香附油滴丸抗痛经作用研究

丁 平[1]，田友清[1,2]，陈国胜[3]（1. 江苏联合职业技术学院连云港中医药分院，江苏 连云港 222007；2. 连云港市药物研发共性技术中心，江苏 连云港 222007；3. 新乡学院，河南 新乡 453003）

摘要：目的 探索香附油滴丸抗痛经作用及其机制。**方法** 采用小鼠离体子宫平滑肌收缩试验，观察受试药对子宫平滑肌收缩张力及 p42/44 丝裂原激活蛋白激酶（p42/44MAPK）磷酸化水平和间隙连接蛋白 43（Cx43）表达水平的影响；采用缩宫素致小鼠痛经试验，观察受试药的抗痛经作用及对血栓烷 B_2（TXB_2）和 6- 酮 - 前列腺素 $F_{1\alpha}$（6-Keto-$PGF_{1\alpha}$）表达、丙二醛（MDA）含量及超氧化物歧化酶（SOD）活力的影响。**结果** 受试药连续灌胃给药 7 d，显著降低小鼠子宫平滑肌收缩张力及 p42/44MAPK 磷酸化水平和 Cx43 表达水平（$P<0.05$，$P<0.01$）；明显抑制缩宫素致小鼠痛经反应，降低小鼠血浆 TXB_2 水平和血清 MDA 含量及升高小鼠血浆 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 水平和血清 SOD 活力（$P<0.05$，$P<0.01$）。**结论** 香附油滴丸具有明显的抗痛经作用，其作用机制可能与抑制 p42/44MAPK 磷酸化水平和 Cx43 表达，调节 TXB_2/6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 平衡及抗氧化作用相关。

关键词： 香附油滴丸；痛经；P42/44 丝裂原激活蛋白激酶；间隙连接蛋白 43
中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783(2015)01-0057-04
doi： 10.3969/j.issn.1003-9783.2015.01.014

Study on Anti-dysmenorrheal Effects of *Xiangfu You Diwan*

DING Ping[1], TIAN Youqing[1,2], CHEN Guosheng[3] (1. Lianyungang TCM Branch Institute, Jiangsu Union Technical Institute, Lianyungang, Jiangsu 222007, China; 2. Lianyungang common technological center for drug research and development, Lianyungang 222007 Jiangsu, China; 3. Xinxiang College, Xinxiang 453003 Henan, China)

Abstract: Objective To explore the anti-dysmenorrheal effects and mechanism of *Xiangfu You Diwan* (XYD). **Methods** The isolated mouse uterine smooth muscle contraction test was carried out to explore the action of XYD on tension of uterine smooth muscle, p42/44 mitogen-activated protein kinase (p42/44MAPK) activity and connexin 43 (Cx43) expression. The oxytocin- induced dysmenorrhea test in mouse model was used to evaluate the anti-dysmenorrheal effect of XYD, the expression levels of thromboxane B_2 (TXB_2) and 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-Keto-$PGF_{1\alpha}$), malondialdehyde(MDA) content, and superoxide dismutase(SOD) activity in blood. **Results** XYD significantly decreased the contraction of mouse uterine smooth muscle, p42/44MAPK activity and Cx43 expression after oral administration for 7 days ($P<0.05$, $P<0.01$), and obviously relieved the oxytocin-induced dysmenorrhea, decreased TXB_2 level and MDA content, and increased 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ level and SOD activity in blood ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** XYD has significant anti-dysmenorrheal effects, and its mechanism may be relevant to inhibiting p42/44MAPK activity and Cx43 expression, regulating the balance of TXB2, 6-Keto-PGF1α and counteracting oxidation.

Keywords: Rhizoma Cyperi; *Xiangfu You Diwan* (XYD); Dysmenorrhea

收稿日期： 2014-06-23
作者简介： 丁平，女，副教授，硕士，主要从事药用植物开发研究。Email：dp0505@126.com。通讯作者：田友清，副教授，主要从事新药开发研究。Email：tyq0505@163.com。
基金项目： 江苏省卫生职业技术教育研究课题(J201215)；江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象基金(2012)。

