

补肾活血法对子宫内膜异位症 模型大鼠细胞凋亡的影响

周 华 齐 聪

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海市卢湾区普安路185号, 200021)

[摘要] **目的** 探讨补肾活血法治疗子宫内膜异位症的细胞凋亡机制。**方法** 将雌性8~12周龄SD大鼠分为模型组、西药组、中药组及中西药合并组, 每组15只。造模成功后, 分别给药4周, 采用光镜、电镜、TUNEL法及免疫组化法检测药物干预前后模型大鼠异位子宫内膜的病理形态学、凋亡细胞的阳性率及凋亡调控蛋白 bcl-2、bax 的阳性表达。**结果** 中西药合并组的异位内膜组织发生凋亡的改变最为明显, 凋亡指数最高, 并可明显下调 bcl-2蛋白的阳性表达和提升 bax 蛋白阳性的表达, 从而使 bcl-2/bax 比值下降, 其次为中药组、西药组和模型组。**结论** 子宫内膜异位症的发生与细胞凋亡能力的下降有关。补肾活血中药能促进异位内膜细胞发生凋亡, 使异位病灶萎缩、消退细胞。

[关键词] 补肾活血法; 子宫内膜异位症; bcl-2; bax; 中医药疗法

Effect of Reinforcing Kidney and Activating Blood Therapy on Apoptosis of Rat Models with Endometriosis

ZHOU Hua, QI Cong

(Shuguang Hospital of Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200021)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of reinforcing kidney and activating blood therapy for the apoptosis of endometriosis. **Methods** Female SD rats aged 8~12 weeks were grouped as model group, western medicine group, Chinese medicine group and integrated Chinese and western medicine group, with 15 in each group. The light microscope, electron microscope, TUNEL method, and immunohistochemical method were adopted to observe the pathomorphology, positive rate of apoptotic cells and the positive expression of apoptosis-regulating gene bcl-2 and bax. **Results** The apoptosis of endometriosis tissues in the integrated Chinese and western medicine group was the most obvious result with the highest apoptosis index, and the positive expression of apoptosis regulating gene bcl-2 was downward regulated and that of apoptosis regulating gene bax upward regulated, so bcl-2/bax decreased. Then it was Chinese medicine group, western medicine group, and model group. **Conclusion** The occurrence of endometriosis is related with the lowering of ability of apoptotic cells. Chinese medicines with the functions to reinforce kidney and activate blood can promote the ability of apoptotic cells in endometriosis to quicken the atrophy and regression of endometriosis tissues.

Key Words Reinforcing kidney and activating blood therapy; Endometriosis; bcl-2 and bax; TCM therapy

子宫内膜异位症是目前妇科领域中的多发病、疑难病, 复发率较高, 药物或手术治疗后常在1年内复发, 其5年复发率超过40%^[1]。由于其发病机制尚不十分明确, 而反复手术或激素类药物给患者造成巨大的身心痛苦和经济负担, 因此防治子宫内膜异位症一直是妇科领域的重要研究课题之一。本实验拟通过观察补肾活血法对子宫内膜异位症模型大鼠异位子宫内膜细胞凋亡的影响, 为其临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雌性SD大鼠60只, 8~12周龄, 体重(200±20)g, 由上海中科院实验动物中心提供。饲养室的温度保持在20~24℃, 相对湿度约45%, 观察无怀孕, 进食、饮水正常的情况下, 适应性喂养2周, 于动情期内进入实验。

1.2 药物与试剂

补肾活血中药由制鳖甲、鹿角、生牡蛎、夏枯草、水蛭、土鳖虫、木馒头、石见穿、瓦楞子、党参、炮姜等中药组成, 比例为2:2:2:2:2:2:2:2:2:2:2:2, 由上海中医药大学附属曙光医院制剂室提供; 丹那唑, 100mg/粒, 上海华联制药厂生产(批号: H31021681); 4%甲醛、2.5%戊二醛由上海中医药大学病理教研室提供; Envision 免疫组化试剂盒由上海广实生物科技有限公司提供; TUNEL 法细胞凋亡试剂盒为德国宝灵曼公司产品。

