

some activation contributes to long-term behavioral alterations in mice injected with lipopolysaccharide [J]. *Neuroscience*, 2017, 343: 77-84.

- [18] Wang Y, Lawson MA, Dantzer R, et al. LPS-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase is regulated in an interferon-gamma-independent manner by a JNK signaling pathway in primary murine microglia[J]. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(2): 201-209.

[19] Tao W, Wang H, Su Q, et al. Paeonol attenuates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice[J]. *Psychiatry Res*, 2016, 238: 116-121.

- [20] Dell'Osso L, Carmassi C, Mucci F, et al. Depression, Serotonin and Tryptophan [J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22(8): 949-954.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)

化瘀通孕方对输卵管炎性阻塞性不孕症大鼠 ICAM-1 表达及血流变学的影响

韩霞, 彭志华, 金素芳

深圳市福田区中医院, 广东 深圳 518034

[摘要] 目的: 研究化瘀通孕方对输卵管炎性阻塞性不孕症大鼠输卵管细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 表达及血流变学的影响, 从分子生物学角度探讨化瘀通孕方的作用机制。方法: SPF 级 Wistar 雌性大鼠 70 只, 随机选取 60 只大鼠采用混合菌法制作输卵管炎性不孕症大鼠模型, 剩余 10 只作为空白组。选择造模成功的大鼠 50 只, 随机分为模型组、西药组、化瘀通孕方低、中、高各剂量组, 各 10 只。化瘀通孕方低、中、高各剂量组分别按 6.09、12.18、24.36 g/(kg·d) 灌胃化瘀通孕方, 西药组灌胃头孢唑啉酯片 52.5 mg/(kg·d) 和甲硝唑片 63 mg/(kg·d), 空白组和模型组予等容量生理盐水灌胃。检测大鼠血液流变学指标和输卵管组织 ICAM-1 蛋白的表达。结果: 空白组大鼠输卵管不表达 ICAM-1。与空白组比较, 模型组大鼠全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著升高 ($P < 0.01$), 说明造模成功。与模型组比较, 西药组和化瘀通孕方低、中、高各剂量组大鼠输卵管 ICAM-1 蛋白表达累积面积和平均光密度均显著减小, 全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与西药组比较, 化瘀通孕方低剂量组大鼠输卵管 ICAM-1 蛋白表达累积面积较高; 化瘀通孕方中、高剂量组大鼠输卵管 ICAM-1 蛋白表达累积面积、大鼠全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞压积均显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与化瘀通孕方高剂量组比较, 化瘀通孕方低、中剂量组大鼠输卵管 ICAM-1 蛋白表达累积面积和平均光密度均显著较高, 全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著较高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 化瘀通孕方能明显改善大鼠血液流变学指标, 并可以降低输卵管 ICAM-1 蛋白的表达, 为临床治疗输卵管炎性阻塞性不孕症提供可靠的实验依据。

[关键词] 输卵管炎性阻塞性不孕症; 化瘀通孕方; 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1); 血液流变学; 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5; R711.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 07-0013-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.07.004

Huayu Tongyun Prescription Can Down-regulate Tubal ICAM-1 Expression and Hemorheology of Rats with Infertility Due to Inflammatory Obstruction of Fallopian Tube

HAN Xia, PENG Zhihua, JIN Sufang

Abstract: Objective: To study the effect of Huayu Tongyun prescription on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and hemorheology of rats with infertility due to inflammatory obstruction of fallopian tube. Methods: There are 70

[收稿日期] 2017-01-05

[基金项目] 广东省中医药局科研课题 (20131035)

