同程度的逆转作用,尤以芍甘 1:1 组最为明显。结论:芍药、甘草以及芍药甘草汤对大鼠佐剂性关节炎均有明显的治疗作用,且以芍药和甘草配伍组效果最佳。

关键词:转化医学 芍药甘草汤 佐剂性关节炎 抗炎 止痛

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.037

近年来,美国制药企业对新药开发的投入越来越大,但研发效率却呈逐年下降的态势,因而面临着巨大的压力和挑战。据报道,已经进入临床研究阶段的药物,仍约有 90% 由于不良反应过大或疗效不理想而以失败告终。很多医药学专家、学者将新药研发过程中基础研究与临床研究的脱节归结为造成这种情况的主要症结^[1]。为进一步促进新药研发过程“药”与“医”的紧密结合,从而提高新药的转化效率,更好的服务于临床,美国国立卫生研究院(NIH)于 2003

年提出了转化医学(Translational Medicine)的概念。

在药物的研发过程中,转化医学的典型含义是将基础研究的成果转化成为临床上真正治疗手段,强调的是从实验室到病床旁(Bench-Bedside)的联接。鉴于转化医学是针对国际主流医学—现代医学的问题提出的,那么对传统中医药来说,是否有必要引入转化医学的研发理念?又如何转化?这些是值得我们中医药工作者们深入思考的问题。笔者认为,由于理论体系、诊疗模式等方面的差异,中医药新药的开发和研究遵循从临床到基础再到临床的模式和路线,即中药新药研发药大多有临床基础,故从这一角

收稿日期:2010-11-19

修回日期:2011-01-30

* 国家自然科学基金面上项目(30873393):芍药甘草汤干预 TRPV₁ 通路的止痛分子机理及其配伍机制,负责人:隋峰;国家自然科学基金面上项目(30672677):基于瞬变感受器电位离子通道蛋白(TRPs)的中药四性分子机制研究,负责人:霍海如;北京市自然科学基金面上项目(7092074):芍药甘草汤干预 TRPV₁ 通路的止痛机理与配伍机制,负责人:隋峰。

** 通讯作者:隋峰,研究员,中国中医科学院中药研究所药性理论与复杂性科学研究室副主任,主要研究方向:中药抗炎止痛的分子机理和中药药性的现代科学内涵,Tel:010-64041008,E-mail:suifeng2136@126.com;姜廷良,本刊学术顾问,研究员,中国中医科学院中药研究所唐氏中药研究中心主任,主要研究方向:中药药理和中药新药开发,Tel:010-64041008,E-mail:jiangt2005@sohu.com。

度讲,中医药是天然的转化医学,但这并不意味着中药的开发就不需要转化医学理念的指导。转换医学倡导以患者为中心,从临床工作中发现和提出问题,由基础研究人员进行深入研究,然后再将基础科研成果快速转向临床应用,基础与临床科技工作者密切合作,以提高医疗总体水平。对中药新药研究而言,“源于临床”的导向更多的体现在有临床基础,而大多忽略了临床需要,这也是导致很多中药新药上市后,由于患者群体小,不能被广泛推广使用的一个重要原因。

随着转化医学重要性的不断提升,它的内涵和外延也在不断发生变化,广义上讲,任何有利于临床应用和治疗的研究过程均可视为转化医学研究范畴。中药的活性成分不明确、作用机制不清楚以及难以复制出能够客观反应中医临床病理状态的实验动物病理模型,从而不能有效评价中药的药效实质和特征,是制约中医药现代化和客观化以及开发高质量中药新药的关键环节,也因此应是今后中药转化医学重点关注和研究的方向。我们课题组在转化医学理念的指导下,选择临床常用有效方剂—芍药甘草汤,做了一部分药效学评价的基础性研究工作,现报道如下:

一、材 料

1. 实验动物

SD 大鼠 40 只(购于中国中医科学院动物科研实验中心,合格证号:医动字第 01-3008),雌雄各半,体重(200±20)g。

2. 药物和试剂

芍药(安徽产),甘草(内蒙产),均购于北京人卫饮片厂,经生药学鉴定;佛氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA),购于 Sigma 公司。

3. 实验仪器

数字温度计(深圳市欣宝瑞仪器有限公司生产),游标卡尺(北京北量机电工量具有限责任公司生产),电子天平(上海精科天平厂),甩尾痛觉测试仪(美国 Harvard 仪器公司)。

