

本事琥珀散对子宫内膜异位症大鼠模型 子宫内膜 VEGF 蛋白含量的影响^{*}

刘丹彤, 张小勇, 马小娜, 王 冬, 赵伟鹏, 孙良明, 赵 妍, 王庆国[△]

(北京中医药大学, 北京 100029)

〔摘 要〕目的: 通过比较本事琥珀散治疗前后子宫内膜异位症(EMs)大鼠模型在位和异位内膜 VEGF 蛋白含量的影响, 探讨本事琥珀散在 EMs 血管形成中的作用机制。方法: 采用自体内膜移植法建立 EMs 大鼠模型, 给药 4 周后 Western Blot 方法检测子宫内膜 VEGF 蛋白含量。结果: 与疾病模型组比较, 本事琥珀散组异位内膜 VEGF 蛋白含量明显降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 本事琥珀散能够通过降低 EMs 异位内膜 VEGF 蛋白含量, 抑制异位内膜新生血管形成, 从而对 EMs 起到一定的治疗作用。

〔关键词〕本事琥珀散; 子宫内膜异位症; 大鼠; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)03—0028—04

子宫内膜异位症(EMs)是指具有生长能力的子宫内膜组织(腺体和间质)出现在子宫腔被覆黏膜以外的身体其他部位的一种疾病, 其痛经、慢性盆腔疼痛和不孕等症状严重影响妇女的生存质量, 是具有恶性特质的良性疾病。在 EMs 的发生发展过程中, 异位内膜的成活至关重要。“黏附—侵袭—血管生成”三个基本环节, 是异位内膜成活的关键^[1]。血管内皮生长因子(VEGF)作为促血管生成因子的代表, 在 EMs 的形成过程中具有重要作用。中医药对 EMs 有较好的治疗作用, 在缩小异位病灶、缓解黏连、减轻疼痛、调经助孕等方面都具有独特优势。现代临床多见用本事琥珀散治疗 EMs 的报道^[2], 并取得良好疗效。本实验拟通过研究本事琥珀散对 EMs 大鼠子宫内膜 VEGF 蛋白含量的影响, 探讨本事琥珀散抑制 EMs 异位内膜血管新生的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SD 大鼠 50 只, 雌性, 体重 180~200g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号 SCXK(京): 2008-0001。

1.2 药物与试剂

本事琥珀散组成及用量: 三棱 10g, 莪术 10g, 赤芍 15g, 刘寄奴 10g, 丹皮 6g, 肉桂 10g, 熟地 10g, 乌药 10g, 元胡 10g, 当归 15g。药物剂量来自王庆国教授经验用量。饮片均由北京同仁堂药店提供。达那唑胶囊: 0.1g/粒(江苏联环药业股份有限公司生产, 批号: 20110102); 水合氯醛(天津市光复精细化工研究所生产, 批号: 20071129); 注射用氨苄西林钠[中诺药业(石家庄)有限公司生产, 批号: 09089024]; 己烯雌酚(合肥久联制药有限公司生产, 批号: 20080616); 生理盐水[中诺药业(石家庄)有限公司生产, 批号: 20090123]。VEGF 抗体购自英国 Abcom 公司。

1.3 仪器设备

Fresco 低温冷冻离心机、MultiSkan3 酶标仪: 美国热电公司; 电泳仪: 美国伯乐公司; 水平脱色摇床: 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; 酸度计 pH211: 意大利哈纳仪器。

2 方法

2.1 分组及给药

50 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 即正常组、伪手

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(No. 2011CB505100)

收稿日期: 2012—04—19

作者简介: 刘丹彤(1982~), 女, 河北唐山人, 2009 级博士在读。主要从事经方配伍规律及作用机制的研究。△通讯作者: 王庆国, Tel: 010-64286871, E-mail: Wangqg8558@sina.com.

