

# 养血化瘀消癥汤对大鼠子宫内膜异位病灶的抑制作用和机制

张璐砾<sup>\*</sup>, 金勇, 郭洪武, 邱华, 夏猛, 张淑贤, 王武  
(广西中医药大学基础医学院, 南宁 530011)

**[摘要]** **目的:**研究养血化瘀消癥汤对大鼠子宫内膜异位病灶的抑制作用及作用机制。**方法:**取雌性 SD 大鼠,除正常组 10 只大鼠外,采用自体移植法建立子宫内膜异位症大鼠模型,造模成功的大鼠随机分为模型组,养血化瘀消癥汤高、中、低剂量组(12, 8, 4 g·kg<sup>-1</sup>)和孕三烯酮组(0.05 g·kg<sup>-1</sup>),每组 10 只。分别 ig 给药 28 d 后,采集病灶组织标本,观察养血化瘀消癥汤对大鼠子宫内膜异位组织体积的抑制作用;RT-qPCR 和 Western blot 检测各组大鼠异位组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管内皮生长因子受体-1(VEGFR-1)的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠子宫内膜异位组织 VEGF, VEGFR-1 mRNA 及蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,药物组大鼠的子宫内膜异位组织较模型组明显抑制,各给药组大鼠的子宫内膜异位组织 VEGF 和 VEGFR-1 mRNA 及蛋白表达均明显低于模型组( $P < 0.05$ )。**结论:**养血化瘀消癥汤能明显抑制模型大鼠子宫内膜异位组织的发展,这种抑制作用可能与其抑制 VEGF/VEGFR 信号通路调控病灶血管生成有关。

**[关键词]** 养血化瘀消癥汤; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体-1

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)03-0152-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016030152

## Effect and Mechanism of Yangxue Huayu Xiaozheng Decoction on Formation of Endometriosis Foci in Rats

ZHANG Lu-li<sup>\*</sup>, JIN Yong, GUO Hong-wu, QIU Hua, XIA Meng, ZHANG Shu-xian, WANG Wu  
(School of Basic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect and mechanism of Yangxue Huayu Xiaozheng decoction on formation of endometriosis foci in rats. **Method:** Female SD rats were selected and all the other rats except 10 rats in normal group were used to establish endometriosis models with auto grafting method. The successfully modeled rats were randomly divided into six groups, including model group, Yangxue Huayu Xiaozheng decoction high-dose group, middle-dose group, low-dose group (12, 8, 4 g·kg<sup>-1</sup>, respectively) and Gestrinone group (0.05 g·kg<sup>-1</sup>),  $n = 10$  in each group. After ig administration respectively for 28 days, the lesion tissue samples of rats were collected, and the inhibitory effect of Yangxue Huayu Xiaozheng decoction on endometriosis tissue in rats was observed. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor1 (VEGFR-1) were detected in ectopic endometrium by using RT-PCR and Western blot technique. **Result:** Compared with the normal group, the expression of VEGF and VEGFR-1 mRNA and protein in endometriosis tissues of rats in model group was significantly higher ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, endometriosis tissues of rats in drug groups were significantly inhibited, and the expression of VEGF and VEGFR-1 mRNA and protein in endometriosis tissues of rats in various drug groups was significantly lower than that in model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Yangxue Huayu Xiaozheng decoction could obviously inhibit the development of

**[收稿日期]** 20150311(010)

**[基金项目]** 广西自然科学基金项目(2011GXNSFB018085);广西高校人才小高地创新团队“八桂医学创新团队”项目(桂教人[2011]47号)

**[通讯作者]** \*张璐砾, 博士, 讲师, 从事国医大师班秀文的挖掘整理和应用研究工作, Tel:18677494529, E-mail:346654858@qq.com

endometriosis tissues in model rats. It may have a closely relation with the inhibition of VEGF/VEGFR signaling pathway to regulate the angiogenesis of lesions.

