

赤雹果总有机酸对大鼠离体子宫平滑肌的作用及机制研究

赵盼¹, 佟继铭², 刘玉玲², 宋素英^{1*}

(1. 河北联合大学中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 承德医学院中药研究所, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的: 观察赤雹果总有机酸(FTDBP)对大鼠离体子宫平滑肌活力的影响。方法: 选用 8 周龄 Wistar 雌性未孕大鼠, 以子宫平滑肌的收缩频率、收缩幅度指标, 计算子宫平滑肌活力及 FTDBP 的半数抑制浓度(IC₅₀)。以盐酸普萘洛尔、盐酸苯海拉明、盐酸雷尼替丁、硫酸阿托品为阻断剂, 观察 FTDBP 对子宫平滑肌作用与 β , H₁, H₂, M 受体的关系, 探讨 FTDBP 对子宫平滑肌的作用机制。结果: 与模型组比较, FTDBP 剂量组(0.032, 0.064, 0.128 g·L⁻¹)和元胡止痛片组对缩宫素所致大鼠离体子宫平滑肌的收缩频率、收缩幅度和活力均有明显的抑制作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), IC₅₀ 为 0.100 24 g·L⁻¹; 与模型组比较, 硫酸阿托品组大鼠子宫平滑肌的收缩频率、幅度和活力差异无统计学意义。结论: FTDBP 对大鼠子宫平滑肌活力有明显的抑制作用, 其作用是通过抑制 M 受体实现的, 与 H₁, H₂, β 受体无关。

[关键词] 赤雹果; 总有机酸; 受体; 子宫收缩

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0202-04

[doi] 10.11653/syfyj2013080202

[收稿日期] 20120803(002)

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(C2006000863)

[第一作者] 赵盼, 在读硕士研究生, 从事中医血证研究, Tel: 13673248129, E-mail: zhaopan520313@sohu.com

[通讯作者] * 宋素英, 教授, 从事中医血证研究, Tel: 13673248129, E-mail: plmmssy@163.com

[参考文献]

- [1] 李克光. 金匱要略译释[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010: 119.
- [2] 胡熙明. 中华本草精选本[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 47.
- [3] 唐于平, 吴起成, 丁安伟. 对中药“十八反”、“十九畏”的现代认识[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 5(6): 79.
- [4] 景欣悦, 彭蕴茹, 王新敏, 等. 基于药物代谢酶探讨中药“十八反”配伍致毒/增毒机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(7): 281.
- [5] 王晓莹. 天然抗氧化剂抗氧化活性的测定及应用[D]. 西安: 西北大学, 2007.
- [6] 王沛坚, 施旭光. 类风湿关节炎的抗氧化治疗展望[J]. 现代生物医学进展, 2006, 26(3): 39.
- [7] Kamanli A, Naziroglu M, Aydilek N, et al. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. Cell biochemistry and function [J]. Chichester, 2004, 22(1): 53.
- [8] 陈玉霞, 刘建华, 林峰, 等. DPPH 和 FRAP 法测定 41 种中草药抗氧化活性[J]. 实验室研究与探索, 2011, 30(6): 11.
- [9] 刘平怀, 汪春牛, 陈德力, 等. DPPH 法测定青皮加速溶剂萃取提取物的抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 69.
- [10] 薛海萍, 朱春赞, 芮欣忆, 等. 半枝莲醇提工艺的优化及体外抗氧化活性评价的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 12.
- [11] 邢煜君, 王海燕, 王俊霞, 等. 杠板归抗氧化作用及抑制 α -葡萄糖苷酶活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2): 189.
- [12] 陈瀚, 李进, 李祥, 等. 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 184.
- [13] 李晓梅, 郭曙光, 康文艺. 山楂提取物的体外和体内抗氧化作用[J]. 精细化工, 2009, 26(4): 348.
- [14] 李文林, 范欣生, 段金殿, 等. 中药十八反的现代临床应用数据分析与思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5): 231.
- [15] 王超, 王宇光, 梁乾德, 等. 乌头与贝母配伍化学成分变化的 UPLC/Q-TOFMS 研究[J]. 化学学报, 2010, 68(16): 1920.
- [16] 刘文龙, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 川乌与半夏、瓜蒌、贝母、白蔹、白芨配伍禁忌的化学研究[J]. 化学学报, 2010, 68(9): 889.

