

复方金铃四逆四物失笑散治疗实验性原发性痛经的作用机制研究

李倩^{1△} 谢萍² 白春霞³ 崔静宜¹ 蒋川³ 吴玉珊¹

摘要 目的 观察临床经验方复方金铃四逆四物失笑散(FFSXF)对原发性痛经模型大鼠子宫的前列腺素和外周血中 β -内啡肽(β -EP)的作用,探讨其治疗痛经的作用机制。**方法** 采用苯甲酸雌二醇联合缩宫素制备大鼠原发性痛经模型,以消炎痛、月月舒作对照药,根据 FFSXF 临床常用剂量,由人与大鼠体重换算后每天分别予 FFSXF 低、中、高剂量组 2.5、5.0、10 g/kg 浓度的 FFSXF 混悬液灌胃,采用 ELISA 对照考察药物对子宫组织前列腺素 E_2 (PGE_2)、前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$)的变化,放射免疫法观察药物对其外周血液中的 β -EP 含量的影响。**结果** 与模型组比较,FFSXF 高、中、低剂量组 PGE_2 含量显著上升($P < 0.01$), $PGF_{2\alpha}$ 含量显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);FFSXF 高、中剂量组 β -EP 含量显著上升($P < 0.01$)。**结论** FFSXF 能有效调节原发性痛经模型大鼠子宫组织中前列腺素水平,同时提高外周血液中的 β -EP 水平,增强内源性镇痛作用,可能是其治疗原发性痛经的作用机制。

关键词 复方金铃四逆四物失笑散;原发性痛经;前列腺素; β -内啡肽

Mechanisms of Fufang Shixiao Formula for Experimental Primary Dysmenorrhea LI Qian¹, XIE Ping², BAI Chun-xia³, CUI Jing-yi¹, JIANG Chuan³, and WU Yu-shan¹ 1 School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075); 2 Department of Gynecology, Teaching Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610072); 3 School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu (610075)

ABSTRACT Objective To observe the roles of Fufang Shixiao Formula (FFSXF) in regulating prostaglandin E_2 (PGE_2), prostaglandin F_2 alpha ($PGF_{2\alpha}$), and β -endorphin peptide (β -EP) in rats with primary dysmenorrhea, and to explore its mechanisms for treating primary dysmenorrhea. **Methods** Primary dysmenorrheal rat model was induced by Estradiol Benzoate combined oxytocin. Indomethacin and Yueyueshu were used as the controls. 2.5, 5.0, and 10.0 g/kg FFSXF (clinical commonly used dose of FFSXF calculated by converting human weight to rat weight) suspensions were administered to rats in low, middle, high dose FFSXF groups, respectively. Changes of PGE_2 and $PGF_{2\alpha}$ in uterus tissue were observed by ELISA. Its effect on β -EP in peripheral blood was observed by radioimmunoassay. **Results** Compared with the model group, PGE_2 content significantly increased ($P < 0.01$), and $PGF_{2\alpha}$ content significantly decreased in the 3 FFSXF groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and β -EP content significantly increased ($P < 0.01$) in middle and high dose FFSXF groups. **Conclusion** FFSXF could effectively regulate prostaglandin level in uterus tissue of primary dysmenorrheal model rats, elevate β -EP content in peripheral blood, strengthen endogenous analgesic effects, which might be its mechanisms for treating primary dysmenorrhea.

KEYWORDS Fufang Shixiao Formula; primary dysmenorrhea; prostaglandin; β -endorphin peptide

痛经是一种导致育龄妇女不孕的常见病,据大型

流行病学研究结果估计,超过女性人口一半的人患有痛经^[1]。痛经是指月经期和月经前后出现的周期性小腹疼痛,可放射至腰骶部、大腿内侧及肛门周围,甚则剧痛难忍、恶心呕吐、晕厥,剧痛时可发生虚脱,分为原发性和继发性两大类。原发性痛经是指无盆腔器质性病变的痛经,占痛经的 90%。其发病率较高,且与女性不孕症有着十分密切的关系。复方金铃四逆四物失笑散(FFSXF)在成都中医药大学

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81373680);四川省科技厅资助项目(No. 2013JY0109)

