临床研究 文章编号:0253-3626(2011)06-0724-04

复方马钱子凝胶镇痛及对 IL-6 影响作用的研究

何 凯,刘岳凤,周 洁
(重庆医科大学附属第一医院中西医结合科,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过对大鼠炎症疼痛模型痛阈值的观察,以及在血清中检测白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)的表达,探讨复方马钱子凝胶的镇痛及抑制炎症反应作用及机理。方法:构建甲醛注射大鼠足跖引起的炎症疼痛模型,测量不同时间大鼠足跖疼痛阈值,应用酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)方法检测各组大鼠血清中 IL-6 的表达水平。结果:复方马钱子凝胶可明显提高甲醛致痛大鼠的痛阈值($P<0.01$),抑制血清中 IL-6 表达水平($P<0.01$)。结论:复方马钱子凝胶治疗软组织炎症疼痛损伤,对 IL-6 的抑制和减轻疼痛的作用,明显优于基质对照组,与扶他林阳性对照组作用相当,提示复方马钱子凝胶外敷,治疗实验性炎症和疼痛方面具有良好的抑制炎症反应和镇痛作用。

【关键词】马钱子;白细胞介素-6;镇痛;炎症
【中国图书分类法分类号】R285.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-25

Study on analgesia and IL-6 effects of nux vomica compound recipe gel

HE Kai, LIU Yue-feng, ZHOU Jie
(*Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To discuss analgesia and inhibiting inflammatory reaction mechanism of nux vomica compound recipe, By detecting interleukin(IL)IL-6 expression in inflammatory pain rat models and observing their pain threshold values. *Methods*: Formaldehyde functioning on rat's voix pedis caused voix pedis inflammatory pain. The pain thresholds were measured at different time points. Interleukin 6 (IL-6) expression levels were detected in the sera of rats using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Results*:Pain threshold remarkably increased in nux vomica compound recipe gel treating group, with internal IL-6 level decreasing at the same time ($P<0.01$). *Conclusion*:Nux vomica compound recipe gel treating group has remarkably

作者介绍:何 凯(1976-),男,主治医师,硕士,
研究方向:中医药外用抗炎及镇痛的研究。
通信作者:刘岳凤,女,副教授,Email:liuyuef@126.com。

提出的预测点 16.7 kPa 之间对于诊断肝硬化的评价指标分析,得出其二者在预测肝硬化上基本呈一致性状态。因此对于目前现行的诊断重度肝纤维化及早期肝硬化界值 17.3 kPa 基本可靠。

本研究进行过程中,出现 4 例 Fibroscan 检测失败者,分析影响肝脏硬度指标准确性甚至导致检查失败和不可靠性值出现的因素。发现其中 1 例患者因体型较为肥胖,以腹部肥胖为主,分析原因考虑为皮下脂肪较厚,影响肝脏弹性波的获取,导致检查失败。另 3 例检查失败者,其上腹部 MRI 和电子胃镜检查均提示明显肝硬化,且既往病史有明显的腹水及消化道出血的情况,临床诊断肝硬化明确,分析原因可能为肝脏严重缩小,肝硬化程度太重,不能准确捕获其弹性回波,导致检测失败。但由于目前检测失败病例有限,具体原因还有待进一步收集病例分析。

综上所述,通过本研究发现上腹部 MRI、电子胃镜、血肝纤维谱透明质酸与 LSM 值之间存在明显关系,因此,可考虑用 Fibroscan 简单、无创、价廉的检查手段,结合各项血清学指标以及影像学检查对慢性乙型肝炎肝纤维化作出比较全面的综合分析,广泛预测肝纤维化、早期肝硬化、食道胃底静脉曲张和相关药物疗效的观察,必要时再行肝脏组织学穿刺检查。

参 考 文 献

[1] 中华医学会肝病学分会,传染病与寄生虫病学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝脏病杂志,2000,8(6):324-329.
[2] Han K H, Yoon K T.New diagnostic method for liver fibrosis and cirrhosis[J].Intervirology,2008,51(1):11-16.
[3] 杨爱婷,白艳锋,尤 红.FIBROSCAN 对乙型肝炎肝纤维化诊断的研究进展[J].实用肝脏病杂志,2009,4(12):142-144.
[4] 罗瑞虹,杨绍基,谢俊强,等.肝纤维化血清五项标志物的诊断意义[J].中华肝脏病杂志,2001,9(3):148-150.

(责任编辑:冉明会)

better effects of IL-6 inhibition and pain relieving than the matrix comparison group, and functions equally to votalin positive comparison group. The findings suggest that nux vomica compound recipe gel can inhibit inflammatory reaction and analgesic activity well in aspects of treating experimental inflammation and pain.

