

花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠子宫的保护作用

岳明¹, 全敏^{1*}, 马丽², 张恩户², 卢健¹

1. 咸阳市中心医院, 陕西 咸阳 712000

2. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 探讨花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠模型子宫的保护作用。**方法** 采用米非司酮联合米索前列醇建立大鼠功能失调性子宫出血模型。随机分为模型组、宫血宁胶囊(0.13 g/kg)组以及花仙宫血胶囊 0.23、0.46、0.92 g/kg 组, 每组各 10 只。对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 其余各组于受孕第 5 天开始给药, 每天给药 1 次, 体积均为 10 mL/kg, 连续给药 10 d。于末次给药后, 次日处死大鼠, 迅速摘取子宫、卵巢, 计算脏器系数。采用固相夹心法酶联免疫吸附实验进行检测内膜血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达水平; 观察 HE 染色后子宫组织形态学的变化。**结果** 花仙宫血胶囊 0.23、0.46、0.92 g/kg 对子宫和卵巢指数均有增加趋势, 但无显著性差异。花仙宫血胶囊 0.46、0.92 g/kg 明显升高子宫组织的 VEGF 表达水平 ($P < 0.01$), 0.23、0.46、0.92 g/kg 明显降低子宫组织的 MMP-1 表达水平 ($P < 0.01$)。花仙宫血胶囊对间质纤维结缔组织增生和炎细胞浸润有所改善, 甚至可见新生血管。**结论** 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠具有显著的子宫保护作用, 其作用机制与促进性器官的生长和成熟, 调节子宫内膜 VEGF、MMP-1 表达水平有关。

关键词: 花仙宫血胶囊; 功能失调性子宫出血; 子宫; VEGF; MMP-1; 保护作用

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)01-0015-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.004

Protection of Huaxian Gongxue Capsules on uterus in dysfunctional uterine bleeding rats

YUE Ming¹, TONG Min¹, MA Li², ZHANG En-hu², LU Jian¹

1. Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, China

2. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: **Objective** To discuss the protective effect of Huaxian Gongxue Capsules on uterus in dysfunctional uterine bleeding rats. **Methods** Dysfunctional uterine bleeding rat models were induced by misoprostol and mifepristone. Rats were randomly divided into model group, Gongxuening Capsules (0.13 g/kg) group, and Huaxian Gongxue Capsules (0.23, 0.46, and 0.92 g/kg) groups, and each group had 10 rats. Rats in the control and model group were given the same volume of water. The rest groups were ig administrated with the volume of 10 mL/kg from 5th day of pregnancy, first daily, and were treated for 10 d. After the last administration, rats were killed on the next day, and the uterus and ovaries were quickly removed, and the organ coefficient was calculated. The expressions of VEGF and MMP-1 in endometrium were detected by solid phase sandwich ELISA. Morphologic changes of uterus were observed after HE staining. **Results** Huaxian Gongxue Capsules could increase the index of uterus and ovary, but there was no significant difference. Huaxian Gongxue Capsules (0.46 and 0.92 g/kg) could significantly increase the levels of VEGF ($P < 0.01$) and Huaxian Gongxue Capsules (0.23, 0.46, and 0.92 g/kg) could decrease the levels of MMP-1 ($P < 0.01$). The proliferation of connective tissue and inflammatory cell infiltration in the interstitial fiber in Huaxian Gongxue Capsules groups were improved, and even the new blood vessels were visible. **Conclusion** Huaxian Gongxue Capsules have remarkable protection on uterus in dysfunctional uterine bleeding rats, and the mechanism is related to growth and maturation of sexual organs and the regulation of expression of VEGF and MMP-1 in the endometrium.

Key words: Huaxian Gongxue Capsules; dysfunctional uterine bleeding; uterus; VEGF; MMP-1; protective effect

收稿日期: 2017-09-12

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2012JM4016)

作者简介: 岳明(1984—), 女, 硕士, 主管中药师, 研究方向: 药理学。Tel: 13149101545 E-mail: yiniyia@163.com

