

加种植体—骨界面的 OBN, 提高骨结合的质量, 具有一定的临床治疗和推广价值。

#### [参考文献]

- [1] 曹采方. 牙周病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 351.
- [2] Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases [J]. Journal of Clinical Periodontology, 2008, 5(8): 286-291.
- [3] Quirynen M, De Soete M, Van Steenberghe D. Infectious risks for oral implants: A review of the

literature [J]. Clin Oral Implants Res, 2002, 13 (1): 1-19.

- [4] Leita JAO, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, et al. Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR) [J]. Braz Oral Res, 2005, 19(1): 52-57.
- [5] 邓伟民, 贺扬淑, 沈有高等. 补肾壮骨中药对去势雌性大鼠血清内骨代谢激素的影响[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 3-4.

(责任编辑: 马力)

## 子宫内膜异位症不孕小鼠水通道蛋白表达及莪棱胶囊的干预作用

黄绮丹<sup>1</sup>, 黄海定<sup>1</sup>, 吴会东<sup>2</sup>, 黄国红<sup>1</sup>, 廖美金<sup>1</sup>, 邓时贵<sup>1</sup>

1. 广东省中医院, 广东 广州 510120; 2. 广东省第二人民医院, 广东 广州 510317

**[摘要]** 目的: 探讨子宫内膜异位症 (EMTS) 不孕小鼠水通道蛋白 (AQP) 表达的差异性及莪棱胶囊的干预作用。方法: 将小鼠随机分为正常组、模型组、达那唑组、莪棱胶囊组。正常组与模型组: 灌胃蒸馏水 0.25 mL/10 g。达那唑组: 灌胃达那唑 0.4 g/(kg·d)。莪棱胶囊组: 灌胃莪棱胶囊 4 g/(kg·d)。共 30 天。用直接化学发光法测定血清雌二醇水平, 用 RT-PCR 技术测定各组子宫内膜组织 AQP mRNA 表达。结果: 造模后小鼠雌二醇水平增高, 模型组与正常组比较, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。达那唑组和莪棱胶囊组雌二醇接近正常组, 与正常组比较, 差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。模型组、达那唑组、莪棱胶囊组 AQP<sub>1</sub> 的相对表达量接近正常组, 但组间比较, 差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。模型组、达那唑组、莪棱胶囊组 AQP<sub>2</sub> 的相对表达量较正常组有所降低, 但组间比较, 差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 子宫内膜异位症不孕小鼠血清雌二醇水平增高, 达那唑和莪棱胶囊均可降低雌二醇水平; 子宫内膜异位症不孕小鼠水通道蛋白表达以及莪棱胶囊等的干预作用尚需进一步的研究。

**[关键词]** 子宫内膜异位症 (EMTS); 雌二醇; 水通道蛋白 (AQP); 莪棱胶囊

**[中图分类号]** R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 07-0196-04

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2014.07.091

## Aquaporin Expression in Endometriosis Infertile Mice and Intervention Effect of *Eleng* Capsule

HUANG Qidan, HUANG Haiding, WU Huidong, et al

**Abstract:** Objective: To investigate the aquaporin (AQP) expression in endometriosis infertile mice and the intervention effect of *Eleng* capsule. Methods: The mice were divided into four groups, namely normal group, model group, Danazol group and *Eleng* group. The normal group and the model group were administrated with distilled water, 0.25 mL for per 10 g of body weight, and Danazol group was administrated with Danazol, 0.4 g for per kilogram of body weight, while *Eleng* group was administrated with *Eleng* capsule, 4 g for per kilogram of body weight. The treatment course lasted 30 days. The serum estradiol level was measured by direct chemiluminescence method, and the mRNA expression of aquaporins in the

