

• 研究论文 •

益母草对产后子宫内膜炎大鼠内膜止血修复的实验研究

叶 赞¹, 王若光²

1. 长沙市中医医院妇产科, 湖南 长沙 410100

2. 湖南中医药大学 中西医结合学院, 湖南 长沙 410007

摘要: **目的** 建立产后大鼠子宫炎症模型, 从分子生物学角度探讨益母草对产后子宫复旧的内在机制。 **方法** 将大鼠随机分为4组: 空白对照组、模型组、益母草组、三七总皂苷组。建立产后子宫炎症模型, 用三七总皂苷作阳性对照, 采用ELISA法对各组大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的量进行测定, 对各组大鼠的子宫组织进行HE染色观察, 同时用免疫组化法检测子宫组织中基质金属蛋白酶-13 (MMP-13)、金属蛋白酶组织抑制因子-1 (TIMP-1)、I型胶原 (collagen I) 的表达。 **结果** 模型组血清 TNF- α 水平明显高于空白对照组; 与模型组比较, 益母草组血清 TNF- α 水平显著降低。模型组与空白对照组比较, MMP-13、TIMP-1 明显升高, collagen I 表达上调; 与模型组比较, 益母草组 MMP-13 无明显变化, TIMP-1 明显降低, collagen I 表达下降。 **结论** 益母草可能使产后炎症子宫的 TNF- α 水平下降, 下调 TIMP-1 的表达, 启动止血修复机制, 并加快细胞外基质 (ECM) 降解, 从而加速产后子宫复旧。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; 基质金属蛋白酶-13; 金属蛋白酶组织抑制因子-1; I型胶原; 益母草; 子宫内膜炎

中图分类号: R927.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)04-0246-04

Endometrial hemostasis repair of motherwort in postpartum endometritis rats

YE Zan¹, WANG Ruo-guang²

1. Department of Gynecology and Obstetrics, The TCM Hospital of Changsha City, Changsha 410100, China

2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of TCM, Changsha 410007, China

Abstract: **Objective** To establish a postpartum uterine inflammation model in rats, and to investigate the internal mechanism of motherwort on postpartum uterine involution from the perspective of molecular biology. **Methods** Rats were randomly divided into four groups: control, model, motherwort, and Notoginseng groups. Uterine inflammation model was set up with Notoginseng as positive control, ELISA method was used to detect the serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in rats, rat uterus in various groups was observed by HE staining, and the expression of matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), tissue inhibitor of metalloproteinase type I (TIMP-1), and collagen I in uterine tissue was detected by immunohistochemical method. **Results** Serum TNF- α levels in the model group were significantly higher than that in the control group; Compared with the model group, serum TNF- α levels in motherwort group decreased significantly. Compared with control group, MMP-13 and TIMP-1 were significantly increased in the model group, and expression of collagen I was up-regulated. Compared with the model group, MMP-13 in motherwort group had no significant change, and expression of TIMP-1 and collagen I was significantly reduced. **Conclusion** This experiment confirms that motherwort could possibly reduce TNF- α levels in rats with postpartum uterine inflammation and the expression of TIMP-1 to start the repair mechanism of stop bleeding, and accelerate the degradation of extracellular matrix (ECM), so as to speed up postpartum uterine involution.

Key words: tumor necrosis factor- α (TNF- α); matrix metalloproteinase-13 (MMP-13); tissue inhibitor of metalloproteinase type I (TIMP-1); collagen I; motherwort; endometritis

产后子宫复旧不全是诱发产后各种疾病的重要原因, 临床主要表现为血性恶露持续淋漓不尽或反

复间歇性血性恶露和产后腹痛, 均严重影响妇女的身心健康。子宫体及子宫内膜在分娩前后所经历的

收稿日期: 2012-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30572405)

作者简介: 叶 赞 (1984—), 女, 湖南湘潭人, 硕士, 医师, 研究方向为中西医结合妇产科及相关中药药理研究。

Tel: 13467534609 E-mail: irene003@163.com

*通讯作者 王若光, 教授, 主要从事中药有效成分分子药理及中西医结合妇产科学应用基础研究。

巨大变化与胶原降解,尤其是I型胶原(collagen I)降解,以及产后子宫内膜修复机制的启动等关系密切,基质金属蛋白酶(MMPs)及其组织抑制因子(TIMPs)在胶原降解过程中扮演重要角色^[1]。本实验采用产后子宫内膜炎导致子宫复旧不全大鼠模型,选用分子生物学指标,探讨益母草治疗产后子宫复旧不良的作用机制,并有助于解释传统中医“瘀血阻滞,血不归经”、“祛瘀则生新”等理论的科学内涵。

