

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.13.018

补肾与活血序贯干预对月经模型小鼠 子宫内膜修复的影响

张艳红¹, 李春香^{1,2*}, 陈进成², 白文忠³, 李云峰², 吴贝贝², 何 康⁴

(1. 河北医科大学, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017; 2. 河北中医学院; 3. 河北体育学院; 4. 河北师范大学)

摘要 目的 探讨补肾与活血序贯干预对月经模型小鼠子宫内膜修复的影响及可能作用机制。方法 将 140 只雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为假手术组 (40 只)、模型组 (50 只)、序贯干预组 (50 只), 模型组和序贯干预组采用切除小鼠双侧卵巢后行激素序贯处理复制小鼠月经模型。序贯干预组在激素序贯处理的同时序贯给予补肾方及活血方, 每天相应药物 2 ml/100 g 灌胃, 共计给药 14 天。模型组、假手术组灌胃等量蒸馏水。在孕酮撤退后 24 h、32 h、40 h、48 h、72 h 对各组小鼠诱导侧 (右侧) 子宫角进行形态学观察及评分, 并检测各组小鼠子宫 Cxcl 2 蛋白的表达。结果 与假手术组比较, 模型组小鼠子宫内膜形态学评分在 24 h、32 h、40 h、48 h 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 序贯干预组小鼠子宫内膜形态学评分在 24 h、32 h、40 h、48 h 显著升高 ($P < 0.05$)。与假手术组比较, 模型组 Cxcl 2 蛋白表达在各个时间点均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 序贯干预组 Cxcl 2 蛋白表达在各个时间点均升高 ($P < 0.05$)。结论 补肾与活血序贯干预可促进月经模型小鼠子宫内膜修复, 其作用机制可能与调控 Cxcl 2 蛋白表达有关。

关键词 子宫内膜修复; 补肾; 活血; 中药周期疗法

临床以补肾为主的周期疗法辨治月经失调取得了明显的疗效^[1-3], 但其作用机制的研究相对较少。本研究建立小鼠月经模型, 观察补肾与活血序贯干预对小鼠子宫内膜修复的影响并探讨其作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雌性 7~8 周龄 C57BL/6J 小鼠 140 只, 体重 18~20 g, 购自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

补肾方由沙苑子 15 g、菟丝子 15 g、枸杞子 15 g、熟地黄 15 g、鹿角霜 15 g、焦三仙各 10 g 等组成; 活血方由生蒲黄 15 g、五灵脂 15 g、当归 15 g、川芎 15 g、艾叶 15 g 等组成, 药物购自石家庄乐仁堂药店, 水煎浓缩至含生药 0.15 g/ml。

1.3 主要试剂及仪器

雌二醇 (美国 Alfa Aesar 公司, 批号:

10152011); 孕酮 (Sigma-Aldrich 公司, 批号: P8783); Cxcl 2 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 货号: bs-1162r); 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: SP-9001); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9032)。BX51T-PHD-J11 显微镜, 日本奥林巴斯公司; RM2016 切片机, 德国莱卡公司; UVP GDS-8000 凝胶成像系统, 美国 Thermo 公司; DYCZ-24DN 电泳仪系统, 北京六一仪器厂; WSE-4040 半干转膜仪系统, 日本 ATTO 公司。

2 方法

2.1 模型建立

参考文献 [4] 制备小鼠月经模型。行小鼠双侧卵巢切除术, 恢复 1 周后行激素序贯处理: 第 1~3 天 9:30 皮下注射 100 ng 雌二醇; 第 4~6 天不给予任何处理; 第 7 天将孕酮皮埋管埋植于小鼠背部皮下, 同时皮下注射 50 ng 孕酮和 5 ng 雌二醇; 第 8~9 天 9:30 皮下注射 5 ng 雌二醇; 第 9 天 11:30 将 15 μ l 过滤除菌的花生油注射到小鼠右侧子宫角以诱导蜕膜化, 未注射花生油的左侧子宫角作为对照。蜕膜化诱导 49 h 后, 取出孕酮皮埋

基金项目: 河北省科学技术研究发展计划 (11276103D-38)

* 通讯作者: zyjsh@163.com, 13582128125

管, 此时间点作为孕酮撤退的 0 h。

2.2 动物分组及给药

将 C57BL/6J 雌性小鼠采用随机数字表法分为假手术组 (开腹关腹, 但不切除卵巢) 40 只、模型组 50 只、序贯干预组 50 只。因手术死亡及模型不成功因素, 最终假手术组、模型组、序贯干预组分别为 35、30、35 只。各组小鼠分为 24 h、32 h、40 h、48 h、72 h 5 个时间点, 假手术组各个时间点 7 只、模型组 6 只、序贯干预组 7 只。序贯干预组在激素序贯处理的同时, 第 1~8 天 9:00 给予补肾方; 第 9~11 天 9:00 给予活血方; 第 11~14 天 16:00 给予补肾方, 共计给药 14 天, 每天 2 ml/100 g 灌胃。假手术组、模型组给予等量蒸馏水灌胃。

