

蒲灵化瘀止痛方治疗小鼠子宫腺肌病的药效学观察

付先芸¹, 魏绍斌^{2*}

(1. 三峡大学, 湖北 宜昌 443000; 2. 成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] **目的:**以雌激素效应相关因子、血管生成相关因子及其相互作用为靶点,探讨蒲灵化瘀止痛方治疗子宫腺肌病(AM)的作用机制及其量效关系。**方法:**选择8周龄ICR雌鼠,随机分为5组,正常组、模型组、蒲灵化瘀止痛方(蒲方)高、中、低剂量组(60,30,15 g·kg⁻¹),除正常组外,均采用垂体宫腔内移植手术造模,术后3月,形成AM模型。分组给药3月,运用免疫组化技术观察不同用药剂量下雌激素效应相关因子及血管生成相关因子的变化。**结果:**与正常组比较,模型组在位及异位内膜细胞色素P450(P450),环氧化酶-2(COX-2),雌激素受体a(ERa)均显著上调($P < 0.05$)。模型组异位内膜与在位内膜比较,P450显著上调($P < 0.05$)。模型组在位内膜与正常组内膜比较,血小板内皮细胞黏附因子CD31(CD31)显著下降,血管内皮生长因子(VEGF)及基质金属蛋白酶2(MMP-2)显著上调($P < 0.05$)。无论在位或异位内膜,与模型组比较,蒲方各给药组P450,COX-2,ERa均值均显著下降($P < 0.05$),除在位内膜COX-2外,各剂量组之间比较无显著差异。与模型组比较,蒲方给药组在位内膜CD31显著升高($P < 0.01$),高剂量组显著优于其余两组($P < 0.01$);蒲方给药组异位内膜VEGF及MMP-2显著下调,高剂量组显著优于低剂量组($P < 0.05$)。**结论:**改善局部缺血缺氧的作用、对血管生成相关因子的调控程度与蒲灵化瘀止痛方剂量相关,雌激素效应因子与该方剂量无显著相关性。

[关键词] 子宫腺肌病; 雌激素效应相关因子; 血管生成相关因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0156-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014230156

Pharmacodynamic Observation of Puling Huayu Zhitong Prescription on Adenomyosis Mice

FU Xian-yun¹, WEI Shao-bin^{2*}

(1. Three Gorges University, Yichang 443000, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of estrogen effect correlator (EFC) and angiogenesis correlator (AC), and investigate the mechanism of different doses of Puling Huayu Zhitong prescription (PLP) at the different position of the endomembrane in adenomyosis (AM) mice. **Method:** AM mouse model was established by pituitary intrauterine transplant operation. The mice were divided into five groups 3 months after modeling: the normal group, the model group and the high, medium, low dose groups of PLP. The express of EFC and AC was detected by method of immunohistochemistry dyeing. **Result:** Whether in ectopia or eutopia endometrium, the express of cytochrome P450 proteins (P450), cyclo-oxygen-ase 2 (COX-2), estrogen receptor a (ERa) increased dramatically after treatment compared to model group, ther was no significant difference among three therapeutics groups except the express of COX-2 in eutopia endometrium. The expression of platelet endothelial cell adhesion molecule CD31 (CD31) increased notably in eutopia endometrium after treatment compared to the model group, the increased extent of CD31 in high dose group was higher than that in medium and low dose groups. In ectopia endometrium, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix

[收稿日期] 20140206(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273796)

[第一作者] 付先芸, 讲师, 主治医师, 博士, 从事子宫腺肌病研究, Tel:13972031404, E-mail:dinnar1@163.com

[通讯作者] * 魏绍斌, 主任医师, 博士生导师, 从事慢性盆腔疼痛研究, Tel:18981885820, E-mail:weisb1016@yahoo.cn

metalloproteinases-2 (MMP-2) decreased significantly in group high dose group compared to group low dose group after treatment. **Conclusion:** The dose of PLF is correspond with the action of improvement of ischemia, anoxemia, and with the regulation of the AC, which has no associativity with EFC.

