

◆实验研究◆

补肾中药对药物流产大鼠子宫内膜修复作用的研究

王慧, 谢波, 陈小平, 饶优花

广东省第二中医院, 广东 广州 510095

[摘要] 目的: 探讨补肾药复方左归胶囊对于药物流产大鼠子宫内膜的修复作用, 为临床用药提供实验依据。方法: 采用妊娠大鼠灌服米非司酮和米索前列醇造成完全流产模型 48 例, 随机分为空白组、西药组、祛瘀组、补肾组, 于流产次日开始分别灌胃相应药物 5 天, 用药结束后观察各组药物流产大鼠血清雌二醇 (E_2)、孕酮 (P) 及子宫内膜组织内皮生长因子 (VEGF) 的变化。结果: 与空白组比较, 祛瘀组和补肾组 VEGF 和 E_2 的表达明显升高, 西药组 E_2 含量明显升高, 补肾组 P 含量明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与西药组比较, 祛瘀组和补肾组 VEGF 的表达明显升高, 补肾组 P 含量降低更明显, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与祛瘀组比较, 补肾组 E_2 含量升高的更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 补肾药复方左归胶囊可提高药流大鼠雌激素水平, 降低孕激素水平, 提高子宫内膜组织 VEGF 含量, 达到促进子宫内膜修复的作用。

[关键词] 药物流产; 子宫内膜; 补肾中药; 雌二醇 (E_2); 孕酮 (P); 内皮生长因子 (VEGF); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 02-0001-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.001

Repair Effect of Chinese Reinforcing Kidney Herbs on Endometrium of Medical Aborting Rats

WANG Hui, XIE Bo, CHEN Xiaoping, RAO Youhua

Abstract: Objective: To discuss mechanism of action of reinforcing kidney herbs compound zuogui capsule on improving endometrium repair after medical abortion, and provide experimental basis for clinical medication. Methods: Forty-eight pregnant rats were gavaged with mifepristone and misoprostol to established rats model of complete abortion. Divided into blank group, western medicine group, removing stasis group and kidney reinforcing group, started gavaging with corresponding drug for 5 days from the second day of abortion. After finishing medication, observed changes of estradiol (E_2), progesterone (P), vascular endothelial cell growth factor (VEGF) of endometrium tissue in abortion rats of each group. Results: Compared with blank group, expression of VEGF and E_2 in removing stasis group and kidney reinforcing group, E_2 content in western medicine group were all significantly increased, P content in kidney reinforcing group was obviously decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with western medicine group, expression of VEGF and E_2 in removing stasis group and kidney reinforcing group were significantly increased, P content in kidney reinforcing group was decreased more obviously ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with removing stasis group, E_2 content in kidney reinforcing group was increased more obviously ($P < 0.01$). Conclusion: Kidney reinforcing drugs compound zuogui capsule can improve E_2 repair by improving estrogen level, decreasing P level of medical abortion rats, and increasing content of VEGF of endometrium.

Keywords: Medical aborting; Endometrium; Kidney reinforcing drugs; Estradiol (E_2); Progesterone (P); Vascular endothelial cell growth factor (VEGF); Animal experiment; Rats

近年来人工流产发生率逐年增高, 其中反复流产、低龄化的现象日趋严重, 为降低反复人工流产率, 减少人流术后并发

症, 我们采用补肾药复方左归胶囊用于人工流产后促进子宫内膜修复, 取得了良好的临床疗效。本研究主要通过动物实验

[收稿日期] 2016-07-12

[作者简介] 王慧 (1983-), 女, 主治中医师, 研究方向: 月经病及不孕症。

观察补肾药复方左归胶囊对药流后大鼠血清雌二醇(E₂)、孕酮(P)及子宫内膜组织内皮生长因子(VEGF)的影响,探讨补肾药复方左归胶囊用于流产后促进子宫内膜修复的作用机理,为临床用药提供实验依据。

1 材料与方

1.1 实验动物 清洁级雌性SD大鼠48只,雄性大鼠24只,体质量(200±5)g,性成熟而未生育,均以标准饲料饲养。动物合格证号:SCXK(粤)2013-0002。

1.2 实验药品 ①复方左归胶囊:粤制剂准字Z20090022,批号20130202,由广东省第二中医院制剂室提供。②妈富隆:由欧加农公司生产,国药准字H20090423。③米非司酮:由浙江仙琚制药股份有限公司生产,国药准字H10950347。④米索前列醇:由湖北葛店人福业有限责任公司生产,国药准字H20073696。生化汤组方:全当归15g,川芎、炮姜各6g,桃仁9g,炙甘草3g。由广东省第二中医院药剂科提供相应计量颗粒剂,将上述药混合,蒸馏水调配成每毫升含生药0.315g的药液,装瓶低温冷藏备用。

1.3 实验试剂 0.01M的磷酸缓冲盐溶液(pH 7.4),0.01M枸橼酸缓冲盐溶液(pH 6.0),一抗(VEGF血管内皮生长因子)、免疫组化试剂盒、抗体稀释液、DAB、Mayor's苏木素(博士德生物技术有限公司,产品编号分别为:BA0407、SA1020、AR1016、AR1022、AR0005)。雌、孕激素抗体检测试剂盒(上海晨易生物科技有限公司CK-E30608R)。

