

· 论 著 ·

红花黄色素、阿魏酸对痛经模型大鼠催产素受体及加压素受体 mRNA 表达的影响

赵伟国, 李运景, 李雪芹

中山大学附属中山医院药学部, 广东 中山 528403

摘要: **目的** 探讨红花黄色素、阿魏酸在抗痛经作用中的相关作用机制。**方法** 70 只雌性 SD 大鼠按体重随机分为 7 组: 正常组、模型组、田七痛经胶囊组(田七组)、红花黄色素高剂量组(红高组)、红花黄色素低剂量组(红低组)、阿魏酸高剂量组(阿高组)及阿魏酸低剂量组(阿低组), 每组 10 只。除正常组外, 大鼠股部皮下注射己烯雌酚复制大鼠痛经模型, 田七组在皮下注射己烯雌酚开始时给予田七胶囊 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 红高组、红低组于注射第 7 天分别给予红花黄色素 $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 阿高组、阿低组于注射第 7 天分别给予阿魏酸 $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。共注射 11 d。采用酶联免疫法(ELISA)检测各组大鼠子宫组织前列腺素 E2(PGE2)、前列腺素 F2a(PGF2a)、血浆血栓素 B₂(TXB₂)、6 酮前列腺素 F1a(6-keto-PGF1a), 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测子宫组织催产素受体(OTR)mRNA 及加压素受体(VPR)mRNA 的表达情况。**结果** 与模型组比较, 各药物处理组扭体反应均有所改善, 但无统计学差异(P 均 > 0.05)。与模型组比较, 田七组、阿高组、阿低组 PGE2 含量均有不同程度升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 而田七组、阿高组、阿低组、红高组 PGF2a 含量及 PGF2a/PGE2 的比值均有不同程度降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 各药物处理组 TXB₂ 及 TXB₂/6-keto-PGF1a 的比值均显著降低(P 均 < 0.01)。与正常组比较, 模型组大鼠子宫 OTRmRNA 和 VPRmRNA 相对表达量显著增高(P 均 < 0.01); 与模型组比较, 田七组 OTRmRNA、VPRmRNA 相对表达量均下降(P 均 < 0.05), 阿高组 OTRmRNA 相对表达量下降($P < 0.05$); 其他组组间比较无统计学差异(P 均 > 0.05)。**结论** 阿魏酸抗痛经作用可能与调节前列腺素系统及调节痛经大鼠子宫 OTR 表达有关, 红花黄色素可调节前列腺素系统但对 OTR 及 VPR 表达无明显影响。

关键词: 红花黄色素; 阿魏酸; 痛经; 前列腺素 E2; 前列腺素 F2a; 催产素受体; 加压素受体

中图分类号: R-33 R 286 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)02-0151-04

Influence of safflower yellow and ferulic acid on the oxytocin receptor and vasopressin receptor mRNA expressions in the uterus of dysmenorrhea model rats

ZHAO Wei-guo, LI Yun-jing, LI Xue-qin

Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhongshan, Guangdong 528403, China

Corresponding author: LI Yun-jing, E-mail: zspylj@163.com

Abstract: Objective To investigate the related mechanism of safflower yellow and ferulic acid on anti-dysmenorrhea. **Methods** Seventy female rats were randomly divided into seven groups ($n = 10$ each): normal group, model group, tianqi group, safflower yellow high dose and low dose groups, ferulic acid high dose and low dose groups. The dysmenorrhea rat model was established by share hypodermic injection of diethylstilbestrol in all rats but normal group. Tianqi capsule ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) was given at the beginning of hypodermic injection of diethylstilbestrol in tianqi group; $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of safflower yellow were respectively given in the seventh day of hypodermic injection in safflower yellow high dose and low dose groups; $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of ferulic acid were respectively given in the seventh day of hypodermic injection in ferulic acid high dose and low dose groups. The hypodermic injections were 11 days in all. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of prostaglandin E2 (PGE2), prostaglandin F2a (PGF2a) in the uterus tissues and plasma thromboxane B2 (TXB2), 6-keto-PGF1a. Reverse transcrip-