**[收稿日期]** 2014-02-11

**[基金项目]** 广东省科技厅项目 (编号: 2009B060300015); 广州中医药大学创新基金项目 (编号: KAB111112K41)

**[作者简介]** 黄绮丹 (1977-), 女, 主治中医师, 主要从事中医内科工作。

**[通讯作者]** 邓时贵, E-mail: dengshigui@aliyun.com.

endometrial tissue was measured by RT-PCR technique. Results: The level of serum estradiol in the model group was higher than that in the normal group ( $P < 0.05$ ). Serum estradiol level in both Danazol group and *Eleng* group was close to that in the normal group ( $P > 0.05$ ). AQP<sub>1</sub> expression level in model group, Danazol group and *Eleng* group was similar to that in the normal group ( $P > 0.05$ ), while AQP<sub>2</sub> expression level was decreased, the inter-group difference being insignificant ( $P > 0.05$ ). Conclusion: Endometriosis infertile mice have higher level of serum estradiol, and Danazol group and *Eleng* capsule have counteraction on the estradiol level. Further research is still required to explore the APQ expression and the intervention effect of *Eleng* capsule.

Keywords: Endometriosis; Estrogen; Aquaporin; *Eleng* capsule

子宫内膜异位症(Endometriosis, EMTS)是指具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆黏膜以外的其他部位所致的疾病。EMTS 是妇女不孕的主要病因之一<sup>[1]</sup>,但具体机制还不清楚。莪棱胶囊是本院妇科专家司徒仪教授的经验方,有活血理气、化瘀消瘕散结之功效,主治 EMTS。已有研究表明莪棱胶囊能有效治疗气滞血瘀型 EMTS,缓解痛经、缩小卵巢巧克力囊肿<sup>[2]</sup>,对 EMTS 的发生及大小有显著的抑制作用<sup>[3]</sup>,可显著提高 EMTS 大鼠胎鼠的成活率,下调 Eotaxin/CCR3 表达等<sup>[4]</sup>,但其确切的分子机制尚不明确。本实验采用 RT-PCR 等技术,从水通道蛋白(AQP)差异性表达角度,观察 EMTS 不孕小鼠 AQP 表达,研究 EMTS 病理微环境生理改变及其致不孕作用机制,并观察莪棱胶囊的干预作用,为探讨莪棱胶囊作用的分子机制提供实验室依据。

## 1 材料与方法

1.1 动物 雌性 NIH 小鼠, SPF 级,体重 20~22 g,质量合格证号为 0100052;雄性 NIH 小鼠, SPF 级,体重 25~30 g,质量合格证号为 0109012。均购自广东省医学实验动物中心。

1.2 试剂 莪棱胶囊,每粒 0.45 g,批号:101203,广东省中医院生产;达那唑,每粒 0.1 g,批号:20100901,江苏联环药业股份有限公司产品;乙烯雌酚注射液,每支 1 mL,批号:20100504,上海通用药业有限公司产品;雌二醇测定试剂盒,批号:127021,西门子医学诊断产品(上海)有限公司生产。RNA 提取试剂(Trizol),批号:24404,Invitrogen 公司产品;RT-PCR 试剂,批号:8211102,Invitrogen 公司产品;逆转录酶,批号:805381,Invitrogen 公司产品;dNTPs,批号:813416,Invitrogen 公司产品;DEPC,批号:A4302-1,美国 Sigma 公司产品;RNasin,批号:265972,美国 Promega 公司产品。

1.3 仪器 ADVIA® Centaur XP 全自动化学发光免疫分析仪,德国西门子;紫外分光光度计(UV-1206),日本 SHIMODZU 公司产品;水平式电泳仪,北京东方仪器厂产品;GDS7600 凝胶扫描系统(DF-23B),英国 UVP 公司产品;Strata gene Mx3000P Real time PCR 仪,美国 Agilent 公司产品。

1.4 造模方法 EMTS 小鼠模型的构建<sup>[5]</sup>: SPF 级 NIH 小鼠,

动物麻醉消毒后分离左侧子宫,置于 4℃ 的生理盐水中,用眼科镊夹住近卵巢端子宫角,用 4 号针头从近输卵管端逐渐向子宫颈方挤压滚动,直至子宫内膜呈长条状完整滑出。3 段等分子宫内膜:每段 1 cm,并分别接种于腹腔壁、右侧子宫体和小肠系膜。最后缝合切口,术毕动物自然苏醒。术后第 2 天每只小鼠肌肉注射乙烯雌酚 0.03 mL,以促种植内膜的生长。接种术后第 7 天每只小鼠肌肉注射乙烯雌酚 0.03 mL。接种术后 160 天,雄:雌动物按 1:3 的比例同笼交配 1 周,观察 15 天,凡不孕者纳入实验对象,即为 EMTS 不孕鼠。