1.3 仪器

BMJ-1型生物组织包埋机, 德国 LICO 公司产品; RM 2145型冰冻切片机, 德国 LICO 公司产品; 光学显微镜、透射电子显微镜、显微镜照相系统及IMS 细胞图像分析系统均为上海广实生物科技有限公司备用器械。

1.4 模型制备

参照文献[2]方法。60只大鼠常规适应性喂养2周后,每日定时作阴道涂片检查,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3个动情周期开始造模。造模前先予大鼠每天肌肉注射苯甲酸雌二醇(0.1ml/kg)共2天,造模时以2%戊巴比妥钠(40mg/kg)对大鼠进行麻醉。在无菌条件下开腹,取下腹正中切口长约1.5cm,进入腹腔后分离并结扎一侧子宫,取中段2cm,纵形剪开宫腔,剥离子宫内膜,将剥离的子宫内膜缝合于腹膜壁层,术毕,关腹,待大鼠清醒后放回笼中饲养,术后注射庆大霉素0.1ml连续3天,正常清洁饲养。造模后第3周再次剖腹检查,见移植的子宫内膜体积增大,呈透明的结节状或囊状,内有液体积聚,表面有结缔组织覆盖及血管形成,并与大网、肠管、腹壁广泛粘连,取少许内膜组织作病理检测,观察有子宫内膜腺体或上皮、间质细胞,证实造模成功。

1.5 动物分组及给药

在造模后的第3周,将成模的52只大鼠称重后随机分为4组,即中药组、西药组、中西药合并组及模型组,每组13只。中药组以60g·kg⁻¹·d⁻¹的补肾活血药液给予灌胃;西药组以100mg·kg⁻¹·d⁻¹的丹那唑混悬液灌胃;中西药合并组用药为上述中药加西药;模型组以同等剂量的生理盐水灌胃^[3]。各组连续灌胃4周。药物干预期间模型组和中西药合并组各有3只大鼠死亡,西药组和中药组各有2只大鼠死亡,死亡原因为腹腔出血和感染。

1.6 病理学观察

灌胃给药4周后,为避免性周期对观察指标的影响,选择在大鼠的动情周期进行取材,将大鼠断头处死,剖腹取出大鼠新鲜的异位及在位的子宫内膜组织,分别放入4%多聚甲醛、2.5%戊二醛中固定、脱水、石蜡包埋、切片,染色,行光镜、电镜观察。

1.7 细胞凋亡指数检测

采用TUNEL法检测(按说明书进行操作)。

1.8 免疫组化染色

常规切片、脱蜡、水化,抗原修复、染色、正常血清封闭,加一抗、二抗试剂,显色、衬染、蓝化,树脂封片。以胞核和胞浆内出现棕褐色阳性颗粒为阳性标准^[4]。

1.9 图像分析

IMS彩色图像分析系统、医学图像分析软件,在100倍下每张随机选取3~5个视野分析细胞凋亡蛋白bcl-2、bax免疫组化棕褐色阳性着色面积。

1.10 统计学方法

采用SPSS 12.0软件进行统计分析,采用单因素方

差分析进行组间比较,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗前后异位内膜肉眼观察变化

造模后第3周,第2次剖腹观察发现60只大鼠有52只大鼠移植后的异位内膜组织生长良好,呈隆起透亮的小囊,内部充满透明积液,表面被结缔组织覆盖并有血管形成,质软,并与大网、肠管、腹壁广泛粘连,病理检测有子宫内膜腺体,为建模成功。5只为炎性坏死囊肿,3只造模后死亡,死因为腹腔感染。分组给药4周后,剩余42只大鼠,再次开腹时可见各组异位内膜组织表现不同,有的异位病灶呈萎缩状态,有的呈低度生长状态,也有呈旺盛的生长状态。在缩小内异灶方面,以中西药合并组的改变最明显,中药组次之,其次为西药组、模型组。同时西药组腹腔内的粘连较中药组和中西药合并组严重。

2.2 各组大鼠治疗前后异位内膜病理形态学观察

分组给药4周后可见各治疗组与模型组比较,均有不同程度抑制异位内膜生长的作用,并可观察到异位内膜组织中典型的细胞凋亡形态学变化:细胞核固缩,染色质凝集,核破裂及凋亡小体形成等。其中以中西药合并组的改变最明显,其次为中药组、西药组。同时发现中药组在位内膜与正常内膜基本相同,而西药组在位内膜呈萎缩性改变,这表明西药能够破坏在位子宫内膜的结构,而中药在对异位内膜显示治疗作用的同时,对在位的子宫内膜无不良影响。

