

实验研究

莪棱胶囊对大鼠实验性子宫内膜异位症作用机理探讨

司徒仪¹ 樊荫萍² 潘华新²

摘要 为了探讨莪棱胶囊治疗子宫内膜异位症的作用机理,采用大鼠自体子宫内膜移植建立实验性子宫内膜异位症模型,分别观察了莪棱胶囊和西药丹那唑对模型大鼠外周血 IL-2、TXB₂、6-keto-PGF_{1α}含量、腹腔巨噬细胞吞噬指数及吞噬百分率、异位内膜组织形态学及超微结构的影响。结果显示各浓度组莪棱胶囊对上述指标有不同的调节或抑制作用,与丹那唑组相比差异无显著性($P>0.05$)。表明莪棱胶囊具有调节 6-keto-PGF_{1α}与 TXB₂ 比值平衡及机体免疫功能,抑制异位内膜的生长等作用。

主题词 子宫内膜异位症/中医药疗法 @ 莪棱胶囊

子宫内膜异位症(EMT)是常见妇科病和疑难病之一,近年来在我国的发病率有明显增加的趋势,目前尚没有完整的治疗方法。我们在临床实践中摸索出治疗子宫内膜异位症有效的中药成方莪棱胶囊(三棱、莪术等药组成),对于改善 EMT 患者痛经、不孕等症状具有良好的效果^[1]。为了探讨莪棱胶囊的治疗作用机理,本研究通过手术方法建立 EMT 动物模型,设立治疗组莪棱胶囊和对照组丹那唑,进行一系列实验研究。具体方法及结果如下。

1 材料

动物:清洁级雌性成熟未交配过的 Wistar 大鼠,体重 180~220g,由中山医科大学实验动物中心提供。合格证号:医动字第 26-98A011。清洁级环境饲养。

试剂:TXB₂、6-keto-PGF_{1α}放免试剂盒,由扬州医学院提供。IL-2 放免试剂盒,由北京东亚免疫技术研究所提供。Alsever's 溶液,临时配制。

灌胃用药:莪棱胶囊由广东省中医院制剂室提供,批号:980701。将药物分别配制成 30%、7.5%两种浓度。丹那唑由江苏扬州制药厂生产,批号:970102。将药物配成 1%的浓度。均于 4℃冰箱保存备用。

2 实验方法

2.1 EMT 动物模型的建立:参照文献[2]略加改良。具体方法如下:(1)选用健康成熟未交配的雌性

Wistar 大鼠,每日定时进行阴道涂片检查,选择动情周期 4~5 天并连续有两个正常动情周期的大鼠,在第三个动情周期的动情期,将大鼠分别进行手术造模。(2)手术在无菌条件下,以 3%的戊巴比妥钠(1.5ml/kg)腹腔内麻醉,常规消毒后剖腹切取右侧宫角处的一段子宫,长约 1cm,迅速将其置于生理盐水中分离,将分离出的子宫内膜剪成约 5mm×5mm 大小的两块,将上皮层反向对着体壁,将组织块四角缝固在腹壁上,左右各一,关腹前予以庆大霉素生理盐水溶液冲洗腹腔,最后逐层关腹,清洁级环境饲养。(3)4 周后再次剖腹观察移植物生长状况,手术成功的标志为:移植物体积增大,出现液体积聚,移植物被结缔组织或大网膜覆盖,并有血管形成。同时取移植物送病检证实内膜成活。

2.2 分组及给药方法:将模型成功者随机分成 4 组:模型对照组,莪棱胶囊高浓度组,莪棱胶囊低浓度组,丹那唑组。用药组均于造模后第 31 天开始给药,其中莪棱胶囊高、低剂量组分别给予 30%、7.5%浓度药液,每日均按 5.6ml/kg 灌胃,丹那唑组每日按 4.2ml/kg 灌胃,模型对照组每日生理盐水 3ml 灌胃,另设正常组大鼠 10 只,常规饲养。胶囊低剂量组及丹那唑组用药量均按单位体表面积等效换算,共给药 1 月。

2.3 指标检测方法:TXB₂、6-keto-PGF_{1α}测定:取全血 4ml 置于含 2%EDTA-Na₂ 的抗凝塑料试管中,4℃离心分离血浆,取血清置于-4℃以下保存。测定方法参照药盒说明书。IL-2 测定:取外周血 2ml,注入试管中待凝固后,挑动凝血,置于 4℃离心,取上清置于低温冰箱中保存。测定方法参见试剂盒说明书。

