

当归芍药散活性部位 DSS-A-N-30 对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响

刘国云^{1,2}, 迟晓丽¹, 马 渊¹, 周文霞^{1*}, 尚玮玮¹, 乔善义¹, 张永祥¹, 刘 超²

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 军事医学科学院

卫生环境医学研究所, 天津 300050)

摘要: 目的 观察当归芍药散提取部位 DSS-A-N-30 对离体子宫平滑肌收缩的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法 制备离体大鼠子宫肌条, 观察 DSS-A-N-30 对子宫平滑肌自发性收缩, 子宫收缩激动剂诱发的子宫平滑肌条剧烈收缩, KCl 致子宫平滑肌条强直收缩及缩宫素(催产素)在无钙平衡盐溶液中致子宫平滑肌条持续收缩的影响。结果 DSS-A-N-30 ($141.5, 283$ 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以显著抑制子宫平滑肌的自发性收缩; 对缩宫素($10 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$)、前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和乙酰胆碱($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 引起的子宫平滑肌剧烈收缩有抑制作用; 对 KCl ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 引起的子宫平滑肌强直收缩无明显作用; 对缩宫素($10 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$) 在无钙平衡盐溶液中引起的子宫平滑肌条持续收缩有显著抑制作用。结论 DSS-A-N-30 可能主要通过抑制细胞内钙库释放而松弛子宫平滑肌, 对子宫平滑肌收缩产生直接的抑制作用。提示 DSS-A-N-30 是当归芍药散的活性部位之一, 有可能开发为新型痛经治疗药物。

关键词: 当归芍药散; 活性部位; 子宫收缩

中图分类号: R984

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2007)05-0427-07

痛经是妇女常见病, 发病率高且严重影响妇女健康和工作效率。痛经的发病原因较复杂, 目前医学界对其发病机制还不是完全清楚, 但普遍认为体内前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ (prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$)、缩宫素

(催产素, oxytocin)、血管加压素等过高可以引起子宫过度收缩, 这可能是痛经的主要发病机制^[1-2]。此外, 痛经患者普遍伴随子宫过度收缩、宫内压升高、子宫局部缺血和血流不畅, 以及由此所引起的下腹部疼痛等症状。目前痛经的治疗药物主要是非甾体抗炎药、选择性环氧化酶-2 抑制剂、避孕药等, 可以迅速有效缓解痛经症状, 但这些药物可引起消化道、心脏或肝肾等不良反应, 或对正常机体代谢平衡有影响, 因而其临床应用具有明显的局限性。

当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS)原载于汉代医圣张仲景的《金匱要略》, 由当归、芍药、川芎、白术、茯苓、泽泻六味药组成。原方主治“妇人妊娠诸疾痛”以及“妇人杂病腹中诸疾痛”。在中年的中医临床实践中, 该方用于治疗痛经有良好疗效, 痛经症状明显减轻, 患者血液流变性得到改善, 血液及经血中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 水平下降^[3], 且疗效巩固。药理实验证实^[4], 该方可显著缓解大鼠离体子宫平滑肌的自发性收缩及由缩宫素、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 等引起的离体子宫平滑肌剧烈收缩, 表明其对子宫平滑肌条的收缩具有直接抑制作用。虽然国内已有用于治疗痛经的 DSS 颗粒剂的研制报道^[5], 但其发挥治疗痛经作用的活性组分尚不清楚。本室前期工作表明, DSS 及其提取部位 DSS-A-N-30 可明显减少醋酸扭体小鼠和缩宫素致痛经模型小鼠因疼痛产生扭体次数, 提示 DSS-A-N-30 可能是 DSS 治疗痛经的活性部位之一。本研究在此基础上观察了 DSS-A-N-30 对离体子宫平滑肌收缩的影响, 并对其可能的作用机制进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂、实验动物和器材

DSS 和 DSS-A-N-30 由军事医学科学院毒物药物研究所天然药物化学研究室制备并提供。DSS 的制备: 当归[*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels], 白芍

来稿日期: 2007-03-06 接受日期: 2007-06-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 项目)资助项目(2004CB518907)