2.3 观察指标及方法

分别在孕酮撤退后 24 h、32 h、40 h、48 h、72 h 处死相应只数小鼠, 取子宫角相机拍照。取部分组织 4% 多聚甲醛固定, 剩余组织 -80℃ 保存备用。

2.3.1 形态学观察及评分 观察子宫大体形态; 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 观察病理变化。参照文献 [4] 对子宫内膜进行形态学评分, 早期修复 (发生蜕膜化的间质区域有明显的崩解脱落现象, 可见大量崩解脱落组织, 但同时伴随上皮的部分被覆) 计 1 分, 中期修复 (子宫内膜表面大部分有上皮被覆, 上皮下的间质结构紧密, 坏死组织完全脱落至宫腔内, 进一步固缩, 体积变小) 计 2 分, 完全修复 (上皮被覆完整, 间质修复完全, 宫腔残留少量组织碎片或无) 计 3 分。

2.3.2 检测 Cxcl 2 蛋白表达 免疫组织化学方法: 石蜡切片脱蜡、复水, 修复抗原, Cxcl 2 一抗 (1:100), 4℃ 过夜, 生物素标记二抗 IgG, 37℃ 孵育 20 min, 滴加 S-A/HRP, 37℃ 孵育 20 min, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水、透明、封片。每个样本随机选取 5 个有意义的组织图片显微照相 ($\times 400$), 进行阳性细胞数分级 (A) 和阳性细胞显色强度分级 (B)。A: 0~1% 计 0 分, 2%~10% 计 1 分, 11%~50% 计 2 分, 51%~80% 计 3 分, 81%~100% 计 4 分; B: 0 分 (阴性), 1 分 (弱阳性), 2 分 (阳性), 3 分 (强阳性); A 与 B 乘积为 IHS 评分 [5]。

Western blot 方法: 裂解子宫组织, 4℃、12000 r/min 离心 10 min, 取上清, 测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样品上样进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转

膜至 PVDF 膜上, 封闭 2 h, Cxcl 2 一抗 (1:300), 4℃ 过夜, 生物素标记二抗 (1:3000), 室温孵育 1.5 h, ECL 发光, 采用 UVP-GDS-8000 凝胶成像系统对胶片进行扫描生成灰度值。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计处理, 计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数间比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 LSD 检验; 形态学评分比较采用秩和检验。

3 结果

3.1 各组小鼠子宫形态学变化

假手术组在 24 h、32 h、40 h、48 h、72 h 小鼠子宫呈浅粉色, 未见充血, 大体形态变化较小; 未发生子宫内膜崩解脱落与修复变化, 子宫内膜基质与上皮完整。模型组和序贯干预组在 24 h 小鼠右侧子宫角充血且呈现暗紫色, 宫腔被覆的上皮坏死并脱落, 蜕膜化间质区域出现大面积坏死并伴有出血, 宫腔上皮已有小部分开始修复; 在 32 h 右侧子宫角变小, 颜色较 24 h 浅, 宫腔内坏死组织进一步固缩, 体积变小, 腔上皮乳头状增生, 间质细胞增多, 内膜增厚, 表明进一步修复; 在 40 h 上皮和间质进一步修复, 序贯干预组子宫内膜上皮和基质大部分已修复完好; 在 48 h 腔上皮和间质进一步修复, 右侧与对照侧子宫角大体形态相似; 在 72 h 两组子宫内膜均完全修复。

3.2 各组小鼠不同时间点子宫内膜形态学评分比较

表 1 示, 与假手术组比较, 模型组形态学评分 24 h、32 h、40 h、48 h 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 序贯干预组形态学评分在 24 h、32 h、40 h、48 h 显著升高 ($P < 0.05$); 72 h 各组形态学评分比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠不同时间点子宫内膜形态学评分比较 (只)

组别	鼠数	评分	24 h	32 h	40 h	48 h	72 h
假手术组	7	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	7	7	7	7	7
模型组	6	1	6	5	2	0	0
		2	0	1	4	3	0
		3	0	0	0	3	6
序贯干预组	7	1	3	2	0	0	0
		2	4	5	2	1	0
		3	0	0	5	6	7