*通信作者 全敏, 副主任药师。E-mail: 258270171@qq.com

花仙宫血胶囊为我院临床用药协定处方, 经过研究已成功开发成为医疗机构院内制剂。花仙宫血胶囊由益母草、仙鹤草、地锦草等8味中药组成, 具有化瘀补肾、止血调经的功效, 用于证属血瘀肾虚型功能性子宫出血、崩漏、月经过多、痛经。功能失调性子宫出血是指下丘脑-垂体-卵巢轴神经内分泌调节机制失常所致的子宫异常出血。本课题组前期研究证实, 花仙宫血胶囊具有良好的止血、镇痛作用, 可调节雌孕激素水平, 同时对子宫平滑肌收缩活动具有明显的增强作用^[1-3]。为了进一步观察花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血的子宫保护作用机制, 本实验采用米非司酮联合米索前列醇造成子宫出血大鼠模型, 复制临床疾病, 为花仙宫血胶囊的临床应用提供参考。

1 实验材料

1.1 动物

SD大鼠, 其中雌性体质量200~220 g, 雄性体质量280~300 g, 购自西安交通大学实验动物中心, 合格证号SCXK(陕)2012-003。

1.2 药品

花仙宫血胶囊, 规格0.5 g/粒, 相当于原药材1.72 g/粒, 由咸阳市中心医院制剂室生产, 批准文号为陕药监制字[2002]第1121号, 批号170113; 宫血宁胶囊, 规格0.13 g/粒, 云南白药集团股份有限公司生产, 批号ZDA1601; 米索前列醇片, 规格0.2 mg/片, 华润紫竹药业有限公司生产, 批号43161003; 米非司酮片, 规格25 mg/片, 华润紫竹药业有限公司生产, 批号431610111。

1.3 试剂

4%多聚甲醛固定液(博士德生物, 批号11K17B69); 水合氯醛(上海山浦化工有限公司); VEGF抗体(批号10371-2-AP, Proteintech公司); MMP-1抗体(批号WL00009b, Wanleibio公司); 生物素化山羊抗兔IgG(批号A0277, 碧云天公司)。

1.4 主要仪器

XDS-1B倒置生物显微镜; UV-2550紫外可见分光光度计; 分析电子天平; TDL-80-2B离心机; U-2550紫外分光光度计。

2 方法

2.1 模型的建立

将成熟未生育的SD雌性大鼠与雄性大鼠, 以2:1合笼, 次日8:00阴道涂片检查, 以发现精子

为妊娠第1天。第7天8:00 ig米非司酮片8.3 mg/kg, 18:00 ig米索前列片100 μg/kg, 造成早孕雌性大鼠不完全流产, 即得功能失调性子宫出血模型^[4]。

2.2 分组和给药

模型大鼠50只随机分为模型组、宫血宁胶囊(0.13 g/kg)组以及花仙宫血胶囊0.23、0.46、0.92 g/kg组, 每组各10只。除对照组外, 各组在第7天8:00 ig米非司酮片8.3 mg/kg, 18:00 ig米索前列片100 μg/kg。对照组和模型组ig等体积蒸馏水, 其余各组于受孕第5天开始给药, 每天给药1次, 体积均为10 mL/kg, 连续给药10 d。

宫血宁胶囊用蒸馏水配制成13 mg/mL混悬液, 花仙宫血胶囊用蒸馏水制成92、46、23 mg/mL混悬液。根据动物与人的换算剂量, 宫血宁胶囊用蒸馏水制成13 mg/mL混悬液, 相当于10倍成人日剂量; 花仙宫血胶囊用蒸馏水制成92、46、23 mg/mL混悬液, 相当于12、6、3倍成人日剂量。

2.3 观察指标

于末次给药后, 次日脱颈椎处死大鼠, 迅速摘取子宫、卵巢, 并称定质量, 计算脏器系数。

称定质量后的子宫, 用10%福尔马林固定、石蜡包埋, 切片, 一部分采用固相夹心法酶联免疫吸附实验进行检测, 试剂盒测定血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶-1(MMP-1)表达水平。另一部分用于HE染色, 光学显微镜下观察子宫组织形态学的变化。

2.4 统计学方法

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0统计分析, 组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠脏器指数的影响

花仙宫血胶囊0.23、0.46、0.92 g/kg组与模型组比较, 子宫和卵巢指数均有增加趋势, 但无显著性差异, 提示花仙宫血胶囊能促进大鼠性器官的生长和成熟, 促进子宫和卵巢发育。结果见表1。