作者单位:1. 成都中医药大学临床医学院(成都 610075);2. 成都中医药大学附属医院妇科(成都 610072);3. 成都中医药大学药学院(成都 610075)

通讯作者:谢萍, Tel: 028-81906642, E-mail: fpx2410@126.com

△现在四川省内江医科学校(四川 641000)

DOI: 10. 7661/CJIM. 2016. 09. 1087

附属医院妇科临床广泛用于治疗原发性痛经,且取得较好的临床效果^[2]。本研究观察 FFSXF 对实验性原发性痛经模型大鼠的子宫组织中前列腺素和周围血 β -内啡肽(β -EP)水平的影响,探讨其治疗原发性痛经的作用机制,为临床上更好地运用该方提供实验依据,现报告如下。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 SPF 级、健康 SD 大鼠 56 只,成熟雌性且未孕,体重 180 ~ 220 g,由四川成都达硕生物科技有限公司提供,动物合格许可证号:SCXK(川)2013-24。动物饲养在取得实验动物开放系统使用许可证的成都中医药大学附属医院药理实验室中。实验前所有动物在实验室中正常饲养一周,以适应环境。

1.2 药物 FFSXF 由川楝子、延胡索、柴胡、白芍、枳壳、当归、熟地黄、川芎、五灵脂、蒲黄、甘草组成,药材均购自成都中医药大学附属医院。FFSXF 药液由成都中医药大学附属医院制剂科参照制定的工艺流程制备并提供,每毫升含生药 1 g。

月月舒痛经宝颗粒[组成:当归、红花、肉桂、三棱、莪术、丹参、五灵脂、木香、延胡索(醋制),10 g/袋,批号 131003,河南省宛西制药股份有限公司];消炎痛片(25 mg/片,批号:713001,重庆科瑞制药有限公司);苯甲酸雌二醇注射液(2 mL:4 mg,批号:0140207,宁波市三生药业有限公司);缩宫素注射液(1 mL:10 U,批号:140416,安徽宏业药业有限公司);0.9%生理盐水(500 mL:4.5 g,批号:B13110101,四川科伦药业)。

1.3 试剂及仪器 前列腺素 $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ELISA 试剂盒(批号:140523);前列腺素 E_2 (PGE_2) ELISA 试剂盒(批号:140523); β -EP 放射免疫分析药盒(批号:140720),均购自北京北方生物技术研究所。电子天平(HZT-A+200 型,福州华志科学仪器有限公司);光学显微镜(Olympus CH30 型,北京城夕科技有限公司);低速离心机(SC-2546 型,安徽中科中佳科技仪器有限公司);漩涡混合器(XH-B 型,江苏康健医疗用品有限公司);医用低温冰箱[MDF-382E(CN)型,大连三洋冷链有限公司]; γ 放射免疫计数器(GC-100 型,科大创新股份有限公司中佳分公司)。

2 方法

2.1 原发性痛经模型制备及给药方法 参照参考文献[3],将 56 只大鼠根据体重随机分为 7 组,分别为正常空白组、模型对照组、消炎痛组、月月舒组、FFSXF 低剂量组、FFSXF 中剂量组、FFSXF 高剂量

组。除正常空白组外,其余各组根据参考文献[3]方法,大鼠每天皮下注射苯甲酸雌二醇(E_2)注射液,连续注射 10 天(第 1、10 天每只大鼠皮下给药 0.5 mg,余日均为每只 0.2 mg),末次注射后间隔 24 h,腹腔注射缩宫素 0.2 mL/只,观察缩宫素注射后 30 min 内大鼠扭体反应发生的潜伏期和扭体次数,计算扭体抑制率。根据扭体反应结果,若模型对照组与正常空白组比较有统计学意义($P < 0.05$),则原发性痛经模型复制成功。

FFSXF 低、中、高剂量组在注射苯甲酸雌二醇的第 5 天起每天分别给予 FFSXF 2.5、5、10 g/kg 灌胃,消炎痛组自第 5 天起每天每只大鼠灌胃消炎痛片混悬液 3.75 mg/kg,月月舒组自第 5 天起每天每只大鼠灌胃月月舒混悬液 2 g/kg,正常空白组、模型对照组自第 5 天起灌胃等体积纯净水,各组均连续灌胃 7 天。给药容量均为 2 mL/200 g 体重。

