

血府逐瘀汤对子宫肌瘤模型大鼠 NOS、TNF-a、IL-2 水平及子宫平滑肌厚度的影响

周立 李淑荣 张 娥

(河南中医药大学第一附属医院妇产科, 郑州, 450000)

摘要 目的:观察血府逐瘀汤对子宫肌瘤的疗效,并研究其对子宫平滑肌厚度的以及 NOS、TNF-a、IL-2 水平的影响。方法:将 45 只 SD 大鼠随机分为 3 组,分别是空白组、模型组、中药干预组,每组 15 只。其中模型组及中药干预组大鼠接收腹腔注射苯甲酸雌二醇建立子宫肌瘤大鼠模型,造模后中药干预组大鼠接收血府逐瘀汤灌胃,模型组及空白组大鼠接收等剂量生理盐水灌胃,连续灌胃 15 d,治疗结束后测量各组大鼠子宫系数变化,采用 HE 染色法比较子宫平滑肌厚度变化,使用 Western Blot 测定大鼠子宫组织 TNF-a 浓度变化,Elisa 法检测大鼠外周血清 NOS、IL-2 水平变化。结果:1)与空白对照组比较,模型组及中药干预组子宫系数增加,中药干预组明显较模型组小,差异有统计学意义($P < 0.05$);2)与空白对照组比较,模型组及中药干预组子宫平滑肌厚度增加,中药干预组明显较模型组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$);3)空白组大鼠子宫平滑肌细胞排列整齐,平滑肌层薄;模型组大鼠平滑肌出现明显增生,细胞排列错乱,肌纤维疏松粗短,且在肌纤维束间出现明显结缔组织,纵行肌层和环形肌层均明显增厚。中药干预组较模型组有明显改善,平滑层细胞排列较整齐,出现轻度的细胞脱落现象,黏膜上皮细胞少量增生;4)模型组及中药干预组大鼠子宫组织 TNF-a 及外周血 NOS 浓度较空白对照组上调,IL-2 浓度有所下降,其中中药干预组明显优于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:血府逐瘀汤对子宫肌瘤有明显抑制效应,其作用机制可能与介导 NOS、TNF-a、IL-2 水平变化有关。

关键词 子宫肌瘤;大鼠;血府逐瘀汤;子宫平滑肌;一氧化氮酶;肿瘤坏死因子;白细胞介素-2

Effect of Xuefu Zhuyu Decoction on NOS, TNF-a and IL-2 Levels and Uterine Smooth Muscle Thickness in Rats with Uterine Leiomyoma

Zhou Li, Li Shurong, Zhang E

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

Abstract Objective: To observe the curative effects of Xuefu Zhuyu Decoction on uterine leiomyoma, and study its effects on the thickness of uterine smooth muscle and the levels of NOS, TNF-a and IL-2. **Methods:** A total of 45 SD rats were randomly divided into three groups: a blank group, a model group and a traditional Chinese medicine intervention group, with 15 rats in each group. Rats in the model group and the intervention group received intraperitoneal injection of estradiol benzoate to establish a rat model of uterine fibroids. Rats in the intervention group received Xuefu Zhuyu Decoction for gastric lavage. Rats in the model group and the blank group received the same dose of normal saline for gastric lavage for 15 days. HE staining was used to compare the thickness of uterine smooth muscle, Western Blot was used to measure the concentration of TNF-a in rat uterus, and ELISA was used to detect the levels of NOS and IL-2 in rat peripheral serum. **Results:** 1) Compared with the blank control group, the uterine coefficient of the model group and the Chinese medicine intervention group increased, the Chinese medicine intervention group was significantly smaller than the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). 2) Compared with the blank control group, the thickness of uterine smooth muscle of the model group and the Chinese medicine intervention group increased, and the Chinese medicine intervention group was significantly less than the model group. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). 3) The smooth muscle cells of the uterus in the blank group were well arranged and thin; the smooth muscle cells in the model group were obviously hyperplasia, disordered cell arrangement, loose and short myofibers, and there were obvious connective tissue between myofibers bundles, and the longitudinal and circular myofibrils were obviously thickened. Compared with the model group, the TCM intervention group showed obvious improvement, smooth layer cells arranged more orderly, slight cell exfoliation and a small amount of proliferation of mucosal epithelial cells. 4) The concentration of TNF-a and NOS in uterine tissue and peripheral blood of

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2018ZY2070)——温经通胞饮对输卵管阻塞性不孕患者血清 IL-6 和 TNF- α 的影响及临床疗效的研究

作者简介:周立(1983.12—),女,硕士,主治医师,研究方向:妇产科临床工作, E-mail:zhli59@163.com

通信作者:李淑荣(1976.08—),女,硕士,副主任医师,研究方向:妇科内分泌工作, E-mail:zzhlsr2008@163.com

the model group and TCM intervention group were increased, while the concentration of IL-2 was decreased. The TCM intervention group was significantly better than the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Xuefu Zhuyu Decoction has obvious inhibitory effects on uterine leiomyoma, and its mechanism may be related to the changes of NOS, TNF- α and IL-2 levels.