香附作为一味传统中药，至今已应用 1700 多年，并收载于新中国成立后编纂的历版《中华人民共和国药典》。《本草纲目》称之为“气病之总司，女科之主帅”，主要用于治疗乳房胀痛、月经不调、经闭痛经等妇科疾病[1]。现代研究[2]表明，香附挥发油为香附的主要活性部位。为了满足现代临床应用的需要，改进传统剂型的不足，我们利用超临界流体萃取技术从香附中提取出香附油，然后制备成现代中药制剂——香附油滴丸[3]。为了验证香附油滴丸仍保持香附的传统功效，本文拟观察其抗痛经作用，并探讨其可能的作用机制，为香附油滴丸治疗痛经等妇科疾病提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物 KM 小鼠，雌性未孕，SPF 级，体质量(20 ± 2)g，河南省实验动物中心提供，动物许可证号：SCHK(豫)2005-0012，动物质量合格证号：410117。

1.2 药物及试剂 香附油滴丸，组方为香附，药材购自安徽亳州中药材市场，由课题组用 CO_2 超临界萃取技术萃取出香附油，然后与聚乙二醇 4000 按 1∶3 熔融混合，以二甲基硅油为冷凝剂，于滴丸试验机中制备而成，批号：120310；田七痛经胶囊，云南维和药业股份有限公司，批号：120401；四制香附丸，上海和黄药业，批号：20120403；乙烯雌酚片，天津力生制药股份有限公司，批号：120504；缩宫素注射液，上海禾丰制药有限公司，批号：120206；血栓烷 B_2(TXB_2)放射免疫分析药盒、6- 酮 - 前列腺素 F1α(6-Keto-$PGF_{1\alpha}$)放射免疫分析药盒，北京科美东雅生物技术有限公司；超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂盒，南京建成生物工程研究所；磷酸化 p42/44 丝裂原激活蛋白激酶(P42/44 MAPK)单克隆抗体，美国 Cell Signaling 公司；抗间隙连接蛋白 43(Cx43)单克隆抗体，美国 Sigma 公司。

1.3 仪器 HW-1000 超级恒温水浴、张力换能器、BL-420F 生理机能实验系统，成都泰盟科技有限公司；垂直电泳槽、转移电泳槽、全自动数码成像系统及分析系统，美国 Bio-Rad 公司；Safire2 型微孔板测读仪，瑞士 TECAN 公司；LEGEND Micro 21R 型离心机，德国 Thermo scientific 公司；AE240 电子天平，瑞士梅特勒公司。

1.4 小鼠离体子宫平滑肌收缩试验[4-5] 取雌性未孕小鼠 70 只，随机分为 7 组：空白对照组，模型组，田七痛经胶囊组(1000 mg·kg^{-1})，四制香附丸组(1000 mg·kg^{-1})，香附油滴丸低、中、高剂量组(50，100，200 mg·kg^{-1})，每组 10 只，灌胃给药(空白对照组和模型组灌胃给予配制供试药所用的 0.3% CMC-Na 溶液，1 mL/10 g)，每天 1 次，连续 7 天。各组小鼠每天灌药 6 h 后，灌胃乙烯雌酚 2 mg·kg^{-1}(空白对照组灌胃等容量蒸馏水)，每天 1 次。末次给药 1 h 后，将小鼠脱颈椎处死，开腹，迅速取出子宫，置预冷 Lock's 液中清洗，分别结扎子宫颈端及两侧卵巢端。然后将子宫置含 20 mL Lock's 液的恒温浴槽中，子宫颈端固定于固定器底部小钩上，卵巢端与张力换能器连接。温度保持(37 ± 0.1)℃，持续供氧，pH 值为 7.3。调节螺母加 1 g 负荷，平衡 40 min，待子宫收缩稳定、恢复自发节律后，开始进行实验。将终浓度为 5 U·L^{-1} 缩宫素加入恒温槽中(空白组加入等容量 Lock's 液)，待子宫发生周期性收缩并稳定后，观察并记录 15 min 内子宫收缩张力变化，并计算抑制率(%)。抑制率 =(模型组子宫平滑肌平均收缩张力(g) - 供试药组子宫平滑肌平均收缩张力(g)/ 模型组子宫平滑肌平均收缩张力(g)× 100 %。

1.5 MAPK 磷酸化水平和 Cx43 蛋白表达的检测[4] 记录离体子宫平滑肌收缩后，取 50 mg 小鼠子宫平滑肌组织匀浆。匀浆液按常规处理和蛋白定量后，采用 Western blot 方法，以磷酸化 p42/44MAPK 单克隆抗体和抗 Cx43 单克隆抗体分别检测 MAPK 磷酸化水平和 Cx43 蛋白表达量。采用全自动数码成像系统及分析系统扫描分析，以靶蛋白条带的灰度值作为 MAPK 磷酸化水平和 Cx43 蛋白表达的相对量。