[责任编辑 邹晓翠]

Effect of Total Organic Acid of *Thladiantha dubia* on Active Capacity of Isolated Rat Uterine Smooth Muscle *in vitro*

ZHAO Pan¹, TONG Ji-ming², LIU Yu-ling², SONG Su-ying^{1*}

(1. College of Chinese Medicine of Hebei Unite University, Tangshan 063000, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] Objective: To explore the effects of the total organic acid of *Thladiantha dubia* (FTDBP) on activity of isolated rat uterus smooth muscle *in vitro*. **Method:** The effect of the FTDBP on activity of the isolated rat uterus smooth muscle of non-pregnant rats eight weeks old was recorded by Maclab/4e four channels physiological recorder. Four antagonists, propranolol hydrochloride tablets ($3.4 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), diphenhydramine hydrochloride tablets ($2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), ranitidine hydrochloride tablets ($2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and atropine sulfate tablets ($2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were used to study their mechanism respectively. **Result:** Compare with model group, the FTDBP markedly inhibited the tension, frequency and activity of uterus of rat *in vitro*. And the IC_{50} of FTDBP was $0.10024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion:** The effect of FTDBP on activity of uterine smooth muscle in rats is mainly associated with M receptor but not H_1 receptor, H_2 receptor or β receptor.

[Key words] *Thladiantha dubia*; Total Organic acid; receptor; uterine contraction

痛经是青春期常见症状之一,国外报道妇女原发性痛经的比例高达 20% ~ 90%^[1],严重影响妇女正常工作和生活质量。葫芦科植物赤霄果具有理气、活血、止痛等作用,主要用于治疗痛经、乳房肿痛等多种疼痛疾病,在满族民间沿用已久,疗效显著,且无明显的毒副作用。本课题前期研究证明赤霄果抗炎镇痛作用主要有效成分为总有机酸^[2],赤霄果对缩宫素诱发的原发性痛经有明显的防治作用,并可抑制缩宫素诱发大鼠离体子宫的收缩幅度和频率^[3]。本研究旨在观察赤霄果总有机酸(FTDBP)的对大鼠离体子宫平滑肌活力的影响和 IC_{50} 及作用受体,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,清洁级,雌性,30 只,体重 (200 ± 20)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,动物许可证号 SCXKY2009-0008。

1.2 药物 赤霄果总有机酸由承德医学院中药研究所提供,采用 717 阴离子交换树脂提取,收率 10.4%,总有机酸质量为 55.84%,批号 20110315。

1.3 药品与试剂 缩宫素(安徽宏业药业有限公司,批号 H34022979),己烯雌酚(天津金耀氨基有限公司,批号 0806021),元胡止痛片(襄樊隆中药业有限责任公司,批号 110301),盐酸普萘洛尔片(大同市云岗制药有限公司,批号 111020),盐酸苯海拉明片(大同市云岗制药有限公司,批号 111117),盐

酸雷尼替丁胶囊(白云山东泰商丘药业有限公司,批号 111203),硫酸阿托品片(山东仁和堂药业有限公司,批号 110502)。

1.4 仪器 AG245 型-梅特勒-托利多分析天平(瑞士 Metter 公司),Maclab/4e 型四道生理仪(澳大利亚),80-2B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 赤霄果总有机酸的制备 称取适量赤霄果粗粉,蒸馏水浸泡过夜,回流提取法制备赤霄果水提取物,调节 pH,717 阴离子交换树脂静态饱和吸附,以 30% 乙醇洗脱,洗脱流速为 $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗脱液,减压回收溶剂,赤霄果的收率为 10.4%,总有机酸质量为 55.84%。赤霄果总有机酸的主要成分为熊果酸、齐墩果酸、草酸、苹果酸、柠檬酸等。