【Key words】nux vomica; interleukin-6;analgesia;inflammation

外治法是中医治疗方法的一个重要组成部分，应用范围极广。运用中医外治法治疗伤科疼痛病证，有疗效快、费用低、治疗方便、副作用小等优点。复方马钱子凝胶是由制马钱子、祖师麻、细辛、当归、白芍、川芎、防风、桂枝等药物组成，具有祛风散寒、活血通络、消肿止痛之功，将其外敷于局部治疗跌打损伤、局部肿痛以及关节、肌肉、软组织的肿痛，在临床上有一定的疗效。为进一步评价其镇痛及抑制炎症反应的作用，并探讨其机理，我们进行了复方马钱子凝胶镇痛及抑制炎症反应的动物实验研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药品及试剂 卡波姆 940(Carbomer 940)为北京鑫洲科技有限公司产品，氮酮(Azone)为福建寿宁美菲思生物化学品厂，甲醛为重庆川东化工集团公司产品。检测大鼠血清白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)水平的酶联免疫吸附(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒为美国 R&D 公司产品。双氯芬酸二乙胺乳胶剂，为北京诺华制药有限公司产品。

1.1.2 复方马钱子凝胶药物的制备 实验选用凝胶剂，适用于皮肤、黏膜及腔道，可添加透皮吸收促进剂，促使药物吸收加快和完全，较快地发挥疗效[1]。取复方马钱子生药材水煎浓缩，在 80℃的条件下，将原药材去渣浓缩成棕黑色药膏(含生药量 2.4 g/g 浸膏)。实验采用添加氮酮透皮促进剂来增加药物的穿透性和提高药物的疗效。氮酮在低浓度(2.5%)时就能极大的增强药物的透皮作用[2]。取卡波姆加入适量的双蒸水待溶解肿胀完全后，加甘油、氮酮研匀使完全溶解肿胀，另取三乙醇胺滴定至 pH=6~6.5，搅拌均匀，避光密封保存[3]。用凝胶基质与复方马钱子药膏混匀，分别配制成含生药 0.125、0.25、0.5 g/g 低、中、高 3 个剂量的复方马钱子凝胶[4]，避光密封保存备用。

1.1.3 实验动物 雄性 SD 大鼠，体质量 180~200 g，重庆医科大学动物实验中心提供。大学实验动物中心提供的标准饲料饲养，实验在重庆医科大学动物实验中心进行。

1.1.4 实验仪器 YLS-3E 电子压痛仪，由山东省医学科学院设备站研制。Labsystems Dragon Wellscan MK-3 全自动多功能酶标仪，由重庆医科大学临床检验中心提供。PB602-E 型分析电子天平，瑞士梅特勒-托利公司生产。

1.2 实验方法

本研究采用采用 Abbott 等[5]推荐的 5%甲醛，甲醛诱导大鼠炎痛模型[6]，注射于大鼠右后足跖复制疼痛模型，观察复方马钱子凝胶的镇痛及抑制炎症反应作用，阳性对照组选用扶他林乳胶剂。

1.2.1 痛阈值的测定 雄性 SD 大鼠 50 只，体质量 180~200 g，致炎前采用压痛仪测定各组大鼠右后足跖的原始痛阈[7]。将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为基质对照组(敷基质 10 g/kg 体重)、扶他林乳剂阳性对照组(敷扶他林乳剂 10 g/kg 体重)、复方马钱子凝胶高剂量组(5.0 g 生药/kg 体重)、复方马钱子凝胶中剂量组(2.5 g 生药/kg 体重)、复方马钱子凝胶低剂量组(1.25 g 生药/kg 体重)共 5 组[8]，治疗组分别按相应剂量外敷复方马钱子凝胶(10 g/kg 体重)。为达到更好的实验效果，提前 3 d 于大鼠右后足跖局部外敷药物，每天 3 次，于第 4 天给每只大鼠右后足跖皮下注射 5%甲醛溶液致炎(每只 0.1 mL)，致炎后立即按上述 5 种给药方法，测定致炎后 6、24、48、72 h 的痛阈值并记录结果[9,10]。实验结束后，处死大鼠，取大鼠血液离心血清-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 IL-6 检测 实验采用双抗体两步夹心 ELISA。按说明书操作，450 nm 波长处测吸光值(Optical densit,OD)，最小检测浓度 5 ng/L，最大浓度为 160 ng/L。记录每孔 OD 值并绘制标准品的剂量反应曲线，查找血清样本中 IL-6 的浓度并记录。

