

隔药饼灸对子宫内膜异位症大鼠过氧化物酶增殖体激活受体- γ 和细胞间黏附分子-1表达的影响

周志刚¹ 王晓洁² 肖小文² 王萍² 覃肯³

(1 江西中医药大学研究生院,南昌,330004; 2 江西中医药大学基础医学院,南昌,330004; 3 江西中医药大学附属医院医务科,南昌,330004)

摘要 目的:观察隔药饼灸对子宫内膜异位症大鼠过氧化物酶增殖体激活受体- γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ , PPAR- γ)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响。方法:选取34只大鼠,将其随机分为空白对照组(8只)和造模组(26只),采用改良的造模法建立子宫内膜异位症大鼠模型。将造模成功的24只大鼠随机分为模型组、隔药饼灸组和丹那唑组,每组8只。采用Western blot检测各组样本ICAM-1和PPAR- γ 的表达。结果:与空白对照组比较,模型组、隔药饼灸组和丹那唑组大鼠的ICAM-1的表达显著上升(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,隔药饼灸组和丹那唑组的ICAM-1的表达显著降低(均 $P < 0.05$);与空白对照组比较,模型组、隔药饼灸组和丹那唑组PPAR- γ 的表达显著降低(均 $P < 0.05$),与模型组比较,隔药饼灸组和丹那唑组的PPAR- γ 的表达显著增强(均 $P < 0.05$)。结论:隔药饼灸能抑制ICAM-1表达,促进PPAR- γ 的表达,从而抑制子宫内膜细胞的黏附,阻止血管生成。

关键词 子宫内膜异位症;隔药饼灸;细胞间黏附分子-1;过氧化物酶增殖体激活受体- γ ;关元

Effects of Herb-partitioned Moxibustion on the Expression of ICAM-1 and PPAR γ in Rats with Endometriosis

Zhou Zhigang¹, Wang Xiaojie², Xiao Xiaowen², Wang Ping², Qin Ken³

(1 Graduate College of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 2 School of Fundamental Medicine of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China; 3 Medical Department of Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract Objective: To observe the effects of herb-partitioned moxibustion on the expression of ICAM-1 and PPAR γ in rats with endometriosis. **Methods:** A total of 34 female rats were randomly divided into 8 rats as control group and 24 rats for model establishment group. The endometriosis model was established by modified methods. 24 model rats were randomly divided into the model group, the herb-partitioned moxibustion group and the Danazol group with 8 rats in each group. The expression of ICAM-1 and PPAR γ by was detected by western blotting method. **Results:** Compared with the control group, the expression of ICAM-1 in the model group, the herb-partitioned moxibustion group and the Danazol group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the expression of ICAM-1 in the herb-partitioned moxibustion group and danazol group was significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the control group, the expression of PPAR γ in the model group, herb-partitioned moxibustion group and Danazol group was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of PPAR γ in the herb-partitioned moxibustion group and the Danazol group was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Herb-partitioned moxibustion can inhibit the expression of ICAM-1 and boost the expression of PPAR γ , which can inhibit the adhesion of endometrial cells and prevent angiogenesis.

Key Words Endometriosis ; Herb-partitioned moxibustion; ICAM-1; PPAR γ ; Guanyuan (RN 4)

中图分类号:R245;R711.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.038

子宫内膜异位症(Endometriosis, EMs)是指子宫内膜组织出现在子宫以外,临床常表现出痛经、性交痛、不孕等症状。其发病机制和原因尚不明确,但大多数学者认为其病理生理过程包括异位病灶的黏附、侵袭和血管形成^[1]。严重影响到女性的正常生活^[2]。研究显示,EMs在育龄女性中的流行率达

15%,而50%的不育患者合并EMs,50%~60%各种盆腔疼痛的女性也合并有EMs^[3]。临床治疗以手术和药物治疗为主,药物治疗存在着许多不良反应,而手术治疗切除病灶但仍可复发且增加组织黏连风险而导致卵巢功能受损甚至丧失^[4]。灸法治疗EMs能有效地改善患者临床症状、防止复发、降低某些药

基金项目:江西省卫计委2016年度中医药科技计划(2016A010)

