

引用:张阳阳,李堃. 丹莪内异方对子宫内膜异位症大鼠的干预作用及机制研究[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(10): 165-167.

丹莪内异方对子宫内膜异位症大鼠的 干预作用及机制研究

张阳阳¹, 李 堃²

(1. 武警北京市总队医院, 北京, 100027;

2. 北京师范大学经济与工商管理学院, 北京, 100875)

[摘要] 目的:探讨丹莪内异方对子宫内膜异位症大鼠的治疗效果。方法:将60只大鼠随机分为假手术组、模型组、丹莪内异方高、中、低剂量组(灌胃剂量中分别含生药15、7.5、3.75 g/kg),阳性药达那唑胶囊组(阳性组,灌胃剂量为36 mg/kg),每组各10只。行自体子宫内膜移植术制备大鼠子宫内膜异位症模型,给药4周。采用光学显微镜观察异位内膜的病理组织学并评价其病变分级,采用ELISA法测定血清炎症细胞因子白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达水平。结果:丹莪内异方可缩小子宫内膜异位症大鼠的异位内膜体积。与模型组相比,丹莪内异方各剂量组的异位内膜病变分级程度均减轻($P<0.01$)。与假手术组比较,模型组血清IL-6和TNF- α 水平均增高($P<0.01$);药物干预后,高、中、低剂量血清IL-6和TNF- α 水平均较模型组降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);低剂量组TNF- α 与阳性组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:丹莪内异方能有效缓解大鼠子宫内膜异位症的发生和发展,这可能与下调炎症细胞因子水平、抑制机体炎症反应等有关。

[关键词] 子宫内膜异位症;丹莪内异方;大鼠;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2020.10.064

Study on the interventional effect and mechanism of Dan'e Neiyi prescription in treatment of rats with endometriosis

ZHANG Yangyang¹, LI Kun²

(1. Beijing Armed Police Corps Hospital, Beijing 100027, China;

2. School of Business and Economics, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Dan'e Neiyi prescription in the treatment of rats with endometriosis. Methods: A total of 60 rats were randomly divided into sham-operation group, model group, high-, middle-, and low-dose Dan'e Neiyi prescription groups (treated with 15, 7.5, and 3.75 g/kg crude drug, respectively), and positive group (treated with the positive drug danazol capsules 36 mg/kg by gavage), with 10 rats in each group. Autologous endometrial transplantation was performed to prepare a rat model of endometriosis, and the drugs were given for 4 weeks. A light microscope was used to observe the histopathology of the ectopic endometrium and evaluate the grade of lesion, and ELISA was used to measure the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Results: Dan'e Neiyi prescription reduced the volume of the ectopic endometrium in rats with endometriosis. Compared with the model group, the three Dan'e Neiyi prescription groups had a reduction in the grade of lesion in the ectopic endometrium ($P<0.01$). Compared with the sham-operation group, the model group had significant increases in the serum levels of IL-6 and TNF- α ($P<0.01$); compared with the model group after drug intervention, the high-, middle-, and low-dose groups had significant reductions in the serum levels of IL-6 and TNF- α ($P<$

基金项目:武警北京市总队院级项目(10173120023)

第一作者:张阳阳,女,药学硕士,药师,研究方向:药物活性成分筛选研究

0.05 or $P<0.01$);there was no significant difference in $TNF-\alpha$ between the low-dose group and the positive group ($P<0.05$). Conclusion:Dan'e Neiyi prescription can effectively alleviate the development and progression of endometriosis in rats,possibly by downregulating the levels of inflammatory cytokines and inhibiting inflammatory response.

[Keywords] endometriosis;Dan'e Neiyi prescription;rat;experimental study

子宫内异位症指子宫内膜碎片异常迁徙于子宫腔外,在腹腔壁或盆腔壁种植而成的异位病灶,表现为月经失调、子宫囊肿、疼痛、不孕等^[1]。子宫内异位症属妇科多发病,严重影响到了女性患者的身体健康和生活质量,目前临床上仍欠缺理想的治疗方法^[2]。本课题组建立实验性子官内膜异位症大鼠模型,应用中医学理论自拟中药复方丹莪内异方(主要药物组成:丹参、血竭、莪术等)进行干预,探讨丹莪内异方的治疗效果及其作用机制。现将结果报告如下。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,雌性未孕,约 9 周龄,体质量 200~240 g,由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号:SCXK(冀)2013-1-003。

1.2 药物 1)丹莪内异方。主要组成药材:丹参、血竭、莪术、薏苡仁,均购自北京同仁堂医药集团北城批发部。采用传统水提醇沉法,浓缩成含生药量 0.75 g/ml 的溶液,动物实验按所需剂量配制后给药。2)达那唑胶囊。达那唑胶囊由江苏联环药业股份有限公司生产,批准文号:国药准字 H20023116,批号:20160902,规格:0.2 g/粒。

