

茜草治疗功能性子宫出血的止血机制研究

欧莉^{1,2}, 张艺耀³, 彭成^{1*}, 白杨², 高晓庆²

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 陕西中医学院药学院, 陕西 咸阳 712046;
3. 中国人民解放军空军总医院, 北京 100853)

[摘要] 目的:观察茜草治疗功能性子宫出血的止血作用及作用机制。方法:分别采用药物致早孕大鼠流产和切除大鼠卵巢的方法建立宫出血模型,分为正常组,模型组,茜草低、中、高剂量组(1.35, 2.7, 5.4 g·kg⁻¹),宫血宁组(阳性药,0.07 g·kg⁻¹)。连续ig给药14 d后处死大鼠,紫外-分光光度计检测对功血模型大鼠子宫出血量的影响,ELISA检测大鼠血浆血小板活性成分血栓素B₂(TXB₂),6-酮-前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})的含量,免疫组化法检测对去势大鼠子宫内膜微血管密度(MVD)表达的影响。结果:与正常组比较,模型组大鼠的子宫出血量明显增高,TXB₂含量明显降低,6-keto-PGF_{1α}含量明显升高,去势大鼠子宫内膜MVD蛋白表达明显降低(P<0.01);茜草各剂量组均可明显减少功血模型大鼠的子宫出血量,明显升高TXB₂含量,明显降低6-keto-PGF_{1α}含量,茜草高、中剂量组均可明显提高去势大鼠子宫内膜MVD含量(P<0.05)。结论:茜草具有良好的止血作用,并可促使去卵巢大鼠子宫内膜修复和血管增生,从而治疗功能性子宫出血。

[关键词] 茜草; 功能性子宫出血; 出血; 止血; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)21-0152-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015210152

Study on Hemostatic Mechanism of Rubiae Radix Et Rhizoma in Treating Dysfunctional Metrorrhagia

OU Li^{1,2}, ZHANG Yi-yao³, PENG Cheng^{1*}, BAI Yang², GAO Xiao-qing² (1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Chengdu 611137, China; 2. College of Pharmacy, Shanxi College of TCM, Xianyang 712046, China; 3. Air Force General Hospital, PLA, Beijing 100853)

[Abstract] **Objective:** To observe the hemostatic effect and hemostatic mechanism of Rubiae Radix et Rhizoma in treating dysfunctional metrorrhagia. **Method:** Dysfunctional metrorrhagia models were established by drug abortion in early pregnancy and removal of the ovaries. The rats were divided into normal group, model group, Rubiae Radix et Rhizoma low dose group (1.35 g·kg⁻¹), middle dose group (2.7 g·kg⁻¹), high dose group (5.4 g·kg⁻¹) and Gongxuening group (positive drug, 0.07 g·kg⁻¹). After treatment for 14 days, the rats were killed to observe the effect on the amount of bleeding in dysfunctional metrorrhagia rats by UV, detect the level of thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-keto-PGF_{1α} contents in blood of rats by enzyme-linked immunosorbent assays, and detect the effect on microvessel density (MVD) expressions of the endometrium in ovariectomized rats by immunohistochemistry. **Result:** Compared with normal group, the amount of bleeding in model group rats was significantly increased, TXB₂ level significantly reduced, 6-keto-PGF_{1α} level significantly increased, and endometrial MVD protein expression in ovariectomized rats was significantly reduced (P<0.01). The each dose group of Rubiae Radix et Rhizoma could significantly reduce the amount of bleeding in dysfunctional metrorrhagia rats, significantly increase TXB₂ level and significantly reduce 6-keto-PGF_{1α} level (P<0.05). High dose group and middle dose group of Rubiae Radix et Rhizoma could significantly increase endometrial microvascular density level in ovariectomized rats (P<0.05). **Conclusion:** Rubiae Radix et Rhizoma has a good hemostatic effect, and

[收稿日期] 20141016(012)

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划项目(2011K16-05-03)

[第一作者] 欧莉,在读博士,副教授,从事中药有效成分药效学及毒理学研究,Tel:13891472452,E-mail:23127438@qq.com

[通讯作者] *彭成,博士,教授,从事从事疾病动物模型与中药复方研究,E-mail:pengchengchengdu@126.com

promotes endometrial repair and blood vessel growth in ovariectomized rats, thus to treat dysfunctional metrorrhagia.