Key Words Uterine fibroids; Rat; Xuefu Zhuyu Decoction; NOS; TNF- α ; IL-2

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.06.013

子宫肌瘤是一种由于激素刺激、细胞突变等多种原因导致子宫平滑肌细胞增生,从而引起子宫局部组织纤维组织化、子宫壁变厚的良性肿瘤性疾病^[1]。有数据显示全球每年近3 600万女性因子宫肌瘤导致不孕,且有逐年上升的趋势。有数据^[2-4]显示一氧化氮酶(NOS)、肿瘤坏死因子(TNF- α)及白细胞介素-2(IL-2)均参与子宫肌瘤发生发展过程,上述指标可能是治疗子宫肌瘤的靶点。

子宫肌瘤属于中医“癥瘕”“石瘕”等范畴,妇人产后体虚,寒邪趁虚而入,或者湿热之邪郁久成痰于体内,导致气血运行不畅,气滞血瘀日久而成此病。血府逐瘀汤具有活血化瘀、行气止痛的作用,临床不乏其有效治疗子宫肌瘤的报道^[5-7],但其作用机制目前尚无统一论,基于此我们利用子宫肌瘤大鼠模型,深入研究血府逐瘀汤的作用机制,具体结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 45只雌性SD大鼠,体质量(230 ± 10.5)g,购买自济南朋悦动物繁育有限公司(许可证号:370181000009090),所有动物饲养于河南中医药大学动物实验中心,饲养条件:温度(24 ± 0.45)℃,湿度(50 ± 2.5)%,以12 h/12 h为光暗周期。本研究方案经过本院伦理委员会批准(伦审号728398293)。

1.1.2 药物 血府逐瘀汤由本院中药研究院提供,中药组成:川芎15 g、生地黄12 g、桔梗6 g、柴胡9 g、当归9 g、赤芍9 g、川牛膝12 g、桃仁9 g、红花9 g、甘草6 g。浓煎100 mL。

1.1.3 试剂与仪器 全自动生化仪(美国贝克曼库尔特公司,型号AU5800);血清NOS试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司,货号kt99351);血清IL-2试剂盒(武汉默沙克生物科技有限公司,货号kt98323);TNF- α 一抗抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,货号ab6671]; β -actin一抗抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,货号ab8226)]。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 45只SD大鼠数字随机法分为空白组、模型组及中药干预组,15只/组。各组大鼠在体质量、鼠龄各方面差异无统计学意义($P > 0.05$),可进行组间比较。参考文献^[8-9]中模型制备方法,具体如下:对模型组及中药干预组大鼠每周进行3次腹腔注射苯甲酸雌二醇(0.5 mg/Kg),隔天1次;空白组大鼠接收等剂量生理盐水腹腔注射。

1.2.2 干预方法 2组大鼠均连续注射12周。第13周开始中药组大鼠进行血府逐瘀汤灌胃,按大鼠与人体间等效剂量换算成1.32 g/mL,灌胃1次/d,空白组及模型组大鼠接受等剂量的生理盐水灌胃,各组均连续灌胃15 d。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 子宫系数 按照参考文献^[8]的测量方法对各组大鼠子宫系数进行计算,具体如下:连续灌胃15 d后从各个组大鼠随机选取3只大鼠,称重后麻醉断头处死后取出子宫,将子宫称重后计算,子宫系数 = 子宫重量(g)/大鼠体质量(g)。

1.2.3.2 子宫平滑肌厚度变化 将上述步骤获得的子宫组织使用10%多聚甲醛固定,24 h,随后进行脱水、石蜡包埋、切片、染色,显微镜镜检,图像采集分析。参照参考文献^[7]病理分级法进行子宫组织分级,具体如下:0级:子宫平滑肌细胞排列整齐;1级平滑肌层无增厚或轻度增厚,肌纤维排列紊乱;II级:子宫平滑肌出现明显增厚表现,大部分平滑肌出现穿插现象;III级:子宫平滑肌细胞排列紊乱,子宫平滑肌出现明显增厚及穿插现象,平滑肌层出现漩涡状。每个样本随机取5个视野进行拍照,并用相关软件测量平滑肌厚度,去平均值。