1.5 实验分组 接种术后 175 天,筛选入围实验动物进行随机分组(每组 10 只,共 40 只):正常组、模型组、达那唑组、莪棱胶囊组。正常组与模型组:灌胃蒸馏水 0.25 mL/10 g,30 天。达那唑组:灌胃达那唑水溶液 0.4 g/(kg·d),30 天。莪棱胶囊组:灌胃莪棱胶囊水溶液 4 g/(kg·d),30 天。严格无菌操作,在末次给药后 1 h,麻醉小鼠,取血。开腹,分别正常子宫内膜和异位内膜,所有内膜分装置 -80℃ 保存备用。

1.6 雌二醇测定 采用直接化学发光法,于 ADVIA® Centaur XP 全自动化学发光免疫分析仪测定所取血清的雌二醇。

1.7 内膜组织水通道蛋白 mRNA 表达 每组随机取 8 只,行 AQP mRNA 测定。

1.7.1 引物的设计和合成 从 GenBank 中检索出根据生物信息学的分析,设计针对小鼠 AQP<sub>1</sub>、AQP<sub>2</sub> 和 GAPDH 基因的 Real time PCR 检测的引物,选择小鼠 GAPDH 基因作为内参(由上海 invitrogen 公司合成)。AQP<sub>1</sub> F: 3'-GCCTTGTCTGGGGCAGTAAT-5', R: 3'-CTAAGGTGGGGGACTTG CTG-5'; AQP<sub>2</sub> F: 3'-AGGTGC ATAGAGACCACCCT-5', R: 3'-AACACGCAGAGATGGACG AG-5'; GAPDH F: 3'-CGTGCCGCTGGAGAAACCTG-5', R: 3'-AGAGTGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-5'。

1.7.2 组织总 RNA 的提取 用 Trizol 法,按照说明书从小鼠内膜组织中提取 RNA。

1.7.3 RT-PCR 实验 以 2 μg 总 RNA 为模板,按照 PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TAKARA)说明书配制逆转录反应体系,总体系为 20 μL,合成 cDNA 第一链,

并收集备用。常规 RT-PCR 扩增目的基因(AQP<sub>1</sub>、AQP<sub>2</sub> 和 GAPDH 基因,下同),按照 93℃, 3 min; 93℃, 30 s, 57℃, 45 s, 72℃, 45 s, 40 循环; 72℃, 10 min; 4℃, 保存, 扩增目的基因。反应结束后, 取 5 μL 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7.4 RT-PCR 检测 AQP<sub>1</sub>、AQP<sub>2</sub> 和 GAPDH 基因方法的建立 荧光定量 RT-PCR 的条件优化, 对 Mg<sup>2+</sup>、引物等浓度进行优化。Real time PCR 扩增的反应体系为 25 μL(TAKARA SYBR Premix Ex Taq kit)。按照: 95℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s, 40 循环, 用 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行荧光定量 PCR 实验。数据分析采用目的基因/内参基因的方法进行表达水平的分析。

1.8 统计学方法 使用 PASW.Statistics.V18.0 统计软件, 其中 AQP 实验结果采用  $t$ -Ct 法进行分析。计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  描述, 2 组样本间均数比较采用独立样本  $t$  检验(并做方差齐性检验)。

## 2 结果

2.1 各组小鼠雌二醇含量比较 见表 1。造模后小鼠雌二醇水平增高, 模型组与正常组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。达那唑组和莪朮胶囊组接近正常组, 与正常组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 1 各组小鼠雌二醇含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量	雌二醇含量(pg/mL)
正常组	10	0.25 mL/10 g	35.61 ± 5.26
模型组	10	0.25 mL/10 g	42.94 ± 8.51 <sup>①</sup>
达那唑组	10	0.4 g/kg	37.81 ± 5.71
莪朮胶囊组	10	4.0 g/kg	39.02 ± 7.59