2.3 各组大鼠异位内膜细胞凋亡指数比较

表1示:西药组、中药组及中西药合并组大鼠的凋亡指数较模型组均明显升高($P < 0.01$),其中中西药合并组的凋亡指数较中药组与西药组升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表1 各组大鼠异位内膜细胞凋亡指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	平均凋亡指数
模型组	10	5.84 ± 4.48
西药组	11	17.81 ± 7.77 *
中药组	11	25.70 ± 2.17 *△
中西药合并组	10	31.22 ± 8.33 *△▲

注:与模型组比较,* $P < 0.01$;与西药组比较,△ $P < 0.01$;与中药组相较,▲ $P < 0.05$

2.4 各组大鼠异位内膜凋亡蛋白 bcl-2、bax 的表达

表2示,西药组、中药组和中西药合并组异位内膜 bcl-2 的表达较模型组均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中中西药合并组异位内膜 bcl-2 的表达较中药组、西药组降低($P < 0.01$)。中药组和中西药合并组异位内膜 bax 的表达较模型组均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以中西药合并组异位内膜 bax 的表

表2 各组大鼠异位内膜 bcl-2、bax 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	bcl-2		bax	
		阳性面积(μm^2)	阳性光密度(OD 值)	阳性面积(μm^2)	阳性光密度(OD 值)
模型组	10	76094.40±2961.05	14.40±1.65	20364.80±4027.97	6.10±0.57
西药组	11	65668.45±16557.72 *	12.45±3.38 *	29942.91±4475.63	7.81±1.60
中药组	11	35056.18±10202.27 **△	9.45±2.62 **	33269.09±9660.65 *	9.72±1.62 *
中西药合并组	10	20226.40±1130.63 **△▲	6.60±0.69 **△▲	59576.40±21351.98 **△▲	13.40±4.01 **△▲

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与西药组比较, △ $P < 0.01$;与中药组相较, ▲ $P < 0.05$

达较中药组、西药组升高($P < 0.01$)。

2.5 各组大鼠异位内膜 bcl-2/bax 比值及阳性光密度比较

表3示,西药组、中药组和中西药合并组异位内膜 bcl-2/bax 的比值较模型组均明显降低($P < 0.01$),其中合并组异位内膜 bcl-2/bax 的比值较中药组、西药组降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表3 各组大鼠异位内膜 bcl-2/bax 比值及阳性光密度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	bcl-2/bax 比值	阳性光密度(OD 值)
模型组	10	3.88±0.87	2.37±0.32
西药组	11	2.27±0.82 *	1.66±0.56 *
中药组	11	1.17±0.66 *△	0.99±0.30 *△
中西药合并组	10	0.36±0.09 *△▲	0.52±0.14 *△▲

注:与模型组比较, * $P < 0.01$;与西药组比较, △ $P < 0.01$;与中药组比较, ▲ $P < 0.05$

3 讨论

子宫内膜异位症的发病机理目前还不清楚,随着腹腔镜的广泛开展,发现经血逆流在许多妇女中存在,但发展为子宫内膜异位症的只占12%^[5]。近年来,研究发现子宫内膜的周期性生长和重建与细胞凋亡有关,凋亡调节蛋白 bcl-2、bax 在子宫内膜异位症的发生、发展中起着十分重要的作用^[6,7]。bcl-2为细胞凋亡抑制蛋白, bax 为细胞凋亡促进蛋白,这两类蛋白质的比例决定了细胞在受到凋亡信号刺激时是否发生凋亡^[8]。据报道,内异症患者异位内膜的细胞凋亡率低于正常妇女的子宫内膜,并且 bcl-2蛋白的表达明显升高,而 bax 蛋白的表达又明显降低,提示这些凋亡率降低的子宫内膜异位至腹腔后,对细胞毒作用的反应敏感性降低,同时组织的抗凋亡性增强,得以逃避免疫监视而在子宫腔以外存活、种植、侵袭和发展,形成异位病灶^[9-11]。

