

温经止痛方治疗原发性痛经药效学及作用机制

任冬玲, 徐砚通, 王伟玲, 吴金英, 刘逍遙, 李佳林, 毕于聪, 王婷*
(北京中医药大学中医学院, 北京中医药研究院, 生命科学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:评价温经止痛方的镇痛效应并探索其可能的镇痛机制,为中药新药研发提供实验依据。方法:应用缩宫素诱导大鼠扭体模型、乙酸诱导小鼠扭体模型和前列腺素 E_1 (PGE_1)诱导小鼠扭体模型,通过观察动物扭体潜伏期和扭体次数,评价温经止痛方镇痛效应。采用缩宫素诱导大鼠在体子宫平滑肌收缩和缩宫素诱导家兔的在体子宫平滑肌收缩模型,评价温经止痛方对子宫收缩频率、收缩幅度及活动力的影响。应用缩宫素诱导大鼠扭体实验模型,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠子宫组织中前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$),前列腺素 E_2 (PGE_2)及大鼠血清中 β -内啡肽(β -EP)的含量变化;应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定大鼠子宫组织中雌激素受体(ER)和缩宫素受体(OTR)表达量变化,探讨温经止痛方可能的镇痛分子机制。结果:镇痛效应评价结果显示,缩宫素所致大鼠扭体实验中,与模型组比较,温经止痛方(1.5, 3.0 $g \cdot kg^{-1}$)组扭体次数均明显降低($P < 0.05$);乙酸所致小鼠扭体实验中,与模型组比较,温经止痛方(6.0 $g \cdot kg^{-1}$)组小鼠的扭体反应潜伏期显著延长($P < 0.01$),且扭体次数明显减少($P < 0.05$); PGE_1 所导致小鼠扭体实验中,与模型组比较,温经止痛方(1.5, 3.0, 6.0 $g \cdot kg^{-1}$)组的扭体次数均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。家兔在体子宫平滑肌实验结果,与模型组比较,温经止痛方(0.38, 0.75, 1.50 $g \cdot kg^{-1}$)组子宫平滑肌收缩频率均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。大鼠在体子宫平滑肌实验结果表明,与模型组比较,温经止痛方(0.75, 1.50, 3.00 $g \cdot kg^{-1}$)组收缩幅度和活动力均明显降低($P < 0.05$)。镇痛分子机制结果证实,与模型组比较,温经止痛方(0.75, 1.50, 3.00 $g \cdot kg^{-1}$)组大鼠子宫组织中 $PGF_{2\alpha}$ 含量, $PGF_{2\alpha}/PGE_2$ 均显著降低($P < 0.01$);温经止痛方(3.00 $g \cdot kg^{-1}$)组大鼠血清中 β -EP含量显著升高($P < 0.01$);温经止痛方(1.50, 3.00 $g \cdot kg^{-1}$)组大鼠子宫中OTR含量明显降低($P < 0.05$)。结论:温经止痛方具有显著镇痛效应,其镇痛机制可能与抑制子宫平滑肌的收缩、减少 $PGF_{2\alpha}$ 含量,降低 $PGF_{2\alpha}/PGE_2$,降低OTR在子宫组织中表达和增加血清中 β -EP的含量有关。

[关键词] 温经止痛方; 原发性痛经; 药效学; 作用机制

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)03-0085-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201986

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200728.0924.001.html>

[网络出版日期] 2020-7-28 14:28

Analgesic Effect and Action Mechanisms of Wenjing Zhitong Prescription on Primary Dysmenorrhea

REN Dong-ling, XU Yan-tong, WANG Wei-ling, WU Jin-ying, LIU Xiao-yao, LI Jia-lin,
BI Yu-cong, WANG Ting*

(College of Chinese Medicine, Beijing Research Institute of Chinese Medicine, College of Life Science,
Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the analgesic effects of Wenjing Zhitong prescription (WZP) and explore its possible analgesic mechanisms so as to provide experimental basis for research and development of new Chinese medicine. **Method:** Analgesic effects of WZP were evaluated by observing the writhing latency and number in the writhing models which were induced by oxytocin in rats as well as those induced by acetic acid and prostaglandin E_1 (PGE_1), respectively in mice. Effect of WZP on uterine contraction frequency,

