

四物汤及其组成药对对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响

禹良艳, 华永庆, 朱敏, 王欢, 唐于平, 段金廛*
(南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] **目的:**探讨四物汤及其组成药对对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响,以期阐明配伍因素对于四物汤干预卵巢功能的作用。**方法:**体外培养大鼠卵巢颗粒细胞,在培养体系中加入终浓度为 2,20,200 mg·L⁻¹ 四物汤及其各药对的样品,通过 MTT 法检测细胞增殖情况,观察其对卵巢颗粒细胞生长的影响。**结果:**四物汤对于卵巢颗粒细胞增殖具有显著促进作用,与溶剂对照组比较上升了 36.73%;各药对亦具有显著促进作用,其强弱顺序为:当归-川芎(66.86%)>当归-白芍(58.52%)>白芍-川芎(47.03%)>白芍-熟地黄(41.43%)>当归-熟地黄(23.67%);对归芍药对的进一步研究表明,其水提物中当归-川芎 1:2 配比,50% 醇提物中 1:1 配比和先水提再醇提物中 1:1.5 配比药对对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响较为显著。**结论:**四物汤及其 5 个药对均有促进卵巢颗粒细胞增殖的作用,其中归芍药对在四物汤调节卵巢功能起着重要作用,并且不同的配伍比例、不同的提取方法对于促进卵巢颗粒细胞增殖具有各自的特点和贡献。

[关键词] 四物汤; 药对; 卵巢颗粒细胞; 增殖
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)06-0141-04

Effects of Siwu Decoction and Its Drug Pairs on Proliferation of Rat Ovary Granulosa Cell

YU Liang-yan, HUA Yong-qing, ZHU Min, WANG Huan, TANG Yu-ping, DUAN Jin-ao*
(Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the effect of Siwu Decoction and its drug pairs on proliferation of rat ovary granulosa cell, and to probe the effect of combination of drug pairs. **Method:**Siwu Decoction and its drug pairs were added into the cultured rat ovary granulosa cells *in vitro* at the concentration of 2,20,200 mg·L⁻¹, and proliferation of the cells was measured by MTT. **Result:**Under the treatment of Siwu Decoction, the proliferation of granulosa cells was significant promoted by 36.73% in compare with the control group. The same effect was also found after treating with 5 drug pairs, and the order of promoting proliferation effects was: Angelicae Sinensis Radix-Chuanxiong Rhizoma (66.86%)> Angelicae Sinensis Radix-Paeoniae Radix Alba (58.52%)> Paeoniae Radix Alba-Chuanxiong Rhizoma(47.03%)> Paeoniae Radix Alba-Rehmanniae Radix Praeparata(41.43%)> Angelicae Sinensis Radix-Rehmanniae Radix Praeparata(23.67%). Water preparation (1:2), ethanol preparation (1:1) and ethanol-water preparation (1:1.5) showed the strongest activity in each group extracted by different method. **Conclusion:**Siwu Decoction and its drug pairs showed significant promotion effects on rat ovary granulosa cell proliferation. Different pairing ratios of Angelicae Sinensis Radix to Chuanxiong Rhizoma and different extraction procedure contribute to different effects on the proliferation of rat ovary granulosa cell *in vitro*.

[Key words] Siwu Decoction; drug pair; ovary granulosa cell; proliferation

[收稿日期] 20101017(002)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30873235,30902014);江苏省自然科学基金项目(BK2008455);江苏省高校自然科学基金重大基础研究项目(06KJA36022,07KJA36024,09KJB36001,10KJA360039);南京中医药大学科技创新团队,南京中医药大学自然科学基金项目(09XCR23)
[通讯作者] * 段金廛, Tel:025-85811116, E-mail: dja@njutcm.edu.cn

四物汤最初见于宋朝《太平惠民合剂局方》，主治血虚、月经不调、痛经等。后世医家以四物汤为基本方，针对不同的证候进行加减化裁形成了香附四物汤、桃红四物汤等一组经典类方并沿用至今。

近年来，围绕四物汤及其衍化方在血虚证、血瘀证所致原发性痛经等方面，国内许多学者进行了一些探索^[1-5]，但对四物汤调节卵巢功能的报道较少。卵巢颗粒细胞是维持卵巢功能的重要生殖细胞，其数量及分泌雌激素和孕激素的功能与卵泡发育密切相关，可能是四物汤调控上述妇科疾病机制之一。本研究试图探讨四物汤及其组成药对对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响，以进一步揭示四物汤及其配伍因素对卵巢功能的影响。

1 材料

1.1 药物及试剂 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根，来源于甘肃岷县当归 GAP 种植基地；川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎，来源于四川彭州川芎 GAP 种植基地；白芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根，产地安徽亳州；熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根，产地河南怀庆。以上药材均经南京中医药大学段金廛教授鉴定，符合《中国药典》(2005 年版)项下标准。

