

化瘀止痛方对人子宫腺肌病病灶细胞 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 分泌的影响

关永格¹, 李坤寅², 宋阳²

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006

[摘要] 目的: 观察化瘀止痛方对人子宫腺肌病病灶细胞前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) 和前列腺素 E_2 (PGE_2) 含量的影响。方法: 实验分为化瘀止痛方高、低浓度组, 空白对照组, 基质组及米非司酮西药对照 (RU486) 组, 每组 5 例, 采用胶原酶消化法培养人子宫腺肌病病灶细胞, 检测药物干预前后子宫腺肌病病灶细胞 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGE_2 的表达。结果: 化瘀止痛方高、低浓度组 PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量与空白对照组比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。化瘀止痛方高浓度组 PGE_2 含量与 RU486 组比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 化瘀止痛方高、低浓度组子宫腺肌病细胞上清中 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 含量与 RU486 组比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。结论: 化瘀止痛方降调子宫腺肌病细胞 PGE_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 分泌, 从而使子宫恢复正常收缩功能, 此可能是其止痛的主要机理之一。

[关键词] 子宫腺肌病; 化瘀止痛方; 前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$); 前列腺素 E_2 (PGE_2)

[中图分类号] R711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 01-0175-03

子宫腺肌病(Adenomyosis, AD)是子宫内膜腺体及间质存在于子宫肌层中, 伴随着周围肌层细胞的代偿性增生和肥大, 为一种雌激素依赖性疾病^[1]。渐进性痛经为其最主要的临床表现, 痛经发生率高达 77.8%^[2], 严重影响患者生活质量。前期临床研究表明化瘀止痛方能明显减轻患者的痛经症状, 总有效率达 90%^[3]。本研究通过观察化瘀止痛方对体外培养的子宫腺肌病病灶细胞前列腺素 $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) 和前列腺素 E_2 (PGE_2) 含量的影响, 探讨化瘀止痛方治疗子宫腺肌病痛经的作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织选择 选择 2010 年 2~8 月广州中医药大学第一附属医院未服任何中西药物的住院手术的子宫腺肌病患者 5 例, 无菌操作取子宫腺肌病病灶约 3 cm^3 , 立即置于冰浴的盛有 DMEM 的标本瓶中, 迅速送至实验室, 同时取病灶组织送病理检查确诊。

1.2 试剂与仪器 PGE_2 ELISA 试剂盒: R&D Systems; $\text{PGF}_{2\alpha}$ ELISA 试剂盒: ENZO 公司; 高糖 DMEM、胎牛血清、2.5% 胰蛋白酶、Collagenase

I、PBS 缓冲液均购于美国 Gibico 公司; 倒置式系统显微镜带全自动显微照相 PM-20: 日本, OLYMPUS; CO_2 培养箱: Thermo SIENTIFIC; 培养瓶、培养板、离心管等购买于美国 Corning 公司; 米非司酮片为北京紫竹药业有限公司产品; 中药购于广东康美药业股份有限公司。

1.3 药物配制及分组

1.3.1 药材与制备 化瘀止痛方全方由三七、五灵脂、没药、延胡索、木香、乌药、香附、白芍、甘草等药物组成。按原方比例购置、鉴定; 取各组药材, 粉碎成粗粉, 加 8 倍量水加热煎煮 2 次, 煮沸后分别再煎煮 40 min、30 min, 合并滤液, 8 000 r/min 离心 5 min, 过滤, 80°C 下减压, 浓缩至 1:1, 滤液浓缩至清膏备用。

1.3.2 含药培养液的配制 化瘀止痛方水提液用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌, 再用高糖 DMEM 稀释, pH 试纸测其 pH 值 (pH 反应呈中性), 分别配制成 500 mg/mL、250 mg/mL、125 mg/mL、80 mg/mL、40 mg/mL、20 mg/mL、10 mg/mL、5 mg/mL、

[收稿日期] 2013-09-24

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (编号: 20094425110001)

[作者简介] 关永格 (1982-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 子宫腺肌病及子宫内膜异位症的相关研究。

1 mg/mL、0.1 mg/mL, 经 MTT 法筛选出 IC₅₀(半抑制浓度)。各组取 IC₅₀ 的上下高低 2 种浓度: 40 mg/mL、20 mg/mL, 现配现用。

1.3.3 对照组药物的配制 米非司酮西药对照(RU486)组: 取 1 片米非司酮(25 mg, 6×10^{-5} mol/L), 用二甲基亚砜(DMSO)溶解, 用高糖 DMEM 稀释为 10^{-5} mol/L(DMSO 在培养液终浓度含量 < 0.5%) 备用。基质组: DMSO 用高糖 DMEM 稀释成 0.5% 备用(基质 DMSO 为溶解米非司酮的溶解剂)。空白对照组: 只用高糖 DMEM 培养基。

