

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2015.11.018

活血方对月经出血模型小鼠子宫内膜 NF- κ B 通路 与金属基质蛋白酶的影响

陈进成¹, 李春香^{1,2*}, 丁芳³, 吴贝贝¹

(1. 河北医科大学研究生院, 河北省石家庄市中山东路 361 号, 050017; 2. 河北中医学院; 3. 河北医科大学第三医院)

摘要 目的 探讨活血方对子宫内膜崩解的影响及可能作用机制。方法 将 130 只 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为假手术组 10 只、模型组 60 只、中药组 60 只。模型组与中药组均采用激素序贯处理复制小鼠月经出血模型, 并对左侧宫腔诱导蜕膜化。从造模第 9 天中药组灌胃活血方 20 g/(kg·d), 假手术组与模型组给予等量的生理盐水。在孕酮撤退后 0、8、12、16、24、32 h 分别于两组中选取一定只数小鼠进行阴道涂片检测, 观察小鼠子宫内膜崩解脱落情况, HE 染色观察双侧子宫角的病理变化并计算子宫系数, 免疫组织化学法检测子宫组织 MMP3、MMP9、P50、P65 表达, Real-time PCR 检测左侧子宫组织 MMP3 mRNA、MMP9 mRNA 的表达, Western blot 方法检测左侧子宫组织 MMP3、MMP9 蛋白表达与 P50、P65 核蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠子宫左侧有明显病理改变, 从 12 h 出血小鼠比率增加, 左侧子宫系数明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组的出血时程明显缩短, 在 0、8、12 h 左侧子宫系数增加、32 h 降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 中药组左侧子宫组织 MMP3 mRNA、MMP9 mRNA 0~32 h 表达均明显上调 ($P < 0.05$); MMP3 及 MMP9 蛋白在 0~12 h 显著升高, 32 h 显著下调 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组小鼠左侧子宫组织 P50 核蛋白在 0、12 h 显著上调, 在 8、16、24、32 h 显著下调 ($P < 0.05$); P65 核蛋白在 0、12、24 h 显著上调, 在 32 h 显著下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 活血方可缩短子宫内膜崩解时程, 其机制可能与调节崩解相关因子 MMP3、MMP9 的表达及 NF- κ B 信号通路的快速激活与及时关闭相关。

关键词 子宫内膜; 活血方; 崩解因子; NF- κ B 信号通路; 金属基质蛋白酶

在下丘脑-垂体-卵巢轴神经内分泌系统的调节下, 子宫内膜在卵巢分泌的甾体性激素作用下发生周期性的剥脱和出血, 病理状态下则会引发包括月经过多、月经过少、闭经甚至不孕等月经类疾病, 可见子宫内膜的崩解这一环节对女性的生理生殖影响颇大^[1]。研究发现, 月经发生的机制有血管收缩假说和炎症假说^[2], 且两种假说的最终环节均为金属基质蛋白酶 (MMPs) 系统降解间质的细胞外基质导致组织的崩解脱落, 核转录因子- κ B (NF- κ B) 则能够调控 MMP3 和 MMP9 的表达^[3]。中医学认为妇人以血为主, 以气为用, 气调血畅, 下养胞宫, 血海充盛, 血满而溢出现月经。行经期血海满盈, 应以“通”为主来“祛瘀生新”, 故“活血调经”在临床应用颇多^[4]。本研究复制小鼠

生理性孕酮撤退的月经出血模型^[5-6], 探讨活血方促进子宫内膜崩解的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雌性未孕 C57BL/6J 小鼠 130 只, 8~10 周龄, 体重 18~20 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2009-0004。

1.2 药物与试剂

活血方由当归 15 g、香附 12 g、生蒲黄 15 g、五灵脂 15 g、川芎 12 g、益母草 15 g、泽兰 15 g 组成, 购于石家庄乐仁堂, 水煎煮, 过滤浓缩至含生药量为 1.0 g/ml 药液。 β -雌二醇 (E_2), 德国 Alfa Aesar 公司, 批号 10152011, 孕酮 (P), 美国 Sigma 公司, 批号 P8783。MMP3 抗体 (批号: 130617W)、MMP9 抗体 (批号: 140508)、 β -actin (批号: 140103w)、Lamin B (批号: 14020910)