tion-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect the mRNA expressions of oxytocin receptor (OTR) and vasopressin receptor (VPR) in rat uterus tissues. **Results** Compared with model group, the body torsion reactions in drug-treated groups were all improved without statistical difference (all $P > 0.05$). Compared with model group, the contents of prostaglandin E2 in tianqi group, ferulic acid high dose and low dose groups increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), while the contents of PGF2a and the ratios of PGF2a/ PGE2 in tianqi group, ferulic acid high dose and low dose groups, safflower yellow high dose group decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The contents of TXB2 and the ratios of TXB2/6-keto-PGF1a decreased significantly (all $P < 0.01$) in all drug-treated groups. Compared with normal group, the OTRmRNA and VPRmRNA expressions in model group increased significantly (all $P < 0.01$); compared with model group, the OTRmRNA and VPRmRNA expressions in tianqi group decreased (all $P < 0.05$); the OTRmRNA expression in ferulic acid high dose group decreased ($P < 0.05$); OTRmRNA and VPRmRNA expressions in other groups were similar (all $P > 0.05$). **Conclusions** The anti-dysmenorrhea effects of ferulic acid might be involved in regulating prostaglandin system and OTR expression, while safflower yellow can regulate prostaglandin system but cannot significantly affect the OTR and VPR expressions in dysmenorrheal rats.

Key words: Safflower yellow; Ferulic acid; Dysmenorrhea; Prostaglandin E2; Prostaglandin F2a; Oxytocin receptor; Vasopressin receptor

痛经属于中医妇科经行腹痛的范畴,中医药在治疗痛经方面积累了大量宝贵的经验,许多行之有效的方剂和复方以其疗效确切、副作用小等优点受到患者的青睐。近年来对于治疗痛经有效的方剂、复方的开发和深入研究逐渐成为研究热点。文献研究显示当归、川芎、红花等药物在中药及其复方治疗痛经方面出现频繁^[1],相关的单味药物研究亦有报道,但对有效成分研究尚未深入,相关的物质基础研究并不多见。本研究以当归、川芎主要成分阿魏酸及红花主要成分红花黄色素为对象进行研究,以期对中药治疗痛经的物质基础及相关作用机制进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠, SPF 级; 100 只, 雌性; 150 ~ 170g; 广东省医学实验动物中心提供。

1.2 主要药品仪器与试剂

1.2.1 药品 己烯雌酚注射液(批号:110421, 广州白云山明兴制药有限公司); 缩宫素注射液(批号:100617, 上海第一生化药业有限公司)。注射用红花黄色素(批号:01302008; 每瓶装 150 mg 含红花黄色素 80 mg, 山西华辉凯德制药有限公司); 阿魏酸(批号:F00100913, 西安市飞达生物技术有限公司); 田七痛经胶囊(批号:N08009, 广州敬修堂药业)。

1.2.2 主要仪器 基因扩增仪(珠海黑马, Hema3200); 凝胶成像系统(北京六一仪器厂, WO-9413B 型), 电泳仪(上海申能博彩); 紫外可见分光光度计(上海欣茂, UV7504); 酶标仪(南京华东电子, DG5033A 型); 电热恒温水箱(上海一恒科技, CU420 型); 电子天平(上海友声衡器, BS-3000A), 恒温生化培养箱(宁波江南仪器厂)。

1.2.3 试剂 催产素受体(OTR)、加压素受体(VPR)、 β -actin 引物设计参考前期研究^[2], 由上海生物工程技术有限公司合成; cDNA 试剂盒(Fermentas 公司)、Trizol reagent(Invitrogen Co. Ltd.)、焦碳酸二乙酯(DEPC, diethyl pyrocarbonate, Sigma, 美国)、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)其他相关试剂均购自广州威佳科技有限公司; 前列腺素 E2(PGE2)、前列腺素 F2a(PGF2a)、血栓素 B₂(TXB₂)、6 酮前列腺素 F1a(6-keto-PGF1a)酶联免疫试剂盒购自武汉华美生物。

1.3 分组与剂量设计

1.3.1 分组 造模前将 70 只雌性 SD 大鼠按体重随机分为 7 组: 正常组以及模型组、田七痛经胶囊组(田七组)、红花黄色素高剂量组(红高组)、红花黄色素低剂量组(红低组)、阿魏酸高剂量组(阿高组)以及阿魏酸低剂量组(阿低组), 每组 10 只。

1.3.2 剂量设计 田七组剂量为 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 红高组 $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 红低组 $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 阿高组 $0.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 阿低组 $0.06 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

