

罂痛饮对大鼠子宫内膜异位症微血管密度的影响

李卫红*, 李莉, 谭文举
(广西中医学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:探讨罂痛饮对大鼠子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)微血管密度(microvessel density, MVD)的影响和抗血管形成作用。方法:采用自体子宫内膜移植法建立 EMS 大鼠模型,将 60 只大鼠分为正常组、模型组、罂痛饮低、中、高剂量组、丹那唑组 6 组,分别给予罂痛饮高、中、低剂量($42.9, 14.3, 4.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和丹那唑($0.0215 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)ig,模型组及空白组按照 $10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予生理盐水 ig,持续用药 28 d,SP 免疫组化法检测各组 EMS 大鼠在位内膜和异位组织灶中 MVD 的表达。结果:丹那唑组和高、中、低剂量罂痛饮减小大鼠异位组织体积分别为 $(32.96 \pm 15.38), (15.75 \pm 8.36), (38.16 \pm 17.32), (42.91 \pm 19.54) \text{ mm}^3$,与模型组 $(89.23 \pm 26.27) \text{ mm}^3$ 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。丹那唑组和高、中、低剂量罂痛饮降低 EMS 大鼠异位内膜 MVD 的计数 $(18.61 \pm 5.89, 12.24 \pm 4.82, 14.36 \pm 4.13, 16.53 \pm 4.56)$,与模型组 (26.43 ± 6.75) 比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:罂痛饮对子宫内膜异位症大鼠异位组织中 MVD 的表达和新生血管形成均有抑制作用,作用呈剂量依赖性。

[关键词] 罂痛饮;子宫内膜异位症;微血管密度;血管形成

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0181-03

Effect of Juantongyin on Microvessel Density of the Experimental Endometriosis in Rats

LI Wei-hong*, LI Li, TAN Wen-ju

(Guangxi Traditional Chinese Medicine College, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Juantongyin (JTY) on microvessel density (MVD) and antiangiogenesis in ectopic endometrium of rats. **Method:** To observe the effect of high-dose, middle-dose, low-dose JTY and danazol on MVD of endometriotic rats through setting up endometriosis model with rat self-endometria transplantation. Sixty rats were divided into 6 groups randomly: JTY high-dose group ($42.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), middle-dose group ($14.3 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), low-dose group ($4.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and danazol group ($0.0215 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), model group and control group ($10 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) of saline. **Result:** There was a marked diversity among model group (89.23 ± 26.27) mm^3 and other groups (32.96 ± 15.38), (15.75 ± 8.36), (38.16 ± 17.32), (42.91 ± 19.54) mm^3 ($P < 0.05$) of the ectopic tissue volume. There was a marked diversity among model group (26.43 ± 6.75), and other groups ($18.61 \pm 5.89, 12.24 \pm 4.82, 14.36 \pm 4.13, 16.53 \pm 4.56$), ($P < 0.05$) of the expression of MVD. **Conclusion:** JTY has inhibitory effect on the expression of MVD and angiogenesis in ectopic endometrium of rats, in a dose-dependent manner. JTY may be a new drug of antiangiogenesis in ectopic endometrium.

[Key words] Juantongyin; endometriosis; microvessel density; angiogenesis

[收稿日期] 20110418(016)

[基金项目] 广西自然科学基金课题(桂科青 099103)

[通讯作者] *李卫红,医学博士,副主任医师,从事中医药防治妇科生殖内分泌疾病的研究, Tel: 13006913206, E-mail: 794431024@qq.com

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是妇科常见疾病之一。EMs为良性病变,但它的某些生物学行为却与恶性肿瘤类似,最显著的特征是具有组织侵袭和血管生成的能力。近年来大量研究表明血管生成是EMs发生发展的重要环节,抑制EMs病灶

局部血管生成成为目前研究关注的热点之一。本实验以子宫内膜异位症模型大鼠作为实验对象,观察罂痛饮对其异位内膜血管形成的影响。

1 材料

1.1 动物 清洁级雌性成熟未交配过的 Wistar 大鼠 60 只,鼠龄(60 ± 5) d,体重 150 ~ 180 g,由广西医科大学实验动物中心提供。合格证号 SCXK(桂)2003-0003。常规饲养。

1.2 试剂与仪器 微血管染色用兔抗鼠 CD31 多克隆抗体免疫组化试剂盒(批号 BA1346)、即用型免疫组化超敏 UltraSensitive™ S-P(Mouse/Rabbit)试剂盒(批号 KIT-9710)均购自武汉博士德生物有限公司。酶底物显色剂 DABkit(20x)(产品编号 DAB-0031)购自武汉博士德生物工程有限公司。Olympus-CX21 型普通光学显微镜。