二、方 法

1. 动物模型复制与分组

大鼠雌雄分开,于实验前适应性喂养 1w 后,随机分为 5 组(每组雌雄各半):芍药组、甘草组、芍药

甘草 1:1 组、模型组、空白组。除空白组外,其余 4 组各鼠分别从左后足足底皮内注射完全佛氏佐剂(CFA)0.1mL,制备佐剂性关节炎(Adjuvant Arthritis, AA)模型^[2]。

2. 药物制备

芍药组和甘草组:分别取芍药、甘草单味药各 3500g,加 5 倍量蒸馏水,浸泡 1h,煎煮 30min,过滤,加 2 倍量水煎煮 20min,过滤,合并煎液,分别浓缩至 1400mL (2.5g·mL⁻¹)。芍药甘草 1:1 组:分别量取芍药、甘草水煎液 350mL,混匀,得芍药甘草 1:1 水煎液 700mL (2.5g·mL⁻¹),4℃冷藏,备用。

3. 给药方法

实验第 8d 起灌胃给药,2mL/100g,每日 1 次,模型组、空白组给予相等体积生理盐水。连续给药 16d,于末次给药测完所有数据后处死大鼠。

4. 指标测定

实验期间,每隔一段时间对大鼠进行行为学观察及肿胀度测量,并作记录。

(1)行为学观察。

分别于造模后第 0、2、8、13、17、21d 观察各组大鼠的毛色、光泽度、活动状况及炎症部位颜色变化,并测量各组大鼠体重。

(2)足温。

分别于造模后第 1、5、9、13、17、21、23d 用数字温度计测量各组大鼠左、右后足同一位置(第 1、2 趾间)温度。

(3)痛阈。

分别于造模后第 1、5、9、13、17、21d 用甩尾痛觉测试仪测量各组大鼠痛阈。

(4)足跖肿胀度。

分别于造模后第 1、5、9、13、17、21、23d 用游标卡尺测量各组大鼠左、右后足的同一位置足跖厚度。

5. 统计方法

各组数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析应用 SPSS 11.5 软件处理,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验进行显著性检验。

三、结 果

1. 行为学观察结果

实验过程中,空白组大鼠的状态良好、毛发光滑、动作自如、反应灵敏;模型组大鼠的毛发枯槁,进食量减少,动作迟缓、反应迟钝、爬行困难、活动减

少,造模后 1h 造模侧即出现红肿且逐渐加重,5d 后逐渐消退,13d 起继发性肿胀出现,造模侧及其对侧均出现红肿,17d 时肿胀最为严重。给药组大鼠所出现的症状相对较轻,且摄食积极,皮毛较光滑有光泽,反应较灵敏,红肿程度较轻,其中以芍甘 1:1 组大鼠状态最佳。各组大鼠体重随时间均有所增加,其中空白组较其它组体重增长幅度明显,给药组体重增长速度比模型组为快(图 1)。

2. 足温变化

造模后前 3d 造模侧(左)足温明显高于空白组,用手触摸可感觉到明显发热,第 5d 起温度有所下降,第 13d 时随着继发性肿胀的出现,温度又开始上升,造模对侧(右)足温也开始升高,至第 17d 两侧足温均达到最高值,随后随继发性肿胀的消退而逐渐降低;给药组大鼠的发热状况与模型组相比均有所缓解,且以芍药甘草 1:1 组降温效果最好(图 2、3)。

3. 痛阈变化

测量结果表明,与空白组相比,模型组大鼠的痛阈显著降低;从第 13d 起,芍甘 1:1 组对模型组痛阈的降低起到显著的抑制作用;17d 以后,芍药组和甘草组痛阈值也显著高于模型组(表 1)。

4. 足跖肿胀测定

(1) 造模侧(左)足跖肿胀变化。

造模大鼠在左后足跖皮内注射 CFA 后,后足爪开始变红、肿胀明显,第 5d 后,肿胀逐渐减轻,第 13d 开始左后足再度肿胀,至 17d 肿胀最为严重,肿胀部位皮肤充血、红肿、增厚、温度升高、触之有明显的躲避行为。足跖厚度是能够反应 AA 模型大鼠炎症程度的客观指标,致炎后模型组大鼠左后足跖肿胀厚度与空白组有显著性差异 ($P<0.01$),提示模型复制成功。给药 5d(造模 13d)后,芍甘 1:1 组可以减轻 CFA 引发的大鼠足跖肿胀,与模型组有显著性差异 ($P<0.01$);给药 9d(造模 17d)后,芍药组和甘草组也可显著降低大鼠的足跖肿胀度 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$);3 个给药组相比,以芍甘 1:1 组降低足跖肿胀的作用最为明显(表 2)。

