

葛根汤对缩宫素复合寒冷刺激诱导的 寒湿凝滞型原发性痛经小鼠模型的影响

乐心逸, 柴程芝, 寇俊萍, 余伯阳*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

[摘要] 目的:探讨葛根汤对寒湿凝滞型原发性痛经小鼠模型的影响和可能的作用机制。方法:将 70 只雌性 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、布洛芬组、桂枝茯苓胶囊组和葛根汤低、中、高剂量组,每组 10 只。连续 3 d ip 雌激素使小鼠子宫同步化并进行寒冷刺激,第 4 天 ip 缩宫素注射液造模,观察 30 min 内小鼠扭体次数,并测定子宫匀浆液内钙离子(Ca^{2+})和一氧化氮(NO)的水平。造模的同时,布洛芬、桂枝茯苓胶囊、葛根汤低、中、高组分别按 0.12, 1.12, 3.5, 7.0, 14.0 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量 ig 给药。结果:葛根汤低、中、高剂量均能够有效地抑制缩宫素复合寒冷刺激诱导的扭体反应,抑制率分别为 81.03%, 84.14%, 90.15%;能够提高子宫匀浆液中 NO 水平、降低 Ca^{2+} 水平($P < 0.001$),与目前治疗原发性痛经的一线药物布洛芬和桂枝茯苓胶囊的药效相当。结论:葛根汤能有效缓解缩宫素复合寒冷刺激诱导的子宫平滑肌痉挛,其作用机制可能与影响子宫组织中 Ca^{2+} 和 NO 水平有关。

[关键词] 葛根汤; 原发性痛经; 寒湿凝滞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0174-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1158.007.html>

[网络出版时间] 2012-7-11 11:58

[收稿日期] 20120311(003)

[基金项目] 教育部博士点新教师基金(20110096120011)

[第一作者] 乐心逸, 硕士研究生, 从事中药复方作用机制研究, Tel:13813895456, E-mail:eyeeye88@163.com

[通讯作者] *余伯阳, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合药理学研究, Tel: 025-83271321, E-mail: boyangyu59@163.com

- [4] William P, Cawthorn, Jaswinder K Sethi. TNF- α and adipocyte biology [J]. FEBS Letters, 2008, 582:117.
- [5] Engelman J A, Lisanti M P, Scherer P E. Specific inhibitors of p38 MAP kinase block 3T3-L1 adipogenesis [J]. J Biol Chem, 1998, 273:32111.
- [6] Kasturi R, Joshi V C. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells [J]. J Biol Chem, 1982, 257:12224.
- [7] Stephens J M, Lee J, Pileh P F. Tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction [J]. J Biol Chem, 1997, 272:971.
- [8] Ruan H, Miles P D, Ladd C M, et al. Profiling gene transcription *in vivo* reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α ; implications for insulin resistance [J]. Diabetes, 2002, 51:3176.
- [9] Ruan H, Hacoen N, Golub T R, et al. Tumor necrosis factor- α suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- κ B activation by TNF- α is obligatory [J]. Diabetes, 2002, 51:1319.
- [10] Miles P D, Romeo O M, Higo K, et al. TNF- α -induced insulin resistance *in vivo* and its prevention by troglitazone [J]. Diabetes, 1997, 46:1678.
- [11] Peraldi P, Xu M, Spiegelman B M. Thiazolidin-ediones block tumor necrosis factor- α -induced inhibition of insulin signaling [J]. J Clin Invest, 1997, 100:1863.
- [12] Ruan H, Pownall H J, Lodish H F. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- κ B [J]. J Biol Chem, 2003, 278:28181.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Gegen Decoction on Primary Dysmenorrhea with Cold-damp Coagulation Induced by Oxytocin and Cold Stimulating in Mice

YUE Xin-yi, CHAI Cheng-zhi, KOU Jun-ping, YU Bo-yang*
(Department of Complex Prescription of Traditional Chinese Medicine,
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