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划 (11276103D-38)

* 通讯作者: zzyjsh@163.com, 13582128125

均购自北京博奥森生物科技有限公司。核蛋白提取试剂盒 (批号: 140128), Thermo Scientific 公司; P65 抗体 (批号: ab7970), 美国 Abcam 公司; P50 抗体 (批号: 130902W), 北京博奥森生物科技有限公司; 二抗 (辣根酶标记山羊抗兔 IgG, 批号: 106484), 北京中杉金桥生物技术有限公司; Trizol (批号: 1382737), Invitrogen 公司; M-MLV 反转录试剂盒 (批号: 8214088), Invitrogen 公司; SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 (批号: A6001), Promega 公司。

1.3 主要仪器

DYY-II 型电泳仪 (北京六一仪器厂), ND2000 紫外分光光度计 (美国 Thermo 公司), BX53 显微镜 (Olympus 公司), ABI7300 型荧光定量 PCR 系统 (美国 ABI 公司), UVP 凝胶扫描仪 (美国 UVP 公司), E4500 微距摄像机 (日本 Nikon 公司)。

1.4 动物分组与处理方法

采用随机数字表法将 130 只 C57BL/6J 雌性小鼠分为假手术组 10 只、模型组 60 只、中药组 60 只。除假手术组外, 模型组与中药组小鼠参照文献 [5-6] 建立小鼠月经出血模型, 小鼠行双侧卵巢切除术, 恢复 1 周后, 进行激素序贯处理: 第 1~3 天皮下注射 100 ng/d E_2 ; 第 4~6 天无处理; 第 7 天将参照文献 [5, 7] 自制的孕酮管皮下埋植于小鼠颈背部皮肤松弛处, 同时皮下注射 P 50 ng/d 和 E_2 5 ng/d; 第 8~9 天皮下注射 5 ng/d E_2 ; 第 9 天, 小鼠麻醉下开腹于左侧宫腔注射 20 μ l 过滤除菌的花生油 (山东鲁花集团), 用以诱导蜕膜化, 右侧做自身对照。假手术组仅开腹关腹, 但不切除卵巢。从造模第 9 天开始, 中药组灌胃活血方, 每天 1 次, 每次 0.02 ml/g, 假手术组与模型组给予等量的生理盐水。于 48 h 后将小鼠背部的孕酮管取出, 以此时间为 0 h, 并分别在 0、8、12、16、24、32 h 处死小鼠, 分别收集双侧子宫角、称重, 部分子宫组织固定于 4% 中性多聚甲醛溶液, 部分组织液氮急冻后 -80°C 保存。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 阴道细胞学涂片检测子宫内膜崩解脱落情况 模型组、中药组小鼠分别于 0、8、12、16、24、32 h 6 个时间点处死前进行细胞学涂片监测出血, 假手术组分别在 12、24 h 各 5 只小鼠进行细胞学涂片作为对照。涂片用瑞氏染色液染色后镜检。

1.5.2 子宫角形态学观察和子宫系数 采用微距

摄像机分别观察小鼠双侧子宫角大体形态。称取子宫角湿重, 子宫角湿重与小鼠体重的比值为子宫系数。4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 观察病理变化。

1.5.3 免疫组织化学方法检测子宫组织 MMP3、MMP9、P50、P65 表达 石蜡切片常规脱蜡复水, 抗原修复, 一抗 (1: 200) 4°C 过夜, 二抗室温孵育 20 min, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树胶封片。黄色或棕褐色为阳性反应, 每个切片测 5 个视野。