**[Key words]** Yangxue Huayu Xiaozheng decoction; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial growth factor receptor 1

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是一类妇科临床常见疑难病症,目前现代医学主要通过口服性激素和手术的方法止痛及缩小病灶,尚缺乏特效治疗药物<sup>[1]</sup>。关于 EMs 的发病机制,目前较多国内外研究认为异位组织的血管生成是该病发生发展的重要因素,EMs 的抗血管生成研究是目前的热点。

广西中医药大学基础医学院国医大师班秀文(1920—2014)从医 60 余年,一生治学严谨,用药精专,擅长治疗各种疑难杂症,中医妇科造诣尤深,留下大批宝贵的临床学术思想和大量临床验方。养血化瘀消癥汤是班老创制的验方,临床上用于治疗湿瘀所致子宫内膜异位症有独到疗效<sup>[2-3]</sup>。本研究继承名老中医临床经验的基础,结合现代医学对 EMs 发病机制的研究,通过建立子宫内膜异位症大鼠模型,观察养血化瘀消癥汤的疗效和对模型大鼠病灶组织血管内皮生长因子(VEGF)和血管内皮生长因子受体 1(VEGFR-1)表达的影响,从抑制血管生成的角度探讨养血化瘀消癥汤防治子宫内膜异位症的治疗作用和作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 9 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠 70 只,性成熟未交配,体重(243 ± 27) g,均购于广西医科大学实验动物中心,实验动物使用合格证号 SCXK(桂)2003-0003;饲养于广西中医药大学实验动物中心(SPF 级),恒温 24 °C,相对湿度 45% ~ 60%。

**1.2 药物及试剂** 养血化瘀消癥汤由当归、川芎、赤芍、白术、土茯苓、泽泻、丹参、莪术、香附、皂角刺、炙甘草等组成,购于广西中医药大学附属瑞康医院。组方经人鼠剂量比例换算,按照给药剂量 = 临床常用剂量 × 大鼠等剂量系数(6.3),煎煮浓缩后配置成分别含生药 0.4 g·mL<sup>-1</sup>(低剂量),0.8 g·mL<sup>-1</sup>(中剂量)和 1.2 g·mL<sup>-1</sup>(高剂量)3 组药液,置 4 °C 冰箱保存。孕三烯酮胶囊(北京紫竹药业有限公司,批号 42010307),反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 00135397),SYBR Green[美国罗氏公司 FastStart Universal SYBR green Master(ROX),批号 14382900],Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 66206),PCR 引物合成(上海英骏生物技术,VEGF 引物序列:上游引物 5'-GCCCTGAGTCAAGAGG

ACAG-3',下游引物 5'-AAGCCACTCACACACACACAGC-3'; VEGFR-1 引物序列:上游引物 5'-ACTCTAACATGCACCTGTGTGG-3',下游引物 5'-GCTCATCCAAAGGAAGTTCATCTG-3'),Bradford 蛋白质定量检测试剂盒(北京天根生化科技公司,批号 NG0638),兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体(批号 EK2690)和兔抗大鼠 VEGFR-1 多克隆抗体(批号 EK3750)均购于武汉博士德公司。

**1.3 仪器** 7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),DYCZ-40E 型电泳及转膜装置(北京六一仪器厂),Gel Doc XR 型凝胶成像系统(美国 Bio Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物造模** 取造模组大鼠 60 只,采用自体移植法造模。造模前制备阴道涂片,观察大鼠动情周期,筛除周期异常或不同步的大鼠,选用大鼠均能连续观察到 2 个连续的动情周期,于第 3 个动情周期进行自体移植法手术建模。手术过程参考文献[1],第 8 周开腹观察异位内膜生长,以观察到移植植物为圆形或椭圆形淡红色囊泡,囊泡内为透明或血色液体,囊泡体积 > 10 mm<sup>3</sup>,且移植植物表面有血管生成判定造模成功。最终造模成功 53 只,术后死亡 2 只,剩余 51 只。

**2.2 分组与给药** 取造模成功的大鼠 50 只,按照体重分层后参照随机数表重新分为 5 组,每组 10 只,分别为养血化瘀消癥汤高、中、低剂量组,模型组和孕三烯酮组,剩余 10 只非造模大鼠设为正常组。中药组分别给予养血化瘀消癥汤药液高、中、低浓度 *ig*,每次给药容量为 10 mL·kg<sup>-1</sup>。孕三烯酮组给予 0.05 g·kg<sup>-1</sup>孕三烯酮 *ig*,模型组和空白组均给予同体积生理盐水 *ig*,每日 1 次,连续 *ig* 28 d,每日 *ig* 时间固定。