[收稿日期] 20200419(005)

[第一作者] 任冬玲,在读硕士,从事中医体质与生殖医学研究,E-mail:ren18801377701@163.com

[通信作者] *王婷,博士,教授,博士生导师,从事名老中医经验传承及新药研发研究,E-mail:wangting1973@sina.com

amplitude and activity were evaluated by observing the oxytocin-induced contraction of uterine smooth muscle in rats and rabbits *in vivo*. In the oxytocin-induced rat writhing models, the content of prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) and prostaglandin E_2 (PGE_2) in rat uterine tissues and the content of beta-endorphins (β -EP) in rat serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expression of estrogen receptor (ER) and oxytocin receptor (OTR) in rat uterine were tested by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) method to investigate the possible molecular mechanism of WZP for its analgesic effect. **Result:** Results of analgesic effect showed that in oxytocin-induced rat writhing experiment, the number of writhing responses in both the WZP (1.5, 3.0 $g \cdot kg^{-1}$) group was lower than than in the model group ($P < 0.05$). In acetic acid-induced mice writhing experiment, the latency of writhing response in WZP (6.0 $g \cdot kg^{-1}$) group was significantly prolonged as compared with that in model group ($P < 0.01$), and the number of writhing response was significantly reduced ($P < 0.05$). In PGE_1 -induced mice writhing model, the writhing number in WZP (1.5, 3.0, 6.0 $g \cdot kg^{-1}$) groups was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Results of effect on uterine smooth muscle demonstrated that WZP (0.38, 0.75, 1.50 $g \cdot kg^{-1}$) could significantly reduce the frequency of uterine smooth muscle contraction in rabbits ($P < 0.05$, $P < 0.01$), WZP (0.75, 1.50, 3.00 $g \cdot kg^{-1}$) could significantly reduce the contractile amplitude and activity of smooth muscle in the uterus of rats ($P < 0.05$). Results of molecular mechanisms of analgesic effects showed that the WZP (0.75, 1.50, 3.00 $g \cdot kg^{-1}$) significantly reduced the content of $PGF_{2\alpha}$ and the ratio of $PGF_{2\alpha}$ to PGE_2 in the uterine tissue of rats ($P < 0.01$). In the WZP (3.00 $g \cdot kg^{-1}$) group, the levels of β -EP in the serum of rats were significantly increased ($P < 0.01$), and the levels of OTR in uterus of rats in the WZP (1.50, 3.00 $g \cdot kg^{-1}$) group were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Pharmacological studies demonstrated potent analgesic effect of WZP, and such analgesic effect were mediated by significantly inhibiting contraction of uterine smooth muscle, decreasing the contents of $PGF_{2\alpha}$ and ratio of $PGF_{2\alpha}/PGE_2$, reducing OTR expression in uterine as well as increasing the amount of β -EP in serum.

[Key words] Wenjing Zhitong prescription; primary dysmenorrhea; pharmacodynamics; mechanisms of actions

原发性痛经(PD)是指女性月经前或月经期间周期性的小腹疼痛,且无任何的器官器质性病变^[1]。PD是妇科临床常见疾病,通常发生在女性青春期和育龄期,一项调查结果显示,中国女大学生PD患病率占调查人数的80.43%^[2]。PD疼痛一般持续8~72 h,月经第1,2天最为严重,严重患者常伴有恶心、呕吐、腹泻等症状。PD严重影响患者的工作和生活^[3]。目前临床治疗PD的常用药物包括非甾体抗炎药(NSAIDs)和口服避孕药。虽然这2种药物都有镇痛效果^[4],但副作用明显。NSAIDs副作用包括胃肠道刺激、中枢神经系统症状、肾毒性和肝毒性、血液异常及支气管痉挛等^[5]。同样,口服避孕药也存在明显的副作用。首先,有备孕需求的女性不可使用避孕药。其次,长期使用激素类药物会引起体质量增加、月经紊乱、黄褐斑等症状^[6]。而中医治疗PD具有副作用少、疗效显著、治病求本的优势。温经止痛方是全国名老中医秦月好主任医师治疗PD的临床经验方,由桃红四物汤与失笑散加减化裁而来,秦月好老师提出PD的核心病机为“寒

