

血竭加味颗粒对雌激素负荷自然衰老小鼠子宫肌瘤的影响

傅萍¹ 姜萍¹ 马娴¹ 邓娟² 张爱菊² 赵宏利¹

(1. 浙江省杭州市中医院, 杭州市体育场路453号, 310007; 2. 浙江中医药大学)

[摘要] **目的** 观察血竭加味颗粒对11月龄雌激素负荷自然衰老小鼠子宫肌瘤模型小鼠的影响。**方法** 通过肌肉注射雌激素建立11月龄小鼠子宫肌瘤模型, 随机分为血竭加味颗粒组、米非司酮组、桂枝茯苓胶囊组及模型组, 另设正常对照组, 每组各10只, 观察各组小鼠的子宫系数、肌层厚度、雌二醇(E₂)、孕酮(P)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及血管内皮生长因子(VEGF)的影响。**结果** 血竭加味颗粒能明显减小11月龄子宫肌瘤模型小鼠的子宫系数, 降低血清E₂、P水平, 抑制子宫组织ER、PR、VEGF及IGF-1的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 血竭加味颗粒能明显抑制11月龄雌激素负荷自然衰老小鼠子宫肌瘤的增生。

[关键词] 血竭加味颗粒; 子宫肌瘤; 雌二醇; 孕酮; 雌激素受体; 孕激素受体; 胰岛素样生长因子-1; 血管内皮生长因子

Effect of Xuejie Jiawei Granule on Hysteromyoma of Natural Aging Mice with Estrogen Load

FU Ping, JIANG Ping, MA Xian, et al.

(Hangzhou Municipal TCM Hospital, Hangzhou 310007)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Xuejie Jiawei Granule on hysteromyoma of eleven-month-old natural aging mice models with estrogen load. **Methods** The eleven-month-old mice hysteromyoma models established by intramuscular injection of estrogen were randomized into Xuejie Jiawei Granule group, Mifepristone control group, Guizhi Fuling Capsule control group and model control group, 10 in each group. Another 10 healthy mice were of the normal control group. Uterus coefficients, muscle thickness, contents of E₂ and P in blood serum, expressions of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), expressions of insulin-like growth factor-I (IGF-I), and expressions of vascular endothelia growth factor (VEGF) were observed. **Results** Xuejie Jiawei Granule obviously reduced uterus coefficients, decreased contents of E₂ and P in blood serum, and inhibited expressions of ER, PR, IGF-I, and VEGF of uterine tissues of mice models. **Conclusion** Xuejie Jiawei Granule inhibits obviously the growth of hysteromyoma of mice models with estrogen load.

Key Words Xuejie Jiawei Granule; Hysteromyoma; Estrodiol; Progesterone; Estrogen receptor; Progesterone receptor; Insulin-like growth factor-I; Vascular endothelia growth factor

子宫肌瘤是子宫平滑肌组织增生而成的良性肿瘤, 是女性生殖系统最常见的肿瘤^[1]。我们的前期研究^[2,3]显示, 中医药治疗本病能明显改善症状, 使肌瘤缩小或消散, 表现出非手术治疗的优势。血竭加味颗粒是在全国老中医药专家学术经验继承工作指导老师何子淮先生治疗子宫肌瘤经验方的基础上组方而成, 疗效确切。本研究从子宫系数、雌二醇(E₂)、孕酮(P)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及血管内皮生长因子(VEGF)诸方面观察血竭加味颗粒对雌激素负荷自然衰老11月龄子宫肌瘤模型小鼠的影响, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