1.6 缩宫素致小鼠痛经试验[5] 分组与给药同 1.4 项。末次给药 30 min 后，除空白对照组外，其余各组小鼠腹腔注射缩宫素 1 U·kg^{-1}，记录各组小鼠 30 min 内扭体反应次数，并计算抑制率(%)，抑制率 =(模型组扭体次数 - 供试药组扭体次数)/ 模型组扭体次数 × 100 %。测试结束后，各组小鼠眼眶取血，部分血液制备血浆，测定 TXB_2 及 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 含量，剩余血液离心分离血清，测定血清 SOD 活力及 MDA 含量。

1.7 统计学处理方法 采用 SPSS 15.0 统计软件，计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 Student's t-test 进行组间差异比较，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 香附油滴丸对小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响

见表 1。与空白对照组比较，模型组小鼠子宫平滑肌收缩张力显著增强($P<0.01$)；与模型组比较，香附油滴丸各剂量组小鼠子宫平滑肌收缩张力显著降低($P<0.05$，$P<0.01$)，并呈一定的剂量相关性；香附油滴丸中剂量组与田七痛经胶囊组相当，低剂量组与四制香附丸组作用相当。表明香附油滴丸具有明显抑制子宫平滑肌收缩活性。

表 1　各组对小鼠离体子宫平滑肌收缩的影响($\bar{x}\pm s$，n=10)

Table 1　Effect of XYD on contraction of isolated uterine smooth muscle of mice

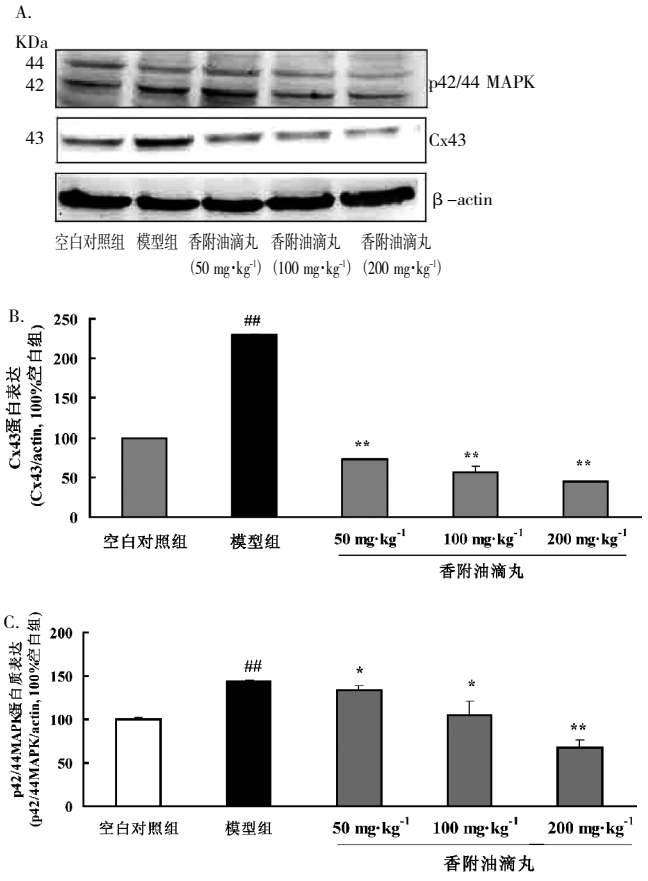
组别	剂量 /mg·kg^{-1}	平均收缩张力 /g	抑制率 /%
空白对照组		0.54 ± 0.18	
模型组	–	1.05 ± 0.27$^{\#\#}$	–
香附油滴丸低剂量组	50	0.84 ± 0.28*	19.7
香附油滴丸中剂量组	100	0.77 ± 0.29*	27.0
香附油滴丸高剂量组	200	0.66 ± 0.21**	37.3
田七痛经胶囊组	1000	0.79 ± 0.35*	24.4
四制香附丸组	1000	0.82 ± 0.26*	22.4

注：与空白对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

2.2 香附油滴丸对 MAPK 磷酸化水平和 Cx43 蛋白表达的影响　与空白对照组比较，模型组 p42/44 MAPK 水平和 Cx43 表达均显著提高($P<0.01$)；与模型组比较，香附油滴丸各剂量组均显著降低 p42/44 MAPK 水平和 Cx43 表达($P<0.05$，$P<0.01$)，并显示一定的剂量依赖性(见图 1A 及 B，C)。