McCoy'5A 培养基(美国 Sigma 公司，批号：010M8304)，孕马血清促性腺激素(PMSG，宁波市三生药业有限公司，批号 091103)，台盼蓝(Trypan blue，Chroma，批号 83-11-20)，噻唑蓝(MTT，Amresco，批号 090703)。

1.2 仪器 SpectrumMAX190 全自动酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)，XSZ-D₂ 光学倒置显微镜(重庆光学仪器厂)，NU-4950CO₂ 培养箱(美国 NuAire 公司)，Z323 离心机(德国 Hermile 公司)。

1.3 动物 21 日龄清洁级健康 SD 雌性大鼠，体重 60~70 g，购自南京医科大学实验动物中心，动物许可证号 SCXK(苏)2008-0004。

2 方法

2.1 样品制备 称取四物汤组方药材饮片按当归、川芎、白芍、熟地黄(1:1:1:1)配比，药对当归-川芎(1:1)、当归-熟地黄(1:1)、当归-白芍(1:1)、川芎-白芍(1:1)及白芍-熟地黄(1:1)各 5.4 kg，各样品经粉碎至粒径为 40 目，水煎煮 2 次，第 1 次 10 倍量水

煎煮 2 h，第 2 次 8 倍量水煎煮 1.5 h。合并 2 次水煎液，减压回收溶剂至一定体积，并烘干成水提浸膏备用。

当归-川芎药对(2:1,1.5:1,1:1,1:1.5,1:2)5 个配比混合药材及当归与川芎单味药各 6 kg，每个组再均分成 3 份，每份 2 kg 分别进行热回流水提取(近似模拟水煎)、热回流 50% 醇提取(近似模拟酒制)和先水提再用 95% 醇提(近似模拟散剂应用)，将 3 种提取液分别浓缩干燥至浸膏备用。

以上样品均以 DMSO 助溶，体系中 DMSO 终浓度为 0.1%，0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌，并设定含有相应浓度 DMSO 的培养液作为对照组。

2.2 卵巢颗粒细胞的分离与原代培养 参照文献方法培养颗粒细胞^[6]。取 3 周龄雌性 SD 大鼠，颈部 sc PMSG 50 U，以促进卵泡发育，48 h 后颈椎脱臼法处死。浸入乙醇缸中消毒 5 min，在无菌条件下迅速剖取卵巢放入预冷的无菌 D-Hank's 中，去除卵巢周围组织及表面包膜，D-Hank's 逐个清洗 3 次后置于预冷的 McCoy'5A 培养基中。用 25 号针头刺破卵泡，使颗粒细胞释放入 McCoy'5A 培养基，离心管内吹打分散成单个悬浮细胞，200 目不锈钢细胞筛过滤。1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，洗涤滤液，弃上清收集细胞。向沉积在离心管底的细胞团中加入 McCoy'5A 培养基制成单细胞悬液。台盼蓝染色，计数，细胞活率大于 70%。将细胞稀释成密度为 1.0×10⁶/mL 的细胞悬液，接种于 96 孔培养板中，在 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后加入待测样品(0.1% DMSO 溶解)，并设立溶剂对照组，继续培养 48 h 后用 MTT 法测定细胞生长情况。实验平行重复 3 次。

2.3 数据处理与统计 考虑到不同批次实验可能存在的细胞密度的差异，影响不同批数据间的比较，因此我们对所获的数据进行处理，以细胞增殖的促进率表示结果。

$$\text{细胞增殖促进率} = \frac{\text{给药组 } A - \text{溶剂对照组 } A}{\text{溶剂对照组 } A} \times 100\%$$

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS16.0 统计软件处理数据，组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 四物汤及其各药对水煎液对卵巢颗粒细胞增殖的影响 结果见表 1。四物汤及归芎、归地、归芍、芍地及芍芍药对水煎液在 200 μg 浸膏/mL 的剂

量下对颗粒细胞均具有一定的促增殖作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。其中归芍、归芍、芍地、芍芍药对的作用优于四物汤全方。在各药对中,归芍药对促进作用最强,达到 66.86%,与对照组相比均具有非常显著差异($P < 0.01$),其余依次为归芍、芍芍、芍地、归地药对。