ICR小鼠, 50只, 11月龄, 雌性, 体重(40±5)g, 浙江中医药大学动物实验中心。动物许可证号: XYXK

(浙)2003-0003。

1.2 药物及试剂

苯甲酸雌二醇注射液, 规格: 2mg/ml, 批号: 050103, 上海通用药业股份有限公司生产; 血竭加味颗粒(21g/包), 由血竭、制大黄、猫爪草、猫人参、夏枯草等组成, 江阴天江药业有限公司生产, 批号: 20050408; 米非司酮, 规格: 25mg/片, 批号: 43051106, 北京紫竹药业有限公司生产; 桂枝茯苓胶囊, 规格: 0.31g/粒, 批号: 060113, 江苏康缘药业股份有限公司。小鼠性激素(E₂、P)ELISA试剂盒, 大连泛邦化工技术开发有限公司生产; 小鼠性激素受体(ER、PR)试剂盒, 上海基因公司生产; 小鼠IGF-1试剂盒, 上海基因公司生产; 小鼠VEGF试剂盒, 北京博奥森生物技术有限公司生产; 即用型DAB显色试剂盒, 北京中杉金桥生物技术有限公司生产。

基金项目: 浙江省中医药管理局课题(2005C117)和杭州市科委课题(2005633Q20)

通讯作者: 傅萍, fuping0515@gmail.com, 13857105261

参照本课题前期实验方法建立雌激素负荷自然衰

老11月龄子宫肌瘤模型^[4],将11月龄的 ICR 雌性小鼠50只随机分成5组:血竭加味颗粒组、米非司酮组、桂枝茯苓胶囊组、模型组、正常对照组,每组10只。正常对照组2只小鼠实验中死亡而剔除。除正常对照组外其余各组肌肉注射苯甲酸雌二醇注射液(浓度0.16mg/ml)0.0032mg·10g⁻¹·d⁻¹,正常对照组肌肉注射同体积生理盐水,共15天。在造模同时,血竭加味颗粒组(浓度416mg/ml)灌血竭加味颗粒混悬液37mg·10g⁻¹·d⁻¹;米非司酮组灌米非司酮溶液(浓度0.248mg/ml)0.022mg·10g⁻¹·d⁻¹,桂枝茯苓胶囊组灌桂枝茯苓胶囊混悬液(浓度55.8mg/ml)4.96mg·10g⁻¹·d⁻¹,模型组及正常对照组灌等体积生理盐水,均按体表面积计算。

1.4 观察指标及检测方法

给药15天后,小鼠称重后摘眼球取血,脱颈椎处死,取出双子宫。①子宫系数测定:仔细去除子宫周围结缔组织,精密称重,按下列公式计算子宫系数:子宫系数=子宫重(克)/体重(克)。②子宫组织形态学观察:将子宫以10%的中性甲醛固定,脱水,包埋,切片,HE染色,光镜下观察并比较各组子宫的组织形态。每张切片选取5个部位在10×4倍镜下显微测微尺测量平滑肌厚度,取平均值。③血清性激素测定:各组小鼠眼眶后静脉丛取血后,血液经离心(3000r/s)后取出血清,置于-20℃低温冰箱保存送检,采用双抗体夹心ELISA法检测各组血清E₂、P水平,酶标仪双波长(主波450nm,辅助波长630nm)测量各组标本OD值,绘制标准曲线,分别计算各组标本E₂、P含量。④子宫中ER、PR含量测定:子宫组织以10%的中性甲醛固定后,采用Envision二步法进行免疫组化的检测。光镜下观察标记ER、PR阳性切片(以细胞核染色为准),每个切片选5个高倍视野(每个视野计数100个细胞),综合分布范围和染色强度进行积分^[5]。ER、PR均定位于细胞核,阳性染色指显微镜下观察细胞内具有清晰可见和定位准确的棕黄色颗粒,并且背景清晰。分布范围按下列标准评分:染色阳性细胞数为0计0分;1%~25%计1分;26%~50%计2分;>50%计3分;染色强度按下列标准评分:未着色为0分,染色弱但明显强于阴性对

照者为1分,染色清晰者为2分,染色强者为3分。上述两种评分相加为表达强度积分。阳性程度按积分值分为:(-)0分,(+)1~2分,(++)3~4分,(+++)5~6分。⑤子宫组织IGF-Ⅰ、VEGF含量测定:免疫组化检测方法及积分方法同子宫组织ER、PR含量测定,采用Envision二步法。IGF-Ⅰ阳性表达存在细胞浆,VEGF阳性表达存在子宫定位于平滑肌细胞。