[**Key words**] Rubiae Radix et Rhizoma; dysfunctional metrorrhagia; haemorrhage; hemostatic; mechanism

茜草始载于《神农本草经》，为茜草科植物茜草的干燥根茎，又名红丝线、活血草、血见愁等^[1-2]，主产于陕西、河南、安徽、河北等地。其性味苦寒，归肝经，具有凉血止血、祛瘀、通经的作用，主治崩漏下血、吐血衄血、月经不调、外伤出血等证。功能性子宫出血在中医学上属于“崩漏”的范畴，研究资料表明茜草治疗功能失调性子宫出血具有较好的临床疗效^[3-5]，且本课题组前期的研究发现，茜草能增强子宫收缩的幅度和活动力，为进一步探讨茜草的止血作用和对子宫内膜修复的作用，本文分别建立动物模型和去势动物模型，以揭示其治疗功能性子宫出血的止血作用及作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级SD大鼠，购自西安交通大学实验动物中心，合格证号SCXK(陕)2007-001，饲养于陕西中医学院实验动物中心。饲养环境保持室温20~25℃，相对湿度40%~60%，实验动物自由进食和饮水。

1.2 药物及试剂 茜草，由陕西咸阳百姓乐大药房提供。煎前加水浸泡30 min，大火煮沸后小火煎煮30 min，煎2次，合并药液至生药5.4 g·mL⁻¹，4℃保存备用。每次由兔抗大鼠CD34多克隆抗体，即用型SABC试剂盒，DAB显色试剂盒(黄)，均由武汉博士德生物制品有限公司提供；血栓素(TXB₂)，6-酮-前列腺素_{1α}(6-keto-PGF_{1α})试剂盒，由南京建成生物工程研究所提供；亚甲基蓝(上海扶生实业有限公司提供)，宫血宁胶囊(0.13 g/粒，由云南白药集团股份有限公司提供，批号20130512)，青霉素注射液(规格160万U·mL⁻¹，哈药集团制药总厂提供，批号A130711720)。

1.3 仪器 DHG-9075 A型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司)，TGL-16 G型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)，UV 2300型紫外分析仪(上海天美科技有限公司)，彩色病理图像分析仪(西化仪科技有限公司)，EX-8080型酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

2 方法

2.1 茜草对功血模型大鼠子宫出血量的影响

2.1.1 造模及分组给药 筛选处于动情期的雌性大鼠，按雌-雄2:1的比例合笼，次日晨进行阴道涂

片检查，以发现阴道栓或者精子为妊娠第1天。选取妊娠大鼠60只，随机分为6组，每组10只，分别为正常组、模型组、茜草低、中、高剂量组和宫血宁组。除正常组外，各组大鼠分别于第7天ig给予米非司酮溶液8.8 mg·g⁻¹(8:00)和米索前列醇溶液100 μg·kg⁻¹(18:00)，造成早孕大鼠不完全流产的子宫出血模型。茜草低、中、高剂量组分别ig给予茜草水煎液1.35, 2.7, 5.4 g·kg⁻¹；宫血宁组，ig给予宫血宁胶囊0.07 g·kg⁻¹；正常组和模型组ig等容量的蒸馏水，每日2次，连续给药7 d。每天在大鼠引道内放置定量消毒棉球1个，次日分别于8:00和18:00将棉球取出，放入塑料袋中密闭冷藏保存，同时更换新棉球于阴道内^[6]。

2.1.2 功血模型大鼠子宫出血量测定 取大鼠静脉血20 μL，加入浓度为5%的NaOH溶液4 mL中，混匀，紫外-分光光度计于546 nm下，测定静脉血吸光度A。将收集的每只大鼠子宫出血棉球置于烧杯内，根据出血量的情况加适量5%的NaOH，浸提24 h后，测定子宫出血A值。

