

• 临床研究 •

宫清颗粒对早孕妇女药物流产后绒毛及蜕膜凋亡基因的影响

张丽娟 刘瑞芬

(山东中医药大学附属医院妇科, 山东省济南市文化西路 42 号, 250011)

[摘要] **目的** 探讨宫清颗粒缩短早孕妇女药物流产后出血时间的可能机制。 **方法** 将非意愿妊娠 49 天内要求药物流产的宫内早孕妇女 120 例随机分成治疗组(米非司酮配伍米索前列醇药物流产同时给予宫清颗粒口服)、对照组(药物流产同时给予茜芷胶囊口服)、空白组(单纯药物流产), 每组 40 例;另选 40 例负压吸宫流产做对照(人流组)。检测自然排出绒毛及蜕膜组织中 Bax、Bcl-2 以及 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 的表达。 **结果** Bax、Bcl-2 及 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 在各组绒毛及蜕膜中均有表达。Bax、Bax mRNA 在治疗组、对照组、空白组、人流组绒毛及蜕膜中的表达依次降低, Bcl-2、Bcl-2 mRNA 表达依次升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);并且治疗组对蜕膜凋亡基因的影响尤为明显。 **结论** 宫清颗粒可以增强药物流产后绒毛及蜕膜中 Bax 的表达, 抑制 Bcl-2 的表达, 从而促进绒毛和蜕膜的细胞凋亡, 减少蜕膜残留, 这可能是其缩短药物流产后出血时间的机制之一。

[关键词] 宫清颗粒;药物流产;细胞凋亡;凋亡基因

Effect of Gongqing Granule on Expression of Apoptosis Gene in Chorionic Villi and Decidua after Medical Abortion in Early Pregnancy

ZHANG Lijuan, LIU Ruifen

(The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011)

ABSTRACT **Objective** To investigate the possible mechanism of Gongqing Granule (Granule for Clearing the Uterus) on shortening the duration of vaginal bleeding after medical abortion. **Methods** The 120 unwanted pregnancy women within 49d of intrauterine gestation were randomly divided into three groups. Gongqing Granule combined with mifepristone and misoprostol was administered orally in Group A (treatment group). Qianzhi Capsule combined with mifepristone and misoprostol was administered orally to Group B (control group), and only mifepristone plus misoprostol was administered orally to Group C (blank group). Other 40 women (Group D, induced abortion group), were treated with vacuum aspiration for abortion. Chorionic villi and decidua tissue were collected and expression of Bax and Bcl-2 were detected by immunohistochemical method and Bax mRNA and Bcl-2 mRNA by situ hybridization. **Results** The expression of Bax, Bcl-2, Bax mRNA and Bcl-2 mRNA was found in all groups. The expression of Bax and Bax mRNA in the treatment group was higher than those in the control group, then the blank group, and then induced abortion group. While the expression of Bcl-2 and Bcl-2 mRNA of the treatment group was lower than those in the control group, then the blank group, and then induced abortion group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). And the effect on decidua apoptosis gene was especially significant in the treatment group. **Conclusion** Gongqing Granule can enhance the expression of Bax and decrease the expression of Bcl-2 to promote the apoptosis and reduce the decidua residue. This might be one of the mechanisms of Gongqing Granule in shortening the uterine bleeding after medical abortion.

Key Words Gongqing Granule (Granule for Clearing the Uterus); Medical abortion; Apoptosis; Apoptosis gene

米非司酮配伍米索前列醇是临床常用的药物流产方案,但该方案存在流产后出血量偏多,出血期较长的缺点。对于药物流产后出血的细胞凋亡机制研究显示^[1],服用米非司酮在孕囊排出后,可能有少量绒毛和蜕膜未完全凋亡排出而滞留于宫腔,造成了流产后出血时间延长。宫清颗粒是我们多年来防治药物流产后出血的经验方,我们前期研究已经证实宫清颗粒防治