1.3 主要试剂与仪器 白介素(interleukin,IL)-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)- α 检测试剂盒(ELISA 法),由南京建成生物工程研究所提供。光学显微镜,由日本 Olympus 公司生产;低温离心机,由美国 Beckman 公司生产;酶标仪,由瑞士 Tecan 公司生产。

2 实验方法

2.1 模型制备 建立子宫内异位症动物模型。制备大鼠的阴道涂片,光学显微镜下确定性周期,选取处于动情周期的大鼠,依照 Pereira FE 等^[3]方法行自体子宫内膜移植术。方法:取大鼠,麻醉、无菌备皮,沿腹中线打开腹腔,取左侧远端子宫段约 1 cm,置于 0.9%氯化钠注射液中,除去脂肪组织,纵向剖开,使子宫内膜面与右侧腹腔壁贴合,并进行缝合固定。用抗菌药物和 0.9%氯化钠注射液冲洗腹腔,闭合腹腔。模型建立成功标准:肉眼可见异位内膜呈透明囊状物,囊内充满液体,囊壁有血管形成^[4]。另取大鼠,以脂肪组织代替子宫内膜固定于腹壁,其他操作同上,作为假手术组。

2.2 分组与给药 建立模型 4 周后,将大鼠随机分为 6 组,即假手术组(等量溶媒),模型组(等量溶媒),丹莪内异方低、中、高剂量组(简称为低、中、高剂量组,生药分别为 3.75、7.5、15 g/kg)、阳性药达那唑胶囊组(简称为阳性组,

生药为 36 mg/kg),每组各 10 只,灌胃相应药物,每天 1 次,连续 4 周。

2.3 主要指标 给药 4 周后,各组大鼠麻醉、开腹,由腹主动脉采血,室温静置 0.5 h,低温离心机 3500 r/min 取血清,低温保存。观察异位内膜的生长及粘连情况,钝性分离出异位内膜,置于福尔马林液中固定保存。1)异位内膜病变分级。取固定好的异位内膜,常规包埋、切片、HE 染色,置于光镜下观察并评价其病变程度。分级标准:+++,表示假腺体数量多,间质内浸润有大量炎性细胞;++,表示假腺体数量较多,间质内浸润有较多炎性细胞;+,表示假腺体极少,间质内浸润少量炎性细胞;- ,表示假腺体无,间质内无炎性细胞。2)血清炎症细胞因子水平。取血清,双抗体夹心 ELISA 法进行检测,酶标仪读取光密度(OD)值,根据试剂盒说明书绘出标准曲线,计算 IL-6 和 $TNF-\alpha$ 的浓度。

2.4 统计学方法 采用 Sigma Stat 3.5 统计学分析软件处理数据,病变分级采用完全随机设计的秩和检验;计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,2 组间比较采用 q 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组异位内膜的病变程度及分级情况比较 假手术组动物的异位脂肪未种植成活,不纳入统计学分析。模型组多数异位内膜呈隆起透亮的囊泡状,体积大,表面血管清晰可见,内部充满黄色浆液,周围与腹壁粘连;光镜下观察到内膜腺上皮细胞层有显著增生,排列紧密,腺体数量较多,间质层丰富,浸润有大量炎性细胞。各给药组多数异位内膜虽形成但有不同程度的萎缩现象,或体积较小,或未形成囊泡状,或表面血管较少;光镜下观察到内膜腺上皮细胞层排列不规则或较薄,腺体数量少或无,间质层炎性细胞数量较少,可见有个别凋亡形态的细胞。丹莪内异方各剂量组、阳性组的病变分级与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。(见表 1)

表 1 各组大鼠异位内膜病变分级情况比较(只)

组别	例数	剂量(g/kg)	+++	++	+	-
模型组	10	-	8	2	0	0
低剂量组	10	3.75	0	3	4	3
中剂量组	10	7.5	0	1	5	4
高剂量组	10	15	0	0	4	6
阳性组	10	0.036	0	0	3	7

3.2 各组血清炎性细胞因子水平比较 假手术组动物血清 IL-6 和 TNF- α 均处于低表达水平。与假手术组比较,模型组动物血清 IL-6 和 TNF- α 水平均有明显增高。经治疗后,高、中、低剂量组、阳性组血清 IL-6 和 TNF- α 水平均降低,与模型组比较,差异均有统计学意义;低剂量组 TNF- α 与阳性组比较,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组血清炎性细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$, ph/ml)

组别	例数	剂量(g/kg)	TNF- α	IL-6
假手术组	10	-	53.29 $\pm$ 10.16	8.33 $\pm$ 1.65
模型组	10	-	507.48 $\pm$ 99.01 ^a	215.44 $\pm$ 40.26 ^a
低剂量组	10	3.75	401.55 $\pm$ 81.23 ^{bd}	152.09 $\pm$ 39.87 ^c
中剂量组	10	7.5	353.27 $\pm$ 84.45 ^c	150.73 $\pm$ 29.28 ^c
高剂量组	10	15	348.60 $\pm$ 65.92 ^c	126.12 $\pm$ 21.40 ^c
阳性组	10	0.036	299.34 $\pm$ 90.17 ^c	143.25 $\pm$ 41.01 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与阳性组比较,^d $P < 0.05$ 。