1.4 模型制作 参照参考文献^[2]复制痛经大鼠模型, 大鼠股部皮下注射己烯雌酚(除正常组外), 每日 1 次, 共注射 11 d, 第 1 天每只 0.8 mg, 第 2 天至第 10 天为每只 0.4 mg, 第 11 天每只 0.8 mg。给药: 田七组在皮下注射己烯雌酚开始时同时口服给药; 红高组、红低组、阿高组及阿低组于己烯雌酚注射第 7 天开始给药, 按体重进行尾静脉给药($0.5 \text{ ml}/100 \text{ g}$), 每天 1 次, 连续给药 5 d^[2]。第 11 天给药 40 min 后, 所有大鼠腹腔注射缩宫素($4 \text{ U}/\text{kg}$), 观察记录扭体反应情况, 包括扭体动物数、潜伏期、30 min 内的扭体次数。

1.5 检测指标 一般情况:每日观察并记录大鼠一般情况,研究开始和结束记录大鼠体重 1 次。扭体反应情况:判定标准以大鼠腹部内凹、躯干与后肢伸展、臀部与一侧肢体内旋为标准^[2]。标本采集:测完扭体反应后 1 h,戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血,离心取血浆(抗凝)、血清(无抗凝),冰箱保存(-80℃)。放血处死大鼠,取子宫组织 2 份,1 份冷冻保存(-80℃);另 1 份以多聚甲醛(4%)保存。标本检测:取血清、血浆、组织匀浆样本按试剂盒说明操作检测相关指标,采用酶联免疫法检测大鼠子宫组织 PGE2、PGF2a、TXB₂、6-keto-PGF1a,采用 RT-PCR 法检测子宫组织催产素受体信使核糖核酸(OTRmRNA)及加压素受体(VPR)mRNA 表达情况,以目的产物与 β-actin 的 OD 比值作为基因表达的半定量数据。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,偏态数据经对数转换近似正态后,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验;动物扭体反应发生率采用 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 各给药组大鼠一般情况正常,被毛光亮,活动正常,眼、耳、口、鼻等未见异常分泌物;大小便等均无异常。除模型组外其他各组体重均较前增长。

2.2 对痛经大鼠扭体反应的影响 与模型组比较,田七组的潜伏期较长,30 min 内扭体次数有所减少,但无统计学差异($P > 0.05$)。红高组、红低组、阿高组、阿低组 30 min 内扭体次数较模型组稍减少,但均无统计学差异(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.3 对痛经模型大鼠子宫 PGE2、PGF2a 的影响 与正常组比较,模型组 PGE2 含量显著降低($P < 0.01$),而 PGF2a 含量及 PGF2a / PGE2 的比值显著升高(P 均 < 0.01)。与模型组比较,田七组、阿高组、阿低组 PGE2 含量均有不同程度升高(P 均 < 0.05);而田七组、阿高组、阿低组、红高组 PGF2a 含量及 PGF2a / PGE2 的比值均有不同程度降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 2。

2.4 对痛经模型大鼠子宫 TXB₂、6-keto-PGF1a 的影响 与正常组比较,模型组 TXB₂ 及 TXB₂/6-keto-PGF1a 的比值显著升高(P 均 < 0.01),而 6-keto-PGF1a 显著降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各药物处理组 TXB₂ 及 TXB₂/6-keto-PGF1a 的比值均显著降低(P 均 < 0.01)。见表 3。

2.5 对大鼠子宫组织 OTRmRNA 和 VPRmRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠子宫 OTRmRNA 和 VPRmRNA 相对表达量显著增高(P 均 < 0.01)。与模型组比较,田七组 OTRmRNA 和 VPRmRNA 相对表达量均下降($P < 0.05$),阿高组 OTRmRNA 相对表达量下降($P < 0.05$)。而其他组间比较无统计学差异(P 均 > 0.05)。见表 4、图 1、图 2。

表 1 大鼠扭体反应发生情况 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药量 (g/kg)	潜伏期 (min)	30 min 内扭体次数	发生扭体动物数(只)
正常组	-	0	0	0
模型组	-	11.26 ± 4.65	10.23 ± 10.28	8
田七组	2.00	12.24 ± 5.03	5.88 ± 5.33	8
红高组	0.02	12.90 ± 5.20	4.63 ± 5.88	8
红低组	0.01	10.00 ± 3.50	6.00 ± 4.41	8
阿高组	0.12	11.09 ± 5.19	10.00 ± 7.79	4
阿低组	0.06	11.22 ± 7.34	6.67 ± 3.78	6