中医学认为,子宫内膜异位症的主要病机责之于肾虚血瘀,由于异位内膜的周期性出血造成离经之血积聚于少腹,冲任、胞脉气血阻滞不通,且病久又损及肾气,形成肾虚血瘀的病理变化,日久形成癥瘕包块。药理研究证实,活血药能抑制异位内膜的增生、分泌和出血,减轻组织增殖和粘连,促进包块吸收、粘连软化、

组织的修复和再生,补肾药可改善改善免疫功能及腹腔内微环境,抑制异位的子宫内膜生长^[12]。本实验以补肾活血中药组方,方中鹿角味咸气温,咸能入血软坚,温能通行散邪,补阳又能益气;炙鳖甲滋阴潜阳、祛瘀散结、软坚消癥,二者相伍,一阴一阳,血肉有情之品,补肾软坚、活血消癥为君药;水蛭、土鳖虫、木馒头、石见穿活血化瘀;夏枯草、牡蛎、瓦楞子化痰散结,使痰瘀同治均为臣药,以增强鹿角片、炙鳖甲活血软坚作用;佐党参健脾益气治其本,以“养正积自除”;用炮姜为使药,行气散寒,以体现治痰先治气,气顺痰自消。全方共奏补肾活血,软坚化痰散结之功。

结果显示,肉眼观察见中西药合并组可明显缩小异位病灶,其次为中药组和西药组,但是西药组腹腔内的粘连较中药组和中西药合并组严重;病理形态学观察可见各治疗组与模型组比较,均有不同程度抑制异位内膜生长的作用,其中以中西药合并组变化较为典型,中药组次之,西药组及模型组不明显。凋亡指数结果显示中西药合并组的凋亡指数最高,其次为中药组、西药组,模型组最低;凋亡相关蛋白结果显示,模型组异位内膜 bcl-2蛋白的表达显著升高,给药后发现各给药组大鼠的 bcl-2阳性面积、OD 值均显著下降,而中西药合并组表达强度最低,其次为中药组、西药组;各组大鼠内膜异位内膜 bax 阳性面积及 OD 值曲线则与 bcl-2相反;而中西药合并组较西药组、中药组可明显降低大鼠异位内膜 bcl-2/bax 的比值。

由此可见,异位内膜细胞可通过 bcl-2蛋白的高表达, bax 蛋白的低表达来增强自身的抗凋亡及抑制凋亡的能力,加之异位内膜细胞又具有黏附性强及侵蚀性生长的特点,得以在子宫腔以外的环境中种植存活,形成异位病灶。凋亡方面的检测结果显示以中西药合并组的改变最为明显,表明中西药联合应用能提升凋亡细胞的阳性率及下调异位内膜细胞中 bcl-2蛋白的表达,上调 bax 蛋白的表达,从而改变 bcl-2/bax 比例,激活异位内膜细胞的凋亡途径,启动异位内膜细胞发生凋亡,使异位病灶得以萎缩、消失。提示中西药合并能促进细胞凋亡,较单纯中药或西药效果明显,推测补肾活血中药可能通过调控细胞凋亡的线粒体途径,促进异位内膜细胞凋亡,以降低其在宫腔外的存活及种

植能力,从而抑制异位内膜病灶的发展,并且不会影响在位内膜组织。

参考文献

[1]曲军英·卵巢子宫内膜异位囊肿研究的进展[J].福建医科大学学报,2000,34(9):318-319.
[2]Vernon MW, Wilson EA·Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat[J].Fertil Steril, 1985, 44(5):684-694.
[3]张大方主编·药理与中药药理实验[M].上海:上海科学技术出版社,2002:9-12.
[4]姜泊主编·细胞凋亡的基础与临床[M].北京:人民军医出版社,1999:7-9.
[5]D'Hooghe TM, Bamba CS, Raeymaekers BM, et al·Intrapelvic injection of menstrual endometrium causes endometriosis in baboons (Papio cynocephalus and Papio anubis) [J]. Am J Obstet Gynecol, 1995, 173(1):125-134.
[6]Harada T, Kaponis A, Iwabe T, et al·Apoptosis in human endometrium and endometriosis [J]. Hum Reprod Update, 2004, 10(1):29-38.

