

当归芍药散对缩宫素诱导的大鼠在体子宫收缩及血管舒缩因子的影响

华永庆^{1,2,3}, 丁爱华³, 段金廛^{3*}, 宿树兰³, 张燕², 秦萍²

1. 南京中医药大学药学院 中药药理教研室, 江苏 南京 210046

2. 南京中医药大学 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210046

3. 南京中医药大学 江苏省方剂高技术研究重点实验室, 江苏 南京 210046

摘要: **目的** 研究当归芍药散对大鼠在体子宫收缩、子宫内血管舒缩因子的影响, 探讨其治疗原发性痛经的作用机制。**方法** 雌性未孕 SD 大鼠随机分为模型组, 维拉帕米 (100 $\mu\text{g/kg}$) 阳性组, 当归芍药散低、中、高剂量 (生药 4、8、16 g/kg) 组, 每天给药 1 次, 连续给药 7 d。第 7 天大鼠 sc 己烯雌酚 4 mg/kg, 次日在麻醉状态下观察给予缩宫素前后大鼠子宫收缩变化, 同时测定药物对子宫组织匀浆中一氧化氮 (NO) 及内皮素 (ET) 量的影响。**结果** 当归芍药散显著提高正常大鼠子宫收缩的平均肌张力, 而对缩宫素诱导的大鼠子宫收缩具有显著的抑制作用; 对缩宫素处理前后的大鼠子宫收缩频率、幅度、平均肌张力及子宫活动力等的变化率有显著抑制作用; 能够显著升高缩宫素处理后大鼠子宫 NO 水平, 降低 ET 水平, 使 NO 与 ET 比值显著上升。**结论** 当归芍药散可能通过抑制子宫收缩, 调节血管舒缩物质, 改善子宫供血, 从而对原发性痛经产生治疗作用。

关键词: 当归芍药散; 原发性痛经; 子宫收缩; 缩宫素; 一氧化氮; 内皮素

中图分类号: R285.5; R984 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)04-0459-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.017

Effects of Danggui Shaoyao Powder on oxytocin-induced *in vivo* uterine contractions and vasomotor factors of rats

HUA Yong-qing^{1,2,3}, DING Ai-hua³, DUAN Jin-ao³, SU Shu-lan³, ZHANG Yan², QIN Ping²

1. Department of Pharmacology of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

3. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China

Abstract: Objective To explore the effects of Danggui Shaoyao Powder (DSP) on *in vivo* uterine contractions and vasomotor factors of rats, and to investigate the mechanism of DSP for healing primary dysmenorrhea. **Methods** Female SD rats were randomly divided into model, Verapamil (100 $\mu\text{g/kg}$, positive control), low-, mid-, and high-dose DSP (4, 8, and 16 g/kg) groups, and the rats were administered once daily for 7 d. The rats were sc administered with diethylstilbestrol (4 mg/kg) on day 7, on the next day the *in vivo* uterine contraction of rats was observed before and after oxytocin treatment under anesthesia condition, and the levels of nitric oxide (NO) and endothelin (ET) in uterine homogenate were determined. **Results** DSP increased the average muscle tension of uterine contraction of normal rats obviously, but inhibited the oxytocin-induced uterine contraction significantly. The changes of the uterine contraction frequency, amplitude, average muscle tension, and uterine vigour of rats before and after oxytocin processing were significantly inhibited. DSP increased the NO level in the uterine of the experimental animals after oxytocin treatment and reduced the level of ET. The NO/ET ratio increased significantly. **Conclusion** DSP could inhibit the *in vivo* uterine contraction, regulate the vasomotor substances, and improve the uterine blood supplement, resulting in the beneficial effect on treating primary dysmenorrhea.

Key words: Danggui Shaoyao Powder; primary dysmenorrhea; uterine contraction; oxytocin; nitric oxide; endothelin

收稿日期: 2012-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30902014); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目 (06KJA36066); 江苏省高校自然科学基金资助项目 (03KJB360094); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (2011ZXYX4-007)

作者简介: 华永庆 (1976—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药药理。E-mail: huayongqing@126.com