与正常组比较, ① $P < 0.05$

2.2 各组小鼠 AQP<sub>1</sub>、AQP<sub>2</sub> 表达比较 见表 2。模型组、达那唑组、莪朮胶囊组 AQP<sub>1</sub> 的相对表达量在数值上都较正常组有增高的趋势, 但组间比较差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。模型组、达那唑组、莪朮胶囊组 AQP<sub>2</sub> 的相对表达量在数值上都较正常组有所降低, 但组间比较, 差异均无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组小鼠 AQP<sub>1</sub>、AQP<sub>2</sub> 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量	AQP <sub>1</sub>	AQP <sub>2</sub>
正常组	8	0.25 mL/10 g	1.13 ± 0.44	1.19 ± 0.75
模型组	8	0.25 mL/10 g	1.31 ± 0.75	0.99 ± 0.43
达那唑组	8	0.4 g/kg	1.41 ± 0.33	1.01 ± 0.32
莪朮胶囊组	8	4.0 g/kg	1.41 ± 0.20	0.76 ± 0.16

## 3 讨论

EMTS 是雌激素依赖性疾病, 雌激素可以直接刺激异位病灶的细胞增殖, 还可刺激多种因子参与 EMTS 的发病过程<sup>[6]</sup>。

达那唑是一种合成甾体 17- $\alpha$  乙炔睾酮的衍生物, 主要通过抑制下丘脑 GnRH 的产生, 导致卵巢功能暂时受到抑制, 亦可直接影响卵巢甾体激素的合成或竞争性与雌孕激素受体结合, 导致正常位置与异位子宫内膜萎缩<sup>[7]</sup>。莪朮胶囊有活血理气、化瘀消癥散结之功效, 但其确切的分子机制尚不明确。本研究结果提示, 模型组雌二醇水平增高, 达那唑组和莪朮胶囊组雌二醇水平均有所下降, 这和既往的研究结果一致<sup>[8]</sup>。

AQP 家族是广泛存在于原核和真核细胞膜上的一组水通透性蛋白。一些研究发现, 子宫内膜疾病常伴随 AQP 的异常表达<sup>[9,10]</sup>, AQP 在子宫上的表达与性激素有相关性, AQP<sub>1</sub> 表达于子宫内膜血管上皮, 在增殖期和分泌期均有表达, AQP<sub>2</sub> 的表达明显受到雌二醇的调节<sup>[12]</sup>。EMTS 病灶的存活和生长依赖于足够的血液供应, 因此, 血管生成在 EMTS 的发病中起重要作用。在 EMTS 患者血液或组织中多种细胞和分子, 如 VEGF、碱性成纤维母细胞生长因子、血管抑素等, 不同程度影响 EMTS 病灶中新生血管形成。Wood PA 等<sup>[13]</sup>报道, 在整个月经周期中, EMTS 患者在位子宫内膜中的微血管密度高于非 EMTS 妇女的子宫内膜。AQP 亦与新生血管形成具有相关性, AQP<sub>1</sub> 广泛表达于血管内皮细胞。Saadoun S 等<sup>[14]</sup>发现, 在 AQP<sub>1</sub> 缺失小鼠皮下和颅内肿瘤生长较野生型缓慢, 在肿瘤内新生血管生长减少, 导致肿瘤广泛坏死。综上所述, AQP 与 EMTS 可能具有相关性。笔者认为 EMTS 的产生一定有其严谨的物质基础和适宜的生理微环境: H<sub>2</sub>O 和 H<sub>2</sub>O 代谢系统, 也非常符合 EMTS 基本病机是血瘀, 其所见的不孕、痛经、月经不调等均由瘀血蓄积下焦、阻滞胞宫经络所致的中医理论观点。AQP 介导的水代谢运动可能在 EMTS 病理生理微环境和 H<sub>2</sub>O 代谢系统构建、血管新生过程中起重要作用, 探讨 EMTS AQP 差异表达与不孕的相关性具有重要意义。本研究结果提示: 模型组、达那唑组、莪朮胶囊组 AQP<sub>1</sub> 的相对表达量在数值上都较正常组有所增高, 而 AQP<sub>2</sub> 表达有所降低。AQP 在 EMTS 不孕小鼠的作用尚需进一步的研究。

## [参考文献]

- [1] Menzies- Gow A, Robinson DS. Eosinophil chemokines and chemokine receptors: Their role in eosinophil accumulation and activation in asthma and potential as therapeutic targets[J]. J Asthma, 2001, 38(8): 605-613.
- [2] 黄艳辉, 曹立幸, 司徒仪. 莪朮胶囊治疗气滞血瘀型子宫内膜异位症临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(3): 46-48
- [3] 邓时贵, 巫志峰, 李伟英, 等. 子宫内膜异位症大鼠孕娠状况及中药莪朮胶囊的影响[J]. 现代医院, 2007, 7(3): 29-31.