凝气滞血瘀”,以“温经活血,理气止痛”为治则。通过前期的临床观察,以温经止痛方为基础方随证加减治疗PD疗效显著,本研究在动物模型上探究温经止痛方的镇痛作用,并探讨温经止痛方可能的镇痛作用机制。

1 材料

1.1 动物 72只SPF级雌性SD大鼠,体质量180~200 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,合格证号为SCXK(京)2016-0038;ICR小鼠60只,雌雄各半,体质量18~22 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-0006。清洁级雌性未孕新西兰大耳白兔56只,体质量2.0~2.5 kg,北京芳元缘养殖场提供,合格证号SCXK(京)2014-0012;以上所有实验动物均饲养于北京中医药大学屏障环境动物室,室内温度20~25℃,湿度45%~55%。经北京中医药大学实验动物伦理委员会审查合格,伦理审查编号BUCM-4-2019040202-2093。

1.2 药物及制备 温经止痛方由延胡索、桂枝、

乌药、当归、川芎、生蒲黄、小茴香、僵蚕、川牛膝组成,药材购买于北京本草方源集团有限公司,经由北京中医药大学李向日教授鉴定后标本存放于北京中医药大学研究院。温经止痛方药理测试样品在北京师范大学教育部资源药物工程研究中心制作而成(批号20190314)。制作工艺,生药材16.4 kg加10倍去离子水(W/V)164 L浸泡1 h,加热2 h后过滤,然后再加入等量去离子水加热2 h过滤,将2次得到滤液混匀,在蒸气压力0.01 mPa,蒸发室温度60~85 °C的环境下进行2次浓缩,收集得到浸膏13.4 kg,最后在进口温度180 °C,出口温度90 °C,药液流动速度8~10 mL·min⁻¹的环境下进行2次喷雾干燥获得干膏药粉5.3 kg,出膏率32%。温经止痛方成人临床有效剂量是生药材每日54.69 g,折算为干膏粉0.25 g·kg⁻¹(成人体质量按70 kg计算)。根据体表面积换算人与不同种属动物间等效剂量^[7],小鼠等效剂量是人临床用量12倍,大鼠等效剂量是人临床用量的6倍,家兔等效剂量是人临床用量3倍,将等效剂量作为中剂量组,分别设置1/2倍等效剂量组作为低剂量组,2倍等效剂量组作为高剂量组。小鼠和大鼠采用灌胃给药,家兔采用十二指肠给药。每次称量药物,用蒸馏水配制成混悬液,储存于4 °C冰箱,每3 d重新配制。扭体反应判断标准,腹部收缩内凹,臀部与一侧肢体内旋,躯干与后肢伸展。

1.3 试剂 布洛芬缓释胶囊(中美天津史克制药有限公司,批号18110450);维拉帕米(天津市中央药业有限公司,批号H12020051);乙酸(北京化工厂,批号20180907);阿司匹林泡腾片(阿斯利康制药有限公司,批号1806211);苯甲酸雌二醇注射液(江西博莱大药厂有限公司,批号20180907);缩宫素注射液(杭州动物药品厂,批号180428);20%乌拉坦溶液,前列腺素E₁(PGE₁),洛氏液[阿拉丁(上海)有限公司,批号分别为E1808063, P129960, E1808063];大鼠前列腺素F_{2α}(PGF_{2α}),前列腺素E₂(PGE₂),β-内啡肽(β-EP)酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,货号分别为ml087411-J, ml002867-J, ml003076-2);HiPureUniversal RNA Mini Kit(Macgene公司,货号R4130-02);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo公司,货号K1622);2×SYBR Green Qpcr Master Mix(Bimake公司,货号B21203)。

