

川芎中总生物碱、总酚酸和总挥发油对大鼠离体子宫平滑肌收缩活动的抑制作用[△]

刘娟^{1,2*}, 蒲忠慧¹, 彭成^{1,2#}, 张鑫^{1,2}, 李文兵³, 戴鸥^{1,2}(1.成都中医药大学药学院/教育部中药材标准化重点实验室/中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; 2.成都中医药大学西南特色药材创新药物成分研究所, 成都 611137; 3.四川新绿色药业科技发展股份有限公司, 四川彭州 610031)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)05-0621-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.05.11

摘要 目的:考察川芎中总生物碱、总酚酸和总挥发油对大鼠离体子宫平滑肌收缩活动的抑制作用,为阐明川芎活血调经的传统功效提供依据。方法:取大鼠离体子宫平滑肌浸泡于洛氏液中,以二甲基亚砜为空白对照、盐酸维拉帕米为阳性对照,采用PowerLab生理记录仪记录子宫平滑肌收缩曲线,通过观察收缩活动力、收缩张力变化来评价川芎中总生物碱、总酚酸(质量浓度分别为0.025、0.05、0.1 mg/mL)和总挥发油(0.04、0.08、0.16 mg/mL)对缩宫素致大鼠离体子宫平滑肌收缩的抑制作用,并计算子宫平滑肌收缩活动力抑制率和收缩张力抑制率。结果:加入缩宫素后大鼠离体子宫平滑肌的收缩活动力、收缩张力较加入缩宫素前均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),不同质量浓度3类川芎组分均可显著降低子宫平滑肌的收缩活动力、收缩张力($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与空白对照比较,除0.025 mg/mL总酚酸外,给予其余浓度药物或组分后子宫平滑肌的收缩活动力抑制率和收缩张力抑制率均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:川芎中总生物碱、总酚酸和总挥发油对缩宫素致大鼠离体子宫平滑肌收缩均有一定的抑制作用,这为川芎活血调经的用法提供了参考依据。

关键词 川芎;总生物碱;总酚酸;总挥发油;离体子宫;大鼠;平滑肌收缩

Inhibition Effect of Total Alkaloid, Total Phenolic Acid and Total Volatile Oil from *Ligusticum chuanxiong* on the Contraction of Isolated Uterine Smooth Muscle of Rats

LIU Juan^{1,2}, PU Zhonghui¹, PENG Cheng^{1,2}, ZHANG Xin^{1,2}, LI Wenbing³, DAI Ou^{1,2}(1.College of Pharmacy, Chengdu University of TCM/Key Lab of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education/State Key Lab Breeding Base of Systematic R&D and Utilization of Chinese Medicine Resource, Chengdu 611137, China; 2.Institute of Innovative Medicine Ingredients of Southwest Specialty Medicinal Materials, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 3.Sichuan Neo-Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Sichuan Pengzhou 610031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibition effect of total alkaloid, total phenolic acid and total volatile oil from *Ligusticum chuanxiong* on the contraction of the isolated uterine smooth muscle of rats, and to provide reference for clarifying the promoting blood circulation to restore menstrual flow traditional efficacy of *L. chuanxiong*. METHODS: The isolated uterine smooth muscle of rats were collected and soaked in Locke's solution. Using dimethyl sulfoxide as blank control, verapamil hydrochloride as positive control, the contraction curves of the isolated uterine smooth muscle in rats were recorded with PowerLab electrophysiograph. Inhibitory effects of total alkaloid, total phenolic acid (mass concentrations of 0.025, 0.05, 0.1 mg/mL) and total volatile oil (0.04, 0.08, 0.16 mg/mL) on the contraction of the isolated uterine smooth muscle of rats induced by oxytocin were evaluated by observing the changes of contraction activity and contraction tension. Inhibitory rates of contraction activity and contraction tension of uterine smooth muscle were calculated. RESULTS: The contraction activity and contraction tension of uterine smooth muscle in rats were increased significantly after treated with oxytocin ($P<0.05$ or $P<0.01$). Different concentrations of 3 types of compounds from *L. chuanxiong* all decreased contraction activity and contraction tension of uterine smooth muscle significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with blank control, except for 0.025 mg/mL total phenolic acid, the inhibitory rates of contraction activity and contraction tension of uterine smooth muscle were all decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$) after treated with other concentration drugs or components. CONCLUSIONS: The total alkaloid, total phenolic acid and total volatile oil from *L. chuanxiong* show certain inhibitory effect on the contraction of isolated uterine smooth muscle in rats, which provide