**2.3 标本采集** 末次给药后禁食 12 h,所有大鼠经麻醉后开腹,迅速剥离移植位处囊泡,测量囊泡体积(体积 = 0.52 × 长 × 宽 × 高),空白组大鼠剪取相同位置正常子宫内膜组织,无菌生理盐水冲洗后 -80 °C 冰箱冻存。

**2.4 实时荧光定量 PCR 检测大鼠标本 VEGFR-1 和 VEGF 的 mRNA 表达** 动物标本用 Trizol 法提

取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增采用 SYBR Green 法, 以 cDNA 为模板在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件: 预变性 95 °C 3 min(1 循环); 变性 95 °C 10 s, 退火 60 °C 20 s(40 循环)。循环结束后得到溶解曲线和扩增曲线, 并进行定量分析, 计算  $\Delta\Delta C_t$  值, 以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值代表样本基因相对表达量。

**2.5** Western blot 法检测大鼠标本 VEGFR-1 和 VEGF 的蛋白表达 取动物标本分别加入 RIPA 裂解液(按每克组织加 3 mL)反复研磨, 加入 PMSF(按每克组织加 30  $\mu$ L), 冰上孵育 30 min。4 °C 15 000  $r \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后取上清。Bradford 比色法检测蛋白质浓度。加入 5  $\times$  上样缓冲液后于热水浴中加热 10 min。取等量蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 分别与抗 VEGFR-1 抗体, 抗 VEGF 抗体及  $\beta$ -actin 抗体孵育, 再接着和二抗孵育。加入 ECL 发光试剂显色后, 凝胶成像仪分析各组样本灰度值, 以目的条带和  $\beta$ -actin 条带的比值代表检测样本的蛋白表达量。

**2.6** 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据, 采用 Kolmogorov-Smirnov 法检验检测数据正态性, Levene 法检验检测方差齐性, 采用配对资料的  $t$  检验, 检验配对资料两组数据的差异, 计量数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1** 对大鼠异位子宫内膜移植组织的形态学影响 给药结束后, 模型组大鼠的异位子宫移植组织相对于给药前并无明显改变。与模型组比较, 孕三烯酮组和养血化瘀消癥汤中、高剂量组大鼠的移植组织均可观察到明显缩小, 且与周围组织粘连较少, 囊泡内液体较为澄清, 囊泡表面血管减少( $P < 0.05$ )。提示经给药处理后各组大鼠的异位子宫内膜移植组织受到明显抑制。见表 1。

表 1 养血化瘀消癥汤对大鼠异位子宫内膜移植组织体积的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of Yangxue Huayu Xiaozheng decoction on volume of endometriosis tissue in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $g \cdot \text{kg}^{-1}$	给药前异位组织	给药后异位组织	抑制率 /%
		体积/ $\text{mm}^3$	体积/ $\text{mm}^3$	
模型	-	33.37 $\pm$ 8.94	35.93 $\pm$ 10.45	-
养血化瘀 消癥汤	4	37.51 $\pm$ 9.21	30.42 $\pm$ 7.27	18.90
	8	31.31 $\pm$ 10.47	19.82 $\pm$ 5.92 <sup>1,2)</sup>	36.70
	12	35.84 $\pm$ 9.32	16.64 $\pm$ 4.31 <sup>1,2)</sup>	53.57
孕三烯酮	0.05	36.84 $\pm$ 11.31	15.39 $\pm$ 5.32 <sup>1,2)</sup>	58.22

注: 与给药前比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

**3.2** 对大鼠异位子宫内膜移植组织 VEGF 和 VEGFR-1 mRNA 的表达影响 造模组大鼠的 VEGFR-1 与 VEGF mRNA 表达显著高于正常组( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 经养血化瘀消癥汤治疗后, 中药各组的指标表达明显降低( $P < 0.05$ ), 与药物浓度呈反比例关系。见表 2。

