

隔药饼灸对子宫内位症大鼠新血管生成的影响

覃 肯¹ 罗薇絮² 王 萍¹ 肖小文¹ 周志刚³

(1 江西中医药大学研究生院,南昌,330004; 2 湖南天添药用胶囊有限公司,岳阳,414017; 3 江西中医药大学基础医学院,南昌,330004)

摘要 目的:探讨隔药饼灸对子宫内位症大鼠血管生成的影响。方法:将大鼠分为空白对照组、隔药饼灸组、西药组以及模型对照组,分别进行相应处理,14 d 后处死,检测实验各组标本的 Ang-1 和 Ang-2 的表达。结果:与正常组比较,模型组、艾灸组和达那唑组大鼠的 Ang-1 表达均相对升高($P < 0.05$),与模型组比较,艾灸组和达那唑组大鼠 Ang-1 表达有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$),与正常组比较,模型组、艾灸组和达那唑组大鼠的 Ang-2 表达显著升高($P < 0.05$),与模型组比较,艾灸组和达那唑组大鼠 Ang-2 表达显著降低($P < 0.05$)。结论:隔药饼灸可能通过促进降低 Ang-2 的表达,抑制血管异常增生而达到治疗子宫内位症目的。

关键词 子宫内位症;隔药饼灸;Ang-1;Ang-2

Effect of Aconite-cake-partitioned Moxibustion on Angiogenesis in Rats with Endometriosis

Qin Ken¹, Luo Weixu², Wang Ping¹, Xiao Xiaowen¹, Zhou Zhigang³

(1 Graduated College, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2 TianTian Medicinal Capsule Lt. co., Yueyang 414017, China; 3 College of Fundamental Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To study the effect of aconite-cake-partitioned moxibustion on angiogenesis in rats with endometriosis.

Methods: The rats were randomly divided into control group, model group, moxibustion Group and Dalazol group. Rats in the four groups received treatment for 14 days and samples were made to detect the expression of ang-1 and ang-2 by western blotting assay.

Results: Compared with the control group, the ang-1 expression in the model group, moxibustion group and Dalazol group were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the ang-1 expression in the moxibustion group and Dalazol group were slightly decreased, but without significantly difference ($P > 0.05$). Meanwhile, the expression of ang-2 in the model group, moxibustion group and Dalazol group were significantly increased ($P < 0.05$), compared with the control group. The expression of ang-2 in the moxibustion group and Dalazol group were significantly decreased, compared with model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Aconite-cake-partitioned moxibustion on CV4 can treat endometriosis by decreasing the expression of ang-2 and inhibiting the angiogenesis.

Key Words Endometriosis; Aconite-cake-partitioned moxibustion; Ang-1; Ang-2

中图分类号:R245.82;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.07.036

子宫内位症(Endometriosis, EMs)为妇科常见病、多发病,且在近年来发病率呈明显上升趋势,普通人群 EMs 的发病率为 7%~10%,其中 70%~80% 患者伴随慢性盆腔疼痛,40%~50% 伴随不孕,严重影响患者的生命质量,不同程度的干扰患者的心理、婚姻和家庭^[1-2]。目前治疗尚无标准化治疗方案,治疗目的是减灭和消除病灶,减轻和消除疼痛,改善和促进生育,减少和避免复发^[2]。EMs 为一种确诊时间长的慢性病程,临床表现多样化、诊治复杂、复发率高。它已经是全世界关注的重大公共卫生问题。直接和间接的非医疗花费甚至超过了直接的医疗费用^[3]。灸法在 EMs 的治疗上具有独特的

优势,临床治疗上已取得了满意的疗效^[4-5]。EMs 发病机制还不明,大多学者认为异位组织的血管异常增生是该病发生发展的重要因素,抑制血管异常增生是目前研究治疗 EMs 的重点和热点。本文以 EMs 大鼠为研究对象,从隔药饼灸能干预 EMs 新血管生成的角度阐明隔药饼灸治疗 EMs 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雌性未孕 9 周龄清洁级 SD 大鼠 34 只,体重(200±20)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号 SCXK(湘)2013-0004。

