

· 药理 ·

## 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

朱敏<sup>1</sup>, 段金廛<sup>1\*</sup>, 唐于平<sup>1</sup>, 华永庆<sup>1</sup>, 宿树兰<sup>1</sup>, 陈芳<sup>1,2</sup>

(1. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046; 2. 贵阳中医学院药学系, 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 研究四物汤及其组方药对、药味对原发性痛经模型小鼠的影响, 探讨其组方特点及可能作用机制。方法: 采用小鼠原发性痛经模型, 观察各给药组对原发性痛经模型小鼠的扭体反应以及子宫组织匀浆中钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )、一氧化氮(NO)水平的影响。结果: 四物汤组方药对、药味能不同程度地减少痛经模型小鼠的扭体反应次数, 降低子宫组织中 $\text{Ca}^{2+}$ 含量, 提高NO水平。结论: 四物汤及其拆方对小鼠原发性痛经模型的干预作用各有特点, 其中熟地对其他3味药在抑制整体动物模型的扭体反应上可能具有拮抗作用, 当归-白芍药对可能是抑制小鼠原发性痛经模型的主要贡献药对, 为进一步深入研究提供了参考。

[关键词] 四物汤; 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(2010)18-0109-04

## Study on Influence of Siwu Decoction and its Composite Drug-pairs or Drugs on Primary Dysmenorrheal Model of Mouse

ZHU Min<sup>1</sup>, DUAN Jin-ao<sup>1\*</sup>, TANG Yu-ping<sup>1</sup>, HUA Yong-qing<sup>1</sup>, SU Shu-lan<sup>1</sup>, CHEN Fang<sup>1,2</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Guiyang college of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the influence of Siwu decoction and its composite drug-pairs or drugs on the primary dysmenorrheal model of mouse so as to clarify the potential mechanism and compatible regularity of Siwu decoction. **Method:** The model of primary dysmenorrheal mice were used to investigate the effect of Siwu decoction on the writhing response and the levels of nitric oxide and calcium ion in mice uterine tissue. **Result:** Siwu decoction and its composite drug-pairs and drugs had certain pharmacological effect on primary dysmenorrheal by reducing the writhing times, increasing nitric oxide (NO) levels and reducing calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) concentration in uterine tissue of mice. **Conclusion:** Siwu decoction and its composite drug-pairs and drugs exhibited characteristic influence on the primary dysmenorrheal model of mouse. The drug of Rehmanniae Radix Praeparata might have the antagonistic effect to Chuanxiong Rhizoma, Angelica Sinensis Radix and Paeoniae Radix Alba on the activity of reducing the model mice's writhing times. The drug-pair of Angelica Sinensis Radix and Paeoniae Radix Alba may be the most significant drug-pair for the treatment effect on the model of primary dysmenorrheal mice. This study provided a reliable reference for the follow-up study.

**[Key words]** Siwu decoction; primary dysmenorrheal; nitric oxide; calcium ion

[收稿日期] 20100710(006)

[基金项目] 国家自然科学基金(30873235); 江苏省自然科学基金(BK2008455); 江苏省高校自然科学重大基础研究项目(06KJA36022, 07KJA36024, 10KJA36024); 国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-09-0163); 江苏高等学校优秀科技创新团队支持计划(2009年度)

[通讯作者] \* 段金廛, Tel/fax: 025-85811116, E-mail: dja@njutcm.edu.cn.

原发性痛经属中医“经行腹痛”范畴,最早记载于《金匱要略·妇人杂病脉证并治》:“带下经水不利,少腹满痛”。据 1980 年的抽样调查,我国痛经发病率为 33.19%,其中原发性痛经占 30.06%,严重影响工作者占 13.55%。

中医认为原发性痛经的证型主要有气滞血瘀、寒凝血瘀、肝郁气滞、肝肾亏损、气血虚弱几种,其治法以理血行滞、温经散寒、疏肝解郁、补益肝肾、益气养血、调经止痛为主,治疗药物依据证型和治法的不同加以选择,在分析中医古方治疗痛经的大量方剂组成药味的基础上,总结出使用频次较高的药味为当归、川芎、白芍、香附、熟地黄<sup>[1]</sup>,妇科经方四物汤即是由当归、川芎、白芍、熟地黄 4 味药组成,传统治疗痛经的代表方剂中,如治疗血虚血瘀证痛经的桃红四物汤,治疗气滞血瘀证痛经的香附四物汤,治疗寒凝血瘀证痛经的少腹逐瘀汤,以及治疗湿热瘀阻痛经的芩连四物汤等均是四物汤加减化裁而来。

