

艾叶不同提取物对小鼠原发性痛经的影响

张来宾¹, 阎奎庆¹, 段金康², 闫福林¹, 吕洁丽^{1*}

(1. 新乡医学院药学院, 河南 新乡 453003;

2. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] **目的:**通过观察艾叶不同提取物(水提液、95%醇提液、先水提后95%醇提混合液)对痛经模型小鼠的影响,初步探讨艾叶治疗原发性痛经的作用机制。**方法:**ICR 雌性小鼠随机分为9组,分别是正常组、模型组、阳性药西乐葆 45.0 mg·kg⁻¹组、艾叶不同提取物的高、低剂量组(1.65, 0.55 g·kg⁻¹)。除正常组外,其余各组以 10 mg·kg⁻¹的剂量给小鼠 sc 苯甲酸雌二醇连续 7 d,第 8 天给予 ip 缩宫素 10 mL·kg⁻¹制造原发性痛经模型。各组均在造模第 5 天起,每天 ig 给予不同药物连续 4 d,观察艾叶不同提取物对原发性痛经模型小鼠的扭体次数以及对子宫组织匀浆中一氧化氮(NO)和钙离子(Ca²⁺)水平的影响。**结果:**与模型组相比,艾叶醇提物高剂量、先水提后醇提混合液的高、低剂量对原发性痛经小鼠的痛阈有极显著的提高,扭体反应抑制率分别为 36.9%, 52.5%, 42.2% (P < 0.01),且相同剂量下先水提后醇提混合液的作用优于水提液 (P < 0.05);此外艾叶醇提物高剂量、先水提后醇提混合液的高、低剂量组能显著增加子宫组织内 NO 含量,降低 Ca²⁺含量 (P < 0.01)。**结论:**艾叶提取物制法不同,对原发性痛经模型小鼠的镇痛作用强度不同。在 3 种不同提取物中,先水提后醇提混合液药效最强,醇提液次之,水提液最弱,这可能与其溶出的效应物质不同有关。

[关键词] 艾叶; 不同提取物; 原发性痛经; 一氧化氮; 钙离子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0205-04

Influence of the Different Extracts of *Artemisiae argyi* on Primary Dysmenorrheal Modelin Mice

ZHANG Lai-bin¹, YAN Xi-qing¹, DUAN Jin-ao², YAN Fu-lin¹, LV Jie-li^{1*}

(1. College of Pharmacy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of the extracts of *Folium Artemisiae argyi* (FAA) with different extraction methods (by water, by ethanol, firstly by water then by alcohol) on the primary dysmenorrheal model in mice and to clarify the potential mechanism. **Method:** The ICR mice were randomly divided into nine groups, including normal control group, model group, masculine control group and the extract of FAA extracted with different preparation method groups (low and high dosage, 0.55, 1.65 g·kg⁻¹ accordingly). Except the control group, all the other groups were injected subcutaneously estradiol benzoate (10 mg·kg⁻¹) with seven consecutive days, and then these mice were injected intraperitoneally oxytocin (10 mL·kg⁻¹) at the eighth day so that the primary dysmenorrheal model was established. All the groups were orally administered once pre day with four consecutive days after the model has been made for 5 days. The mouse model of primary dysmenorrheal was used to study the effect of FAA extracted with different preparation methods (low dose and high dose) on writhing

[收稿日期] 20111212(014)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011B310006);新乡医学院第七批重点实验室开放课题(ZD2009067);新乡医学院高学历人才科研项目(100779)

[第一作者] 张来宾,医学硕士,讲师,从事中药活性成分研究,Tel:0373-3831652,E-mail: zhanglaibinli@yahoo.com.cn

[通讯作者] *吕洁丽,理学博士,讲师,从事中药活性成分的筛选、中药资源化学研究,Tel:0373-3831981,E-mail: ruoxin0371@163.com

response and the levels of nitric oxide (NO) and calcium ion (Ca^{2+}) in mice uterine tissue. **Result:** The ethanol extract in high dosage of FAA and the water alcohol mixture extract in both dosages of FAA could increase pain threshold markedly, and the inhibitory rate was 36.9%, 52.5% and 42.2% ($P < 0.01$), respectively. Furthermore, the solution of FAA extracted firstly by water then by alcohol showed the stronger effect than the water extract at the same dosage by reducing the writhing times ($P < 0.05$). In addition, the ethanol extract in high dosage of FAA and the water alcohol mixture extract in both dosages of FAA showed significant effect on primary dysmenorrhea by increasing NO concentration and reducing Ca^{2+} concentration in uterine tissue ($P < 0.01$). **Conclusion:** The different extracts of FAA showed different antidysmenorrheic trend on primary dysmenorrhea model mice, which were related with the containing constituents. In three extracts of FAA, the water alcohol mixture extract showed stronger analgesic activity than that of the ethanol extract, and the water extract had the weakest activity.