1 材料

1.1 动物

成年雌性SD大鼠40只,体质量180~220 g,雄性SD大鼠20只,体质量200~300 g,清洁级条件下饲养,动物和饲料由湖南中医药大学动物实验中心提供,动物许可证号SCXK(豫)2005-0001。室温22~25℃,相对湿度40%~70%,保持通风干燥,噪音<60 db,采用全价营养颗粒饲料,保持供应足够的清洁饮用水,饮水器具及笼具定期消毒。

1.2 药品与试剂

益母草提取物由湖南中医药大学药学院提取,消毒,灭菌,4℃保存备用。三七总皂苷由湖南中医药大学药学院提取,消毒,灭菌,4℃保存备用。3%冰醋酸造模。动物麻醉:10%水合氯醛,每只大鼠用量按3 mL/kg计算。因存在个体差异,若麻醉效果不佳,可追加1~2 mL/kg。标本固定用4%多聚甲醛固定液。

1.3 细菌品种

大肠埃希菌标准株ATCC25922送至湖南中医药大学细菌培养室协助培养,定期活化。用麦氏比浊法比浊,用生理盐水稀释成 1.0×10^9 CFU/mL。

1.4 仪器

DNP-9162型电热恒温培养箱、Haier医用微波炉、MIAS医学图象分析系统、800型碳极牌离心沉淀器、Shandon325型石蜡切片机、Motic B₅显微摄像系统、光学显微镜、血常规计数仪、巴氏吸管等,将7号注射针头的针尖截断,在细磨刀石上打磨截面,保持圆滑。

2 方法

2.1 分组

按随机数字表法将40只雌性大鼠分为空白对照组、模型组、益母草组、三七总皂苷组,每组10只。按体质量顺序依次按雌雄2:1的比例合笼饲养。

2.2 造模

因目前未见报道产后大鼠子宫内膜炎症稳定复制模型,参照赵红琼^[2]、和翀翼^[3]等建立大鼠子宫内膜炎模型的方法,借鉴并加以改进。估算预产期,于产后第一天接种细菌。将大鼠麻醉后常规消毒、铺巾,用阴道灌注针将大肠埃希菌菌液直接送至阴道内贴近宫颈处推注,复制大鼠子宫内膜炎模型。

2.3 给药

将益母草浸膏按1:125用蒸馏水溶解,按大鼠体质量10 mL/kg ig给药。三七总皂苷以正常人0.12 g/kg常用量换算,按1:150溶解,按大鼠体质量10 mL/kg ig给药。除空白组不接种细菌外,其余组大鼠均于产后第1天接种细菌,造模后即提出分笼饲养,同时按其所在组别对应处理。益母草组于产后第1天ig给予益母草提取物配制液(1.8 g/kg),每天1次。三七总皂苷组于产后第1天ig给予三七总皂苷配制液(0.54 g/kg),模型组及空白组于产后第1天ig给予生理盐水2 mL。均连续给药7 d后处死检测指标。

2.4 标本采集和指标检测

2.4.1 血清标本采集 连续给药7 d后处死大鼠,分离颈动脉采集血液标本,经3 000 r/min离心15 min,留取上清液(血清)-20℃保存,统一进行血清指标检测。

2.4.2 子宫标本采集 大鼠以10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉后处死,取出两侧子宫,生理盐水冲洗后置于4%多聚甲醛中固定。

2.4.3 血清ELISA法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 将冷冻血清标本置于4℃冰箱冷藏过夜,再置于室温复温后采用双抗夹心ELISA法检测大鼠血清TNF- α 的量。

2.4.4 HE染色石蜡切片的制备 取出的子宫标本经4%多聚甲醛溶液固定24 h后,常规酒精逐级脱水(70%~100%)、二甲苯固定透明、石蜡包埋,切片机切取5 μ m子宫组织片,烤干后进行常规HE染色。

2.4.5 免疫组织化学方法检测MMP-13、TIMP-1、collagen I MMP-13、TIMP-1、collagen I在胞浆中呈棕黄色或棕褐色片状表达。在MPIS病理图象分析系统下,用 $\times 400$ 倍测定其阳性平均灰度值,灰度值越高,表达越低。

2.5 统计学处理

所有数据采用SPSS 14.0统计软件处理,实验

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间显著性检验采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LDS 检验法。

3 结果

3.1 病理切片观察

病理学观察结果提示, 模型组子宫内膜上皮不

完整, 间质炎性细胞增多明显, 以中性粒细胞为主, 间质有出血。上皮细胞变性坏死、充血水肿、炎细胞浸润, 益母草组及三七总皂苷组较模型组明显减轻, 模型组比空白组加重, 同时也证明炎症模型复制成功。见图 1。