1.4 方法

1.4.1 子宫腺肌病病灶细胞培养、传代及鉴定 培养方法参考文献^[4-5], 在无菌操作台上从标本瓶中取出子宫腺肌病标本, PBS 冲洗 2 次, DMEM 冲洗 2 次; 将其剪成 1 mm³, 放入含有 0.1% I 型胶原酶的培养瓶内, 37 °C 温箱消化 5~6 h, 加含胎牛血清的培养基终止消化, 不锈钢筛网过滤, 以 1 000 r/min 8 min × 3 次; 加入 10% 胎牛血清 DMEM 培养基制成 5×10^5 个/mL 的细胞悬液, 5 mL/瓶, 37 °C、5% CO₂ 温箱培养, 每 2~3 天换液 1 次, 首次传代 7~10 天, 2 次以上传代 5~7 天传代 1 次。细胞均经角蛋白、波形蛋白、 α -平滑肌肌动蛋白免疫细胞化学法鉴定证实。

1.4.2 给药方法 将传代培养的子宫腺肌病细胞置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞生长旺盛, 弃去培养液, 加入无血清的高糖 DMEM 培养液, 每孔 100 μ L, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h, 使细胞生长同步化, 弃掉原培养液, 各组分别加入对应含药培养液, 各组继续培养 24 h。

1.4.3 酶联免疫技术检测化瘀止痛方对子宫腺肌病病灶细胞 PGF_{2 α} 的影响 检测方法: 取药物干预后各组细胞上清, 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100 μ L, 余孔分别加对应的标准品或细胞上清 100 μ L, 加样时将样品加于酶标板孔底部, 轻轻晃动混匀, 室温, 振动 500 rpm × 120 min; 弃去液体, 甩干, 不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 50 μ L, 37 °C, 60 min; 温育 60 min 后, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 3 次, 每次浸泡 1~2 min, 每孔 400 μ L, 甩干; 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 50 μ L, 37 °C, 60 min; 温育 2 h 后弃去孔内液体, 甩干, 洗板 3 次; 依次每孔加

底物溶液 200 μ L, 45 min 常温避光显色; 依次每孔加终止溶液 50 μ L, 终止液的加入顺序与底物液的加入顺序相同; 用酶标仪测量各孔的光密度(OD 值)。在加终止液后 30 min 以内进行检测。结果判定: 根据一系列标准品的浓度以及相对应的校正 OD₄₀₅ 值通过 CurveExpert1.3 软件分析作出 PGF_{2 α} 的标准曲线, 并得到其方程式为: $y=10.85622/(1-1.003843 \cdot \exp(-0.025016X))$ (其中 X 为 OD₄₀₅ 值, y 为 PGF_{2 α} 标准品的浓度), 根据酶标仪检测得到样品的吸光值, 利用标准曲线的二次方程式计算得出待检样品中 PGF_{2 α} 的浓度(pg/mL)。

1.4.4 酶联免疫技术检测化瘀止痛方对子宫腺肌病病灶细胞 PGE₂ 的影响 检测方法: 取药物干预后各组细胞上清; 分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 150 μ L, 余孔分别加标准品或细胞上清 150 μ L, 加样时将样品加于酶标板孔底部, 轻轻晃动混匀, 酶标板加上盖, 常温振荡反应 1 h; 弃去液体, 甩干, 不用洗涤。每孔加生物素标记抗体工作液 50 μ L, 振荡 2 h; 温育 60 min 后, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 4 次, 每次浸泡 1~2 min, 每孔 200 μ L, 甩干; 每孔加辣根过氧化物酶标记亲和素工作液 200 μ L, 37 °C, 60 min; 温育 60 min 后, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 4 次, 每次浸泡 1~2 min, 每孔 200 μ L, 甩干; 依次每孔加底物溶液 200 μ L, 常温避光显色; 依次每孔加终止溶液 100 μ L, 终止反应, 终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性, 底物反应时间到后应尽快加入终止液; 用酶标仪测量各孔的光密度(OD 值)。在加终止液后 30 min 以内进行检测。结果判定: 根据一系列标准品的浓度以及相对应的校正 OD₄₅₀ 值通过 CurveExpert1.3 软件分析作出 PGE₂ 的标准曲线, 并得到其二次方程式为: $y=4339.1929-11789.703X+8057.2113X^2$ (其中 X 为 OD 值, y 为 PGE₂ 标准品的浓度), 根据酶标仪检测得到样品的吸光值, 利用标准曲线的二次方程式计算得出待检样品中 PGE₂ 的浓度(pg/mL)。

1.5 统计学方法 使用 SPSS13.0 软件包进行数据处理。实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 Levene 检验方差齐性。若方差齐, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA); 若方差不齐, 采用多个样本比较的秩和检验(Kruskal-Wallis 法, 即 H 值检验)。