△ 基金项目:四川省科技支撑计划项目(No.2015SZ0031)

* 博士研究生。研究方向:中药药效物质基础。电话:028-61800231。E-mail:liuj02022@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:中药药理与毒理。电话:028-61800018。E-mail:pengchengchengdu@126.com

reference for promoting blood circulation to restore menstrual flow use of *L. chuanxiong*.

KEYWORDS *Ligusticum chuanxiong*; Total alkaloids; Total phenolic acid; Total volatile oil; Isolated uterine; Rat; Contraction of smooth muscle

川芎为伞形科藁本属多年生草本植物,首载于《神农本草经》。有文献中记载:川芎上行头角、助清阳之气,止痛;下行血海,养新生之血调经^[1],广泛用于各种瘀血阻滞之病症。中医临床用于治疗各种血瘀症之妇科疾病的复方芎归散、经前三剂止痛方、四物汤、少腹逐瘀汤、香附四物汤等经典方剂均含川芎这味重要中药。现代临床也将川芎作为活血调经之品,多以川芎复方治疗原发性痛经^[2],且主要通过抑制子宫平滑肌兴奋来缓解子宫强烈收缩所致的痛经。药理研究表明,川芎对子宫平滑肌收缩活动的影响的研究报道主要有川芎提取物^[3]和川芎复方提取物^[4],而关于川芎不同组分以及川芎单体成分影响子宫平滑肌收缩的研究报道相对较少。就组分而言,目前仅发现川芎挥发油对小鼠离体子宫平滑肌收缩有一定的抑制作用^[5],川芎总生物碱^[6]和川芎总酚酸^[7-9]作为川芎的有效活性成分群,二者对子宫平滑肌收缩活动的影响研究尚未见报道。川芎在临床上常以水煎剂入药,用于活血调经,而川芎生物碱和川芎总酚酸作为川芎中的大极性成分,是否在活血调经中发挥着重要作用,值得深入研究。因此,本研究采用课题组前期优化的提取工艺,从川芎药材中提取富集总生物碱、总酚酸和总挥发油这3类组分,利用大鼠离体子宫平滑肌收缩模型评价其对离体子宫收缩活动的影响,以期为川芎应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

PowerLab 多功能生理记录仪、恒温水浴槽和 Lab-chart Pro 专业版软件[澳大利亚埃德仪器国际贸易(上海)有限公司];FA2004B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司);DZKW-S-4 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

1.2 药材、药品与试剂

川芎饮片由四川新绿色药业科技发展股份有限公司提供,经成都中医药大学药学院李敏教授鉴定为伞形科多年生草本植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎,标本现存于成都中医药大学中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地(标本号:LC-20150910);缩宫素注射液(安徽宏业药业有限公司,批号:140347,规格:10 u/mL,使用时用生理盐水配成1 u/mL);戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司,批号:309A,规格:1 mg/片,使用时用纯水配成0.8 mg/mL);盐酸维拉帕米(四川省食品药品检验检测院,批号:100223-200102,规格:50 mg/支,用纯水配成 1×10^{-3} mol/L的母液);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康成年未孕SD大鼠20只,普通级,♀,体质量220~250 g,由成都达硕实验动物有限公司提供[动物生产许可证号:SCXK(川)2015-030]。

2 方法

2.1 川芎不同组分的制备

2.1.1 川芎总生物碱的制备 称取川芎药材15 kg,粉碎,按照实验室前期优化的提取工艺制备川芎总生物碱^[10-11],获得0.75 kg的川芎总生物碱浸膏,采用酸性染料比色法测定川芎总生物碱含量,测得每g浸膏含137.28 mg总生物碱。临用前用二甲亚砜(DMSO)配成0.1 g/mL(以浸膏计,下同)。