术组、疾病模型组、本事琥珀散组和达那唑组。正常组常规饲养; 伪手术组做大网移植; 疾病模型组、本事琥珀散组和达那唑组均采用自体移植法复制子宫内膜异位症模型。于术前第5天和术后第10天开始给予己烯雌酚灌胃 0.02mg/kg, 连续 5d, 使手术时大鼠统一处于动情期; 术后给予氨苄青霉素肌注 16 万 u/kg, 连续 5d。

造模 1 周后, 各组开始灌胃给药, 连续 4 周。正常组和疾病模型组给予 2mL 生理盐水灌胃, 每日 1 次。其余各组药量参照文献换算, 本事琥珀散组含生药量 14g/kg, 达那唑组 80mg/kg。

2.2 模型制作

(1) 取雌性成熟未孕 SD 大鼠, 于术前第 5 日和术后第 10 日开始给予己烯雌酚 0.02mg/kg 灌胃, 每日 1 次, 连续 5d, 使手术时大鼠统一处于动情期。

(2) 手术在室温 23℃ ~ 28℃ 环境下进行, 无菌操作。以 10% 水合氯醛 (0.4mL/100g, 腹腔注射) 麻醉大鼠。

(3) 待麻醉后, 将大鼠固定于手术板上, 腹部备皮, 常规消毒铺巾。选取尿道口上端约 1cm

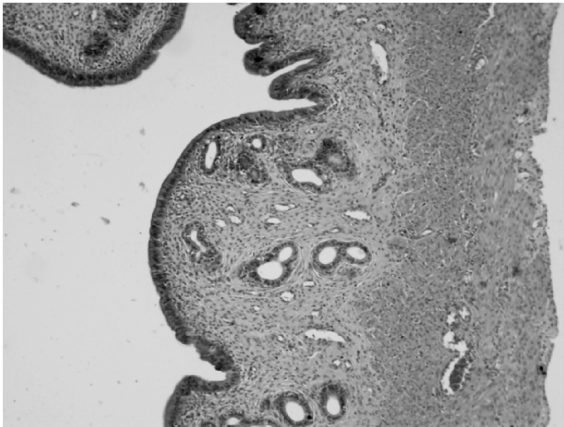
处为切入点, 沿腹中线切开 1.5 ~ 2cm 的纵形切口, 逐层分离腹壁进入盆腔。探查大鼠子宫 (呈 V 型), 细丝线结扎左侧局部子宫血管以及需切除的子宫上下端。

(4) 取大鼠左侧子宫角长约 1 ~ 2cm, 立即放入 PBS 溶液中, 修剪去除子宫浆膜外的脂肪组织, 纵向切开子宫腔, 切取 5 × 5mm 大小的子宫片段, 使其内膜面与右侧腹膜相对, 用 5 - 0 号丝线将其四角缝于右侧腹壁, 缝合处尽量远离手术切口, 以减少组织粘连, 并防止取材再次开腹时损伤已种植的异位组织。剩余部分子宫片进行组织学观察, 以证实移植植物确为子宫内膜组织。

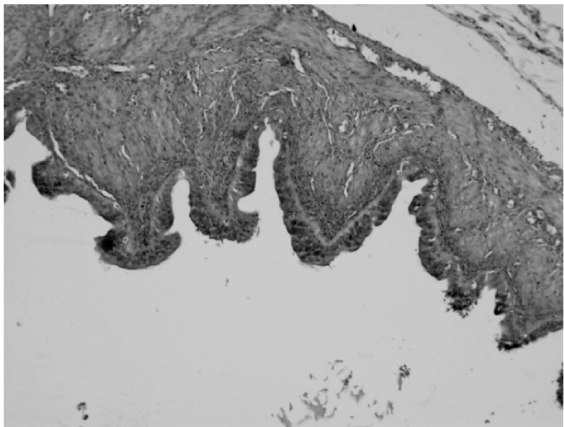
(5) 关腹前向腹腔滴入以 0.9% 生理盐水溶解的氨苄青霉素 16 万 u/kg 进行腹腔消毒, 逐层缝合关腹。术后第 1 日开始给予氨苄青霉素 16 万 u/kg 肌肉注射, 每日 1 次, 连续 5d。

