

· 实验研究 ·

温经汤对寒凝血瘀模型大鼠卵巢 血红素氧合酶表达的影响

成秀梅 杜惠兰* 李 丹 路 帅

(河北医科大学中西医结合学院, 石家庄市新石南路 326 号, 050091)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973766); 教育部高等学校博士学科点专项基金资助项目(2000800890006)

* 通讯作者: duhuilan@163.com, (0311) 86265042

[摘要] **目的** 观察温经汤对寒凝血瘀模型大鼠卵巢血红素氧合酶 1(HO-1)、血红素氧合酶 2(HO-2) 的影响, 探讨温经汤治疗寒凝血瘀型妇科疾病的作用机制。 **方法** 按随机数字表法将 40 只 SD 雌性大鼠分为正常组、模型组、温经汤低剂量组(低剂量组)、温经汤高剂量组(高剂量组), 每组 10 只。低剂量组、高剂量组于造模的第 1 天开始, 分别按 14.66 、 $29.32\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 给予温经汤灌胃, 每日 1 次, 连用 2 周。其余两组给予同体积的蒸馏水。采用血红蛋白结合及联二亚硫酸盐还原法测定血浆一氧化碳(CO)活性; 采用免疫组织化学 SP 法检测卵巢颗粒细胞和黄体细胞 HO-1、HO-2 蛋白表达; 采用原位杂交法检测卵巢颗粒细胞和黄体细胞 HO-1、HO-2 mRNA 的表达。 **结果** 高剂量组、低剂量组大鼠血浆碳氧血红蛋白(COHb)活性较模型组明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 卵巢颗粒细胞、黄体细胞 HO-1、HO-2 蛋白表达, HO-1 mRNA、HO-2 mRNA 表达加强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论** 温经汤治疗寒凝血瘀型妇科疾病的作用可能与调节 HO-1、HO-2 水平有关。

[关键词] 温经汤; 寒凝血瘀证; 血红素氧合酶; 内源性一氧化碳; 大鼠

Effect of Wenjing Decoction on Expression of Hemeoxygenase in the Ovarian of Rats with Blood Stasis due to Cold Accumulation

CHENG Xiumei, DU Huilan, LI Dan, LU Shuai

(College of Integrated Traditional and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Wenjing Decoction (Decoction for warming meridians) on the expression of heme oxygenase 1 (HO-1) and heme oxygenase 2 (HO-2) in the ovary of model rats with blood stasis due to cold accumulation, and to explore its therapeutic mechanism in treating gynecological diseases. **Methods** Forty SD female rats were randomized into normal group, model group, and Wenjing Decoction low-dose and high-dose groups, 10 in each. Wenjing Decoction low-dose and high-dose groups were administered Wenjing Decoction by gavage 14.66 or $29.32\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ respectively, once a day, for 2 weeks in succession. The other two groups were given the same volume distilled water. The plasma carbonic oxide (CO) activity was determined with the method of hemoglobin binding and dithionite reduction, the expression of HO-1 and HO-2 in ovarian granular and luteal cells was determined with the immunohistochemical SP method, and the expression of HO-1 mRNA and HO-2 mRNA in ovarian granular and luteal cells was determined with the in situ hybridization method. **Results** Compared with the model group, the activity of plasma COHb in the Wenjing Decoction low-dose and high-dose groups was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the expressions of HO-1, HO-2, and HO-1 mRNA and HO-2 mRNA in ovarian granular and luteal cells were decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** The therapeutic effect of Wenjing Decoction on gynecological disease due to cold accumulation and blood stasis was related to regulating the expression of HO-1 and HO-2.

Key Words Wenjing Decoction (Decoction for warming meridians); blood stasis due to cold accumulation; hemeoxygenase; carbonic oxide; rat

温经汤是妇科临床常用方, 治疗寒凝血瘀所致痛经、月经不调等多种妇科疾病疗效显著。我们前期的药效学研究表明, 温经汤能够调节生殖内分泌, 改善卵巢功能, 调节患者镇痛致痛物质 5-羟色胺(5-

HT)、 β 内啡肽(β EP)及血管舒缩功能^[1-2]。研究发现血红素氧合酶 1(HO-1)、血红素氧合酶 2(HO-2)在妇科寒凝血瘀证的形成中有重要的作用, 本实验探讨温经汤对寒凝血瘀模型大鼠卵巢 HO-1、HO-2

的调节作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康清洁级SD 雌性大鼠 40 只,鼠龄 3 个月,体重(230±20)g,由河北医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(冀) 2003-1-003,适应性饲养 2 周后,按随机数字表法分为 4 组,即正常组、模型组、温经汤低剂量组(低剂量组),温经汤高剂量组(高剂量组),每组 10 只。