1.5.4 Real-time PCR 检测左侧子宫组织 MMP3 mRNA、MMP9 mRNA Trizol 法提取总 RNA, 引物由 Invitrogen 公司合成, MMP3: 上游引物: 5'-CT-CACCTTTGACGATGATGAACG-3'; 下游引物: 5'-GAGCAGCAACCAGGAATAGG-3'。MMP9: 上游引物: 5'-CAGTATCTGTATGGTCGTGGCT-3'; 下游引物: 5'-TTCAGTTGTGGTGGTGGCT-3'。内参基因 GAPDH: 上游引物: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'; 下游引物: 5'-GCTTCACCACCTTCTTGATGTC-3'。按 M-MLV 反转录试剂盒说明书进行反转录, 将模板 cDNA 1 μ l、SYBR Greenq PCR Master Mix 5 μ l、上下游引物各 1 μ l。反应条件为 95°C 预变性 5 min, 变性 30 s, 60°C 30 s, 40 个循环, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达水平。

1.5.5 Western blot 方法检测子宫组织 MMP3、MMP9、P65、P50 蛋白表达 裂解子宫组织, 提取蛋白用于 MMP3 与 MMP9 检测, 按核蛋白提取试剂盒说明书提取与核蛋白用于 P65 与 P50 检测, 考马斯亮蓝法测定蛋白浓度, 取 30~50 μ g 蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 转膜, 一抗 (1: 200) 4°C 孵育过夜, 二抗 (1: 10000) 室温下孵育 1 h, ECL 发光检测, 进行凝胶图像分析, 以目的蛋白/ β -actin 或 Lamin B 的灰度比值表示目的蛋白的相对含量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 进行正态性及方差齐性检验。组内比较采用 t 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间点子宫内膜崩解脱落情况比较

因手术意外死亡等因素, 最终模型组 48 只、

中药组 46 只小鼠进行阴道细胞学涂片观察子宫内膜崩解脱落情况。表 1 示, 模型组从 12 h 出血小鼠的比率增加, 24 h 达 87.5%, 32 h 为 88.9%, 表明子宫内膜的崩解脱落时间可达 10 h 以上。中药组 16、24 h 出血小鼠百分比到达 87.5%、77.8%, 32 h 明显下降 (25.0%), 与模型组比较子宫内膜崩解的速度明显增加, 时程明显缩短。

表 1 各组小鼠不同时间点子宫内膜崩解脱落情况比较 (出现红细胞小鼠数/小鼠总数, 只)

组别	0 h	8 h	12 h	16 h	24 h	32 h
假手术组	—	—	0/5	—	0/5	—
模型组	0/8	0/7	2/8	4/8	7/8	8/9
中药组	2/8	2/6	4/7	7/8	7/9	2/8

2.2 各组小鼠不同时间点双侧子宫系数比较

表 2 示, 与同侧同时间点假手术组比较, 模型组 12、24 h 左侧子宫系数显著增加 ($P < 0.05$), 右侧子宫系数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在各个时间点, 模型组与中药组左侧子宫系数均显著高于右侧 ($P < 0.05$); 与模型组左侧比较, 中药组左侧子宫系数在 0、8、12 h 显著增加 ($P < 0.05$), 在 32 h 则显著减小 ($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠不同时间点子宫组织形态学变化比较

假手术组与模型组、中药组右侧子宫角在整个过程中上皮完整, 功能层细胞排列紧密, 基底层间质细胞无明显变化, 说明未出现蜕膜化样改变。模型组左侧 0 h 子宫腔由于间质细胞蜕膜化内膜增厚使宫腔狭窄, 细胞肥大, 胞浆红染; 8 h 则近宫腔处间质蜕膜细胞体积缩小, 胞质致密、嗜酸性染色增强, 核固缩, 染色质致密; 12 h 到 16 h, 间质中有白细胞浸润, 蜕膜化间质坏死并伴有出血; 24 h 到 32 h, 左侧子宫角充血的颜色现暗紫色, 脱落的间质细胞呈坏死变化, 较多白细胞浸润, 大量的坏死组织涌现, 子宫内膜崩解脱落。中药组左侧的子宫组织变化趋势与模型组相似, 但在时间点的变化上与模型组有明显差异, 0 h 的变化与模型组的 8 h