1.4 仪器 BSA323S型多功能电子天平(德国Satorius公司);JZJ01型肌肉张力换能器, RM6240

多道生理信号采集处理系统(成都仪器厂);xMark 10092型酶标仪, C1000型基因扩增仪, CFX96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);Centrifuge 5430小型高速离心机(德国Eppendorf公司)。

2 方法

2.1 模型制备 SD大鼠适应性饲养分组后,根据文献采用苯甲酸雌二醇配合缩宫素的造模方法^[8]。造模组大鼠连续10 d皮下注射苯甲酸雌二醇以提高子宫的敏感性,给药剂量为第1天和第10天每只大鼠0.5 mg,第2~9天每只大鼠0.2 mg。实验前注射缩宫素以刺激子宫的异常收缩,产生疼痛从而造成痛经模型。

2.2 检测缩宫素诱导大鼠扭体模型镇痛作用 72只SD大鼠适应性饲养3 d,根据体质量随机分为空白组,模型组,布洛芬组,及温经止痛方低、中、高剂量组,每组12只。模型组及给药组大鼠连续10 d皮下注射苯甲酸雌二醇,每日1次,其中第1天和第10天苯甲酸雌二醇用量为每只0.5 mg,第2~9天每只0.2 mg,使大鼠子宫对药物的敏感性增强。用药组大鼠从第2天灌胃给药,布洛芬组按0.05 g·kg⁻¹每日灌胃,温经止痛方低、中、高剂量组剂量依次为0.75, 1.50, 3.00 g·kg⁻¹每日灌胃,空白和模型组每天灌胃等体积饮用水,各组均连续给药10 d。在最后1次注射苯甲酸雌二醇24 h,动物再给药1次,1 h后腹腔注射缩宫素每只2 U,观察大鼠在30 min内的扭体潜伏期和扭体次数。

2.3 检测乙酸诱导小鼠扭体模型的镇痛作用 60只ICR小鼠适应性饲养33 d,根据体质量随机分为模型组、阿司匹林组、温经止痛方低、中、高剂量组,每组12只。连续1周灌胃给药,给药量分别是阿司匹林0.09 g·kg⁻¹,温经止痛方低、中、高剂量组剂量依次为1.50, 3.00, 6.00 g·kg⁻¹每日灌胃,在末次给药30 min,每只小鼠腹腔注射0.7%乙酸10 mL·kg⁻¹。注射后立即观察并记录20 min内小鼠扭体潜伏期与扭体次数。

2.4 检测PGE₁诱导小鼠扭体模型的镇痛作用 60只ICR小鼠适应性饲养33 d,分组及给药方案同乙酸扭体实验。在连续1周灌胃给药中的第4天开始,连续3 d皮下注射苯甲酸雌二醇,每只0.1 mg,在最后1次注射苯甲酸雌二醇24 h,小鼠再给药1次,1 h后腹腔注射PGE₁ 0.125 μg·kg⁻¹,随即观察注射PGE₁后20 min内小鼠扭体反应潜伏期及扭体次数。

2.5 检测缩宫素诱导家兔子宫平滑肌收缩 56只

雌性未孕家兔适应性饲养3 d,按体质量随机分为空白组、模型组、布洛芬组、维拉帕米组、温经低、中、高剂量组,每组8只。给药组及模型组家兔预先连续2 d每日腹腔注射苯甲酸雌二醇,每只0.5 mg,空白组腹腔注射等体积生理盐水。采用3%戊巴比妥钠溶液按 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 用量耳缘静脉注射麻醉,麻醉家兔仰位固定在兔台上,腹部剃毛后首先沿腹部中线切口,在十二指肠插入导管缝合固定,然后在耻骨联合处切4~5 cm切口,分离左侧子宫并固定,在子宫段中点引出一条棉线,穿过塑料管与JZJ01型肌肉张力换能器连接,然后将家兔腹壁围绕塑料管底部四周缝合,塑料管中加入洛氏液浸润子宫,记录子宫收缩情况(子宫前负荷 2 g)^[9]。实验过程中首先稳定系统30 min后记录子宫收缩情况,作为给药前子宫收缩基线数值。