1.2.3.3 ELISA检测 干预后各组随机取3只大鼠,充分麻醉后取腹主动脉血,充分离心后分离出上清液,采用ELISA检测法进行HIS、IgE、IL-4、TNF- α 浓度测定,用碳酸盐包被缓冲液将抗体稀释至适量浓度后加至反应孔中加0.1 mL,4℃孵育过夜,随后用PBS冲洗3次,每次2 min,随后加入待测样品,室温下反应1 h,随后用PBS冲洗3次,2 min/次,加入新鲜稀释的酶标抗体,室温下孵育1 h后洗涤。随

后与每个反应孔中加入 TMB 底物溶液 0.1 mL,充分反应后加入 2 mol/L 硫酸 0.05 mL 显色,在酶标仪中进行显色测定,计算出 OD 值,操作过程严格按照说明书进行。

1.2.3.4 Western Blot 检测 将 1.4.3 步骤中的大鼠断头后取出子宫组织,称重后按照 1:100 比例加入裂解液,高速离心后取出上清液并进行蛋白定量测定,根据测量结果计算上样量,将各组样本加入事先配制好的电泳凝胶内,常温下按照一定的条件进行电泳,然后将目的蛋白转移至 PVDF 膜内,将转膜后的 PVDF 膜使用溶液 TBST 洗涤,一共 3 次,5 min/次;洗涤后转至封闭液中放在摇床上进行封闭,加入一抗(1:1 000 比例稀释),在 4 ℃ 环境下孵育 24 h 后取出生物膜,冲洗后加入二抗,室温下孵育 2 h,随后加入显影液,在凝胶成像系统中进行化学发光显影、采集及观察。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。所得数据都用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用两样本 *t* 检验或两样本秩和检验;组内比较采用配对 *t* 检验或配对秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组子宫系数、子宫平滑肌厚度比较 与空白对照组比较,模型组及中药干预组子宫系数增加,中药干预组明显较模型组小,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较,模型组与中药干预组子宫平滑肌厚度增加,中药干预组明显较模型组减少,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组子宫系数、子宫平滑肌厚度变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	子宫系数	子宫平滑肌厚度(μm)
空白组(n=3)	0.0019 ± 0.0001	160.29 ± 19.27
模型组(n=3)	0.0091 ± 0.0006*	224.28 ± 22.18*
中药组(n=3)	0.0048 ± 0.0004* ^Δ	178.27 ± 20.11* ^Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$

2.2 各组大鼠子宫病理变化 空白组大鼠子宫平滑肌细胞排列整齐,平滑肌层薄;模型组大鼠平滑肌出现明显增生,细胞排列错乱,肌纤维疏松粗短,且在肌纤维束间出现明显结缔组织,纵行肌层和环行肌层均明显增厚。中药干预组较模型组有明显改善,平滑层细胞排列较整齐,出现轻度的细胞脱落现象,黏膜上皮细胞少量增生。见图 1。

2.3 各组子宫组织 TNF-α 浓度变化 模型组及中药干预组大鼠子宫组织 TNF-α 较空白对照组上调,其中中药干预组明显优于模型组,差异有统计学意

义 ($P < 0.05$)。见图 2。

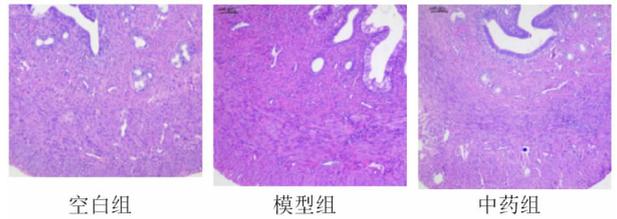


图 1 各组大鼠子宫病理结果(HE 染色, ×200)