相似, 且胞浆大量红染, 12 h 的出血量最多, 16 h 崩解的内膜与基底层界限清晰, 32 h 则呈现腔上皮有乳头状增生, 内膜层有明显的修复变化。

2.4 各组小鼠不同时间点子宫组织 MMP3、MMP9、P50、P65 表达比较

免疫组织化学法检测显示: 假手术组小鼠子宫角功能层未见 MMP3、MMP9、P50、P65 的阳性表达, 模型组与中药组右侧功能层未见阳性表达, 提示子宫内膜未发生蜕膜化。MMP3 与 MMP9 在左侧蜕膜化的区域均匀表达, 随时间延长, 蜕膜化与腔上皮整体有表达, 24 h 中间坏死区域有较强的表达, 且模型组在 16 h、中药组在 12 h 表达最强。P50 与 P65 在细胞中的定位反映了 NF- κ B 信号通路的激活状态, 模型组左侧在孕酮撤退的 0 h, P50 与 P65 均定位在蜕膜化区域间质细胞的细胞浆内, 到 16 h 二者则定位在细胞核内, 说明在 0 h, NF- κ B 的信号通路处于未激活状态, 16 h 即被激活; 中药组左侧 0 h P50 与 P65 在蜕膜化区域间质细胞的细胞核内即有表达, 8 h 又定位在细胞浆, 12 h 细胞核表达较强, 24 h 则仅在细胞浆内表达, 说明 NF- κ B 的信号通路开始被激活, 随后缓冲, 后又处于较强的激活状态, 最后及时关闭。

2.5 各组小鼠不同时间点左侧子宫组织 MMP3 mRNA 与 MMP9 mRNA 表达比较

表 3 示, 模型组 MMP3 mRNA 与 MMP9 mRNA 8~32 h 表达量均显著高于本组 0 h ($P < 0.05$); 与模型组同时间点比较, 中药组 0~32 h MMP3 mRNA 与 MMP9 mRNA 的表达量均显著上调 ($P < 0.05$)。

2.6 各组小鼠不同时间点左侧子宫组织 MMP3、MMP9、P50、P65 蛋白表达比较

表 4 示, 模型组 MMP3、MMP9 蛋白表达在 8~16 h 均显著高于本组 0 h ($P < 0.05$); 与模型组同时间比较, 中药组 MMP3 蛋白和 MMP9 蛋白表达在 0~12 h 均显著提高 ($P < 0.05$), 32 h 的表达量则明显下降 ($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠不同时间点双侧子宫系数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	部位	0 h	8 h	12 h	16 h	24 h	32 h
假手术组	左侧	—	—	0.135 $\pm$ 0.066 (5)	—	0.141 $\pm$ 0.075 (5)	—
	右侧	—	—	0.139 $\pm$ 0.071 (5)	—	0.135 $\pm$ 0.080 (5)	—
模型组	左侧	0.362 $\pm$ 0.085 Δ (8)	0.334 $\pm$ 0.071 Δ (7)	0.422 $\pm$ 0.092 Δ (8)	0.484 $\pm$ 0.095 Δ (8)	0.442 $\pm$ 0.063 Δ (8)	0.364 $\pm$ 0.055 Δ (9)
	右侧	0.137 $\pm$ 0.087 (8)	0.139 $\pm$ 0.082 (7)	0.138 $\pm$ 0.083 (8)	0.136 $\pm$ 0.079 (8)	0.138 $\pm$ 0.082 (8)	0.138 $\pm$ 0.071 (9)
中药组	左侧	0.507 $\pm$ 0.073 Δ (8)	0.419 $\pm$ 0.048 Δ (6)	0.621 $\pm$ 0.098 Δ (7)	0.452 $\pm$ 0.081 Δ (8)	0.394 $\pm$ 0.096 Δ (9)	0.292 $\pm$ 0.064 Δ (8)
	右侧	0.138 $\pm$ 0.069 (8)	0.140 $\pm$ 0.067 (6)	0.143 $\pm$ 0.090 (7)	0.140 $\pm$ 0.078 (8)	0.141 $\pm$ 0.072 (9)	0.139 $\pm$ 0.085 (8)

