

经前三剂止痛方治疗原发性痛经的机制研究

方 玲¹, 朱新冰², 祝诚诚¹, 尹 菊¹, 徐玉华³, 张建伟¹, 郑晓昆¹, 张艳军^{1*}

(1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193; 2. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150;

3. 天津红桥区中医院, 天津 300130)

摘 要:目的 探讨临床经验方剂经前三剂止痛方 (JQF) 治疗原发性痛经的作用机制。方法 以 sc 雌二醇和 ip 缩宫素的方法建立实验小鼠、大鼠痛经模型, 阿司匹林作为对照, 观察 JQF 对小鼠扭体反应的影响, 对大鼠血清、子宫前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 的影响; 以耳廓涂抹二甲苯复制小鼠炎症模型, 观察 JQF 对耳廓肿胀的影响; 分离家兔离体子宫, 分别以重酒石酸去甲肾上腺素、甲磺酸倍他司汀、米非司酮促进子宫收缩, 观察 JQF 对离体子宫收缩的抑制作用。结果 JQF 能够减少痛经模型小鼠的扭体次数, 降低痛经大鼠血清、子宫 $PGF_{2\alpha}$ 水平, 减轻二甲苯所致小鼠耳廓肿胀程度, 抑制家兔离体子宫收缩。结论 JQF 具有一定的镇痛、抗炎作用, 其机制可能与降低血清 $PGF_{2\alpha}$ 水平, 抑制子宫平滑肌收缩有关, 是治疗原发性痛经的有效方剂。

关键词:经前三剂止痛方; 原发性痛经; 镇痛; 抗炎; 子宫收缩

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0615-03

原发性痛经是发病率较高的常见妇科疾病, 其在青少年期的发病率已经达到 50%, 是影响妇女工作和生活的重要影响因素之一。经前三剂止痛方 (JQF) 由益母草、当归、川芎等组成, 具有活血化瘀、温经止痛的功效, 只需月经前 3 天使用 3 剂止痛方本次月经无疼痛, 连续使用 3 个月即可停药, 是临床上治疗原发性痛经的有效方药, 有必要对其药效机制进行深入探讨。本研究观察经前三剂止痛方对不同痛经模型的影响, 多角度探讨其治疗原发性痛经的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物: 健康昆明种小鼠, 雌性, 未孕, 体质量 18~22 g, 由中国医学科学院放射医学研究所动物室提供。健康新西兰种家兔, 雌性, 未孕, 体质量 1.8~2.0 kg, 由天津中医药大学动物房提供。健康 SD 大鼠, 雌性, 未孕, 体质量 180~220 g, 由中国医学科学院放射医学研究所动物室提供。

1.2 药物与试剂: JQF 制剂由天津中医药大学中药制剂实验室制备 (2 100 g 生药材得浸膏干粉 520 g, 其出膏率为 24.7%, 本实验所指中药给药均为浸膏干粉); 苯甲酸雌二醇注射液, 天津金耀氨基酸有限公司生产, 批号 0701041; 缩宫素注射液, 蚌埠市宏业生化制药厂生产, 批号 070310; 阿司匹林片, 广东百澳药业有限公司生产, 批号 20070501; 重酒石酸去甲肾上腺素, 天津金耀氨基酸有限公司生产, 批

号 0702081; 甲磺酸倍他司汀, 卫材中国药业有限公司生产, 批号 0800315; 米非司酮片, 北京紫竹药业有限公司生产, 批号 0711191; 大鼠前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 酶联免疫检测试剂盒, 上海西唐生物科技有限公司提供, 批号 0808253。

1.3 仪器: RM6240C 型多道生理信号采集处理系统, 成都仪器厂; JZ100 型肌肉张力换能器, 高碑店市新航机电设备有限公司; 电子分析天平; DL28R 冷冻离心机 (上海离心机械研究所); Flex Station3 多功能微孔分析仪 (美国 Molecular Devices); XH6020Y 免疫计数器 (西安 262 厂)。

