

子宫内膜异位症动物模型中整合素 $\beta 3$ 的表达及中药干预作用的研究

陈瑜¹, 曹大农¹, 李莉²

1. 深圳市中医院, 广东 深圳 518000; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 研究整合素 $\beta 3$ 在子宫内膜异位症大鼠模型中的表达情况, 温经化瘀散结中药复方对整合素 $\beta 3$ 在子宫内膜异位症大鼠模型中表达的干预作用。方法: 将大鼠随机分为4组, 空白对照组、造模对照组、丹那唑组、中药组, 除空白对照组外, 其余3组造模采用自体移植法造模, 进行子宫内膜异位症动物模型实验。空白对照组14只大鼠进行假手术, 开腹后将一侧子宫角结扎, 目的使假手术组达到与造模组均为单侧子宫角的生殖环境。监测模型大鼠的情况及检测模型大鼠及对照组大鼠的血清整合素 $\beta 3$ 和雌二醇(E_2)、孕酮(P)、CA125。自体移植造模手术及假手术后1月始分别给予中药液(温经化瘀散结中药复方)、丹那唑、生理盐水、生理盐水, 每天1次, 连续8周。结果: ①与空白对照组比较, 造模对照组血P下降, CA125轻度升高, 整合素 $\beta 3$ 表达下降($P < 0.05$)。②丹那唑组与造模对照组比较CA125降低明显, 而血P亦降低($P < .05$), 整合素 $\beta 3$ 变化则无统计学差异; 而中药组CA125较造模对照组亦有下降, 与丹那唑组比较, 血 E_2 、P、整合素 $\beta 3$ 明显升高($P < 0.05$)。③中药组 E_2 、P、整合素 $\beta 3$ 与空白对照组比较, 差异均无显著性意义($P < 0.05$)。结论: 整合素 $\beta 3$ 在子宫内膜异位症大鼠模型中的表达较正常大鼠有一定程度的下降。温经化瘀散结中药复方能干预整合素 $\beta 3$ 的表达, 使子宫内膜异位症大鼠模型整合素 $\beta 3$ 表达升高, 亦不会降低子宫内膜异位症大鼠模型 E_2 和P水平, 可能使得妊娠机率提高。

[关键词] 子宫内膜异位症; 动物模型; 整合素 $\beta 3$; 中药; 温经化瘀散结中药复方

[中图分类号] R-332; R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415(2014)06-0207-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.06.098

子宫内膜异位症以盆腔疼痛、月经失调及不孕为主要临床表现, 严重影响患者的生活质量。近年来发病有增高趋势, 育龄妇女的发病率约占10%~15%, 不孕妇女则高达40%~50%。对于轻-中度子宫内膜异位症之不孕症患者, 中医治疗颇具特色, 对改善患者症状效果明显, 且不影响患者受孕。近期研究认为整合素 $\beta 3$ 的表达与子宫内膜异位症的发生机制有一定相关性。为进一步探索其表达与子宫内膜异位症的关系, 本研究以动物实验复制子宫内膜异位症模型, 观测整合素 $\beta 3$ 在子宫内膜异位症中的表达以及温经化瘀散结中药复方的干预作用。现报道如下。

1 材料

1.1 动物 清洁级雌性成熟未交配过的SD大鼠65只, 体重180~220 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物 温经化瘀散结中药复方组成: 茯苓30 g, 桂枝、鳖甲、皂角刺、浙贝母、夏枯草、橘核、山药、老鹤草各20 g, 桑寄生、牡丹皮各15 g, 桃仁、刘寄奴各10 g。由深圳市中医院按方药组成提供免煎中药颗粒20剂。使用时按所需分量将药粉溶于生理盐水3 mL, 配成浓缩液含生药约1.44

g/mL。注: 按人与大鼠等效剂量换算公式: 系数 $K_j = W_i/W_j \times A_j$ (其中 W_i 为人体重, W_j 为大鼠体重, $A_j = 0.018$), $A_j = K_j \times A_i$ (A_j 为大鼠用药量, A_i 为人用药量)^[1]。丹那唑: 江苏扬州制药厂生产, 批号: 20100302。将药粉和适量阿拉伯树胶混合研磨, 用生理盐水定容, 含量为0.16 g/mL。

1.3 器械 注射器、试管、手术器材、冰箱、离心机、大鼠整合素 $\beta 3$ 酶联免疫分析试剂盒(上海信然生物技术有限公司出品)、BIO-TEK全自动酶标仪(产地: 美国; 型号: ELX-800)等。