采用十二指肠给药方法,给药剂量分别为布洛芬 $0.03\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,维拉帕米 $0.004\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,温经止痛方低、中、高剂量 $0.38, 0.75, 1.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,给药后30 min记录收缩曲线。给药后1 h,肌肉注射缩宫素4 U每只,记录注射缩宫素1 h内家兔子宫平滑肌收缩的频率和幅度,并计算子宫活动力,活动力=收缩幅度 \times 收缩频率。

2.6 检测缩宫素诱导大鼠子宫平滑肌收缩 实验分组和造模方法同2.1项中大鼠镇痛实验。大鼠在注射缩宫素后采用20%乌拉坦 $0.055\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 麻醉,仰位固定,下腹部正中行4~5 cm长切口,在左侧子宫选取长约3 cm的一段进行固定,在固定好的子宫段中点固定一条棉线,使其从塑料管中引出并与JZJ01型肌肉张力换能器相连,在仪器稳定10 min,记录1 h内子宫平滑肌收缩情况,实验后每组大鼠选取30 min进行数据分析,统计大鼠子宫平滑肌收缩的频率和振动加速度,计算子宫活动力值。

2.7 应用ELISA检测大鼠子宫组织 $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 含量及血清中 β -EP含量 实验2.1项中大鼠在观察扭体后进行麻醉,腹主动脉采血,收集左侧同段子宫。精确称取子宫样本,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)液冲洗子宫,剪碎子宫组织。将组织与相应体积的PBS(1:9)放入匀浆器里,放置冰上研磨。匀浆后取上清液用于ELISA检测 $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGE_2 含量。血标本在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜,1 000 $\times g$ 离心20 min,取上清液,按照ELISA试剂盒说明书进行检测。

2.8 应用Real-time PCR检测大鼠子宫雌激素受体(ER- α)和缩宫素受体(OTR)mRNA表达水平 称取子宫组织30 mg,根据试剂盒说明书提取RNA,根

据RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit说明书操作,将从大鼠子宫组织中提取的总RNA反转录为cDNA,反应条件: $42\text{ }^\circ\text{C}$ 下孵育60 min,最后通过在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 加热5 min来终止反应。根据SYBR Green Qpcr Master Mix试剂盒说明书进行荧光定量PCR反应。反应条件: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性30 s,进入PCR循环($95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 30 s),共40个循环。溶解曲线分析: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 60 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, 1个循环。以 β -actin为内参基因,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因表达的相对定量值。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
ER	上游 ACTACCTGGAGAACGAGCCC	153
	下游 CCTTGGCAGACTCCATGATC	
OTR	上游 CGATTGCTGGGCGGTCTT	161
	下游 CCGCCGCTGCCGTCTTGA	
β -actin	上游 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA	189
	下游 GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	

2.9 数据统计 采用SPSS 20.0软件进行统计分析,采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。符合正态性分析采用单因素方差分析,不符合正态性分析采用非参数检验的方法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 温经止痛方对缩宫素诱导大鼠扭体模型镇痛作用 与模型组比较,布洛芬组扭体次数显著降低($P<0.01$),温经止痛方($1.5, 3.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组扭体次数明显降低($P<0.05$)。表明温经止痛方对缩宫素所致大鼠扭体次数具有显著抑制作用,并且呈量效关系。见表2。

表2 温经止痛方对缩宫素诱导大鼠扭体反应的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 2 Effect of Wenjing Zhitong prescription (WZP) on writhing responses induced by oxytocin in rats ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	潜伏期/s	0~30 min扭体数/次
模型		364.00 \pm 107.00	19.0 \pm 12.11
布洛芬	0.05	360.70 \pm 219.10	8.4 \pm 4.50 ²⁾
温经止痛方	0.75	424.00 \pm 124.70	11.3 \pm 5.90
	1.50	413.10 \pm 73.78	10.5 \pm 4.40 ¹⁾
	3.00	303.20 \pm 88.11	9.1 \pm 7.10 ¹⁾