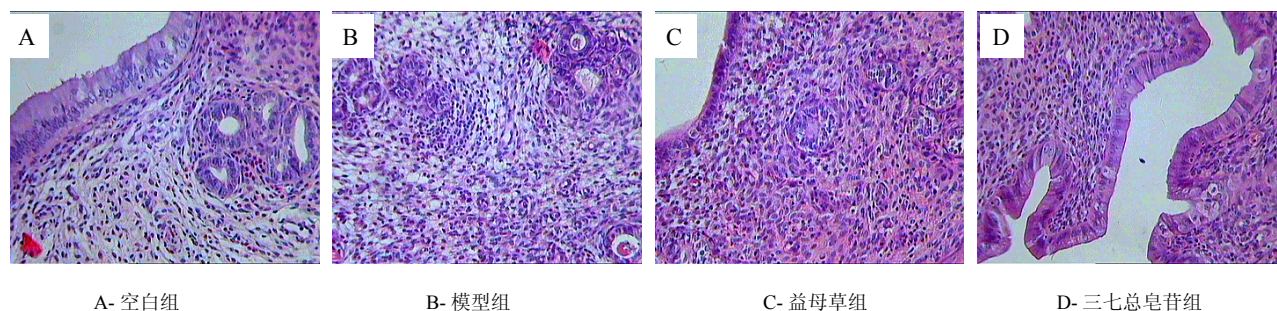


图 1 组织病理学图片

Fig. 1 Histopathological pictures

3.2 各指标检测结果

本研究中模型组与空白组比较, $\text{TNF-}\alpha$ 的量明显升高, MMP-13、TIMP-1 灰度值明显降低 ($P < 0.01$), 提示其表达上调, 破坏细胞外基质

(ECM) 降解平衡, 同时使 collagen I 上调。益母草和三七总皂苷干预后, 相对模型组, $\text{TNF-}\alpha$ 降低, MMP-13 无明显变化, 但 TIMP-1、collagen I 表达下调 (灰度值升高)。见表 1。

表 1 益母草对大鼠 $\text{TNF-}\alpha$ 、MMP-13、TIMP-1 和 collagen I 的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Effect of motherwort on $\text{TNF-}\alpha$, MMP-13, TIMP-1, and collagen I in rat ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$\text{TNF-}\alpha/(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$	MMP-13	TIMP-1	collagen I
空白	10	$20.42 \pm 9.99^{**}$	$163.37 \pm 15.59^{**}$	$171.87 \pm 7.52^{**}$	$171.94 \pm 4.57^{**}$
模型	9	$55.84 \pm 7.47^{###}$	$138.16 \pm 7.22^{###}$	$141.37 \pm 13.10^{###}$	$153.96 \pm 7.59^{###}$
益母草	10	$45.66 \pm 7.89^{*###}$	$146.73 \pm 12.95^{###}$	$157.56 \pm 7.06^{*###}$	$160.46 \pm 7.11^{*###}$
三七总皂苷	9	$45.04 \pm 6.64^{*###}$	$149.68 \pm 12.45^{#}$	$155.83 \pm 11.53^{#}$	$158.21 \pm 5.72^{*###}$

与模型组比较: $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与空白组比较: $^{###}P < 0.01$

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

4 讨论

目前, 产后大鼠子宫内膜炎症规范模型尚未建立, 有报告表明, 异常子宫出血患者内膜细菌检出率为 79.5%, 金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌比例最高, 认为是异常出血的主要致病菌^[4]。参考恒河猴子宫内膜炎性出血模型^[5]、大肠杆菌肺炎模型^[6], 于产后第一天开始接种大肠杆菌。因此时子宫内膜创面尚未完全修复, 可为细菌生长提供良好的滋生环境, 有利于炎症的形成。病理切片证实炎症改变。从可行性强、方便操作、炎症改变等方面综合考虑, 选取从阴道给菌方式制造模型。炎症反应与凝血系统相互影响, 从而促进凝血, 使子宫内膜末稍循环淤滞, 内膜基质崩解出血。形成局部的炎症-凝血

网络, 炎症-凝血→末稍循环淤滞→崩解出血, 似中医“血瘀”状态。故复制此炎症模型来研究益母草对产后子宫的化瘀止血修复机制。

子宫复旧不全的机制目前仍未明确, 很多由于异常流血所致, 而炎症是引起异常流血的重要因素。产后子宫肌层及内膜局部粒细胞和单核/巨噬细胞 (MΦ) 显著增加, 除可以合成分泌前列腺素 E (PGE)、前列环素 (PGI₂) 和纤维蛋白溶酶原激活剂 (PA) 外, 还可释放松弛素, 使内膜中的网状纤维分解, 造成内膜松解、崩溃而脱落。脱落的组织以及革兰阴性菌内毒素——脂多糖 (LPS) 均可通过激活腺上皮细胞核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 引起 $\text{TNF-}\alpha$ 、白细胞介素-1 (IL-1) 转录增