1.2 药物

温经汤组成:当归 10g、川芎 10g、白芍 10g、肉桂 10g、莪术 10g、牡丹皮 10g、吴茱萸 10g、怀牛膝 12g、甘草 6g。由本校中药制剂室制备。将当归、川芎、莪术、肉桂、吴茱萸浸泡过夜;加入 8 倍的水,用蒸馏法提取挥发油。取药渣与浸泡的其他药物一起水煎 3 次,每次 30min,过滤,共得药液 1200ml,离心、浓缩至每毫升约含生药 3.52g。置 4℃ 冰箱备用,用时取出用蒸馏水稀释至所用浓度。

1.3 模型建立及给药

正常组常规饲养,模型组、低剂量组、高剂量组大鼠置于 0~1℃ 冰水中 20min,每日 1 次,连续 2 周^[3]。低剂量组、高剂量组于造模的第 1 天开始,分别按 14.66、29.32g/(kg·d)⁻¹(分别相当于临床成人剂量的 10 倍、20 倍)给予温经汤灌胃,每日 1 次,连用 2 周。其余两组给予同体积的蒸馏水。

1.4 指标检测

1.4.1 血浆一氧化碳(CO)的测定 采用乐宏元等的血红蛋白结合及联二亚硫酸盐还原法^[4]。2 周后,于动情间期断头取血 0.1ml,取 10μl 溶血后加 Na₂S₂O₄ 25mg,将血中多组分的血红蛋白转化为 Hb 和碳氧血红蛋白(COHb)两个组分,在 721-100 型分光光度计上用 420nm 和 432nm 两个波长比色,记录吸光度值,依比尔定律建立方程式,计算出 COHb 的百分含量。

1.4.2 卵巢组织 HO-1、HO-2 蛋白表达 处死大鼠后,迅速将卵巢组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,脱水、石蜡包埋。将卵巢组织标本,制作 4μm 厚切片。

采用免疫组化 SP 法标记 HO-1、HO-2。

1.4.3 卵巢组织 HO-1 mRNA、HO-2 mRNA 表达 处死大鼠后,迅速将卵巢组织置于 4% 多聚甲醛+0.1%DEPC 溶液中固定,脱水、石蜡包埋。将石蜡包埋的卵巢组织标本,制作 6μm 厚切片。采用原位杂交法检测 HO-1 mRNA、HO-2 mRNA 表达。采用 HPIAS-1000 彩色病理分析系统,测定每个视野平均灰度值做半定量分析,平均灰度值与阳性表达强弱成反比,即平均灰度值越高,阳性表达越弱。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计分析软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠血浆 COHb 的比较

表 1 示,模型组大鼠血浆 COHb 活性较正常组明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,高、低剂量组血浆 COHb 活性显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。高剂量组的治疗效果优于低剂量组($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血浆 COHb 活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	COHb(%)
正常组	10	1.01±0.14
模型组	10	0.56±0.18*
低剂量组	10	0.71±0.11△
高剂量组	10	0.96±0.17△△▲

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与低剂量组比较,▲ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠卵巢组织 HO-1、HO-2 蛋白表达的比较

表 2 示,与正常组比较,模型组卵巢颗粒细胞、黄体细胞 HO-1、HO-2 表达下降($P < 0.01$)。与模型组比较,低剂量组卵巢颗粒细胞、黄体细胞 HO-1、HO-2 蛋白表达均增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,高剂量组卵巢颗粒细胞、黄体细胞 HO-1、HO-2 蛋白表达均增强($P < 0.01$);高剂量组比低剂量组卵巢颗粒细胞和黄体细胞 HO-1、黄体细胞 HO-2 蛋白表达更强($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠卵巢 HO-1、HO-2 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HO-1		HO-2	
		颗粒细胞	黄体细胞	颗粒细胞	黄体细胞
正常组	10	104.36±8.73	80.66±4.85	116.28±13.71	85.26±6.28
模型组	10	160.50±23.97*	136.42±23.69*	160.82±22.88*	136.20±24.07*
低剂量组	10	130.66±23.06△△	117.34±14.15△	128.10±22.61△△	115.22±6.39△△
高剂量组	10	108.34±9.24△△▲	97.02±8.32△▲	119.82±21.24△▲	98.81±7.14△▲

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与低剂量组比较,▲ $P < 0.05$

表3 各组大鼠卵巢HO-1 mRNA、HO-2 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HO-1 mRNA		HO-2 mRNA	
		颗粒细胞	黄体细胞	颗粒细胞	黄体细胞
正常组	10	136.99±15.33	103.92±7.83	135.42±19.92	116.28±13.71
模型组	10	180.78±10.78*	162.32±19.92*	168.33±23.62*	160.82±22.86*
低剂量组	10	153.57±24.75△△	129.29±19.32△△	152.19±8.81	128.10±22.60△△
高剂量组	10	136.12±10.60△△▲	107.37±8.89△△▲	144.60±19.27△	121.21±13.68△△