腹腔液巨噬细胞吞噬功能测定:采用鸡红细胞体内半吞噬法观察腹腔巨噬细胞的吞噬指数和吞噬百分率。参照《中药药理实验方法指导》^[3],计数 200 个巨噬细胞,并按下列公式计算吞噬指数及吞噬百分率:吞噬指数=被吞噬的 CRBC/巨噬细胞数(吞的);吞噬百分率=吞噬 CRBC 的巨噬细胞数/200 巨噬细胞数(吞及未吞的)×100%

病理切片:常规病理切片制备方法。切取异位子宫内膜块,以 10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,HE 染

基金项目:国家中医药管理局课题(95A2313)

1 广东省中医院妇科,广州市大德路 111 号(510120)

2 广州中医药大学

收稿日期:1998-08-12;修回日期:1999-06-05

表1 各组大鼠 TXB₂、6-keto-PGF_{1α}的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	TXB ₂ (pg/ml)	6-keto-PGF _{1α} (pg/ml)	6-keto-PGF _{1α} /TXB ₂
造模前	70	572.38±189.68	141.87±40.09	0.268±0.123
造模后	60	455.29±158.62 [△]	54.58±30.50 [△]	0.143±0.065 [△]
胶囊高剂量组	15	543.57±120.52*	143.67±20.47**	0.278±0.083**
胶囊低剂量组	13	572.13±110.13**	139.82±54.09**	0.275±0.077**
丹那唑组	15	509.43±104.43*	127.67±54.13**	0.262±0.134**
模型组	15	427.21±160.96	50.59±22.02	0.124±0.043

与造模前比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

色,光镜检查。所取组织块皆于最大直径处切片。

电镜观察:按常规电镜标本制备法制备标本。将组织块修成 1mm³ 小块,在 2.5%戊二醛与 2%多聚甲醛混合液中固定 3 小时,用 0.1M 磷酸缓冲液漂洗 3 次后,置于 1%四氧化锇溶液中固定 1.5 小时;同上法用缓冲液漂洗,以不同浓度的丙酮溶液阶梯脱水,Epon812 浸透,包埋,聚合;包埋块在光镜下定位后行超薄切片,切片用铀、铅双重染色,置于 JEM-1200EX 透射电镜下观察组织块的超微结构。

2.4 统计方法:配对资料采用 t 检验,率的比较用 u 检验。所有统计工作均经计算机,采用 SPSS for Windows(ver 6.0)软件进行统计分析处理。

3 结果

3.1 对 EMT 大鼠外周血 TXB₂、6-keto-PGF_{1α}的影响:造模后大鼠外周血 TXB₂ 含量明显下降($P < 0.05$),6-keto-PGF_{1α}含量下降更明显($P < 0.01$),6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 比值与造模前相比明显降低,两者相比差异有极显著性($P < 0.01$)。经随机分组给药后,各给药组与模型组相比 TXB₂ 含量均增加,其中尤以莪朮胶囊低剂量组为明显($P < 0.01$);各给药组 6-keto-PGF_{1α}含量则均较模型组明显增加($P < 0.01$),6-keto-PGF_{1α}/TXB₂ 比值上升,各给药组与模型组相比均差异有显著性($P < 0.01$)。结果见表 1。

3.2 对 EMT 大鼠外周血 IL-2 的影响:造模后外周血 IL-2 含量较造模前明显升高($P < 0.01$)。给药后,胶囊高、低剂量组及丹那唑组外周血 IL-2 含量较模型组明显下降,经统计分析处理,差异均有非常显著性

表2 各组大鼠外周血 IL-2 的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	IL-2(ng/ml)
造模前	70	5.54±1.15
造模后	60	7.82±1.55 [△]
胶囊高剂量	15	4.74±0.92*
胶囊低剂量	13	4.31±0.53*
丹那唑组	15	4.20±0.64*
模型组	15	7.79±1.25