表 2 养血化瘀消癥汤对大鼠异位子宫内膜移植组织 VEGF 和 VEGFR-1 mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of Yangxue Huayu Xiaozheng decoction on mRNA expression of VEGF and VEGFR1 in each group of endometriosis tissue in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $g \cdot \text{kg}^{-1}$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	
		VEGF	VEGFR-1
正常	-	3.67 $\pm$ 0.47	2.93 $\pm$ 0.29
模型	-	6.98 $\pm$ 0.74 <sup>1)</sup>	4.25 $\pm$ 0.37 <sup>1)</sup>
养血化瘀消癥汤	4	5.87 $\pm$ 0.69 <sup>2)</sup>	3.97 $\pm$ 0.32
	8	4.63 $\pm$ 0.52 <sup>2)</sup>	3.54 $\pm$ 0.40 <sup>2)</sup>
	12	4.72 $\pm$ 0.64 <sup>2)</sup>	3.51 $\pm$ 0.45 <sup>2)</sup>
孕三烯酮	0.05	4.29 $\pm$ 0.49 <sup>2)</sup>	3.28 $\pm$ 0.33 <sup>2)</sup>

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ (表 3 同)。

**3.3** 对大鼠异位子宫内膜移植组织 VEGFR-1 和 VEGF 蛋白的表达影响 与空白组比较, 模型组 VEGFR-1 和 VEGF 蛋白表达均明显升高( $P < 0.05$ ), 提示 VEGFR-1 和 VEGF 的激/失活调控被打破。经给药后发现, 与模型组比较, 养血化瘀消癥汤各个剂量组均能对 VEGFR-1 和 VEGF 蛋白的表达起到抑制作用( $P < 0.05$ )。见表 3, 图 1。

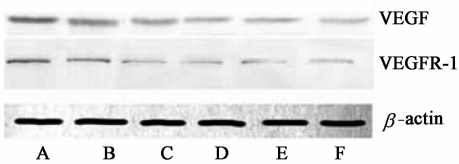
表 3 养血化瘀消癥汤对大鼠异位子宫内膜移植组织 VEGF 和 VEGFR-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effects of Yangxue Huayu Xiaozheng decoction on protein expression of VEGF and VEGFR1 of endometriosis tissue in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 / $g \cdot \text{kg}^{-1}$	灰度值	
		VEGF	VEGFR-1
正常	-	0.26 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.09
模型	-	0.51 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>	0.89 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>
养血化瘀消癥汤	4	0.41 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	0.75 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>
	8	0.36 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.63 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>
	12	0.37 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>	0.61 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>
孕三烯酮	0.05	0.35 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>	0.60 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>

### 4 讨论

传统中医对 EMs 的理解, 按主要症状将其纳入“瘀血”、“痛经”、“癥瘕”的范畴。对妇科瘀血证的治疗, 班老认为: 治经先治血, 理血不忘瘀<sup>[2]</sup>, 妇女以血为本, 以血为用; 出血之时, 止血为治标, 而养血



A. 模型组; B. 养血化瘀消癥汤 4 g·kg<sup>-1</sup> 组; C. 养血化瘀消癥汤 8 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 养血化瘀消癥汤 12 g·kg<sup>-1</sup> 组; E. 孕三烯酮 0.05 g·kg<sup>-1</sup> 组; F. 正常组

图 1 养血化瘀消癥汤对大鼠异位子宫内膜移植组织 VEGF 和 VEGFR-1 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of Yangxue Huayu Xiaozheng decoction on protein expression of VEGF and VEGFR1 of endometriosis tissue in rats

活血为治本, 调气血为治疗的关键<sup>[3]</sup>, 此为其一。妇女的疾病, 虽然是气血病理变化的反映, 但归根结底是脏腑功能的失调, 多属内伤病的范畴; 疏肝以行气活血, 补肾以化精生血, 和脾胃以充气血生化之源, 脏腑功能的协调为治疗的基础<sup>[3]</sup>, 此为其二。养血化瘀消癥汤方以理气活血养血为主, 辅以健脾利湿之品, 行祛湿除瘀之功, 攻补兼施, 标本同治。可用于湿瘀型 EMs, 卵巢囊肿, 子宫肌瘤、慢性炎性包块、痛经等妇科疾病的治疗。

