

调经赞育丸对戊酸雌二醇诱导的大鼠无排卵型功能失调性子宫出血的改善作用

王婧婧¹, 王 张^{2*}

1. 成都市第七人民医院 妇产科, 四川 成都 610041

2. 成都中医药大学 民族医药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 探讨调经赞育丸对大鼠无排卵型功能失调性子宫出血的改善作用及其作用机制。**方法** 将雌性SD大鼠随机分为对照组、模型组。模型组大鼠 ig 戊酸雌二醇 2.8 mg/(kg·d), 对照组 ig 等容积生理盐水, 连续3周。再将模型组大鼠随机分为模型组、肾上腺色腙组和调经赞育丸 155、310、620 mg/kg 组, 每组各10只。给药组均按 10 mL/kg 的 ig 相应药物, 对照组、模型组 ig 等体积的生理盐水, 连续7 d。计算各组大鼠的子宫系数, 采用酶联免疫吸附法测定大鼠血清中雌二醇和孕酮水平。观察子宫内膜组织病理学形态, 并采用免疫组化法检测子宫内膜组织中 VEGF 表达。**结果** 与模型组比较, 调经赞育丸 620 mg/kg 组大鼠的子宫系数均明显升高 ($P < 0.05$); 各给药组大鼠血清中雌二醇和孕酮水平均没有明显变化。与模型组比较, 调经赞育丸 620 mg/kg 组大鼠的子宫内膜增生病理改变均明显减轻 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 调经赞育丸 310、620 mg/kg 组大鼠子宫内膜组织血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达量均明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)。**结论** 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血具有明显的改善作用, 其机制可能与升高子宫内膜 VEGF 蛋白表达量有关。

关键词: 调经赞育丸; 戊酸雌二醇; 无排卵型功能失调性子宫出血; 子宫内膜增生; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)04-0955-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.04.015

Improvement of Tiaojing Zanyu Pills on anovulatory dysfunctional uterine bleeding induced by estradiol valerate in rats

WANG Jing-jing¹, WANG Zhang²

1. Department of Gynaecology and Obstetrics, the Seventh People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610041, China

2. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To investigate the improvement and mechanism of Tiaojing Zanyu Pills on anovulatory dysfunctional uterine bleeding induced by estradiol valerate in rats. **Methods** Female SD rats were randomly divided into control and model group. Rats in the model group were ig administered with estradiol valerate 2.8 mg/(kg·d). Rats in the control group were given normal saline with equal volume for 3 weeks. Then the rats in the model group were randomly divided into model group, carbazochrome group, and Tiaojing Zanyu Pills (155, 310, and 620 mg/kg) group, and each group had 10 rats. The administration groups were given corresponding drugs at the volume of 10 mL/kg, while the control and the model group were given normal saline at the same volume for 7 d. Uterine coefficients of rats in each group were calculated. Serum estradiol and progesterone levels were measured by ELISA. The histopathological morphology of endometrium was observed, and the VEGF expression in the endometrium was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the model group, the uterine coefficient in Tiaojing Zanyu Pills (620 mg/kg) group were significantly increased ($P < 0.05$). The levels of estradiol and progesterone in each group were not significantly changed. Compared with the model group, the pathological changes of endometrial hyperplasia in Tiaojing Zanyu Pills (620 mg/kg) group were significantly alleviated ($P < 0.05$). Compared with the model group, the VEGF expression in Tiaojing Zanyu Pills (310, 620 mg/kg) group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Tiaojing Zanyu Pills has a significant effect on improvement of anovulatory dysfunctional uterine bleeding, and its mechanism may be related to increasing expression of VEGF in the endometrium.

Key words: Tiaojing Zanyu Pills; estradiol valerate; anovulatory dysfunctional uterine bleeding; endometrial hyperplasia; VEGF

收稿日期: 2019-01-23

作者简介: 王婧婧 (1981—), 女, 四川自贡人, 主治医师, 主要从事妇产科常见病、多发病的临床诊疗和研究工作。E-mail: 36389509@qq.com