表 2 对大鼠子宫组织 PGE2、PGF2a 的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	给药量 (g/kg)	PGE2 (pg/mg)	PGF2a (pg/mg)	PGF2a / PGE2
正常组	-	188.08 ± 44.33	324.78 ± 81.14	1.82 ± 0.65
模型组	-	122.24 ± 17.72 [△]	758.17 ± 102.86 [△]	7.13 ± 2.77 [△]
田七组	2.00	157.40 ± 30.14*	566.91 ± 191.49*	3.70 ± 1.18**
红高组	0.02	143.63 ± 40.40	604.24 ± 174.61*	4.48 ± 1.53*
红低组	0.01	146.51 ± 35.65	712.12 ± 226.30	5.07 ± 1.88
阿高组	0.12	163.87 ± 35.68*	579.25 ± 158.74*	3.64 ± 1.07**
阿低组	0.06	159.25 ± 30.40*	564.26 ± 189.73*	3.62 ± 1.14**

注:与正常组比较,△ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

表 3 对大鼠血浆 TXB₂、6-keto-PGF1a 含量的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

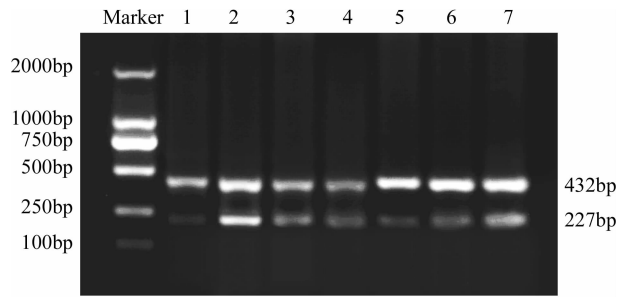
组别	给药量 (g/kg)	TXB ₂ (pg/ml)	6-keto-PGF1a (pg/ml)	TXB ₂ /6-keto-PGF1a
正常组	-	747.49 ± 305.64	354.21 ± 129.16	2.27 ± 0.90
模型组	-	1392.99 ± 394.85 ^{△△}	192.09 ± 64.31 [△]	7.37 ± 1.22 ^{△△}
田七组	2.00	716.07 ± 313.78**	231.98 ± 94.55	3.45 ± 1.67**
红高组	0.02	454.13 ± 105.03**	277.93 ± 102.39	1.91 ± 0.72**
红低组	0.01	486.54 ± 74.85**	265.95 ± 94.98	2.00 ± 0.73**
阿高组	0.12	566.86 ± 78.78**	271.54 ± 116.03	2.41 ± 0.91**
阿低组	0.06	621.46 ± 155.06**	289.94 ± 144.28	2.43 ± 0.81**

注:与正常组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.01$ 。

表 4 大鼠子宫组织 OTRmRNA 和 VPRmRNA 表达情况 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

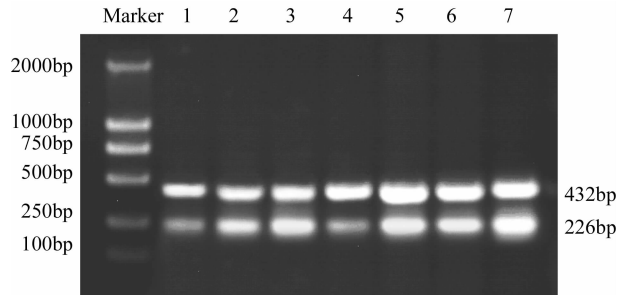
组别	给药量 (g/kg)	OTRmRNA 相对表达量	VPRmRNA 相对表达量
正常组	-	0.53 ± 0.14	0.54 ± 0.21
模型组	-	0.80 ± 0.14 [△]	0.92 ± 0.17 [△]
田七组	2.00	0.65 ± 0.16*	0.72 ± 0.19*
红高组	0.02	0.66 ± 0.22	0.91 ± 0.12
红低组	0.01	0.68 ± 0.17	0.85 ± 0.11
阿高组	0.12	0.65 ± 0.18*	0.81 ± 0.16
阿低组	0.06	0.68 ± 0.16	0.83 ± 0.16