2 实验方法

2.1 对实验性小鼠痛经模型的影响: 将小鼠随机分为对照组, 模型组, JQF 高、低剂量 (12.5、6.25 g/kg) 组, 阿司匹林 (31.25 mg/kg) 组, 每组 8 只, 按 0.25 mL/10 g ig 给药, 1 次/d, 连续 4 d。对照组、模型组每天 ig 等体积生理盐水。

采用 sc 雌二醇和 ip 缩宫素的方法制备实验性小鼠痛经模型^[1], 实验各组小鼠每天 sc 雌二醇 0.05 mL/只, 连续 4 d, 对照组 sc 等量生理盐水, 末次注射 1.5 h 后, 实验各组小鼠 ip 缩宫素 1 U/只, 对照组 ip 等量生理盐水。观察注射缩宫素后 20 min 内每只小鼠的扭体次数。

2.2 对实验性痛经模型大鼠血清和子宫中 $PGF_{2\alpha}$ 的影响: 实验分组同 2.1 项, 按 4 mL/kg ig 给药, 1

收稿日期: 2009-07-12

基金项目: 天津市卫生局中医、中西医结合科研专项资金课题

作者简介: 方 玲 (1962—), 女, 天津人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事中医妇科教学及临床研究工作。

E-mail: fangling@tjutcm.edu.cn

*通讯作者 张艳军 E-mail: zyjsunye@163.com

次/d,连续 10 d。JQF 高、低剂量分别为 10、5 g/kg,阿司匹林剂量为 25 mg/kg,对照组、模型组 ig 等体积生理盐水。

采用 sc 雌二醇和 ip 缩宫素的方法建立实验性大鼠痛经模型^[1],实验各组均连续 10 d 给大鼠 sc 雌二醇[第 1、10 天 sc 雌二醇 0.5 mg/只,其余时间均为 0.2 mg/只],对照组 sc 等量生理盐水。末次注射 40 h 后,ip 催产素 2 U/只。30 min 后,各组大鼠眼眶取血,3 000 r/min,4 离心 15 min,分离血清,置于 -20 保存。采用 ELISA 法检测大鼠血清、子宫中 PGF_{2α}。

2.3 对小鼠炎症模型的影响:小鼠随机分为 3 组,对照组 JQF 高、低剂量组,给药剂量与方法同 2.1 项。采用二甲苯致炎方法复制小鼠炎症模型^[2,3],末次给药后将二甲苯 0.02 mL/只均匀涂擦小鼠右耳正反面,以左耳作为对照。将致炎 0.5 h 后小鼠处死,用 9 mm 打孔器在左右耳廓相同部位打下耳片,分别称质量,以左右耳片质量差作为肿胀度。

2.4 对家兔离体子宫收缩的影响:取家兔等段离体子宫,分别浸入任氏液中,待标本平衡 40 min,给予 JQF,实验分为 JQF 高、低剂量 (0.50、0.25 g/mL) 组和对照组,给药体积 2 mL,分别同时给予重酒石酸去甲肾上腺素 0.03 mg 或甲磺酸倍他司汀 1.5 mg 或米非司酮 1.5 mg 使子宫收缩,采用 RM6240C 型多道生理信号采集处理系统采集处理数据,记录 40 min 子宫收缩曲线下面积。

2.5 统计学方法:应用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析 LSD 方法统计,组间比较用 Dunnett 't 检验。

3 结果

3.1 对实验性小鼠痛经模型的影响:模型组与对照组比较,小鼠扭体次数明显增加 ($P < 0.01$),说明小鼠的痛经模型制备成功。JQF 低、高剂量组与阿司匹林组均能明显缓解由缩宫素引起的子宫剧烈收缩而表现的扭体,与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 1。

3.2 对实验性痛经模型大鼠血清 PGF_{2α} 水平的影响:与对照组比较,模型组大鼠血清中 PGF_{2α} 水平明显升高 ($P < 0.01$)。JQF 低、高剂量组,阿司匹林组 PGF_{2α} 水平均比模型组低 ($P < 0.01$)。结果见表 2。

3.3 对小鼠炎症模型的影响:JQF 低、高剂量组均能减轻二甲苯所致的小鼠耳廓肿胀程度,与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

