

## 益气化瘀方对产后子宫复旧不全模型大鼠 TNF- $\alpha$ , IL-1, 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , TXB<sub>2</sub> 的影响

邓海燕<sup>1</sup>, 曾晶<sup>1</sup>, 查亚萍<sup>1</sup>, 李丹<sup>1</sup>, 谈珍瑜<sup>2\*</sup>

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208;

2. 湖南中医药大学第一附属医院 国家中医药管理局重点学科中医妇科, 长沙 410007)

**[摘要]** 目的:探讨益气化瘀方对产后子宫复旧不全模型大鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1(IL-1)、6-酮-前列腺素 F<sub>1 $\alpha$</sub> (6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> )、血栓素 B<sub>2</sub>(TXB<sub>2</sub>)的影响。方法:将 72 只雌鼠随机分为空白组、模型组、产复康组及益气化瘀方低、中、高剂量组(4.68, 9.36, 18.72 g·kg<sup>-1</sup>)。除空白组外,其余各组均造成子宫复旧不全模型,并于造模后第 1~7 天分别 ig 给药。采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- $\alpha$  值;采用免疫组化法检测 IL-1 含量;采用放免药盒测试法测定 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  和 TXB<sub>2</sub> 的含量。结果:与空白组相比,模型组 IL-1 平均灰度、TXB<sub>2</sub> 显著降低( $P < 0.01$ ),其余各指标升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组相比,产复康组 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  降低无统计学意义,其余各指标变化差异性显著( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。益气化瘀方中剂量组 IL-1 平均灰度值升高、IL-1 面密度值及 TNF- $\alpha$  值降低有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );益气化瘀方高剂量组各指标变化均有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与产复康组相比,益气化瘀方高剂量组降低 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  水平的作用较显著。而益气化瘀方各剂量组间比较,益气化瘀方高剂量组能更好调节 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比值。结论:益气化瘀方能降低炎症因子 TNF- $\alpha$ , IL-1 水平,有抗炎作用;能调节 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比值,促进 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 之间的动态平衡,使止血而不留瘀,从而发挥治疗产后子宫复旧不全之功效。益气化瘀方高剂量组疗效显著。

**[关键词]** 产后子宫复旧不全;益气化瘀方;肿瘤坏死因子 $\alpha$ ;白介素-1;6-酮-前列腺素 F<sub>1 $\alpha$</sub> ;血栓素 B<sub>2</sub>;大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0196-003

## Effect of Yiqi Huayu Fang on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1, 6-Keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub> , Thromboxane B<sub>2</sub> in Rat Model of Subinvolution of Uterus

DENG Hai-yan<sup>1</sup>, ZENG Jing<sup>1</sup>, ZHA Ya-ping<sup>1</sup>, LI Dan<sup>1</sup>, TAN Zhen-yu<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Traditional Chinese Medicine(TCM), Changsha 410208, China;

2. The 1<sup>st</sup> Affiliated Hospital of Hunan University of TCM The Key Discipline of State Administration of TCM in Gynecology, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Yiqi Huayu Fang on tumor necrosis factor - $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 (IL-1), 6-keto-prostaglandin F<sub>1 $\alpha$</sub>  (6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> ), thromboxane B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) in rats model of subinvolution of uterus. **Method:** Seventy-two SD female rats were randomly divided into 6 groups: blank group, model group, Chanfukang group and small-, middle-, large-dose of Yiqi Huayu Fang group. The model of subinvolution of uterus was established for rats in the groups beside the blank one. All rats in each group were administered by intragastric infusion with corresponding drugs during day 1 - 7 after the model established. The contents of TNF- $\alpha$ , IL-1, 6-K-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  and TXB<sub>2</sub> were respectively detected by the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunohistochemistry and radioimmunoassay (RIA). **Result:** Compared with blank group, the content of average gray level of IL-1 and TXB<sub>2</sub> in model group decreased significantly ( $P < 0.01$ ) while other indexes in this group became higher ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with model group, other indexes in Chanfukang group changed