[作者简介] 韩霞 (1979-), 女, 博士, 副主任中医师, 主要从事中医妇科临床工作。

Wistar female rats of SPF grade and selected 60 rats of them randomly to build models of infertility due to inflammatory obstruction of fallopian tube with mixed culture method, the other ten rats were selected as the blank group. Selected 50 successful model rats and divided them into the model group, western medicine group, and low, middle and high dose of Huayu Tongyun prescription groups randomly, 10 cases in each. The low, middle and high dose of Huayu Tongyun prescription groups were given 6.09, 12.18, 24.36 g/(kg·d) of Huayu Tongyun prescription respectively by gavage. The western medicine group was given Cefuroxime axetil tablets of 52.5 mg/(kg·d) and Metronidazole tablets of 63 mg/(kg·d) by gavage, and the blank group and the model group were given isovolumetric saline solution. Detected ICAM-1 protein expression of ovarian tissues and hemorheology indexes of rats. **Results:** There was no expression of ICAM-1 of ovarian tissues in the rats of the blank group. Comparing with those of the blank group, whole blood viscosity in high shear rate and in low shear rate, erythrocyte aggregation and rigidity index and hematocrit of the model group were all increased significant ($P < 0.01$), which suggested the success of modeling. Comparing with those of the model group, cumulative area and average optical density of ICAM-1 protein expression in ovarian tissues of the western medicine group and the low, middle and high dose of Huayu Tongyun prescription group were all reduced significantly, and the whole blood viscosity in high shear rate and in low shear rate, erythrocyte aggregation and rigidity index and hematocrit were also reduced significantly, the differences being significant ($P < 0.01$). Comparing with those in the western medicine group, cumulative area of oviduct ICAM-1 protein expression in the low dose of Huayu Tongyun prescription groups was higher. Cumulative area of oviduct ICAM-1 protein expression, and the whole blood viscosity in high shear rate and in low shear rate, erythrocyte aggregation and rigidity index and hematocrit in the middle and high dose of Huayu Tongyun prescription groups were all reduced significantly ($P < 0.05$). Cumulative area and average optical density of ICAM-1 protein expression in ovarian tissues in the low and middle dose of Huayu Tongyun prescription groups were significantly higher than those in high dose of Huayu Tongyun prescription group, and the whole blood viscosity in high shear rate and in low shear rate, erythrocyte aggregation and rigidity index and hematocrit were also significantly higher than those in high dose of Huayu Tongyun prescription group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huayu Tongyun prescription can improve hemorheology indexes of rats significantly, and reduce the oviduct ICAM-1 protein expression, which can provide reliable experiment basis for treating infertility due to inflammatory obstruction of fallopian tube.

Keywords: Infertility due to inflammatory obstruction of fallopian tube; Huayu Tongyun prescription; Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1); Hemorheology; Animal experiment; Rat

不孕症是全世界共同关注的疑难病症,也是妇科常见病之一,由输卵管炎导致输卵管阻塞而形成的不孕症称为输卵管炎性阻塞性不孕症(SOI)^[1]。中医学认为瘀血阻络是输卵管阻塞性不孕的主要病机,临床上本院经验方化瘀通孕方治疗输卵管阻塞性不孕取得了较满意疗效,但是未能从分子生物学水平认识该经验方治疗输卵管阻塞性不孕的机理。为进行相关探讨,笔者研究了化瘀通孕方对输卵管炎性阻塞大鼠输卵管 ICAM-1 表达及血液流变学的影响,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级 Wistar 雌性大鼠 70 只,6~8 周龄,体重(200±20)g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证编号:SYXK(粤)2013-0096,饲养环境:广东省中医药工程技术研究院 SPF 动物实验室,环境合格证号:SYXK(粤)2013-0096。动物实验经广东省中医药工程技术研究院实验动物伦理委员会审批后执行。

1.2 药品与试剂 化瘀通孕方:赤芍、丹参各 15 g,桃仁、三棱、莪术、当归、黄芪、牡丹皮、白术、桂枝各 10 g,甘

草 6 g。水煎,分别浓缩成 0.5、1、2 g/mL 三个浓度的煎液。消毒,灭菌,4℃ 保存备用,中药饮片由康美药业提供。头孢呋辛酯片(0.25 g/片,国药准字 H20010096),珠海联邦制药股份有限公司中山分公司产品;甲硝唑片(0.2 g/片,国药准字 H44024136),广州迈特兴华制药厂有限公司产品。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌标准菌,由广州市微生物研究所提供。0.1% DEPC 多聚甲醛,武汉博士德生物工程有限公司产品;细胞间黏附分子-1(ICAM-1)一抗、SP 免疫组化染色试剂盒、DAB 染色试剂盒,北京博奥森生物工程开发有限公司产品;抗凝剂,河南省科虹医疗器械商贸有限公司产品。