(6) 术后大鼠分笼单放, 自然苏醒, 常规饲养。

建模 4 周后随机选取 2 只模型大鼠开腹检查移植植物生长情况, 并送病检, 验证造模效果 (结果见图 1)。



正常组 (HE × 100)



疾病模型组 (HE × 100)

图 1 造模 4 周后大鼠与正常大鼠比较

疾病模型大鼠手术 4 周后移植物体积明显增大, 呈圆形, 内有半透明囊液, 表面有结缔组织覆盖和血管形成, 质软。病理检查可见正常大鼠子宫内膜上皮细胞排列整齐, 呈长柱状, 肌层较厚, 结构完整, 腺体和血管丰富; 疾病模型大鼠移植植物囊内壁有内膜上皮细胞及间质细胞生长, 上皮细胞呈

低柱状, 较扁平, 细胞结构不清, 肌层较薄, 腺体较少。根据大体观察以及病理检查结果, 可以认为 EMs 模型复制成功。

2.3 指标检测

于造模后第 5 周, 用 10% 的水合氯醛 0.4mL/100g 腹腔注射麻醉动物, 开腹 (开腹时尽量避开

造模时子宫内膜种植部位)后,腹主动脉采血,用 WesternBlot 法检测大鼠在位及异位内膜组织 VEGF 蛋白含量。

实验方法参照文献 [3]。蛋白裂解液提取组织蛋白,BAC 法测定蛋白浓度,将样品蛋白浓度调整为 4ug/uL。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿转法凝胶转膜,丽春红染色后观察转膜效果,BSA-TBST 封闭,加入一抗、二抗后分别孵育,加入 ECL 显色剂后显影。采用 Imagpro-plus 图像分析软件进行灰度值分析,目标蛋白含量以其条带灰度值/ β -actin 条带表示。

2.4 统计分析

实验数据以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析及 LSD 检验。应用 SPSS16.0 软件作统计学分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

与其余各组在位及异位内膜比较,疾病模型组异位内膜 VEGF 蛋白含量明显升高;与疾病模型组异位内膜比较,本事琥珀散组异位内膜 VEGF 蛋白含量明显降低,但仍高于正常组。组间比较差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。见下表。

本事琥珀散对 EMs 大鼠子宫内膜组织 MMP-2、TIMP-2 和 VEGF 含量的影响		
组别	n	VEGF
正常组	10	0.65±0.042**
伪手术组	10	0.65±0.036**
疾病模型组在位	8	0.65±0.026**
疾病模型组异位	8	1.63±0.096▲▲
本事琥珀散组在位	9	0.71±0.021**
本事琥珀散组异位	9	0.95±0.067▲▲▲
达那唑组在位	9	0.71±0.031**
达那唑组异位	9	0.55±0.078**

注:同正常组相比▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;同疾病组异位相比* $P<0.05$,** $P<0.01$

4 讨论

VEGF 可由多种细胞产生,只表达于血管内皮

细胞表面,能够增强血管通透性,促进血管生成。VEGF 是最关键的血管形成因子,主要参与调控血管内皮细胞的增殖和血管的构建,对于新生血管形成、血管内皮细胞增殖迁移及微血管通透性均有促进作用。

因为建立新的血供对异位内膜存活的重要意义,故而 VEGF 被认为可能是异位内膜种植、生长的决定因素。有研究表明 VEGF 含量在 EMs 患者的腹腔液、血清及异位内膜组织中均明显升高^[4-5],临床分期越高,VEGF 的含量越高^[6],且腹腔液与血清 VEGF 水平呈直线相关关系^[7]。但亦有一些学者发现 EMs 患者血清 VEGF 含量并不升高,认为可能 VEGF 在异位病灶局部所发挥的作用更为重要^[8]。Na^[9]等研究发现,EMs 患者腹腔液中嗜中性粒细胞表达 VEGFmRNA 水平显著增高,因而认为 EMs 患者体内的嗜中性粒细胞可能是其腹腔液中升高的 VEGF 来源。目前关于 VEGF 基因多态性与 EMs 的研究正在展开,但结果存在差异性,可能与人群选择有关。