药物流产后出血有显著临床疗效^[2],组织病理学观察结果表明,宫清颗粒方有促进绒毛细胞凋亡的现象^[3]。本研究进一步从绒毛和蜕膜 Bax、Bcl-2 蛋白表达以及 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 基因表达方面探讨宫清颗粒缩短药物流产后出血时间的可能机制。

1 临床资料

1.1 一般资料

所有病例均来自 2006 年 5 月~2007 年 10 月山东中医药大学附属医院妇科计划生育门诊,共纳入研究对象 120 例。按照随机数字表法,随机分为治疗组、对

照组、空白组各 40 例,并以要求负压吸宫流产的健康早孕妇女(人流组)40 例作对照。其中治疗组平均年龄(25.69 ± 4.57)岁,孕囊最大直径(1.54 ± 0.84)cm,孕次(1.18 ± 1.14)次;对照组平均年龄(26.59 ± 4.87)岁,孕囊最大直径(1.56 ± 0.76)cm,孕次(1.21 ± 1.58)次;空白组平均年龄(27.48 ± 5.27)岁,孕囊最大直径(1.60 ± 0.68)cm,孕次(1.22 ± 1.71)次;人流组平均年龄(26.65 ± 5.61)岁,孕囊最大直径(1.60 ± 0.82)cm,孕次(1.11 ± 1.21)次。4 组间年龄、孕次、孕囊平均内径差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 纳入及排除标准

根据《中华妇产科学》^[4]并参考文献[5]拟定纳入标准:年龄 18~40 岁,身体健康;经尿绒毛膜促性腺激素(HCG)及 B 超确诊为宫内孕;停经 ≤ 49 天,孕囊直径 < 2.5 cm;3 个月内无性激素使用史;无前列腺素使用禁忌;均签署知情同意书。

排除标准:米非司酮和前列腺素禁忌症、异位妊娠或异位妊娠可疑者;血红蛋白 < 100 g/L、急性传染病或其他疾病急性期、妊娠剧吐、电解质紊乱未纠正者;此次妊娠前 1 个月或妊娠后使用过甾体激素避孕者;正在哺乳者;带器妊娠者;过敏体质或长期服用利福平、异烟肼、抗癫痫药、抗抑郁药、西米替丁、前列腺素合成抑制药(阿司匹林、消炎痛等)、巴比妥类药物者。

2 方法

2.1 治疗方法

2.1.1 研究药物 米非司酮 25mg/片(国药准字 H10950202),米索前列醇 200 μ g/片(国药准字 H10960144),购自上海华联制药有限公司。宫清颗粒 8g/包,由益母草 30g、马齿苋 30g、蒲黄 12g、当归 12g、党参 15g 等药物组成(临床研究批件 2003L01386),由浙江爱生药业有限公司生产提供。茜芷胶囊由川牛膝、三七、茜草、白芷等组成,由甘肃兰州药业有限公司生产(国药准字 20010102,批号 020302)。

2.1.2 给药方案 治疗组(药物流产加宫清颗粒):第 1~3 天早晚各服米非司酮 25mg,第 4 天晨一次顿服米索前列醇 600 μ g。药物流产第 1 天同时服宫清颗粒每次 2 包,每日 3 次,连服 7 天停药。对照组(药物流产加茜芷胶囊):药物流产服法同治疗组,药物流产第 1 天同时口服茜芷胶囊每次 5 粒,每日 3 次,连服 7 天停药。空白组:单纯口服药物流产药,服法同治疗组。人流组:常规进行负压吸宫。

2.2 观察指标和方法

2.2.1 标本收集 嘱药物流产对象服用米索前列醇

后在医院观察 6h,清洁纸杯收集其自然排出的绒毛及蜕膜组织,生理盐水漂洗后,立即 10% 甲醛固定,石蜡包埋备用。同法收集负压吸宫所获绒毛及蜕膜组织。由于标本收集过程中出现标本收集不全情况,故结果仅统计实际收集标本数量。