作者简介: 刘国云(1978-), 女, 山东省潍坊人, 药理学硕士研究生, 主要从事中药新药药理学研究。

* 联系作者 Tel: (010) 66931625 Fax: (010) 68211656 E-mail: zhouwx@nic.bmi.ac.cn

(*Paeonia lactiflora* Pall.), 茯苓[*Poria cocos* (Schw.) Wolf], 白术(*Atractylodes macrocephala* Koidz.), 泽泻[*Alisma orientalis* (Sam.) Juzep.], 川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.), 购自北京普生霖药业公司, 并经生药学鉴定。按配方 3:16:8:4:4:8 取各味生药, 粉碎后用 5 倍 95% 乙醇加热回流提取 2 次, 过滤后合并 95% 乙醇提取液, 将乙醇提取液浓缩至无醇味; 药渣中加入 5 倍体积的水, 加热回流提取 2 次后过滤, 将 95% 乙醇提取液与水提液合并, 浓缩至每升 1 kg 生药, 得 DSS。DSS-A-N-30 的制备: 在完成制备工艺研究和优化后, 按制备工艺条件进行。上述配方取各味生药, 粉碎后用水煎煮 3 次, 每次 2 h。滤液合并后浓缩并进行大孔树脂柱层析分离, 依次以水和乙醇洗脱, 乙醇洗脱部位经浓缩, 冷冻干燥为 DSS-A-N-30。HPLC 分析表明, DSS-A-N-30 主要含白芍苷和芍药苷等苷类物质, 白芍苷和芍药苷含量占该部位的 $(40.03 \pm 3.21)\%$ 。实验时以蒸馏水做溶剂, 配成不同浓度的溶液。

PGF_{2α}, Sigma 公司; 氯化乙酰胆碱 (批号 060517), 北京化学试剂公司; 缩宫素 (催产素) 注射液 (10 IU, 1 mL, 批号 040912), 上海第一生化药业有限公司; 己烯雌酚 (diethylstilbestrol) 注射液 (2 mg, 1 mL, 批号 050401), 广州明兴制药有限公司。

SD 大鼠, 240 ~ 280 g, 雌性, 6 ~ 7 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXK(京)2002-0003。Medlab-U/4cs 生物信号采集处理系统, 南京美易科技有限公司; 肌肉张力换能器 (JZ101 型, 0 ~ 5 g), 北京新航兴业科贸有限公司; 恒温槽 (WC/09-05), 中国重庆银河试验仪器有限公司; 麦氏浴槽, 军事医学科学院实验仪器厂制造。

1.2 子宫平滑肌条的分离

SD 大鼠皮下注射己烯雌酚 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 以增加子宫平滑肌条对药物的敏感性。24 h 后将大鼠颈部脱臼处死, 迅速剖取子宫, 两个子宫角各取 2 cm 长的子宫段, 分别沿肌肉纹理纵向剖开, 得 2 cm 长的子宫肌条 4 段, 将其悬挂于充满洛氏液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 154, KCl 5.63, CaCl_2 2.55, NaHCO_3 1.79, 葡萄糖 5.55, pH 7.4) 的麦氏浴槽中, 一端固定在浴槽内 T 形钩上, 一端与肌肉张力换能器连接, 加前负荷 1.0 g, 恒温 37℃、饱和氧气孵育^[6-7]。肌肉张力换能器通过计算机软件 Medlab 生物信号采集处理系统 (版本号: V6.3.2) 记录肌条的收缩情况。

1.3 大鼠子宫平滑肌条自发性收缩的实验观察

子宫平滑肌条在洛氏液中平衡 50 min, 然后分别加入 DSS-A-N-30 (终浓度 141.5, 283 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 DSS (终浓度 $7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 观察此后 0 ~ 10 min, 10 ~ 20 min 及 20 ~ 30 min 内子宫平滑肌条收缩性的变化。溶剂对照组加入相应体积的溶剂。以药物处理前 10 min 内子宫平滑肌条收缩曲线下面积 (area under curve, AUC) 为 100%, 计算其余时间段的抑制率。

1.4 子宫收缩激动剂引起大鼠子宫平滑肌条剧烈收缩的实验观察

子宫平滑肌条在洛氏液中平衡 50 min, 接着加入缩宫素 (终浓度 $10 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$)、PGF_{2α} (终浓度 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 ACh (终浓度 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 引起子宫平滑肌条剧烈收缩, 待其收缩稳定后 (5 min 后), 记录此后 10 min 内子宫平滑肌条的收缩情况, 然后分别继续加入 DSS-A-N-30 (终浓度 141.5, 283 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 DSS (终浓度 $7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 观察并记录此后 5 ~ 15 min 内子宫平滑肌条收缩性的变化。溶剂对照组加入相应体积的溶剂。以子宫收缩激动剂致子宫平滑肌条剧烈收缩 5 ~ 15 min 内的平均收缩张力、收缩频率和 AUC 为 100%, 计算药物处理 15 min 内子宫平滑肌条的抑制率。

1.5 KCl 引起大鼠子宫平滑肌条强直收缩的实验观察

子宫平滑肌条在洛氏液中平衡 50 min, 接着加入 KCl (终浓度 $60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 待其引起子宫平滑肌条强直收缩 10 min 后, 分别加入 DSS-A-N-30 (终浓度 141.5, 283 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 DSS (终浓度 $7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 后, 观察并记录此后 0 ~ 10 min, 10 ~ 20 min 及 20 ~ 30 min 时间段内子宫平滑肌条收缩张力的变化。溶剂对照组加入相应体积的溶剂。以药物处理前 10 min 内 KCl 致子宫平滑肌强直收缩平均收缩张力为 100%, 计算药物处理各时间段内子宫平滑肌条的抑制率。

