

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.01.016

# 益坤抑痛平颗粒对子宫腺肌病模型小鼠子宫内膜神经生长因子及其受体表达的影响

杨舫, 王清\*

(中日友好医院, 北京市朝阳区樱花东路 2 号, 100029)

**摘要** 目的 探讨益坤抑痛平颗粒缓解子宫腺肌病患者痛经的可能作用机制。方法 30 只 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组和中药组, 每组 10 只。模型组和中药组以口服枸橼酸他莫昔芬片法建立小鼠子宫腺肌病模型。造模成功后空白组和模型组以生理盐水  $10 \mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{d})$  灌胃, 中药组以益坤抑痛平颗粒混悬液  $15 \mu\text{l}/(\text{g} \cdot \text{d})$  灌胃, 均给药 8 周。肉眼观察各组小鼠子宫形态并称重子宫重量, 检测各组小鼠子宫内膜中神经生长因子 (NGF) 及其受体 P75 的表达。结果 空白组小鼠子宫表面光滑, 子宫表面未见异常结节; 模型组和中药组小鼠子宫表面可见腺肌病结节。中药组和模型组小鼠子宫重量均重于空白组 ( $P < 0.05$ ); 而中药组与模型组小鼠子宫重量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。各组小鼠 NGF 蛋白表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。模型组小鼠子宫内膜中 P75 表达高于空白组, 而中药组小鼠子宫内膜中 P75 表达较模型组降低 ( $P < 0.05$ )。结论 益坤抑痛平颗粒可能通过降低子宫内膜中 NGF 受体 P75 的表达来达到缓解子宫腺肌病痛经的目的。

**关键词** 子宫腺肌病; 痛经; 子宫内膜; 益坤抑痛平颗粒; 神经生长因子

子宫腺肌病 (adenomyosis, AM) 是指子宫内膜腺体和间质存在于子宫肌层中, 伴随周围肌层细胞的代偿性增生和肥大<sup>[1]</sup>。痛经是子宫腺肌病常见的临床表现之一, 给患者带来了极大的痛苦, 严重影响了患者的日常生活和工作。近年来神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 及受体与子宫腺肌病的关系受到国内外学者的重视, 其在子宫腺肌病痛经患者的在位内膜及异位内膜中有极高的表达<sup>[2-3]</sup>。益坤抑痛平是许润三教授治疗肾虚血瘀型子宫腺肌病的经验处方, 临床研究证实其止痛效果确切<sup>[4]</sup>。本研究以 NGF 及其受体为切入点, 观察益坤抑痛平颗粒对子宫腺肌病模型小鼠病灶组织 NGF 及其受体 P75 表达的影响, 探讨益坤抑痛平颗粒缓解子宫腺肌病患者痛经的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

出生 2 日的雌性 ICR 小鼠 30 只, 清洁级, 体重  $1.8 \sim 2.4 \text{g}$ , 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK(京) 2012 -

0001, 饲养温度  $18 \sim 24^\circ\text{C}$ , 明暗周期 12h, 2 ~ 21 天均由母鼠哺乳饲养, 22 日龄起与母鼠分笼, 自由摄食饮水。

### 1.2 实验药物

益坤抑痛平颗粒, 组成: 黄芪 30 g, 何首乌 20 g, 急性子 10 g, 三七粉 3 g, 水蛭 10 g, 泽兰 10 g, 黄柏 10 g。中药颗粒与生理盐水按 1 : 5 配成悬浊液, 制备成  $0.2 \text{g}/\text{ml}$  药液。枸橼酸他莫昔芬片 ( $10 \text{mg}/\text{片}$ , 国药准字: H31021545), 上海复旦复华药业有限公司。

### 1.3 主要试剂与仪器

RIPA 裂解液 (批号: WB-0071), 北京鼎国昌盛生物技术责任有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, Geneview 公司; 蛋白酶抑制剂 (批号: 4693159001), Roche 公司; Actin 抗体 (批号: Ab156302)、P75 抗体 (批号: Ab52987)、NGF 抗体 (批号: Ab68151), 均为 Abcam 公司产品。0.45  $\mu\text{m}$  PVDF 膜, Millipore 公司; 蛋白垂直电泳仪 (Mini Protean Tetra Cell 型), Bio-Rad 公司; 凝胶成像分析系统 (Molecular Imager ChemiDoc XRS + Imaging System), Bio-Rad 公司; 台式微量天平

\* 通讯作者: clean0551@sina.com, (010) 84205645

(CPA225Da 型), Sartorius 公司; Western Blot 半干转印仪 (Trans-blot SD 型), Bio-Rad 公司。

#### 1.4 造模方法

参照文献 [6] 方法, 小鼠出生后第 2~5 天 (出生日为第 1 天) 滴喂 5  $\mu$ l/g 花生油/卵磷脂/炼乳混合液 (体积比为 2 : 0.2 : 3), 并加入 2.7  $\mu$ mol/kg 枸橼酸他莫昔芬片。12 周后小鼠子宫呈暗红色、充血、增粗、局部膨大, 子宫表面可见少量腺肌病结节。HE 染色显示子宫内膜层结构紊乱, 与子宫肌层无明显分界线, 子宫肌层可见腺体细胞及间质细胞, 病灶周围血管丰富, 证明造模成功。