1.3 实验仪器 LG-R-80 全自动血流变仪(中外合资北京中勤世帝公司)。-80℃ 超低温冰箱,美国 Therm;3K30 型低温冷冻离心机,SIGMA 公司产品。组织脱水机、切片机、石蜡包埋机、摊片机、烘片机等病理系统,德国徕卡公司产品;CX21-BIM 生物显微镜,日本奥林巴斯公司。

1.4 模型的建立 从 70 只 Wistar 雌性大鼠中随机选取 60 只

大鼠,按照输卵管炎性阻塞性不孕大鼠模型行造模,剩余10只作为空白组。具体造模方法如下:用体积分数为10%乌拉坦(剂量按10 mL/kg)腹腔注射麻醉后,大鼠固定于操作台上,在无菌条件下,下腹部正中切口长0.8~1 cm,分别在子宫角近输卵管处进针,向输卵管—卵巢方向注射细菌悬液0.15 mL^[2](大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌按2:1:1用无菌盐水稀释,浓度为 3×10^9 个/mL),空白组大鼠注射经高温高压处理后的混合菌液,缝合切口,恢复饮水,正常清洁饲养。造模术后于第5、10、15、20天分别从造模大鼠中随机处死2只进行病理学观察,经验证20天后均表现为输卵管腔黏连、僵硬,或受周围疤痕组织的牵拉、扭曲或闭塞视为造模成功,剔除差异过大动物后,选取成功造模大鼠50只。

1.5 分组给药方法 把造模成功的50只大鼠按照随机数字表法随机分为5组,每组10只。①模型组:生理盐水;②化痰通孕方低剂量组:按6.09 g/(kg·d)灌胃化痰通孕方,0.5倍临床等效剂量;③化痰通孕方中剂量组:按12.18 g/(kg·d)灌胃化痰通孕方,1倍临床等效剂量;④化痰通孕方高剂量组:按24.36 g/(kg·d)灌胃化痰通孕方,2倍临床等效剂量;⑤西药组:头孢呋辛酯片52.5 mg/(kg·d),甲硝唑片63 mg/(kg·d),1倍临床等效剂量。各给药组于造模术后第20天开始按等容量灌胃给药,空白组与模型组予等容量生理盐水灌胃,每天1次,连续给药30天。

1.6 检测指标 于末次给药后1.5~2 h,处死大鼠,取血加抗凝剂后,采用R80全自动血黏度仪检测血液流变学指标(全血黏度、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数和红细胞压积);取输卵管用0.1% DEPC多聚甲醛中固定,常规石蜡切片,免疫组化法测ICAM-1蛋白表达,于400倍光镜下拍照,每片随机取5个视野,采用Image Pro Plus 5.0图像分析系统进行半定量测量,结果以5个视野阳性表达累积面积百分率(%)和平均光密度值表示。

1.7 统计学方法 采用SPSS19.0软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均值比较采用单因素方差分析,组间均值两两比较采用SNK检验。

2 结果

2.1 各组大鼠输卵管ICAM-1蛋白表达结果比较 见表1。空白组大鼠输卵管ICAM-1蛋白阴性表达,其余各组大鼠均阳性表达。与模型组比较,西药组和化痰通孕方低、中、高各剂量组大鼠输卵管ICAM-1蛋白表达累积面积和平均光密度均显著减小($P < 0.01$)。与西药组比较,化痰通孕方低剂量组大鼠输卵管ICAM-1蛋白表达累积面积较高,化痰通孕方高剂量组大鼠输卵管ICAM-1蛋白表达累积面积较低,化痰通孕方高、中剂量组大鼠输卵管ICAM-1蛋白表达平均光密度较低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与化痰通孕方高剂量组比较,化痰通孕方低、中剂量组大鼠输卵管ICA