*通信作者 段金廛 Tel: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

当归芍药散源于汉代张仲景《金匮要略》，由当归、芍药、川芎、茯苓、泽泻、白术组成，主治“妇人腹中诸疾痛”，后世医家在临床上采用此方治疗原发性痛经取得良好的疗效^[1]。原发性痛经产生的直接原因是各种因素导致的子宫强烈收缩。前期研究表明，当归芍药散能显著减少缩宫素诱发的小鼠痛经模型的扭体次数及延长潜伏期，并能直接抑制缩宫素诱导的小鼠离体子宫收缩^[2-3]。然而，当归芍药散对在体大鼠子宫收缩的影响仍不清楚。因此本实验考察当归芍药散对正常大鼠与缩宫素诱导的大鼠在体子宫收缩的影响，并观察当归芍药散给药后大鼠子宫组织中血管舒缩因子一氧化氮（NO）、内皮素（ET）等的变化，以期进一步阐明当归芍药散治疗原发性痛经的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，来源于甘肃岷县当归 GAP 种植基地；川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎，来源于四川彭州川芎 GAP 种植基地；白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，产地安徽亳州；白术为 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的根茎，产地内蒙古海格尔；茯苓为 *Poria cocos* Wolf. 的干燥菌核，产地浙江松阳；泽泻为 *Alisma orientalis* Juzep, 产地四川彭州。以上药材经南京中医药大学段金廛教授鉴定，符合《中国药典》2010年版项下标准。当归芍药散提取液（DSP）由江苏省方剂研究重点实验室制备。

己烯雌酚注射液，广州白云山明兴制药有限公司，批号 060501；缩宫素注射剂，上海第一生化药业有限公司，批号 060105；维拉帕米注射剂，上海禾丰制药有限公司，批号 061101；NO 试剂盒，南京建成生物工程研究所；ET 放免试剂盒，北京北方生物技术研究所。

1.2 动物

雌性未孕 SD 大鼠，清洁级，体质量 190~210 g，由南京医科大学实验动物中心提供，合格证号 SCXK（苏）2002-0031。

1.3 仪器

FSG—01 压力传感器，PowerLab/8s 多道生理记录仪，Chart4.2 数据分析软件，澳大利亚 AD Instruments 公司；Z—323 台式离心机，德国 TM 公

司；GC—1200γ 放射免疫计数器，科大创新股份有限公司中佳分公司。

2 方法

2.1 提取物制备

当归芍药散由当归 3 g、芍药 16 g、川芎 8 g、茯苓 4 g、泽泻 8 g、白术 4 g 组成。称取 10 倍处方量的药材，粉碎至 40 目，水加热提取 2 次，第 1 次加入 10 倍量水回流提取 2 h，第 2 次加入 8 倍量水回流提取 1.5 h，合并 2 次提取液，减压回收溶剂，浓缩至生药 2 g/mL，即得当归芍药散水提取物。残渣趁热晾干，用 80%乙醇回流提取 2 次，第 1 次加入 10 倍量 80%乙醇回流提取 2 h，第 2 次加入 8 倍量 80%乙醇回流提取 1.5 h，合并 2 次提取液，70℃减压浓缩至无醇味，室温真空干燥，即得当归芍药散水提后醇提物，4℃保存备用。给药时按比例混合水提物及醇提物，即得当归芍药散总提取物。质量控制参照文献方法^[3]。每克提取物中含芍药苷 1.260 mg、芍药内酯苷 6.40 mg、阿魏酸 2.520 mg、咖啡酸 1.210 mg、香草酸 0.830 mg、洋川芎内酯 1.10 mg。

2.2 分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组，模型组，维拉帕米（100 μg/kg）阳性组，当归芍药散总提取物低、中、高剂量（生药 4、8、16 g/kg）组。当归芍药散各组 ig 给予相应剂量药物溶液，阳性对照组尾 iv 给予维拉帕米，每天给药 1 次，连续给药 7 d，模型组 ig 等体积蒸馏水，ig 体积均为 10 mL/kg。

2.3 对缩宫素诱导的大鼠在体子宫收缩的影响^[4]

给药第 7 天，各组大鼠 sc 己烯雌酚注射液 4 mg/kg，当晚禁食 8 h。次日，当归芍药散各剂量组给药后（模型组及维拉帕米组给予等体积蒸馏水），戊巴比妥钠麻醉，仰位固定，下腹部正中行 4~5 cm 长切口，取出子宫，在一侧子宫角选取长约 3 cm 的一段，将子宫角的阴道端和卵巢端分别缝合在中空的塑料 Y 型支架底部的两端支点上。在已固定好的子宫两支点中点缝一棉线，从塑料管中引出，与肌张力传感器连接，然后将腹壁围绕塑料管底部四周缝合，稳定 10 min，记录各组大鼠在给药后 60 min 时子宫平滑肌的活动。之后每只大鼠尾 iv 缩宫素 0.025 U，阳性对照组大鼠在给予缩宫素后 5 min 尾 iv 维拉帕米 100 μg/kg。观察给予缩宫素前 10 min 及给予缩宫素后 50~60 min 子宫收缩的频率和幅度、平均肌张力值，计算子宫活动力值（子宫活动力=子宫的收缩频率×收缩幅度）；计算缩宫素处理