1.6 缩宫素在无钙平衡盐溶液中诱发大鼠子宫平滑肌条持续收缩的实验观察

子宫平滑肌条在任洛液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 154, KCl 5.63, CaCl_2 2.55, NaHCO_3 5.95, MgCl_2 2.1, 葡萄糖 5.55) 中平衡 1 h, 然后在无钙平衡盐溶液 ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$: NaCl 154, KCl 5.63, NaHCO_3 5.95, MgCl_2 2.1, 葡萄糖 5.55, EDTA 3, pH 7.4) 中孵育 50 min, 接着更换含 EDTA $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无钙平衡盐溶液, 加前负荷 1

g, 平衡 20 ~ 30 min, 加入催产素 (终浓度 $10 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$), 待其引起子宫平滑肌条稳定持续收缩后, 记录此后 10 min 内子宫平滑肌条收缩情况, 然后分别继续加入 DSS-A-N-30 (终浓度 141.5, 283 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 DSS (终浓度 $7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 观察并记录此后 0 ~ 5 min 内, 5 ~ 15 min 内子宫平滑肌条收缩张力的变化; 溶剂对照组加入相应体积的溶剂。以缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起子宫平滑肌条稳定持续收缩后 10 min 内平均收缩力为 100%, 计算各时间段内子宫平滑肌条的抑制率。

1.7 数据处理^[8-9]

以观察时间段内子宫平滑肌条的平均收缩张力、收缩频率和 AUC 计算抑制率, 抑制率 (%) = $(1 - \text{药物处理后效应} / \text{药物处理前效应}) \times 100\%$ 。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行单因素方差分析, 方差齐性数据用 SNK 检验, 方差不齐性数据用 Tamhane 检验比较各组间差异。

2 结果

2.1 DSS-A-N-30 对大鼠子宫平滑肌条自发性收缩的影响

观察药物处理前 10 min 内子宫平滑肌条的自发性收缩, AUC 为 $(493 \pm 154) \sim (679 \pm 250) \text{ g} \cdot \text{s}$, 收缩频率为 $(0.50 \pm 0.15) \sim (0.66 \pm 0.14) \text{ min}^{-1}$, 平均张力为 $(3.4 \pm 0.8) \sim (3.9 \pm 1.0) \text{ g}$ ($n = 6 \sim 9$), 如图 1 所示。

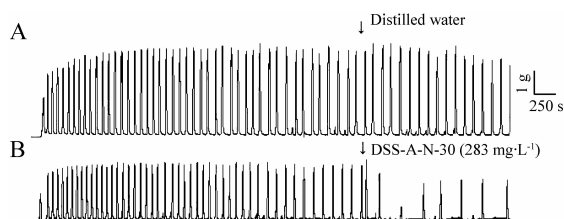


Fig 1. Polygraph tracings show representative uterine spontaneous contraction during exposure to (A) distilled water, and (B) $283 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DSS-A-N-30. DSS-A-N-30 is one of the extracted ingredients of Danggui Shaoyao San.

DSS-A-N-30 能明显抑制大鼠子宫平滑肌条的自发性收缩 (图 2)。处理 10 min 达最大药效, 283 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DSS-A-N-30 抑制 AUC 最高可达 40% 左右, 其后抑制作用有所减弱。DSS ($7140 \text{ mg} \cdot$

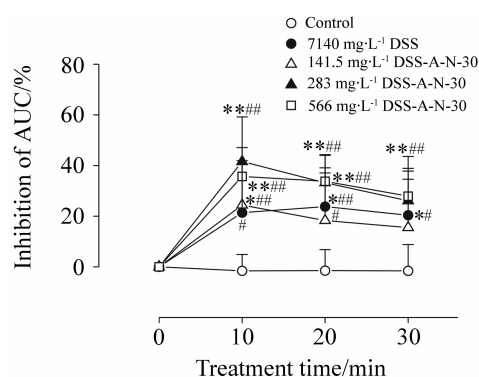


Fig 2. Effect of DSS-A-N-30 on spontaneous contraction of isolated rat uterine strips. Rat uterine strips were equilibrated in Locke's solution for 50 min, and then treated with DSS-A-N-30 or DSS for 30 min respectively. Spontaneous contraction was expressed as contracting area under curve (AUC) in every 10 min. Spontaneous contraction occurring over a 10-min period before adding drugs was taken as 100% [$(493 \pm 154) - (679 \pm 250) \text{ g} \cdot \text{s}$]. Inhibitory percent was calculated as $(1 - \text{effect after treatment} / \text{effect before treatment}) \times 100\%$, the same as Fig 3-5. $\bar{x} \pm s$, $n = 6 - 9$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with before treatment (0 min); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with control group at the corresponding time.