1.5 统计学方法

应用统计软件SPSS11.0,计量资料用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用*t*检验,多组间比较用单因素方差分析,多组之间两两比较用LSD及S-N-K分析;计数资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 血竭加味颗粒对自然衰老小鼠子宫重量的影响

表1示,模型组与正常对照组比较,子宫重量、子宫系数均明显增大,差异有统计学意义($P<0.01$)。血竭加味颗粒对雌激素负荷自然衰老小鼠子宫增重有明显的抑制作用,能减轻子宫重量,降低子宫系数。与模型组比较,血竭加味颗粒组、米非司酮组对小鼠子宫增重的抑制作用最为显著($P<0.01$);桂枝茯苓胶囊组对子宫增重也有明显抑制作用($P<0.05$)。

2.2 血竭加味颗粒对自然衰老小鼠子宫肌层的影响

从大体形态上观察,模型组子宫增大,切面宫腔变窄,肌层增厚。HE染色后镜下观察,造模后子宫平滑肌明显增厚,肌纤维肥大,排列呈卷云状或编织状,界限不清,细胞增大核密集肥大,呈活跃增生现象。治疗各组子宫肌层中肌纤维稍肥大,排列较模型组整齐,子宫平滑肌厚度薄于模型组。表1示,血竭加味颗粒组、米非司酮组、桂枝茯苓胶囊组对小鼠子宫平滑肌增厚均有明显抑制作用($P<0.01$)。

2.3 血竭加味颗粒对自然衰老小鼠血清E₂、P水平的影响

表2示,与正常对照组比较,模型组小鼠血清中E₂、P水平均明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$)。血竭加味颗粒组、米非司酮组、桂枝茯苓胶囊组均使小鼠血清E₂、P水平明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而米非司酮组更为显著($P<0.05$)。

表1 各组小鼠子宫重量、子宫系数及肌层厚度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	子宫重量(g)	子宫系数	肌层厚度(×10 ⁻³ mm)
正常对照组	8	0.190±0.064	4.77±1.66	346.68±53.23
模型组	10	0.365±0.090*	8.72±2.35*	1115.77±124.22*
血竭加味颗粒组	10	0.262±0.031△△	6.51±1.01△△	733.31±196.71△△
米非司酮组	10	0.247±0.077△△	6.28±1.91△△	468.65±37.64△△
桂枝茯苓胶囊组	10	0.273±0.068△	6.62±1.91△	733.93±15.84△△

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

表2 各组小鼠血清 E ₂ 、P 水平比较 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	E ₂	P
正常对照组	8	24.47 ± 2.77	9.18 ± 2.44
模型组	10	115.37 ± 24.99 *	20.01 ± 3.83 *
血竭加味颗粒组	10	43.06 ± 9.81 △△	17.00 ± 2.28 △△
米非司酮组	10	29.79 ± 8.06 △△	14.25 ± 3.33 △△
桂枝茯苓胶囊组	10	43.43 ± 9.81 △△	17.05 ± 1.96 △△

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与米非司酮组比较, ▲ $P < 0.05$

2.4 血竭加味颗粒对自然衰老小鼠子宫 ER、PR 含量的影响

表3示, ER、PR 阳性表达存在子宫肌瘤细胞核中, 与正常对照组相比, 模型组小鼠 ER、PR 的分布强度、染色强度、总积分以及阳性表达率均明显升高 ($P < 0.01$)。从分布强度和染色强度来看, 血竭加味颗粒组、米非司酮组、桂枝茯苓胶囊组均能明显降低小鼠子宫组织的 ER、PR 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.5 血竭加味颗粒对自然衰老小鼠子宫 IGF-Ⅰ、VEGF 含量的影响