1.3 药物 罂痛饮由鸡血藤 20 g,丹参 15 g,当归 10 g,川芎 6 g,赤芍 10 g,补骨脂 10 g,白术 10 g,土茯苓 20 g,泽兰 10 g,龙血竭 6 g,田七 10 g,炙甘草 6 g 组成。购于广西中医学院附属瑞康医院,按原方药物比例水煎浓缩,配制成含生药量 1.33 g·mL⁻¹ 混悬液,放于 4 ℃ 冰箱保存,剂量按动物与人临床用药剂量换算公式算出。丹那唑胶囊,上海华联制药有限公司生产,批号 020301。

2 方法

2.1 动物模型建立、分组及给药 大鼠 60 只,随机抽取 10 只作为空白组,其余 50 只随机分为罂痛饮高、中、低剂量组、丹那唑组、模型组 5 组进行子宫内膜异位症造模。造模大鼠适应性饲养 1 周后,连续 5 d 行阴道脱落细胞学检查,择动情期行造模术,采用大鼠自体内膜子宫内异位症造模方法,参照 Jones 方法^[1]。造膜 4 周末,空白组及造模大鼠各随机取 6 只做相关检测(以移植植物有血管形成,积液高度 > 2 mm,送检证实内膜成活作为模型成功的标准)证实子宫内膜异位症形成。造膜 4 周开始给药,剂量按动物与人临床用药剂量换算公式算出,其中罂痛饮高、中、低剂量组分别 ig 42.9, 14.3, 4.8 g·kg⁻¹(相当于成人临床用量等效量的 4, 2, 1 倍)^[2],丹那唑组以 21.5 mg·kg⁻¹(相当于成人临床用量等效量的 2 倍)混悬液给大鼠 ig,模型组及空白组按照 10 mL·kg⁻¹生理盐水,1 次/d,连续 ig 4 周。

2.2 指标的检测

2.2.1 SP 法检测在位及异位内膜组织微血管密度

和异位组织体积测量 末次给药后,禁食不禁水 12 h,5% 水合氯醛(7 mL·kg⁻¹) ip 麻醉大鼠,打开腹腔,暴露异位组织,游标卡尺测量组织体积大小;取下在位及异位内膜置于 10% 甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚度连续切片,进行 HE 染色和免疫组化染色。

2.2.2 微血管密度(MVD)的测定与计数 参照 Veidner 等^[3]报道的方法,在低倍视野下选取微血管数量最丰富的区域,在 200 倍视野下计数 5 个视野的微血管数目,以任何一个棕色染色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为一个血管计数,然后求平均值。凡管腔 > 8 个红细胞大小、炎症、肉芽、坏死区、带有较厚肌层的血管及静脉窦均不计数。

2.3 统计学处理 所有数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用双侧 *t* 检验。*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况 用药前后各组大鼠精神均可,活动正常,饮食及体重均无明显改变。

3.2 对大鼠异位组织体积的影响 用药后,丹那唑组和不同剂量罂痛饮组较模型组体积有不同程度的减小,与模型组比较有显著性的差异(*P* < 0.05)。说明丹那唑组和不同剂量罂痛饮均可以抑制异位子宫内膜的发展。丹那唑组和罂痛饮高剂量组间比较有显著性差异(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 罂痛饮对大鼠异位组织体积的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	治疗后体积/mm ³
模型	-	89.23 ± 26.27
丹那唑	0.021 5	32.96 ± 15.38 ¹⁾
罂痛饮	42.9	15.75 ± 8.36 ^{1,2)}
	14.3	38.16 ± 17.32 ¹⁾
	4.8	42.91 ± 19.54 ¹⁾

注:与模型组相比¹⁾ *P* < 0.05;与丹那唑组相比²⁾ *P* < 0.05(表 2 同)。

3.3 对大鼠在位及异位内膜 MVD 的影响 模型组异位内膜的 MVD 要高于在位内膜;模型组在位内膜 MVD 较正常组高,但无统计学意义;用药后,丹那唑组和不同剂量罂痛饮组异位内膜较模型组 MVD 均有下降,比较有显著性的差异(*P* < 0.05);高剂量罂痛饮组较丹那唑组异位内膜 MVD 下降明显,比较有显著性的差异(*P* < 0.05)。结果见表 2。