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

3.2 温经止痛方对乙酸诱导小鼠扭体模型镇痛作用 与模型组比较,阿司匹林组扭体潜伏期显著

延长($P<0.01$),扭体次数显著降低($P<0.01$),温经止痛方($6.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组扭体潜伏期显著延长($P<0.01$),扭体次数明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 温经止痛方对乙酸诱导小鼠扭体反应的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 3 Effect of WZP on writhing responses induced by acetic acid in mice ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	潜伏期/s	0~20 min 扭体数/次
模型		165.40±73.40	43.75±17.12
阿司匹林	0.09	363.60±149.80 ²⁾	14.08±10.26 ²⁾
温经止痛方	1.50	213.00±52.05	38.17±18.13
	3.00	305.20±218.30	23.08±10.18

3.3 温经止痛方对PGE₁诱导小鼠扭体模型镇痛作用的影响 与模型组比较,阿司匹林组大鼠潜伏期明显延长($P<0.05$),扭体次数显著降低($P<0.01$),温经止痛方($1.5, 3.0, 6.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组扭体次数均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表4。

表5 温经止痛方对家兔在体子宫平滑肌收缩的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5 Effect of WZP on rabbit uterine smooth muscle contraction *in vivo* ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	频率/次·(10 min) ⁻¹	振动加速度/ g^5	活动力
空白		14.25±4.64	0.77±0.31	10.89±5.32
模型		24.75±8.08 ¹⁾	0.76±0.39	17.31±6.51
布洛芬	0.03	15.42±3.02	1.31±0.67 ³⁾	20.61±11.77
维拉帕米	0.004	11.17±2.46 ⁴⁾	0.97±0.34	10.88±4.00
温经止痛方	0.38	13.13±5.27 ⁴⁾	0.82±0.22	11.13±6.15
	0.75	12.79±3.05 ³⁾	0.81±0.46	10.27±5.68
	1.50	11.25±2.55 ⁴⁾	0.60±0.17	6.91±2.85 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;⁵⁾ $1\text{ g}=9.8\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$ (表6~9同)。

3.5 温经止痛方对大鼠在体子宫平滑肌收缩的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫平滑肌收缩幅度与子宫活动力均升高($P<0.01$)。与模型组比较,布洛芬组、温经止痛方($0.75, 1.50, 3.00\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组大

表4 温经止痛方对PGE₁诱导小鼠扭体反应的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

Table 4 Effect of WZP on writhing responses induced by PGE₁ in mice ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	潜伏期/s	0~20 min 扭体数/次
模型		19.78±8.57	8.92±4.10
阿司匹林	0.09	35.89±15.81 ¹⁾	3.50±3.58 ²⁾
温经止痛方	1.50	14.00±5.29	4.75±4.31 ¹⁾
	3.00	14.22±7.71	5.00±2.49 ¹⁾
	6.00	16.00±13.82	3.58±2.07 ²⁾

3.4 温经止痛方对缩宫素诱导家兔在体子宫平滑肌收缩的影响 与空白组比较,模型组家兔子宫平滑肌收缩频率明显增加($P<0.05$)。与模型组比较,维拉帕米组、温经止痛方($0.38, 0.75, 1.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组家兔子宫平滑肌收缩频率均明显下降($P<0.05, P<0.01$);布洛芬组家兔子宫平滑肌收缩振动加速度明显增高($P<0.05$);温经止痛方($1.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组子宫活动力显著下降($P<0.01$)。见表5。

鼠子宫平滑肌收缩振动加速度均降低($P<0.05$),温经止痛方($0.75, 1.50, 3.00\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组子宫活动力均降低($P<0.05$)。各组大鼠子宫平滑肌收缩频率差异无统计学意义。见表6。

表6 温经止痛方对大鼠在体子宫平滑肌收缩的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Effect of WZP on contractile smooth muscle of rat uterus *in vivo* ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	频率/次·(10 min) ⁻¹	振动加速度/g	活动力
空白		0.62±0.11	0.49±0.16	0.30±0.13
模型		0.68±0.09	0.89±0.28 ²⁾	0.61±0.24 ²⁾
布洛芬	0.05	0.55±0.10	0.62±0.23 ³⁾	0.35±0.17
温经止痛方	0.75	0.57±0.13	0.54±0.26 ³⁾	0.31±0.18 ³⁾
	1.50	0.57±0.09	0.59±0.25 ³⁾	0.33±0.15 ³⁾
	3.00	0.54±0.12	0.57±0.16 ³⁾	0.30±0.09 ³⁾