表 1 JQF 对实验性痛经小鼠扭体次数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 1 Effect of JQF on writhing number of dysmenorrheal mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)		
组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	扭体次数/(次 · 20 min ⁻¹)
对照	-	0.3 ± 0.7
模型	-	10.1 ± 3.8 ^{**}
JQF	6.25	4.3 ± 1.9 [#]
	12.5	5.5 ± 2.8 [#]
阿司匹林	0.03 125	5.5 ± 1.9 [#]

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.01$ vs model group

表 2 JQF 对实验性痛经模型大鼠血清 PGF_{2α} 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Table 2 Effect of JQF on PGF _{2α} level of serum in dysmenorrheal rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)		
组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	血清 PGF _{2α} /(μg · mL ⁻¹)
对照	-	2.33 ± 0.51
模型	-	8.44 ± 4.65 ^{**}
JQF	5	5.27 ± 3.48
	10	3.97 ± 1.35 [#]
阿司匹林	0.025	4.21 ± 1.12 [#]

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.01$ vs model group

表 3 JQF 对二甲苯所致耳廓肿胀的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 3 Effect of JQF on xylene-induced ear edema in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)		
组别	剂量/(g · kg ⁻¹)	耳廓肿胀度/mg
对照	-	5.7 ± 0.0
JQF	6.25	2.8 ± 0.0 ^{**}
	12.5	3.2 ± 0.0 ^{**}

与对照组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{**} $P < 0.01$ vs control group

3.4 对家兔离体子宫收缩的影响:家兔各离体子宫收缩在给药前无差异。JQF 能抑制重酒石酸去甲肾上腺素、甲磺酸倍他司汀、米非司酮引起的子宫平滑肌收缩 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

4 讨论

近年来原发性痛经由于其发病率较高而备受关注^[4]。JQF 是临床治疗原发性痛经的有效方药,针对该病主症之“疼痛”,主要病机之“瘀”,主要病因之“气质寒凝”而设,具有活血化瘀、温经止痛之功。本实验在中医理论的指导下,从整体-部分-受体多层次,不同动物不同剂量等多角度客观地评价 JQF 治疗原发性痛经的作用机制。JQF 可以明显抑制缩宫素所致痛经小鼠的扭体反应频率,并与临床观察相结合,说明 JQF 与调节卵巢激素水平有关,通过调节卵巢激素,缓解子宫肌痉挛,舒张子宫血管,改善子宫血流,解除或缓解疼痛。家兔离体子宫再分

表 4 JQF 对家兔离体子宫收缩的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 4 Effect of JQF on in vivo uterine contraction of rabbit ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	$\rho/(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	给药前子宫收缩 曲线下面积/ $(\text{mV} \cdot \text{s})$	给药后 40 min 子宫收缩曲线下面积/ $(\text{mV} \cdot \text{s})$		
			重酒石酸去甲肾上腺素	甲磺酸倍他司汀	米非司酮
对照	-	0.1491 $\pm$ 0.0004	3.1845 $\pm$ 0.8088	2.7522 $\pm$ 0.2695	4.9273 $\pm$ 0.8213
JQF	0.50	0.1473 $\pm$ 0.0005	0.8686 $\pm$ 0.0845 **	0.3287 $\pm$ 0.0043 **	0.2894 $\pm$ 0.0016 **
	0.25	0.1503 $\pm$ 0.0005	0.2073 $\pm$ 0.0021 **	0.3086 $\pm$ 0.0048 **	0.4873 $\pm$ 0.0065 **

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

别给药肾上腺素 α 受体激动剂去甲肾上腺素、组胺H1受体激动剂甲磺酸倍他司汀、孕酮受体竞争性拮抗剂米非司酮后,对子宫平滑肌均起到不同程度的兴奋作用,JQF可抑制其兴奋,表明JQF可作用于受体,在受体水平调节子宫的收缩程度,以缓解子宫强烈收缩所致的痛经。为进一步阐明JQF治疗痛经的作用机制,本实验同时进行了炎症模型试验,结果显示JQF能明显对抗二甲苯所致小鼠耳廓肿胀,具有缓解炎症作用,从多角度阐述了JQF治疗痛经的作用机制。