*通信作者 王 张 (1980—), 男, 重庆荣昌人, 副研究员, 博士, 主要从事中药药理研究。E-mail: wzcqcd@163.com

调经赞育丸由人参、韭菜子、当归、蛇床子、益母草、川芎、薏苡仁、蟾酥等组成,具有补益肾气、调经赞育等功效,临床上主要用于女性肾阳虚损、月经紊乱、痛经、性欲减退、功能性不孕症等症,属于虚实夹杂,以虚为主的病证。针对肾的阴阳亏虚,应阴阳双补^[1],正如张景岳《景岳全书》曰:“善补阳者,必于阴中求阳,则阳得阴助而生化无穷;善补阴者,必于阳中求阴,则阴得阳升而泉源不竭。”调经赞育丸方中人参、韭菜子补益肾气,助肾阳,共为君药;当归、益母草、川芎活血调经,兼补气血为臣;蛇床子、薏苡仁、蟾酥以通络,为佐使之剂。全方共凑补益肾气、调经赞育之功。

正常女性的月经周期为 24~35 d,经期持续 2~7 d,平均失血量为 20~60 mL,凡不符合上述标准的均属异常子宫出血^[2]。功能失调性子宫出血可分为无排卵型功能失调性子宫出血和排卵型功能失调性子宫出血,其中前者多见于绝经过渡期女性和青春期女性。雌激素撤退性出血是子宫内膜在长期、大量和持续的雌激素刺激而无孕激素拮抗情况下异常增生,组织结构不稳定,因多数生长卵泡退化闭锁,致雌激素水平急剧下降,内膜失去雌激素支持而剥脱出血。雌性未成年大鼠在全周期持续外源性雌激素干预后,子宫内膜多呈增生改变,与无排卵型功能失调性子宫出血时雌激素撤退性出血病理机制相似^[3],故本实验通过雌激素长期刺激建立未成年大鼠无排卵型功能失调性子宫出血模型,验证临床使用调经赞育丸治疗月经紊乱的药理学基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LG15-W 高速微量离心机(北京医用离心机厂); Multiskan Mk3 酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司); BA200Digital 数码三目摄像显微摄像系统(麦克奥迪实业集团有限公司); PHY-III病理组织漂烘仪(常州市中威电子仪器有限公司); Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.2 试药

调经赞育丸,装胶囊服用,成都中医药大学自制,每粒装 0.31 g 素丸,产品批号 20180320; 肾上腺色腺片(江苏亚邦爱普森药业有限公司生产,规格 5 mg/片,产品批号 1805002); 戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司广州分公司分包装,规格 1 mg/片,产品批号 352A); Rat E2 ELISA Kit (Abcam

生产,鑫乐生物进口分装,规格 96 孔/盒,货号 xl-ER0478); Rat PROG ELISA Kit (Abcam 生产,鑫乐生物进口分装,规格 96 孔/盒,货号 xl-ER0477); VEGF (目的基因一抗,兔多克隆抗体),北京博奥森生物技术有限公司,浓度 1:100,货号 bs-1665R; 山羊抗兔工作液、柠檬酸盐缓冲液、正常山羊血清和浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中衫金桥生物有限公司。

1.3 实验动物

雌性 SD 大鼠,SPF 级,80 只,4 周龄,体重 60~70 g,由成都达硕实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK(川)2015-030,实验动物质量合格证号 51203500005016。动物饲养于成都中医药大学温江校区科技楼,实验动物使用许可证号 SYXK(川)2014-124。

2 方法

2.1 动物造模

将大鼠随机分为对照组 15 只、模型组 65 只。模型组 ig 戊酸雌二醇 2.8 mg/(kg·d)^[4],对照组 ig 等容积生理盐水,连续 3 周,并于第 3 周连续镜检观察大鼠阴道脱落上皮细胞涂片,剔除模型组中阴道角化率呈周期性变化的大鼠 15 只以及剔除对照组中阴道角化率不呈周期性变化的大鼠 5 只。

2.2 动物给药和处置

调经赞育丸成人(均以 50 kg 计,后同)日用剂量为 3.10 g 素丸,即 62 mg 素丸/(kg·d),进而将大鼠的低、中(亦即等效剂量,后同)、高剂量依次设置为 155、310、620 mg 素丸/(kg·d),分别相当于成人日用剂量的 2.5、5、10 倍。肾上腺色腺片成人剂量为 12.5 mg/d,即 0.25 mg/(kg·d),进而将大鼠的剂量设置为 1.25 mg/(kg·d),相当于成人日用剂量的 5 倍。

将上述模型组大鼠再随机分为模型组、肾上腺色腺组和调经赞育丸 155、310、620 mg/kg 组,每组各 10 只。给药组均按 10 mL/kg 的 ig 体积给予相应药物,对照组、模型组 ig 等体积的生理盐水,连续 7 d。次日用水合氯醛麻醉,腹腔动脉取血,脱颈椎处死,取子宫待检查。