2.1.2 川芎总酚酸的制备 称取川芎药材100 g,粉碎,加13倍量65%的乙醇超声提取2次,每次55 min,过滤,滤液浓缩蒸干。残渣加氨水充分溶解,滤过,滤液用浓盐酸调pH为2~3,再用乙酸乙酯萃取3次,合并乙酸乙酯萃取液,浓缩蒸干,共获得4.63 g总酚酸浸膏,采用高效液相色谱法测定川芎总酚酸含量,测得每g浸膏含43.46 mg总酚酸。临用前用DMSO配成0.1 g/mL。

2.1.3 川芎总挥发油的制备 称取川芎药材1 kg,粉碎,以8倍量蒸馏水浸泡过夜,按照常规水蒸气蒸馏提取法提取10 h,收集挥发油,以无水硫酸钠除水后,得到川芎总挥发油3.65 g。临用前用DMSO配成0.1 g/mL。

2.2 正常大鼠离体子宫平滑肌肌条的制备

实验前2 d取大鼠,每天按8 mg/kg灌胃戊酸雌二醇溶液,复制动情期大鼠模型^[12]。于实验第3 d,颈椎脱臼处死大鼠并迅速剖取子宫,置于盛有洛氏液(取NaCl 9.2 g、KCl 0.42 g、CaCl₂ 0.24 g、NaHCO₃ 0.15 g、葡萄糖1.0 g,用生理盐水制备成1 000 mL的溶液,即得)的玻璃皿中,轻轻剥离子宫上附有的结缔组织和脂肪组织,然后取中间段子宫平滑肌2~3 cm。

2.3 川芎3类组分对缩宫素致大鼠离体子宫收缩活动的影响

将肌条一端固定于盛有洛氏液20 mL的浴槽中,另一端连接张力换能器,负重为1 g,保持浴槽中的营养液温度为 (37 ± 0.5) °C,并通以95% O₂+5% CO₂的混合气体,速度为1~2个小气泡/s^[13],用PowerLab多功能生理记录仪记录子宫收缩曲线。待子宫收缩曲线稳定30 min后,加入1 u/mL缩宫素160 μL复制子宫平滑肌收缩模型。10 min后,分别给予川芎总生物碱、总酚酸(终质量浓度均分别为0.025、0.05、0.1 mg/mL)以及总挥发油(终质量浓度分别为0.04、0.08、0.16 mg/mL),并以DMSO为空白对照, 5×10^{-7} mol/L盐酸维拉帕米为阳性对照,均按照等体积给药。给药后,观察离体子宫平滑肌的收缩张力(即张力平均值)和收缩活动力(即收缩张力×收缩频率,其中收缩频率为10 min内子宫平滑肌的收缩次数)的变化,记录给药后10 min内子宫平滑肌的收缩曲线,并计算给药后的子宫平滑肌收缩张力抑制率和收缩活动力抑制率[(给药前数值-给药后数值)/给药前数值×100%]。试验重复6次。

2.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,加入缩宫素前后及给药前后的比较采用配对 t 检验;空白对照和给药后指标变化的比较采用单因素方差分析和独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 子宫收缩张力的测定结果

与造模前比较,造模后子宫平滑肌的收缩张力显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与造模后比较,加入DMSO后子宫平滑肌的收缩张力有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);加入盐酸维拉帕米和川芎3类组分后子宫平滑肌的收缩张力均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),结果见表1。

表1 大鼠离体子宫平滑肌收缩张力的变化($\bar{x} \pm s, n = 6, g$)

Tab 1 Changes of contraction tension of isolated uterine smooth muscle in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6, g$)