**[收稿日期]** 20101130(011)

**[第一作者]** 邓海燕,在读硕士研究生, E-mail: vivian851127@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \*谈珍瑜,教授,主任医师, Tel: 0731-85600443

significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) except 6-K-PGF $_1$ ; there had not obvious effects in small-dose of Yiqi Huayu Fang group; average gray level of IL-1 increased, while area density and TNF- $\alpha$  decreased in middle-dose of Yiqi Huayu Fang group, these changes were significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); All indexes in large-dose of Yiqi Huayu Fang group changed apparently. Compared with Chanfukang group, large-dose of Yiqi Huayu Fang group had a more remarkable effect on reducing 6-K-PGF $_1$  level. Group comparison among small-, middle-, large-dose of Yiqi Huayu Fang, large-dose group could regulating PGI $_2$ /TXA $_2$  ratio better. **Conclusion:** Yiqi Huayu Fang has anti-inflammatory effect by reducing the content of TNF- $\alpha$  and IL-1; It can also adjust PGI $_2$ /TXA $_2$  ratio to maintain dynamic equilibrium and to got hemostasis without blood stasis. Through these ways, Yiqi Huayu Fang plays a role in the treatment of subinvolution of uterus. Large-dose of Yiqi Huayu Fang had a significant curative effect.

[Key words] subinvolution of uterus; Yiqi Huayu Fang; tumor necrosis factor  $\alpha$ ; interleukin 1; 6-Keto-prostaglandin F $_{1\alpha}$ ; thromboxane B $_2$ ; rats

产后子宫复旧不全是指产后 6 周子宫仍未能恢复到非孕状态,是产后较多见的并发症,常表现为血性恶露持续时间长,甚至阴道大量出血,以及伴有腰痛和下腹坠胀痛等。诸多因素均可导致产后子宫复旧不全,子宫内膜炎是其中较常见的一种。本实验以产后子宫内膜炎导致的子宫复旧不全模型大鼠为基础,观察益气化瘀方对各组大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),白介素-1 (IL-1),6-酮-前列腺素 F $_{1\alpha}$  (6-K-PGF $_{1\alpha}$ ),血栓素 B $_2$  (TXB $_2$ )表达的影响。

## 1 材料

**1.1 药物** 益气化瘀方由党参、黄芪、蒲黄、鹿衔草、马鞭草、茜草、台乌药、狗脊、续断、甘草 10 味组成。上药制成浸膏,由湖南中医药研究院提供,批号 20090328。临床用量为 52 g·d $^{-1}$ ,经换算得大鼠用量为 4.68 g·kg $^{-1}$ 。实验当日将浸膏用冷开水配成所需浓度供 ig,动物的低、中、高剂量分别相当于临床等效剂量的 1,2,4 倍。产妇康颗粒,临床用量 60 g·d $^{-1}$ ,大鼠给药量为 5.4 g·kg $^{-1}$ ,深圳三顺制药有限公司生产,批号 080802。

**1.2 动物** 选取清洁级 SD 大白鼠共 108 只,雌雄比为 2:1,鼠龄 3 个月以内,体重 180~220 g,由湖南斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(湘)2009-0004。本实验观察对象为雌鼠,实验室环境符合 SPF 动物实验室要求。

**1.3 细菌菌种** 致病性大肠杆菌,临床分离菌,由湖南中医药大学微生物研究室提供,菌号 X25922。

**1.4 试剂** 人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )定量酶联检测试剂盒,上海森雄科技实业有限公司提供,批号 0906141。白介素-1 (IL-1)免疫组化试剂盒,武汉博士德生物技术有限公司提供,批号 BA1643。6-酮-前列腺素 F $_{1\alpha}$  (6-K-PGF $_{1\alpha}$ )和血栓素 B $_2$  (TXB $_2$ )放射免疫试

剂盒,北京华英生物技术研究所提供,批号 20090620。

**1.5 仪器** TP100 型动物天平(湘仪天平仪器厂); AG205 电子天平(梅特勒-托力多公司); T22S 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); DHW-600 型不锈钢电热恒温水箱(北京东霞科学仪器厂); MK3 型酶标仪(热电<上海>仪器有限公司); Motiic B $_3$  显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司); MIAS 医学图象分析系统(北航公司)。