表4示, 与正常对照组比较, 模型组小鼠子宫 IGF-Ⅰ、VEGF 的分布强度、染色强度、总积分均明显升高 ($P < 0.01$)。从分布强度和染色强度来看, 与模型组比较, 血竭加味颗粒组、米非司酮组、桂枝茯苓胶囊组均能明显降低小鼠子宫组织的 IGF-Ⅰ 和 VEGF 的表达 ($P < 0.01$)。

3 讨论

现代研究多采用卵巢去势法造老鼠的围绝经期模型, 或用 D-半乳糖法造衰老小鼠模型。我们认为, 卵巢功能衰退是一个逐渐的过程, 采用去势法或 D-半乳糖

法造模, 不符合自然衰老规律。我们的前期研究发现^[6], 11月龄的 ICR 小鼠阴道上皮细胞角化程度显著降低, 动情周期明显延长甚至紊乱, 动情频率明显下降, 其卵巢功能开始衰退, 相当进入女性围绝经期, 故我们直接采用11月龄的 ICR 小鼠动物模型。子宫肌瘤是一种卵巢性激素依赖性的良性肿瘤, 雌激素在其发生中起关键作用, 雌激素的过度作用能刺激子宫平滑肌细胞增生, 体积增大, 促进子宫肌瘤的发生发展, 故我们肌肉注射雌激素后成功建立了自然衰老小鼠的子宫肌瘤模型。

中医虽无“子宫肌瘤”病名的记载, 但因其“坚硬不移, 有形可征, 有块可掬”, 属中医“癥瘕”范畴。妇女在六七至七七之年, 历经了经、孕、产、乳, 正值“六七, 三阳脉衰于上, 七七任脉虚, 太冲脉衰少”的时期^[7], 肾之阴精有所亏虚, 肾精渐亏, 正气渐弱, 肝血亦日趋不足。易导致肝气失疏、气滞血瘀、痰湿内停, 结而成癥; 瘀久生热、热扰血海, 发生月经紊乱、来潮量多如崩或淋漓难断。我们基于围绝经期妇女子宫肌瘤的病因病机, 提出防治当以凉肝消癥、软坚化痰为主。

血竭加味颗粒系在继承何子淮先生治疗子宫肌瘤经验方的基础上结合临床实践组方, 以凉肝消癥软坚化痰为治法。临床用于治疗痰瘀互阻之子宫肌瘤, 疗效确切。血竭性味甘咸平, 入心肝经, 功能散瘀定痛、止血破积, 前人用血竭、没药用醋为丸, 治产后胞衣不下。我们治疗子宫肌瘤用血竭, 寓消癥于软坚之内, 祛瘀生新之中。制大黄因其性苦寒, 活血祛瘀, 削坚散结, 有推陈致新之功, 两药合用为主药。夏枯草入肝胆经, 药性寒凉, 《本草通玄》言: “补养厥阴血脉, 又能通气散结”,

表3 各组小鼠子宫 ER、PR 比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ER			PR		
		分布强度(分)	染色强度(分)	阳性率(%)	分布强度(分)	染色强度(分)	阳性率(%)
正常对照组	8	0.25 ± 0.46	0.25 ± 0.46	25	0.38 ± 1.06	0.50 ± 0.93	25
模型组	10	2.80 ± 0.42 *	2.70 ± 0.48 *	100 *	2.70 ± 0.48 *	2.00 ± 0.47 *	100 *
血竭加味颗粒组	10	1.50 ± 0.85 △△	1.10 ± 0.57 △△	90	1.70 ± 1.06 △△	1.30 ± 0.82 △△	90
米非司酮组	10	0.20 ± 0.42 △△	0.20 ± 0.42 △△	20 △△	0.00 ± 0.00 △△	0.00 ± 0.00 △△	0 △△
桂枝茯苓胶囊组	10	1.50 ± 0.71 △△	1.10 ± 0.84 △△	90	2.00 ± 0.82 △	1.30 ± 0.67 △	90

