

桂枝茯苓丸治疗大鼠子宫内膜异位症的机制研究

令红艳*

(乐山职业技术学院药学系, 四川 乐山 614000)

[摘要] 目的:探讨桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症(EMS)大鼠止痛的作用机制及对基质金属蛋白酶表达的影响。方法:复制大鼠模型,分为模型组,芬必得组($0.054 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),丹那唑组($0.036 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),桂枝茯苓丸低、高剂量组(含生药 $0.256, 1.024 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续 ig 给药 4 周,放免法测定大鼠血浆中 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$), β -内啡肽(β -EP),血栓素 B_2 (TXB $_2$),剥取大鼠异位内膜组织,测定体积,并检测基质金属蛋白酶-2(MMP-2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在异位内膜的表达。结果:桂枝茯苓丸各组异位内膜体积明显减小($P < 0.01$);桂枝茯苓丸各剂量组均能升高大鼠血浆 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, β -EP 水平,降低 TXB $_2$ 水平($P < 0.01$);桂枝茯苓丸各剂量组 MMP-2 及 MMP-9 表达阳性强度均降低($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:桂枝茯苓丸能抑制异位内膜的生长,其作用机制可能与抑制内膜组织中 MMP-2 及 MMP-9 表达有关;桂枝茯苓丸止痛机制可能是通过平衡前列腺素水平,缓解子宫平滑肌痉挛,升高内啡肽实现的。

[关键词] 桂枝茯苓丸; 子宫内膜异位症; 6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$; β -内啡肽; 血栓素 B_2 ; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0270-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121012.1009.032.html>

[网络出版时间] 2012-10-12 10:09

Mechanism Research on Treatment of Guizhi Fuling Pills for Endometriosis in Rats

LING Hong-yan*

(Department of Pharmacy, Leshan Vocational Technical College, Leshan 614000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of Guizhi Fuling pills (GFP) on pain and matrix metalloproteinases expression in rats with endometriosis. **Method:** Rat model of endometriosis (EMS) was established. The model rats were divided into the model group, ibuprofen group ($0.054 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), danazol group ($0.036 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and GFP low, high dose groups ($0.256, 1.024 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The treatment in each group was lasted for 4 weeks. Plasma 6-ketone prostaglandin $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF $_{1\alpha}$), beta endorphins (beta EP) and thromboxane B_2 (TXB $_2$) were determined by radioimmunoassay. Tissue of uterus endometriosis was obtained, and lesions and size were evaluated. The expression of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in ectopic endometrium was determined. **Result:** GFP could reduce the volume of ectopic endometrium significantly ($P < 0.01$). Two doses of GFP could increase plasma 6-keto-PGF $_{1\alpha}$, beta EP level, and reduce TXB $_2$ level ($P < 0.01$). Two doses of GFP could reduce the expression of MMP-2 and MMP-9 ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** GFP inhibits the growth of ectopic endometrium. The mechanism may be related to inhibition of the expression of MMP-2 and MMP-9. The pain relieving of GFP may be obtained through the balance prostaglandin level, alleviation of spasms of smooth muscle, and elevation of endorphins.

[Key words] Guizhi Fuling pills; endometriosis; 6-ketone prostaglandin $F_{1\alpha}$; beta endorphins; thromboxane B_2 ; matrix metalloproteinases-2; matrix metalloproteinases-9.

子宫内膜异位症(EMS)是生育期妇女常见病、疑难病,发病率10%,80%的患者有痛经,50%合并不孕,严重影响患者的生活质量^[1]。桂枝茯苓丸出自《金匱要略》,具有化瘀生新、调和气血、消癥止痛之功,临床广泛用于子宫内膜异位症、子宫肌瘤等病证的治疗^[2]。前期实验研究显示桂枝茯苓丸可抑制EMS模型大鼠异位内膜的血管生成因子(VEGF),使异位内膜萎缩^[3];桂枝茯苓胶囊还能调节免疫功能而发挥抗内膜种植作用^[4]。本研究从前列腺素、 β -内啡肽的变化方面探讨了桂枝茯苓的止痛机制;并探讨了其对EMS模型大鼠异位内膜基质金属蛋白酶表达的影响,以进一步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康成熟未曾交配过的雌性Wistar大鼠,体重180~220 g。购自四川省医科院实验动物研究所,合格证号SCXK(川)2004-16。给予12 h光照,12 h黑暗的循环光照,按需给予饲料和水。