3.2 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠子宫组织VEGF和MMP-1表达水平的影响

与模型组比较, 花仙宫血胶囊0.46、0.92 g/kg组子宫组织的VEGF表达水平明显升高($P < 0.01$)。花仙宫血胶囊0.23、0.46、0.92 g/kg组子宫组织的MMP-1表达水平明显降低($P < 0.01$)。结果见表2。

表 1 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Huaxian Gongxue Capsules on viscera index in dysfunctional uterine bleeding rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脏器指数/(g·100 g ⁻¹)	
		子宫	卵巢
对照	—	0.215 8±0.064 4	0.054 2±0.009 1
模型	—	0.176 2±0.013 1	0.052 8±0.004 5
宫血宁胶囊	0.13	0.184 1±0.041 4	0.057 9±0.008 9
花仙宫血胶囊	0.23	0.189 6±0.044 8	0.060 0±0.009 1
	0.46	0.181 5±0.029 6	0.061 8±0.008 6
	0.92	0.185 1±0.033 1	0.059 3±0.007 1

表 2 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠子宫组织 VEGF 和 MMP-1 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Huaxian Gongxue Capsules on levels of VEGF and MMP-1 in dysfunctional uterine bleeding rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	VEGF 平均吸光度值	MMP-1 平均吸光度值
对照	—	0.006 011±0.001 425	0.002 716±0.000 888
模型	—	0.005 418±0.000 979 [#]	0.021 591±0.002 561 ^{##}
宫血宁胶囊	0.13	0.010 878±0.002 751 ^{**}	0.009 346±0.001 327 ^{**}
花仙宫血胶囊	0.23	0.005 939±0.000 841	0.017 695±0.002 835 ^{**}
	0.46	0.010 118±0.002 219 ^{**}	0.011 273±0.002 652 ^{**}
	0.92	0.011 373±0.002 263 ^{**}	0.006 464±0.001 291 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.3 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠子宫组织形态学的影响

对照组子宫结构层次分明, 子宫内膜单层柱状上皮有序列, 固有层基质细胞形态正常, 血管数量未见异常, 未见炎性细胞浸润, 网状纤维排列有序, 未见病理改变。模型组子宫内膜上皮细胞未见明显改变, 固有层间质可见细胞增生, 可见血管扩张, 间质纤维化明显, 伴有较为明显的炎性细胞浸润, 固有层增厚明显。宫血宁胶囊组子宫内膜上皮柱状细胞相对改变不显著, 固有层腺体细胞无明显病理变化, 基质细胞略有增生, 少量纤维结缔组织增生, 可见少量新生血管。花仙宫血胶囊 0.23 g/kg 组子宫内膜上皮柱状细胞变性坏死, 凋落, 固有层略减纤

维样变和增生, 血管扩张不甚明显, 可见明显的炎性细胞浸润至肌层, 但轻于模型组。花仙宫血胶囊 0.46 g/kg 组子宫内膜柱状上皮细胞轻度变性, 固有层腺体上皮细胞略有变性, 纤维结缔组织增生较为明显, 血管轻微扩张, 伴有少量炎性细胞浸润。花仙宫血胶囊 0.92 g/kg 组子宫内膜上皮细胞病变不明显, 固有层少量细胞变性并伴有增生, 腺体改变不明显, 少量纤维结缔组织增生, 可见新生血管。

病理切片显示: 复制的子宫病变主要表现为固有层间质细胞增生, 间质血管扩张, 间质纤维化, 炎性细胞浸润。使用花仙宫血胶囊后间质纤维结缔组织增生和炎细胞浸润有所改善, 甚至可见新生血管。结果见图 1。

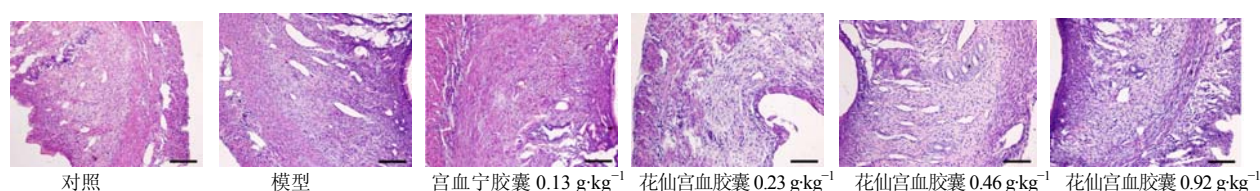


图 1 花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血大鼠子宫形态学的影响

Fig. 1 Effect of Huaxian Gongxue Capsules on uterine pathological examination in dysfunctional uterine bleeding rats