- [4] 孙静, 张维彬, 韩凌, 等. Eotaxin/CCR3 在子宫内膜异位症不孕小鼠的表达及中药莪棱胶囊的干预作用[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(4): 61- 63.
- [5] 邓时贵, 张娴, 巫志峰, 等. 小鼠子宫内膜异位症模型的建立及其异位内膜蛋白质的差异表达谱分析[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(7): 535- 538.
- [6] Morgan KG, Wilkinson N, Buckley CH. Angiogenesis in normal, hyperplastic and neoplastic [J]. J Pathol, 1996, 179(3): 317- 320.
- [7] 李诵弦. 实用妇科内分泌学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 245.
- [8] 程兰, 曹立幸. 莪棱胶囊防治子宫内膜异位囊肿复发的临床观察[J]. 新中医, 2008, 40(10): 63
- [9] Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumor suppressor [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(5): 350- 361.
- [10] Yang X, Wod PA, Oh EY, et al. Down regulatin of circadian clock gene Period 2 accelerates breast cancer growth by altering its daily growth rhythm [J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 117(2): 423- 431.
- [11] Kayanagi S, Kuramoto Y, Nakagawa H, et al. A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells [J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7277- 7283.
- [12] Chen- Good speed M, Lee CC. Tumor suppression and circadian function [J]. J Biol Rhythms, 2007, 22(4): 291- 298.
- [13] Wood PA, Yang X, Taber A, et al. Period 2 mutation accelerates ApcMin/+ tumorigenesis [J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(11): 1786- 1793.
- [14] Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara- Chikuma M, et al. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin- 1 gene disruption [J]. Nature, 2005, 434(7034): 786- 792.

(责任编辑: 马力)

## 宫炎平胶囊联合抗生素治疗慢性盆腔炎 54 例临床观察

周良妃

嵊州市甘霖镇中心卫生院, 浙江 嵊州 312462

**[摘要]** 目的: 观察宫炎平胶囊联合抗生素治疗慢性盆腔炎的疗效及安全性。方法: 将 108 例慢性盆腔炎患者随机分为 2 组各 54 例, 对照组于月经期给予盐酸左氧氟沙星注射液、替硝唑氯化钠注射液静脉滴注治疗, 观察组在对照组治疗基础上给予宫炎平胶囊口服。治疗 3 个月经周期。比较 2 组的临床疗效。结果: 治疗 3 月后, 总有效率观察组 92.59%, 对照组 77.78%, 2 组总有效率比较, 差异有显著性意义 ( $P < 0.05$ )。2 组用药期间血常规、尿常规、肝肾功能均无明显异常。结论: 宫炎平胶囊联合抗生素治疗慢性盆腔炎的临床疗效优于单用抗生素, 且无明显不良反应。

**[关键词]** 慢性盆腔炎; 中西医结合疗法; 宫炎平胶囊

**[中图分类号]** R 711.33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256- 7415 (2014) 07- 0199- 02

**DOI:** 10.13457/j.cnki.jncm.2014.07.092

慢性盆腔炎是育龄期妇女最为常见的妇科疾病之一, 治疗相对棘手, 病情易反复发作。为探讨提高慢性盆腔炎疗效的新方法, 本院在常规抗生素治疗外另予患者宫炎平胶囊口服, 现将观察结果报道如下。

### 1 临床资料

以 2011 年 12 月~2013 年 5 月于本院就诊的 108 例慢性盆腔炎患者为观察对象。所有患者未闭经, 符合慢性盆腔炎相关诊断标准, 有肛门坠胀不适、腰骶部酸痛且劳累、性生活后

**[收稿日期]** 2014-03-16

**[作者简介]** 周良妃 (1970-), 女, 副主任医师, 研究方向: 妇产科。