阴道出血量(mL) = 静脉血量 × (子宫浸提液A值 × V2) / (静脉血A值 × V1)

其中V1 = 稀释静脉血所用的NaOH溶液的量(4 mL)；V2 = 浸提子宫血所用NaOH溶液量

2.1.3 血小板活性成分TXB₂，6-keto-PGF_{1α}测定 乙醚麻醉大鼠，腹腔动脉取血，注入含3.8%枸橼酸钠的离心管内摇匀，3 000 r·min⁻¹离心，取上清液。按照试剂盒说明书，采用酶联免疫吸附测定法，测定上清液中血小板活性成分TXB₂，6-keto-PGF_{1α}的含量。

2.2 茜草对去势大鼠子宫内膜MVD表达的影响

2.2.1 造模及分组给药 取雌性大鼠90只，行卵巢切除术而进行去势造模。术后用青霉素40万U·kg⁻¹·d⁻¹肌注，连用3 d，于术后第7天进行阴道脱落细胞涂片检查，并连续检查5 d，以阴道涂片不出现角化上皮细胞作为去势造模成功指标。选取造模成功的大鼠60只，随机分为6组，每组10只，分别为假手术组、模型组、茜草低、中、高剂量组和宫血宁对照组。茜草低、中、高剂量组分别ig给予茜草水煎液1.35, 2.7, 5.4 g·kg⁻¹；宫血宁组，ig给予宫血宁胶囊0.07 g·kg⁻¹；假手术组和模型组ig等容

量的蒸馏水,术后第 7 天开始给药,每日 1 次,连续给药 14 d。末次给药后处死大鼠,取得子宫内膜组织。在解剖显微镜下去除双角子宫表面脂肪组织,用 10% 多聚甲醛固定,用于免疫组化形态学观察。

2.2.2 S-P 免疫组化法检测各组大鼠子宫内膜的 MVD 石蜡包埋,5 μm 切片;切片常规脱蜡水化后,按免疫组化 ABC 程序染色,滴加一抗 CD34(浓度为 1:100)于 4 ℃ 孵育过夜,生物素标记的 IgG 抗体于 37 ℃ 孵育 40 min,ABC 复合物 37 ℃ 下孵育 20 min,二氨基联苯胺(DAB)显色 15 min,系列酒精脱水、透明、中性树胶封片。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照,已知阳性片为阳性对照。染色结果,参照 Hickey^[7]的方法进行判定:在低倍镜视野中(10×)选取微血管内皮细胞染色清晰的高血管密集区,在高倍视野(40×)下计算 5 个视野的微血管密度数,以微血管/40×视野为子宫内膜微血管密度,取平均值。孤立的棕黄色血管内皮细胞核细胞团代表一个单独的微血管,若血管内皮细胞数多于 8 个,不计为微血管。单个棕染内皮细胞或内皮细胞堆积无论有无管腔形成,只要结构不相连,其分支结构也作为一个血管参与计数,管腔较大且有较厚肌层的不在计数之列。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 12.0 进行数据统计,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行多组数据计量资料单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对功血模型大鼠子宫出血量的影响 模型组大鼠流产后第 1 天收集的棉球即可见到出血,第 3 天达到高峰,随后逐渐减少,功血模型复制成功;与模型组比较,茜草各剂量组均可明显减少功血模型大鼠的子宫出血量,结果有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 茜草对大鼠子宫出血量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Rubiae Radix et Rhizoma on uterine bleeding amount of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	出血量/mL
正常	-	0.00 ± 0.00 ²⁾
模型	-	0.21 ± 0.10
宫血宁	0.07	0.13 ± 0.07 ¹⁾
茜草	1.35	0.14 ± 0.04 ¹⁾
	2.7	0.13 ± 0.07 ¹⁾
	5.4	0.13 ± 0.07 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 对血小板活性成分 TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} 的影响 与正常组比较,模型组的 TXB₂ 明显降低($P < 0.05$),6-keto-PGF_{1α} 出现显著性升高($P < 0.05$);与模型组比较,茜草高剂量组可明显提高大鼠血浆的 TXB₂ 值($P < 0.05$),并显著性降低 6-keto-PGF_{1α} 水平($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 茜草对大鼠血小板活性成分 TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of Rubiae Radix et Rhizoma on TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} of platelet active ingredients in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TXB ₂ /ng·L ⁻¹	6-keto-PGF _{1α} /ng·L ⁻¹
正常	-	102.05 ± 23.51 ¹⁾	115.51 ± 22.30 ¹⁾
模型	-	83.69 ± 13.64	139.47 ± 23.95
宫血宁	0.07	96.43 ± 19.20	118.58 ± 20.31 ¹⁾
茜草	1.35	90.60 ± 18.52	122.43 ± 25.66
	2.7	86.37 ± 18.11	127.32 ± 30.69
	5.4	96.82 ± 14.21 ¹⁾	120.20 ± 16.17 ¹⁾