作者简介:周志刚(1971.05—),男,博士,副教授,研究方向:灸法的基本原理和作用,E-mail:775906015@qq.com

通信作者:王晓洁(1993.08—),女,2016级硕士生,研究方向:灸法的基本原理和作用,E-mail:949364356@qq.com

物不良反应、促进妊娠,且其价格相对低廉,无明显毒性反应,作用时间持久^[5],适于长期使用等独特的优势^[6]。这有利于降低生产力损失、生命损害和医疗保健的消费,从而降低患者和社会的医疗成本。但灸法治疗子宫内膜异位症的机制还有待于进一步阐明,本研究通过检测异位子宫内膜过氧化物酶增殖体激活受体- γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ , PPAR- γ) 和细胞间黏附分子-1 (Inter-cellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1) 的表达来阐明隔药饼灸对异位子宫内膜的黏附和新生血管形成的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 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]的清洁级健康雌性未孕 9 周 SD 大鼠,体重(200 ± 20) g。所有实验大鼠置于室温(25 ± 2) °C 环境下饲养,自由饮水和摄食。

1.1.2 药物 药饼[上海市针灸经络研究所制备(将木香、红花、肉桂、丹参、附子等切碎研磨,以黄酒调和)];达那唑胶囊(民生药业,国药准字 H33022461);直径 5 mm 细艾条(南阳汉医艾绒有限责任公司);

1.1.3 试剂与仪器 磷酸酶抑制剂(碧云天生物技术研究所)、PMSF(碧云天生物科技研究所)、RIPA 裂解液(碧云天生物技术研究所)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所)、蛋白 maker(北京全氏金生物技术有限公司)、PVDF 膜(Millipore)、 β -actin 抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、检测抗体 PPAR- γ 和 ICAM-1(武汉三鹰生物技术有限公司)、显影定影试剂盒(武汉巴菲尔生物技术有限公司)、微量移液器(Eppendorf)、电泳仪电源(北京六一仪器厂,型号 DYY-7C)、垂直电泳槽(北京六一仪器厂,型号 DYCZ-24DN)、电转仪(北京六一仪器厂,型号 DYCZ-40)、水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号 TS-1)、PH 计(德国 Metter-Toledo GmbH 公司,型号 LP115)、CPA 型号电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 34 只清洁级雌性大鼠随机分为空白对照组(8 只)和造模组(26 只)。造模组给予 5 d 乙烯雌酚 0.02 mg/kg 灌胃,使大鼠处于动情期。参照自体移植造模方法进行造模^[7],造模 7 d 后随机挑选 2 只造模组大鼠给予断头处死并

解剖显示病灶部位有 5 ~ 8 mm 的半透明囊肿,囊肿内充满液体并有血管形成,提示造模成功。

1.2.2 给药方法 将 24 只造模成功的大鼠分为模型组、隔药饼灸组和丹那唑组,每组 8 只。1)空白对照组:将大鼠放入自制固定器中,使其头部、四肢、尾部固定,暴露关元穴,固定器置于支架上,不做其他处理,7 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程,疗程间隔 3 d。2)模型组:将大鼠放入自制固定器中,使其头部、四肢、尾部固定,暴露关元穴,固定器置于支架上,不做其他处理,7 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程,疗程间隔 3 d。3)隔药饼灸组:大鼠固定后,在关元穴处涂医用凡士林少许,放置药饼(直径约 0.5 cm),制小艾炷(绿豆大小,重量约 15 mg),直接放在药饼上,用线香点燃,待艾炷燃至大鼠挣扎时用镊子夹去,每穴灸 2 壮,持续时间约 10 min,7 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程,2 个疗程中间隔 3 d;4)丹那唑组:给予灌胃丹那唑混悬液(每天以 36 mg/kg 体重给药),1 次/d,7 d 为 1 个疗程,共 2 个疗程,2 个疗程间隔 3 d。