现代医学认为痛经是由于子宫平滑肌痉挛性收缩,导致组织缺血而引起的,而引起子宫平滑肌收缩的原因现多认为与前列腺素(PG)、加压素(AVP)、催产素(OT)、雌二醇(E<sub>2</sub>)、孕酮(P)以及一氧化氮(NO)、钙离子(Ca<sup>2+</sup>)等相关,西医对于此病大多采用非甾体类抗炎药,尤其是 NO 供体型非甾体类抗炎药以及 Ca<sup>2+</sup> 阻滞剂和激素治疗来减轻患者的疼痛症状<sup>[2]</sup>。由于胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流和 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<sup>2+</sup> 和 NO 与痛经的发生有着重要关系,本课题组围绕四物汤及其类方治疗妇科血瘀证痛经的物质基础及配伍规律进行了大量的实验研究,前期研究表明四物汤及其类方水提液及醇沉上清液对原发性痛经模型小鼠有不同程度的镇痛作用<sup>[3]</sup>,本研究从小鼠原发性痛经模型的扭体反应和子宫组织中 Ca<sup>2+</sup> 和 NO 水平几个指标入手,评价基本方四物汤及其组方药对、药味对此模型的干预作用,以期为四物汤的配伍规律与作用机制的阐明及四物汤类方治疗妇科血瘀证痛经的共性和各异性特点的综合分析提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级雌性未孕 ICR 小鼠,体重 18~22 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(沪) 2007-0005。

**1.2 药材** 当归药材为伞形科植物当归 *Angelica*

*sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,来源于甘肃岷县当归 GAP 种植基地;川芎药材为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎,来源于四川彭州川芎 GAP 种植基地;熟地黄药材为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的加工炮制品,购自南京市药材公司;白芍药材为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根,购自南京市药材公司。以上药材均经南京中医药大学段金廛教授鉴定。

**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 0907161);缩宫素注射液(上海第一生化药业有限公司,批号 090512);塞来昔布胶囊(辉瑞制药有限公司,批号 BK081004);钙测定及一氧化氮测定试剂盒(分别采用甲基百里香酚蓝比色法和硝酸还原酶法,南京建成生物工程研究所,批号 20091108);Power Wave 340 酶标仪(Bio-TEK,美国)。

## 2 方法

**2.1 药材的提取** 分别称取当归(G)、川芎(X)、白芍(S)、熟地黄(D)各 200 g,当归-川芎(GX)、当归-熟地黄(GD)、当归-白芍(GS)、白芍-熟地黄(SD)、白芍-川芎(SX)、川芎-熟地黄(XD)各 400 g (200 g × 2),当归-川芎-白芍-熟地黄(SW) 800 g (200 g × 4),以上共 11 组药材,分别用 10 倍及 8 倍量水提 2 次,合并 2 次提取液,减压浓缩到与原生药质量 1:1 (g/mL) 的体积量。

**2.2 药物剂量的选择** 按四物汤的人临床用量 36 g·d<sup>-1</sup> (1:1:1),组方药味分别用 9 g·d<sup>-1</sup>,组方药对分别用 18 g·d<sup>-1</sup>,依据体表面积和得率折算小鼠每日给药剂量,按 20 mL·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 给药。

**2.3 造模、分组及给药** SPF 级 ICR 雌性小鼠 140 只,体重 18~22 g,随机分为正常组、模型组、阳性组及 G, X, S, D, GX, GD, GS, SD, SX, XD, SW 共 14 组,每组 10 只,除正常组外,以雌激素和缩宫素联合复制原发性痛经模型<sup>[4-5]</sup>,以 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> 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,阳性组给予塞来昔布(西乐葆) 41.1 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,其他各组给药,给药体积均为 20 mL·kg<sup>-1</sup>,连续给药 4 d,第 4 天给药 30 min 后,ip 缩宫素 10 mL·kg<sup>-1</sup>,同时开始记录 ip 缩宫素后 30 min 内各组小鼠扭体次数。

扭体发生率 = 扭体动物数 / 组内动物总数;扭体抑制率 = (1 - 给药组扭体次数 / 模型化扭体次数) × 100%

30 min 后,脱颈处死,解剖取子宫,匀浆后检测

子宫组织匀浆中  $\text{Ca}^{2+}$  及 NO 含量(按试剂盒操作说明书进行)。

**2.4 数据处理** 各组数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用统计学 SPSS16.0 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** 由表 1 可见,单味药 G, X, D, S, 药对 GX, GS, SD 组的扭体反应次数均与模型组有明显差异,从扭体反应抑制率来看,组方单味药中, G, X, S 的抑制作用明显强于 D; 组方药对中, GS, GX, SX 药对抑制作用较强,其中 GS 药对能显著降低痛经模型小鼠扭体次数 ( $P < 0.001$ )。