1.4 实验仪器 天平、大鼠台架、止血钳、组织剪、手术刀片及刀柄、有齿及无齿镊、长颈(3~4cm)硬质玻璃滴管。飞鸽牌离心机(TDL-5-4)、德国莱卡1512型切片机、重庆奥特BK-DM500数码生物显微镜、韩国大龙多通道移液器(5~50 μL)、韩国大龙单通道移液器(2~20 μL)、韩国大龙单通道移液器(10~100 μL)、韩国大龙单通道移液器(100~1 000 μL)、上海一恒有限公司DZF-6030A型恒温箱、上海永创医疗器械有限公司SM800型全自动酶标仪。

1.5 造模方法^[1] 将清洁级大鼠雌雄2:1合笼后,每天上午8:00作雌鼠阴道涂片检查,以发现精子的当天为妊娠第1天。所有大鼠均于妊娠第7天早晨8:00按体质量灌胃,给予米非司酮16.6 mg/kg,于18:00给予米索前列醇100 μg/kg灌胃1次,造成大鼠药物流产模型。

1.6 给药方法 将48只流产大鼠随机分为4组:①空白组:流产次日开始,予生理盐水2 mL灌胃,每天1次,连续灌胃

5天。②西药组:流产次日开始,予妈富隆(去氧孕烯0.0135 mg/kg,炔雌醇2.7 μg/kg)灌胃,每天1次,连续灌胃5天。③祛瘀组:流产次日开始,予生化汤3.15 g/kg灌胃,每天1次,连续灌胃5天。④补肾组:流产次日开始,予复方左归胶囊0.454 g/kg灌胃,每天1次,连续灌胃5天。

1.7 药流后大鼠E、P含量测定 用药结束后次日(妊娠第13天)取眼眶静脉血,收集血液后,3 000转离心10 min,将血清和红细胞迅速小心分离,将血清分装冻存于-20℃冰箱,避免反复冻融。雌、孕激素的检测按照试剂盒说明书进行。

1.8 药流后大鼠子宫内膜VEGF表达的测定 用药结束后(妊娠第13天)解剖大鼠,取子宫组织,立即置入10%中性福尔马林中固定,免疫组化测定子宫内膜生长因子(VEGF)。方法如下:①切片脱蜡;②3%过氧化氢20 min,蒸馏水洗3次;③微波抗原修复;④滴加5% BSA封闭液,室温20 min,甩去多余液体,不洗;⑤滴加兔抗人一抗(VEGF),37℃水浴箱孵育1 h, PBS洗3次;⑥滴加生物素化山羊抗兔IgG,室温30 min, PBS洗3次;⑦滴加SABC复合物,室温20 min, PBS洗3次;⑧DAB镜下控制显色,Mayor's苏木素复染,脱水、透明、封片。读片时每张片子取5个区域拍照,应用IPP 6.0病理图象分析软件测定各组免疫阳性产物的光密度值(OD值),每张切片随机测定5个视野,同时测定同一张切片上组织的OD值作为背景,免疫反应产物的OD值减去背景OD值得到校正的OD值(COD值),即为各阳性产物的实际吸光度值,然后求平均值作为该样本的COD值。用COD值进行分析和比较,以避免染色过程中的非特异性染色等导致的误差。

1.9 统计学方法 采用SPSS17.0统计分析软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,用t检验,计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠子宫内膜生长因子(VEGF)表达比较 见图1和表1。光镜下观察各组大鼠子宫内膜均有VEGF的表达,主要表达在大鼠子宫内膜腔上皮细胞、基质或蜕膜细胞的胞质中,实验结果见图1。A:空白组光镜下显浅黄色;B:西药组光镜下显浅黄色;C:祛瘀组光镜下显色棕黄色;D:补肾组光镜下显色深褐色。与空白组比较,祛瘀组和补肾组VEGF的表达明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与西药组比较,祛瘀组和补肾组VEGF的表达明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

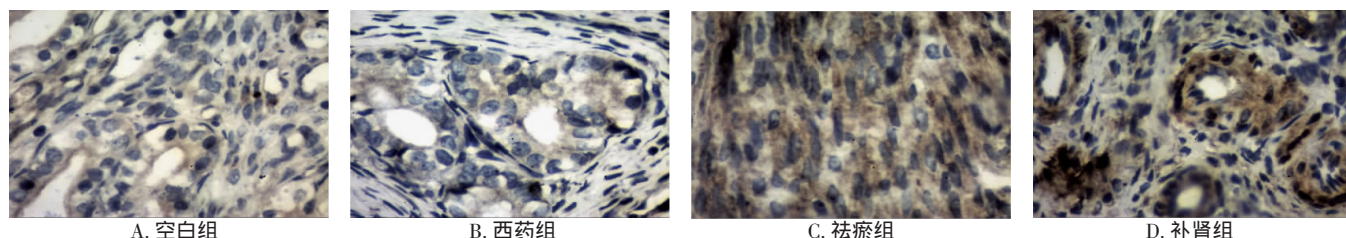


图1 各组大鼠子宫内膜VEGF免疫组化比较(×400)