## 2 方法

**2.1 分组** 将雌鼠先分层再按随机数字表法随机分为 6 组:空白组,模型组,产妇康组,益气化瘀方低、中、高剂量组。

**2.2 造模** 参考文献[1]方法造成产后子宫内膜炎大鼠模型。将大鼠按雌雄比 2:1 合笼,每笼 3 只,同样条件下饲养至雌鼠自然分娩。分娩后第 1 天,对大鼠进行腹部切口术。在距耻骨联合上 1 cm 处的腹部正中做 1 个 0.8~1 cm 小切口,用 1 mL 普通注射器将生理盐水注入空白组大鼠双侧子宫;将过夜培养后的致病性大肠杆菌(X25922)用生理盐水稀释成 1.0×10 $^7$  个/mL,取 0.20 mL 注入其他组雌鼠子宫。接种后雌鼠子宫黏膜下层充血、出血,并有炎性细胞浸润,造模成功。

**2.3 给药** 造模后第 1 天开始,将益气化瘀方低、中、高剂量组大鼠依次按 4.68,9.36,18.72 g·kg $^{-1}$  ig;产妇康组大鼠 5.4 g·kg $^{-1}$  ig;模型组、空白组均以蒸馏水 ig。各组大鼠 ig 体积均为 8 mL·kg $^{-1}$ ,1 次/d,连续 7 d。

**2.4 指标及方法** 各组大鼠末次 ig 2 h 后以 20% 乌拉坦 ip 麻醉,腹主动脉取血 4.0 mL,室温下静置 1 h,血样凝结后在 4℃ 下离心 10 min,取上层血清-20℃ 保存,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- $\alpha$ 。采血后迅速剖腹取各组雌鼠

右侧子宫置于 4% 福尔马林固定液中固定,常规脱水、包埋、切片、脱蜡至水、染色、封片、图像分析。所有步骤严格按 IL-1 免疫组化试剂盒所示方法进行。用显微摄像系统在每张切片上随机选取 5 个视野,将图像放大 400 倍,输入系统分析,检测阳性细胞率、测定平均灰度值、面密度值。

取子宫组织 200 mg,用眼科剪剪成小碎块后加入 4.5 mL 生理盐水和 0.5 mL 无水乙醇(9:1),倒入玻璃匀浆器,按 1 500 r·min<sup>-1</sup> 研磨 8 min,将组织制成 4% 的组织匀浆。将匀浆以 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液 -20 ℃ 保存,采用放免药盒测试法测定 6-K-PGF<sub>1α</sub> 和 TXB<sub>2</sub> 的含量。

### 2.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行

表 1 益气化瘀方对产后子宫复旧不全大鼠子宫组织 IL-1 平均灰度、面密度,6-K-PGF<sub>1α</sub>,TXB<sub>2</sub> 及血清 TNF-α 比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	IL-1		TNF-α	6-K-PGF <sub>1α</sub>	TXB <sub>2</sub>
		平均灰度	面密度	/ng·L <sup>-1</sup>	/ng·L <sup>-1</sup>	/ng·L <sup>-1</sup>
空白	-	214.46 ± 3.66 <sup>2)</sup>	0.281 ± 0.035 <sup>2)</sup>	36.06 ± 1.262)	293.83 ± 7.01 <sup>1)</sup>	114.13 ± 8.72 <sup>2)</sup>
模型	-	150.62 ± 7.04	0.630 ± 0.736	42.63 ± 2.03	365.35 ± 17.87	78.96 ± 6.45
产妇康	5.4	180.35 ± 9.69 <sup>1)</sup>	0.290 ± 0.032 <sup>2)</sup>	35.38 ± 1.67 <sup>2)</sup>	337.73 ± 13.05	101.36 ± 4.38 <sup>2)</sup>
益气化瘀方	4.68	169.59 ± 12.07	0.443 ± 0.111	38.39 ± 1.23	346.25 ± 9.50 <sup>2)</sup>	89.64 ± 4.27
	9.36	178.23 ± 5.82 <sup>2)</sup>	0.348 ± 0.094 <sup>1)</sup>	37.57 ± 1.41 <sup>1)</sup>	331.50 ± 10.79	82.72 ± 6.28 <sup>1)</sup>
	18.72	181.73 ± 8.41 <sup>1)</sup>	0.268 ± 0.042 <sup>2)</sup>	37.16 ± 1.91 <sup>1)</sup>	299.55 ± 24.19 <sup>1)</sup>	106.52 ± 3.51 <sup>2)</sup>