[**Key words**] adenomyosis; angiogenesis correlator; estrogen effect correlator

子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 发病率约为 20.9%, 该病常伴有反复发作的进行性加重的痛经, 患者妊娠率远远低于正常人群 (22.2%), 对其生活质量造成了极大的影响。目前研究结果显示, AM 是雌激素依赖性疾病, 雌激素效应异常是子宫腺肌病主要发病机制, 子宫内膜血管向肌层的浸润生长是 AM 发生的必要条件, 雌激素可通过雌激素受体调节机体的多种信号途径, 引起内皮细胞增殖、凋亡、运动、芽生、黏附等特性改变, 两类因子的调节失衡及相互作用共同促进了 AM 的发生与发展。活血化瘀类药物可通过调控病灶血管生成, 有效截断病程、缓解痛经症状及显著减少月经量。本研究引入 AM 小鼠模型, 以血管生成相关因子、雌激素效应相关因子及其相互作用为靶点, 探索蒲灵化瘀止痛方 (行气化瘀法临床验方) 的作用机制及其量效关系。

1 材料

1.1 动物 健康雌性未孕 ICR 小鼠, 健康雄性 ICR 小鼠, 鼠龄 8 周, 体重为 (28 ± 2.5) g, 由四川医学科学院简阳动物实验中心提供。合格证号 SCXK(川) 2010-01

1.2 药物 蒲灵化瘀止痛方 (蒲方) 全方由蒲黄 10 g, 五灵脂 15 g, 制乳香 6 g, 制没药 10 g, 姜黄 15 g, 延胡索 15 g, 三七粉 6 g, 花蕊石 15 g, 水蛭 6 g, 土鳖虫 10 g 组成。该方除三七粉外其余各药物由四川省中医院制剂室制成中药浸膏。煎膏严格按照标准操作规范制备, 制备过程中, 控制带入的不溶性异物, 制备后的煎膏的“不溶物”检查为全部溶化或有微量细小纤维、颗粒; 微生物限度检查符合国家规定标准; 同时通过测定控制煎膏剂相对密度, 以保证药品质量。制备好的煎膏按比例加入三七粉储存于 4 °C 冰箱保存。实验前将中药浸膏用蒸馏水稀释后备用。

1.3 试剂 血管内皮生长因子 (VEGF), 环氧化酶-2 (COX-2), 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2), 细胞色素 P450 (P450) 免疫组化试剂盒 (批号 BAO407, BAO738, BAO659, BAO378), DBA 显色试剂盒 (SA2025), 即用型 SABC 免疫组化试剂盒 (SA1052), 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 雌激素 a 受体 (ERa, Abcam 公司, 批号 847073), 血

小板内皮细胞黏附因子 CD31 (CD31) 单抗 (美国 SANTA 公司, 批号 03042674)。

1.4 仪器 BX50 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司), TK-C1381EG 型数码摄像机 (日本 JVC 公司), LEICA-2015 型切片机 (德国 Microsystems Nussloch 公司), PHY-III 型切片漂烘控温仪、TSJ-Q 型脱水机、BMJ-3 包埋机 (常州中威电子仪器厂), Biomias 型图像分析系统 (四川大学图像图形研究所)。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药 选择 8 周龄 ICR 雌鼠 30 只随机分为 5 组, 每组 6 只, 除正常组外均采用小鼠同种异体垂体宫腔内移植法造模: 雌鼠 ip 3% 戊巴比妥钠 $30 \sim 35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉, 分层切开皮肤层及皮下肌层, 在膀胱下找到子宫分叉处; 雄鼠处死后开颅取出垂体, 混合少许生理盐水, 将垂体生理盐水悬浊液约 0.5 ~ 1 mL 于自制套管针头内, 针头穿刺进入雌鼠右侧子宫内后, 利用套管针内芯将垂体生理盐水悬浊液缓慢推入宫腔, 腹腔内滴入庆大霉素溶液 0.25 mL (1 万 U) 预防感染, 关腹。术后饲养 3 月后, 分组给药, 正常组及模型组 ig 蒸馏水, 蒲方高、中、低剂量组 ig 蒲方浸膏稀释后水溶液 (60, 30, $15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 给药剂量按照体表面积换算法计算。每日 1 次, 共给药 3 个月。