L^{-1}) 对子宫平滑肌条自发性收缩的抑制作用在 10 min 后基本达最大, 在 20 min 仅略有增强, 并维持到 30 min。上述结果提示, DSS-A-N-30 和 DSS 均能明显抑制大鼠子宫平滑肌条的自发性收缩。

2.2 DSS-A-N-30 对子宫收缩激动剂引起大鼠子宫平滑肌条剧烈收缩的影响

2.2.1 DSS-A-N-30 对缩宫素引起大鼠子宫平滑肌条剧烈收缩的影响

缩宫素引起子宫平滑肌条剧烈收缩 [AUC (977 ± 323) ~ (1102 ± 226) $\text{g} \cdot \text{s}$, 频率 $(0.83 \pm 0.15) \sim (0.93 \pm 0.21) \text{ min}^{-1}$, 平均张力 $(3.2 \pm 0.6) \sim (3.6 \pm 0.8) \text{ g}$]。图 3 结果表明, DSS-A-N-30 (141.5 , 283 和 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以显著抑制缩宫素引起的肌条收缩 AUC 增加和频率加快, 浓度为 $566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能同时抑制收缩张力的增加。DSS ($7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对缩宫素所致子宫平滑肌条 AUC 的增加、收缩频率的加快及收缩张力的增加均具有明显的抑制作用。结果提示, DSS-A-N-30 和 DSS 均能抑制缩宫素引起的大鼠离体子宫平滑肌条剧烈收缩。

2.2.2 DSS-A-N-30 对 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 引起大鼠子宫平滑肌条剧烈收缩的影响

$\text{PGF}_{2\alpha}$ 引起子宫平滑肌条剧烈收缩 [AUC ($897 \pm$

193) ~ (1220 ± 446) g · s, 频率 (1.06 ± 0.14) ~ (1.13 ± 0.20) min⁻¹, 平均张力 (3.5 ± 0.8) ~ (3.6 ± 0.7) g]。图 3 结果表明, DSS-A-N-30 (141.5, 283 和 566 mg · L⁻¹) 可以显著抑制 PGF_{2α} 所致肌条收缩 AUC 的增加, DSS-A-N-30 (283 和 566 mg · L⁻¹) 可以显著抑制收缩频率加快, 各浓度的 DSS-A-N-30 对 PGF_{2α} 所致收缩张力增加无明显作用。DSS (7140 mg · L⁻¹) 能显著抑制收缩频率的加快, 但对 AUC 和收缩张力的抑制无统计学显著意义的差异。结果提示, DSS-A-N-30 可以显著抑制 PGF_{2α} 引起的大鼠离体子宫平滑肌条剧烈收缩。

2.2.3 DSS-A-N-30 对 ACh 引起大鼠子宫平滑肌条剧烈收缩的影响

ACh 引起子宫平滑肌条剧烈收缩 [AUC (1179 ±

123) ~ (1549 ± 495) g · s, 频率 (1.04 ± 0.09) ~ (1.21 ± 0.36) min⁻¹, 平均张力 (3.7 ± 0.4) ~ (4.9 ± 1.3) g]。图 3 结果表明, DSS-A-N-30 (283 和 566 mg · L⁻¹) 可以显著抑制 ACh 引起肌条收缩 AUC 的增加, DSS-A-N-30 (283 mg · L⁻¹) 对肌条收缩张力的增加有显著抑制作用, 各浓度 DSS-A-N-30 对收缩频率的抑制均无统计学意义的差异。DSS (7140 mg · L⁻¹) 可以显著抑制 ACh 引起的子宫平滑肌条收缩 AUC 的增加、收缩频率的加快及收缩张力的增加。结果提示, DSS-A-N-30 和 DSS 均可显著抑制 ACh 引起的大鼠子宫平滑肌条的剧烈收缩。