(2) 对侧(右)足跖肿胀变化。

致炎后第 13d,继发病变逐渐加重。对侧右后足开始红肿,

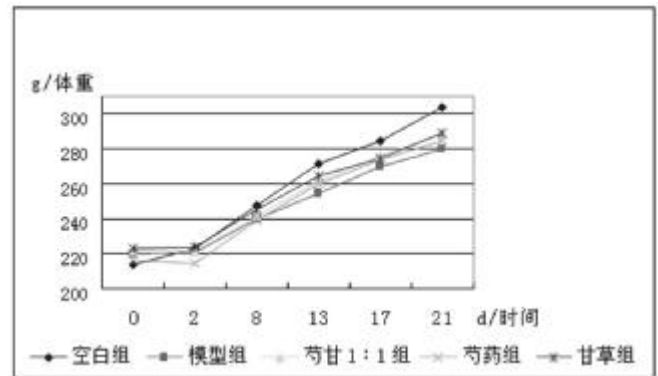


图 1 各组大鼠体重变化

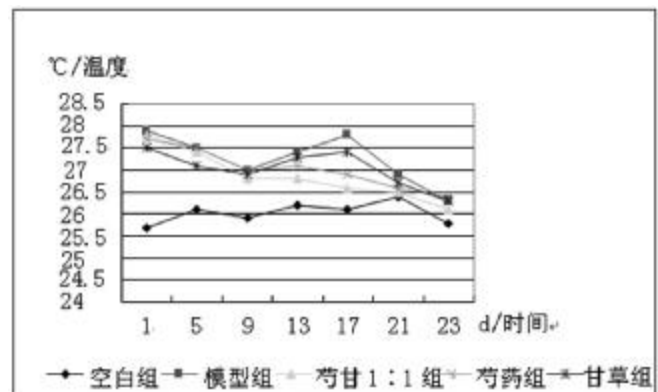


图 2 大鼠造模侧(左)足温度变化

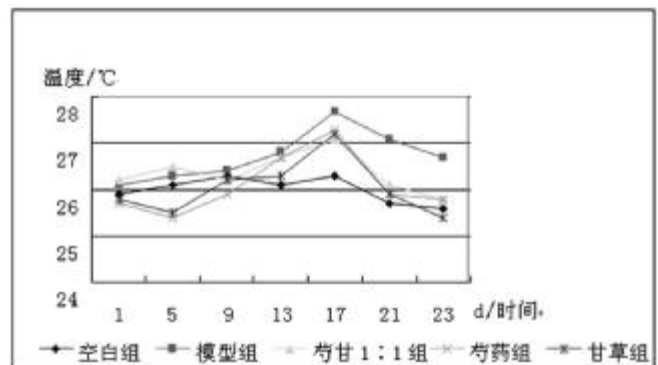


图 3 大鼠对侧(右)足温度变化

表 1 药物对大鼠痛阈的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8, s$)

组别	造模 1d	造模 5d	造模 9d	造模 13d	造模 17d	造模 21d
正常组	4.81±1.09	4.91±0.85	4.31±0.93	4.59±1.14	4.39±1.08	5.12±1.16
模型组	2.54±0.70**	2.75±0.98**	3.14±0.69**	2.64±0.78**	2.88±0.97**	2.81±0.83**
芍甘组	3.12±0.92	2.74±0.83	3.14±0.75	3.84±0.96##	4.78±1.23##	4.22±1.20##
芍药组	3.17±1.22	2.81±0.76	3.50±1.24	3.45±1.03	4.22±1.08##	3.83±1.02##
甘草组	3.10±0.84	2.91±0.83	3.50±1.14	3.04±0.95	4.38±1.25##	4.66±1.34##