注: 与假手术组同侧同时间比较, * $P < 0.05$; 与本组右侧同时间比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型组左侧同时间比较, $\Delta P < 0.05$; () 内为鼠数

表 3 MMP3 mRNA、MMP9 mRNA 在各组小鼠不同时间左侧子宫组织表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	0 h	8 h	12 h	16 h	24 h	32 h
MMP3 mRNA	模型组	0.691 ± 0.15 (8)	0.832 ± 0.23* (7)	0.869 ± 0.21* (8)	1.199 ± 0.18* (8)	0.998 ± 0.16* (8)	1.016 ± 0.24* (9)
	中药组	1.498 ± 0.14 [△] (8)	2.467 ± 0.11 [△] (6)	3.012 ± 0.09 [△] (7)	1.908 ± 0.12 [△] (8)	1.234 ± 0.14 [△] (9)	1.934 ± 0.16 [△] (8)
MMP9 mRNA	模型组	0.664 ± 0.18 (8)	1.115 ± 0.20* (7)	1.093 ± 0.24* (8)	1.857 ± 0.23* (8)	1.690 ± 0.19* (8)	0.961 ± 0.22* (9)
	中药组	1.066 ± 0.17 [△] (8)	2.600 ± 0.19 [△] (6)	3.721 ± 0.24 [△] (7)	2.901 ± 0.22 [△] (8)	1.187 ± 0.25 [△] (9)	1.858 ± 0.28 [△] (8)

注:与本组 0 h 比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$; () 内为鼠数

表 4 MMP3 及 MMP9 蛋白在各组小鼠不同时间左侧子宫组织表达比较 (β -actin, $\bar{x} \pm s$)

指标	组别	0 h	8 h	12 h	16 h	24 h	32 h
MMP3 蛋白	模型组	0.230 ± 0.09 (8)	0.553 ± 0.20* (7)	0.568 ± 0.21* (8)	0.588 ± 0.21* (8)	0.258 ± 0.10 (8)	0.135 ± 0.04 (9)
	中药组	0.293 ± 0.08 [△] (8)	0.677 ± 0.12 [△] (6)	0.790 ± 0.22 [△] (7)	0.527 ± 0.18 (8)	0.049 ± 0.02 [△] (9)	0.059 ± 0.02 [△] (8)
MMP9 蛋白	模型组	0.012 ± 0.01 (8)	0.161 ± 0.06* (7)	0.408 ± 0.12* (8)	0.834 ± 0.21* (8)	0.363 ± 0.11* (8)	0.243 ± 0.09* (9)
	中药组	0.352 ± 0.12 [△] (8)	0.697 ± 0.19 [△] (6)	0.886 ± 0.20 [△] (7)	0.838 ± 0.22 (8)	0.310 ± 0.10 (9)	0.049 ± 0.02 [△] (8)

注:与模型组 0 h 比较, * $P < 0.05$; 与同时间模型组比较, $\Delta P < 0.05$; () 内为鼠数

表 5 各组小鼠左侧子宫组织不同时间 P50、P65 核蛋白表达比较 (Lamin B, $\bar{x} \pm s$)

指标	组别	0 h	8 h	12 h	16 h	24 h	32 h
P50	模型组	0.047 ± 0.01 (8)	0.216 ± 0.09* (7)	0.302 ± 0.11* (8)	0.312 ± 0.12* (8)	0.194 ± 0.07* (8)	0.218 ± 0.08* (9)
	中药组	0.201 ± 0.06 [△] (8)	0.117 ± 0.05 ^{△△} (6)	0.381 ± 0.14 ^{△△} (7)	0.200 ± 0.08 ^{△△} (8)	0.053 ± 0.02 ^{△△} (9)	0.004 ± 0.00 ^{△△} (8)
P65	模型组	0.149 ± 0.07 (8)	0.344 ± 0.10* (7)	0.306 ± 0.09* (8)	0.382 ± 0.10* (8)	0.203 ± 0.08* (8)	0.245 ± 0.09* (9)
	中药组	0.371 ± 0.11 [△] (8)	0.291 ± 0.07 (6)	0.392 ± 0.10 [△] (7)	0.388 ± 0.09 (8)	0.294 ± 0.09 [△] (9)	0.026 ± 0.01 ^{△△} (8)