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表4 各组小鼠子宫 IGF-Ⅰ、VEGF 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IGF-Ⅰ			VEGF		
		分布强度(分)	染色强度(分)	阳性率(%)	分布强度(分)	染色强度(分)	阳性率(%)
正常对照组	8	0.63 ± 0.744	0.56 ± 0.54	50	0.25 ± 0.46	0.38 ± 0.52	37.5
模型组	10	3.00 ± 0.00 *	2.50 ± 0.52 *	100 *	2.80 ± 0.42 *	2.70 ± 0.48 *	100 *
血竭加味颗粒组	10	1.70 ± 0.48 △	1.40 ± 0.52 △	100	0.90 ± 0.87 △	1.00 ± 0.67 △	80
米非司酮组	10	1.10 ± 0.57 △	0.90 ± 0.32 △	90	0.30 ± 0.48 △	0.40 ± 0.51 △	40 △
桂枝茯苓胶囊组	10	1.70 ± 0.68 △	1.70 ± 0.82 △	100	0.70 ± 0.82 △	0.90 ± 0.72 △	70

注:与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$

具凉肝益阴、软坚化痰之功。紫草入肝经血分,《医林纂要》记载“补心,缓肝,散瘀,活血”。药对猫爪草、猫人参活血消癥,消散肌瘤。方中三棱、莪术活血消癥,抑瘤生长;贯众凉肝清热止血使沸腾之血平和,减少经量。全方行中有止,散中有收,相辅相成,使厥阴肝经血气得柔,瘀瘀得消,癥积得散。

雌孕激素在子宫肌瘤的发生发展中具有重要作用,其作用机理为激活局部调节因子,改变细胞激素受体水平,进而影响子宫平滑肌的有丝分裂。雌激素使细胞分裂、增殖,孕激素使靶细胞肥大、成熟^[8]。本研究结果表明,血竭加味颗粒对小鼠血液中雌孕激素的含量均有明显的抑制作用,能够抑制子宫肌瘤的发生。现代研究证实^[9],E₂、P对靶器官作用的强弱与靶细胞内ER、PR水平的高低密切相关。本实验结果显示,给小鼠注射雌激素后,小鼠子宫内膜中的ER、PR表达较正常组对照明显增强。而用血竭加味颗粒等治疗模型小鼠后,小鼠子宫内膜中的ER、PR表达显著降低。

胰岛素样生长因子系统(insulin-like growth factor system, IGFs)由两种同源的相关多肽胰岛素样生长因子-Ⅰ和胰岛素样生长因子-Ⅱ(IGF-Ⅰ和IGF-Ⅱ)组成。IGF-Ⅰ是细胞生长和分化过程中的重要调节因子,具有细胞分化和增殖功能,可促进细胞的有丝分裂及分化后功能的表达,其在子宫局部的阳性表达与肌瘤的分布关系密切。IGF-Ⅰ可以通过内分泌、旁分泌、自分泌途径,调节靶器官的增生和调亡的速率,刺激细胞的正常生长和肿瘤的生长^[10]。结果显示,血竭加味颗粒能抑制自然衰老子宫肌瘤模型小鼠子宫组织局部的IGF-Ⅰ的阳性表达。这可能是血竭加味颗粒对自然衰老小鼠子宫系数抑制的又一原因。

VEGF是血管内皮细胞的特殊分裂因子,具有双重作用,在肌瘤的发生中起重要作用。本课题研究表

明,模型小鼠肌瘤组织中的VEGF的表达强于正常对照组,血竭加味颗粒能显著抑制模型小鼠子宫组织的VEGF的表达,其抑制强度与桂枝茯苓胶囊、米非司酮的作用程度相当。提示降低模型小鼠体内的IGF-Ⅰ、VEGF表达,阻断细胞异常增殖是治疗子宫肌瘤的又一个机制。