[7]Suganuma N, Nawa A, Furuhashi M·Apoptosis in endometriosis[J]. Nippon Rinsho, 2001, 59(Suppl 1):77-80.
[8]Sato T, Hanada M, Bodrug S, et al·Interactions among members of the bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(20):9238-9242.
[9]Nishida M, Nasu K, Ueda T, et al·Endometriotic cells are resistant to interfero-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis: a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis[J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(1):29-34.
[10]Garcia-Velaso, Arici A·Apoptosis and the pathogenesis of endometriosis[J]. Semin Reprod Med, 2003, 21(2):165-172.
[11]宋影,刘雨生·细胞凋亡和子宫内膜异位症[J].国外医学计划生育/生殖健康分册,2006,25(3):162-164.
[12]刘健,李祥云,胡晓梅·补肾祛瘀法治疗子宫内膜异位症的临床观察[J].中国中西医结合杂志,1998,18(3):45-147.

(收稿日期:2008-02-26;修回日期:2008-07-30)

[编辑:行之]

乳癖散结胶囊治疗乳腺增生症124例

冯庆菁 刘加栋 丁善衡 吴 昆 李永林

(浙江省义乌市妇幼保健院外科,义乌市南门街320号,322000)

为了研究乳癖散结胶囊对乳腺增生症的疗效,我们随机对照观察了乳癖散结胶囊和三苯氧胺(TAM)对乳腺增生症的治疗效果。现总结如下。

1 临床资料

选取表现为乳房疼痛和乳房肿块的乳腺增生症患者248例,均为女性,年龄31~58岁,平均42岁。纳入病例标准:依据临床症状、体征及彩色超声检查,并且均经GE公司数字化乳腺钼靶摄片排除乳腺恶性肿瘤。

2 治疗方法

248例病患者按单双数随机分为2组,治疗组给予乳癖散结胶囊(陕西白鹿制药股份有限公司生产,国药准字Z20010010,0.53g/粒)4粒,每日3次;对照组给予TAM 10mg,每日2次,饭后口服,用药时间均为3个月,所有病例均门诊随访6个月~1年。

3 疗效观察

3.1 疗效标准

按照全国中医外科学会乳腺病专题组制定的疗效标准。临床治愈:肿块和乳痛消失,停药后3个月不复发。显效:肿块最大直径缩小 $\geq 1/2$,乳痛消失。有效:肿块最大直径缩小 $< 1/2$,乳痛减轻;或肿块缩小 $1/2$ 以上,乳痛减轻不明显。无效:肿块及乳痛均无改善。

3.2 两组临床疗效比较

治疗组124例,临床治愈36例,显效60例,有效23例,无效5例,总有效率为95.97%;对照组124例,分别为38例、62例、20例、4例、96.77%。两组疗效比较差异无显著性($P>0.05$)。

3.3 两组药物副反应比较

治疗组月经紊乱12例,经血减少12例,胃部不适13例;对照组月经紊乱82例,头眼昏花19例,经血减少43例,胃部不适50例,白带改变27例。

3.4 停药后症状、体征复发情况

疼痛复发者,治疗组78例,对照组83例,肿块复发者,治疗组79例,对照组72例,经X检验差异无统计学意义($P>0.05$)。

4 讨论

乳癖散结胶囊含夏枯草、川芎、僵蚕、鳖甲、柴胡、赤芍、玫瑰花、莪术、当归、延胡索、牡蛎等,主要药理作用是行气活血,软坚散结,能有效地调节肝脏功能,使其对多余雌激素灭活作用增强。我们前瞻性研究了乳癖散结胶囊和TAM的临床效果,发现2组药物治疗的总有效率分别为95.97%和96.77%,差异无统计学意义。乳癖散结胶囊的治疗机理虽然为中医理论,但对乳腺增生症的有效率(95.97%)高,无论治愈率还是显效率与TAM相比差异均无显著性,亦间接证实了乳癖散结胶囊既符合中医传统理论,又与现代医学理论相一致,可以替代TAM用于治疗乳腺增生症。

(收稿日期:2008-11-26)

[编辑:黄健]