注: **与空白组比较 $P<0.01$, #与模型组比较 $P<0.05$, ##与模型组比较 $P<0.01$ 。

主要表现在踝关节、脚趾关节及足跖出现肿大,屈伸不利,痛反射明显;至第 17d,继发性病变最为严重,致炎后模型组对侧足跖肿胀与空白组比较一直有显著性差异($P<0.01$)。给药 5d(造模 13 天)后,芍药 1:1 组大鼠继发性右足跖肿胀度明显低于模型组($P<0.01$);给药 9 天(造模 17d)后,芍药组、甘草组也与模型组出现显著性差异($P<0.01$ 或 $P<0.05$);3 个给药组相比,以芍药 1:1 组降低足跖肿胀的作用最明显(表 3)。

四、讨论

芍药甘草汤出自东汉张仲景《伤寒论》,由白芍和甘草两味药组成,是包括桂枝汤等在内的多种经方的方中方。该方配伍严谨,用药精简,可酸甘化阴,舒缓挛急。临床上加减广泛用于治疗关节炎、胃脘痛、腓肠肌痉挛、腰腿痛、足跟痛、急性乳腺炎、小儿腹痛、妊娠腹痛等病症均有良效^[3]。本研究本着转化医学的思想,以本方临床上治疗频次以及发病率均较高的类风湿关节炎为研究对象,通过采用佛氏佐剂,加强机体对抗原产生免疫力能力,复制出了拟临床关节炎病理的大鼠实验模型,在此基础上,对大鼠行为学、足温、痛阈等进行了综合分析和观察,进一步研究了芍药甘草汤对佐剂性关节炎的治疗作用,同时对芍药甘草汤与其组成药味芍药和甘草单味药进行了比较和研究。

有研究显示:致炎后的大鼠表现为原发性和继发性两个反应期,原发性反应期的病变主要表现为致炎局部的急性炎症反应。继发性反应期是由于免疫功能紊乱所造成的免疫性炎症反应,大多出现于致炎后的 10~16d,表现为持续性软组织炎症,伴有骨质溶解性骨膜炎、骨膜新骨形成、单核细胞浸润、血管翳形成、关节完全黏连等病理变化^[4-5]。本实验发现,大鼠在左后足足底皮内注入 CFA 后,2h 内大鼠左足局部即开始红肿,并伴随有发热现象;5d 后,局部肿胀开始逐渐消退;第 13d 左后足再度肿胀,并开始出现多发性的继发性炎症反应,大鼠的对侧(右后足)也出现关节红肿热痛症状,主要表现在踝关节、脚趾及足跖部位肿大,大鼠痛阈降低,足温升高。继发性病变在约 17d 达到高峰。整个实验过程中,AA 大鼠的足跖肿胀出现了两次高峰,且两次肿胀过程中模型组与空白组均出现显著性差异。这与文献报导的 AA 大鼠经历的几个阶段性变化,即急性局部炎症期(第 1~4d)、急性炎症缓解期(第 7~12d)、以多发性关节炎为特征的慢性周身炎症期(第 10~28d)基本一致,说明模型复制成功^[6]。

芍药组、甘草组和芍药 1:1 组在体重、足温、痛阈、关节肿胀度等多个评价环节均显示出能够逆转 AA 大鼠病理变化,提示:各给药组对实验性佐剂性关节炎损伤均有一定的治疗作用;各给药组中,芍药 1:1 组在各个评价指标上均优于其它两组,尤其是在

止痛的环节上,芍药组发挥作用的时间点明显早于其它两组,也充分体现出了中药多成分、多部位、多靶点发挥整合调节效应的作用特征以及通过复方配伍发挥协同作用的优势和配伍应用的科学性。本研究为芍药甘草汤临床用于治疗关节炎类疾病提供了有力的数据支持,也为本方的进一步开发,从而转化为临床上安全高效

表 2 大鼠造模侧(左)足跖肿胀程度的变化($\bar{x}\pm s, n=8, s$)

组别	造模 1d	造模 5d	造模 9d	造模 13d	造模 17d	造模 21d	造模 23d
正常组	0.14±0.08	0.28±0.11	0.43±0.13	0.57±0.12	0.71±0.15	0.84±0.18	0.92±0.20
模型组	2.74±0.26**	3.27±0.49**	2.38±0.28**	2.64±0.35**	2.65±0.32**	2.32±0.39**	2.20±0.38**
芍药组	2.90±0.28	3.26±0.50	2.32±0.35	2.03±0.36 ^{##}	1.73±0.27 ^{##}	1.43±0.21 ^{##}	1.35±0.25 ^{##}
芍药组	2.77±0.41	3.31±0.47	2.38±0.36	2.44±0.38	1.89±0.31 ^{##}	1.66±0.28 ^{##}	1.42±0.25 ^{##}
甘草组	2.72±0.38	3.20±0.42	2.34±0.41	2.47±0.43	2.23±0.39 ^{##}	1.84±0.21 ^{##}	1.72±0.25 ^{##}