现代医学认为原发性痛经的发生与前列腺素(PGs)有着密切关系^[5],前列腺素能促进子宫内螺旋小动脉收缩,加速内膜缺血、坏死及血管的断裂导致月经来潮。大量实验已经证实,痛经越严重的妇女,其经血中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 水平就越高,在月经开始的最初两天症状最严重时, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 水平亦达到最高峰。高浓度的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 作用于螺旋小动脉上的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 受体,引起子宫平滑肌痉挛性收缩,表现为能使子宫肌张力增高、收缩幅度增加,导致子宫血流不足、子宫肌组织缺血,酸性代谢产物堆积于肌层,刺激子宫自主神经疼痛纤维而痛经^[6]。本实验考察JQF对大鼠痛经模型的 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 水平的影响,JQF高、低剂量组

与阿司匹林组均可调节 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的量,显著降低痛经大鼠 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 水平,说明JQF可直接对抗 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 所致的大鼠子宫痉挛,从而有效缓解痛经症状,达到标本兼治痛经的效果。在上述实验中均设置了JQF高、低剂量组,实验显示JQF存在剂量依赖性,但其并不成倍数关系,这可能是因为受体饱和,表现为痛经效果并不随着剂量的增加而增强。本实验从部分影响因素考察JQF治疗痛经的机制,JQF治疗痛经的确切机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙海燕,曹永孝,刘静,等.小鼠痛经模型的建立[J].中国药理学通报,2002,18(2):233-236.
- [2] 宋卓敏,屈彩芹,张远,等.益母草治疗痛经机制探索[J].中国医学科学院学报,2003,21(2):90-93.
- [3] 沈建芬,肖军花,王嘉陵,等.当归 A_3 活性部位的抗炎作用及其对大鼠离体子宫环氧化酶-2表达的影响[J].中草药,2006,37(9):1371-1374.
- [4] Nazar H, Usmanghani M K. Clinical evaluation to assess the safety and efficacy of coded herbal medicine "Dysmo-off" versus allopathic medicine "diclofenac sodium" for the treatment of primary dysmenorrhea [J]. J Herb Pharmacoth, 2006, 6(1):21-39.
- [5] Creatsas G, Deligeorgiou E, Zachari A. Prostaglandins: PGF_2 alpha, PGE_2 , 6-keto- PGF_1 alpha and TXB_2 serum levels in dysmenorrheic adolescents before, during, and after treatment with oral contraceptives [J]. Europ J Obst Gynecol Reprod Biol, 1990, 36(3):292-298.
- [6] 华永庆,洪敏,朱荃.原发性痛经进展[J].南京中医药大学学报,2003,19(1):62-64.

黄连解毒汤中栀子苷在正常及脑缺血大鼠体内药动学研究

曾明飞,潘林梅*,朱华旭,张启春,郭立玮

(南京中医药大学 中药复方分离工程实验室,江苏 南京 210029)

摘要:目的 比较黄连解毒汤中栀子苷在正常和脑缺血大鼠体内的动力学过程。方法 正常大鼠及脑缺血大鼠ig黄连解毒汤后不同时间采血,用HPLC法测定栀子苷的血药浓度,3P87软件拟合药动学参数。结果 脑缺血及正常大鼠栀子苷药动学符合一室模型。脑缺血及正常状态下大鼠ig黄连解毒汤后,栀子苷在脑缺血及正常状态下体内的AUC分别为 (15.819 ± 5.228) 、 $(11.395 \pm 3.111) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $t_{1/2\text{ke}}$ 分别为 (4.704 ± 1.850) 、

收稿日期:2009-08-10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30873450);江苏省教育厅自然科学基金项目(07KJB360087)

作者简介:曾明飞(1986—),男,江西抚州人,南京中医药大学2007级硕士研究生。

Tel: (025) 86798399 E-mail: xiaofei02@gmail.com

*通讯作者 潘林梅 E-mail: linmeip@yahoo.com.cn