2.2 子宫组织 $PGF_{2\alpha}$ 、 PGE_2 、 β -EP 含量测定 制备大鼠痛经模型并给予药物干预后,于末次灌胃 1 h 后,各组大鼠均腹腔注射缩宫素注射液 0.2 mL/只。给予缩宫素 1 h 后,大鼠腹腔注射 25%乌拉坦 4 mL/kg,股动脉取血 2 mL,迅速注入抗凝试管(含 7.5% EDTA 二钠 30 μ L 和抑肽酶 40 μ L)中,低温(4 $^{\circ}$ C)3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆,严格按照 β -EP 放免分析药盒说明书操作,测定血浆中 β -EP 的含量。取血后,快速剥离动物新鲜子宫,放入生理盐水中冲洗,吸干,用电子天平精密称取 0.2 g,加 10 倍量生理盐水制成子宫内膜组织匀浆液,37 $^{\circ}$ C 保温 15 min,低温(4 $^{\circ}$ C)3 000 r/min 离心 10 min,取上清即可。

2.3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据先行正态性及方差齐性检验,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠扭体潜伏期、扭体次数及扭体抑制率比较(表 1) 与正常空白组比较,模型对照组潜伏期时间明显缩短($P < 0.01$),扭体次数明显增加($P < 0.01$),说明本实验原发性痛经模型造模成功。与模型对照组比较,消炎痛组、月月舒组及 FFSXF 高、中剂量组的扭体潜伏期均缩短($P < 0.01$),扭体次数均明显减少($P < 0.01$);FFSXF 低剂量组扭体潜伏期差异无统计学意义,扭体次数差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠的扭体潜伏期、扭体次数及扭体抑制率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量[g/(kg·d)]	扭体潜伏期(s)	扭体次数(次)	扭体抑制率(%)
正常空白	8	—	27.25 ± 7.78	0.13 ± 0.35	—
模型对照	8	—	6.25 ± 3.11 *	21.25 ± 6.09 *	—
消炎痛	8	3.75	15.50 ± 4.24 $\Delta\Delta$	8.75 ± 6.89 $\Delta\Delta$	58.82
月月舒	8	2.00	16.38 ± 4.69 $\Delta\Delta$	6.88 ± 3.85 $\Delta\Delta$	70.59
FFSXF 低剂量	8	2.50	9.63 ± 3.54	13.38 ± 6.21 Δ	37.04
中剂量	8	5.00	13.88 ± 3.76 $\Delta\Delta$	10.25 ± 4.85 $\Delta\Delta$	55.29
高剂量	8	10.00	14.63 ± 5.07 $\Delta\Delta$	4.38 ± 2.97 $\Delta\Delta$	79.39

注:与正常空白组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组大鼠子宫组织中 PGF_{2 α} 、PGE₂ 含量及 PGF_{2 α} /PGE₂ 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量[g/(kg·d)]	PGF _{2α} (ng/L)	PGE ₂ (ng/L)	PGF _{2α} /PGE ₂
正常空白	8	—	56.97 ± 1.65	85.42 ± 7.25	0.67 ± 0.15
模型对照	8	—	79.25 ± 10.12 *	71.86 ± 10.02 *	1.12 ± 0.20
消炎痛	8	3.75	55.03 ± 5.70 $\Delta\Delta$	81.38 ± 9.19 Δ	0.69 ± 0.12
月月舒	8	2.00	63.77 ± 8.58 $\Delta\Delta$	82.35 ± 5.87 $\Delta\Delta$	0.78 ± 0.12
FFSXF 低剂量	8	2.50	64.55 ± 4.57 $\Delta\Delta$	79.46 ± 4.73 Δ	0.81 ± 0.05
中剂量	8	5.00	57.35 ± 5.27 $\Delta\Delta$	83.32 ± 5.28 $\Delta\Delta$	0.69 ± 0.09
高剂量	8	10.00	50.60 ± 6.26 $\Delta\Delta$	84.80 ± 8.78 $\Delta\Delta$	0.61 ± 0.12