#### 1.5 分组及给药

将 30 只小鼠通过随机区组设计产生随机序列分为空白组、模型组和中药组, 每组 10 只。模型组和中药组进行造模。造模成功的模型组和空白组小鼠以生理盐水 10  $\mu$ l/(g · d) 灌胃, 中药组给予益坤抑痛平颗粒混悬液 15  $\mu$ l/(g · d)。各组均灌胃 8 周。

#### 1.6 观察指标及方法

1.6.1 大体标本及子宫重量 小鼠引颈处死, 逐层打开腹腔, 观察各组小鼠子宫形态变化, 摘取小鼠子宫, 肉眼观察各组小鼠子宫的大体形态及病变情况, 采用台式微量天平记录小鼠子宫重量。

1.6.2 子宫内膜 NGF 及 P75 蛋白含量 采用 Western Blot 法检测。1) 子宫总蛋白的提取: 每 20 mg 子宫组织加入 200  $\mu$ l RIPA (临用前加入 20  $\mu$ l PMSF), 待组织融化后将组织转移到 EP 管中, 离心取上清, 进行蛋白定量。2) 总蛋白定量: 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作, 测定各孔 OD<sub>570nm</sub> 值计算样品浓度。3) Western Blot 鉴定: 取出 PVDF 膜, 蒸馏水漂洗并转移至 5% 脱脂奶封闭液中, 4℃ 条件下封闭过夜。弃去封闭液, 加入以封闭液 1 : 5000 稀释的兔抗 NGF、P75 抗体, 37℃ 作用 1 h。弃去一抗反应液, PBST 洗膜 3 次, 5 min/次, 加入以封闭液 1 : 10000 稀释的羊抗兔 IgG 二抗, 37℃ 作用 1 h。弃去二抗反应液, 用上述方法洗膜 5 次。将 PVDF 膜放入平皿, 加 HRP 底物 4 ml 室温孵育 1 min, 用凝胶成像分析系统扫描荧光显色, 计算灰度值。

#### 1.7 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计处理, 计量数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 若数据呈正态分布且方差齐, 采用单因素方差分析; 若呈非正态分布或方差不齐, 则采用秩和检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

灌胃期间小鼠死亡 2 只, 其中空白组 1 只, 中药组 1 只。模型组因验证造模处死 2 只小鼠。最后纳入统计模型组 8 只, 空白组 9 只, 中药组 9 只。

#### 2.1 各组小鼠子宫大体标本肉眼观察结果

空白组小鼠子宫呈淡红色, 表面光滑, 较细, 粗细均匀, 子宫表面未见异常结节; 模型组和中药组小鼠子宫均呈暗红色, 充血, 增粗, 局部膨大, 子宫表面可见腺肌病结节; 中药组与模型组小鼠相比, 子宫大小及子宫表面腺肌病结节无明显差异。

#### 2.2 各组小鼠子宫重量比较

表 1 示, 中药组和模型组小鼠子宫重量均重于空白组 ( $P < 0.05$ ); 而中药组与模型组小鼠子宫重量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组小鼠子宫重量比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | 子宫重量             |
|-----|----|------------------|
| 空白组 | 9  | 0.11 $\pm$ 0.05  |
| 模型组 | 8  | 0.19 $\pm$ 0.05* |
| 中药组 | 9  | 0.18 $\pm$ 0.04* |

注: 与空白组比较, \*  $P < 0.05$

#### 2.3 各组小鼠子宫内膜 NGF、P75 蛋白表达比较

表 2 示, 各组小鼠 NGF 蛋白表达差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。模型组小鼠子宫内膜中 P75 表达高于空白组, 而中药组小鼠子宫内膜中 P75 表达较模型组降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 2 各组小鼠子宫内膜中 NGF、P75 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 鼠数 | NGF 灰度值         | P75 灰度值                     |
|-----|----|-----------------|-----------------------------|
| 空白组 | 9  | 0.10 $\pm$ 0.04 | 0.23 $\pm$ 0.61             |
| 模型组 | 8  | 0.14 $\pm$ 0.08 | 1.02 $\pm$ 0.32*            |
| 中药组 | 9  | 0.05 $\pm$ 0.04 | 0.21 $\pm$ 0.18 $^{\Delta}$ |

注: NGF, 神经生长因子; 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较,  $\Delta P < 0.05$

## 3 讨论

缓解痛经是治疗子宫腺肌病治疗中最为关注的问题之一。许润三教授认为, “肾虚血瘀” 为子宫腺肌病主要病因病机, 结合张仲景对血瘀证善用虫类和利水活血药物来达到活血止痛的目的, 并经过多年临床实践, 精简处方, 创制益坤抑痛平方药。方中既有活血、破瘀、止痛之水蛭、三七及急性子, 又有活血利水的泽兰; 何首乌、黄芪补肾养阴血, 意在避免该病长期服用破血化瘀药物损伤气血的弊病; 同时选用入下焦的黄柏, 其药理机制中有消炎的功用, 可改善子宫腺肌病患者病变局部炎症