2.2 标本采集与处理方法 于末次给药后 24 h, 颈椎脱臼处死小鼠, 立即剖腹取出右侧子宫标本置于 10% 中性福尔马林液中固定保存, 48 h 后取出, 经常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 (片厚 4 μm)、采用免疫组化 SP 法染色: 用 PBS 液 ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 5 min; 3% H_2O_2 室温孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶的活性, 室温下孵育 10 min; 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; 10% 的正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭, 室温孵育 10 min。倾去血清, 勿洗, 滴加 1:100 比例稀释的一抗, 37 °C 孵育 1 h; PBS 冲洗, 冲洗 3 次, 每次 5 min; 滴加第二代生物素标记二抗工作液, 37 °C 孵育 30 min; PBS 冲洗, 冲洗 3 次, 每次 5 min; 滴加第二代辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 °C 孵育 30 min; PBS 冲洗, 冲洗 3 次, 每次 5 min; DAB 显色剂显色; 自来水充分冲洗, 苏木精复染, 封片。

2.3 结果判定 取小鼠右侧子宫纵切面及横切面切片,一个标本的同一切片显微镜下可同时观察异位内膜及在位内膜。采用 Mias 图形分析系统,在 200 倍视野下分别选择异位及在位内膜组织的被覆上皮中含阳性物质(即棕黄色颗粒物质)最多的 5 个区域浏览,先测量被覆上皮面积,再测量相应面积中阳性物质的积分吸光度(A),以此表示观察指标的表达情况。

2.4 统计方法 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,由 SPSS 17.0 统计软件进行处理,定量指标用单因素方差分析,组间比较用 LSD, S-N-K 分析和 Tamhane's T2 检

验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 雌激素效应相关因子的变化 模型组异位内膜与在位内膜比较, P450 显著上调。模型组在位及异位内膜与正常组内膜比较, P450, COX-2, ERa 显著上调 ($P < 0.05$)。无论在位或异位内膜,与模型组比较,各组治疗后 P450, ERa 均值均显著下降,各剂量组之间比较无显著差异;与模型组比较,治疗后在位或异位内膜 COX-2 值各组均显著下降,在位内膜高剂量组显著优于中、低剂量组 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 蒲灵化瘀止痛方对小鼠 AM 在位子宫内 膜和异位子宫内 膜雌激素效应相关因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 在位子宫内 膜/A·μm ⁻² | | | 异位子宫内 膜/A·μm ⁻² | | |
|---------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | P450 | ERa | COX-2 | P450 | ERa | COX-2 |
| 正常 | - | 1 356 ± 428 | 1 906 ± 602 | 480 ± 324 | - | - | - |
| 模型 | - | 3 921 ± 1 898 ¹⁾ | 2 530 ± 684 | 2 058 ± 267 ¹⁾ | 7 551 ± 2 106 | 3 187 ± 2 718 | 2 663 ± 1 247 |
| 蒲灵化瘀止痛方 | 60 | 2 466 ± 985 ²⁾ | 1 483 ± 676 ²⁾ | 820 ± 372 ²⁾ | 3 124 ± 1 578 ²⁾ | 1 484 ± 432 ²⁾ | 1 244 ± 819 ²⁾ |
| | 30 | 2 683 ± 684 ²⁾ | 1 613 ± 779 | 1 621 ± 742 | 3 445 ± 1 026 ²⁾ | 1 839 ± 338 ²⁾ | 1 748 ± 680 ²⁾ |
| | 15 | 2 296 ± 837 ²⁾ | 1 613 ± 1 009 | 1 355 ± 498 | 2 897 ± 747 ²⁾ | 2 113 ± 401 ²⁾ | 1 068 ± 248 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 血管生成相关因子的变化 模型组在位内膜与正常组内膜比较, CD31 显著下降, VEGF 及 MMP-2 显著上调 ($P < 0.05$),与模型组比较,异位内膜各组 MMP-2 治疗后显著下降 ($P < 0.01$), MMP-2 下降幅度,各组间比较无统计学意义。各剂量组治疗后,