2.3 DSS-A-N-30 对 KCl 致离体子宫平滑肌条强直收缩的影响

图 4 结果可见, KCl 引起子宫平滑肌条剧烈收缩

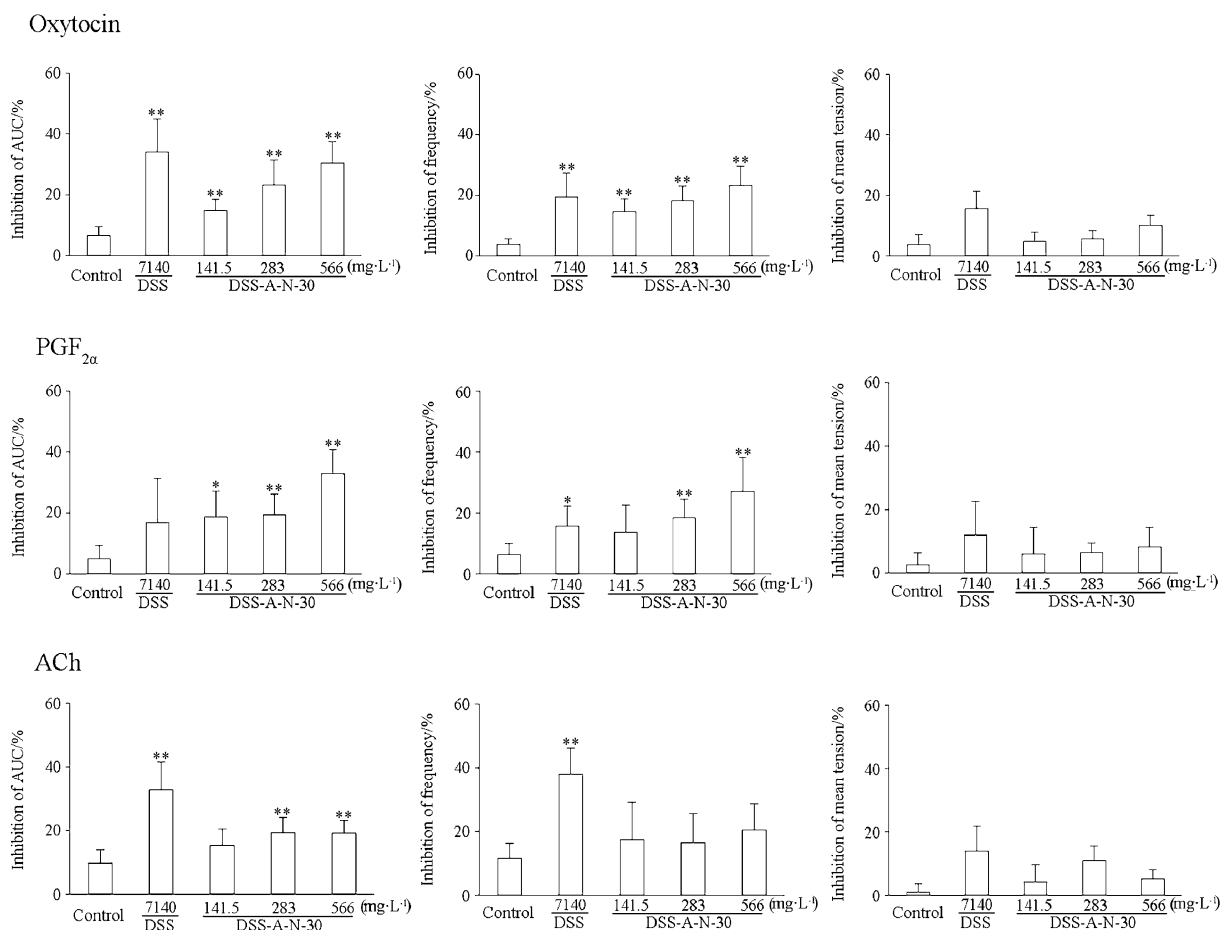


Fig 3. Effects of DSS-A-N-30 on oxytocin, prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) or acetylcholine (ACh)-induced contraction of isolated rat uterine strips. Rat uterine strips were equilibrated in Locke's solution for 50 min, then treated with oxytocin (10 IU · L⁻¹), PGF_{2α} (1 mg · L⁻¹) and ACh (10 μmol · L⁻¹) respectively for 15 min, and further treated with DSS-A-N-30 or DSS for 15 min in the presence of oxytocin, PGF_{2α} and ACh. $\bar{x} \pm s$, $n = 8 - 9$ (oxytocin, PGF_{2α}), $6 - 7$ (ACh). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group.

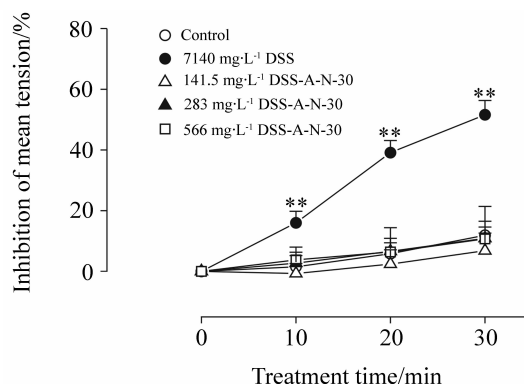


Fig 4. Effect of DSS-A-N-30 on KCl-induced contracting tension of isolated rat uterine strips. Rat uterine strips were equilibrated in Locke's solution for 50 min, and then treated with KCl ($60 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). DSS-A-N-30 or DSS was added respectively when prolonged contraction reached plateau. $\bar{x} \pm s$, $n = 6 - 7$. ** $P < 0.01$, compared with control group at the corresponding time.