变化<sup>[4]</sup>。

NGF 是一种具有神经元营养和促神经突起生长双重生物学功能的神经细胞生长调节因子, 对中枢及周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用<sup>[5]</sup>。NGF 有两个受体, 分别是高亲和力的酪氨酸激酶受体和低亲和力受体的 P75 神经生长因子受体<sup>[6]</sup>。有研究表明, NGF 及其受体可能参与了子宫内膜异位症的发生和发展<sup>[7]</sup>; 另有研究显示, 在疼痛方面, 子宫内膜异位症患者在内膜仅 P75 的表达显著高于无疼痛患者<sup>[8]</sup>, 重度痛经患者子宫内膜表达 P75 较无痛经症状患者及对照组高<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, 在子宫腺肌病小鼠的子宫内膜中未见到 NGF 的高表达, 而 P75 有高表达。经过益坤抑痛平颗粒治疗后, 子宫内膜中 NGF 表达降低, 表明益坤抑痛平颗粒可能通过降低 NGF 受体 P75 的表达来达到缓解子宫腺肌病痛经的作用。本研究中益坤抑痛平颗粒在改善子宫重量和形态方面未显示出明显疗效, 可能与研究样本量少, 且未对其血清、神经节等方面进行检测有关, 有待进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] 丰有吉, 沈铿. 妇产科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 377.
- [2] BARCENA DE ARELLANO ML, ARNOLD J, LANG H,

et al. Evidence of neurotrophic events due to peritoneal endometriotic lesions [J]. Cytokine, 2013, 62 (2): 253-261.

- [3] 王文莉, 段华, 张颖, 等. 子宫腺肌病 PGP 9.5、NGF 的表达及其与痛经关系 [J]. 首都医科大学学报, 2012, 33 (1): 11-15.
- [4] 王清, 赵红, 杨舫, 等. “益坤内异丸”治疗子宫内异位症、子宫腺肌病痛经(血瘀肾虚型)的临床观察 [J]. 中日友好医院学报, 2009, 23 (4): 223-225.
- [5] 李雁, 张绍芬. 口服他莫昔芬法建立 ICR 小鼠子宫腺肌病模型的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17 (5): 346-350.
- [6] ZETTERBERG M, SJOLANDER A, VON OTTER M, et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1) S18Y polymorphism in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2010, 5: 11. doi: 10.1186/1750-1326-5-11.
- [7] HALVORSON KG, KUBOTA K, SEVCIK MA, et al. A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone [J]. Cancer Res, 2005, 65 (20): 9426-9435.
- [8] 全进毅. 子宫内膜异位症在位和异位内膜神经生长因子及其受体 TrkA、P75 的表达和患者疼痛的关系 [J]. 杭州: 浙江大学, 2011: 1-3.
- [9] 李晓燕. 子宫内膜异位症疼痛与神经生长因子及其受体关系的研究 [J]. 北京: 北京协和医学院, 2009: 27.

#### Impact of *Yikun Yitongping Keli* (益坤抑痛平颗粒) on Endometrium Nerve Growth Factor and Receptor Expression in Adenomyosis Model Mice

YANG Fang, WANG Qing

(China-Japan Friendship Hospital, Beijing, 100029)

**ABSTRACT Objective** To explore the possible mechanism of *Yikun Yitongping Keli* (益坤抑痛平颗粒) in relieving adenomyosis (AM) patients' dysmenorrheal. **Methods** Thirty Institute of Cancer Research (ICR) mice were randomized into blank group, model group and herb group, 10 mice in each group. Mice in the model group and the herb group were made AM models by oral tamoxifen citrate tablet method. After successful modeling, the blank group and the model group were given normal saline 10  $\mu$ l/(g  $\cdot$  d) by gavage. The herb group was given *Yikun Yitongping Keli* suspension 15  $\mu$ l/(g  $\cdot$  d) by gavage. All groups were treated for 8 weeks. Uterine morphology of mice in each group was observed by naked eye. Uterus weight was weighted. The nerve growth factor (NGF) in endometrium and the receptor P75 expression of mice in each group were detected. **Results** The uterus surface of mice in the blank group was smooth; no abnormal nodules were found on the surface of the uterus. Adenomyosis nodules could be seen on the surface of the uterus of mice in the model group and the herb group. Uterus weight of mice in the herb group and the model group were higher than that in the blank group ( $P < 0.05$ ). The deficiency of uterus weight of mice in the herb group and the model group was not significant ( $P > 0.05$ ). The deficiency of NGF protein expression of mice in each group was not significant ( $P > 0.05$ ). P75 expression in endometrium of mice in the model group was higher than that in the blank group while P75 expression in endometrium of mice in the herb group was lower than that in the blank group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Yikun Yitongping Keli* might relieve AM-related dysmenorrheal by reducing the expression of NGF receptor P75 in endometrium.

**Keywords** adenomyosis; dysmenorrheal; endometrium; *Yikun Yitongping Keli*; nerve growth factor

(收稿日期: 2017-05-05; 修回日期: 2017-08-14)

编辑: 邓 媛