2.2 半数抑制浓度的测定 取未孕 Wistar 大鼠,于实验前大鼠皮下注射己烯雌酚 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 2 d,增加子宫的敏感性。于第 3 天腹腔注射 20% 乌拉坦 ($6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠,迅速取出子宫,立即置于冷洛氏液中清洗,用棉线分别扎住子宫颈端及卵巢端,置于盛有 10 mL 洛氏液的恒温浴槽中,其中一端固定于浴槽底部固定钩上,另一端连接到与 MecLab/4e 四道生理仪相连的张力换能器上。浴槽内温度为 $37 \text{ }^\circ\text{C} \sim 38 \text{ }^\circ\text{C}$,恒量通入 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体。调节微调器加前负荷 1 g,平衡 40 min,待子宫恢复自发节律,收缩幅度和频率稳定后,记录正

常收缩曲线。向恒温浴槽内加入缩宫素,终质量浓度为 $6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 10 min 后分别加入赤霉素总有机酸,使得终浓度为 $(0.008, 0.016, 0.032, 0.064, 0.128 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$ 5 个不同质量浓度和元胡止痛片 $(0.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$,观察给予药物后大鼠离体子宫平滑肌的收缩频率和幅度 10 min。

子宫活力 = 收缩幅度 \times 收缩频率

抑制率 = (给药前活力 - 给药后活力) / 给药前活力^[4-5]

2.3 对 M, β, H_1, H_2 受体的影响 取未孕 Wistar 大鼠,分为 FTDBP 对照组和盐酸普萘洛尔、盐酸苯海拉明、盐酸雷尼替丁和硫酸阿托品 5 组,处理方法同前,待子宫平滑肌收缩平稳后,FTDBP 对照组加入 $0.064 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$;其余 4 组分别加入盐酸普萘洛尔 $(3.4 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 、盐酸苯海拉明 $(2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 、盐酸雷尼替丁 $(2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 和硫酸阿托品 $(2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$,10 min 后再加入 FTDBP 使终质量浓度为 $0.064 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别观察上述各组中未孕大鼠离体子宫平滑肌收缩频率、收缩幅度和活力^[6-8]。

2.4 统计分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,两两比较用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠离体子宫平滑肌活力和 IC_{50} 的影响 FTDBP 终浓度为 $0.008 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组用药前后子宫平滑肌收缩频率和幅度差异无统计学意义;FTDBP 组 $(0.016, 0.032, 0.064, 0.128 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$ 大鼠离体子宫平滑肌收缩频率和幅度显著降低,与药前比较差异有显著统计学意义 $(P < 0.05$ 或 $P < 0.01)$,且有明显的剂量依赖关系。FTDBP 组 $(0.032, 0.064, 0.128 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1})$ 大鼠离体子宫平滑肌活力显著降低,与药前比较差异有显著统计学意义 $(P < 0.05$ 或 $P < 0.01)$,且有明显的剂量依赖关系。抑制率和给药浓度的线性方程: $Y = 3.044 - 5X + 0.1948$, $R = 0.97128$ 。FTDBP 的 IC_{50} 为 $0.10024 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1 和图 1。

3.2 4 种阻断剂对 FTDBP 对子宫活力的影响 FTDBP 对照组、盐酸普萘洛尔组、盐酸苯海拉明组、盐酸雷尼替丁组用药前后子宫平滑肌收缩频率、幅度及活力显著降低,与药前比较差异有显著统计学意义 $(P < 0.05$ 或 $P < 0.01)$;硫酸阿托品组用药前后子宫平滑肌收缩频率、幅度及活力差异无统计学意义。见表 2。