注:与模型组相比,<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01。

### 4 讨论

正常分娩后,由于子宫体肌纤维收缩及缩复作用,局部血液供应明显减少,子宫体积显著缩小,子宫腔内的胎盘剥离面亦相应缩小,加之子宫内膜的再生使剥离面得以修复,子宫通常在产后 5~6 周时恢复到接近非孕时状态。当上述复旧功能受到阻碍时,即发生子宫复旧不全。TNF-α 可作为观测凝血与炎症的指标;IL-1 是在局部和全身炎症反应中起核心作用的细胞因子,感染、炎症以及内毒素血症时,其值有不同程度的增高<sup>[2]</sup>。PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 之间的动态平衡可以控制正常的止血机制,防止血栓形成<sup>[3]</sup>,而 PGI<sub>2</sub>,TXA<sub>2</sub> 很不稳定,故通常将其稳定代谢产物 6-K-PGF<sub>1α</sub>,TXB<sub>2</sub> 作为观测指标。有人推测,子宫内膜炎症:细菌合成的脂多糖(LPS)→激活核因子-κB(NF-κB)↑→转录 IL-1↑,TNF-α↑→进一步激活单核/巨噬细胞(MΦ)、中性粒细胞(Neu)→激活胞内 NF-κB↑,一氧化氮合酶(iNOS)↑,释放 IL-1↑,TNF-α↑,PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比例失调→NO↑,纤溶酶原激活剂(PA)↑,纤溶酶原激活剂抑制物(PAI)↓→出血量多或淋漓不止<sup>[4,5]</sup>。益气化瘀方为尤昭玲教授临床有效经验方,此方以益气化瘀、扶正祛邪为法,功专益气摄血、化瘀止痛,化瘀不耗气、

数据分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态性和方差齐性的计量资料用单因素方差分析,不符合者用 Wilcoxon 秩和检验。P < 0.05 有统计学意义。

### 3 结果

免疫组化染色显示:空白组子宫内膜组织基本正常;模型组上皮脱落坏死,内膜连续性中断,有大量炎性细胞浸润,内膜下小血管部分扩张、充血,间质较疏松水肿;产妇康及益高组内膜上皮轻度损伤,炎性细胞较少,偶可见小血管扩张、充血,间质较致密,宫腔中未见明显渗液;益小、中组上皮损伤较模型组轻,较产妇康和益高组重。益气化瘀方对产后子宫复旧不全模型大鼠子宫组织 IL-1,6-K-PGF<sub>1α</sub>,TXB<sub>2</sub> 及血清 TNF-α 的影响,详见表 1。

止血不留瘀,虚实标本兼治,为治疗产后或人流、药流、上环等手术后阴道不规则流血、腹痛等症之良方。本实验结果表明,益气化瘀方能降低子宫内膜炎致子宫复旧不全大鼠 IL-1,TNF-α 异常高表达,发挥其抗炎作用;能降低 6-K-PGF<sub>1α</sub> 水平、升高 TXB<sub>2</sub> 水平,调节 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 比值,促进 PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> 的动态平衡,从而控制正常的止血机制,体现此方止血不留瘀的特点。高剂量组的益气化瘀方疗效更肯定。

### [参考文献]

- [1] 赵红琼,简子健,姚刚,等.建立大鼠实验性子宫内膜炎模型的探讨[J].新疆农业大学学报,2008,31(3):5.
- [2] 郭甫坤,吴曙光.白介素 1 信号转导研究进展[J].国外医学分子生物学分册,2001,23(1):13.
- [3] 秦莉花,王若光,尤昭玲.子宫异常出血的中医药研究思路[J].中医药导报,2007,13(8):95.
- [4] Goebeler M,Gillitzer R,Kilian K,et al. Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells[J]. Blood, 2001,97(1):46.
- [5] 游慧,尤昭玲.炎性子宫异常出血、凝血、修复机理的研究进展[J].中国中医药信息杂志,2004,11(7):649.

[责任编辑 聂淑琴]