样品	浓度	造模前	造模后	给药后
DMSO		2.04 ± 0.48	2.80 ± 0.41*	2.62 ± 0.35
盐酸维拉帕米	5 × 10 ⁻⁷ mol/L	2.56 ± 0.24	6.61 ± 0.55**	1.78 ± 0.11 ^{###}
总生物碱	0.1 mg/mL	3.17 ± 0.48	4.44 ± 0.42**	2.30 ± 0.37 ^{##}
	0.05 mg/mL	3.60 ± 0.25	5.02 ± 0.23**	2.43 ± 0.38 ^{##}
	0.025 mg/mL	2.22 ± 0.36	3.84 ± 0.27**	2.74 ± 0.33 [#]
总酚酸	0.1 mg/mL	2.88 ± 0.43	4.09 ± 0.53*	1.90 ± 0.30 ^{###}
	0.05 mg/mL	3.34 ± 0.58	5.45 ± 0.54**	3.31 ± 0.51 ^{##}
	0.025 mg/mL	2.51 ± 0.44	4.17 ± 0.41*	3.24 ± 0.36 [#]
总挥发油	0.16 mg/mL	3.08 ± 0.44	4.38 ± 0.41*	1.32 ± 0.31 ^{###}
	0.08 mg/mL	3.09 ± 0.30	4.32 ± 0.31*	1.53 ± 0.23 ^{##}
	0.04 mg/mL	3.11 ± 0.32	4.10 ± 0.14*	2.30 ± 0.30 ^{##}

注:与造模前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与造模后比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. before molding, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. after molding, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

3.2 子宫平滑肌收缩活动力的测定结果

与造模前比较,造模后子宫平滑肌的收缩活动力显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与造模后比较,加入DMSO后子宫平滑肌收缩活动张力有降低趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);给予盐酸维拉帕米和不同质量浓度3类川芎组分后,子宫平滑肌的收缩活动力均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。子宫平滑肌收缩曲线见图1,收缩活动力测定结果见表2。

3.3 子宫平滑肌收缩张力抑制率和收缩活动力抑制率测定结果

DMSO对缩宫素致大鼠离体子宫平滑肌收缩活动的影响不大,无显著抑制作用。与DMSO比较,加入盐酸维拉帕米和川芎3类组分后子宫平滑肌的收缩张力抑制率和收缩活动力抑制率均不同程度升高,除0.025 mg/mL总生物碱和0.025 mg/mL总酚酸外差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但是川芎3类组分的作用均不及盐酸维拉帕米,结果见表3。

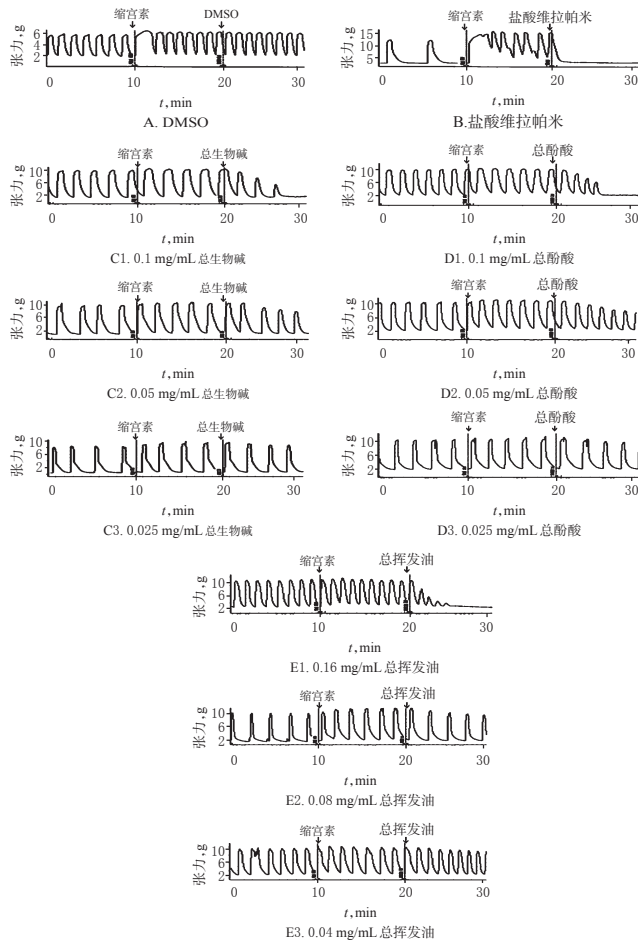


图1 大鼠离体子宫收缩曲线图

Fig 1 The contraction curves of isolated uterine in rats

表2 大鼠离体子宫平滑肌收缩活动力的变化($\bar{x} \pm s, n = 6, g \times \text{次}/10 \text{ min}$)