多,参与影响 ECM 胶原的合成/分解的动态平衡。另一方面,炎症细胞因子、蛋白酶及细菌 LPS 可促进或诱导子宫内膜合成 MMPs,从而使 MMPs 与 TIMPs 的平衡失调,过度表达的 MMPs 一方面促进血管基底膜的降解导致血管通透性增加和血管完整性丧失,同时促进炎症细胞的浸润;另一方面促进子宫内膜基质水解导致内膜剥脱,从而引起间质水肿、炎症细胞、内膜表面溃疡、出血等炎症反应,最终导致内膜修复不能正常完成,经血量过多,出血时间延长。

子宫复旧不全另外的可能原因之一是胶原降解能力下降,导致子宫纤维化所致。有报道胶原降解能力下降的主要原因之一是 TIMP-1 和 TIMP-2 水平升高,其中以 TIMP-1 最为重要。如肝纤维化时沉积的胶原主要为 I、III 型胶原,这两型胶原主要由间质胶原酶降解。该酶在人主要为 MMP-1,在大鼠为 MMP-13,其活性受 TIMP-1 调节。MMP-13 或胶原酶 3 属于中性蛋白酶一族^[7],需钙离子的激活,专门降解 I、III 型间质胶原酶, TIMP-1 则为 MMP-13 的抑制物。

本实验选取三七总皂苷作为阳性对照是因为现代药理研究表明,三七总皂苷具有抗炎、抗凝、抗氧化、抗自由基损伤、改善微循环等作用,对多种实验性炎症模型具有良好抗炎活性,其抗炎机制与抑制炎症渗出液中的 TNF 有关^[8]。还可通过降低血管通透性及较强的抑菌作用而达到抗炎作用。其对某些真菌有较强的抑制作用,对大肠杆菌等也有一定的抑制生长作用^[9],并且能抑制纤维化^[10]。

益母草是活血化瘀调经名药,在产后子宫复旧及产后病治疗中尤为常用。研究表明益母草对子宫有直接兴奋作用,使子宫收缩的振幅、收缩率、紧张度均明显增加且时间持久^[11],有行血去瘀的作用,有利于产后子宫复旧。据实验结果推测,一方面是益母草干预后,发挥抗炎作用,降低 TNF- α 表达,引起一系列相应反应,减弱 NF- κ B 的激活,促进产后子宫残留蜕膜脱落,启动修复机制。另一方面可能是使 TIMP-1 表达降低,抑制减弱,使胶原降解能力增强,导致 collagen I 下调,促使子宫复旧

加快。这可能是其抑制纤维化作用的机制之一,使子宫局部胶原有序降解,从而促进子宫复旧。

现代研究证明,益母草中含有生物碱、黄酮类、二萜、环烯醚萜苷、阿魏酸、挥发油等成分。但是益母草的药效物质基础还不清楚,是生物碱在体内直接起作用还是通过别的途径起作用,还是生物碱在体内代谢产物有此功效,或是益母草的其他成分,有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 李春梅, 尤昭玲, 王若光, 等. 产后子宫复旧不良的中西医结合研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(6): 13-15.
- [2] 赵红琼, 简子健, 姚 刚, 等. 建立大鼠实验性子宫内膜炎模型的探讨 [J]. 新疆农业大学学报, 2008, 31(3): 5-8.
- [3] 和翀翼, 武 瑞, 李 利, 等. 大鼠子宫内膜炎模型复制及其中西药复方乳剂治疗 [J]. 中国实验动物学报, 2008, 16(3): 214-216.
- [4] 唐 林, 施志欣, 李志明. 异常子宫出血患者子宫内膜的细菌培养 [J]. 中华妇产科杂志, 1998, 30(8): 389.
- [5] 尤昭玲, 马红霞, 陈俊明, 等. 恒河猴子宫内膜炎性出血模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(5): 310-312.
- [6] 杨 戈, 许维淑, 李建生, 等. 毒素清口服液对大肠杆菌肺炎模型老龄大鼠自由基代谢的影响 [J]. 江西中医医学学报, 2003, 15(3): 63-65.
- [7] Freije J M, Diez-Itza I, Balbin M, *et al.* Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas [J]. J Biol Chem, 1994, 269(24): 16766-11773.
- [8] 李淑慧, 李晓辉, 楚 延. 三七总皂苷抗炎作用机制的实验研究 [J]. 中草药, 2000, 31(9): 676.
- [9] 沈映君. 中药药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社. 2000.
- [10] 全 燕, 夏前明, 李福祥, 等. 三七总皂苷对大鼠肺纤维化及结缔组织生长因子表达的影响 [J]. 西南国防医药, 2009, 19(1), 23-25.
- [11] 王 煜, 赵长石, 王春玲. 益母草胶囊治疗产后胎盘胎膜部分残留 45 例分析 [J]. 中国妇幼保健, 2005, 20(9): 1127.