[平均张力 (2.8 ± 0.8) ~ (3.5 ± 1.0) g]。DSS ($7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以显著缓解 KCl 引起的离体子宫平滑肌条的强直收缩, 随着时间的延长而作用增强, 处理 30 min 抑制率可达 50% 左右。而 DSS-A-N-30 ($141.5 \sim 566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 则无明显作用。结果提示, DSS 能明显缓解 KCl 致离体子宫平滑肌条强直收缩, 而 DSS-A-N-30 无明显作用。

2.4 DSS-A-N-30 对缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起子宫平滑肌条持续收缩的影响

缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起子宫平滑肌条持续收缩[平均张力 (0.58 ± 0.12) ~ (0.67 ± 0.12) g], 各浓度 DSS-A-N-30 处理 5 min 均显著抑制缩宫素引起的持续收缩(图 5)。高浓度 ($566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 15 min 与对照组比较仍有统计学意义。DSS $7140 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 5 min 和 15 min 对缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起的子宫平滑肌条持续收缩均具有明显抑制作用(图 5)。结果提示, DSS-A-N-30 和 DSS 可以抑制缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起的子宫平滑肌条持续收缩。

3 讨论

DSS 是《金匱要略》所载著名方剂, 偏重于止痛, 适用于妇人腹痛, 广泛用于治疗与妇科相关的多种疾病。在日本的一项临床双盲研究中发现^[10], DSS 对患有原发性痛经且辨证属阴证、虚、寒、瘀血

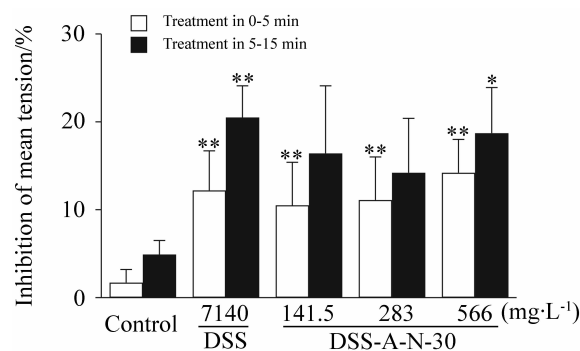


Fig 5. Effect of DSS-A-N-30 on oxytocin-induced contracting tension of isolated rat uterine strips in Ca^{2+} -free solution. Rat uterine strips were equilibrated in Ringer Locke's solution for 1 h, then incubated in Ca^{2+} -free solution containing $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA for 50 min, followed by Ca^{2+} -free solution containing $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA for another 20–30 min. After a sustained contractile response to oxytocin ($10 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$) was obtained, DSS-A-N-30 or DSS was added for 15 min respectively in the presence of oxytocin. Tensions of uterine strips were recorded from 0–5 min and 5–15 min after administration. Oxytocin-induced tension occurring over a 10-min period before adding drugs was taken as 100% [$(0.58 \pm 0.12) - (0.67 \pm 0.12) \text{ g}$]. $\bar{x} \pm s$, $n = 5 - 7$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group at the corresponding time.

的绝经期前妇女的镇痛作用优于安慰剂, 显示出良好的药效。近年来发现, DSS(当归: 芍药: 川芎: 茯苓: 白术: 泽泻 = 3: 4: 3: 4: 4: 4) 对经缩宫素、麦角新碱(ergonovine)、普萘洛尔(propranolol)、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、ACh 或 KCl 处理的离体子宫均具有缓解痉挛的作用, 且具有浓度依赖性^[4]。这种解痉作用一方面与临床研究的结果一致, 另一方面对其作用机制也有一定的提示作用。目前对 DSS 中的某些单味药或复方在这种解痉过程中的作用有少量研究, 如当归精油(含藁本内酯 $> 97\%$) 无论对正常未孕离体子宫还是对缩宫素、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 等处理的离体子宫, 都具有缓解痉挛的作用^[11]; 当归水提液对缩宫素引起的离体小鼠子宫的收缩频率和收缩幅度均有显著抑制作用, 而芍药和香附的水提液则对收缩频率的抑制作用较明显, 且芍药和香附分别与当归配伍后, 这种对收缩频率的抑制作用增强, 其中芍药与当归的配伍对收缩频率的抑制作用更强^[12]; 复方芎归散(当归、川芎两味药组成)总提取物可使大鼠在体子宫平滑肌的收缩力和活动度减少^[13]; 泽泻的提取物泽泻醇能抑制高浓度 KCl 引起的血管收缩, 其抑制作用可能与其拮抗电压依赖性钙通道有关^[14]。以上研究提示, DSS 的六味药可能对子宫平滑肌的收缩均具有抑制