本事琥珀散出自宋·许叔微的《普济本事方》,原名琥珀散,本事琥珀散之名因《医宗金鉴·妇科心法要诀》转载而得之。本事琥珀散由三棱、莪术、赤芍、刘寄奴、丹皮、肉桂、熟地、当归、乌药、元胡组成,具有行气活血,温经止痛的功效。

本实验结果显示:各组在位内膜 VEGF 含量没有明显差异,说明在位内膜在造模前后未发生变化,与临床所见 EMs 患者在位内膜 VEGF 亦显著高于正常内膜的现象不同,这是由于 EMs 大鼠模型和 EMs 患者疾病发生条件的不同而造成的。疾病模型组大鼠异位内膜 VEGF 的含量明显高于其他各组在位及异位内膜,反映此时血管内皮的生长和血管新生正在快速进行,为异位内膜的成功种植生长提供了基本条件。经本事琥珀散治疗后,EMs 大鼠异位内膜 VEGF 的含量明显降低,说明本事琥珀散能够通过降低 VEGF 含量,减少新生血管的形成,从而阻断异位内膜的种植生长。但本事琥珀散组异位内膜 VEGF 的含量仍明显高于正常组和达那唑组,提示本事琥珀散尚不能使异位内膜的血管生成状况恢复到正常水平。至于随着给药时间的延长,本事琥珀散能否使异位内膜 VEGF 的含量降至正常水平,尚需进一步实验验证。

[参考文献]

[1] Tan XJ, Lang JH, Liu DY, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis. *Fertil Steril*, 2002, 27: 148-153.

[2] 张亚平, 李红梅. 琥珀散加减治疗子宫内膜异位症痛经 30 例 [J]. *黑龙江中医药*, 2011 (6): 28-29.

[3] Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Gold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1 713-1 726.

[4] 郝群, 史常旭, 汪灏. 子宫内膜异位症患者异位内膜 VEGF 表达的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2001, 23 (11): 1 351-1 353.

[5] McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 1996, 11 (1): 220-223.

[6] Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, et al. Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gammac (null) immunodeficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (6): 1 925-1 930.

[7] Wu MH, Yang BC, Lee YC, et al. The expression of soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 1998, 70 (6): 1 139-1 142.

[8] Gagne D, Page M, Robitaille G, et al. Levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of patients with endometriosis. *Hum Reprod*, 2003, 18 (8): 1 674-1 680.

[9] Na YJ, Yang SH, Baek DW, et al. Effects of peritoneal fluid from endometriosis patients on the release of vascular endothelial growth factor by neutrophils and monocytes [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21 (7): 1 846-1 855.

(编辑: 迟 越)

Effects of BenShiHuPoSan on Th1/Th2 Drift in Endometriosis Model Rats

LIU Dan-tong, ZHANG Xiao-yong, MA Xiao-na, WANG Dong,
ZHAO Wei-peng, SUN Liang-ming, ZHAO Yan, WANG Qing-guo
(Beijing University Of Chinese Medicine, Beijing, 100029)

[ABSTRACT] Objective: By comparing the changes of VEGF in endometriosis model rats' ectopic endometrium in before and after using BenShiHuPoSan (BSHPS), we discuss about the effects of BSHPS on angiogenesis in Endometriosis. Methods: First, establish the rat model of EMs by transplanting autologous endometrium to the abdominal wall. Then divide the rats randomly into 5 groups: normal group, pseudo operation group, disease group, BSHPS group and danazol group. Finally, detect the contents of VEGF in endometrium by Western Blot, after dosing for 4 weeks. Results: Compared with the normal group, the content of VEGF in ectopic endometrium of disease group is much higher. Compared with disease group, the content of VEGF in ectopic endometrium of BSHPS group is significantly reduced ($P < 0.05$). Conclusion: BSHPS can reduces the content of VEGF in EMs model rats' ectopic endometrium, and inhibites angiogenesis to treat EMs.

[KEY WORDS] BenShiHuPoSan; endometriosis; rat; VEGF

云南中医学院学报欢迎网上投稿

网址: <http://www.ynzyxyxb.cn>