M-1蛋白表达累积面积和平均光密度均显著较高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠输卵管ICAM-1蛋白表达结果比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	累积面积(%)	平均光密度
空白组	-	-
模型组	41.34 ± 4.44	0.284 ± 0.045
西药组	27.64 ± 5.96 ^①	0.175 ± 0.037 ^①
化痰通孕方低剂量组	34.90 ± 4.13 ^{①②③}	0.177 ± 0.040 ^{①③}
化痰通孕方中剂量组	30.21 ± 2.30 ^{①③}	0.125 ± 0.040 ^{①②③}
化痰通孕方高剂量组	22.22 ± 4.72 ^{①②}	0.023 ± 0.044 ^{①②}

与模型组比较,① $P < 0.01$;与西药组比较,② $P < 0.05$;与化痰通孕方高剂量组比较,③ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠血液流变学指标比较 见表2。与空白组比较,模型组大鼠全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著升高($P < 0.01$),说明造模成功。与模型组比较,西药组和化痰通孕方高、中、低各剂量组大鼠全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与西药组比较,化痰通孕方高剂量组大鼠全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著降低,化痰通孕方中剂量组大鼠全血黏度高切、红细胞刚性指数、红细胞压积均显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与化痰通孕方高剂量组比较,化痰通孕方低、中剂量组大鼠全血黏度高切和低切、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积均显著较高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

中医学并无输卵管炎性阻塞性不孕症的病名,然根据该疾病主要症状特点,可将其归属于中医学不孕、癥瘕等疾病范畴。中医认为本病属瘀血病症,病因多为外邪入侵、七情致病、气滞血瘀等,发病机制均与瘀滞有关,瘀血阻滞胞宫,气血运行不畅,胞络闭塞,精卵运行受阻,两精不能结合而导致不孕。因此瘀血阻络是本病的核心病机,而活血通络为治疗本病的主要原则。化痰通孕方为本院中医妇科经验方,用于治疗输卵管炎性阻塞性不孕多年,在临床上取得较好效果。方中以赤芍和丹参为君,丹参为活血化瘀之要药,赤芍性平活血且不伤正气,共用有活血通经、散瘀消癥、行气止痛的作用;臣以桃仁、牡丹皮增强活血化瘀之功,兼可清郁热;三棱与莪术相伍为用,三棱偏于破血,莪术偏于破气,既能破血逐瘀,又能行气止痛;桂枝升发阳气,温通经络,配伍为用,使组方具备活血化瘀通络的疗效;佐以当归补血调经,黄芪益气扶正,白术健脾;甘草为使,具有调和诸药之功效。诸药合用,共奏活血化瘀、通经活络、助孕安胎的作用,是理想的治疗输卵管阻塞性不孕的中药方剂。

表 2 各组大鼠血液流变学指标比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	全血黏度(mPa·s)		红细胞刚性指数	红细胞聚集指数	红细胞压积(%)
	高切	低切			
空白组	4.37± 0.95 ^①	12.38± 2.00 ^①	10.47± 1.15 ^①	2.18± 0.39 ^①	28.96± 1.18 ^①
模型组	9.40± 0.89	21.81± 2.76	17.14± 1.22	3.58± 0.46	37.37± 1.49
西药组	6.88± 1.26 ^①	18.52± 2.10 ^①	14.21± 1.55 ^①	2.77± 0.35 ^①	34.42± 1.25 ^①
化瘀通孕方低剂量组	6.64± 0.81 ^{①③}	17.84± 1.60 ^{①③}	14.72± 1.66 ^{①③}	2.55± 0.28 ^{①③}	35.56± 1.68 ^{①③}
化瘀通孕方中剂量组	5.49± 0.92 ^{①②③}	16.87± 2.35 ^{①③}	12.78± 1.97 ^{①②③}	2.44± 0.57 ^{①③}	32.12± 1.00 ^{①②③}
化瘀通孕方高剂量组	4.59± 0.80 ^{①②}	13.98± 1.57 ^{①②}	10.40± 1.81 ^{①②}	2.21± 0.26 ^{①②}	30.24± 1.45 ^{①②}