[Key words] *Artemisiae argyi*; different extract; primary dysmenorrheal; nitric oxide; calcium ion

痛经是目前妇科最常见疾病,其发病率在 20%~90%^[1]。流行病学调查显示,我国女性痛经发病率为 33.19%,其中原发性痛经占 36.06%,严重影响工作者占 14%^[2]。原发性痛经是指生殖器官没有器质性病变,在经行前后或在行经期间出现腹痛、腰酸、下腹坠胀或其他不适,其发病机制尚不明确。目前认为多是由于子宫平滑肌过度收缩、子宫血流缓慢或子宫局部缺血所引起^[3]。现代研究发现胞外钙离子(Ca^{2+})内流和一氧化氮(NO)水平降低会导致血管和子宫肌膜的收缩,使子宫内膜供血不足产生痛经,故 Ca^{2+} 和 NO 与痛经的发生有着密切关系^[4]。

艾叶为菊科蒿属植物,以叶入药,全国各地均有分布。始载于《名医别录》,中医理论认为其具有温经散寒,散瘀止痛之功效,临床广泛应用艾叶治疗寒凝胞中、冲任瘀阻的寒凝血瘀型痛经^[5-6]。尽管目前不乏关于艾叶化学成分、药理活性的现代研究^[7-8],然而关于不同制法的艾叶提取物对原发性痛经效应影响的研究尚无报道,且关于其治疗原发性痛经的作用机制亦不清楚。基于以上考虑,我们以 3 种不同制法(水提取、95%醇提,先水提后 95%醇提)制备的艾叶提取物为研究对象,从小鼠原发性痛经模型的扭体反应和子宫组织中 Ca^{2+} 和 NO 水平几个指标入手,评价不同艾叶提取物对此模型的干预作用,以期为揭示艾叶温经止痛的科学内涵提供依据。

1 材料

1.1 药物 艾叶 2010 年 5 月采自湖北省枣阳市太平庄,经河南中医学院陈随清教授鉴定为菊科植物艾 *Artemisiae argyi* Levl. et Vant. 的干燥叶。凭证样品存放于新乡医学院药学院,编号 2010-Y0506。

1.2 动物 SPF 雌性 ICR 小鼠,体重 18~22 g,由郑州大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(豫)2005-0001。

1.3 仪器与试剂 苯甲酸雌二醇注射液(上海通用药业股份有限公司,批号 090502);缩宫素注射液(上海禾丰制药有限公司,批号 H31020850),西乐葆(辉瑞制药有限公司,批号 1000323); Ca^{2+} , NO 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20100917)。Power Wave 340 酶标仪(Bio-TEK,美国)。

2 方法

2.1 药材的提取 称取 3 份经干燥粉碎后过 20 目筛的艾叶药材各 1 kg,分别进行热回流水提取(2 次),热回流 95%乙醇提取(2 次)和先水提后 95%醇提(各 1 次),各份提取液分别合并浓缩干燥成浸膏。

2.2 造模、分组及给药 SPF 级 ICR 雌性小鼠 90 只,体重 20~22 g,随机分为正常组、模型组、阳性组及不同制法艾叶提取物组共 9 组,每组 10 只,除正常组外,其余各组参照文献[4,9]以雌激素和缩宫素联合复制原发性痛经模型,具体操作如下:以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给小鼠连续 sc 苯甲酸雌二醇 7 d,使小鼠子宫同步化,第 5 天起正常组和模型组给予等量蒸馏水,阳性组给予西乐葆 $45.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,各给药组(即不同制法的艾叶提取物)均设 2 个剂量组,高剂量为 $1.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,低剂量为 $0.55 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,以生药量计(该剂量参考了临床上艾叶的常用剂量范围,依据体表面积折算小鼠每日给药剂量所得),连续给药 4 d,第 4 天给药 30 min 后,ip 缩宫素 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,同时开始记录 ip 缩宫素后 30 min 内各组小鼠扭体次数,并按以下公式计算扭体反应抑制率。