2 方法

2.1 动物模型的制备 将65只雌性大鼠每天进行阴道细胞涂片检查, 选择动情周期4~5天的大鼠, 随机分为中药组、丹那唑组、造模对照组及空白对照组。在第3个动情周期的动情期, 将大鼠进行自体移植法手术造模及假手术。子宫内膜异位症动物模型造模方法: 手术在无菌条件下, 以1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 然后固定大鼠四肢, 剖腹, 切口长约1.5 cm, 切取右侧宫角处的一段子宫, 长约1 cm, 迅速将其置于生理盐水中, 将子宫内膜与肌层分离, 并剪取2块

[收稿日期] 2013-11-16

[作者简介] 陈瑜(1981-), 女, 主治医师, 主要从事中医妇科临床工作。

[通讯作者] 李莉, E-mail: linxdlili@126.com。

各约 5 mm×5 mm 的内膜组织块,将其分别缝于腹壁上及皮下。缝于腹壁下的内膜组织块上皮层反向对着体壁,将组织块四角缝固在腹壁上;缝于皮下的内膜组织块上皮层反向朝内侧缝合,缝合处与皮肤切缘相距约 0.5 cm。右侧子宫角断端吻合结扎。关腹前予庆大霉素生理盐水溶液冲洗腹腔,最后缝合各层组织,清洁级环境饲养。术后用青霉素粉洒于术口处,每天 1 次,共 3 天。中药组、丹那唑组及造模对照组各 17 只大鼠进行造模。假手术组(空白对照组):14 只大鼠,开腹后将右侧子宫角结扎,其余处理措施同造模大鼠。目的使假手术组达到与造模组均为单侧子宫的生殖环境。

2.2 分组给药及观察动物一般情况 常规饲养 1 月后,分别从中药组、丹那唑组及造模对照组中随机各取 3 只,剖腹观察腹壁与皮下移植植物生长情况(见移植植物形成小泡状,表面有血管增生,内有液体积聚,说明其成活,造模成功)。开腹后第 2 天同组大鼠继续进行以下实验。每只大鼠按 1 mL/100 g 体重开始灌胃给药,4 组分别给予中药、丹那唑、生理盐水、生理盐水,每天 1 次,连续 8 周。第 8 周末,选择在大鼠的动情期取材。实验过程中观察一般情况:活动:有无活动抑制、嗜睡、厌食、旋转、轻瘫等行为异常。粪便、尿液或身体其他排出物有无带血。有无立毛、体毛蓬松、脱发,肿胀、肿块、损伤等情况。有动物死亡,记录死亡数量及原因,考虑中途因灌药或喂养不当等造成动物死亡。

2.3 观测指标 灌胃前第 1 天乙醚吸入麻醉后,眼眶下静脉丛取血。取血 4 mL 分二等分注入 2 个干燥管,离心,取血清,储存于 -20℃ 冰箱备用,用以测雌二醇(E₂)、孕酮(P)、CA125 及整合素 β 3 指标。灌胃后第 8 周末以 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,剖腹观察移植植物生长情况及在腹主动脉采血,各大鼠分别取血 6 mL 分二等分注入 2 个干燥管,离心,取血清,储存于 -20℃ 冰箱备用,用以测 E₂、P、CA125 及整合素 β 3 指标。

2.4 统计学方法 采用 SPSS11.0 软件进行统计分析,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,先以 AVONA 进行方差分析,再用 *t* 检验在分组均值之间做成对比较。

3 结果

3.1 一般情况 造模后各组大鼠均在术后约 2 h 清醒,清醒后 1 h 即可饮水,进食量明显减少;之后可出现精神萎靡,活动减少,立毛,有间断性抽搐现象,最长可持续 30 s,最短持续 10 s,抽搐表现为单侧肢体的震颤,偶有爪部痉挛表现,2 天后逐渐好转,丹那唑组及造模组各有 1 只大鼠因伤口感染、腹水而致死亡(均剔除,不在统计结果之内),其余大鼠伤口愈合良好。存活大鼠二便正常,耳、鼻、口无分泌物,对外界反应正常。随着造模天数的增加,与空白对照组相比,其他各组大鼠均有不同程度的毛发不荣,倦卧少动,耳缘红紫,尾部红紫不清洁,足趾较暗,经灌胃治疗后中药组及丹那唑组足趾紫暗的情况可逐渐减轻。

3.2 灌胃前各组整合素 β 3、CA125、E₂、P 比较 见表 1。中药组、丹那唑组、造模对照组 CA125 均高于空白对照组,差异均有显著性意义($P > 0.05$)。中药组、丹那唑组、造模对照组整合素 β 3 均低于空白对照组,但差异均无显著性意义($P > 0.05$),提示整合素 β 3 在子宫内异位症大鼠模型中的表达较正常大鼠可能有一定程度的下降,但依据不够充分。