Tab 2 Changes of contraction activity of isolated uterine smooth muscle in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6, g \times \text{times}/10 \text{ min}$)

样品	浓度	造模前	造模后	给药后
DMSO		10.70 ± 3.07	17.85 ± 2.43*	15.09 ± 1.93
盐酸维拉帕米	5 × 10 ⁻⁷ mol/L	11.58 ± 3.60	47.64 ± 2.63**	5.66 ± 1.65 ^{###}
总生物碱	0.1 mg/mL	19.17 ± 3.87	28.79 ± 4.02*	13.62 ± 3.89 ^{##}
	0.05 mg/mL	23.52 ± 2.89	37.54 ± 2.64**	16.24 ± 3.15 ^{##}
	0.025 mg/mL	12.29 ± 3.45	26.83 ± 3.19**	16.78 ± 3.76 [#]
总酚酸	0.1 mg/mL	16.13 ± 3.75	25.55 ± 4.84*	10.30 ± 2.91 ^{##}
	0.05 mg/mL	17.52 ± 4.78	34.57 ± 4.17**	19.92 ± 4.45 ^{##}
	0.025 mg/mL	15.39 ± 4.94	30.03 ± 4.67*	21.14 ± 4.41 [#]
总挥发油	0.16 mg/mL	20.81 ± 5.24	31.51 ± 5.01	4.53 ± 2.07 ^{###}
	0.08 mg/mL	22.20 ± 3.63	33.59 ± 2.10*	9.27 ± 2.83 ^{##}
	0.04 mg/mL	18.79 ± 3.61	28.12 ± 4.30*	14.85 ± 2.34 [#]

注:与造模前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与造模后比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. before molding, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. after molding, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

4 讨论

本研究探究了川芎3类主要药效组分总生物碱、总

表3 大鼠离体子宫平滑肌收缩张力抑制率、收缩活动力抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

Tab 3 Determination result of inhibitory rate of contraction tension and contraction activity of isolated uterine smooth muscle in rats ($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

样品	浓度	收缩张力抑制率	收缩活动力抑制率
DMSO		4.74 ± 5.98	13.74 ± 11.71
盐酸维拉帕米	5 × 10 ⁻⁷ mol/L	75.77 ± 3.61**	92.90 ± 2.54**
总生物碱	0.1 mg/mL	49.41 ± 5.23**	57.18 ± 10.22**
	0.05 mg/mL	51.92 ± 5.99**	58.23 ± 4.94**
	0.025 mg/mL	28.18 ± 8.42**	36.81 ± 11.79
总酚酸	0.1 mg/mL	52.34 ± 6.12**	58.26 ± 10.08**
	0.05 mg/mL	41.20 ± 4.99**	45.65 ± 10.14*
	0.025 mg/mL	22.09 ± 6.52	31.07 ± 10.07
总挥发油	0.16 mg/mL	71.63 ± 5.40**	84.07 ± 9.27**
	0.08 mg/mL	64.94 ± 4.84**	73.42 ± 6.45**
	0.04 mg/mL	42.59 ± 9.60**	41.22 ± 12.20*

注:与DMSO比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. DMSO, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

酚酸以及总挥发油对缩宫素致大鼠离体子宫平滑肌收缩活动的影响。本研究中川芎总挥发油给药浓度的设置主要参照文献[14];而川芎总生物碱和总酚酸则主要参考预试验结果:0.2 mg/mL川芎总生物碱和总酚酸对子宫平滑肌的抑制作用太强,经洛氏液冲洗3次后子宫平滑肌无法恢复活力,而0.1、0.05、0.025 mg/mL的川芎总生物碱与总酚酸对子宫平滑肌收缩的抑制率可达30%~60%。本研究结果表明,在选择的质量浓度范围内,川芎总挥发油对子宫平滑肌收缩具有显著的抑制作用,且呈浓度依赖性,该结果与文献报道一致^[6];而川芎总生物碱和总酚酸对子宫平滑肌收缩活动同样均具有显著抑制作用,当给药质量浓度在0.1 mg/mL时,两者对子宫平滑肌收缩活动的抑制作用相当,而在0.05、0.025 mg/mL时,前者对子宫平滑肌收缩活动的抑制作用优于后者。