2.3 子宫系数的计算

按照公式子宫系数=子宫质量(mg)/大鼠体质量(g)计算子宫系数。

2.4 血清性激素水平测定

采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法

(ELISA) 测定大鼠血清中雌二醇、孕酮水平。

2.5 子宫内膜组织病理学观察

将子宫置于 10% 甲醛溶液中固定, 全自动脱水机脱水、修剪、石蜡包埋、HE 染色、制作切片、封片等, 最后镜检。采用显微摄像系统对切片进行图像采集, 观察具体病变。参考文献报道方法^[5], 观察子宫内膜是否完整, 有无增生、萎缩、充血水肿和变性坏死, 有无炎性细胞浸润, 上皮细胞排列是否整齐、有无增厚、脱落变性, 肌层厚度、平滑肌细胞体积有无增大或缩小, 浆膜层是否异常, 子宫内膜上皮细胞内是否出现空泡、内含有少量细胞碎片。若没有病变, 则记录为 (-); 若有病变, 则再分为轻度 (+)、中度 (++)、重度 (+++)。

2.6 子宫内膜组织中 VEGF 表达 (免疫组化法)

子宫标本均按病理检验 SOP 程序进行操作; 采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的吸光度值和面积, 计算每张图像的平均吸光度值, 使用 3 张图像的平均吸光度值再计算均数, 得出每例样本的平均吸光度值。检测结果阴性细胞呈蓝色, 底物呈白色, 阳性细胞呈黄色或棕黄色, VEGF 阳性产物主要分布在细胞浆、细胞间质^[6]。

2.7 统计学处理

运用 SPSS 17.0 for windows 软件提供的独立样本 *t* 检验或单因素方差分析进行两组或多组数据之间的均数差异的显著性检验。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 Levene 检验进行方差齐性检验, 当 $P > 0.05$ 时, 表明方差齐, 观察相应的 *t* 检验或 LSD 检验的 *P* 值; 当 $P < 0.05$ 时, 表明方差不齐, 观察相应的 *t* 检验或 Tamhane's T2 检验的 *P* 值。等级资料采用上述软件提供的非参数检验中的 Mann-Whitney 检验法进行组间的差异性比较。

3 结果

3.1 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫系数的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的子宫系数明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 肾上腺色腺组、调经赞育丸 620 mg/kg 组大鼠的子宫系数均明显升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.2 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠血清雌激素和孕激素水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中雌二醇水平无明显差异, 说明外源性雌激素拆除后, 血清中雌二醇水平回归正常范围; 与模型组比较, 各给药组

大鼠血清中雌二醇水平均无明显变化。与对照组比较, 模型组大鼠血清孕酮水平无明显差异, 说明大鼠血清中孕酮水平处于较低水平。与模型组比较, 各给药组大鼠血清孕酮水平均无明显变化, 见表 2。

表 1 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Tiaojing Zanyu Pills on uterine coefficient of anovulatory dysfunctional uterine bleeding in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	子宫系数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	2.85 ± 0.23
模型	—	1.98 ± 0.52 ^{##}
肾上腺色腺	1.25	2.56 ± 0.41 [*]
调经赞育丸	155	2.02 ± 0.35
	310	2.22 ± 0.47
	620	2.63 ± 0.29 [*]

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

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

表 2 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠血清雌激素和孕激素的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Tiaojing Zanyu Pills on serum estradiol and progesterone of anovulatory dysfunctional uterine bleeding in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	雌二醇/(ng·L ⁻¹)	孕酮/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	164.45 ± 18.72	5.29 ± 0.24
模型	—	158.23 ± 21.49	5.01 ± 0.58
肾上腺色腺	1.25	168.47 ± 19.88	4.99 ± 0.42
调经赞育丸	155	154.75 ± 14.71	5.25 ± 0.73
	310	160.20 ± 20.16	4.97 ± 0.85
	620	161.22 ± 14.62	5.13 ± 0.51

3.3 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫组织病理学的影响

对照组大鼠子宫内膜完整, 未见增生、萎缩、充血水肿和变性坏死, 无炎性细胞浸润, 上皮细胞排列整齐、无增厚、脱落变性, 肌层较厚、平滑肌细胞体积无增大或缩小, 浆膜层未见异常。与对照组比较, 模型组大鼠子宫内膜多见水肿和少量上皮细胞变性和坏死 ($P < 0.01$), 即呈现子宫内膜增生病理改变; 与模型组比较, 肾上腺色腺组、调经赞育丸 620 mg/kg 组大鼠的子宫内膜增生均明显减轻 ($P < 0.05$), 见图 1、表 3。