1.3 统计学处理

统计学方法实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用统计软件 SPSS 18.0 进行数据分析。使用统计方法包括：重复测量方差分析，*Dunnett-t* 检验、*SNK-q* 检验，直线回归分析，$P<0.05$ 其差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 复方马钱子凝胶对甲醛致大鼠足跖机械性炎痛的影响

结果见表 1、图 1，分别测得 5 组大鼠致炎前、给药后 6 h、给药后 24 h、给药后 48 h、给药后 72 h 痛阈值，表明造模后大鼠痛阈值明显下降。采用重复测量方差分析进行数据处理。经检验，各组间的差异具有显著性，$F=24.30$，$P<0.000\ 1$；各时间点测量值之间差异具有显著性，$F=25.95$，$P<0.000\ 1$。以基质组为共用对照组，用 *Dunnett-t* 检验，结果表明给药后各组与基质组间差异具有统计学意义($P<0.01$)，扶他林组、复方马钱子凝胶高、中、低剂量组在给药后各时间点均可显著提高甲醛致炎大鼠的疼痛阈值。进一步在各治疗组之间采用 *SNK-q* 检验进行两两比较，表明给药后 24 h，复方马钱子凝胶高剂量组与其它各组差异具有显著性($P<0.01$)，其余时

表 1　各组对大鼠甲醛致足跖压痛的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

组 别	剂 量（g/kg）	致炎前痛阈值（g）	给药后痛阈值（g）			
			6 h	24 h	48 h	72 h
基质对照组	5	241.06 ± 10.69	219.53 ± 9.87	218.54 ± 8.03	218.48 ± 8.17	225.55 ± 9.24
扶他林组	5	237.87 ± 12.60	251.31 ± 15.55*	260.37 ± 14.55*	266.35 ± 14.38*	264.26 ± 14.12*
复方马钱子(低)	1.25	236.43 ± 10.94	258.88 ± 17.18*	261.08 ± 14.74*	256.16 ± 11.86*	251.88 ± 11.23*
复方马钱子(中)	2.5	239.09 ± 12.29	262.19 ± 13.79*	257.43 ± 11.40*	259.87 ± 10.19*	261.30 ± 8.62*
复方马钱子(高)	5	236.74 ± 9.99	261.38 ± 20.46*	279.74 ± 14.24*	273.72 ± 19.95*	266.08 ± 13.56*

注：与基质对照组比较，*，P<0.01

间点各治疗组之间相比无显著性差异，表明复方马钱子凝胶高剂量组与复方马钱子凝胶中、低剂量组相比，在 24 h 时间点具有较强的镇痛作用，其余时间点它们之间作用相当；复方马钱子凝胶中、低剂量组及扶他林组之间相互比较，在各时间点镇痛作用相当。

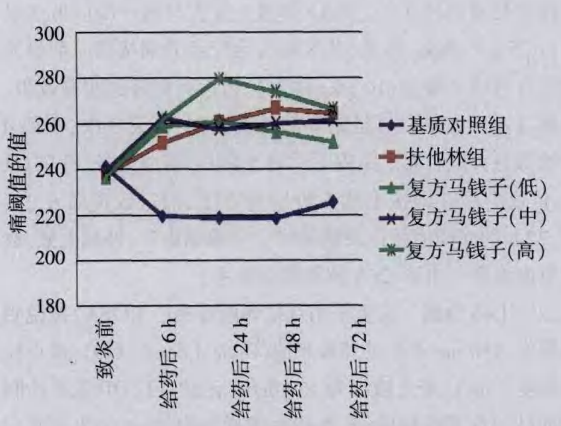


图 1　各组大鼠各时间点痛阈值均值曲线图

2.2　72 h 时对 IL-6 的影响

见表 2，IL-6 在治疗组与基质组相比（P<0.01），有显著的差异性，随治疗组剂量增大对 IL-6 表达的抑制越明显，各治疗组大鼠血清中 IL-6 水平，均显著低于基质对照组，其降低的程度依次为：扶他林组、复方马钱子凝胶低、复方马钱子凝胶中、复方马钱子凝胶高剂量组，差异具有高度显著性（P<0.01）。

表 2　各组大鼠血清 IL-6 水平比较（$\bar{x}\pm s$，ng/L）

组 别	剂量（g/kg）	只 数	IL-6
基质对照组	5	10	93.05 ± 24.69
扶 他 林 组	5	10	54.09 ± 28.19
复方马钱子（低）	1.25	10	46.32 ± 25.03
复方马钱子（中）	2.5	10	41.47 ± 15.26
复方马钱子（高）	5	10	33.32 ± 25.29