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与低剂量组比较,▲ $P<0.05$

2.3 各组大鼠卵巢组织HO-1 mRNA、HO-2 mRNA 表达比较

表3示,与正常组比较,模型组卵巢颗粒细胞、黄体细胞HO-1、HO-2 mRNA表达下降($P<0.01$)。与模型组比较,高、低剂量组卵巢颗粒细胞、黄体细胞HO-1、HO-2 mRNA表达均增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与低剂量组比较,高剂量组卵巢颗粒细胞、黄体细胞HO-1 mRNA表达较强($P<0.05$)。

3 讨论

寒凝血瘀是导致妇科疾病的常见病机之一。寒为阴邪,主收引凝滞,寒客冲任,血为寒凝,冲任瘀阻而致妇科疾病。根据“寒者热之”、“结者散之”原则,治宜温经散寒、活血化瘀调经,临床选用陈自明《妇人大全良方》之温经汤加减。方中吴茱萸味辛性热,归肝、肾、胃经,能散能温,温经散寒;肉桂味辛性热,归肾、脾、肝经,能“破血通利月闭,止腹中冷气,痛不可忍”,以上二味温经散寒,暖宫化瘀为君药。当归“温中止痛,除客血内塞”,为调经要药;川芎行气开郁,活血止痛,为血中之气药;莪术能通月经,消瘀血,治疗妇女血瘀经闭诸症;当归、川芎、莪术活血化瘀,行气调经为臣药。牡丹皮能祛瘀通经;白芍“通顺血脉,缓中,散恶血,逐贼血,消腹痛”;怀牛膝引诸药下行,能散瘀血,破瘀结;甘草调和诸药,上述诸药共为佐使。全方共收温经散寒、活血化瘀、调经止痛之效,故在临床上治疗妇科寒凝血瘀证取得了很好的疗效^[5]。

HO是生物体内催化血红素分解成胆绿素、CO和铁离子过程中一种关键的限速酶。近年来发现它在许多生理和病理过程中起重要的调节作用,尤其是具有组织器官的保护作用^[6-7],已逐渐成为目前研究的一个热点。而CO作为一种新的信使分子和血管舒张因子已引起人们的广泛关注^[8]。我们前期的研究已证实,大鼠卵巢存在HO,卵巢HO/CO通过其舒张血管、细胞信使、促进血管生成等作用调节

和维持卵巢正常的生理功能。受到寒冷刺激时,卵巢颗粒细胞、黄体细胞HO-1、HO-2蛋白表达下降,卵巢颗粒细胞、黄体细胞HO-1 mRNA、HO-2 mRNA表达减弱,血浆COHb活性降低,引起生殖激素及卵巢局部的调节失常,从而影响卵巢的功能,导致妇科疾病的发生。温经汤能够提高模型大鼠血浆COHb活性,增强卵巢HO-1 mRNA、HO-2 mRNA及蛋白的表达。推测温经汤可能通过调节COHb活性,增强卵巢HO-1、HO-2表达,解除寒凝血瘀时血管收缩和痉挛状态,改善卵巢局部的血液供应,使HO-CO发挥正常的细胞保护作用 and 舒张血管功能,并作为一种神经信使对下丘脑垂体的促性腺激素进行调节,恢复正常的卵巢功能,从而达到治疗妇科疾病的目的。

参考文献

[1]成秀梅,杜惠兰,李丹.加减温经汤对寒凝血瘀模型大鼠卵巢功能的影响[J].北京中医药大学学报,2006,29(2):118-121.

[2]苏健,杜惠兰.加减温经汤对月经病寒凝血瘀证患者血管舒缩功能的影响[J].中医杂志,2008,49(4):323-325.

[3]成秀梅,杜惠兰,李丹.寒凝血瘀动物模型的创建[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(8):604-605.

[4]乐宏元,宋小兴,刘和平.一氧化碳血红蛋白双波长定量测量[J].临床检验杂志,1996,14(2):87-88.

[5]杜惠兰,李清雪,魏影非,等.加减温经汤对月经病寒凝证患者生殖激素及5-HT、βEP的影响[J].中成药,2005,27(9):1047-1050.

[6]安莉,刘庆辉,秦雪冰,等.血红素氧合酶1干预对呼吸机所致肺损伤的影响[J].中国呼吸与危重监护杂志,2010,9(3):284-286.

[7]胡昌兴.血红素氧合酶-1与动脉粥样硬化和冠心病相关性研究的最新进展[J].心血管康复医学杂志,2008,17(1):94-96.

[8]常向云,王晓丽,沈耿,等.HO-CO系统在糖尿病足患者中的表达及其意义[J].中国糖尿病杂志,2008,16(2):113-115.