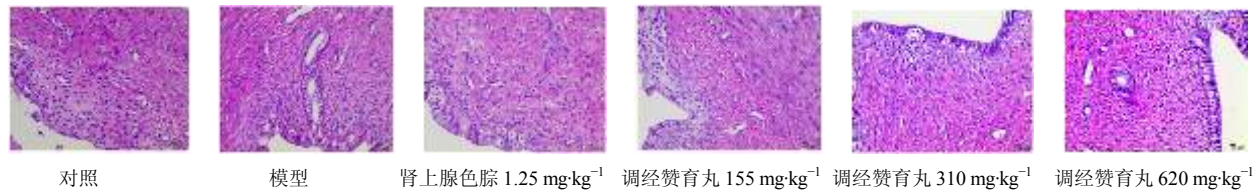


图 1 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫内膜组织影响的病理图 (HE 染色)

Fig. 1 Histopathological photographs of Tiaojing Zanyu Pills on endometrial tissue in rats with anovulatory dysfunctional uterine bleeding (HE staining)

表 3 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫内膜病理学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Tiaojing Zanyu Pills on histopathological changes of endometrial tissue in rats with anovulatory dysfunctional uterine bleeding ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	子宫系数/(mg·g ⁻¹)				P值
		—	+	++	+++	
对照	—	10	0	0	0	—
模型	—	1	5	3	1	0.000 166 9 ^{##}
肾上腺色脎	1.25	6	3	1	0	0.019 95 [*]
调经赞育丸	155	3	6	1	0	0.094 91
	310	4	4	2	0	0.125 7
	620	7	2	1	0	0.010 22 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.4 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫内膜组织中 VEGF 表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠子宫内膜组织 VEGF 蛋白表达量明显减少 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 肾上腺色脎组、调经赞育丸 310、620 mg/kg 组大鼠子宫内膜组织 VEGF 蛋白表达量均明显升高 ($P < 0.05、0.01$), 见图 4、表 5。

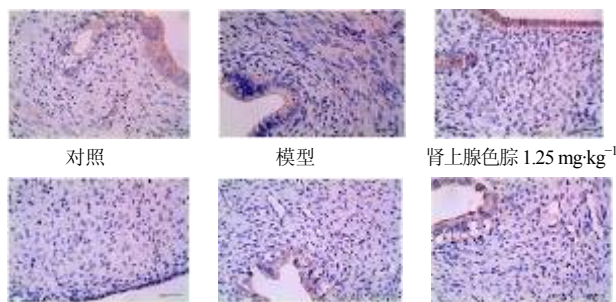


图 2 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫内膜组织 VEGF 表达的影响

Fig. 2 Effect of Tiaojing Zanyu Pills on VEGF expression in rats with anovulatory dysfunctional uterine bleeding

表 4 调经赞育丸对无排卵型功能失调性子宫出血大鼠子宫内膜组织中 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of Tiaojing Zanyu Pills on VEGF expression in rats with anovulatory dysfunctional uterine bleeding ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	吸光度均值
对照	—	0.546 2 ± 0.024 1
模型	—	0.499 1 ± 0.032 1 ^{##}
肾上腺色脎	1.25	0.562 8 ± 0.024 8 ^{**}
调经赞育丸	155	0.501 7 ± 0.095 8
	310	0.540 6 ± 0.034 8 [*]
	620	0.539 8 ± 0.074 3 [*]

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$
^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.05$ vs model group

4 讨论

青春期无排卵型功能失调性子宫出血的机制是下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴激素间反馈调节未成熟^[7-8], 大脑中枢对雌激素的正反馈作用存在缺陷, 卵泡刺激素 (FSH) 呈持续低水平, 无促排卵性黄体生成素 (LH) 峰形成, 导致卵巢不能排卵。各种原因引起的无排卵均可导致子宫内膜受单一雌激素刺激且

无孕酮对抗而发生雌激素突破性出血、撤退性出血或混合性出血,出血量与雌激素对子宫内膜刺激强度和作用时间相关。目前有关无排卵型功能失调性子宫出血、止血、修复的分子机制尚不清楚。功能失调性子宫出血的现代医学治疗以内分泌疗法为主,其中雌激素、促排卵药物的应用广泛。