表 1 灌胃前各组整合素 β3、CA125、E₂、P 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β3(pg/mL)	CA125(U/L)	E ₂ (ng/L)	P(μg/L)
中药组	14	15.31±1.19	0.52±0.11	14.21±8.77	26.76±7.63
丹那唑组	13	14.52±1.43	0.49±0.11	13.07±4.52	25.98±6.96
造模对照组	13	16.50±2.72	0.48±0.09	14.75±1.70	27.96±3.31
空白对照组	14	18.03±7.81	0.09±0.07	15.67±5.21	30.50±9.01

与空白对照组比较,① $P < 0.05$

3.3 灌胃后各组整合素 β 3、CA125、E₂、P 指标比较 见表 2。灌胃后丹那唑组 CA125 比造模对照组降低,差异有显著性意义($P < 0.05$)。中药组 CA125 比造模对照组轻微降低,差异无显著性意义($P > 0.05$),提示中药治疗对内异位症的控制效果可能不如丹那唑。中药组整合素 β 3 高于造模对照组,差异有显著性意义($P < 0.05$),丹那唑组整合素 β 3 低于造模对照组,差异无显著性意义($P > 0.05$),提示血清整合素 β 3 不能反映子宫内异位症的治疗效果。中药组整合素 β 3 亦高于丹那唑组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。中药组 E₂、P 高于丹那唑组和造模对照组,差异均有显著性意义($P < 0.05$),丹那唑组 P 低于造模对照组,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表 2 灌胃后各组整合素 β3、CA125、E₂、P 指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	β3(pg/mL)	CA125(U/L)	E ₂ (ng/L)	P(μg/L)
中药组	14	18.93±1.94	0.14±0.11	26.33±3.05	35.42±7.18
丹那唑组	13	12.78±1.74	0.05±0.07	15.31±2.23	18.03±3.03
造模对照组	13	14.40±2.52	0.24±0.09	14.95±2.52	27.34±8.13
空白对照组	14	17.22±2.26	0.11±0.09	29.12±12.22	33.61±6.38

与丹那唑组比较,① $P < 0.05$;与造模对照组比较,② $P < 0.05$

3.4 2 组灌胃前后各项指标比较 见表 3。中药组灌胃后 P、E₂ 较灌胃前水平升高,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。丹那唑组灌胃后 P 较灌胃前水平下降,差异有显著性意义($P < 0.05$)。中药组灌胃后整合素 β 3 较灌胃前水平升高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。中药组、丹那唑组灌胃后 CA125 较灌胃前水平均有下降,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

4 讨论

4.1 温经化痰散结中药复方的功效探讨 本实验所选用的温经化痰散结中药复方为桂枝茯苓丸所化裁,为本院妇科曹大农主任医师经过长期的临床实践总结所得之经验方。此方瘀痰虚同治,配合通络,以温经化痰为主,温清补消并用,共奏散结

表 3 2 组灌胃前后各项指标比较($\bar{x} \pm s$)

时 间	中药组				丹那唑组			
	E ₂ (ng/L)	P(μg/L)	β3(pg/mL)	CA125(U/L)	E ₂ (ng/L)	P(μg/L)	β3(pg/mL)	CA125(U/L)
灌胃前	14.21±8.77	26.76±7.63	15.31±1.19	0.52±0.11	15.07±4.52	25.98±6.96	14.52±1.43	0.49±0.11
灌胃后	26.33±3.05	35.42±7.18	18.93±1.94	0.14±0.11	15.31±2.23	18.03±3.03	12.78±1.74	0.05±0.07

与灌胃前比较, ① $P < 0.05$

消癥之效。历代医家普遍认为“瘀血阻滞胞宫、冲任”是子宫内位症的基本病机。曹大农主任医师认为肾虚瘀痰互结是子宫内位症发病的重要环节之一。温经化瘀散结中药复方用以治疗子宫内位症临床疗效确切, 有效改善患者因子宫内位症所致的疼痛、不孕等状况。此方中老鹤草之使用颇有特色, 临床尚常用之治疗慢性盆腔炎、输卵管积水、附件囊肿等患者。《纲目拾遗》中云此药“去风, 疏经活血, 健筋骨, 通络脉”, 《滇南本草》中云此药“性微温, 味苦辛”, 可用“治妇人经行受寒, 月经不调, 经行发热, 腹胀痛, 不能受孕”。子宫内位症患者瘀血痰凝日久可影响经络的顺畅, 亦可致肾虚, 肾虚必然影响受孕。温经化瘀散结中药复方是在温经活血、散结通络的基础上加入补益肝肾之品来治疗子宫内位症, 有效改善血瘀的病机, 温阳利于排卵的发生所需要的阳气鼓动, 补肾利于孕卵着床和发育。