EMs 的发病机制目前尚未完全阐明, 当前的研究提出了子宫内膜种植学说<sup>[4]</sup>、体腔上皮生化学说<sup>[5]</sup>、遗传学说<sup>[6]</sup>、免疫学<sup>[7]</sup>说等多种学说, 并且都存在一定争议。其中子宫内膜种植学最为被国内外学者认可<sup>[4]</sup>, 本次研究造模技术的理论基础也基于此学说。异位内膜的黏附-侵袭-血管生成是该病发生发展的基础。血管生成作为决定性因素, 通过调控血管生成, 减少病灶的血流供应是治疗的关键。血管生成是一个复杂的过程, 涉及多种血管生成调控因子。目前认为 VEGF 是其中特异性最强, 与血管生成关系最为密切的一类因子<sup>[8]</sup>。VEGF 家族包括 VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, 胎盘生长因子 (PLGF) 以及 VEGF 受体。VEGF 受体包括 VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (KDR/flk-1), VEGFR-3 (flt-4), 神经毡蛋白-1 (NP-1) 和神经毡蛋白-2 (NP-2)<sup>[9]</sup>。VEGF/VEGFR 信号通路是血管生成过程最关键一步, VEGF 通过与受体结合, 自身磷酸化, 诱发一系列传导信号, 调控新血管生成<sup>[8]</sup>。通过抑制 VEGF/VEGFR 信号通路发挥抗血管生成作用, 是众多血管生成抑制剂的重要研究方向。

孕三烯酮临床上作为 EMs 的常用治疗药物, 具有较强的抗雌激素、孕激素作用, 同时也是一种较强的 VEGF 阻滞剂<sup>[10]</sup>, 本实验采用孕三烯酮作为

西药组。结果显示经给药治疗后, 各药物组大鼠的子宫内膜异位组织均明显缩小, 形态学趋于恢复, 显示了养血化瘀消癥汤对模型大鼠良好的治疗作用。所采集标本经 RT-PCR 和 Western blot 法, 从核酸和蛋白两个层次检测 VEGF 和 VEGFR-1 表达。实验结果显示, 中药药液在一定浓度下, 能明显抑制模型大鼠的 VEGF 和 VEGFR-1 表达, 提示养血化瘀消癥汤或许通过抑制 VEGF/VEGFR 信号通路, 调控血管生成过程, 抑制 EMs 病灶的发展。

[参考文献]

[1] Lebovic D I, Kir M, Casey C L. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induces regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis[J]. Fertil Steril, 2004, 82(3):1008-1013.  
[2] 李莉. 班秀文论调经[J]. 新中医, 1993, 25(10):4-5.  
[3] 韦宗奎. 班秀文教授治疗妇科病经验[J]. 广西中医药, 1987, 10(2):21-23.  
[4] Halme J, Hammond M G, Hulka J F, et al. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis[J]. Obstet Gynecol, 1984, 64(2):151-154.  
[5] Surrey E S. Endometriosis and assisted reproductive technologies: maximizing outcomes[J]. Semin Reprod Med, 2013, 31(2):154-163.  
[6] Treloar S A, Wick J, Nyholt D R, et al. Genomewide linkage study in 1 176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26[J]. Am J Hum Genet, 2005, 77(7):365-376.  
[7] Khan K N, Kitajima M, Hiraki K, et al. Toll-like receptors in innate immunity: role of bacterial endotoxin and toll-like receptor 4 in endometrium and endometriosis[J]. Gynecol Obstet Invest, 2009, 68(1):40-52.  
[8] Poon R T, Ho J W, Tong C S, et al. Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Br J Surg, 2004, 91(10):1354-1360.  
[9] Hao T, Rockwell P. Signaling through the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 protects hippocampal neurons from mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 63:421-431.  
[10] 马芳, 段彩芳, 黄学惠, 等. 沙利度胺联合孕三烯酮对大鼠子宫内膜异位症血管生成的影响[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(2):134-138.

[责任编辑 周冰冰]