1.1.2 药物 药饼灸的制备:采用上海中医药大学

基金项目:江西省教育厅科技项目(GJJ15550)

作者简介:覃肯(1988.09—),男,硕士,研究方向:针灸基础研究针灸实验工作,E-mail:135590132@qq.com

通信作者:周志刚(1971.05—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:针灸基础研究,E-mail:edmundzzg@sina.com

针灸经络研究所制备的药饼灸,达那唑胶囊(民生药业生产,国药准字 H33022461)。

1.1.3 试剂与仪器 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,生产批号 PV-9000),DAB 显色试剂盒(黄)(北京索莱宝科技有限公司,生产批号 DA1010),Trizol(由 Aidlab 公司提供,生产批号 Lot:252250AX),RNase Inhibitor(由 TransGen 公司提供,生产批号 LOT:I21222)。病理切片机(德国 Leica RM 2016 轮转式切片机),组织摊烤片机(武汉俊杰 JK-6 生物组织摊烤机),实时荧光定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司 ABI7900 型),显微镜(尼康 E100 型生物显微镜),电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),水平电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 先将 32 只大鼠分随机分为 2 组。即空白对照组 8 只,造模组 26 只。参照改良 LEMs 造模方法^[6]对 26 只大鼠造模。常规饲养 3 周后开腹,随机挑选 2 只已造模大鼠断头处死后开腹观察病灶,发现移植物体积增大,表面有囊状小泡聚集,病理检验提示成模。然后将造模大鼠随机分组为模型对照组、艾灸组,达那唑组,每组分别 8 只。

1.2.2 干预方法 正常组:常规饲养 14 d,不作任何实验处理;模型对照组:常规饲养 14 d,每天固定于手术板上 15 min,不作其他治疗处理;艾灸组:每天固定大鼠,在关元穴(定位:大鼠脐下约 25 mm,当于人关元穴位置)放置附子饼,上放艾炷,灸至皮肤发红(约 15 min 左右),1 次/d,连续治疗 14 d;达那唑组:每天每只大鼠灌服达那唑溶液 0.3 mL,含生药 12 mg(0.9% 生理盐水溶解),连续给药 14 d。

1.2.3 检测指标与方法 末次给药 24 h 后断头处死动物,在冰上快速选取并分离出三段子宫片段,每段长度约 1 cm 作用,然后迅速将样本放入 -80 ℃ 低温冰箱保存后待测。实验步骤均按 Ang-1 及 Ang-2 检测说明进行操作。结果判定方法:利用免疫组化的观察大鼠 Ang-1 及 Ang-2 的阳性情况,其评判标准为:胞质或胞膜着棕黄、棕褐色颗粒为阳性细胞,其染色程度可分为:基本不着色者计 0 分;着色淡者为 1 分;着色适中者为 2 分;着色深者为 3 分。阳性染色细胞百分比:着色细胞占计数细胞 <5% 为 0 分;5% ~ 25% 为 1 分;26% ~ 50% 为 2 分;51% ~ 75% 为 3 分, >75% 为 4 分。将每张切片着色程度

和着色细胞百分比得分相加最后得分 0-2 分者为阴性,3 分以上者为阳性^[7]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。Ang-1、Ang-2 表达率的比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与正常组比较,模型组、艾灸组和达那唑组大鼠的 Ang-1 表达均相对升高($P < 0.05$),与模型组比较,艾灸组和达那唑组大鼠 Ang-1 表达有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1 和图 1。与正常组比较,模型组、艾灸组和达那唑组大鼠的 Ang-2 表达显著升高($P < 0.05$),与模型组比较,艾灸组和达那唑组大鼠 Ang-2 表达显著降低($P < 0.05$)。见表 1 和图 2。

表 1 Ang-1 与 Ang-2 蛋白的表达[例(%)]

组别	只数	Ang-1 阳性(%)	Ang-2 阳性(%)
正常对照组	8	4(16.67%)	6(25.00%)
模型对照组	8	11(45.83%)* Δ	22(91.67%)* $\blacktriangle$
艾灸组	8	7(29.17%)* Δ	10(41.67%)* $\blacktriangle$
达那唑组	8	5(20.83%)* Δ	11(45.83%)* $\blacktriangle$