4.2 整合素 β3 在子宫内位症动物模型中的表达及中药干预 血清整合素 β3 在造模对照组中的表达低于空白对照组。由此认为, 子宫内位症的发生和血清整合素 β3 表达的下降有一定的联系。经治疗后, 丹那唑组血清整合素 β3 表达下降, 而中药组血清整合素 β3 表达升高并与空白对照组无统计学差异。提示血清整合素 β3 不能反映子宫内位症的治疗效果。

有研究认为, 整合素 β3 可作为子宫内位容受性的标志, 其表达时间与胚胎着床窗开启时间一致, 是胚胎定位、黏附必不可少的因素^[2]。整合素 β3 的表达下降, 致使子宫内位的容受性降低, 接受胚胎能力降低, 母体对胚泡黏附功能不全, 细胞外基质代谢能力紊乱, 子宫内位与胚泡发育不协调, 阻碍胚泡正常植入, 着床失败, 从而不孕。故整合素 β3 的表达与妊娠的成功率密切相关, 整合素 β3 降低可能是子宫内位症患者不孕的原因之一。本研究通过检测血清整合素 β3 来研究其在子宫内位症大鼠模型中的表达。经治疗后中药组血清整合素 β3 表达高于丹那唑组, 故认为中药组大鼠模型子宫内位容受性胜于丹那唑组大鼠模型, 从而妊娠机率亦有可能相应提高。而中药组整合素 β3 表达与造模对照组相比升高, 提示经中药治疗后子宫内位症的低表达情况有所改善。

4.3 子宫内位症动物模型 CA125 及 E₂、P 的检测意义及中药干预 有文献资料报道, 血清 CA125 测定对子宫内位症有较理想的诊断价值^[3-5]。检测 CA125 对评价子宫内位

位症治疗疗效具有一定意义。研究结果显示, CA125 测定可用于监测内位症病变活动情况, 若药物或手术治疗有效时 CA125 下降, 复发时又升高^[6]。本实验结果表明, 造模对照组 CA125 较空白对照组轻度升高, 经药物治疗后, 丹那唑组大鼠与中药组大鼠 CA125 均比造模对照组降低, 说明丹那唑与中药都对内位症控制有效。雌、孕激素协同调节胚胎着床前子宫内位的容受状态, 其中孕激素是容受状态不可缺少的激素。子宫内位症患者不孕率高达 40%~50%, 其卵巢功能异常, 卵泡发育不良、排卵障碍、黄体形成不良是其受孕率低的重要原因之一。本实验结果表明, 灌胃后丹那唑组 P 与灌胃前比较, 下降明显, 提示经丹那唑治疗后, 孕激素水平下降, 子宫内位难以向分泌型转化, 不利于孕卵的着床, 难以维持妊娠。中药组灌胃后 E₂、P 水平均高于灌胃前, 灌胃后与造模对照组相比亦有明显提高, 与空白对照组相比无统计学差异, 灌胃后中药组 E₂、P 水平明显优于丹那唑组, 说明中药治疗子宫内位症不影响患者的内分泌生理, E₂、P 水平接近正常水平可以为受孕提供有效的激素支持, 使得妊娠率相应提高。

综上所述, 温经化瘀散结中药复方治疗子宫内位症尤其是轻中度伴不孕患者相比起西药更有优势。

[参考文献]

- [1] 熊远珍. 实验动物与人用药量的新换算[J]. 江西医学院学报, 1994, 4(7): 41.
- [2] Greus M. Integrin expression in normal and out-of-phase endometria [J]. Hum Reprod, 1998, 13 (12): 3460-3468.
- [3] McBean JH, Brumsted JR. In vitro CA125 secretion by endometrium from women with advanced endometriosis[J]. Fertile Steril, 1993, 95(1): 891.
- [4] 巫云. 血清 CA125 检测对子宫内位症临床诊断价值[J]. 交通医学, 2003, 17(5): 5351.
- [5] 曹立幸, 韩冰, 李同玺, 等. 妇痛宁对大鼠子宫内位症 CA125 水平影响的实验研究[J]. 福建中医学院学报, 2003, 13(5): 31.
- [6] 乐杰. 子宫内位症和子宫腺肌病妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001.

(责任编辑: 马力)