2.3 香附油滴丸对缩宫素致小鼠痛经的影响　见表 2。与空白对照组比较，模型组小鼠发生扭体反应次数显著增多 ($P<0.01$)；与模型组比较，香附油滴丸各剂量组小鼠扭体次数显著减少 ($P<0.05$，$P<0.01$)，其中高剂量组与阳性对照药田七痛经胶囊组相当(抑制率达 46.3 %)，中剂量组与四制香附丸组作用相当(抑制率达 30.8 %)。表明香附油滴丸具有明显抑制缩宫素致小鼠痛经的活性。

2.4 香附油滴丸对痛经小鼠血浆 TXB_2、6-Keto-$PGF_{1\alpha}$、SOD、MDA 含量的影响　见表 3。与空白对照组比较，模型组小鼠血浆 TXB_2 水平和血清 MDA 含量显著升高($P<0.01$)，血浆 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 水平和血清 SOD 活力显著降低($P<0.01$)；与模型组比较，香附油滴丸中、高剂量组小鼠血浆 TXB_2 水平和血清 MDA 含量明显降低($P<0.05$，$P<0.01$)，且呈一定的剂量相关性；香附油滴丸中、高剂量组小鼠血浆 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 水平和血清 SOD 活力显著升高($P<0.05$，$P<0.01$)，亦呈一定的剂量相关性，与田七痛经胶囊组和四制香附丸组作用相当。



与空白对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

图 1　各组对小鼠离体子宫平滑肌 p42/44MAPK 水平和 Cx43 表达的影响($\bar{x}\pm s$，n=10)

Figure 1　Effect of XYD on p42/44MAPK levels and Cx43 expression of isolated uterine smooth muscle of mice($\bar{x}\pm s$，n=10)

表 2　香附油滴丸对缩宫素致小鼠痛经的影响($\bar{x}\pm s$，n=10)

Table 2　Effect of XYD on oxytocin-induced dysmenorrheal in mice

组别	剂量 /mg·kg^{-1}	扭体次数	抑制率 /%
空白对照组		0.0 ± 0.0	
模型对照组	–	34.1 ± 10.9$^{\#\#}$	–
香附油滴丸低剂量组	50	27.1 ± 5.3*	20.5
香附油滴丸中剂量组	100	23.6 ± 7.4*	30.8
香附油滴丸高剂量组	200	18.3 ± 7.1**	46.3
田七痛经胶囊组	1000	19.2 ± 6.7**	43.7
四制香附丸组	1000	24.5 ± 5.8*	28.2

注：与空白对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

3 讨论

痛经是青春期女性的常见病，我国妇女发病率为 42 % ~ 90 %，在美国甚至达到了 90 %，其病理机制

表 3　香附油滴丸对痛经小鼠 TXB_2、6-Keto-$PGF_{1\alpha}$、SOD、MDA 的影响（$\bar{x}\pm s$，n=10）

Table 3　Effect of XYD on TXB_2，6-Keto-$PGF_{1\alpha}$，SOD and MDA of dysmenorrheal mice

组别	剂量 /mg·kg^{-1}	TXB_2 /pg·mL^{-1}	6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ /pg·mL^{-1}	SOD /U·mL^{-1}	MDA /nmol·mL^{-1}
空白对照组		1032.7 ± 202.4	600.9 ± 177.9	24.35 ± 0.90	1.21 ± 0.17
模型组		1400.6 ± 199.6$^{\#\#}$	350.3 ± 118.3$^{\#\#}$	20.01 ± 1.63$^{\#\#}$	1.68 ± 0.50$^{\#\#}$
香附油滴丸	50	1258.1 ± 158.0*	387.6 ± 129.3	20.48 ± 0.82	1.41 ± 0.40
	100	1232.7 ± 159.0*	452.6 ± 98.6*	22.31 ± 0.61**	1.36 ± 0.12*
	200	1206.0 ± 124.0**	507.4 ± 132.7**	22.34 ± 0.88**	1.26 ± 0.07**
田七痛经胶囊	1000	1207.3 ± 155.8*	458.3 ± 112.0*	22.54 ± 1.56**	1.31 ± 0.15*
四制香附丸	1000	1237.2 ± 159.6*	434.4 ± 88.9*	21.33 ± 1.17*	1.32 ± 0.28*