注:与模型组 0 h 点比较, * $P < 0.05$; 与同时间点模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta \Delta P < 0.01$; () 内为鼠数

表 5 示, 模型组 p50、P65 核蛋白表达在 8 ~ 32 h 显著高于本组 0 h ($P < 0.05$); 与模型组同时间比较, 除 8 h P65 核蛋白外, 中药组 P50、P65 核蛋白各时间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

子宫内膜血管^[8]以及子宫内环境^[9]等因素是导致子宫不规则出血的主要原因。对月经出血机制研究显示, 子宫内膜胞外基质崩解的最终作用因子为 MMPs, 且在月经的发生过程中, MMPs 的表达与大量内流的白细胞, 如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞等有关系^[10-11]。作为重要的调控因子信号通路 NF- κ B 则可以调控 MMP3 与 MMP9 的分泌与表达^[9]。因此, 子宫出血过程中的崩解因子 MMPs 的表达以及信号通路 NF- κ B 的活化是内膜崩解的关键, 也是影响崩解时程即出血时间的关键。

中医学认为, 在月经期, 天癸至, 精血盛, 冲任相资, 血海满盈则血溢于胞宫, 最易发生的病理状态为“虚与瘀”, 且依经期血室正开, 大寒大热之剂用时宜慎^[12]原则, 用药以养血活血、祛瘀调经为主, 本实验用方以失笑散加味组成。现代研究表明, 失笑散有明显的增强子宫收缩频率、抗动脉粥样硬化以及降低血小板聚集等作用^[13]。

本研究显示, 从形态学直接反映出活血方能够促进子宫内膜的崩解, 缩短出血时程。活血方在子宫内膜崩解的 0 ~ 12 h 对 MMP3、MMP9 的表达有明显的上调作用, 随后的 24 ~ 32 h 在蛋白的表达上又可下调; 对组织信号通路 NF- κ B 的影响则是使 P50 与 P65 迅速的入核出核, 达到迅速激活或关闭信号通路的作用, 进而影响了作用因子 MMP3 与 MMP9 的表达。提示活血方通过直接调节 MMP3、MMP9 的表达时相, 调节信号通路 NF- κ B 的激活状态进而又调节了 MMP3、MMP9 的表达从而影响内膜崩解的时程, 使子宫内膜能够快速、完全的脱落, 而此将有利于内膜的修复, 为下一个月经周期程序做好准备, 这可能是活血方缩短子宫内膜崩解时程的作用机制之一。

参考文献

- [1] Jabbour HN, Kelly RW, Fraser HM, et al. Endocrine regulation of menstruation [J]. Endocr Rev, 2006, 27 (1):17-46.
- [2] Salamonsen LA, Marsh MM, Findlay JK. Endometrial endothelin: regulator of uterine bleeding and endometrial repair [J]. Clin Exp Pharmacol, 1999, 26(2):154-157.
- [3] Chase AJ, Bond M, Crook MF, et al. Role of nuclear factor kappaB activation in metalloproteinase-1, -3 and -9 secretion by human macrophages in vitro and rabbit foam