3.3 对大鼠子宫内膜 MVD 的影响 CD34 为血管密度标志物,表达于子宫内膜内皮细胞,用于测定子宫内膜微血管密度。与正常组比较,模型组的大鼠子宫内膜微血管密度显著性降低($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组的大鼠子宫内膜微血管密度均有不同程度增加,其中茜草中剂量组及高剂量组的大鼠子宫内膜微血管密度出现显著性差异($P < 0.05$),见表 3,图 1。

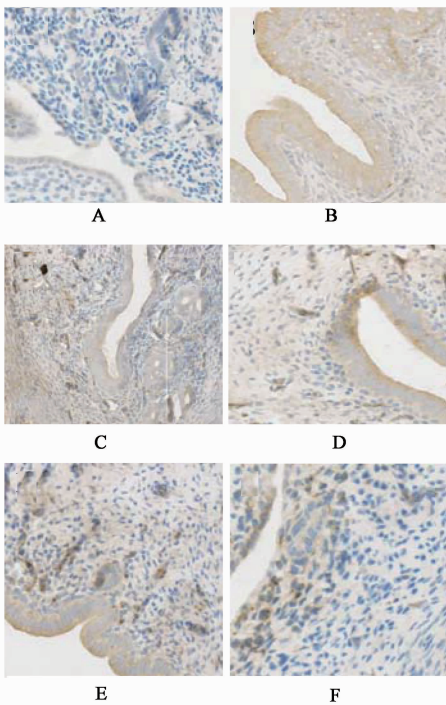
表 3 茜草对大鼠子宫内膜 MVD 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of Rubiae Radix et Rhizoma on MVD of endometrium in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MVD/个
正常	-	29.30 ± 12.14 ²⁾
模型	-	14.65 ± 7.27
宫血宁	0.07	22.89 ± 10.04 ¹⁾
茜草	1.35	23.63 ± 14.58
	2.7	21.97 ± 8.15 ¹⁾
	5.4	24.20 ± 12.11 ¹⁾

4 讨论

功能失调性子出血(dysfunctional uterine bleeding, DUB)又称功血,是指非生殖器官本身的器质性病变或全身疾病引起的不正常子宫出血^[8],发病率约占妇科门诊病人的 10%。正常月经的发生是下丘-垂体-卵巢轴生理调节控制下的周期性的



A. 正常组; B. 模型组; C. 宫血宁组; D. 茜草 1.35 g·kg⁻¹组; E. 茜草 2.7 g·kg⁻¹组; F. 茜草 5.4 g·kg⁻¹组

图 1 茜草对大鼠子宫内膜 MVD 的影响 (免疫组化, ×200)

Fig. 1 Effects of Rubiae Radix et Rhizoma on MVD of endometrium in rats (IHC, ×200)