作用,因此对 DSS 全方加以提取并进行研究,有可能开发出活性好且质量可控的新型痛经治疗药物。DSS-A-N-30 即是本研究所提取 DSS 全方的部位中开发前景比较好的活性部位之一。

痛经患者子宫内膜及经血中前列腺素较正常妇女显著偏高^[1],体内过高 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 是原发性痛经的主要发病原因;缩宫素不仅直接作用于子宫平滑肌引起子宫收缩,而且同时刺激子宫内膜释放前列腺素,两者协同作用引起子宫收缩,原发性痛经患者体内过高的缩宫素可能是导致痛经的原因之一^[15];ACh 作用于平滑肌细胞可以引起平滑肌剧烈收缩。本研究结果表明,DSS-A-N-30 可以显著抑制 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、缩宫素和 ACh 引起的子宫平滑肌条剧烈收缩,尤其对收缩频率加快的抑制作用较强。这与华永庆等^[12]的研究结果一致,故推测芍药苷和白芍苷可能是 DSS-A-N-30 的有效成分之一。

缩宫素、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、ACh 均可作用于平滑肌细胞上各自的受体引起细胞内钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 升高,而细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加可能是引起子宫平滑肌收缩的直接原因。细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加有细胞外 Ca^{2+} 内流和细胞内质网钙库释放两种途径。KCl 可引起细胞膜去极化导致电压依赖性钙通道开放,细胞外 Ca^{2+} 内流,最终引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,因此可建立 KCl 致子宫平滑肌强直收缩的模型来考察药物对细胞外钙内流所致平滑肌收缩的影响。缩宫素与其受体结合,激活磷脂酶 C-三磷酸肌醇 (IP_3) 和二酯酰甘油-蛋白激酶 C (PKC) 系统^[16]。PKC 引起细胞膜上的钙通道开放,细胞外 Ca^{2+} 内流入细胞内; IP_3 被释放入细胞质,与钙库上的受体结合引起细胞内钙库释放,这两种途径同时引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,导致子宫平滑肌收缩。当平滑肌处于无钙环境中时,缩宫素诱导细胞内钙库释放引起细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。因此,通过缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起离体子宫平滑肌条持续收缩的模型可考察药物对细胞内钙库释放所致平滑肌收缩的影响。本研究应用这两种模型进行实验,结果发现,DSS 可以缓解由 KCl 引起的大鼠离体子宫平滑肌条强直收缩,而 DSS-A-N-30 无明显作用,提示 DSS 可以阻断细胞外 Ca^{2+} 内流,而 DSS-A-N-30 对细胞外 Ca^{2+} 内流无明显影响。DSS-A-N-30 和 DSS 均可显著抑制缩宫素在无钙平衡盐溶液中引起的子宫平滑肌条持续收缩,提示二者均能抑制细胞内钙库释放引起的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。本实验数据提示,DSS-A-N-30 主要

通过抑制细胞内钙库释放而松弛子宫平滑肌;DSS 既能抑制细胞外 Ca^{2+} 内流,又能抑制细胞内钙库释放而松弛子宫平滑肌。这一结果与文献报道^[4](DSS 能够抑制细胞外 Ca^{2+} 内流,而对细胞内钙库释放无明显作用)有所不同,这可能是 DSS 各味药的配比及实验中所用浓度不同所致。

由以上研究结果可见,DSS-A-N-30 对离体子宫平滑肌的自发性收缩及多种子宫收缩促进剂所致离体子宫平滑肌的收缩均具有抑制作用,是 DSS 治疗痛经的活性部位,有望开发成为质量可控的新型痛经治疗中药。

致谢 感谢军事医学科学院放射医学研究所赵振虎老师及香港理工大学钱忠明教授在离体子宫平滑肌实验方法学上给予的指导与帮助。

4 参考文献:

- [1] Lundström V, Gréen K. Endogenous levels of prostaglandin F₂alpha and its main metabolites in plasma and endometrium of normal and dysmenorrheic women[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1978, **130**(6):640-646.
- [2] Akerlund M. Involvement of oxytocin and vasopressin in the pathophysiology of preterm labor and primary dysmenorrhea[J]. *Prog Brain Res*, 2002, **139**:359-365.
- [3] Xie CG, Wang XH. Effect of Dang-gui-shao-yao-san on the concentration of prostaglandin f₂alpha and blood rheology in patients of dysmenorrhea[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*(中国中西医结合杂志), 1990, **10**(7):410-412.
- [4] Hsu CS, Yang JK, Yang LL. Effect of "Dang-Qui-Shao-Yao-San", a Chinese medicinal prescription for dysmenorrhea on uterus contractility *in vitro*[J]. *Phyto-medicine*, 2006, **13**(1-2):94-100.
- [5] Wu J, Sun DH, Yang HF, Min JL. Experimental study on pharmacological effect of Danggui Shaoyao Granules[J]. *Chin Pharm*(中国药师), 2005, **8**(9):711-713.
- [6] Xu SY, Bian RJ, Chen X. *Methodology of Pharmacological Experiments*(药理实验方法学)[M]//3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 1584-1585.
- [7] Adebisi A, Ganesan Adaikan P, Prasad RN. Tocolytic and toxic activity of papaya seed extract on isolated rat uterus[J]. *Life Sci*, 2003, **74**(5):581-592.
- [8] Moustafa AM, El-Sayed EM, Badary OA, Mansour