注:与正常空白组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠子宫组织中 PGF_{2 α} 、PGE₂ 含量及 PGF_{2 α} /PGE₂ 比较(表 2) 与正常空白组比较,模型对照组大鼠子宫组织 PGF_{2 α} 含量明显升高,PGE₂ 含量明显降低($P < 0.01$);与模型对照组比较,消炎痛组、月月舒组大鼠子宫组织 PGF_{2 α} 含量均明显降低,FFSXF 低、中、高剂量组亦均不同程度地降低子宫组织 PGF_{2 α} 水平($P < 0.01$);与模型对照组比较,FFSXF 高、中剂量组及月月舒组大鼠子宫组织中 PGE₂ 含量均明显升高($P < 0.01$),消炎痛组、FFSXF 低剂量组亦有所升高($P < 0.05$)。

3 各组大鼠子宫组织中 β -EP 含量比较(表 3) 与正常空白组比较,模型对照组 β -EP 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型对照组比较,消炎痛组、月月舒组、FFSXF 中、高剂量组 β -EP 含量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);FFSXF 低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠子宫组织中 β -EP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β -EP (ng/L)
正常空白	8	1 838.88 ± 286.02
模型对照	8	1 491.49 ± 294.84 *
消炎痛	8	1 936.06 ± 330.38 $\Delta\Delta$
月月舒	8	1 887.05 ± 316.68 Δ
FFSXF 低剂量	8	1 691.69 ± 181.31
中剂量	8	2 093.36 ± 167.02 $\Delta\Delta$
高剂量	8	2 278.67 ± 461.45 $\Delta\Delta$

注:与正常空白组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

原发性痛经已经成为困扰青少年女孩和育龄期女性的一种普遍的妇科疾病。Park KS 等^[4]研究表明,中草药被认为是有效治疗原发性痛经的值得深入挖掘的资源。我院妇科临床常用方复方金铃四逆四物失笑散是由多个古代经方化裁而成,具有疏肝健脾,养血活血,柔肝理气,化瘀止痛等功效,于月经来潮前 7 天开始服药,连服 3 个月经周期,均能有效预防痛经的发生或有效减轻疼痛的程度,已取得了良好的临床疗效。因此,有必要对其治疗原发性痛经的作用机制进行探讨。

目前现代医学已公认前列腺素(PG)和白细胞介素(IL)增高是原发性痛经的主要发病机制。而原发性痛经的发生可能与过多的或不平衡的前列腺素和类花生酸从月经期间子宫内膜释放,增加周围神经敏感性而诱发疼痛有关^[5,6]。

Dawood MY^[7]研究表明,原发性痛经是产生或释放过多的前列腺素引起的不正常的子宫活动。PG 产量的增加,可引起血管收缩,子宫基层和子宫内膜血流不足^[8]。Coco AS^[9]研究显示,迅速合成的 PG 直接影响子宫基层,引起子宫肌肉组织收缩,导致子宫内膜小血管收缩,组织缺血,子宫内膜脱落、出血,进而引起疼痛。目前研究较多,并与生殖系统密切相关的前列腺素主要是 PGE₂ 和 PGF_{2 α} ,子宫内膜分泌 PG 呈周期性变化,在黄体期 PGE₂ 的含量比 PGF_{2 α} 高,而月经期则相反^[10,11]。

杨继红等^[12]研究报告示,痛经中学生月经来潮

48 h 内外周血中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的浓度明显高于月经来潮 ≥ 48 h 组及无痛经组,且痛经症状与 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的浓度密切相关。李亚洲等^[13] 研究报道也证实,痛经患者子宫内膜及经血中 PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的浓度显著高于正常妇女,经血中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 的水平与疼痛程度呈正相关。同时, PGE_2 与 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 对非妊娠子宫的作用差异明显, $\text{PGF}_{2\alpha}$ 使子宫平滑肌收缩,子宫血流量减低,而 PGE_2 则能抑制子宫平滑肌的自发活动。因此,调节 $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ 的比值含量,在一定程度上可以预防原发性痛经的发生。

本次实验结果表明,FFSXF 高、中、低剂量组都能有效降低 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量,提高 PGE_2 含量,同时降低 $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ 比值,抑制子宫过度收缩,扩张血管,增加子宫血流量,可能是其治疗原发性痛经的重要机制之一。