与造模前比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

($P < 0.05$),而各给药组与造模前相比差异无显著性($P > 0.05$)。结果见表 2。

3.3 对 EMT 大鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响:模型对照组腹腔巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数均较正常组明显增加,两者相比差异具有极显著性($P < 0.01$)。给药后各组中尤以丹那唑组及胶囊高剂量组的腹腔巨噬细胞吞噬百分率及吞噬指数明显降低,与模型对照组相比差异有显著性($P < 0.05$)。胶囊低剂量组虽然吞噬百分率有所下降,但无统计意义($P > 0.05$),其吞噬指数则与模型对照组比较有明显降低($P < 0.05$)。结果见表 3。

表3 莪朮胶囊对腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	吞噬百分率(%)	吞噬指数
正常对照组	10	28.1±3.72	1.09±0.25
模型对照组	10	38.4±5.77 [△]	1.92±0.13 [△]
胶囊高剂量组	15	30.3±3.58*	1.27±0.44*
胶囊低剂量组	13	35.2±4.41	1.35±0.18*
丹那唑组	15	32.4±4.23*	1.28±0.33*

与正常组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.05$

3.4 对 EMT 大鼠病理组织形态的影响:光镜下可见模型组移植的内膜存活并沿腹壁表面生长,形成锯齿状或环状封闭结构,表面上皮明显增生呈柱状,并有小囊肿形成,腺体呈缝隙状或高柱状,腺上皮呈立方状,间质致密,腺腔中可见到大量含铁血黄素细胞及泡沫细胞,血管丰富。给药后见各组异位内膜组织呈缝隙状改变,表面上皮矮立方状,囊肿大部分消失,可见萎缩腺体,表面血管减少,间质细胞小而稀疏。

3.5 对 EMT 大鼠异位内膜超微结构的影响:电镜下模型组可见异位内膜上皮细胞表面有发达的微绒毛及细长的纤毛,胞浆中有丰富的细胞器,如高尔基体、核糖体、线粒体等,可见溶酶体及分泌颗粒。而各给药组可见异位内膜上皮细胞表面微绒毛短小稀疏,几乎见不到纤毛,胞核大,外型不规则,胞浆少,胞浆中的高尔基体、线粒体数量明显减少,粗面内质网扩张,并有脱颗粒现象,另可见大量的凋亡小体。各给药组中尤以胶囊高剂量组及丹那唑组改变明显。

4 讨论

迄今的研究表明, PGI_2 、 TXA_2 含量异常与 EMT 的痛经和不孕等症状密切相关, 可能在 EMT 病理生理机制方面起着重要的作用。EMT 的临床主症之一为痛经, 西医认为痛经与前列腺素水平异常有关。王大增等^[4]报道 EMT 患者经期血浆 TXB_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 水平显著高于正常妇女, 而 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ / TXB_2 比值低于正常妇女。6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 TXB_2 为 PGI_2 与 TXA_2 的代谢产物, 在正常情况下两者保持一定的平衡。EMT 患者由于 TXA_2 、 PGI_2 水平升高, 比例失调而致子宫及血管舒缩平衡失调, 子宫强烈收缩引起子宫缺血、血小板聚集性增高, 血瘀加重而引起痛经。但也有学者持相反的意见^[5]。在本实验中, 考虑到不可能多次吸取腹腔液进行 TXB_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 含量的检测对比, 故我们选择测定外周血 TXB_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 。结果发现模型动物其外周血 TXB_2 、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 含量下降, 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ / TXB_2 比值降低; 灌服莪棱胶囊和丹那唑后, 其 TXB_2 及 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ 水平显著升高 ($P < 0.01$), 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ / TXB_2 比值明显提高 ($P < 0.01$), 莪棱胶囊与丹那唑相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。表明莪棱胶囊可以协调改善 PGI_2 / TXA_2 的关系, 且效果与丹那唑相当。推测本药在临床上可缓解痛经是因为调节 PGI_2 / TXA_2 的平衡, 使子宫及血管的舒缩功能趋于协调, 从而使痛经得到缓解。