与模型组比较, ① $P < 0.01$; 与西药组比较, ② $P < 0.05$; 与化瘀通孕方高剂量组比较, ③ $P < 0.05$

细胞间黏附分子(ICAM-1)是炎性细胞的一种趋化因子, 主要存在于血管内皮细胞, 在正常情况下极少出现, 当受到炎性细胞因子, 如 IL-1、TNF- α 等刺激后, 可广泛出现在造血和非造血系统来源的多种细胞表面^[3]。ICAM-1 与其配体白细胞整合素亚家族淋巴细胞功能相关抗原结合, 可介导细胞间黏附和信号传递, 参与细胞-细胞、细胞-基质细胞、效应细胞-靶细胞的相互作用, 尤其与炎症过程密切相关, 是免疫激活和应答的重要早期指标^[4]。本研究发现 ICAM-1 参与了输卵管阻塞性不孕症的病理过程。ICAM-1 蛋白在空白组输卵管上皮细胞中未见表达, 模型组大鼠 ICAM-1 蛋白表达较高; 经 30 天的治疗后, 化瘀通孕方高、中、低各剂量组及西药组大鼠 ICAM-1 蛋白表达较模型组降低, 特别以化瘀通孕方高剂量组下降最为明显($P < 0.01$), 与化瘀通孕方的剂量呈正相关的趋势。化瘀通孕方能起到抑制炎症引起的 ICAM-1 蛋白在输卵管组织的异常表达来阻断或减轻炎症及组织损伤, 减少输卵管组织中炎性细胞的募集、浸润, 改善输卵管的结构和功能, 达到治疗炎症阻塞性不孕的效果。

现代有研究指出^[5], 炎症是机体对各种损伤的反应, 炎症过程中, 局部受刺激后引起组织损伤, 并激活化学介质, 血管通透性增加, 血浆渗出, 白细胞向炎症局部趋化, 肉芽形成, 结缔组织增生, 致使血液黏滞度增加, 局部血管通畅度下降, 血液循行不畅甚至不通。全血黏度、红细胞刚性指数、红细胞聚集指数、红细胞压积等都是血液流变学指标, 被广泛用于各类实验室, 以作为评价血液黏稠度的重要依据, 具有较高的准确性。在输卵管炎症阻塞性不孕大鼠机体上, 这几个指标会呈现出一定程度的提高。本实验结果显示, 采用化瘀通孕方治疗的大鼠和西药组大鼠的血液流变学指标均较模型组明显降低,

差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与应用头孢唑啉和甲硝唑治疗的西药组大鼠比较, 化瘀通孕方高、中剂量组大鼠血液流变学指标显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果显示, 化瘀通孕方能够改善不孕症模型大鼠的血液流变学指标, 同时, 在一定程度上, 随着化瘀通孕方剂量的增高, 成正相关关系。

综上所述, 化瘀通孕方能明显改善大鼠血液流变学指标, 并可以降低输卵管 ICAM-1 蛋白的表达, 为临床治疗输卵管炎症阻塞性不孕症提供可靠的实验依据。

[参考文献]

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 351.
- [2] 赵广兴, 工春田, 马宝璋, 等. 大鼠输卵管炎症性不孕症模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1): 23-26.
- [3] 朱艳宾. 人类输卵管上皮细胞内黏附分子-1 的表达及其对淋巴细胞黏附的介导作用[J]. 国外医学: 妇产科学分册, 2001, 28(3): 182.
- [4] 杨名诗, 陈垦, 龙友明, 等. 细胞间黏附分子-1 在大鼠炎症性肠病模型中的表达研究[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(3): 271-274.
- [5] 杨新鸣, 侯丽辉, 吴效科. 妍婷颗粒对输卵管炎症性不孕大鼠模型 ICAM-1 的影响[J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2006, 13(2): 1-4.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)