表 1 FTDBP 对缩宫素所致的离体大鼠子宫平滑肌收缩幅度和频率及活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	收缩频率/次/10 min		收缩幅度/g		活力(频率 \times 幅度)	
		药前	药后	药前	药后	药前	药后
缩宫素模型	-	11.27 \pm 1.09	10.77 \pm 0.85	4.03 \pm 0.57	3.87 \pm 0.46	45.24 \pm 9.52	41.65 \pm 6.15
FTDBP	0.008	10.84 \pm 1.95	9.63 \pm 1.51	3.76 \pm 0.68	3.53 \pm 0.60	40.53 \pm 8.75	33.88 \pm 7.11 ¹⁾
	0.016	11.55 \pm 1.77	9.48 \pm 1.67 ³⁾	3.98 \pm 1.05	3.53 \pm 0.89	46.33 \pm 14.18	33.77 \pm 11.21
	0.032	11.78 \pm 1.73	9.17 \pm 0.78 ^{1,4)}	3.55 \pm 0.88	3.02 \pm 0.58 ¹⁾	41.65 \pm 10.50	27.71 \pm 6.05 ^{2,4)}
	0.064	11.49 \pm 1.45	8.98 \pm 1.42 ^{1,4)}	3.88 \pm 0.73	3.01 \pm 0.83 ^{1,3)}	44.51 \pm 9.27	26.25 \pm 4.19 ^{2,4)}
	0.128	11.34 \pm 2.13	7.29 \pm 2.57 ^{2,4)}	4.20 \pm 0.61	2.82 \pm 0.89 ^{2,4)}	47.07 \pm 7.49	20.68 \pm 10.19 ^{2,4)}
元胡止痛片	0.09	10.77 \pm 0.91	9.17 \pm 1.22 ^{1,3)}	3.93 \pm 0.52	3.19 \pm 0.29 ^{2,4)}	42.47 \pm 7.25	29.50 \pm 5.17 ^{2,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与药前比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 使用拮抗剂后 FTDBP 对大鼠子宫平滑肌条的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 $/\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	收缩频率/ $t \cdot 10 \text{ min}^{-1}$		收缩幅度/g		活力(频率 \times 幅度)	
		药前	药后	药前	药后	药前	药后
FTDBP 对照	0.064	8.413 \pm 1.349	6.219 \pm 0.950 ⁴⁾	4.020 \pm 0.521	3.289 \pm 0.644 ³⁾	33.49 \pm 4.94	20.44 \pm 5.03 ⁴⁾
盐酸普萘洛尔	3.4×10^{-7}	9.428 \pm 1.666	6.771 \pm 2.283 ³⁾	4.177 \pm 0.846	3.612 \pm 0.694 ³⁾	38.98 \pm 7.84	23.94 \pm 13.6 ³⁾
盐酸苯海拉明	2×10^{-6}	8.378 \pm 1.219	6.534 \pm 0.975 ⁴⁾	4.436 \pm 0.513	3.796 \pm 0.430 ³⁾	35.23 \pm 7.49	24.98 \pm 6.03 ³⁾
盐酸雷尼替丁	2×10^{-5}	8.550 \pm 1.392	6.083 \pm 1.646 ³⁾	4.207 \pm 0.405	3.683 \pm 0.536 ³⁾	36.15 \pm 7.65	23.94 \pm 5.49 ⁴⁾
硫酸阿托品	2×10^{-5}	9.108 \pm 1.858	8.470 \pm 2.057 ¹⁾	4.184 \pm 0.770	4.028 \pm 0.690 ¹⁾	38.28 \pm 11.89	33.75 \pm 8.51 ²⁾

注:FTDBP 剂量以 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 表示。

4 讨论

原发性痛经是常见疾病,目前临床上西医对原发性痛经有多种治疗方法,以非甾体抗炎镇痛药和口服避孕药为主,副作用大,且远期效果不理想^[9]。手术治疗如骶前神经节切除术虽有疗效,但有一定局限性难以推广。赤芍果乙醇提取物及水提取物可显著延长缩宫素诱发小鼠扭体反应的潜伏期,减少扭体反应次数^[3,10]。现代医学普遍认为,前列腺素改变是形成痛经的根本机制,高浓度的 PGF₂ α 作用于螺旋小动脉壁上的 PGF₂ α 受体,引起子宫异常收缩,造成子宫平滑肌血流减少,缺血、缺氧、酸性代谢产物堆积,故缓解子宫平滑肌痉挛是治疗原发性痛经的关键^[10-12]。且赤芍果水提取物可显著降低小鼠腹腔液中的 PGE₂,提示其镇痛作用与抑制 PGE₂的合成和/或释放有关^[11]。

本实验中 FTDBP 0.032,0.064,0.128 g·L⁻¹ 剂量组对缩宫素所致大鼠离体子宫平滑肌的收缩频率、收缩幅度及活力均有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), IC₅₀ 为 0.100 2 g·L⁻¹。