在位内膜 VEGF 表达均呈显著下降趋势,组间比较无统计学差异;高剂量组治疗后异位内膜 VEGF 表达下降显著优于低剂量组 ($P < 0.05$);在位内膜 CD31 治疗后显著升高,高剂量组显著优于中、低剂量两组 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 蒲灵化瘀止痛方对小鼠 AM 在位和异位子宫内 膜血管生成相关因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 剂量 /g·kg ⁻¹ | 在位子宫内 膜/A·μm ⁻² | | | 异位子宫内 膜/A·μm ⁻² | | |
|---------|---------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | CD31 | VEGF | MMP-2 | CD31 | VEGF1 | MMP-21 |
| 正常 | - | 9 064 ± 1 752 | 25 185 ± 6 186 | 3 946 ± 556 | - | - | - |
| 模型 | - | 4 316 ± 879 ¹⁾ | 45 682 ± 7 023 ¹⁾ | 13 865 ± 3 771 ¹⁾ | 11 053 ± 3 861 | 13 389 ± 4 149 | 7 966 ± 1 283 |
| 蒲灵化瘀止痛方 | 60 | 12 474 ± 3 022 ²⁾ | 12 021 ± 7 012 ²⁾ | 5 590 ± 812 ²⁾ | 6 717 ± 2 297 ²⁾ | 8 543 ± 3 566 ²⁾ | 4 994 ± 1 739 ²⁾ |
| | 30 | 8 048 ± 3 041 ^{2,3)} | 16 126 ± 787 ²⁾ | 10 673 ± 2 580 ³⁾ | 7 889 ± 2 717 ²⁾ | 12 612 ± 4 149 | 4 633 ± 1 218 ²⁾ |
| | 15 | 8 003 ± 832 ^{2,3)} | 16 311 ± 3 861 ²⁾ | 9 896 ± 804 ³⁾ | 7 594 ± 2 947 ²⁾ | 14 191 ± 9 363 ³⁾ | 4 590 ± 1 638 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比²⁾ $P < 0.05$;与蒲灵化瘀止痛方高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

COX-2 被认为是快速反应基因,缺血缺氧可以诱发其异常增高。高表达水平的 COX-2 及 COX-2 活性的增加导致了前列腺素 E₂ (PGE₂) 的高表达,而 PGE₂ 是目前已知的最强的异位内膜间质细胞芳香化酶诱导剂, PGE₂ 通过增加细胞内 cAMP 水平增强 P450 的表达,从而触发 COX-2-PGE₂-P450 正反馈通路的形成,局部雌激素水平增高,通过调节一系

列通路,上调血管生成因子,进一步促进疾病的发生发展。蒲灵化瘀止痛方各组通过改善局部的缺血缺氧状态,显著上调在位 CD31 水平,下调在位及异位 VEGF 的异常增高,截断快速反应通路,显著下调在位 COX-2 水平,阻断疾病的发生发展。在位内膜 CD31 的上调和异位内膜 VEGF 的下调与用药剂量相关,高剂量组对上述因子的调控显著优于中、低剂量组。而 MMP-2 主要功能是降解细胞外基质,新生

血管的出芽过程必须破坏由细胞间基质和基膜构成的细胞外基质屏障 (ECM) 和基底膜 (BM)。蒲灵化瘀止痛方组治疗后异位内膜 MMP-2 表达显著下降,提示治疗可以有效下调新生血管的异常增殖。在位内膜 MMP-2 的表达高剂量组显著优于中、低剂量组,提示该调节作用与中药剂量相关。