3.3 各组小鼠不同时间点子宫组织 Cxcl 2 蛋白表达比较

表 2、表 3 示, 与假手术组比较, 模型组和序

表 2 各组小鼠不同时间点 Cxcl 2 蛋白表达 IHS 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	24 h	32 h	40 h	48 h	72 h
假手术组	7	1.286 ± 0.488	1.000 ± 0.577	0.714 ± 0.488	0.857 ± 0.378	1.143 ± 0.378
模型组	6	3.667 ± 1.506*	3.333 ± 1.033*	1.833 ± 0.408*	4.000 ± 1.265*	1.667 ± 0.516*
序贯干预组	7	9.000 ± 1.732* [△]	8.571 ± 2.070* [△]	3.143 ± 1.069* [△]	8.571 ± 2.699* [△]	4.571 ± 1.512* [△]

注:与假手术组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠不同时间点 Cxcl 2 蛋白表达平均灰度比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	24 h	32 h	40 h	48 h	72 h
假手术组	7	0.101 ± 0.017	0.095 ± 0.012	0.029 ± 0.005	0.037 ± 0.006	0.090 ± 0.014
模型组	6	0.214 ± 0.030*	0.201 ± 0.008*	0.222 ± 0.023*	0.073 ± 0.016*	0.123 ± 0.017*
序贯干预组	7	0.458 ± 0.031* [△]	0.441 ± 0.031* [△]	0.374 ± 0.033* [△]	0.490 ± 0.021* [△]	0.439 ± 0.044* [△]

注:与假手术组同时时间点比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, $\Delta P < 0.05$

贯干预组 Cxcl 2 蛋白表达各个时间点均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 序贯干预组 Cxcl 2 蛋白表达在各个时间点均升高 ($P < 0.05$)。

4 讨论

子宫内膜蜕膜化是月经发生的基础, 而小鼠蜕膜化的启动需要胚胎信号对上皮的刺激。在未受孕的动情周期甚至假孕时, 因为无胚胎信号, 小鼠子宫内膜也不会发生蜕膜化。1984 年英国学者 Finn 等^[4]用人工刺激子宫蜕膜化后撤退孕酮, 使得小鼠子宫发生月经样改变, 建立了第 1 个小鼠月经模型, 证明子宫内膜必要的激素准备、蜕膜化样改变及其后的孕酮撤退是月经产生的基本条件。

我们前期预试验利用小鼠月经模型观察了单纯雌激素处理、雌激素结合孕激素和孕酮撤退后 0 h、8 h、12 h、16 h、24 h、32 h、40 h、48 h、72 h 的小鼠子宫内膜组织形态学, 结果子宫组织学显示在孕酮撤退后 12~16 h 子宫内膜开始崩解, 24 h 出血强度最大且伴随着子宫内膜的初始修复, 72 h 子宫内膜完全修复。该结果许多组织学特征与人类子宫内膜的周期性变化十分相似^[7-8], 为进一步探究补肾与活血序贯干预对子宫内膜修复的影响及机制, 我们选取 24 h、32 h、40 h、48 h 和 72 h 为观察点进行本次研究。

胞宫即子宫, 乃奇恒之腑, 具有藏泻并重的生理特性, “藏”与“泻”交替变化, 藏泻有度, 维持正常的月经周期^[9]。中药周期疗法是依据中医对月经产生的机制结合现代医学卵巢周期性变化对子宫的周期性影响而周期性用药的一种治疗方法^[10]。补肾方中菟丝子、沙苑子、鹿角霜温肾壮阳力强, 枸杞子填精补血见长, 熟地黄滋阴补肾、填精益髓, 诸药合用滋养肝肾之精血, 温补肾阳,

使肾中精气充盈, 气血逐渐化生、充实, 血海按时满盈。填精益肾之药不但可以促进卵泡发育和雌激素分泌, 还有助于子宫内膜的修复和再生以调经^[11]。活血方可温经活血化瘀, 因势利导, 推陈出新, 提高子宫兴奋性, 使子宫内膜脱落并排出, 有利于改善子宫内膜修复机制, 防止经期延长、崩漏发生^[11-12]。补肾填精养血活血中药能明显改善子宫卵巢血流灌注^[13]。本研究从子宫形态学评分比较可以看出, 与模型组比较, 序贯干预组能加快子宫内膜修复。

Cxcl 2 是一个小细胞因子, 属于趋化因子 CXCL 家族。Menning 等建立小鼠月经模型, 证明中性粒细胞趋化因子主要受体 Cxcr 2 和 Cxcl 2 在孕酮撤退后 24 h 上调明显^[4]。本研究结果显示, 模型组小鼠 Cxcl 2 在孕酮撤退后 24 h、32 h、40 h、48 h、72 h 的表达较假手术组明显升高, 与 Menning 等的报道一致。序贯干预组较模型组更能增强 Cxcl 2 蛋白表达且能维持较长时间, 提示补肾与活血序贯干预可能是通过调节 Cxcl 2 的表达促进子宫内膜修复。