参考文献

- [1]乐杰.妇产科学[M].北京:人民卫生出版社,2000:323-326.
- [2]傅萍.血竭化瘤冲剂治疗子宫肌瘤59例观察[J].实用中医药杂志,2001,17(5):6.
- [3]傅萍,何嘉琳,崔林.血竭化瘤冲剂治疗子宫肌瘤的临床观察[J].中医医学刊,2004,22(10):1802-1804.
- [4]傅萍,崔林,何嘉琳,等.血竭化瘤颗粒对子宫肌瘤模型小鼠雌孕激素及其受体的影响[J].中国中医药科技,2004,11(6):336-337.
- [5]王慧香,岳瑛,周新,等.血管内皮生长因子受体Ⅰ及孕激素受体在子宫肌瘤中的表达[J].中国实验诊断学,2005,9(6):906-908.
- [6]傅萍,赵宏利,姜萍.自然衰老ICR小鼠进入围绝经期时限的研究[J].中华中医药学刊,2008,26(5):974-975.
- [7]程泾.妇科疑难病现代中医诊断与治疗[M].北京:人民卫生出版社,2003:400.
- [8]马慧芬,马海燕,郭建红.子宫肌瘤组织雌孕激素受体的测定[J].长治医学院学报,2000,4(14):300-301.
- [9]丁佩芳,程忠平,蒋允凯.ER、PR、PCNA、C-CrbB-2在子宫肌瘤中的表达及其临床意义[J].现代诊断与治疗,2003,14(3):137-140.
- [10]van der Ven LT, Gloudemans T, Roholl PJ, et al. Growth advantage of human leiomyoma cells compared to normal smooth-muscle cells due to enhanced sensitivity toward insulin-like growth factor Ⅰ[J]. Int J Cancer, 1994, 59(3):427-434.

(收稿日期:2008-03-07;修回日期:2008-08-07)

[编辑:行之]

石家庄炎黄针灸推拿专修学校招生

我校师资力量雄厚,办学独具特色,招生如下。1. **中医针灸师培训班**:学期4个月,全日制,每年3月1日、7月1日、11月1日开学。课本用大专院校统一教材的针灸学、推拿学、中医基础、中医诊断、解剖学。针法有腹针、眼针、火针、舌三针、锋针、梅花针、头针。学会为止。2. **高级针灸师进修班**:学期15天,每月10日开学。讲授腹针、火针、舌三针、锋针、头皮针治疗高血压、半身不遂、针灸减肥、肠炎、胃炎、结肠炎、头痛等疾病的方法。3. **按摩师资格等级培训班**:学期1~2个月,全日制。每月1日开学,中级班学费400元、高级班学费600元,考试合格颁发国家等级资格证书及河北省卫生厅中医按摩师上岗证书。4. **反射疗法师培训班**:讲授腹部诊断及肠炎、胃炎、更年期综合征、背部、足部反射区的诊断和治疗,考试合格颁发国家职业资格证书。全国通用。5. **手诊手疗班、小儿推拿班**。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

地址:河北省石家庄市桥西区广平街69号,电话:(0311)88872897,83819019,网址:www.YHzhenniu.com。

尚真杯全国特色医技学术研讨会征文

为研究探讨我国各地知名医生的医疗技术,拟于2009年4月在扬州召开“尚真杯全国特色医技学术研讨会”。征文如下:各种医疗技术治疗常见病、多发病、疑难病的方法与思路,病例报告或经验总结;有关祖传与师承关系、或多年临证积累所掌握的特色医疗技术。请注明“医技”字样。

为研究探讨专科专病的临床经验与学术成果,拟于2009年5月在无锡召开“尚真杯全国专科专病学术研讨会”。征文如下:专科专病诊治临床经验总结;中医、中西医结合诊治专科专病的思路及经验总结;专科专病理论与临床研究的新成果、新发现、新进展;名方、验方的研究;名老中医的学术思想继承与整理、经验总结。请注明“专科专病”字样。

征文请于2009年3月28日前寄至:南京市商埠街27号尚真医学技术研究中心学术部收。邮编:210011。E-mail:xsbsb@yxjw.com。电话:(025)51522033,51502086。论文一经录用,作者即可成为本研究中心研究员,并颁发聘书。