前后大鼠子宫收缩上述各参数变化率。

变化率 = (给予缩宫素后值 - 给予缩宫素前值) / 给予缩宫素前值

2.4 对大鼠子宫血管舒缩因子的影响

当归芍药散各剂量组及维拉帕米组处理方法同“2.3”项，对照组不注射缩宫素，ig 蒸馏水，模型组注射缩宫素，ig 蒸馏水。实验末剥离对侧大鼠子宫，精密称取子宫组织 200 mg，用冰冷的生理盐水冲洗除去血液，滤纸拭干，剪碎，在冰浴下研磨，制成 20% 子宫组织匀浆，3 500 r/min 低温离心 15 min，取上清液，按照试剂盒说明书，硝酸还原酶法测定 NO 的量，放免法测定 ET 的量。

2.5 数据处理与统计

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各项检测指标采用方差分析 (ANOVA)，两两比较用 LSD 检验，所有统计分析均采用 SPSS 11.5 软件。

3 结果

3.1 对大鼠子宫收缩的影响

与模型组比较，当归芍药散高、低剂量组能提高给予缩宫素前大鼠子宫收缩的平均肌张力 ($P < 0.05$ 、 0.01) 和子宫活动力 ($P < 0.05$)。当归芍药散高剂量组还显著增强子宫的收缩频率 ($P < 0.05$)，结果见表 1。经雌激素预处理的大鼠给予缩宫素后，子宫产生强烈的收缩，而当归芍药散高剂量组和维拉

帕米组对缩宫素诱导的子宫收缩具有显著抑制作用，子宫收缩的平均肌张力与模型组比较有显著差异 ($P < 0.05$)，结果见表 2。当归芍药散对缩宫素处理前后大鼠子宫收缩的变化率具有显著抑制作用，与模型组比较，其低剂量组大鼠的子宫收缩幅度、平均肌张力及子宫活动力等指标变化率均显著降低 ($P < 0.01$)；中剂量组大鼠的平均肌张力及子宫活动力变化率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)；高剂量组大鼠的子宫收缩频率和幅度、平均肌张力及子宫活动力等变化率亦均显著降低 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

3.2 对缩宫素处理的大鼠子宫中 NO 和 ET 的影响

经缩宫素处理后，与对照组比较，模型组大鼠子宫组织中 NO 的量显著下降 ($P < 0.01$)，ET 的量显著上升 ($P < 0.05$)，NO/ET 值明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，维拉帕米组大鼠子宫组织中 NO 的量、NO/ET 值显著升高 ($P < 0.05$)；而当归芍药散中、高剂量组大鼠子宫组织中 NO 的量和 NO/ET 值均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)；当归芍药散高剂量组大鼠子宫组织中 ET 的量显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 4。

4 讨论

缩宫素引起的大鼠在体子宫强烈收缩，类似于女性痛经时的子宫强烈收缩，因此常用来观察药物对处于剧烈收缩状态下子宫的影响。有实验结果显

表 1 当归芍药散对造模前大鼠在体子宫收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of DSP on *in vivo* uterine spontaneous contraction in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	收缩频率 / s ⁻¹	收缩幅度 / g	平均肌张力 / g	子宫活动力 / (g·s ⁻¹)
模型	—	0.012 6 ± 0.004 3	2.07 ± 0.85	0.88 ± 0.28	0.025 7 ± 0.011 4
当归芍药散	4	0.014 7 ± 0.004 7	2.63 ± 1.06	1.14 ± 0.34*	0.038 4 ± 0.018 0*
	8	0.015 1 ± 0.004 6	2.04 ± 0.48	1.00 ± 0.21	0.031 9 ± 0.013 4
	16	0.016 8 ± 0.005 0*	2.35 ± 0.73	1.23 ± 0.29**	0.038 3 ± 0.012 5*
维拉帕米	0.000 1	0.013 7 ± 0.003 7	2.05 ± 0.75	1.04 ± 0.22	0.029 0 ± 0.013 7

与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，表 2、3 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as Table 2 and 3

表 2 当归芍药散对造模后大鼠在体子宫收缩的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of DSP on oxytocin-induced *in vivo* uterine contraction in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	收缩频率 / s ⁻¹	收缩幅度 / g	平均肌张力 / g	子宫活动力 / (g·s ⁻¹)
空白对照	—	0.018 0 ± 0.004 2	2.94 ± 0.96	2.24 ± 0.68	0.055 1 ± 0.026 1
当归芍药散	4	0.018 7 ± 0.005 7	3.01 ± 1.04	2.13 ± 0.71	0.054 8 ± 0.018 9
	8	0.019 2 ± 0.006 1	2.63 ± 0.63	1.90 ± 0.47	0.051 7 ± 0.022 2
	16	0.017 9 ± 0.004 5	2.70 ± 0.88	1.69 ± 0.29*	0.047 7 ± 0.016 4
维拉帕米	0.000 1	0.013 8 ± 0.003 7	2.63 ± 1.07	1.71 ± 0.67*	0.037 4 ± 0.018 5