- AM, Hamada FM. Effect of bromocriptine on uterine contractility in near-term pregnant rats[J]. *Pharmacol Res*, 1999, **39**(2):89-95.
- [9] Keskil Z, Bayram M, Ercan ZS, Turker RK. The contribution of nitric oxide and endothelins to angiotensin. II. Evoked responses in the rat isolated uterus smooth muscle[J]. *Gen Pharmacol*, 1999, **33**(4):307-312.
- [10] Kotani N, Oyama T, Sakai I, Hashimoto H, Muraoka M, Ogawa Y, *et al.* Analgesic effect of a herbal medicine for treatment of primary dysmenorrhea - a double-blind study[J]. *Am J Chin Med*, 1997, **25**(2):205-212.
- [11] Du J, Bai B, Kuang X, Yu Y, Wang C, Ke Y, *et al.* Ligustilide inhibits spontaneous and agonists- or K^+ depolarization-induced contraction of rat uterus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, **108**(1):54-58.
- [12] Hua YQ, Hong M, Li X, Yu L, Sun XY. Influence of dang gui, shao yao, xiang fu and their compatibility to isolated mouse's uterus model of dysmenorrhea [J]. *Zhejiang J Tradit Chin Med* (浙江中医杂志), 2003, **38**(1):26-27.
- [13] Shen X, Zong GZ, Li DF, He W. Experimental studies on effect of Fufang Xiongguai Powder on uterine spasm *in vivo* and hemorheology in rats [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2004, **10**(8):22-23.
- [14] Matsuda H, Kobayashi G, Yamahara J, Fujimura H, Kurahashi K, Fujiwara M. Effects of alismol isolated from *Rhizoma Alismatis* on calcium-induced contraction in the rabbit thoracic aorta [J]. *Life Sci*, 1987, **41**(15):1845-1852.
- [15] Deng HX, Zhu NS, Wang CW, Cen HX, Xu YZ. Effect of Jiawei Mojie tablet on plasma oxytocin level in patients with primary dysmenorrhea in menstrual period [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2003, **23**(5):354-356.
- [16] Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction [J]. *Physiol Rev*, 1996, **76**(4):967-1003.

Effect of DSS-A-N-30, an active ingredient of Danggui Shaoyao San, on contractility of rat uterine smooth muscle *in vitro*

LIU Guo-Yun^{1,2}, CHI Xiao-Li¹, MA Yuan¹, ZHOU Wen-Xia^{1*}, SHANG Wei-Wei¹,
QIAO Shan-Yi¹, ZHANG Yong-Xiang¹, LIU Chao²

(1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;
2. Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: **AIM** To observe the effect of DSS-A-N-30, the extracted ingredient of Danggui Shaoyao San, on rat uterine smooth muscle contractility *in vitro*, and to analyze its possible physiological mechanism. **METHODS** The isolated rat uterine strips were made and the effect of DSS-A-N-30 on spontaneous uterine contraction, and uterine contraction induced by agonists, K^+ -depolarization and oxytocin in Ca^{2+} -free solution was observed. **RESULTS** DSS-A-N-30 ($141.5, 283, 566 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibited the spontaneous uterine contraction, and the intense contraction induced by three agonists ($10 \text{ IU} \cdot \text{L}^{-1}$ oxytocin, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ prostaglandin $F_{2\alpha}$, and $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ acetylcholine). The contraction induced by K^+ -depolarization was not inhibited by DSS-A-N-30, but sustained con-

tractile induced by oxytocin in Ca^{2+} -free solution could be inhibited by DSS-A-N-30.

CONCLUSION DSS-A-N-30 directly inhibits the uterine contraction, mainly by inhibiting the release of Ca^{2+} from intracellular stores to relax uterine smooth muscle. These findings clearly show that DSS-A-N-30 is one of the active ingredients of Danggui Shaoyao San and has the potential to be developed into an effective drug for the treatment of primary dysmenorrhea.

Key words: Danggui Shaoyao San; active ingredient; uterine contraction

Foundation item: The project supported by National Basic Research Program of China(2004CB518907)

* Corresponding author.

(本文编辑 董立春)