1.2 试剂与药物 桂枝茯苓丸(成都九芝堂金鼎药业有限公司),芬必得(葛兰素史克公司),丹那唑(上海华联制药有限公司)。6-酮前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α}), β -内啡肽(β -EP)及血栓素B₂(TXB₂)放免试剂盒,基质金属蛋白酶(MMP-2和MMP-9)抗体及联苯二胺(DAB)显色试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.3 仪器 石蜡切片机(德国徕卡公司),BS210S 1/万天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),HPLAS-1000计算机图像分析系统为本院实验室提供。

2 方法

2.1 EMS模型复制 选择动情周期4~5 d,并连续有2个正常动情周期的大鼠55只,在第3个动情期按Jones^[5]的子宫内膜自体移植法,建立大鼠EMS模型。于建模术后4周再次用涂片法检查大鼠的性周期和动情期;随机抽取5只,再次开腹,检查异位病灶生长情况,并病理检查证实移植物存活并有子宫内膜上皮、间质细胞及腺体生长,造模成功。

2.2 动物分组与给药 50只造模成功的大鼠随机分为模型组、芬必得组(0.054 g·kg⁻¹)、丹那唑(0.036 g·kg⁻¹)、桂枝茯苓丸低、高剂量组(含生药0.256,1.024 g·kg⁻¹)各10只,各组均ig,模型组给予等体积生理盐水。连续给药28 d。

2.3 检测指标与方法

2.3.1 血浆6-keto-PGF_{1 α} , β -EP及TXB₂水平 大鼠末次给药后禁食12 h,每只内眦取血2 mL,迅速

放入抗凝管中混匀,3 000 r·min离心,取血浆,-20℃保存待测。采用放免法检测。

2.3.2 异位内膜中MMP-2,MMP-9的表达 取血后以戊巴比妥钠麻醉大鼠,取移植植物,用游标卡尺测量其体积, $V=0.52 \times \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}$,比较各组体积变化情况。以4%多聚甲醛固定,24 h内常规石蜡包埋、切片,采用免疫组织化学SP-0023染色法检测。参照Terry^[6]的标准进行评分,即以阳性细胞百分率及显色深浅的半定量评分值之和为最终评分标准:①阳性细胞百分率评分:无细胞显色为0;<25%细胞显色为1;25%~50%细胞显色为2;>50%细胞显色为3;②显色深浅评分:不显色或显色不清为0;浅黄色为1;棕黄色为2;深褐色为3。2项评分相加为染色强度:0~1分为阴性(-),2分为弱阳性(+),3~4分为中度阳性(++),5~6分为强阳性(+++)。统计中、重度阳性强度的阳性积分总和(总积分)。

2.4 统计学处理 采用SPSS 15.0统计分析软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$,比较采用 t 检验;计数资料采用Wilcoxon等级分组秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠异位内膜体积比较 与模型组比较,芬必得组异位内膜体积变化不明显;丹那唑和桂枝茯苓丸各剂量组均明显小于模型组($P < 0.01$),见表1。

表1 各组大鼠异位内膜体积比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	异位内膜体积/mm ³
模型	-	103.24 ± 5.32
芬必得	0.054	99.60 ± 5.25
丹那唑	0.036	69.75 ± 4.52 ¹⁾
桂枝茯苓丸	0.256	85.25 ± 4.76 ¹⁾
	1.024	74.36 ± 4.40 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠血浆6-keto-PGF_{1 α} , β -EP及TXB₂水平比较 与模型组比较,芬必得组和桂枝茯苓丸各剂量组均能升高大鼠血浆6-keto-PGF_{1 α} , β -EP水平,降低TXB₂水平($P < 0.01$);丹那唑也能升高6-keto-PGF_{1 α} ,降低TXB₂($P < 0.05$),但 β -EP无明显改变,见表2。

3.3 各组大鼠MMP-2及MMP-9表达水平比较 与模型组比较,丹那唑和桂枝茯苓丸组MMP-2及MMP-9表达阳性强度均降低($P < 0.05, P < 0.01$);芬必得组变化不明显。见表3。