川芎总挥发油是川芎研究报道较多的一类组分,也是最主要的药效组分,临床应用及现代药理研究均证实了其具有镇痛镇静、改善血管功能等活性^[15-16],而针对川芎非挥发性组分(生物碱和酚酸类成分)的研究相对较少。除挥发油外,川芎传统入药方式常以水煎剂入药,为进一步明确其药效,本研究发现川芎总生物碱和总酚酸对缩宫素致大鼠离体子宫收缩活动同样具有显著的抑制作用,该研究结果为进一步证实川芎活血调经之传统功效提供了参考资料。但是,不同组分对大鼠离体子宫平滑肌的作用机制以及药效物质基础还有待进一步深入研究。

参考文献

[1] 刘丽宁.谈中药经典方剂应用中的动力药[J].辽宁中医药大学学报,2009,11(9):28-29.

[2] 方玲,朱新冰,祝诚诚,等.经前三剂止痛方治疗原发性痛经的机制研究[J].中草药,2010,41(4):615-617.

[3] 宁其娟,黄金花,邓世富,等.川芎提取液对小白鼠离体子宫平滑肌收缩性能的影响[J].中国医药导报,2009,6(17):19-20.

[4] 陈芳,朱敏,唐于平.川芎白芍及配伍对离体小鼠子宫痛经模型的影响[J].时珍国医国药,2011,22(7):1557-1558.

[5] 宿树兰,华永庆,段金廛,等.当归-川芎挥发性成分与其抗子宫痉挛活性相关性分析[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(2):64-67.

[6] 刘絮,姜秀文,王立英,等.川芎生物碱对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J].北华大学学报(自然科学版),2016,17(3):339-343.

[7] SAULNIER L, MAROT C, ELGORRIAGA M, et al. Thermal and enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran[J]. *Carbohydr Polym*, 2001, 45(3):269-275.

[8] 顾俊菲,封亮,袁嘉瑞,等.赤芍总苷、川芎总酚酸组分组成结构对缺氧损伤人脐静脉内皮细胞的影响[J].中国中药杂志,2015,40(5):920-926.

[9] BARONE E, CALABRESE V, MANCUSO C. Ferulic acid and its therapeutic potential as a hormetin for age-related diseases[J]. *Biogerontology*, 2009, 10(2):97-108.

[10] 蒲忠慧,苏海国,王力,等.正交试验法优选川芎总生物碱的提取工艺[J].成都中医药大学学报,2017,40(2):20-24.

[11] 蒲忠慧,王力,高宇,等.大孔吸附树脂纯化富集川芎总生物碱的工艺[J].食品研究与开发,2017,38(11):85-90.

[12] 代良萍,谢晓芳,孙晨,等.益母草注射液生物碱单体配伍对离体子宫收缩活动的影响[J].天然产物研究与开发,2016,28(10):1633-1638.

[13] 袁凤娟,孙玉华,哈木拉提·哈斯木,等.神香草不同洗脱物对豚鼠离体气管平滑肌收缩的影响[J].中国药房,2017,28(13):1790-1793.

[14] 刘琳娜,梅其炳,尚磊,等.当归精油对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响[J].中成药,2004,26(4):308-311.

[15] 杜旌畅,谢晓芳,熊亮,等.川芎挥发油的化学成分与药理活性研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(23):4328-4333.

[16] 刘露丝,岳美颖,李文兵,等.当归油与川芎油的化学成分及其对急性化学性脑损伤保护作用差异研究[J].中药药理与临床,2016,32(6):105-108.

(收稿日期:2017-08-25 修回日期:2018-01-08)

(编辑:林 静)