表 1 四物汤及其各药对水煎液对卵巢颗粒细胞增殖的促进作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	卵巢颗粒细胞高于对照组的增殖率 /%		
	2 mg·L ⁻¹	20 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹
四物汤	9.10 ± 3.82	9.64 ± 4.13	36.73 ± 18.79 ¹⁾
当归 + 川芎	6.83 ± 2.94	16.28 ± 13.11	66.86 ± 3.71 ²⁾
当归 + 熟地黄	6.11 ± 2.62	8.67 ± 2.70	23.67 ± 14.70 ¹⁾
当归 + 白芍	10.50 ± 3.54 ¹⁾	15.69 ± 7.17 ¹⁾	58.52 ± 14.56 ²⁾
白芍 + 熟地黄	3.72 ± 1.46	18.08 ± 4.05	41.43 ± 22.26 ¹⁾
白芍 + 川芎	5.49 ± 2.36	10.17 ± 8.27	47.03 ± 6.06 ¹⁾

注:与溶剂对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;溶剂对照组的细胞增殖率为 100% (表 2 ~ 4 同)。

3.2 当归-川芎药对不同配比及不同提取方法对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响 比较当归和川芎的单味药及 5 种常用配伍比例共 7 种配比(1:0, 2:1, 1.5:1, 1:1, 1.5:1, 1:2, 0:1)及 3 种不同提取方法(水提取,50% 醇提取,先水提再 95% 醇提)的提取液对颗粒细胞增殖的影响。

实验结果见表 2 ~ 4。结果表明当归及川芎配比不同及制备方法不同时对颗粒细胞增殖的促进率不同。

由表 2 可见,水提取成分中,当归及川芎单味药作用于颗粒细胞后的促增殖率均较高,两药配伍后,当归:川芎为 1:2 时,增殖率最高,为 67.45%,与溶剂对照组相比具有显著差异($P < 0.01$)。

表 2 不同配比当归-川芎药对水提取物对卵巢颗粒细胞增殖的促进作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

当归:川芎	卵巢颗粒细胞高于对照组的增殖率 /%		
	2 mg·L ⁻¹	20 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹
1:0	4.54 ± 1.63	10.79 ± 1.37	42.47 ± 1.34 ²⁾
2:1	4.34 ± 2.09	11.28 ± 1.07	54.50 ± 19.04 ¹⁾
1.5:1	15.25 ± 12.16	22.19 ± 5.70	55.41 ± 7.15 ²⁾
1:1	11.98 ± 3.23	19.83 ± 3.10	60.34 ± 9.36 ²⁾
1:1.5	11.32 ± 1.76	12.02 ± 2.45	65.58 ± 3.41 ²⁾
1:2	13.92 ± 4.40	13.43 ± 1.83	67.45 ± 8.19 ²⁾
0:1	3.12 ± 2.44	20.51 ± 4.37	65.81 ± 4.62 ¹⁾

由表 3 可见,醇提液中,当归单用时,对颗粒细胞略有促增殖作用,但未有显著差异,在归芍 1:1 配伍时,增值率为 68.65%,促增殖作用最好,与溶剂对照组相比具有显著差异($P < 0.01$)。

表 3 不同配比当归-川芎药对醇提物对卵巢颗粒细胞增殖的促进作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

当归:川芎	卵巢颗粒细胞高于对照组的增殖率 /%		
	2 mg·L ⁻¹	20 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹
1:0	6.85 ± 0.85	7.92 ± 4.78	5.38 ± 2.12
2:1	3.60 ± 0.13	13.68 ± 3.57	11.10 ± 6.23
1.5:1	12.82 ± 1.41	13.06 ± 2.94	13.98 ± 9.09
1:1	3.08 ± 1.79	14.02 ± 4.24	68.65 ± 10.74 ²⁾
1:1.5	7.15 ± 0.42	17.36 ± 2.16	31.50 ± 16.90 ¹⁾
1:2	8.90 ± 5.49	16.48 ± 6.94	52.86 ± 4.32 ¹⁾
0:1	4.79 ± 2.50	9.39 ± 0.08	52.52 ± 16.55 ²⁾

由表 4 可见,水提后醇提液中,当归或川芎单用时均有显著的促增殖作用,两药伍用后,比例为 1:1.5 时,增殖率为 62.12%,促进增殖作用最好,与溶剂对照组相比具有显著差异($P < 0.01$)。

相同配比不同提取方法的提取液之间比较,水提液对颗粒细胞增殖的促进作用最好。7 种配比及 3 种提取方法的归芍药对提取液对颗粒细胞增殖的作用不同,可能是与配比不同及提取方法不同造成的效应物质含量不同有关。

表 4 不同配比当归-川芎药对先水提后醇提物对卵巢颗粒细胞增殖的促进作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