注:与正常组比较,△ $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$ 。



注:1 正常组;2 模型组;3 田七组;4 阿高组;5 阿低组;6 红高组;7 红低组。

图 1 各组大鼠子宫组织 OTRmRNA 表达



注:1 正常组;2 模型组;3 田七组;4 阿高组;5 阿低组;6 红高组;7 红低组。

图 2 各组大鼠子宫组织 VPRmRNA 表达

3 讨论

治疗痛经的方剂涉及药物广泛,包括近 16 类,以活血化瘀药、补益药、理气药、温里药、清热药等应用频繁,约占用药总次数的 84.51%,用药频次较高的药物有当归、延胡索、川芎、五灵脂、香附、红花等,其中当归的出现频率高达 90.90%^[1]。参阅相关研究文献发现虽然当归、川芎、红花等药物在中药及其复方治疗痛经的研究中出现频繁,但对其真正的药效物质基础的研究较少,研究表明,当归多糖^[3]、当归精油^[4]及某些活性组分^[5]被认为具有抗痛经作用,而对作为当归、红花药物的主要有效成分阿魏酸、红花黄色素等的相关研究主要集中在循环系统疾病方面^[6-11],关于这些成分对痛经作用的研究很少,且多数治疗痛经的中药制剂的质量控制标准却以其中的一种或多种成分为主要指标^[12-13],其是不是有效成分,却缺少相关依据。为进一步研究中成药治疗痛经的物质基础及作用机制,本研究选取当归的主要成分阿魏酸和红花的主要成分红花黄色素作为研究对象,观察其抗痛经作用及相关机制。

原发性痛经的发病机制尚未完全明确,目前研究认为多与月经周期的激素水平变化影响子宫内膜前列腺素水平的变化及催产素与加压素等因素有

关^[14]。本研究前期研究结果表明,含有当归、川芎、红花的痛经康口服液具有明显的抗痛经作用,机制可能与下调痛经大鼠子宫 OTR 及 VPR 表达有关^[2]。本研究结果显示,阿魏酸、红花黄色素在调节前列腺素水平、改善局部血液循环等方面具有一定作用,阿魏酸可降低 OTR 的表达,但总体的抗痛经作用并不明显。由此看来阿魏酸、红花黄色素可能在抗痛经作用中只是发挥部分作用,并不能代表复方的整体作用,即多效多靶点的作用,因此可以推断中药复方中仍然存在其他成分参与抗痛经作用,需要进一步的研究求证。

参考文献

- [1] 董克玲. 近 15 年来中医治疗痛经方药应用分析[J]. 国医论坛, 2003, 23(6): 57.
- [2] 赵伟国, 李运景, 黄民. 痛经康口服液对痛经大鼠子宫组织中催产素受体及加压素受体 mRNA 的表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34(7): 1224 - 1228.
- [3] 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 - 748.
- [4] 刘琳娜, 梅其炳, 程建峰, 等. 当归精油治疗痛经的药理研究[J]. 解放军药学学报, 2002, 18(2): 77 - 78, 127.
- [5] 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, 32(5): 471 - 473, 477.
- [6] 龚庆成, 杨璟, 臧宝霞, 等. 红花黄色素对体外循环肺再灌注损伤的保护作用[J]. 心肺血管病杂志, 2014, 33(2): 272 - 275.
- [7] 张媛, 陈晨, 刘倩, 等. 红花黄色素对急性心肌梗死大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 282 - 284.
- [8] 蔡珊珊, 邓淑珍, 王瑞耕, 等. 阿魏酸对慢性心力衰竭小鼠心室胶原重构的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2012, 41(6): 684 - 687.
- [9] 胡益勇, 徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(2): 253 - 255.
- [10] 薛立新, 王慧俐, 刘芳, 等. 注射用红花黄色素治疗稳定型心绞痛 50 例临床观察[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2013, 16(7): 1178 - 1180.
- [11] 葛恒超. 红花黄色素联合脑蛋白水解物治疗急性脑梗死疗效观察及对血液流变学的影响[J]. 中国基层医药, 2013, 20(23): 3571 - 3573.
- [12] 赵伟国, 李运景, 陈钧茂. 痛经康口服液质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1651 - 1654.
- [13] 梁远园, 黄有带, 熊艺花, 等. 妇血安薄膜衣片的质量标准[J]. 中国医药工业杂志, 2013, 44(5): 487 - 491.
- [14] 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(自然科学版), 2003, 19(1): 62 - 64.

收稿日期: 2014 - 10 - 31 修回日期: 2014 - 12 - 16 编辑: 王娜娜