4 讨 论

子宫内异位症属中医学“癥瘕”“崩漏”等范畴,其病因病机为气滞血瘀,治疗多采用“活血、化瘀、行气”法,该法经基础和临床研究证实有效^[5-6]。本研究所用丹莪内异方的主要组成包括丹参、血竭、莪术等活血化癥类中药,全方有行气活血、消癥止痛之功。现代药理学研究表明丹参、血竭、莪术等具有抗炎、调节免疫、抗血栓、增加血流量等作用^[7]。本研究探讨了丹莪内异方对子宫内异位症模型大鼠异位内膜的影响,经 4 周治疗后,大鼠的异位子宫内膜体积可见显著缩小,各给药组可明显减轻异位内膜的组织病理学和病变分级程度。

子宫内异位症病理机制虽未完全阐明,大量报道表明紊乱的免疫功能及失控的炎症反应与其关系密切^[8]。该病理过程由多种细胞因子参与,包括先导炎症因子 IL-6、TNF- α 等。IL-6 由多种淋巴细胞释放,主要参与机体炎症反应,诱导细胞毒性作用,可促进机体产生自身抗体,影响正常的免疫功能。TNF- α 由激活的巨噬细胞释放,具有双重生理作用,低水平与机体免疫调节功能有关,高水平则导致病理损伤,可诱导 IL-6 分泌并与 IL-6 协同作用。子宫内异位症发生发展时,IL-6 和 TNF- α 除了介导免疫炎症反应之外,尚可刺激其他炎症因子的分泌,形成炎症级联反应,促进异位内膜周围的细胞增殖、炎性浸润和组织粘连;还能诱导血管内皮生长因子的释放,促进异位病灶新生血管的生成^[9]。因此,IL-6 和 TNF- α 参与了异位内膜的种植、黏附及维持过程。临床研究证实,子宫内异位症患者血清或腹腔液中 IL-6 和 TNF- α 水平与病情的严重程度呈正相关^[10]。本研究结果表明模型组血清 IL-6 和 TNF- α 均处于高水平,提示子宫内异位症模型大鼠存在严重

炎症反应,IL-6 和 TNF- α 参与子宫内异位症的病理过程,这与文献报道^[11]结论是一致的。经治疗后,丹莪内异方各剂量组可显著降低 IL-6 和 TNF- α 水平,提示丹莪内异方可通过减少炎症细胞因子的释放,改善机体炎症反应程度。

综上所述,丹莪内异方采用“活血、化瘀、行气”法组方,能有效缓解大鼠子宫内异位症的发生和发展,其机制可能与下调炎症细胞因子水平、抑制炎症反应等有关。丹莪内异方对子宫内异位症异位病灶炎性微环境的影响仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] SAMIMI M, POURHANIFEH MH, MEHDIZADEHKASHI A, et al. The role of inflammation, oxidative stress, angiogenesis, and apoptosis in the pathophysiology of endometriosis: basic science and new insights based on gene expression [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11): 19384-19392.
- [2] HABIB N, CENTINI G, LAZZERI L, et al. Bowel endometriosis: current perspectives on diagnosis and treatment [J]. Int J Womens Health, 2020, 12(1): 35-47.
- [3] PEREIRA FE, ALMEIDA PR, DIAS BH, et al. Development of a subcutaneous endometriosis rat model [J]. Acta Cir Bras, 2015, 30(1): 6-12.
- [4] 纪莲, 马铁, 刘冬妍. 子宫内异位症大鼠模型研究进展 [J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1): 72-76.
- [5] MACHAIRIOTIS N, VASILAKAKI S, KOUROUTOU P. Natural products: potential lead compounds for the treatment of endometriosis [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2020, 245(2): 7-12.
- [6] 庞佳欢, 夏亲华. 活血化癥软坚散结法治疗子宫内异位症患者的疗效及对体液免疫因子的影响 [J]. 世界中医药, 2019, 14(10): 2711-2715.
- [7] 郑依玲, 梅全喜, 戴卫波, 等. 妊娠禁忌中药研究概述 [J]. 中国药房, 2018, 29(3): 421-424.
- [8] WEI Y, LIANG Y, LIN H, et al. Autonomic nervous system and inflammation interaction in endometriosis-associated pain [J]. J Neuro Inflammation, 2020, 17(1): 80.
- [9] 李姐姐, 郭广玲, 王铁延. 子宫内异位症与免疫炎症、氧化应激及血管生成的相关性研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(4): 468-471.
- [10] LI J, CHEN Y, WEI S, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-6 gene polymorphisms and endometriosis risk in Asians: a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Hum Genet, 2014, 78(2): 104-116.
- [11] 庄梦斐. 清热化瘀法通过抑制炎症和血管生成对大鼠子宫内异位症治疗作用的机制研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2016: 94-96.

(收稿日期: 2019-11-12)