表3 当归芍药散对缩宫素处理前后大鼠在体子宫收缩参数变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 3 Effects of DSP on changes of *in vivo* uterine contraction indexes of rats before and after oxytocin treatment ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	子宫收缩参数变化率 / %			
		收缩频率	收缩幅度	平均肌张力	子宫活动力
模型	—	51.8±48.8	47.3±23.9	163.4±64.0	122.5±76.8
当归芍药散	4	29.5±17.7	18.6±18.2**	93.0±54.3**	53.4±30.6**
	8	31.1±36.4	31.2±23.1	93.5±34.3**	69.1±52.3*
	16	8.5±15.9**	14.6±11.1**	40.5±20.7**	24.5±22.4**
维拉帕米	0.000 1	3.12±25.8**	29.3±29.1	60.0±37.9**	29.0±25.0**

表4 当归芍药散对缩宫素处理后大鼠子宫组织 NO 及 ET 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 4 Effects of DSP on levels of NO and ET in uterine of rats after oxytocin treatment ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	NO / (μmol·L ⁻¹)	ET / (ng·L ⁻¹)	NO/ET
对照	—	14.73±2.43	17.02± 4.41	0.91±0.27
模型	—	9.65±2.80 ^{##}	32.45±17.63 ^{##}	0.37±0.17 ^{##}
当归芍药散	4	11.66±3.64	28.85±13.22	0.47±0.23
	8	13.40±3.08*	22.80± 9.35	0.68±0.29*
	16	12.86±2.73*	17.61± 5.68*	0.81±0.39**
维拉帕米	0.000 1	12.92±2.54*	26.35± 7.79	0.51±0.12*

与对照组比较: ^{##}*P*<0.01; 与模型组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01^{##}*P*<0.01 vs control group; **P*<0.05 ***P*<0.01 vs model group

示, 当归芍药散能显著地抑制缩宫素诱发的小鼠痛经模型的多项指标的改变, 延长扭体反应的潜伏期, 减少扭体次数, 其作用与抑制离体子宫收缩、镇痛抗炎、抑制前列腺素的产生以及调节内分泌等因素有关^[1,4-5]。

以往观察在体动物子宫的收缩多采用水囊法, 即将与压力换能器相联的水囊通过子宫切口置入子宫内, 记录水囊随子宫的收缩产生的压力变化。但由于大鼠子宫较小, 操作不便, 且为有创手术, 对动物造成显著的刺激和影响。本研究设计了一个 Y 型装置, 可以在较小损伤情况下较为客观地记录在体大鼠子宫收缩状态。结果表明, 当归芍药散能够显著抑制缩宫素诱导的在体大鼠子宫收缩, 主要体现在抑制子宫收缩的张力, 并使子宫对缩宫素的反应性下降。

原发性痛经时, 各种原因导致子宫平滑肌痉挛性收缩, 进而引起子宫血流减少, 子宫组织缺血、缺氧等^[7]。本研究表明, 当归芍药散不仅能抑制在体大鼠子宫的过度收缩, 同时能够调节干预子宫血管舒缩功能的关键因子 NO 及 ET^[8], 通过升高 NO 的和降低 ET 的量, 增加子宫的供血、供氧, 改善缺血状态, 从而缓解痛经的症状。

参考文献

- [1] 郭笑梅, 王 燕, 张元珍, 等. 132 名原发性痛经流行病学研究及当归芍药散疗效观察 [J]. 数理医药学杂志, 2003, 16(5): 409-410.
- [2] 华永庆, 谢海棠, 段金廛, 等. 当归芍药散治疗痛经的方药量效关系研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(5): 501-507.
- [3] 王言才, 段金廛, 华永庆, 等. 当归芍药散抑制小鼠离体子宫收缩效应与效应物质分析评价 [J]. 中国天然药物, 2008, 6(2): 196-200.
- [4] 沈 欣, 宗桂珍, 李德凤, 等. 复方芍归散对大鼠在体子宫痉挛及血液流变学的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(8): 22-24.
- [5] 叶靖宇, 黄玉芳, 华永庆. 当归芍药散及其不同提取部位对离体培养大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响 [J]. 福建中医药, 2009, 40(1): 46-48.
- [6] Hua Y Q, Su S L, Duan J A, *et al.* Danggui-Shaoyao-San, a traditional Chinese prescription, suppresses PGF 2 alpha production in endometrial epithelial cells by inhibiting COX-2 expression and activity [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(12): 1046-1052.
- [7] 华永庆, 洪 敏, 朱 荃. 原发性痛经研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(1): 62-64.
- [8] 杨爱萍, 陈 群. 妇科疾病瘀血舌象与血浆 NO-ET 失衡相关性研究 [J]. 江苏中医药, 2008, 40(11): 34-35.