[Abstract] Objective: To investigate the influence of Gegen decoction (GGD) and the potential mechanism on primary dysmenorrhea with cold-damp coagulation induced by oxytocin and cold stimulating. **Method:** Seventy female ICR mice were randomly divided into seven groups: normal group, model group, bupropion group, Guizhi Fuling capsule group, low-dose GGD group, middle-dose GGD group and high-dose GGD group. Subcutaneous injection of estrogen and cold stimulation were used for 3 consecutive days, and peritoneal injection of oxytocin on the 4th day to construct primary dysmenorrhea model with cold-damp coagulation, the writhing response and the levels of nitric oxide (NO) and calcium ion (Ca^{2+}) in mice uterine tissue were investigated. Meanwhile, ibuprofen group received ibuprofen ($0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), GFC group received Guizhi Fuling Capsule ($1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), GGD group received GGD (low-dose, $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; middle-dose, $7.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; high-dose, $14.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). **Result:** GGD could inhibit the writhing response effectively (the inhibition rate was 81.03%, 84.14%, 90.15% at low, middle and high-dose, respectively) and increase NO levels and reduce Ca^{2+} concentration in uterine tissue of mice ($P < 0.001$). The efficacy of GGD was equal to the positive drug ibuprofen and Guizhi Fuling capsule. **Conclusion:** GGD could effectively alleviate the spasm of uterine smooth induced by oxytocin and cold. The mechanism might be relative to regulation of uterine NO and Ca^{2+} levels.

[Key words] Gegen decoction; primary dysmenorrhea; cold-damp coagulation

流行病学研究表明,原发性痛经是妇科最常见疾病之一,其发病率在 20% ~ 90%^[1]。目前原发性痛经的治疗药物以非甾体抗炎药和选择性环氧酶-2 (COX-2) 抑制剂、避孕药和钙离子拮抗剂为主,这些药物能不同程度地缓解痛经症状,但具有明显的消化道、心脏或肝、肾等不良反应,疗效难以持久且不宜长期服用,临床应用具有明显的局限性^[2]。传统中药治疗痛经具有悠久的历史,且具有疗效确切和毒副作用小的优点^[3-5]。因此,研究开发疗效确切且不良反应小的新型痛经治疗药物十分必要。

葛根汤出自《伤寒论》,具有发汗解表,升津舒筋的功效,通常用于外感风寒表证。课题组在临床研究发现,葛根汤治疗原发性痛经疗效确切,与同类药物相比,具有起效快,作用持久,不易复发的优点^[6-7]。本研究拟在“方证相应”的中医理论指导下,通过考察葛根汤对模拟寒湿凝滞型原发性痛经小鼠模型的影响并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雌性未孕 ICR 小鼠,体重 18 ~

22 g,由扬州大学实验动物中心提供。许可证号 SCXR(苏)2007-0001。

1.2 药材 葛根汤组成药物购自南京传统中医门诊部,由南京中医药大学王椿根教授鉴定。

1.3 药物与试剂 苯甲酸雌二醇注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号 1007081),缩宫素注射液($10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 南京新百药业有限公司,批号 100503),布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号 10020460),桂枝茯苓胶囊(江苏康源药业股份有限公司,批号 06933),钙测定及一氧化氮测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20110623)。

1.4 仪器 分析天平(浙江宁海白石电子医药仪器厂),Sunrise 酶标仪(奥地利 Tecan Gmbh 公司),Z-323 冷冻离心机(德国 HERMLE 公司),KH-250DB 型数控超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司)。

2 方法

2.1 样品制备 将葛根汤组成药物饮片,按照葛根:麻黄:桂枝:芍药:甘草:生姜:红枣 4:1:3:3:2:2:

4, 以 8 倍量水浸泡 30 min 后, 热回流提取 1 h, 滤渣再加 6 倍水提取 40 min, 合并两次滤液并浓缩装瓶(浓缩液每 1 mL 约含生药 1 g), 临用前按要求稀释配制不同浓度的供试品。

2.2 小鼠阴道组织涂片的制作 按文献报道的大鼠性周期阴道涂片的制作方法^[8], 连续 3 d ip 苯甲酸雌二醇 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 每日给药前用胶头滴管取少量生理盐水滴入小鼠阴道, 吹打 2 次左右, 吸出阴道液滴入 96 孔板相应的孔中。用 100 μL 移液枪将孔中的阴道液吹打均匀, 用载玻片在显微镜下对每种细胞进行观察和拍摄。

2.3 小鼠寒湿凝滞原发性痛经模型的建立 取未孕 ICR 雌性小鼠, 参照文献报道^[9-10], 采用雌激素联合缩宫素复合寒冷刺激构建寒湿凝滞型原发性痛经模型。在复制缩宫素诱导原发性痛经模型的基础上(连续 3 d ip 苯甲酸雌二醇 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 将小鼠后肢及下腹部浸入 $(20 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ 冷水中(室温 $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)进行寒冷刺激, 每天 1 次, 每次 10 min, 在造模第 4 天, ip 缩宫素 0.4 mL/只(4 U/只)。