与基质对照组比较：P<0.01

2.3　72 h 时的痛阈与 IL-6 的直线回归分析

见图 2，结果经用一元线性回归法对 50 只大鼠在 72 h 的痛阈与 IL-6 进行分析。结果表明，二者之间在统计意义下，具有极显著的线性相关性（P<0.01），其回归方程为 Y=297.677-0.604X，R^2=0.85，R=0.92。

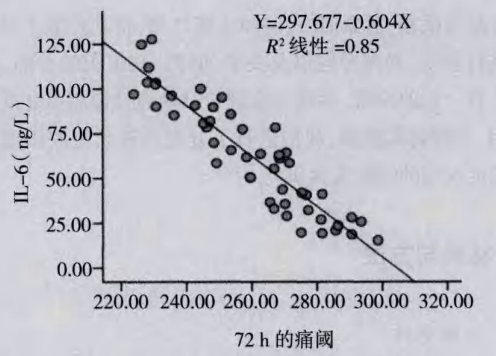


图 2　IL-6 与 72 h 痛阈(g)的回归分析

3　讨　论

大鼠右后足跖注射甲醛实验模型，应用于炎痛机制的研究。实验造模后，基质对照组大鼠痛阈值降低，注射足出现缩腿、抬腿、舔爪、抖动等反应，局部红、肿等表现，提示造模成功。针对疼痛部位，局部外敷药物。为了促进皮肤对药物吸收，添加渗透剂-月桂氮酮。IL-6 是一组由淋巴细胞、单核一巨噬细胞和血管内皮细胞等产生的免疫活性因子，参与血管舒张、水肿和局部红斑形成、炎性渗出增加等一系列的炎症反应过程以及机体的免疫反应、应激反应等重要作用[11,12]。文献报道[13]在急性炎症时 IL-6 及急性期反应物产生会增多。由甲醛引起的继发性炎性疼痛，可刺激炎症周围细胞释放各种炎性介质如组织胺、前列腺素和缓激肽等[14]，加重局部炎症反应的发生。

中医认为疼痛有虚实之分，实者为风、寒、湿、热等邪侵犯人体，阻闭经脉，气血运行不畅，造成“不通则痛”；虚者为阴血不能濡养经脉，经脉痉挛，造成“不荣则痛”。通过祛风、散寒、清热、行气、活血、扶正通络等，可使疼痛明显减轻。复方马钱子凝胶针对中医疼痛产生的机理，结合多年临床经验进行组方，外用治疗痛证，有较为理想的疗效，且毒副作用低。方中马钱子性温，有通络散结，消肿定痛，镇痛效果明显的功效，为君药；祖师麻辛温，能祛风散寒除湿、活血散瘀止痛，细辛辛温，祛风散寒止痛力强，共为臣药；当归、白芍养血活血、川芎祛风行气止痛，防风祛风散寒，桂枝散寒通络止痛，同为佐使；全方共奏祛风散寒、行气活血、通络止痛之功[15]，可

达到治疗痛证之目的。

本研究在甲醛炎症疼痛模型上，给予复方马钱子凝胶进行干预，检测 IL-6 的表达水平、测量各组大鼠机械痛阈值的变化，以评价复方马钱子凝胶镇痛及抑制炎症反应的效应。复方马钱子凝胶对大鼠机械压力致痛有显著性抑制作用，并能明显提高大鼠的疼痛阈值，表明该药对实验性疼痛具有良好的镇痛作用。与朱建伟等[16]用马钱子碱做小鼠镇痛实验，以吗啡为对照组，证实马钱子具有较强的镇痛作用一致。这与方中的多种组分所具有的镇痛抗炎作用密切相关。马钱子碱是马钱子中的主要成分，动物实验结果表明，马钱子碱是马钱子抗炎、镇痛作用的主要成分，发现其具有明显的镇痛效果[17]。张娟等[18]发现马钱子碱有明显的中枢镇痛作用，可减轻疼痛反应。方中细辛、白芍、防风、桂枝也具有较强镇痛作用。祖师麻主要成分黄瑞香，是其抗炎活性成分[19]。有资料显示祖师麻对甲醛所致的炎症具有有较强的抑制作用[20]。实验显示复方马钱子凝胶可以下调 IL-6 的表达水平。其可能参与抑制大鼠机体相关免疫细胞及其他多种相关细胞产生 IL-6，减轻炎症介质的释放[21]，达到抑制炎症反应的目的。据研究疼痛所激发的自主神经刺激抑制该区域的血供，可致营养改变，产生炎性介质，导致疼痛加重[22]。有研究发现，炎症组织具有血循环和微循环障碍，通过活血化瘀药可使毛细血管网大量开放，改善微循环，增加毛细血管张力，改善血管的通透性，增强组织的抗损伤和耐缺氧能力，当归、川芎等活血化瘀药物，具有抑制免疫抗体产生和对抗机体形成细胞抑制作用，抑制变态反应炎症作用，增加巨噬细胞的吞噬功能，促进非特异性免疫功能等作用[23]。本研究显示了复方马钱子凝胶具有明显镇痛及抑制 IL-6 表达水平作用，这可能涉及到其镇痛、活血化瘀，改善微循环、减少炎症介质释放等方面的综合作用。