表 2 各组大鼠血浆 6-keto-PGF_{1a},β-EP 及 TXB₂ 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

ng·L⁻¹

组别	剂量/g·kg ⁻¹	6-keto-PGF _{1a}	β-EP	TXB ₂
模型	-	22.45 ± 7.62	64.90 ± 15.15	1119.25 ± 119.74
芬必得	0.054	45.02 ± 8.17 ²⁾	99.56 ± 16.42 ²⁾	835.62 ± 45.38 ²⁾
丹那唑	0.036	29.78 ± 7.68 ¹⁾	70.12 ± 14.82	1024.27 ± 52.64 ¹⁾
桂枝茯苓丸	0.256	36.35 ± 7.55 ²⁾	79.50 ± 15.34 ¹⁾	767.85 ± 44.28 ²⁾
	1.024	42.64 ± 7.82 ²⁾	85.02 ± 16.11 ²⁾	651.45 ± 40.85 ²⁾

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

表 3 各组大鼠移植植物 MMP-2 及 MMP-9 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MMP-2					MMP-9				
		-	+	++	+++	总积分	-	+	++	+++	总积分
模型	-	0	3	4	3	30	2	2	2	4	28
芬必得	0.054	0	3	4	3	29	2	2	2	4	28
丹那唑	0.036	2	4	3	1	15 ²⁾	2	4	2	2	19 ²⁾
桂枝茯苓丸	0.256	2	3	3	2	21 ¹⁾	2	3	3	2	22 ¹⁾
	1.024	1	4	4	1	18 ²⁾	3	3	3	1	15 ²⁾

4 讨论

EMS 属中医“痛经”、“癥瘕”等范畴,其主要病机为“血瘀络阻”,故治疗原则为活血化瘀、通经活络^[7]。血浆或组织中 PGI₂ 具舒张血管作用, TXA₂ 则有收缩血管作用,正常情况下二者处于生理平衡,这种平衡的破坏可直接引起子宫小动脉痉挛致子宫缺血而引起疼痛, TXA₂, 前列腺素 I₂ (PGI₂) 及代谢产物 TXB₂, 6-keto-PGF_{1a} 在病灶局部和盆腔液体中蓄积或比例失调及含量的异常,使子宫血管异常收缩造成子宫缺血和痉挛而致痛经,或抑制干扰排卵,这是导致 EMS 临床症状的机制^[8]。本实验结果显示,桂枝茯苓丸能升高 6-keto-PGF_{1a} 水平,降低 TXB₂ 水平,从而调节其平衡。β-EP 有内源性中枢镇痛作用,EMS 疼痛的发生、转归与血浆中 β-EP 的关系密切^[9],本实验结果显示桂枝茯苓丸能升高 β-EP 水平,从而达到缓解疼痛的作用。

EMS 具有类似恶性肿瘤转移侵袭的能力,细胞基质 (ECM) 的降解与重建是其关键因素,基质金属蛋白酶 (MMPs) 则是降解 ECM 的重要蛋白水解酶类,有研究证实 MMPs 与 EMS 的发生密切相关,其中 MMP-2, MMP-9 参与了 EMS 发生发展^[10], Ria^[11] 等的研究发现在卵巢巧克力囊肿组织中,血管生成数量的增加与 MMP-2, MMP-9 在异位内膜细胞中表达的增加同时存在, MMP-2, MMP-9 在 EMS 的发病过程中起到了决定性作用。本实验结果显示桂枝茯苓丸各剂量组均能抑制 MMP-2, MMP-9 的表达。

桂枝茯苓丸是治疗 EMS 的传统经方,在临床无论单独使用还是与西医治疗配合都有较好的临床疗效,能够缓解 EMS 疼痛,缩小内膜异位肿块。本实验证实桂枝茯苓丸能缩小异位内膜组织;桂枝茯苓丸改善疼痛的作用机制可能是通过平衡前列腺素水平、缓解子宫平滑肌痉挛、升高内啡肽来实现的;桂枝茯苓丸还能抑制 MMP-2, MMP-9 在异位内膜组织的表达,进而抑制异位内膜的侵袭、转移和种植,说明其治疗 EMS 是多层次、多靶点的。

[参考文献]

- [1] 魏郁清,杨根林,谈勇. 子宫内膜异位症的中医药研究进展[J]. 陕西中医, 2011, 32(11): 1559.
- [2] 李晓丽,崔晓萍. 桂枝茯苓丸治疗子宫内膜异位症探析[J]. 现代中医药, 2010(4): 34.
- [3] 张文举,王自能,郑辉,等. 桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症大鼠血管生成的影响[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版, 2004, 25(2): 164.
- [4] 胡春萍,胡婷婷,蔡雪婷,等. 桂枝茯苓胶囊对子宫内膜异位症大鼠脾脏 CD4⁺ T 淋巴细胞数和 NK 细胞杀伤活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 145.
- [5] Jones R C. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist (Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat [J]. Acta Endocrinologica, 1984, 106(2): 282.