1.2.3 检测指标与方法 ICAM-1 和 PPAR- γ 表达:用 Western blot 检测。取适量 RIPA 裂解液匀浆组织,根据蛋白分子量配制 10% PAGE 胶电泳,待测定蛋白浓度后,各样品取 50 μ g 总蛋白上样电泳,判断目的蛋白得到充分分离(根据预染 marker 显示),取出 marker 切下的目的条带,用蒸馏水冲洗,将电转液中浸泡的与 PAGE 凝胶相同大小的 PVDF 膜取后浸泡在含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液)中室温摇床封闭 2 h。将 PVDF 膜浸泡在用封闭液稀释的相应一抗孵育液(1:2 000 稀释)4 °C 中过夜,用 TBST 充分洗涤 PVDF 膜后将 PVDF 膜浸泡于封闭液稀释相应的标记二抗孵育液(1:50 000 稀释),室温摇床孵育 2 h。之后显色曝光。用 BandScan 分析胶片灰度值,用 β -actin 作为内参,计算出 ICAM-1/ β -actin 和 PPAR- γ / β -actin 的值进行分析。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间数据采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ICAM-1 检测结果 与空白对照组比较,模型组、隔药饼灸组、丹那唑组 3 组 ICAM-1 的表达量显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组组比较,隔药饼灸组、丹那唑组组中 ICAM-1 的表达量显著下降(均 $P < 0.05$);与隔药饼灸组比较,丹那唑组的 ICAM-1 表达下降,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 PPAR- γ 检测结果 与空白对照组比较,模型组、隔药饼灸组和丹那唑组 PPAR- γ 的表达量显著降低(均 $P < 0.05$);与模型组比较,隔药饼灸组、丹那唑组中 PPAR- γ 的表达量显著增强(均 $P < 0.05$);与隔药饼灸组比较,丹那唑组的 PPAR- γ 表达量降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组 ICAM-1/ β -actin 及 PPAR- γ / β -actin 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	ICAM-1/ β -actin	PPAR- γ / β -actin
空白对照组($n=8$)	0.154 \pm 0.041	0.143 \pm 0.035
模型组($n=8$)	0.637 \pm 0.137 *	0.052 \pm 0.139 *
隔药饼灸组($n=8$)	0.384 \pm 0.106 * Δ	0.101 \pm 0.149 * Δ
丹那唑组($n=8$)	0.323 \pm 0.051 * Δ	0.121 \pm 0.105 * Δ

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

子宫内膜异位症虽是良性疾病,但其病理特征具有恶性肿瘤的特性^[8]。研究发现,子宫内膜在盆腔突破腹膜及器官“防线”,在“异域”生根、生长以至发病,要经过黏附(Attachment)、侵袭(Aggression)和血管形成(Angiogenesis)等 3 个分子与病理变化过程,称之为“3A”模式^[9];而内异症患者在位内膜的“3A”能力明显增强,其内膜逆流进入腹腔后,它们必须先和腹膜发生黏附,同时子宫内膜细胞之间也需要黏附、积聚成团,并且能突破机体的防御体系,才可能成功地种植生长^[1],导致疾病的发生。

实验研究表明,子宫内膜的异位生长需要细胞的黏附,在这个过程中细胞间黏附分子(Inter-cellular Adhesion Molecule-1, ICAM-1)发挥关键作用^[10]。ICAM-1 是单链糖蛋白的一种,为淋巴细胞功能相关抗原-1 的配体,属于细胞黏附分子中的免疫球蛋白超家族一员。研究发现,ICAM-1 可介导细胞与细胞之间的黏附^[11],参与细胞信号转导、炎性反应等生理和病理过程^[12]。有研究发现 EMs 异位内膜 ICAM-1 存在高表达,与疾病有密切的关系^[13]。

过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ , PPAR)属于 II 型核受体超家族成员之一,PPAR- γ 参与了机体多种生理病理过程,包括脂肪代谢、糖代谢、细胞增殖与分化、肿瘤发生、炎性反应及免疫反应等^[14]。PPAR- γ 通过与配体结合被激活产生炎性反应抑制反应、阻止血管生成等作用,这引起了广大科学家的广泛关注,可能成为治疗子宫内膜异位症的新靶点。PPAR- γ 在异位子宫内膜组织中表达情况的研究报道较少。Ohama 等^[15]研究表明 PPAR- γ 在体外培养

的子宫内膜异位内膜基质细胞中有表达,而 McKinnon 等^[16]发现 PPAR- γ 蛋白在人异位子宫内膜基质细胞和上皮细胞均呈高表达。Nenicu 等^[17]研究发现替米沙坦抑制小鼠异位子宫内膜异位组织生长除了通过阻断血管紧张素 II 受体途径外,还与激活 PPAR- γ 途径有关。研究发现,PPAR- γ 激动剂罗格列酮显著抑制狒狒腹膜异位子宫内膜组织的生长^[18],而且能显著抑制小鼠子宫内膜异位损伤部位体积^[19]。由此推断 PPAR- γ 异位子宫内膜是非低表达,由上可知两者似有矛盾之处。