当归:川芎	卵巢颗粒细胞高于对照组的增殖率 /%		
	2 mg·L ⁻¹	20 mg·L ⁻¹	200 mg·L ⁻¹
1:0	5.12 ± 4.13	1.04 ± 0.48	48.37 ± 10.86 ²⁾
2:1	-2.73 ± 0.98	6.18 ± 1.19	21.78 ± 5.56 ²⁾
1.5:1	7.70 ± 2.05	14.70 ± 9.48	25.01 ± 5.59 ¹⁾
1:1	19.16 ± 1.69	13.68 ± 3.47	33.57 ± 18.12 ¹⁾
1:1.5	12.63 ± 2.87	11.16 ± 0.46	62.12 ± 7.88 ²⁾
1:2	12.07 ± 1.57	29.40 ± 6.80	49.28 ± 6.37 ¹⁾
0:1	10.16 ± 6.82	13.64 ± 2.61	56.42 ± 9.45 ²⁾

4 讨论

4.1 四物汤及其组成药对与颗粒细胞增殖的关系 药对是中医理论和临床实践中常用且相对固定的中药配伍形式。药对是方剂最小的组方单位,是方剂组成的核心和基础。相对于多味中药组成的方剂来说,药对的配伍规律和量效关系较易阐明。从药

对入手开展配伍的研究及探讨方剂的量效关系有助于研究复杂方剂的配伍规律。实验表明,四物汤及其归芍、归地、归芍、芍地及芍芍药对水煎液对颗粒细胞均具有一定的促增殖作用。其中归芍药对作用较为突出,并且其配伍比例及提取方法不同,功效也具有明显差异。

4.2 归芍药对不同配比及不同提取方法对颗粒细胞的作用特点 归芍药对即可以此药对为基础组方配入其他方剂中使用,又可独立成方,其配伍比例及提取方法不同,其功效也有差别。我们对归芍药对不同配比及不同提取方法对颗粒细胞生长作用的功效差异作了进一步研究。在前期进行的对于归芍药对中医应用数据分析的研究中,我们选取了《中医方剂大辞典》中 1 242 首含有当归、川芍的方剂,并建立当归川芍方剂配比数据库,统计分析发现 2:1,1.5:1,1:1,1:1.5,1:2 这 5 种配伍比例应用频率较高^[7]。

实验结果表明,归芍药对不同配比及不同提取方法对颗粒细胞增殖作用的不同。3 种提取方法中水提法作用最强,其各配比的促进率大多高于醇提液及水提后醇提液中的相应配比;水提液中当归-川芍 1:2 配比、醇提液中当归及川芍 1:1 伍用及水提后醇提液中当归川芍比为 2:3 时促进率最高。

4.3 归芍药对不同效应指标间的关联 在前期实验在原发性痛经模型小鼠的实验中,发现归芍药对水提后醇提液作用最强,水提液最弱,先水提后醇提及醇提液的 1.5:1 配比作用最强^[8];对家兔血小板聚集和凝血功能研究中,归芍配比 1.5:1 和水提液对血小板聚集作用均弱于其他配比和提取方法^[9];对小鼠离体子宫收缩研究中,醇提、水提后醇提方法和归芍比为 1.5:1 及 1:1 时对缩宫素预增敏的子宫收缩缓解作用最好^[10]。在不同模型应用的研究中,归芍药对在临床应用时不仅涉及到其对卵巢功能的调节作用,还需考虑对子宫、血液等功能的影响,采

用综合效应最好的配比及提取方法以实现养血活血调经的功效。研究为揭示四物汤及其类方效应变化及其效应物质奠定了基础。

[参考文献]

[1] 华永庆,段金廛,宿树兰,等. 用于不同证型痛经的四物汤类方生物效应评价[J]. 中国药科大学学报, 2008,39(1):72.

[2] 路晓钦,高月,梁乾德,等. 四物汤中不同组分对血虚模型小鼠造血功能的影响[J]. 中成药, 2005, 27(10):1189.

[3] 马增春,高月,谭洪玲,等. 四物汤对辐射致血虚证小鼠血清蛋白质表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11):1050.

[4] 马宏跃,李伟霞,尚尔鑫,等. 基于抗氧化活性的不同制法当归-川芍药对配伍比例研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010,15(6):631.

[5] 刘培,宿树兰,周卫,等. 香附四物汤与四物汤对急性血瘀模型大鼠血液流变性及卵巢功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(8):124.

[6] 叶靖宇,黄玉芳,华永庆,等. 当归芍药散及其不同提取部位对离体培养大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响[J]. 福建中医药, 2009,40(1):46.

[7] 王欢,唐于平,丁安伟,等. 当归-川芍药对不同配比的中医应用数据分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009,15(11):44.

[8] 王欢,唐于平,郭建明,等. 当归-川芍配伍对小鼠原发性痛经的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7):892.

[9] 王欢,唐于平,郭建明,等. 当归-川芍不同配比组方对家兔血小板聚集和凝血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(2):73.

[10] 李伟霞,华永庆,唐于平,等. 归芍药对小鼠离体子宫收缩活动的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2010, 26(2):120.

[责任编辑 聂淑琴]