4 讨论

功能失调性子宫出血是临床上的常见病、多发病和疑难病,国外报道其发病率为22%^[5]。其病理机制普遍认为是由于下丘脑-垂体-卵巢功能失调所致。

实验动物的内脏器官质量和脏器指数是主要生物学特性之一,可用来衡量和反映动物的功能状态,生殖器官在一定程度上能反映药物的作用。组织形态学可研究疾病的病理、发病机制、发展的规律及药物治疗后疾病的发生发展。本实验复制功能失调性子宫出血模型大鼠,结果显示花仙宫血胶囊组与模型组比较,子宫和卵巢指数均有增加趋势,提示花仙宫血胶囊能促进大鼠性器官的生长和成熟,在一定程度上促进子宫和卵巢发育。子宫组织形态学结果表明使用花仙宫血胶囊后间质纤维结缔组织增生和炎细胞浸润有所改善,甚至可见新生血管。提示花仙宫血胶囊在一定程度上具有性激素样和抗炎作用,能促进子宫内膜的复旧和愈合。

有研究表明^[6-7],功能失调性子宫出血在激素作用下,子宫局部微环境发生改变。在众多子宫内膜止血环节中,上皮和血管的再生是其彻底终止的重要机制,血管生成是子宫内膜修复的最基本因素,受到不同生长因子的调节,其中以bFGF、VEGF及其受体最为重要^[8-11]。而基质金属蛋白酶家族(MMPs)在生理状态下参与胚胎形成、新生血管的形成、伤口的愈合。有研究报道^[9],子宫内膜MMP-1水平明显升高可能与子宫异常出血有关。本实验结果表明,花仙宫血胶囊组与模型组比较,能明显增加功能失调性子宫出血模型大鼠子宫组织VEGF表达水平,明显降低MMP-1表达水平,提示花仙宫血胶囊修复子宫内膜的机制与其增加VEGF、降低MMP-1表达水平有关。

本实验结果表明,花仙宫血胶囊对功能失调性子宫出血子宫保护的作用机制与其促进性器官的生长和成熟,调节子宫内膜VEGF、MMP-1表达水平

有关,在一定程度上具有性激素样和抗炎作用,能促进子宫内膜的复旧和愈合。

参考文献

- [1] 卢健, 吴琳, 张恩户, 等. 花仙宫血胶囊对雌性大鼠动情周期及生殖内分泌的影响 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(2): 159-160.
- [2] 卢健, 张恩户, 吴琳, 等. 花仙宫血胶囊对药物致不完全流产大鼠子宫出血量的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(5): 21-23.
- [3] 全敏, 卢健, 赵勤, 等. 花仙宫血胶囊治疗功能性子宫出血的研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(3): 101-103.
- [4] 王晓东, 赵军宁, 张白嘉, 等. 药物致早孕大鼠子宫出血模型的建立 [J]. 中国药理学通报, 1999, 15(2): 182-184.
- [5] Chen B H, Ciudice L C. Dysfunctional uterine bleeding [J]. *West J Med*, 1998, 169(5): 280.
- [6] Swasti U. Role of endoscopy in the management of dysfunctional uterine bleeding (DUB) [J]. *Apollo Med*, 2006, 3(4): 376-380.
- [7] 张志革, 姚莉芸. 血管内皮生长因子及其受体与功能失调性子宫出血的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 18(13): 2005-2007.
- [8] Bhardwaj S, Roy H, Babu M, et al. Adventitial gene transfer of VEGFR-2 specific VEGF-E chimera induces MCP-1 expression in vascular smooth muscle cells and enhances neointimal formation [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 219(1): 84-91.
- [9] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E [J]. *Endothelium*, 2006, 13(2): 63-69.
- [10] 金巧凤, 赖爱鸾. 功能失调性子宫出血子宫内膜组织中VEGF、Ang-2的表达变化与意义 [J]. 北京医学, 2010, 32(11): 877-879.
- [11] 李清雪, 白凤楼, 杜惠兰, 等. 无排卵性功能失调性子宫出血子宫内膜VEGF、bFGF、TNF- α 及其受体与血清生殖激素的表达及意义 [J]. 陕西中医, 2011, 32(11): 1443-1444.