表 1 四物汤组方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	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	扭体反应 /次	扭体 抑制率/%	扭体 发生率/%
模型	-	30.2 ± 4.6	-	100
塞来昔布	0.04	8.1 ± 6.1 <sup>3)</sup>	73.1	70
G	1.17	11.2 ± 6.6 <sup>2)</sup>	62.9	70
X	1.17	12.3 ± 3.3 <sup>2)</sup>	59.2	80
D	1.17	26.8 ± 9.7	11.3	90
S	1.17	12.9 ± 9.3 <sup>2)</sup>	57.3	80
GX	2.34	17.2 ± 5.7 <sup>1)</sup>	43.0	70
GD	2.34	20.8 ± 7.5 <sup>1)</sup>	31.3	80
GS	2.34	10.2 ± 8.4 <sup>3)</sup>	66.3	80
SD	2.34	21.3 ± 7.4 <sup>1)</sup>	29.6	80
SX	2.34	18.2 ± 11.2 <sup>1)</sup>	39.9	80
XD	2.34	24.6 ± 5.2	18.8	90
SW	4.68	20.4 ± 7.8 <sup>1)</sup>	32.7	70

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ 。

**3.2 对原发性痛经模型小鼠子宫匀浆中  $\text{Ca}^{2+}$  和 NO 含量的影响** 由图 1 可见,组方单味药中, G, X, S 给药组子宫匀浆中  $\text{Ca}^{2+}$  含量均低于 D; 组方药对中 GS, SD 给药组  $\text{Ca}^{2+}$  含量均低于其组成单味药 G, S 和 S, D, 显示了药对配伍的优越性; SW 原方给药后模型小鼠子宫匀浆中  $\text{Ca}^{2+}$  含量最低,显示四药配伍后能协同降低模型小鼠子宫组织中  $\text{Ca}^{2+}$  含量。与模型组相比, GX, GS, SD 药对能显著提高痛经模型小鼠子宫匀浆中 NO 水平 ( $P < 0.001$ )。组方单味药中, D 组 NO 含量低于 G, X 和 S 组; 组方药对中, GS, GX, XD 药对给药组小鼠子宫匀浆中 NO 水平均

高于其组成单味药。

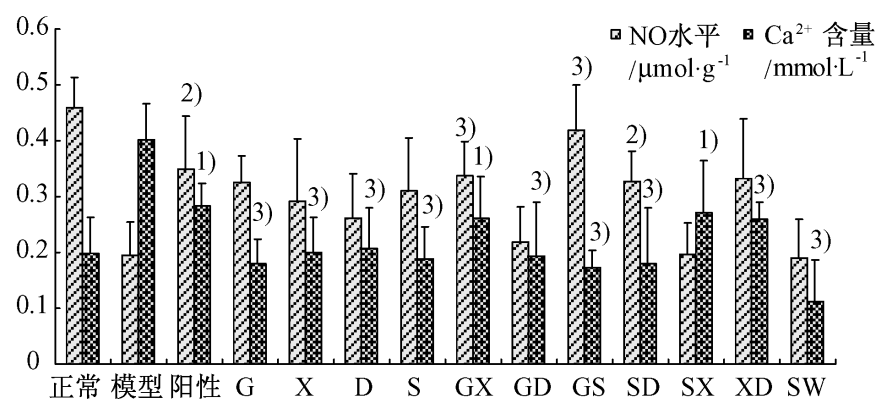


图 1 四物汤及其组方对原发性痛经模型小鼠子宫匀浆中  $\text{Ca}^{2+}$  和 NO 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  
与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$ 。

### 4 讨论

四物汤组方药味中,川芎,活血行气,祛风止痛;当归,补血活血,调经止痛;熟地,补血滋阴,益精填髓;白芍,养血调经,平肝止痛,其中川芎、当归、白芍均有止痛的功效。现代研究也表明,当归油类及粗多糖类成分能显著抑制催产素所致痛经小鼠扭体反应,升高子宫组织中 NO 水平,降低钙离子水平<sup>[6-7]</sup>,当归中的水溶性成分具有较强的镇痛作用<sup>[8]</sup>;川芎中的川芎可阻止心肌细胞核  $\text{Ca}^{2+}$  的异常内流,川芎哌有明显的镇痛作用<sup>[9]</sup>;白芍的不同炮制品均可增加小鼠痛阈值,抑制醋酸所致扭体反应,具有良好的镇痛作用<sup>[10]</sup>。从本研究结果来看,在原发性痛经模型小鼠的扭体反应、子宫匀浆  $\text{Ca}^{2+}$ , NO 水平指标上,当归、川芎、白芍这 3 味药均显示有较显著的活性,并都优于单味药熟地黄,对原发性痛经模型小鼠有不同程度的镇痛作用,这与其传统功效及已有研究结果是相符的,其作用机制可能与调节子宫组织中  $\text{Ca}^{2+}$ , NO 水平有关。