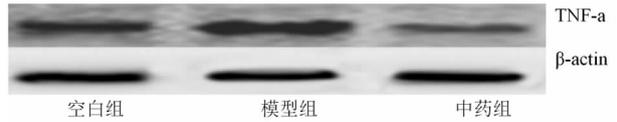


图 2 各组大鼠脑组织 TNF-α 蛋白表达

2.4 各组外周血 NOS、IL-2 浓度水平变化 模型组及中药干预组大鼠外周血 NOS 浓度较空白对照组上调,IL-2 浓度有所下降,其中中药干预组明显优于模型组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠外周血 NOS、IL-2 浓度变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	NOS	IL-2
空白组(n=3)	127.27 ± 11.29	59.33 ± 4.25
模型组(n=3)	428.27 ± 38.29*	217.28 ± 10.22*
中药组(n=3)	207.29 ± 22.37* ^Δ	90.23 ± 8.92* ^Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,^Δ $P < 0.05$

3 讨论

子宫肌瘤是妇科常见的良性肿瘤,主要以月经延长、经量变多、白带异常、下腹坠胀等为主要临床表现。现代研究显示子宫肌瘤的发生发展与激素的变化关系密切^[10],对该病的主要治疗以手术清除为主,甚至有患者进行子宫切除,造成了巨大的伤害^[11]。根据子宫肌瘤的临床表现,归属中医学“癥瘕”“石瘕”等范畴,对其病因病机古代医家有诸多研究。明代张介宾在其《景岳全书妇人规》中云:“瘀血留滞做癥,惟妇人育之……总由动血之时,余血未净,而一有所逆则留滞日积,而渐以成微矣”,认为瘀血阻滞是子宫肌瘤的主要病机,而外感内伤等因素是子宫肌瘤的诱发因素。清代医家沈金鳌在其著作《妇科玉尺》一书中指出:“妇人积聚之病皆血之所为,盖妇人多郁怒,郁怒则肝伤,而肝藏血者也,妇人多忧思,忧思则心伤,而心主血者也,心肝既伤,其无所主则妄溢,不能藏则横行”,指出肝失疏是子宫肌瘤形成的原因,肝气郁结,情志不畅致瘀血内停胞宫,瘀血日久成癥瘕。亦有其他医家认为患者素体脾胃亏虚,气血运行乏力,素体亏虚,加之操劳过度或产后耗伤气血,气虚血瘀,最终导致瘀血内停胞宫而发此病。因此“活血化瘀、破癥散结”是治疗本病的重要原则。

血府逐瘀汤是治疗妇人瘀血诸症,方中含有川芎、赤芍、生地黄、当归、桃仁、红花、牛膝、枳壳、桔梗、柴胡及甘草诸药^[12]。方中红花有活血化瘀、通络散瘀之功,其主要成分红花黄色素有抗凝效应,亦可增加子宫平滑肌的收缩性。桃仁有祛瘀生新的作用,可通过扩张血管而降低血流阻力,与红花合用可增强活血化瘀之功^[13]。当归有补血活血的作用,可双向调节子宫平滑肌。赤芍性寒味苦,可活血化瘀、凉血消肿止痛,可缓解不通而痛的病症。川芎是血中之气药,可行气活血,祛风止痛,现代药理学证实川芎嗪可改善子宫平滑肌的血液循环。生地黄可清热养阴,与川芎、当归、赤芍合用具有补血活血调经之功效^[14]。柴胡可疏肝解郁,桔梗与枳壳共奏行气散结之功效,三药合用以司调畅气机。牛膝可活血化瘀,甘草益气健脾、调和诸药药性。诸药合用即可条畅全身气机,又可消除局部血瘀^[15-16]。

在对血府逐瘀汤作用机制的研究中我们对各组大鼠子宫病理表现进行形态学观察,结果显示血府逐瘀汤干预后大鼠平滑层细胞排列较整齐,仅出现轻度的细胞脱落现象,黏膜上皮细胞少量增生,这提示血府逐瘀汤对子宫肌瘤确有理想疗效,与此同时我们对子宫组织的 TNF- α 以及外周血 NOS 及 IL-2 表达水平进行检测。TNF- α 是一种能够直接杀伤肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性的细胞因子,是迄今为止所发现的直接杀伤肿瘤作用最强的生物活性因子之一,子宫肌瘤大鼠体内肿瘤细胞增多导致 TNF- α 应激性升高;NOS 与血管新生关系密切,NOS 浓度上调提示机体组织存在异常增生,子宫肌瘤模型组大鼠外周血 NOS 浓度均上调,这说明子宫肌瘤大鼠子宫平滑肌异常增生,导致良性肿瘤的产生;IL-2 与机体细胞免疫功能水平息息相关,IL-2 浓度下调意味着免疫功能下降,研究中我们发现子宫肌瘤模型大鼠的 IL-2 水平低于空白组,这说明子宫肌瘤机体存在免疫能力低下。经过血府逐瘀汤干预后大鼠的子宫平滑肌排列较整齐,TNF- α 、NOS 浓度较模型组下降,IL-2 水平有所增加,这提示血府逐瘀汤对子宫肌瘤有明显抑制效应,其作用机制可能与介导 NOS、TNF- α 、IL-2 水平变化有关。