注:在 Ang-1 和 Ang-2 阳性 * $P < 0.05$, $\Delta P > 0.05$, $\blacktriangle P < 0.05$ 。

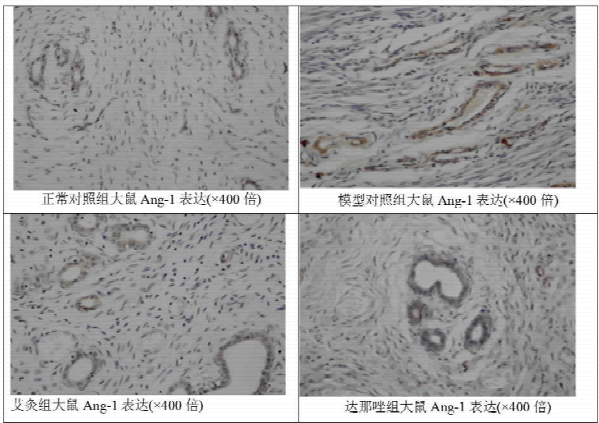


图 1 Ang-1 蛋白的表达

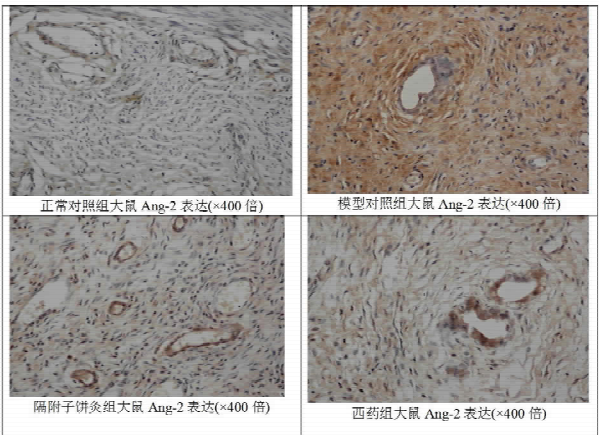


图 2 Ang-2 蛋白的表达

3 讨论

EMs 好发于育龄期妇女生殖系统,为具有侵袭性和雌激素依赖性的良性疾病。目前 EMs 病因和病机尚不明确,2015 年版《子宫内膜异位症的诊治指南》在发病机制指出应以 Sampson 经血逆流种植为主导理论,逆流至盆腔的子宫内膜需经黏附、侵袭、血管性形成等过程得以种植、生长、发生病变^[2]。血管生成有关的因素对 EMs 的发病作用越来越引起学术界高度重视。有研究结果发现血管生成在 EMs 的发生、发展过程中起着关键性作用^[8]。研究结果证明异位内膜及其周围组织形成新的血供和血管异常增生是 EMs 发生的基本条件,即“3A”程序^[9-10]。逆流经血中的子宫内膜能成功在异位种植成长与局部新生毛细血管的建立有关,这些新生血管可以异位病灶生长的物质供给^[11]。

有研究结果显示 Ang-1 和 Ang-2 作为血管生成调节因子,能特异性作用于血管内皮细胞,与 EMs 的发生发展有重要联系^[12]。Ang-1 能促进诱导新生血管的出芽、形成新生血管管腔、维持血管网络的稳定性、调节血管功能等方面具有重要作用,Ang-2 作为 Ang-1 的天然拮抗剂,竞争性与 Tie-2 受体结合,能破坏 Ang-1 稳定血管网络作用,利于血管内皮细胞的分裂及血管网络的重建^[13-14]。

隔附子饼由附子、肉桂、丹参、红花、木香、黄连等药物配方制成,上海中医药大学吴焕淦教授一直使用隔子饼灸治疗病因不明、病情比较复杂的溃疡性结肠炎、克隆氏病等疾病,取得了良好的效果。关元是任脉、冲脉、足三阴、阳明之会,冲任二脉皆起于胞宫,任脉为“阴脉之海”,冲脉为“血海”,该穴又位于脐下 3 寸,邻近胞宫,故亦为治疗 EMs 之要穴。艾绒燃烧产生的热量能穿透皮肤、直达组织深部,附子药性刚燥,纯阳之性,能行十二经脉,走而不守,外达皮毛而除表寒,艾炷与皮肤隔之以附子饼,火力温和,艾灸和药物双重作用同时对腧穴时行刺激,产生艾灸生物效应,影响组织细胞代谢。