表1 各组大鼠 VEGF 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF(COD)
空白组	12	0.33± 0.27
西药组	12	0.24± 0.11
祛瘀组	12	0.45± 0.13 ^{①②}
补肾组	12	0.53± 0.09 ^{①②}

与空白组比较, ① $P < 0.05$; 与西药组比较, ② $P < 0.01$

2.2 各组大鼠血清 E_2 、P 含量比较 见表 2。与空白组比较, 西药组、祛瘀组、补肾组 E_2 含量明显升高, 补肾组 P 含量明显降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与西药组比较, 补肾组 P 含量降低更明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与祛瘀组比较, 补肾组 E_2 含量升高的更明显, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表2 各组大鼠血清 E_2 、P 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	E_2 (pmol/L)	P(ng/mL)
空白组	12	166.58± 36.99	18.53± 15.50
西药组	12	235.20± 17.16 ^①	22.48± 15.57 ^①
祛瘀组	12	200.34± 31.19 ^①	17.58± 13.37
补肾组	12	232.68± 21.22 ^{①③}	9.78± 12.39 ^{①②}

与空白组比较, ① $P < 0.01$; 与西药组比较, ② $P < 0.05$; 与祛瘀组比较, ③ $P < 0.01$

3 讨论

药物流产后, 米非司酮竞争孕激素受体促使局部微环境改变, 引起蜕膜血管内皮细胞局部明显减少, 微血管形成障碍, 致蜕膜坏死、脱落、出血, 坏死的蜕膜组织易引起子宫内膜炎症反应。米非司酮具有抗雌激素特性, 使药流后的子宫内膜修复出现障碍, 子宫的敏感性降低。

雌激素是一类重要的女性激素, 包括雌酮、雌二醇等。雌二醇主要由卵巢分泌。关硕的实验研究证实, 少量的雌激素可以修复受损的子宫内膜^[2]。尤昭玲等研究发现, 药物流产大鼠模型雌激素(E)、孕激素(P)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)均降低, 可能影响产后子宫内膜的修复, 通过升高 E、ER、PR 水平, 降低 P 水平, 可促进产后子宫内膜修复^[3]。研究发现药物完全流产后, 卵巢妊娠黄体退化不全与雌激素水平过低皆可导致流产后阴道流血, 机体黄体退化不全, 机体孕激素水平过高, 则流产后阴道流血不止, 内膜修复障碍^[4]。

血管内皮生长因子(VEGF)是二聚葡萄糖蛋白, 具有调节血管内皮生长活性, 增加血管通透性作用^[5]。其中子宫内膜 VEGF 来源于内膜中的腺上皮细胞、间质细胞、血管内皮细胞等^[6]。Shifren 检测 VEGF mRNA 提示 VEGF 参与子宫内膜血

管的生成和通透性的改变, 促进子宫内膜修复^[7]。

复方左归胶囊是广东省第二中医院院内制剂, 在临床中广泛应用于绝经期综合症、青春期功血、月经不调等, 该药最早应用于 1996 年, 对于中医辨证属于肾虚型青春期无排卵功血具有很好的临床疗效。组方中熟地黄、菟丝子、山萸肉、山药、续断、白芍、旱莲草、女贞子等诸药合用, 共奏补肾填精之功。本研究结果显示: 雌、孕激素在补肾组与西药组间比较无统计学差异; 雌激素在补肾组明显高于空白组及祛瘀组; 孕激素在补肾组明显低于空白组及祛瘀组; 子宫内膜组织 VEGF 在祛瘀组与补肾组明显高于空白组。表明补肾药复方左归胶囊不仅可提高药流大鼠雌激素水平, 降低孕激素水平, 且与祛瘀组同样可提高子宫内膜组织 VEGF 含量, 从而诱导新生血管发生, 促进新生血管形成, 达到促进子宫内膜修复的作用, 疗效更为确切。

[参考文献]

- [1] 王晓东, 赵军宁, 张白嘉, 等. 药物致早孕大鼠子宫出血模型的建立[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 182-184.
- [2] 关硕. 小鼠子宫内膜损伤后修复的初步研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [3] 尤昭玲, 曾晶, 游卉, 等. 妇科止血消痛颗粒对药物流产大鼠模型雌孕激素及其受体的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(8): 19-21.
- [4] 张丽, 吴瑞芳, 王振海, 等. 药物流产后功能失调性子宫出血(附 7 例报告)[J]. 中国综合临床, 2003, 19(7): 672-673.
- [5] 胡珈瑞, 陈兴会, D Ghosh. 人体子宫内膜血管内皮生长因子的研究[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2001, 22(2): 145-147.
- [6] 张雯, 朱慧莉, 黄薇. 血管内皮生长因子与子宫内膜血管生成的研究进展[J]. 国外医学: 妇产科学分册, 2004, 31(4): 249-252.
- [7] Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(8): 3112-3118.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)