β -EP 来自前阿黑皮素系统,主要分布在垂体、下丘脑的弓状核、孤束核和联合核,具有吗啡样活性,起镇痛及维持神经内分泌环境的相对稳定等作用。

近年来,许多学者发现 β -EP 与女性生殖内分泌(如月经、排卵、妊娠、分娩、不孕、更年期等)有关,并进行了临床和实验室观察,为进一步认识 β -EP 的生理功能及其临床意义提供了新的信息。

李煜等^[14] 通过观察韩氏穴位神经刺激仪(HANS)预刺激对缩宫素致痛经大鼠的镇痛作用,结果发现 HANS 能提高痛经大鼠中枢及外周血 β -EP 的含量,延长痛经大鼠的扭体潜伏期及减少扭体次数,对痛经大鼠有镇痛作用。

刘冬等^[15] 观察以桃红四物汤治疗原发性痛经的小鼠模型,结果表明桃红四物汤有明显的镇痛作用,可能与提高内源性镇痛物质 β -EP 含量有关。明海霞等^[16] 观察温经活血颗粒对痛经模型大鼠血浆 β -EP 含量影响,结果表明提高血浆 β -EP 含量和抑制离体子宫收缩活动可能是其对原发性痛经模型大鼠镇痛作用机制之一。

综上所述,FFSXF 能降低大鼠原发性痛经模型子宫组织 $\text{PGF}_{2\alpha}$,提高 PGE_2 ,调节 $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ 比值,同时提高外周血中的 β -EP 含量,增加其内源性镇痛作用,可能是 FFSXF 治疗原发性痛经的作用机制。

参 考 文 献

[1] Mrugacz G, Grygoruk C, Sieczyński P, et al. Etiopathogenesis of dysmenorrhea [J]. Med Wieku Rozwoj, 2013, 17(1): 85-89.

- [2] 冯瑶. 先期服药法治疗原发性痛经(气滞血瘀证)的随机、对照临床研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [3] 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.
- [4] Park KS, Park KI, Hwang DS, et al. A review of *in vitro* and *in vivo* studies on the efficacy of herbal medicines for primary dysmenorrhea[J]. Evid-Based Complement Alternat Med, 2014: 296860.
- [5] Harel Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: from pathophysiology to pharmacological treatments and management strategies [J]. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(15): 2661-2672.
- [6] Dawood MY. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management[J]. Obstet Gynecol, 2006, 108(2): 428-441.
- [7] Dawood MY. Dysmenorrhea [J]. Curr Obstetr Gynaecol, 1993, 3(4): 219-224.
- [8] Lumsden MA, Kelly RW, Baird DT. Primary dysmenorrhoea: The importance of both prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ [J]. Br J Obstetr Gynaecol, 1983, 90(12): 1135-1140.
- [9] Coco AS. Primary dysmenorrhea [J]. Am Fam Physician, 1999, 60(2): 489-496.
- [10] Huang HF, He SN. The progress of study of uterus prostaglandin [J]. Foreign Med Sci · Obstet Gynecol Fascicle, 1995, 22(5): 265-268.
- [11] 党海珍, 滕久祥, 彭芝配, 等. 原发性痛经疼痛的中西医结合研究概况[J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(3): 70-71.
- [12] 杨继红, 陈英, 胡佳贞. 中学女生外周血前列腺素与原发性痛经关系[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(8): 1042-1043.
- [13] 李亚洲, 佟继铭. 原发性痛经的机制[J]. 承德医学院学报, 2011, 28(2): 193-194.
- [14] 李煜, 陈金海, 刘惠英, 等. 韩氏穴位神经刺激仪预刺激对痛经大鼠镇痛作用的观察[J]. 广州医药, 2013, 44(3): 39-41.
- [15] 刘冬, 谭秦莉, 李元宝, 等. 桃红四物汤治疗原发性痛经实验研究[J]. 安徽中医学院学报, 2009, 28(2): 46-48.
- [16] 明海霞, 金戈, 董晓丽, 等. 温经活血颗粒对痛经模型大鼠 β -EP 含量和离体子宫收缩活动的影响[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 954-955.

(收稿: 2015-03-04 修回: 2016-05-30)