- cells produced in vivo [1]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(5):765-771.
- [4] 刘佳, 杨丽丽. 中药人工周期疗法临床应用进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2007, 9(2):48-50.
- [5] Brasted M, White CA, Kennedy TG, et al. Mimicking the events of menstruation in the murine uterus [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69(4):1273-1280.
- [6] Xu XB, He B, Wang JD. Menstrual-like changes in mice are provoked through the pharmacologic withdraw of progesterone using mifepristone following induction of decidualization [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(12):3184-3191.
- [7] Milligan SR, Cohen PE. Silastic implants for delivering physiological concentrations of progesterone to mice [J]. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6(2):235-239.
- [8] Hague S, Mackenzie IZ, Bicknell R, et al. In vivo angiogenesis and progestogens [J]. *Hum Reprod*, 2002, 17(3):786-793.
- [9] Li R, Luo X, Pan Q, et al. Doxycycline alters the expression of inflammatory and immune-related cytokines and chemokines in human endometrial cells: implication in irregular uterine bleeding [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(10):2555-2563.
- [10] Alvarez GM, Galant C, Frankenne F, et al. Development of an animal experimental model to study the effects of levonorgestrel on the human endometrium [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(3):697-704.
- [11] Bethea CL, Reddy AP, Smith LJ. Nuclear factor kappa B in the dorsal raphe of macaques: an anatomical link for steroids, cytokines and serotonin [J]. *Psychiatry Neurosci*, 2006, 31(2):105-114.
- [12] 马宝璋. 中医妇科学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006:61.
- [13] 伍小燕. 失笑滴丸与失笑散的药理作用比较 [J]. *中成药*, 1996, 18(10):33.

Effect of *Huoxue Fang* (活血方) on NF- κ B Pathway and Matrix Metalloproteinases of Endometrium of Menstruation Bleeding Model Mice

CHEN Jincheng¹, LI Chunxiang^{1,2}, DING Fang³, WU Beibei¹

(1. Graduate College of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, 050017; 2. Hebei University of Chinese Medicine; 3. Third Hospital of Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To explore the effect of *Huoxue Fang* on disintegration of endometrium and possible mechanism. **Methods** Totally 130 C57BL/6J female mice were divided into sham operation group ($n=10$), model group ($n=60$) and herb group ($n=60$). Model and herb group were given sequential hormone to replicate models of menstruation bleeding mice. Induce decidualization to left uterine cavity. From the ninth day of modeling, herb group were given *Huoxue Fang* 20 g/(kg·d) by gavage. Sham operation group and model group were given equivalent normal saline. After progesterone withdrawals at 0, 8, 12, 16, 24, 32 h, choose a certain amount of mice in both groups respectively to take vaginal secretion detection and observe disintegration and shedding of endometrium. After hematoxylin-eosin (HE) staining, observe pathological change of bilateral uterine horn and calculate uterine coefficient. Detect the expression of MMP3、MMP9、P50 and P65 in uterine tissues adopting immunohistochemical method. Detect the expression of MMP3 mRNA and MMP9 mRNA with Real-time PCR. Detect the protein expression of MMP3 and MMP9 and the nuclear protein expression of P50 and P65 in uterine tissues using Western blot. **Results** Compared with sham operation group, left side of uterine of model group mice showed significant pathological change. From 12 h, the rate of bleeding mice increased; left uterine coefficient increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, bleeding time-histories of herb group decreased obviously; at 0, 8, 12 h, left uterine coefficient increased which decreased at 32 h ($P<0.05$). Compared with model group, the expression of MMP3 mRNA and MMP9 mRNA of left uterine tissues of herb group were up-regulated obviously during 0-32 h ($P<0.05$). The expression of MMP3 and MMP9 protein increased during 0-12 h and were down-regulated at 32 h ($P<0.05$). Compared with model group, nuclear protein P50 of left uterine tissues of herb group mice was up-regulated at 0 and 12 h and was down-regulated at 8, 16, 24, 32 h ($P<0.05$). Nuclear protein P65 was up-regulated at 0, 12, 24 h and was down-regulated at 32 h ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** *Huoxue Fang* can decrease disintegration time-histories of endometrium. The mechanism may relate to expression of MMP3 and MMP9 and rapid activation and timely closure of NF- κ B pathway.

Keywords endometrium; *Huoxue Fang*; disintegration factor; NF- κ B pathway; matrix metalloproteinases

(收稿日期: 2015-01-01; 修回日期: 2015-03-01)

编辑: 洪 潮