研究发现,灸法能抑制细胞 ICAM-1 的表达从而抑制细胞的黏附过程^[20],灸法可以激活细胞 PPAR- γ 的表达,有类似 PPAR- γ 激动剂作用^[21]。我们前期研究发现,现代文献针灸治疗子宫内膜异位症主要取穴为关元、三阴交、气海、中极、子宫,经脉以任脉、足太阴脾经为主,主要分布在胸腹部,特定穴以募穴为主^[22],与中药组、西药组比,针灸治疗 EMs 的有效率及改善症状的疗效更佳,在 VAS 疼痛评分方面,针灸组相对对照组的治疗效果更具有优势^[23]。在此研究基础上我们在关元穴上施隔药饼灸探讨其对子宫内膜异位症大鼠信号转导通路的影响,结果显示隔药饼灸可以调控 p38MAPK 信号通路,减少 IL-4 表达,促进 IFN- γ 表达,介导炎性反应,促进 Th 细胞向 Th1 分化,Th 细胞动态平衡有恢复趋势。

子宫内膜异位症是西医学病名,在中医学中并无此病名,根据其临床症状属于月经不调、不孕、崩漏等范畴。灸法不仅能提高患者妊娠率,缓解症状,而且无不良反应且降低医疗成本^[5]。关元穴为下腹部靠近子宫的任脉穴位,具有行气止痛、活血化瘀的功效。有研究显示 EMs 的病机是瘀阻冲任,在 EMs 的针灸取穴均以任脉穴位作为主穴,通过调理冲任使机体气血阴阳平衡,而关元穴的频次最高^[22]。调查表明任脉穴位的常用功效有健脾和胃、调腹、调经引产、壮肾利尿等 17 项,这些功能可归纳为两大类:一是治疗任脉循行部位的疾病;二是治气、补虚、散寒、清热。“调腹(散积)”的功效出现 702 次。附子饼由木香、红花、肉桂、丹参、附子等组成,具有疏肝理气、活血化瘀的功效^[24],研究显示活血化瘀中药能抑制异位子宫内膜的生长^[25],对子宫内膜异位症的治疗有显著疗效^[26]。

本研究在前期研究结果基础上,探索隔药饼灸对 EMs“3A”模式中黏附和血管形成病理过程中作用。本研究结果发现,模型组大鼠的 ICAM-1 表达显著上升,推断在子宫内膜症病理过程中,ICAM-1 高

表达,介导异位内膜细胞与细胞之间的黏附,参与细胞信号转导、炎性反应等生理和病理过程;经隔药饼灸处理后,异位内膜组织中的 ICAM-1 的表达下调,可以推断在关元穴实施隔药饼灸后,经过艾灸的生物和非生物效应刺激,可以抑制 ICAM-1 的表达,使病理过程向良好方向发展。目前国内尚无子宫内膜异位症 PPAR- γ 表达的报道,但有报道发现子宫内膜癌患者的子宫内膜 PPAR- γ 呈低表达,在高分化的肿瘤细胞中呈高表达^[27]。本实验显示,与空白对照组比较,模型组大鼠子宫内膜 PPAR- γ 明显降低,经过隔药饼灸和丹那唑治疗后,子宫内膜 PPAR- γ 表达明显增强。本实验结果与 McKinnon 等^[16]报道子宫内膜 PPAR- γ 高表达相反,但根据 Nenicu 等^[17]抑制小鼠异位子宫内膜异位组织生长与激活 PPAR- γ 有关的报道,可以推断子宫内膜 PPAR- γ 表达至少是非低表达,因此本实验数据更符合实际。所以我们可以推测在关元穴实施隔药饼灸具有类似 PPAR- γ 激动剂作用,可以阻止新生血管形成。

由此可知,隔药饼灸可以抑制子宫内膜异位症大鼠 ICAM-1 和促进 PPAR- γ 的表达来抑制细胞与细胞之间的黏附作用和阻止新生血管形成。这为临床使用隔药饼灸治疗 EMs 提供了有力的理论指导。

参考文献

[1] 凌丽. 子宫内膜异位症免疫机制研究进展[J]. 国际妇产科学杂志, 2015, 42(1): 33-37.

[2] 刘开江. 子宫内膜异位症疼痛的伴随症状与治疗[J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(9): 650-652.

[3] 李雷, 冷金花. 子宫内膜异位症及其治疗对女性生育影响的研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2013, 29(5): 393-396.