对雌激素效应其他相关因子的研究表明,无论在位或异位内膜,中药的剂量对 P450 的影响无显著统计学差异;对于在位内膜:治疗前后,不同治疗剂量组 ER α 值均下降,与现有研究成果一致,各剂量组间无统计学差异,提示对该类因子调节作用与中药剂量无相关性。

综上,蒲灵化瘀止痛方通过改善局部的缺血缺氧状态,显著上调在位 CD31 水平,改善在位及异位 VEGF 及 MMP-2 的异常增高,降低异常血管增殖,同时下调在位及异位 COX-2 水平,截断 COX-2-PGE $_2$ -P450 α 反应通路,从而降低雌激素效应相关因子的异常表达,阻断病情的发生发展。本实验结果显示改善局部缺血缺氧的作用、对血管生成相关因子的调控程度与蒲灵化瘀止痛方剂量相关,而雌激素效应因子与剂量无显著相关性。

[参考文献]

- [1] Salim R, Riris S, Saab W, et al. Adenomyosis reduces pregnancy rates in infertile women undergoing IVF[J]. *Reprod Biomed Online*, 2012,25(3):273.
- [2] 赵瑞,李艳,赵蔚. 子宫腺肌病中异位子宫内膜血管发生的研究[J]. *医药论坛杂志*,2007,28(21):38.
- [3] Mori T, Nagasawa H, Takahashi. The induction of adenomyosis in mice by intrauterine pituitary isografts [J]. *Life Sci*,1981,29:1277.
- [4] 曲晓媛,贾世磊,王言. 芳香化酶 P450 与环氧化酶-2 在子宫内膜异位症和子宫腺肌病中的表达及意义 [J]. *中国现代医药杂志*,2009,11(5):27
- [5] Subbaramaiah K, Morris P G, Zhou X K, et al.

Increased levels of COX-2 and prostaglandin E $_2$ contribute to elevated aromatase expression in inflamed breast tissue of obese women[J]. *Cancer Discov*, 2012, 2(4):356.

- [6] Yamanaka K, Xu B, Sugauma I, et al. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E $_2$ production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture [J]. *Fertil Steril*, 2012,97(2):477.
- [7] 杨正望,文炯,张增玲. 补肾化瘀方对 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞 CYP450 表达的影响 [J]. *湖南中医药大学学报*,2011,31(1):30
- [8] 王小霞,康佳丽,邵雪飞,等. GnRHa 对子宫腺肌病在位内膜细胞凋亡及 VEGF 分泌的影响 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2012,28(1):72.
- [9] Yasumura E G, Stilhano R S, Samoto V Y, et al. Treatment of mouse limb ischemia with an integrative hypoxia-responsive vector expressing the vascular endothelial growth factor gene [J]. *PLoS One*, 2012,7(3):e33944.
- [10] 贺丰杰,李小宁,张文婷. 调膜止崩液宫腔靶向给药对 ADUB 模型大鼠子宫内膜组织中 MMP-1、TIMP-1、ER 及亚型表达的影响 [J]. *时珍国医国药*,2012,23(6):1861
- [11] Moreira L, de Carvalho E C, Caldas-Bussiere M C. Differential immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in cow uteri with adenomyosis during follicular phase [J]. *Vet Res Commun*, 2011, 35(5):261.
- [12] 钟凌,袁立明. 血府逐瘀汤对子宫肌瘤雌激素受体和 BCL-2 表达的影响 [J]. *肿瘤药学*, 2012(1):34.
- [13] 宗慧梅,王禹. 活血化瘀中药对实验性急性脑梗死大鼠脑组织 VEGF、bFGF mRNA 表达的影响 [J]. *中国中医急症*, 2006, 15(7):766.
- [14] 吕晓霞,李楠. 子宫腺肌病组织中 PTTG、bFGF 和 VEGF 的表达及意义 [J]. *山东医药*,2008,48(3):97.

[责任编辑 聂淑琴]