子宫平滑肌上有 M 受体、 α 受体、H 受体、 β 受体等多种受体存在。M 受体激动后,通过肌醇三磷酸与甘油二酯合成和促进环磷酸腺苷分解,使细胞内钙离子增加,引起家大鼠子宫平滑肌收缩^[13]。 α 受体属于 G 蛋白耦联受体,促进子宫收缩的 α_1 受体与其激动剂结合后,即可通过 G 蛋白而激活 PKC,使细胞内钙离子增加,蛋白激酶活化,从而使平滑肌产生收缩。另外,子宫平滑肌细胞膜上存在 H₁ 受体,当与激动剂结合后,可通过三磷脂酰肌醇—Ca²⁺ 发挥作用^[14]。而 β 受体则可引起子宫平滑肌的松弛,无论 β_1 和 β_2 受体,都通过 1 个中间媒介 G 蛋白与腺苷酸环化酶结合,活化的腺苷酸环化酶激活 cAMP 依赖性激酶,从而导致 cAMP 的增加。而 cAMP 又通过降低肌浆 Ca²⁺ 浓度而导致松弛作用^[15]。不同的药物作用于子宫平滑肌上不同的受体或通道,通过兴奋或抑制子宫的活动,达到预期的临床目的^[16]。用阿托品(M-受体阻断剂)阻断 M-受体后,FTDBP 的抑制作用基本被阻断,而阻断 β , H₁, H₂ 受体后,不影响 FTDBP 对子宫平滑肌的抑制作用。综上所述 FTDBP 有抑制子宫平滑肌活力的作用,并且主要是通过抑制 M-受体,而与 β , H₁, H₂ 受体无关。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 亢炎,佟继铭.阴离子交换树脂分离纯化赤芍果中的总有机酸[J].承德医学院学报,2009,26(3):237.
- [3] 佟继铭,李兰芳,刘玉玲,等.满药赤芍果乙醇提取物治疗原发性痛经的实验研究[J].时珍国医国药,2008,19(11):2688.
- [4] 朱敏,段金殿,唐玉平,等.四物汤及其组方药物对小鼠离体子宫收缩的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):149.
- [5] 张建英,楚更五,刘秀萍,等.当归散对正常和缩宫素处理大鼠离体子宫活动力的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):201.
- [6] 徐敬东,王文,秦晓民.远志增强未孕大鼠子宫平滑肌运动的机制研究[J].中国中药杂志,2005,30(4):295.
- [7] 韩继超.槟榔次碱对未孕大鼠离体子宫平滑肌运动的影响[J].中华中医药学刊,2008,26(2):379.
- [8] 李志强,马力扬,徐敬东,等.香附对未孕大鼠离体子宫肌收缩的影响[J].西安交通大学学报,2007,28(4):399.
- [9] 肖雯晖,王香桂.中药巴布剂治疗痛经的主要药效学实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2005,11(5):52.
- [10] 佟继铭,刘玉玲,陈光晖.满药赤芍果水提取物治疗原发性痛经的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(12):3050.
- [11] 陈光晖,佟继铭,刘玉玲.赤芍果水提取物镇痛作用与前列腺素 E2 关系研究[J].时珍国医国药,2009,20(4):818.
- [12] 谭迎春,李克勤,徐红岩,等.铜精合剂治疗原发性痛经机制的实验研究[J].安徽中医学院学报,2006,25(1):30.
- [13] 徐淑云.药理实验方法学[M].3版.北京人民卫生出版社,2005:1584.
- [14] 李志强,徐敬东,马力扬.乌梅水煎剂增强大鼠离体子宫平滑肌运动作用的研究[J].中药药理与临床,2005,21(5):35.
- [15] 刘恒,马永明,瞿颂义,等.青皮对大鼠离体子宫平滑肌运动的影响[J].中草药,2000,31(3):203.
- [16] 徐敬东.远志增强大鼠子宫平滑肌峰电活动实验研究[J].中药药理与临床,2005,12(4):44.

[责任编辑 李玉洁]