表2 用药后各组在位和异位内膜

组别	剂量/g·kg ⁻¹	MVD 值比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)	
		在位内膜	异位内膜
空白	-	17.60 ± 5.85	-
模型	-	20.65 ± 4.15	26.43 ± 6.75
丹那唑	0.0215	18.37 ± 4.47	18.61 ± 5.89
罂痛饮	42.9	18.72 ± 4.34	12.24 ± 4.82 ^{1,2)}
	14.3	18.43 ± 4.32	14.36 ± 4.13 ¹⁾
	4.8	18.26 ± 4.53	16.53 ± 4.56 ¹⁾

4 讨论

近年来血管生成在 EMs 的发生与发展中的作用受到广泛重视^[4-5], MVD 是对新生血管生成做出定量描述的一个指标。本研究通过检测 EMs 模型 MVD 的变化, 发现异位内膜病灶区的 MVD 值明显增高, 与 Khan 等^[6]的结果相同, 提示病灶的出现及维持与局部血供密切相关, 推测异位病灶通过分泌相关血管生成促进因子, 如血管内皮生长因子(VEGF)、细胞间黏附因子(ICAM-1)等刺激血管内皮的增殖、迁移, 诱导血管形成增多, 为异位内膜提供丰富的血供, 为病灶的存在与继续生长提供基础^[7]。

EMs 属中医“癥瘕”范畴, 根据本病所导致的痛经、不孕等主症, 以及现代医学对局部病灶病理变化(增生、浸润、复发、结节)的认识, 以“湿、瘀”立论^[8]。方中以《金匱要略》当归芍药散为基础方加减而成。当归芍药散是治疗“妇人腹中诸疼痛”的著名方剂, 现代药理学研究证明其有镇痛、抗炎、缓解平滑肌痉挛、降低血黏度, 改善微循环及促排卵, 促黄体功能作用。鸡血藤、丹参、当归、川芎、赤芍补血行血, 补而不滞, 补中有行, 恰合女子血常不足, 易虚易瘀特征, 以扶正驱邪; 补骨脂、白术、土茯苓温肾健脾利湿, 合泽兰既能化瘀, 又能利湿; 使湿祛瘀化, 且药物甘淡平和, 利湿而不伤阴; 龙血竭、田七化瘀散结止痛; 炙甘草合芍药即为《伤寒论》芍药甘草汤, 经临床及实验研究证实为缓急止痛要药; 以上诸药组成罂痛饮, 不仅原袭了经方当归芍药散调和肝脾, 化瘀利湿的功用, 并强化了温肾化瘀助孕, 行气止痛散结的功效。

本研究结果显示罂痛饮治疗后在位内膜的 MVD 均有下降, 但与正常组和假手术组相比均无明显差异; 罂痛饮可显著缩小 EMs 模型大鼠异位病灶的体积, 异位组织内新生血管的数量明显减少。推测可能通过降低在位及异位内膜中 VEGF 及 ICAM-

1 的表达而达到治疗的目的^[9-10]。说明 EMs 模型大鼠在位内膜与异位内膜对药物罂痛饮抑制血管生成的反应不一, 而罂痛饮能显著抑制 EMs 模型大鼠异位移植物的血管生成, 且呈剂量依赖性, 提示罂痛饮对 EMs 的治疗具有潜在的应用前景。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.
- [3] Xavier P, Beires J. Endometriosis clinical aspects: suband endometrial blood flow in patients with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2004, 19(5): 1168.
- [4] Laschke M W, Elitzsch A, Vollmar B, et al. Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions [J]. Hum Reprod, 2006, 21(1): 262.
- [5] Laschke M W, Menger M D. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis [J]. Hum Reprod Update, 2007, 13(4): 331.
- [6] Khan K N, Masuzaki H, Fujishita A, et al. Immunoeexpression of hepatocyte growth factor and c-Met receptor in the eutopic endometrium predicts the activity of ectopic endometrium [J]. Fertility and Sterility, 2003, 79(1): 173.
- [7] Gagne D, Page M, Robitaille G, et al. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2003, 18(8): 1674.
- [8] 李卫红, 李莉. 从湿瘀论治子宫内膜异位症 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(3): 86.
- [9] 李卫红, 李莉, 宋小燕. 罂痛饮对子宫内膜异位症大鼠血管生长因子的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(1): 34.
- [10] 李卫红, 李莉, 宋小燕, 等. 罂痛饮对子宫内膜异位症大鼠 ICAM-1 的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 12(12): 3078

[责任编辑 聂淑琴]