子宫内膜剥脱性出血,其发生与女性生殖内分泌有关,与子宫内膜出血的自限性机制缺乏有关,同时与上皮和血管的再生能力下降有关。临床上将功血分为无排卵型和排卵型 2 类,其中无排卵型功血约占 70%~80% 左右。中医认为功血属“崩漏”证的范畴,是指经血非时暴下或淋漓不止。茜草是临床上治疗崩漏下血的常用中药,具有祛瘀止血,使血止而不留瘀的特点。

本实验采用药物致早孕大鼠流产的方法建立功血模型。雌鼠受孕后,子宫内膜增生增厚,并有大量血管新生,于妊娠第 7 日序贯给予米非司酮和米索前列醇,造成子宫内膜雌激素水平随然下降,子宫收缩增加,最终导致子宫内膜血管破裂出血,该造模方法与人类月经产生的机制相似。实验结果显示,模型组大鼠流产后第 1 天收集的棉球即可见到出血,第 3 天达到高峰,随后逐渐减少,功血模型复制成功,给药后茜草各剂量组均可明显减少功血模型大鼠的子宫出血量,表明茜草具有良好的止血作用。

前列腺素类物质中的 TXA₂ 是目前发现的最强的缩血管物质之一,PGI₂ 则是作用较强的血管舒张剂。在正常情况下, TXA₂ 和 PGI₂ 之间维持着动态

平衡,由于 TXA₂ 和 PGI₂ 半衰期短,在体内极不稳定,易转化为稳定的代谢产物 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α},故后两者的含量可反映 TXA₂ 和 PGI₂ 在体内的水平。实验结果显示,茜草高剂量组可显著提高 TXB₂ 的含量,降低 6-keto-PGF_{1α} 的含量,使 6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 的比值降低,提示茜草可能通过调节前列腺素类物质,促进子宫内膜血管收缩而止血。

在无排卵性功血中,由于无拮抗的雌激素导致子宫内膜过度增殖和增生,而子宫内膜增生与血管生成密切相关。子宫内膜微血管密度(MVD)计数是反映血管生成的金标准,能够定量反映子宫内膜的生成,故本实验选择 MVD 作为检测指标。CD34 为血管内皮细胞特异性标记物,选择性表达于血管内皮细胞。CD34 选择性表达于血管内皮细胞有助于对 MVD 的定量分析,进而反映组织新生毛细血管的生长情况,CD34 已被广泛的用于各种动物及组织中 MVD 的检测。本实验结果显示,给药后茜草高剂量组和中剂量组均可明显提高去势大鼠子宫内膜微血管密度,促使去卵巢大鼠子宫内膜修复和血管增生,影响子宫内膜微血管形成而达到止血的目的。子宫内膜微血管结构、功能状态的改变可能是异常出血的关键,但子宫内膜血管生成又受多种因子调控,茜草是否对子宫内膜局部微环境中参与血管再生的 VEGF, bFGF 等相关因子表达有影响,还有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 常用中药材品种整理和质量研究(北方编). 第 2 册[M]. 北京: 中国协和医科大学联合出版社, 2003.
- [2] 肖培根. 新编中药志 I [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002.
- [3] 张长全. 茜草汤治疗功能失调性子宫出血 120 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(14): 1747-1748.
- [4] 徐连英. 黄芪茜草汤治疗更年期功血 48 例[J]. 陕西中医, 2001, 6(22): 361.
- [5] 许壮丽. 宫宁颗粒治疗放置宫内节育器月经异常 80 例[J]. 中国中医药科技, 2012, 19(5): 413.
- [6] 李霞, 王永红, 王丽, 等. 宫清方诱导 Th1/Th2 亚群漂移减轻药物流产后子宫出血动物研究[J]. 中国计划生育杂志, 2012, 20(12): 805-808.
- [7] Hickey M, G Pillai, J M Higham, et al. Changes in endometrial blood vessels in the Endometrium of women with hormone replacement therapy-related irregular bleeding [J]. Humen Reproduction, 2003, 18 (5): 1100-1106.
- [8] 张静. 无排卵性功能失调性子宫出血中医药治疗现状[J]. 山西中医, 2011, 27(1): 53-55.

[责任编辑 周冰冰]