2.2.2 免疫组化和原位杂交检测 采用免疫组化 SP 染色法检测绒毛及蜕膜组织 Bcl-2 和 Bax 的表达,采用原位杂交法检测绒毛及蜕膜组织 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 的表达。Bcl-2 浓缩型试剂盒(批号 BA 0412)、Bax 浓缩型试剂盒(批号 BA 0315)和人 Bcl-2 mRNA 试剂盒(批号 MK 1108h)、人 Bax mRNA 试剂盒(批号 MK 1050h)均购自武汉博士德生物工程有限公司,按说明书操作。阳性反应为黄或棕黄色,高倍镜下规范化选取 8~10 个不同视野,用 Leica DM 4000B 光学显微镜完成图像摄取,Leica QWinV 3 图像分析软件系统进行图像分析,得到灰度值。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,其组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 各组 Bcl-2、Bax 及 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达光镜结果

免疫组化和原位杂交结果显示,各组绒毛及蜕膜细胞均有 Bcl-2、Bax 两种蛋白和 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 基因的表达,其中 Bax 表达部位主要是细胞浆, Bcl-2 表达部位主要是在细胞浆和细胞膜上,阳性反应为黄色或棕黄色。

3.2 各组绒毛、蜕膜 Bcl-2、Bax 及 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达灰度值比较

采用图像分析软件分析显示,蛋白表达强弱与灰度值大小呈负相关,即蛋白表达越强,灰度值越低。表 1、表 2 示,治疗组、对照组、空白组、人流组绒毛和蜕膜 Bax mRNA、Bax 灰度值依次升高,绒毛和蜕膜 Bcl-2 mRNA、Bcl-2 灰度值依次降低,与治疗组比较,其余 3 组各项指标均与其有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与空白组比较,人流组各项指标差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。提示治疗组绒毛和蜕膜中促凋亡基因 Bax 表达较对照组、空白组、人流组明显增强,抑凋亡基因 Bcl-2 表达明显减弱。

另外,通过比较绒毛和蜕膜凋亡基因的表达,我们发现人流组蜕膜组织 Bax、Bcl-2、Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 表达均较绒毛中低($P < 0.05$),推断蜕膜中凋亡基因 Bax 和 Bcl-2 蛋白含量低于绒毛,或者说这两种基因主要表达于绒毛。但治疗组蜕膜中 Bax 表达却较

表 1 各组绒毛凋亡基因平均灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	Bcl-2	Bcl-2 mRNA	Bax	Bax mRNA
治疗组	31	207.78±4.25	208.64±4.24	169.71±9.39	169.22±9.72
对照组	32	182.72±3.49*	184.41±3.40*	175.46±5.10*	176.42±4.94*
空白组	29	173.21±2.28*	174.28±2.28*	183.48±4.83*	184.20±4.86*
人流组	33	167.93±2.77**△	169.04±2.86**△	198.56±7.64**△	199.16±7.96**△

注:与治疗组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组比较,△ $P<0.05$

表 2 各组蜕膜凋亡基因平均灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本数	Bcl-2	Bcl-2 mRNA	Bax	Bax mRNA
治疗组	25	211.45±2.03	212.66±2.25	158.98±5.78	155.98±4.79
对照组	25	188.08±1.11*	188.82±0.91*	187.32±5.64*	187.96±5.70*
空白组	23	175.59±2.30*	176.59±2.23**	192.23±4.54*	192.54±4.95*
人流组	33	172.36±2.13**△	173.50±2.09**△	205.38±4.17**△	205.82±4.19**△