3.6 温经止痛方对缩宫素诱导大鼠子宫组织中PGF_{2α}, PGE₂含量及其比值的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫组织中PGF_{2α}含量明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,布洛芬组和温经止痛方(0.75, 1.50, 3.00 g·kg⁻¹)组大鼠子宫组织中PGF_{2α}含

量显著降低($P < 0.01$)。与空白组比较,模型组PGF_{2α}/PGE₂显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,布洛芬组、温经温经止痛方(0.75, 1.50, 3.00 g·kg⁻¹)组PGF_{2α}/PGE₂均显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,布洛芬组的PGE₂含量明显增高($P < 0.05$)。见表7。

表7 温经止痛方对大鼠子宫组织中PGF_{2α}, PGE₂含量及其比值的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 7 Effect of WZP on contents of PGF_{2α} and PGE₂, as well as ratio of PGF_{2α} to PGE₂ in rat uterine tissues induced by oxytocin ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	PGF _{2α} /mg·g ⁻¹	PGE ₂ /mg·g ⁻¹	PGF _{2α} /PGE ₂
空白		4.84±0.73	1.67±0.19	3.30±0.62
模型		6.40±1.62 ¹⁾	1.28±0.46	4.82±1.99 ²⁾
布洛芬	0.05	4.57±1.52 ⁴⁾	1.74±0.49 ³⁾	2.49±0.39 ⁴⁾
温经止痛方	0.75	4.31±0.46 ⁴⁾	1.48±0.12	2.88±0.29 ⁴⁾
	1.50	3.25±0.42 ⁴⁾	1.35±0.12	2.42±0.40 ⁴⁾
	3.00	4.45±0.51 ⁴⁾	1.39±0.14	3.20±0.26 ⁴⁾

3.7 温经止痛方对缩宫素处理大鼠血清中β-EP含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中β-EP含量明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,布洛芬组和温经止痛方(3.00 g·kg⁻¹)组大鼠血清中β-EP含量显著增高($P < 0.01$)。见表8。

表9 温经止痛方对痛经模型大鼠子宫组织ER, OTR水平的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 9 Effect of WZP on levels of ER and OTR in uterus of dysmenorrhea model rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	ER	OTR
空白		7.89±0.46	3.83±1.03
模型		7.90±0.49	5.37±1.98 ¹⁾
布洛芬	0.05	8.27±0.33	5.21±0.89
温经止痛方	0.75	8.47±1.01	4.30±1.25
	1.50	8.54±0.50	3.73±0.92 ³⁾
	3.00	8.00±0.52	3.49±0.85 ³⁾

表8 温经止痛方对缩宫素处理大鼠血清中β-EP含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 8 Effect of WZP on β-EP content in serum of rats treated by oxytocin ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	β-EP/ng·L ⁻¹
空白		5.16±0.51
模型		3.97±0.60 ¹⁾
布洛芬	0.05	5.58±0.64 ⁴⁾
温经止痛方	0.75	4.81±0.98
	1.50	4.45±0.65
	3.00	5.72±0.98 ⁴⁾

3.8 温经止痛方对缩宫素处理大鼠子宫组织中ER-α和OTR表达的影响 与空白组比较,模型组大鼠子宫组织OTR表达明显增加($P < 0.05$)。与模型组比较,温经止痛方(1.50, 3.00 g·kg⁻¹)组OTR表达量明显降低($P < 0.05$)。见表9。