参考文献

[1]柯志鹏,张新庄,丁玥,等.桂枝茯苓方治疗痛经、盆腔炎以及子宫肌瘤的活性成分和分子作用机制研究[J].中国中药杂志,2015,

40(6):999-1004.

- [2]胡艳萍,李璐,李馨.植物性雌激素对子宫肌瘤合并缺铁性贫血患者血清激素水平、NOS 及氧化应激产物影响[J].中国生化药物杂志,2015,36(7):113-115.
- [3]王雪丹,王培培,孙健,等.植物性雌激素对子宫肌瘤模型大鼠血清 NOS、TNF- α 、IL-2 水平及子宫平滑肌厚度的影响研究[J].中国生化药物杂志,2014,35(9):137-139.
- [4]沈美娟,施瑾,任晓冰,等.一氧化氮合成酶在子宫肌瘤的表达及与性激素的关系[J].中国肿瘤,2001,10(10):613-614.
- [5]尹青竹.血府逐瘀汤联合米非司酮治疗子宫肌瘤临床研究[J].中医药信息,2017,34(6):93-96.
- [6]齐金羚.血府逐瘀汤治疗子宫肌瘤及对患者激素水平影响临床观察[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(2):151-153.
- [7]陈喻萍.加减血府逐瘀汤治疗子宫肌瘤患者疗效观察及安全性评价[J].湖北中医药大学学报,2014,16(4):34-35.
- [8]奚剑敏,丁正香.子宫肌瘤大鼠模型的病理改变及病因分析[J].现代生物医学进展,2010,10(3):466-469.
- [9]胡颖,罗俊,黄能慧.妇科再造丸对雌孕激素负荷大鼠子宫病理形态学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(23):140-144.
- [10]沈杨,许茜,徐洁,等.子宫肌瘤危险因素的流行病学调查研究[J].实用妇产科杂志,2013,29(3):189-193.
- [11]董丽霞,濮德敏.子宫肌瘤发病机制研究进展[J].中国妇产科临床杂志,2001,2(5):311-313.
- [12]李鹏飞,王彦晖.近 10 余年来血府逐瘀汤临床应用概况[J].中医临床研究,2017,9(31):143-145.
- [13]王晓曼,申丹,杨卫彬.血府逐瘀汤临证应用举隅[J].山东中医杂志,2017,36(11):981-983.
- [14]杨占达,董桂英,赵文华.血府逐瘀汤药理作用及临床应用研究进展[J].实用中医药杂志,2017,33(9):1106-1108.
- [15]苏丹,姚丽.血府逐瘀汤的现代药理学研究[J].中医药学报,2013,41(3):172-175.
- [16]吴剑宏,陈幸谊.血府逐瘀汤方剂的现代药理研究进展[J].中成药,2013,35(5):1054-1058.
- [17]吴志兵.消积冲剂对子宫肌瘤大鼠的血液流变学、T 细胞亚群及 TNF- α 影响的实验研究[D].南京:南京中医药大学,2013.
- [18]王纪元. TNF- α 、MMP-2、MAPK 和 NF- κ B 在人类子宫肌瘤发病机制中的作用[D].天津:天津医科大学,2012.
- [19]张慧,王瑞玲.米非司酮联合雷公藤多苷治疗子宫肌瘤的临床疗效观察[J].实用癌症杂志,2018,33(8):1361-1363.
- [20]张茅茅.傣药抗肿瘤验方对小鼠实验性子宫肌瘤抑制作用的研究[D].昆明:云南中医学院,2017.
- [21]周小飞,刘玉珠.腹腔镜下子宫肌瘤剔除术治疗子宫肌瘤以及对患者 IL-6、IL-2 和 CRP 的影响[J].中国内镜杂志,2017,23(11):19-23.
- [22]王宏婷,郑书国,苏云明.肌清胶囊对子宫肌瘤模型大鼠血清 NOS、TNF- α 和 IL-2 水平的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(3):66-68.

(2018-10-31 收稿 责任编辑:王明)