抑制率 = (模型组小鼠扭体次数 - 给药组小鼠扭体次数) / 模型组小鼠扭体次数 × 100%

2.3 生化指标的检测 测完 30 min 扭体次数后的各组小鼠,脱颈处死,迅速剖腹,分离出子宫,按试剂盒要求,剔除周围的结缔组织,以生理盐水洗净拭干,用 1/万分析天平称取子宫质量,在冰浴下以每克子宫组织加入 3 mL 生理盐水用匀浆机制备匀浆,后以 3 000 r·min⁻¹ 低温离心 15 min,分离出上清液, -20 ℃ 保存待测。NO 含量测定采用硝酸还原酶法,钙离子测定采用甲基百里香酚蓝比色法,蛋白测定采用考马斯亮蓝法,严格参照试剂盒说明书操作。

2.4 数据处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据采用统计学 SPSS 16.0 软件处理,组间比较用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 对原发性痛经模型小鼠扭体反应的影响 与模型组比较,艾叶醇提液高剂量组、艾叶先水提后醇提高、低剂量组对痛经模型小鼠扭体反应具有极显著性作用($P < 0.01$);艾叶水提高剂量组以及艾叶醇提液低剂量组对痛经模型小鼠扭体反应具有显著性作用($P < 0.05$)。此外,与水提液相比,相同剂量下先水提后醇提混合液对痛经模型小鼠扭体反应具有显著性差异($P < 0.05$),而醇提液与水提液之间无显著性差异。由此可见,艾叶不同提取方法所得的提取物对小鼠原发性痛经扭体反应的影响差异较大,先水提后醇提混合液优于水提液。见表 1。

表 1 艾叶不同提取物对小鼠原发性痛经模型扭体反应的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	扭体反应 /次	扭体抑制率 /%
模型对照	-	37.7 ± 10.0	-
西乐葆	0.045	6.9 ± 4.2 ²⁾	81.7
艾叶水提物	0.55	32.9 ± 8.7	12.7
	1.65	27.4 ± 9.7 ¹⁾	27.3
艾叶醇提物	0.55	28.7 ± 8.4 ¹⁾	23.9
	1.65	23.8 ± 7.6 ²⁾	36.9
艾叶先水提后醇提	0.55	21.8 ± 9.1 ^{2, 3)}	42.2
	1.65	17.9 ± 9.0 ^{2, 3)}	52.5

注:与模型组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与艾叶水提物相同剂量组比³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

3.2 对原发性痛经模型小鼠子宫匀浆中 Ca²⁺, NO 含量的影响 与正常组比较,模型组小鼠子宫内 Ca²⁺ 水平显著增加。各给药组与模型组相比,小鼠

子宫内 Ca²⁺ 水平有所降低,其中艾叶先水提后醇提混合液高、低剂量组以及醇提液高剂量组与模型组比较具有极显著差异($P < 0.01$);而艾叶醇提液低剂量组、水提液高剂量组与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。不同制法制备的艾叶提取物,先水提后醇提液与醇提液作用总体上强于水提液。见表 2。

与正常组比较,模型组小鼠子宫内 NO 水平显著降低;各给药组与模型组相比,小鼠子宫内 NO 水平均有所升高,其中艾叶先水提后醇提混合液高、低剂量组以及醇提液高剂量组与模型组具有极显著差异($P < 0.01$);而艾叶醇提液低剂量组及水提液高剂量组与模型组比较具有显著性差异($P < 0.05$)。不同制法的艾叶提取物,总体作用强度上呈现先水提后醇提混合液强于其他 2 种提液的趋势。见表 2。

表 2 艾叶不同提取物对原发性痛经模型小鼠子宫匀浆中 Ca²⁺ 和 NO 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量 /g·kg ⁻¹	Ca ²⁺ /mmol·g ⁻¹	NO /μmol·g ⁻¹
正常对照	-	0.55 ± 0.38 ²⁾	1.27 ± 0.26 ²⁾
模型对照	-	1.21 ± 0.43	0.59 ± 0.30
西乐葆	0.045	0.77 ± 0.35 ¹⁾	1.01 ± 0.32 ²⁾
艾叶水提物	0.55	0.92 ± 0.54	0.75 ± 0.41
	1.65	0.79 ± 0.30 ¹⁾	0.86 ± 0.25 ¹⁾
艾叶醇提物	0.55	0.77 ± 0.36 ¹⁾	0.88 ± 0.31 ¹⁾
	1.65	0.69 ± 0.21 ²⁾	0.95 ± 0.23 ²⁾
艾叶先水提后醇提	0.55	0.67 ± 0.26 ²⁾	0.92 ± 0.16 ²⁾
	1.65	0.60 ± 0.19 ²⁾	0.99 ± 0.31 ²⁾