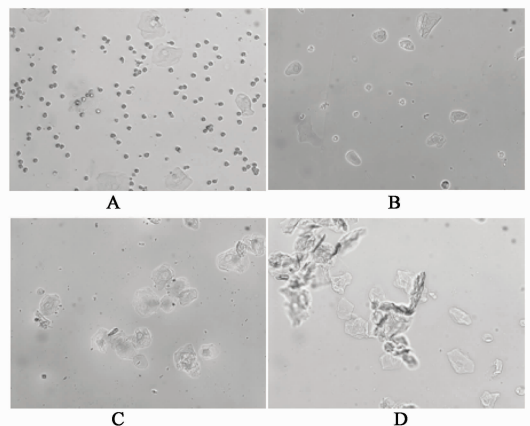
2.4 分组和给药 将 70 只小鼠随机分为正常对照组, 模型对照组, 布洛芬组(西药阳性对照组)、桂枝茯苓胶囊组(中药阳性对照组)和葛根汤高、中、低剂量组, 每组 10 只。正常对照组、模型对照组给予等容积生理盐水, 阳性对照组分别按照临床剂量换算, 分别 ig 给予布洛芬 $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和桂枝茯苓胶囊 $1.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 葛根汤高、中、低剂量组 ig $14, 7, 3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的葛根汤水提液(均为生药量)。按 2.2 方法复制寒湿凝滞型原发性痛经模型。从第 1 天起, 造模结束后, 正常对照组给予生理盐水 0.4 mL/只, 其余各组相应药物, 连续 3 d, 于末次给药后 30 min, ip 缩宫素注射液 4 U/只, 记录注射后 30 min 内小鼠扭体次数及扭体反应抑制率。

2.5 指标测定 参照文献报道的方法^[11], 取 2.4 项 7 组小鼠, 颈椎脱臼处死, 分离出子宫, 剔除周围的脂肪组织后用 1/万电子分析天平称取子宫的质量, 以每克子宫组织加 9 倍量生理盐水用匀浆机制备 10% 组织匀浆, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 低温离心 10 min, 分离出上清液, $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 用于 Ca^{2+} 和 NO 含量的测定。采用甲基百里香酚蓝比色法和硝酸还原酶法, 测定小鼠子宫匀浆中 Ca^{2+} 和 NO 的含量, 均按照试剂盒说明书严格操作。

2.6 统计学方法 使用 Office Excel 2007 软件进行统计, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠阴道组织涂片观察 参照文献报道^[10]的大鼠性周期阴道涂片的细胞变化特点来划分小鼠发情周期的各阶段。发现第 0 天小鼠分别处于不同的性周期(如图 1 所示), 包括以白细胞占绝大多数, 有核上皮和角化上皮细胞很少的发情间期(图 1A), 以椭圆形有核上皮细胞占绝大多数, 白细胞和角化上皮细胞很少的发情前期(图 1B), 以角化上皮细胞占绝大多数, 白细胞和有核上皮细胞很少的发情期(1C)和片状角化上皮细胞、有核上皮细胞和白细胞都有的发情后期(图 1D)。连续观察注射苯甲酸雌二醇第 0, 1, 2, 3 天阴道脱落细胞的形态变化后发现, 处于不同性周期的小鼠在第 3 天均呈现出发情期阴道涂片的特征, 表现为片状的角化上皮细胞占绝大多数, 白细胞和有核上皮细胞很少的特征。



A. 发情间期; B. 发情前期; C. 发情期; D. 发情后期
图 1 小鼠发情周期各阶段的阴道组织涂片

3.2 对寒湿凝滞原发性痛经模型小鼠扭体的抑制作用 葛根汤不同剂量均能有效抑制缩宫素复合寒冷刺激诱导的原发性痛经模型小鼠 30 min 内扭体次数($P < 0.001$), 低、中、高剂量的抑制率分别为 81.03%, 84.14%, 90.15%。见表 1。

3.3 对寒湿凝滞原发性痛经模型小鼠子宫匀浆液内 Ca^{2+} , NO 含量的影响 与正常对照组比较, 模型组子宫匀浆液内 Ca^{2+} 含量异常升高($P < 0.001$), 葛根汤不同剂量均能显著抑制 Ca^{2+} 含量异常升高, 与模型组比较有极显著差异($P < 0.001$)。与正常对照组比较, 模型组子宫匀浆液内 NO 含量明显下降($P < 0.001$), 葛根汤不同剂量均能极显著升高子宫匀浆液内 NO 含量, 与模型组比较有极显著差异($P < 0.001$)。见表 2。

表1 葛根汤对寒湿凝滞原发性痛经模型小鼠扭体次数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	扭体数 /次	扭体抑制率 /%
空白	-	0	-
模型	-	14.5 ± 2.00	-
布洛芬	0.12	1.00 ± 0.32 ³⁾	93.10
桂枝茯苓胶囊	1.12	2.54 ± 0.80 ³⁾	82.07
葛根汤	3.50	2.75 ± 0.47 ³⁾	81.03
	7.00	2.30 ± 0.40 ³⁾	84.14
	14.0	1.43 ± 0.40 ³⁾	90.15