2 结果

各组子宫腺肌病细胞上清 PGE₂、PGF_{2α} 含量的影响, 见表 1。化瘀止痛方高、低浓度组 PGE₂、PGF_{2α} 含量与空白对照组比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。化瘀止痛方高浓度组 PGE₂ 含量与 RU486 组比较, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 化瘀止痛方高、低浓度组子宫腺肌病细胞上清中 PGF_{2α} 含量与 RU486 组比较, 差异均有显著性意义 ($P < 0.05$)。基质组与空白对照组比较, 子宫腺肌病细胞上清 PGE₂、PGF_{2α} 含量无明显差异 ($P > 0.05$), 说明此浓度范围的基质对子宫腺肌病细胞上清 PGF_{2α} 分泌无影响。

表1 各组子宫腺肌病细胞上清 PGE₂、

PGF_{2α} 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	pg/mL	
		PGE ₂	PGF _{2α}
化瘀止痛方低浓度组	5	48.03 ± 1.64 ^①	801.18 ± 38.51 ^②
化瘀止痛方高浓度组	5	26.90 ± 0.57 ^②	653.03 ± 11.99 ^②
RU486 组	5	1988.95 ± 65.64	3799.91 ± 30.31
基质组	5	3052.33 ± 52.94	3750.89 ± 99.75
空白对照组	5	2866.74 ± 92.43	3830.37 ± 38.53

与空白对照组比较, ① $P < 0.05$; 与 RU486 组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

子宫腺肌病的主要病机为血瘀, 缘于患者多次的孕堕或宫腔操作, 损伤了冲任、胞宫, 气血不调, 功能受损, 经血不循常道, 遂为离经之血, 离经之血蓄积胞宫, 日久而成癥瘕, 血瘀阻滞, 不通则痛。化瘀止痛方全方由三七、五灵脂、没药、延胡索、木香、乌药、香附、白芍、甘草等药物组成, 以化瘀止痛为主, 并佐以理气止痛、缓急止痛、消癥散结, 其缓解子宫腺肌病患者痛经症状的总有效率达 90%^[1]。

前列腺素(PG)是一类具有广泛生理活性的不饱和脂肪酸。其产物包括 PGF_{2α}、PGE₂、PGD₂、PGI₂ 和血栓素 A₂, 均通过 PG 运载体转运出细胞, 并与各自的受体结合, 激活第二信使环磷酸腺苷、肌醇三磷酸和细胞内的信号级联系统而产生自分泌或旁分泌作用。在 PG 受体中, 既有可使平滑肌松弛的“放松”

受体; 又有促进平滑肌收缩的“收缩”受体组, PG 与其受体适量结合来调控子宫的收缩机制。子宫腺肌病内异病灶局部 PG 合成增加为痛经的重要原因, 高表达的 PG 是通过“收缩”受体、“放松”受体导致子宫肌层的收缩、放松异常而发生痛经, 其中 PGF_{2α}、PGE₂ 异常表达是子宫腺肌病痛经发生的主要机制之一。尤其是 PGF_{2α} 为一种血管收缩物质, 其异常增高能引起子宫平滑肌及血管收缩、缺血, 致痉挛性疼痛而发生痛经。

本次研究结果提示化瘀止痛方高、低浓度组细胞上清中 PGE₂、PGF_{2α} 含量呈不同程度的下降, 并且化瘀止痛方高、低浓度组子宫腺肌病细胞上清中 PGF_{2α} 含量呈浓度依赖关系 ($P < 0.05$)。此研究结果表明, 化瘀止痛方降调子宫腺肌病细胞上清中 PGE₂、PGF_{2α} 含量可能是其止痛的主要机理之一, 通过降调子宫肌层 PGE₂、PGF_{2α} 含量而使子宫协调收缩而达到止痛效果。

【参考文献】

- [1] Mehaseb MK, Bell SC, Pringle JH, et al. Uterine adenomyosis is associated with ultrastructural features of altered contractility in the inner myometrium [J]. Fertil Steril, 2010, 93(7): 2130-2136.
- [2] Yeniel O, Cirpan T, Ulukus M, et al. Adenomyosis: prevalence, risk factors, symptoms and clinical findings [J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2007, 34(3): 163-167.
- [3] 李坤寅, 方庆霞. 化瘀止痛方对子宫腺肌病痛经患者 PGF_{2α}、PGE₂、OT 影响的临床研究 [J]. 新中医, 2009, 41(2): 63-65.
- [4] Suzuki-Kakisaka H, Murakami T, Hirano T, et al. Effects of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid on cultured human adenomyosis-derived cells [J]. Fertil Steril, 2007, 87(1): 33-38.
- [5] 刘玉琴. 细胞培养实验手册 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 3-5.

(责任编辑: 马力)