苓桂术甘汤对大鼠心肌缺血再灌注 损伤心肌细胞凋亡的影响

龚明玉*, 杜超, 许倩, 李素婷

(承德医学院生化教研室, 河北承德 067000)

[摘要] 目的: 观察苓桂术甘汤在大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)时对心肌细胞凋亡的影响。方法: 40只SD大鼠随机分为假手术组, 模型组, 辛伐他汀组, 苓桂术甘汤组。辛伐他汀组药量为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 苓桂术甘汤组药量为 $50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 另2组给生理盐水 $1.0\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。采用结扎大鼠左冠状动脉前降支方法制备心肌缺血再灌注模型。缺血30 min、再灌注2 h后, 采用流式细胞术检测心肌细胞凋亡情况, 采用免疫组化技术检测心肌细胞 Smad3, Smad7 蛋白表达的变化。结果: 与假手术组相比, 模型组心肌细胞的凋亡率明显增加($P < 0.01$), 并且 Smad3 蛋白表达增加($P < 0.01$), Smad7 蛋白表达减少($P < 0.01$); 与模型组相比, 苓桂术甘汤和辛伐他汀可明显降低心肌细胞的凋亡率($P < 0.01$); 心肌细胞 Smad3 蛋白表达减少($P < 0.05$), Smad7 蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论: 苓桂术甘汤可以抑制大鼠缺血再灌注损伤时心肌细胞凋亡, 上调 Smad7 蛋白表达, 下调 Smad3 蛋白表达, 可能是其保护 MIRI 的作用机制之一。

[关键词] 苓桂术甘汤; 心肌缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; Smad 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0273-04

Effect of Lingui Zhugan Decoction on Cardiomyocyte Apoptosis Caused by Myocardial Ischemia Reperfusion in Rats

GONG Ming-yu*, DU Chao, XU Qian, LI Su-ting

(Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and mechanism of Lingui Zhugan decoction on cardiomyocyte apoptosis caused by ischemia reperfusion in rats. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into sham, model, simvastatin and Lingui Zhugan decoction group. Rats in simvastatin group were perfused with Simvastatin $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, rats in Lingui Zhugan decoction group were perfused with Lingui Zhugan decoction $50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, other two groups were given NS $1.0\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ a week before the operation. Myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) model was established by ligating the left descend coronary artery. After ischemia 30 min and reperfusion 2 hours, the changes in cardiomyocyte apoptosis were detected by flow cytometry, the

[收稿日期] 20120307(013)

[通讯作者] * 龚明玉, 在读博士, 副教授, 从事中药对心血管疾病的防治研究, Tel: 18796086859, E-mail: mingyugong@126.com

[6] Terry J, Saito T, Subramanian S, et al. TLE1 as a diagnostic immunohistochemical marker for synovial sarcoma emerging from gene expression profiling studies [J]. Am J Surg Pathol, 2007, 31(2): 240.

[7] 司徒仪, 曹立幸. 子宫内膜异位症不孕的中西医结合诊治[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(11): 969.

[8] 杨帆, 王燕, 杨淑梅, 等. 祛异康对子宫内膜异位症模型大鼠血浆 TXB₂ 和 6-Keto-PGF1 α 的影响[J]. 陕西中医, 2011, 32(11): 1557.

[9] 徐晓娟, 金沈锐. 芍药甘草汤不同配伍比例对痛经大

鼠 B-内腓肽的影响研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2004, 10(6): 4041.

[10] 车建华, 潘文婧, 刘倩, 等. MMP-2、MMP-9 及 EMMPRIN 在子宫内膜异位症中的表达及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(12): 19.

[11] Ria R, Loverro G, Vacca A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and-9 agree with progression of ovarian endometriosis[J]. Eur J Clin Invest, 2002, 32(3): 199.

[责任编辑 何伟]