本实验结果显示,模型组大鼠的 Ang-1 表达高于正常组、艾灸组和达那唑组,但结果并不具有统计学意义,与近年来的研究表明 Ang-1 与新血管生成关系并不显著^[15]相符,这说明 Ems 可能诱导新生血管的出芽、形成新生血管管腔,模型组大鼠 Ang-2 表达明显高于正常组、艾灸组和达那唑组,提示模型组 Ang-2 高表达,血管异常增生明显;艾灸组与达那唑组大鼠 Ang-2 的表达量比较模型对照组都有明显的下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。我们推测在

关元穴上施隔药饼灸对 EMs 血管生成有显著的抑制作用。

隔附子饼灸治疗子宫内膜异位症安全、简便、无不良反应。其可能通过促进降低 Ang-2 的表达,抑制血管异常增生而达到治疗子宫内膜异位症目的。本实验为临床治疗提供了理论基础,拓宽了隔附子饼灸的治疗范围,但还需进一步探讨更深层次的临床分子生物学作用机制。

参考文献

- [1] Ozkan S, Arici A. Advances in treatment options of endometriosis[J]. Gynecol Obstet Invest, 2009, 67(2): 81-91.
- [2] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊治指南[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 50(3): 161-169.
- [3] Levy AR, Osenenko KM, Lozano-Ortega G, et al. Economic burden of surgically confirmed endometriosis in Canada[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2011, 33(8): 830-837.
- [4] 谷凌云, 王蕴伶, 查青山. 雷火灸联合温经止痛汤治疗子宫内膜异位症临床观察[J]. 河北中医, 2014, 36(3): 361-362.
- [5] 李秀敏, 满玉晶. 非药物疗法治疗子宫内膜异位症性痛经临床研究[J]. 河南中医, 2015, 35(4): 848-850.
- [6] 张曦, 王鑫, 王红静, 等. 大鼠子宫内膜异位症模型建立方法的探索[J]. 华西医学, 2007, 22(4): 831-833.
- [7] 黄丹丹. VEGF, Ang-2, Tie-2 在子宫内膜异位症中的表达及相关性研究[J]. 疾病监测与控制, 2014, 8(12): 740-742.
- [8] Burney RO, Giudice LC. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis[J]. Fertil Steril, 2012, 98(3): 511-519.
- [9] Grund EM, Kagan D, Tran CA, et al. Tumor necrosis factor- α regulates inflammatory and mesenchymal responses via mitogen-activated protein kinase kinase, p38, and nuclear factor kappaB in human endometriotic epithelial cells[J]. Mol Pharmacol, 2008, 73(5): 1394-404.
- [10] Xu H, Zhang T, Man GC, et al. Vascular endothelial growth factor C is increased in endometrium and promotes endothelial functions, vascular permeability and angiogenesis and growth of endometriosis[J]. Angiogenesis, 2013, 16(3): 541-551.
- [11] Taylor RN, Yu J, Torres PB, et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis[J]. Reprod Sci, 2009, 16(2): 140-146.
- [12] Hata K, Udagawa J, Fujiwaki R, et al. Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie2 genes in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer[J]. Oncology, 2002, 62(4): 340-348.
- [13] Murray BW, Padrique ES, Pinko C, et al. Mechanistic effects of autophosphorylation on receptor tyrosine kinase catalysis: enzymatic characterization of Tie2 and phospho-Tie2[J]. Biochemistry, 2001, 40(34): 10243-10253.
- [14] Sullivan CC, Du L, Chu D, et al. Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(21): 12331-12336.
- [15] 尚思慧. Ang-1, Ang-2 及 Tie-2 在子宫内膜异位症表达的研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2006.