而设,所以作为君药。当归功能养血活血,调经止痛。最早记载于《神农本草经》,被称为“血家之圣药”,《景岳全书》^[11]曰:“味甘辛,气温,气清味重,可升可降,阴中有阳,味甘而重,故专能补血;气清而辛,故能行血,补中有动,行中有补,诚血中之气药,亦血中之圣药也。头止血上行,身养血中守,尾破血下流。”素有“药王”之美称。川芎为“血中之气药”,既能活血化瘀,又能行气止痛;蒲黄具有凉血止血,活血消瘀之功效。乌药具有行气止痛,温肾散寒的作用,最早见于《本草拾遗》,以上4味共为臣药。小茴香温经止痛,僵蚕止痛、止痉;川牛膝为佐使药,起到活血通经,引诸药下行的作用。诸药相合,治疗寒凝气滞血瘀型PD效果显著。

4 讨论

温经止痛方主治寒凝气滞血瘀型原发性痛经。方中延胡索始载于《神农本草经》,主治气血瘀滞痛证,《本草纲目》^[10]谓其“能行血中气滞,气中血滞,故专治一身上下诸痛,用之中的,妙不可言。”桂枝温通经脉,散寒止痛,两药相配正为PD的核心病机

本研究首先在催产素、乙酸和前列腺素E₁诱导扭体模型上考察了温经止痛方镇痛效应,虽然三者通过不同作用途径引发疼痛,温经止痛方在这3种

动物模型上均证实具有明显镇痛效果,证明温经止痛方具有镇痛作用。为了进一步考察温经止痛方对原发性痛经治疗作用,本研究采用催产素诱导家兔和大鼠子宫平滑肌收缩模型观察温经止痛方对子宫平滑肌收缩的影响,结果表明温经止痛方可降低家兔和大鼠子宫平滑肌收缩幅度和频率,证实温经止痛方对子宫平滑肌收缩具有调节作用。为深入探讨温经止痛方的镇痛作用机制,对大鼠子宫组织中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 的含量进行了测定,计算了 $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$,考察了子宫组织中 $\text{ER-}\alpha$ 和 OTR 的表达情况,且测定了大鼠血清中具有内源性镇痛作用 $\beta\text{-EP}$ 含量,实验结果表明,温经止痛方显著降低了子宫组织中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量,降低 $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$,降低了 OTR 在子宫组织中表达,增加血清中 $\beta\text{-EP}$ 的含量。综上所述,本研究证实了温经止痛方具有镇痛效应,能够调节子宫平滑肌活动,其镇痛机制涉及降低子宫 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量,降低子宫 OTR 表达,增加血清中 $\beta\text{-EP}$ 的含量等。本研究为临床上应用温经止痛方治疗女性PD提供了科学证据,为进一步新药研发提供了实验依据。

[参考文献]

[1] DAWOOD M Y. Primary dysmenorrhea advances in pathogenesis and management [J]. *Obstet Gynecol*, 2006, 108(2):428-441.

[2] 花琰,李晋华,范艳婷,等. 某医学院在校女大学生痛经现状及其影响因素分析[J]. *实用临床护理学电子杂志*, 2018, 3(1):96-97.

[3] IACOVIDES S, AVIDON I, BAKER F C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review [J]. *Hum Reprod Update*, 2015, 21 (6) : 762-778.

[4] ZAHRADNIK H P, HANJALIC-BECK A, GROTH K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and hormonal contraceptives for pain relief from dysmenorrhea: a review [J]. *Contraception*, 2010, 81 (3):185-196.

[5] 朱华,邹峥. 非甾体抗炎药临床作用及副作用研究新进展[J]. *江西医药*, 2007, 42(3):268-271.

[6] 梁如碧. 原发性痛经的中医认识及治疗研究进展[J]. *中外女性健康研究*, 2018(6):10-11.

[7] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:1861.

[8] 嵇波,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):711-714.

[9] 沈芑,孟宪丽. 产泰对家兔在体子宫平滑肌收缩的影响[J]. *四川生理科学杂志*, 2002, 24(2):75-77.

[10] 明·李时珍. 本草纲目[M]. 太原:山西科学技术出版社, 2014:368-369.

[11] 明·张介宾. 景岳全书[M]. 太原:山西科学技术出版社, 2006:624.

[责任编辑 张丰丰]