目前, 多数学者认为 EMT 是一种自身免疫性疾病, 不仅可以产生自身抗体 (EMAb), 而且还表现为体内多种细胞因子活性增强, 如 IL-1、IL-2、IL-6、巨噬细胞等的生物活性增强。施律琴^[6]报道 EMT 患者外周血 IL-2 活性升高, 存在免疫失常状态。故在此实验中我们选择测定了外周血 IL-2 含量, 结果发现造模后大鼠 IL-2 含量增加 ($P < 0.01$); 而灌服莪棱胶囊和丹那唑后其 IL-2 含量降低 ($P < 0.05$), 两药相比其差异无显著性 ($P > 0.05$), 各给药组与造模前相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。表明 EMT 动物模型亦存在免疫功能失常, 而莪棱胶囊可以调节其免疫功能恢复至正常水平。推测莪棱胶囊对 EMT 患者的治疗作用, 令 EMAb 转阴, 是调整了患者的免疫功能的結果。

巨噬细胞是一种极为重要的免疫细胞, 它能吞噬和消化各种抗原异物, 提取、加工处理、传递抗原给免疫活性细胞, 产生和释放 IL-1、TNF、干扰素和 PGs 等参与及调节免疫应答。正常的腹腔液是妇女排卵、受精、精卵运输、着床及早期胚胎发育所必需的生殖生理环境。不孕在正常妇女中占 15%, 而在 EMT 患者中则

高达 30%~40%。临床资料研究显示^[7], EMT 患者其腹腔液中巨噬细胞数量增多, 且高度活化, 其吞噬能力和细胞毒作用也明显增强。本实验通过鸡红细胞体内半吞噬法测定了腹腔巨噬细胞的吞噬功能, 结果发现模型组其吞噬功能明显增强 ($P < 0.01$), 给药后其吞噬功能降低, 尤以胶囊高剂量组为明显 ($P < 0.05$), 其降低程度与丹那唑相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。表明 EMT 模型亦存在着腹腔内巨噬细胞吞噬增强状态, 与临床结果是一致的, 而莪棱胶囊可以降低腹腔巨噬细胞的吞噬能力, 其效果与丹那唑相当。

从病理组织形态学及电镜观察结果发现: 腺体萎缩, 表面血管明显减少, 间质细胞小而稀疏。微绒毛短小稀疏, 胞浆中的高尔基体、线粒体数量明显减少, 粗面内质网扩张, 并有脱颗粒现象。异位内膜的超微结构如线粒体为上皮细胞的供能场所, 而高尔基体及内质网则储存糖原颗粒, 为上皮细胞的能量储备。超微结构的改变直接影响着异位内膜细胞的代谢活跃性。我们通过电镜下观察发现: 各治疗组异位内膜超微结构较模型对照组均有显著改变, 尤以莪棱胶囊高浓度组及丹那唑组异位内膜超微结构变化最明显。可以推测莪棱胶囊在一定程度上抑制了异位内膜细胞的能量代谢, 从而抑制异位内膜组织生长, 导致异位内膜萎缩。

莪棱胶囊由三棱、莪术、丹参、赤芍、当归、鳖甲等活血化瘀药组成。现代药理研究证实^[8], 活血化瘀药有改善血流动力学、改善血液流变学和抗血栓形成、改善微循环、抑制炎症和组织异常增生、镇痛及免疫调节功能。药理实验表明鳖甲有增强免疫功能, 抑制肿瘤组织生长等作用。

参考文献

- 1 司徒仪, 沈碧琼, 梁雪芳, 等. 子宫内膜异位症本质及活血化瘀疗效机理探讨. 北京中医, 1998, (3): 11.
- 2 肖纯, 黄桂林, 彭泽华. 大鼠实验性子宫内膜异位症模型复制. 中国病理生理杂志, 1995, 11(3): 332.
- 3 李仪奎主编. 中药药理实验方法学. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 158.
- 4 王大增, 王祖倩, 俞超芹. 化瘀通腑法治疗子宫内膜异位症. 中医杂志, 1992, 33(11): 33-35.
- 5 Sgarlata CS, Hertelendy F, Mikhail G, et al. The peritoneal content in peritoneal fluid and plasma of women with endometriosis. Am J Obstet Gynecol, 1983, 147(5): 563-565.
- 6 施律琴. 外周血白介素-2 与子宫内膜异位症. 上海医学, 1995, 18(4): 236.
- 7 Hill JA, Fairs HM, Schiff I, et al. Characterization of Leukocyte Subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. Fertil Steril, 1988, 50(2): 216-222.
- 8 王本祥主编. 现代中药药理学. 天津科学技术出版社, 1997: 877-879.