4 讨论

现代研究发现,血管和子宫肌膜收缩时所需要的 Ca²⁺ 主要来自细胞外,痛经时,胞外 Ca²⁺ 内流导致细胞内 Ca²⁺ 增多,进而导致血管和子宫肌膜的收缩,子宫内膜供血不足^[10]。一氧化氮是一种具有多种生物功能的气体分子,它在机体循环、神经、免疫系统及细胞凋亡过程中都起着十分重要的作用,尤其是在痛觉调制过程中参与外周及中枢水平的痛觉调制。在外周,NO 作用于不同的靶细胞,通过 NO-cGMP 途径表现为镇痛和镇痛双重作用,其含量减少时,可促进伤害性信息的传递而致痛;增多时,则起抑制作用而镇痛^[11]。由此可见,Ca²⁺ 和 NO 水平与痛经的发生有着重要的联系。

艾叶具有温经止血、散寒止痛、安胎的传统功

效。临床上广泛应用于治疗寒凝血瘀型的原发性痛经。研究显示,艾灸成分如桉油精、樟脑、龙脑等具有消炎镇痛的作用^[6];同时,艾灸能够能对抗催产素所致的大鼠扭体反应,并能降低大鼠体内的 NO, ET-1 的含量^[12]。

以上研究侧重于针灸辅以艾叶止痛的效应研究,对于单独给予药材提取物对原发性痛经模型小鼠的影响未见报道,考虑到不同提取方法所获得的化学成分类型不同,进而影响到疗效的差异,本实验以原发性痛经模型小鼠扭体及子宫组织中 Ca^{2+} 和 NO 水平为评价指标对艾叶的水提液、醇提液、先水提后醇提混合液进行了比较研究,以此评价其对模型小鼠的镇痛作用。结果发现,不同制法制备的艾叶提取物对原发性痛经模型小鼠扭体次数及子宫组织中 Ca^{2+} 和 NO 水平具有不同程度的影响。其作用强度呈现出以下趋势:艾叶 3 种不同制法中,先水提后醇提混合液药效最强,醇提液次之,水提液最弱。究其原因可能是:先水提后醇提取法能同时将艾叶中的具有镇痛作用的水溶性活性成分、脂溶性成分溶出;而水提取、醇提取法则分别只能溶出其中的水溶性或脂溶性物质。本实验结果表明不同提取方法具有不同作用特点,提示不同提取液作用强度的不同与有效成分的溶出情况有关,而先水提后醇提取效果最好,说明水溶性成分与脂溶性成分对痛经模型小鼠的影响可能具有协同作用,其镇痛的作用机制可能与调节子宫组织中 Ca^{2+} , NO 水平有关。

综上所述,艾叶的不同制法制备的艾叶提取物对原发性痛经模型小鼠具有一定的镇痛作用,且强度亦有差别,其作用差别与其所含的有效物质群具有相应的联系,此研究可为进一步阐明艾叶的镇痛的机制奠定基础。

[参考文献]

- [1] Davis A R, Westhoff C L. Primary dysmenorrhea in adolescent girls and treatment with oral contraceptives [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2001, 14(1): 3.
- [2] 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.
- [3] Du J R, Yu Y, Ke Y, et al. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 112: 211.
- [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] 周峰, 秦路平, 连佳芳, 等. 艾叶的化学成分、生物活性和植物资源 [J]. 药学实践杂志, 2000, 18(2): 96.
- [6] 朱畅, 费兰波. 艾灸治疗寒凝血瘀型原发性痛经 [J]. 湖北中医杂志, 2011, 33(1): 65.
- [7] Lao A, Fujimoto Y, Tatsuno T. Studies on the constituents of *Artemisia argyi* Lévl et Vant [J]. Chem Pharm Bull, 1984, 32(2): 723.
- [8] 瞿燕, 曾锐, 刘圆. 艾叶研究概况 [J]. 西南民族大学学报:自然科学版, 2005, 31(2): 254.
- [9] 王欢, 唐于平, 郭建明, 等. 当归-川芎配伍对小鼠原发性痛经的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 892.
- [10] Du J R, Bai B, Kuang X, et al. Ligustilide inhibits spontaneous and agonists-or K^+ depolarization-induced contraction of rat uterus [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 108: 54.
- [11] 李亚洲, 佟继铭. 原发性痛经发病机制与治疗 [J]. 承德医学院学报, 2011, 28(2): 193.
- [12] 姚合梅, 陈盼碧, 黄小瑾, 等. 艾灸对痛经大鼠子宫组织内皮素和一氧化氮的影响 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 586.

[责任编辑 聂淑琴]