四物汤组方药对对小鼠原发性痛经模型有不同程度的抑制作用,在整体动物模型的扭体反应上,当归-白芍、当归-川芎、白芍-川芎 3 个药对的扭体反应抑制率明显高于含熟地的 3 个药对当归-熟地黄、白芍-熟地黄、川芎-熟地黄,由此说明当归、川芎、白芍 3 味药不仅单独用药时有显著的镇痛作用,两两配伍使用时仍具有显著活性,配伍药味熟地黄后,以上 3 味药对原发性痛经整体动物模型的抑制作用均有不同程度的降低,在该药效水平上,作者推测熟地黄对其他药味可能具有一定的拮抗作用,其可能的作用机制及配伍前后成分组成变化值得进一步研究。值得关注的是,当归-白芍药对在整体动物扭体反应以及  $\text{Ca}^{2+}$  和 NO 水平 3 个指标中都显示出较其他药对显著的活性,并优于其组方单味药当归和白芍,结

果提示,当归-白芍药对可能是抑制该病症模型的主要贡献药对,当归和白芍配伍有协同增效的作用,并且其作用机制可能主要与影响子宫组织中  $\text{Ca}^{2+}$  和 NO 水平有关。

从本研究结果看,四物汤及其组方药对在所研究的 3 个指标(扭体反应抑制率、 $\text{Ca}^{2+}$ , NO 水平)上并不都表现出优于单味药的作用,在某些指标上甚至不及单味药,各给药组对整体动物模型扭体反应的抑制作用与调节子宫组织中  $\text{Ca}^{2+}$  和 NO 水平功能的强弱趋势也不完全相同,这与中药多组分多靶点的作用特点及其配伍规律的复杂性是相关的,原发性痛经的发病机制较复杂,对病症模型的疗效亦是多方面作用的综合反映,本文仅探讨了对痛经模型小鼠扭体反应次数及对子宫匀浆中  $\text{Ca}^{2+}$ , NO 含量的影响,后续研究还需要基于原发性痛经的病理机制,从其他途径与角度研究四物汤及其组方药对与药味对该病症的干预作用,结合配伍后成分组成变化特点,综合评价其组方特点和作用机制,为进一步阐明四物汤的配伍规律和作用机制提供依据,为综合评价四物汤类方治疗妇科血瘀证痛经的共性和各异性特点提供参考。

#### [参考文献]

[1] 宿树兰, 尚尔鑫, 叶亮, 等. 治疗痛经方药的关联规

则分析[J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24(6): 383.

- [2] 华永庆, 洪敏, 朱荃. 原发性痛经研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(1): 62.
- [3] 张畅斌, 陆茵, 段金廛, 等. 四物汤及其加减方对痛经模型小鼠干预作用的研究[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(6): 459.
- [4] 孙海燕, 曹永孝, 刘静, 等. 小鼠痛经模型的建立[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(2): 233.
- [5] 华永庆, 段金廛, 朱荃, 等. 缩宫素诱导的小鼠离体痛经模型的实验方法研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(4): 489.
- [6] 王小荣, 邱明丰, 谢国祥, 等. 当归油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, 2006, 17(5): 723.
- [7] 乐江, 彭仁, 孔锐, 等. 当归粗多糖镇痛作用的实验研究[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(10): 746.
- [8] 杨瑜, 查仲玲, 朱蕙, 等. 当归提取物的镇痛作用[J]. 医学导报, 2002, 21(8): 48.
- [9] 夏腊梅, 伍杰雄. 川芎 对心肌细胞核钙转运功能异常的保护[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2002, 7(2): 124.
- [10] 刘皈阳, 闫旭, 李外, 等. 白芍不同炮制品中芍药苷含量及镇痛作用[J]. 解放军药学学报, 2005, 21(3): 167.

[责任编辑 聂淑琴]

#### 更正

中西医结合治疗小儿支气管哮喘体会 一文(刊载于中国实验方剂学杂志 2010 年 9 月第 16 卷第 11 期 226 页)作者姓名误写为吕艳芒,应为吕艳芬,特此更正,并向作者致歉。