注:与治疗组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$;与空白组比较,△ $P<0.05$

绒毛中明显增强($P<0.05$),由此推断宫清颗粒可以增强药物流产时绒毛和蜕膜中 Bax 的表达,尤其是蜕膜中 Bax 的表达。

3 讨论

Bcl-2、Bax 同属于 Bcl-2 基因家族,Bcl-2 是凋亡抑制基因,Bax 是重要的促凋亡基因。有研究证实,正常早孕绒毛及蜕膜组织中即有 Bax、Bcl-2 基因的表达^[6]。对药物流产中细胞凋亡发生机制的研究发现^[7],药物流产组蜕膜及绒毛抑凋亡基因 Bcl-2 与促凋亡基因 Bax 的比值显著低于人流组,可能系米非司酮诱导蜕膜与绒毛组织 Bcl-2/Bax 基因比率下降,引起细胞凋亡所致。宋淑芳等^[8]也从组织形态学上观察到米非司酮作用后绒毛细胞凋亡改变重于蜕膜。由此我们推断,因蜕膜中凋亡基因特别是促凋亡基因表达少,故药物流产时蜕膜不能完全凋亡,可能是蜕膜组织排出缓慢和不全流产的原因之一。临床上也发现药物流产后出血患者多以蜕膜残留为主^[9]。所以,我们提出促使蜕膜完全凋亡排出是防治药物流产后出血、提高药物流产成功率的重点。

宫清颗粒是我们多年来防治药物流产后出血的经验方,其组方针对产后“多虚多瘀”的基本病机,兼顾“未病先防,既病防变”的思想,具有活血祛瘀,养血益气,清热止血的功能。我们前期研究发现,宫清方有促进绒毛细胞凋亡的现象^[3]。

本研究中发现,治疗组绒毛和蜕膜 Bcl-2 蛋白、Bcl-2 mRNA 表达较对照组、空白组以及人流组明显减弱,而绒毛和蜕膜 Bax 蛋白、Bax-mRNA 表达较对照组、空白组以及人流组明显增强。由此我们可以推断,宫清颗粒可以通过增强绒毛和蜕膜促凋亡基因 Bax 的表达和抑制抑凋亡基因 Bcl-2 的表达,提高了 Bax/Bcl-2 比值,从而提高绒毛及蜕膜细胞凋亡率,达

到减少药物流产后阴道出血时间的目的。我们在研究中特别发现,与绒毛比较,宫清颗粒对蜕膜组织中 Bax 基因表达的增强作用尤为明显,通过提高蜕膜组织中 Bax/Bcl-2 比值,促进蜕膜完全凋亡排出,弥补单纯口服米非司酮蜕膜不能完全凋亡的不足,减少药物流产后出血的发生。

参考文献

[1]Anjum R,Khar A. Differential regulation of apoptosis in AK-5 tumor cells by the proto-oncogene Bcl-2: presence of Bcl-2 dependent and independent pathways [J]. FEBS Lett, 2001,499(1-2):166-170.

[2]王洪萍,刘瑞芬,王险峰,等. 宫清颗粒治疗药物流产后阴道出血 150 例临床观察[J]. 中国计划生育学杂志,2005,13(6):365-367.

[3]刘文琼,刘瑞芬,王玉玲. 宫清方防治药物流产后阴道出血及对绒毛超微结构变化的影响[J]. 福建中医药,2003,34(1):12-13.

[4]曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999:2588-2589.

[5]桑国卫,贺昌海,邵庆翔,等. 米非司酮配伍前列腺素终止早孕 17523 例的大规模引入性研究[J]. 中国临床药理学杂志,1999,15(5):323-329.

[6]Lea RG,Riley SC. Placental apoptosis and pregnancy failure [J]. J Reprod Fert, 1997,20(3):4.

[7]丁峰. 米非司酮对人早孕期蜕膜细胞凋亡及其调控基因 Bcl-2/Bax 的影响[J]. 现代妇产科进展,2002,11(1):36-38.

[8]宋淑芳,宋静慧,李国慧. 米非司酮对早孕绒毛蜕膜组织细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国误诊学杂志,2005,5(7):1236-1237.

[9]邱晓燕,李大金,周先荣,等. 米非司酮抗早孕宫腔组织的病理学研究[J]. 中华妇产科杂志,1999,34(5):272-274.