综上所述，本文从镇痛及抑制炎症反应的角度，观察复方马钱子凝胶的镇痛作用及其对 IL-6 的影响，进一步证明了复方马钱子凝胶在急性炎症疼痛方面的优势，同时提示了抑制 IL-6 活性可能成为治疗炎症相关性疼痛的有效途径，但其机理有待系统、深入、细致的研究。

参 考 文 献

[1] 方和桂.适用于中药外用的剂型凝胶剂[J].中国药业，2002，11(8)：58-26.

[2] 赖 芸.促进药物透皮吸收方法的研究进展[J].赣南医学院学报，2008，28(6)：957-958.

[3] 李 燕，刘 新.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素外用凝胶中雷公藤甲素的含量[J].重庆医科大学学报，2008，33(7)：862-863.

[4] 杜贵友，方文贤.有毒中药现代研究与合理应用[M].北京：人民卫生出版社，2003.

[5] Abbott F V，Franklin K B，Westbrook R F.The formalin test：scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats[J].Pain，1995，60(1)：91-102.

[6] 徐叔云，卞如濂，陈 修.药理实验方法学[M].第 2 版.北京：人民卫生出版社，1991.892.

[7] 谭煌英，李 园，于莉莉，等.康莱特对大鼠的镇痛作用及其对促炎细胞因子的影响[J].中国中西医结合外科杂志，2007，13(2)：349-350.

[8] 李仪奎.中药药理试验方法学[M].第 2 版.上海：上海科学技术出版社，2006.38-39.

[9] 陈荣明，姜 淼，殷书梅，等.复方南星止痛膏对甲醛等致炎性疼痛模型大鼠止痛作用及 c-fos 表达的影响[J].世界中西医结合杂志，2008，3(8)：455-456.

[10] 李驰荣，张尊祥，蔡晓红，等.散瘀止痛巴布膏对大鼠试验性炎症和疼痛药效学研究[J].东南国防医药，2008，10(5)：349-350.

[11] 屠永华，李 岚.炎性细胞因子与脑缺血[J].中国临床康复杂志，2003，7(1)：49-50.

[12] Eli Eliav，Rafael Benoliel，Uri Herzberg，et al.The role of IL-6 and IL-1β in painful perineural inflammatory neuritis[J].Brain，behavior，and Immunity，2009，23(4)：474-484.

[13] Dessem D.IL-6，cyclooxygenase in muscle pain[J].Pain，2011，152(1)：238.

[14] Lebrun P，Manil J，Colin F.Formalin-induced central sensitization in the rat：somatosensory evoked potential data[J].Neurosci Lett，2000，283(2)：113.

[15] 杨 丽.中药学[M].北京：人民卫生出版社，2005.

[16] 朱建伟，武继彪，李成韶，等.马钱子碱镇痛作用及其药效动力学研究[J].中国中医药科技，2005，12(3)：166-167.

[17] 朱建伟，武继彪，李成韶.复方马钱子碱的镇痛作用及其药效动力学初步观察[J].中国中医药信息杂志，2005，12(9)：37.

[18] 张 娟，肖鲁伟，戴体俊，等.马钱子碱中枢镇痛作用的研究[J].中国中医药科技，2009，16(1)：34-35.

[19] 周光雄，杨永春，石建功，等.祖师麻活性化学成分研究[J].中国中药杂志，2006，31(7)：555-557.

[20] 董培智，朴晋华，高 天.祖师麻注射液的抗炎作用研究[J].山西医科大学学报，1999，30(增刊)：52-53.

[21] 毕爱华.医学免疫学[M].北京：人民军医出版社，2002.71-72.

[22] 张立生，刘小立.现代疼痛学[M].河北：河北科技出版社，2000.139-142.

[23] 阮成伟.对活血化瘀法治疗炎症的认识[J].现代中西医结合杂志，2008，17(3)：354-355.

（责任编辑：关蕴良）