注：与空白对照组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$。

多与子宫平滑肌痉挛性收缩、子宫供血不足或子宫炎症有关[6-7]。在研究香附油滴丸抗炎镇痛作用的基础上[8]，为了进一步证实香附油滴丸的抗痛经作用，本文选择抗痛经新药开发的两个主要药效学指标——抑制子宫平滑肌收缩和抗痛经进行探讨。

研究结果显示，香附油滴丸(50，100，200 mg·kg^{-1}，分别约相当于原药材 1.25，2.5，5 g·kg^{-1})连续 7 d 灌胃给药预处理，可显著降低小鼠子宫平滑肌收缩张力，明显抑制缩宫素致小鼠痛经反应，作用与田七痛经胶囊及四制香附丸相当，提示香附油滴丸具有显著的抗痛经活性。

由于在子宫平滑肌收缩过程中，丝裂原激活蛋白激酶 p42/44MAPK 和间隙连接蛋白 Cx43 信号通路发挥着重要的调控作用。Cx43 在子宫平滑肌中表达具有特异性，MAPK 是信号从细胞表面转导到细胞内部的重要传递者，磷酸化级联反应触发后可导致各种转录因子的激活，激活的转录因子与 Cx43 启动区同源 Cis-acting 元件结合，从而调节 Cx43 基因的表达，影响细胞间通讯功能，调节平滑肌收缩的协调性[9-11]。本实验结果显示，香附油滴丸抑制子宫平滑肌组织的 P42/44MAPK 磷酸化水平和 Cx43 表达水平，表明香附油滴丸可通过减弱 MAPK-Cx43 信号传导而抑制子宫平滑肌的收缩。

现代研究发现，痛经的发生与 TXA_2/PGI_2 比例失调而引起的子宫平滑肌痉挛性收缩，子宫平滑肌血流减少有关。通过测定其稳定的代谢产物 TXB_2 及 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 含量即可反映二者的代谢情况。同时，缩宫素所致的组织缺血、缺氧使超氧自由基产生过多而发生应激反应，造成对子宫内膜的损伤而引起痛经[5]。本实验结果显示，香附油滴丸(100 mg·kg^{-1} 和 200 mg·kg^{-1}) 明显降低小鼠血浆 TXB_2 水平和血清 MDA 含量，显著升高小鼠血浆 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 水平和血清 SOD 活力，提示香附油滴丸可通过调节 TXB_2/6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 平衡及抗氧化作用而降低痛经反应。

综合上述，提示香附油滴丸作为香附的现代制剂，具有明显的抗痛经作用，其作用机制可能与减弱 MAPK-Cx43 信号传导，调节 TXB2 和 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ 平衡及抗氧化作用相关，为将香附油滴丸开发成抗痛经新药提供了药理学依据。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（一部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：241-242.

[2] 田友清，丁平. 香附挥发油的研究进展及其开发前景[J]. 中国药业，2010，19(3)：1-2.

[3] 田友清，丁平. 香附油滴丸的制备工艺研究[J]. 内蒙古中医药，2009，28(22)：26-27.

[4] 肖军花，林先明，周全军，等. 当归 A3 活性部位抑制子宫平滑肌收缩机制的研究[J]. 华中科技大学学报(医学版)，2003，132(15)：471-473，477.

[5] 贺克，刘姣，李清. 少腹逐瘀丸抗痛经作用机制研究[J]. 河北中医药学报，2012，27(2)：3-6.

[6] Wong LP. Premenstrual syndrome and dysmenorrhea：urban-rural and multiethnic differences in perception，impacts，and treatment seeking [J]. J Pediatr Adolesc Gynecol，2011，24(5)：272-277.

[7] Eby GA. Zinc treatment prevents dysmenorrhea[J]. Med Hypotheses，2007，69(2)：297-301.

[8] 田友清，丁平，陈国胜，等. 香附油滴丸抗炎镇痛作用及其物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(20)：26-27.

[9] Wu J，Taylor RN，Sidell N. Retinoic acid regulates gap junction intercellular communication in human endometrial stromal cells through modulation of the phosphorylation status of connexin 43 [J]. J Cell Physiol，2013，228(4)：903-910.

[10] 萨日娜，宋静慧. 子宫结合带超微结构及间隙连接蛋白 43 的表达变化与子宫腺肌病发病的关系[J]. 中华妇产科杂志，2010，45(10)：762-766.

[11] Wu X，Shen H，Yu L，et al. Corticotropin-releasing hormone activates connexin 43 via activator protein-1 transcription factor in human myometrial smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab，2007，293(6)：E1789-1794.

（编辑：修春）