参考文献

- [1] 吴红. 益肾为主结合周期疗法治疗青春期崩漏临床观察 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(10): 59-60.
- [2] 王芳, 付金荣. 蔡小荪治疗子宫内膜异位症不孕经验 [J]. 中医杂志, 2014, 55(4): 283-285.
- [3] 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.
- [4] 关硕, 徐祥波, 贺斌, 等. 雌激素对小鼠子宫内膜崩解后修复的影响 [J]. 生殖医学杂志, 2012, 21(5): 454-458.
- [5] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors [J]. Cancer, 2000, 89(12): 2637-2645.

- [6] Finn CA, Pope M. Vascular and cellular changes in the decidualized endometrium of the ovariectomized mouse following cessation of hormone treatment: a possible model for menstruation [J]. J Endocrinol, 1984, 100(3): 295-300.
- [7] Menning A, Walter A, Rudolph M, et al. Granulocytes and vascularization regulate uterine bleeding and tissue remodeling in a mouse menstruation model [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e41800. doi: 10.1371/journal.pone.0041800.
- [8] 王冬颖, Sk Smith, Steve-Charnock Jones, 等. 小鼠月经生理模型的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2005, 13(4): 208-211.
- [9] 张慧珍, 山书玲, 赵纯. 通因通用治疗崩漏 [J]. 中医杂志, 2014, 55(15): 1341-1342.
- [10] 张琦. 试述中药周期疗法治疗崩漏 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(4): 751-753.
- [11] 韩凤娟. 王秀霞治疗多囊卵巢综合征青春期功能性子宫出血经验 [J]. 中医杂志, 2011, 52(23): 2000-2001.
- [12] 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: 10.
- [13] 夏誉激, 蔡连香, 张树成, 等. 养血补肾中药治疗肾虚型无排卵不孕症的临床疗效及其对卵巢、子宫动脉血流动力学参数的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(4): 299-302.
- [14] 张慧珍, 山书玲, 赵纯. 通因通用治疗崩漏 [J]. 中医杂志, 2014, 55(15): 1341-1342.

The Effects of Sequential Intervention of Kidney-Reinforcing and Blood-Activating on Endometrium Regeneration in Menstruation Model Mice

ZHANG Yanhong¹, LI Chunxiang^{1,2}, CHEN Jincheng², BAI Wenzhong³, LI Yunfeng², WU Beibei², HE Kang⁴

(1. Hebei Medical University, Hebei Province, 050017; 2. Hebei College of Traditional Chinese Medicine; 3. Hebei Institute of Physical Education; 4. Hebei Normal University)

ABSTRACT Objective To explore the effects and possible mechanism of sequential intervention of kidney-reinforcing and blood-activating on endometrium regeneration of menstruation model mice. **Methods** Totally 140 female C57BL/6J mice were randomly divided into sham-operated group (n=40), model group (n=50), sequential interventional group (n=50). Model group and sequential interventional group adopted hormone sequential processing after removing bilateral ovaries of mice to copy menstruation model of mice. Sequential interventional group was given kidney-reinforcing decoction and blood-activating decoction sequentially while adopting hormone sequential processing, perfused with corresponding medicine 2 ml/100 g, for 14 days. Model group and sham-operated group were perfused with equivalent distilled water. Conducted morphological observation and scoring on guiding lateral (right) uterine horn of mice in each group 24 h, 32 h, 40 h, 48 h, 72 h after the withdrawal of progesterone, and detected the expression of Cxcl 2 protein of mice uteri. **Results** The morphological score of mice endometrium in model group decreased remarkably at 24 h, 32 h, 40 h, 48 h compared with that of sham-operated group ($P < 0.05$); The morphological score of mice endometrium in sequential interventional group increased remarkably at 24 h, 32 h, 40 h, 48 h compared with that of model group ($P < 0.05$). The expression of Cxcl 2 protein of model group all increased at any time point compared with that of sham-operated group ($P < 0.05$); The expression of Cxcl 2 protein of sequential interventional group all increased at any time point compared with that of model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Sequential intervention of kidney-reinforcing and blood-activating can improve endometrium regeneration of menstruation model mice, and the underlying mechanism may be related to regulating the expression of Cxcl 2 protein.

Keywords endometrium regeneration; kidney-reinforcing; blood-activating; cycle therapy of Chinese medicine

(收稿日期: 2014-07-15; 修回日期: 2015-02-26)

编辑: 洪 涛