[4] 陈灿, 王冰. 子宫内膜异位症诊断与治疗进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2014, 28(2): 114-115.

[5] 牛向馨, 牛乾, 王小蔓, 等. 平冲化瘀通络法联合灸法治疗子宫内膜异位症痛经 32 例的临床研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(19): 329-332.

[6] 沈烨, 曹雪梅. 子宫内膜异位症术后药物治疗现状及进展[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(21): 3315-3318.

[7] 金济云, 夏亲华. 子宫内膜异位症动物模型研究进展[J]. 中国医药导报, 2016, 13(5): 28-31.

[8] 武梅, 翟东霞, 张丹英, 等. 子宫内膜异位症炎性效应与血瘀证相关性研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(7): 2712-2715.

[9] 张悦, 刘岩然. MicroRNAs 和 lncRNAs 在子宫内膜异位症中的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2015, 26(7): 546-548, 551.

[10] 范素鸿, 马俊彦, 林俊. 黏附分子 VCAM-1 和 ICAM-1 在子宫内膜异位症中的表达及意义[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33(2): 119-123.

[11] Kim SY, Ryu HM, Yang JH, et al. Maternal serum levels of VCAM-1,

ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia[J]. Korean Med Sci, 2004, 19(5): 688-692.

[12] 伍海鹰, 史云, 谢蓬蓬. 罗氏内异方对子宫内膜异位症并不孕患者腹腔液细胞 ICAM-1 与 IL-8 含量的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(3): 114-116.

[13] 冯晓冰. 组织基质金属蛋白酶、细胞间黏附分子-1 表达与子宫内膜异位症的相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(8): 1259-1260.

[14] 庄瑞春, 向安玲, 肖召安. PPAR γ 在子宫内膜异位症中的作用研究进展[J]. 安徽医药, 2015, 19(5): 830-833.

[15] Ohama Y, Harada T, Iwabe T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand reduced tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production and growth in endometriotic stromal cells[J]. Fertil Steril, 2008, 89(2): 311-317.

[16] McKinnon B, Bersinger NA, Huber AW, et al. PPAR-gamma expression in peritoneal endometriotic lesions correlates with pain experienced[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1): 293-296.

[17] Nenicu A, Körbel C, Gu Y, et al. Combined blockade of angiotensin II type 1 receptor and activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by telmisartan effectively inhibits vascularization and growth of murine endometriosis-like lesions[J]. Hum Reprod, 2014, 29(5): 1011-1024.

[18] Lebovic DI, Mwenda JM, Chai DC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-(gamma) receptor ligand partially prevents the development of endometrial explants in baboons: a prospective, randomized, placebo-controlled study[J]. Endocrinology, 2010, 151(4): 1846-1852.

[19] Olivares C, Ricci A, Bilotas M, et al. The inhibitory effect of celecoxib and rosiglitazone on experimental endometriosis[J]. Fertil Steril, 2011, 96(2): 428-433.

[20] 章海凤, 刘密, 常小荣, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔主动脉内皮细胞 NF- κ B 及 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 29(4): 914-917.

[21] 何亚敏, 李金香, 常小荣, 等. 艾炷灸对动脉粥样硬化兔过氧化酶体增殖物激活受体 γ 及基质金属蛋白酶-9 mRNA 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 271-274.

[22] 肖小文, 周志刚, 王萍, 等. 子宫内膜异位症现代针灸腧穴谱[J]. 实用中西医结合临床, 2017, 17(1): 101-103.

[23] 肖小文, 周志刚, 王萍, 等. 针灸治疗子宫内膜异位症 Meta 分析[J]. 江西中医药, 2017, 48(2): 50-53.

[24] 蒋会芹. 丹赤饮治疗子宫内膜异位症相关不孕症随机平行对照研究[J]. 实用中医内科杂志, 2015, 29(4): 38-40.

[25] 贺克, 刘姣, 李彩霞, 等. 活血化瘀药治疗子宫内膜异位症机制研究进展[J]. 药品评价, 2012, 9(17): 26-28.

[26] 唐晓琳, 石璇. 中药治疗子宫内膜异位症的临床效果[J]. 西部中医药, 2017, 30(1): 66-68.

[27] 冯振中, 武世伍, 李楠, 等. COX-2 选择性抑制剂塞来昔布联合 PPAR- γ 配体罗格列酮治疗子宫内膜癌的实验研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2014, 43(6): 619-625.