功能性子宫出血相当于中医月经病中的崩漏、月经先期、月经后期、月经先后无定期、月经过多、月经过少、经期延长、经间期出血等^[9]。无排卵型子宫出血由单一雌激素刺激导致子宫内膜增生,而血管、腺体、间质发育不同步,子宫内膜末梢循环淤滞,内膜易崩解出血,血液不循常道,溢以脉外,为中医所述“离经之血”“衄血”“瘀血”。中医药可从多层次、多途径、多靶点方面对功能性子宫出血产生止血、调节内分泌作用,相对于现代医学治疗所应用的止血药、激素类药物,中药有其疗效稳定、副作用少、不易复发等独特优势。

子宫内膜是对雌性激素最敏感的效应组织,未成年雌性大鼠在单一雌激素持续干预下使子宫蛋白质的合成增加,子宫内膜增生,血管、间质、腺体发育不同步,内膜厚而不牢固,且不断增厚的子宫内膜对雌激素的需求也持续增加。当雌激素急速下降时发生雌激素撤退性出血,伴随纤维结缔组织增生,间质血管扩张,炎细胞浸润、子宫脏器系数下降^[10]。本研究结果表明,未成年大鼠连续灌胃给予戊酸雌二醇 2.8 mg/(kg·d),3 周后,呈现子宫内膜增生病理改变,如多见水肿和少量上皮细胞变性和坏死,子宫系数降低;拆除戊酸雌二醇 1 周后,血清中雌激素水平回归正常范围,孕激素水平仍处于较低水平。无排卵型功能性子宫出血子宫内膜腺上皮 VEGF 减少,进一步导致内膜微血管形成减少和结构不良,临床表现为子宫不规则出血。

目前围绕调经赞育丸的功能主治开展了部分现代药理学研究。如孙嘉敏等^[11]研究了调经赞育丸对雄激素致不孕大鼠生育功能的治疗作用及其机制,结果提示调经赞育丸能明显增加大鼠卵巢中各级卵泡总数和黄体数,能明显恢复大鼠的动情周期和排卵功能,降低大鼠血清中的总睾酮水平,还能明

显升高大鼠血清中雌二醇和促卵泡激素水平。关于调经赞育丸临床用于痛经治疗的机制,张丽梅等^[1]认为可能与其降低子宫平滑肌对催产素和 PGF2 α 等激素的敏感性有关,王婧婧等^[12]研究还认为与其抑制病理状态下的子宫平滑肌收缩有关。本研究结果表明,调经赞育丸能明显减轻子宫内膜增生病理改变,减少功能性子宫出血,可能与升高子宫内膜 VEGF 蛋白表达量有关,为临床月经紊乱的治疗提供了药理学基础。

参考文献

- [1] 张丽梅,程宏斌.调经赞育丸对小鼠痛经扭体模型的影响[J].四川中医,2010,28(6):17-18.
- [2] 谢幸,苟文丽.妇产科学[M].第8版.北京:人民卫生出版社,2013:344-352.
- [3] 宋苗苗,刘广霞.中医药治疗无排卵型功能失调性子宫出血概况[J].湖南中医杂志,2012,28(2):137-139.
- [4] 薛露,王海丽,单鸣秋,等.茜草炭不同提取物对子宫出血模型大鼠影响的比较研究[J].辽宁中医杂志,2017,44(3):640-643.
- [5] 刘东平.三七有效部位对雌激素干预下大鼠子宫内膜止血、修复机制的研究[D].长沙:湖南中医药大学,2012.
- [6] 王洁.补肾健脾固冲方对子宫内膜增生大鼠模型 VEGF, BAX, BCL-2 作用的实验研究[D].郑州:河南中医学院,2015.
- [7] 朱晓雪.不同止血药物治疗青春期无排卵型功能失调性子宫出血的效果比较分析[J].临床研究,2018,26(7):99-100.
- [8] 陈忠兰,梁小洁.宫血宁胶囊联合醋酸甲羟孕酮和戊酸雌二醇治疗青春期功能失调性子宫出血的疗效观察[J].现代药物与临床,2016,31(7):1063-1066.
- [9] 张玉珍.中医妇科学[M].北京:中国中医药出版社,2002:69-120.
- [10] 薛露,王海丽,肖林焱,等.茜草炭抗雌二醇致大鼠出血倾向的活性部位研究[J].中国现代中药,2016,18(9):1114-1119.
- [11] 孙嘉敏,王张,周力,等.调经赞育丸对雄激素致不孕大鼠的影响[J].中药药理与临床,2009,25(3):8-10.
- [12] 王婧婧,王张.调经赞育丸抑制催产素致大鼠离体子宫平滑肌收缩的作用研究[J].中国医药导报,2018,15(31):16-19.