注: **与空白组比较 $P<0.01$, # 与模型组比较 $P<0.05$, ## 与模型组比较 $P<0.01$ 。

表 3 大鼠对侧(右)足跖肿胀程度的变化($\bar{x}\pm s, n=8, s$)

组别	造模 1d	造模 5d	造模 9d	造模 13d	造模 17d	造模 21d	造模 23d
正常组	0.70±0.20**	0.91±0.28**	0.98±0.29**	1.36±0.28**	1.45±0.27**	1.43±0.23**	1.39±0.26**
模型组	0.16±0.09	0.28±0.15	0.45±0.13	0.58±0.14	0.70±0.18	0.83±0.16	0.90±0.21
芍药组	0.66±0.28	0.87±0.30	0.92±0.25	1.04±0.26 [#]	1.01±0.23 ^{##}	0.94±0.20 ^{##}	0.89±0.18 ^{##}
芍药组	0.71±0.32	0.91±0.30	0.88±0.36	1.14±0.31	1.02±0.28 ^{##}	0.98±0.24 ^{##}	0.91±0.23 ^{##}
甘草组	0.70±0.29	0.90±0.33	0.85±0.40	1.21±0.25	1.14±0.25 ^{##}	1.03±0.21 ^{##}	1.00±0.20 ^{##}

注: **与空白组比较 $P<0.01$, # 与模型组比较 $P<0.05$, ## 与模型组比较 $P<0.01$ 。

的中药制剂奠定了实验基础。本文仅为我们课题组在动物实验基础上针对芍药甘草汤抗炎止痛作用进行的部分药效评价工作,进一步的生物效应研究工作及其分子作用机理还有待深入研究。

参考文献

- 1 Steven M.Paul, Daniel. Mytelka, Christopher T. Dunwiddie, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9:203-214.
- 2 王婷玉,李俊,葛金芳,等. 豹皮樟总黄酮对大鼠佐剂性关节炎的作用及部分机制的研究. *中国药理学通报*, 2007, 23(12):1618-1623.
- 3 王均宁. 芍药甘草汤及其制剂止痛作用的药理与临床研究. *中成药*, 1999, 21(9):483.
- 4 牛拴成,张轩平,杨彩红,等. 祛风息痛丸对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007, 21(5):422-426.
- 5 唐玲,冀保全,史丽颖,等. 荨麻抗类风湿性关节炎的实验研究. *华西药理学杂志*, 2008, 23(5):552-555.
- 6 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京:人民卫生出版社, 1993:44-60.

Experimental Study on Anti-inflammatory and Pain-relieving Effects of Shaoyao Gancao Decoction Based on Translational Medicine

Sui Feng, Li Lanfang, Li Shan, Guo Shuying, Huo Hairu, Jiang Tingliang

(Tang Center for Herbal Medicine Research, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

Abstract: This study aimed to uncover the compatibility mechanism of *Paeonia lactiflora* (Shaoyao) with *Radix Glycyrrhiza* (Gancao) and evaluate the therapeutic effects and characteristics in the treatment of adjuvant arthritis by Shaoyao, Gancao and the combination of Shaoyao with Gancao (1:1). Adjuvant arthritis rat models were experimentally established with Freund's complete adjuvant. The behavior, foot temperature, pain threshold and swelling degree of the rat models were observed and analyzed. The data showed that after injection, the rats presented with decreased weight, increased foot temperature, decreased pain threshold and significant joint swelling. After drug administration, pathological changes mentioned above were gradually reversed. The group administered intragastrically with the combination of Shaoyao with Gancao (1:1) is the one with obvious symptom-relieving profile. The results indicated that all drugs applied in this study have obvious therapeutic effect in the treatment of adjuvant arthritis and the combination group presented with the best therapeutic effect.

Keywords: Translational medicine, Shaoyao Gancao decoction, Adjuvant arthritis, Anti-inflammation, Pain-relieving

(责任编辑:李沙沙 张志华, 责任译审:王 晶)