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, ³⁾ $P < 0.001$ (表2同)。

表2 葛根汤对寒湿凝滞原发性痛经模型小鼠子宫匀浆液内Ca²⁺和NO含量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Ca ²⁺ 含量 /mmol·g ⁻¹	NO含量 /μmol·g ⁻¹
空白	-	0.067 ± 0.01 ³⁾	1.22 ± 0.10
模型	-	0.426 ± 0.02	0.17 ± 0.01
布洛芬	0.12	0.062 ± 0.01 ³⁾	0.33 ± 0.02 ³⁾
桂枝茯苓胶囊	1.12	0.143 ± 0.03 ³⁾	0.25 ± 0.02 ³⁾
葛根汤	3.50	0.283 ± 0.02 ³⁾	0.29 ± 0.02 ³⁾
	7.00	0.109 ± 0.01 ³⁾	0.38 ± 0.02 ³⁾
	14.0	0.148 ± 0.01 ³⁾	0.51 ± 0.04 ³⁾

4 讨论

原发性痛经的直接发病原因是由于子宫平滑肌痉挛性收缩,导致子宫血流减少,造成子宫缺血及缺氧,酸性代谢产物堆积于肌层而引起痛经^[12]。中医学认为,“血得热则行,得寒则凝。”临床流行病学研究也表明,感受寒邪是诱发与加重痛经的常见致病因素,寒湿凝滞是原发性痛经的最常见证型,约占33.8%^[13]。本研究采用缩宫素联合寒冷刺激诱导子宫平滑肌痉挛模型,模拟临床寒湿凝滞型原发性痛经的发病情况,考察葛根汤对子宫平滑肌收缩的影响并探讨初步的作用机制。研究结果显示,葛根汤不同剂量能有效抑制缩宫素复合寒冷刺激诱导的原发性痛经模型小鼠30 min内扭体次数($P < 0.001$),低、中、高剂量抑制率分别为81.03%, 84.14%, 90.15%。此外,葛根汤不同剂量均能够

调节子宫匀浆液中Ca²⁺与NO水平,显著降低子宫组织中Ca²⁺含量,提高NO水平,与模型组相比有极显著差异($P < 0.001$)。提示葛根汤能有效缓解子宫平滑肌痉挛,与目前治疗原发性痛经的一线药物布洛芬和桂枝茯苓丸的药效相当,其作用机制可能与调节子宫组织中Ca²⁺,NO水平有关,为葛根汤治疗原发性痛经的临床新用途提供了可靠的实验依据。

[参考文献]

- [1] Davis A R, Westhoff C L. Primary dysmenorrheal in adolescent girls and treatment with oral contraceptives [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2001, 14(1):3.
- [2] 姚方,叶寒.原发性痛经的病因与中西医治疗进展[J].现代中西医结合杂志,2009,18(29):3652.
- [3] 杜静,王东梅.香延止痛方治疗原发性痛经的研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(7):183.
- [4] 朱敏,段金殿,唐于平,等.四物汤及其组方药对与药味对小鼠原发性痛经模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(18):109.
- [5] 曹旦华,高珍,寇俊萍,等.2种当归芍药散提取物的镇痛活性与化学成分差异分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(16):89.
- [6] 柴程芝,余伯阳,朱丹妮,等.一种治疗痛经的中药组合物及其制备方法[P].200810235428.9.
- [7] 柴程芝,寇俊萍,朱丹妮,等.葛根汤辨证治疗原发性痛经[J].世界中西医结合杂志,2012,7(3):244.
- [8] 张森,王新,韦旭斌,等.大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察[J].动物医学进展,2006,27(2):69.
- [9] 稽波,张露芬,朱江,等.痛经模型建立和评价方法的思考[J].中国药理学通报,2008,24(6):711.
- [10] 周华妙,郭勇.寒凝血瘀证小鼠动物模型的建立及评价[J].中国中医药科技,2010,17(1):1.
- [11] 陈芳,朱敏,唐于平.川芎、白芍及配伍对痛经小鼠子宫组织中一氧化氮和钙离子的影响[J].时珍国医国药,2011,22(4):788.
- [12] 曹泽毅.中华妇产科学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2004:2483.
- [13] 连凤梅,赵瑞华,姜美华,等.原发性痛经的中医证候分布特点分析[J].世界科学技术——中医药现代化,2007,9(4):96.

[责任编辑 聂淑琴]