

活血消异方对子宫内膜异位症大鼠生育力和早期妊娠毒性的影响

孙伟伟¹, 常欢^{1,2}, 赵瑞华^{1*}

1. 中国中医科学院广安门医院 妇科, 北京 100053

2. 首都医科大学附属北京康复医院, 北京 100069

摘要: **目的** 评价活血消异方对子宫内膜异位症(EMs)模型大鼠生育力、早期妊娠毒性的影响。**方法** 采用改良同种异体移植法建立大鼠EMs模型,造模大鼠随机分为模型组和活血消异方低、高剂量(18、36 g/kg)组,行假手术操作的大鼠为假手术组,未经过任何处理的大鼠为空白组。每天ig给药1次,给药体积1 mL/100 g,连续给药至处死,空白组、假手术组、模型组同时ig等体积蒸馏水。给药3周后,将各组雌鼠分别与平行喂养的雄鼠以2:1合笼交配,试验期间每天观察大鼠的活动、行为、步态和对外界的反应情况,记录死亡情况。孕6 d各组随机选取17只大鼠处死,计算妊娠率;未孕大鼠进行子宫硫化铵染色,确定是否有早期胚胎死亡。孕14 d各组随机选取8只大鼠,脱颈处死,常规消毒后开腹,取出双侧子宫、卵巢观察形态;纵行剖开子宫,记录着床数及活胎数、死胎数、吸收胎数,计算活胎率、着床前丢失率、着床后丢失率;并在显微镜下观察黄体数。**结果** 试验期间各组大鼠的活动、行为、步态和对外界的反应情况正常,各组间大鼠体质量差异无统计学意义;在规定合笼时间内,各组妊娠率无明显差异,各组大鼠均未出现早期胚胎死亡情况;模型组着床数、活胎数明显少于空白组、假手术组,活血消异方低、高剂量组着床数、活胎数明显多于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);模型组着床前丢失率明显高于空白组、假手术组,活血消异方低、高剂量组着床前丢失率明显低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。活血消异方高、低剂量组黄体数、活胎数、着床数、死胎数、吸收胎数、活胎率、着床前丢失率、着床后丢失率与空白组比较无明显差异。**结论** EMs疾病本身可降低大鼠生育力,但不存在早期胚胎毒性;活血消异方可在一定程度上提高EMs大鼠生育力,且不存在早期胚胎毒性。

关键词: 子宫内膜异位症;活血消异方;生育力;早期胚胎毒性;大鼠

中图分类号: R962.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2019)04-0648-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.008

Effect of Huoxue Xiaoyi Prescription on fertility and early pregnancy toxicity of rats with endometriosis

SUN Weiwei¹, CHANG Huan^{1,2}, ZHAO Ruihua¹

1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

2. Beijing Rehabilitation Hospital of Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of Huoxue Xiaoyi Prescription on the early pregnancy toxicity of rats with endometriosis. **Methods** The endometriosis model rats were established by modified allograft method. The model rats were randomly divided into model group, Huoxue Xiaoyi Prescription low and high dose groups (18, 36 g/kg). The sham-operated rats were the sham-operated group, and the untreated rats were the blank group. The corresponding drugs were ig administered once daily with volume of 1 mL/100 g. The rats were administered to death continuously. The blank group, sham operation group and model group were administered distilled water at the same time. After 3 weeks of administration, female rats in each group were mated with parallel-fed male rats in a cage with rate of 2:1. Activity, behavior, gait and reaction to the outside world were observed daily during the experiment, and death was recorded. Seventeen rats in each group were killed at random on the 6th day of gestation to calculate the pregnancy rate. Unpregnant rats were stained with ammonium sulfide to determine whether there was early embryo death. Eight rats in each group were randomly selected on the 14th day of pregnancy and executed without cervix. After routine

收稿日期: 2017-09-02

基金项目: 国家自然科学基金(81202714);国家支撑计划课题(2014BAI10B00)

第一作者: 孙伟伟,女,博士研究生,副主任医师,研究方向为子宫内膜异位症的临床与基础研究。

*通信作者: 赵瑞华 Tel:(010)88001139 E-mail:rhzh801@126.com

disinfection, the uterus and ovaries were opened to observe the morphology. The uterus was longitudinally dissected to record the number of live births, dead births, absorbed births, calculate the rate of live births, the rate of loss before and after implantation, and observe the number of corpus luteum under the microscope. **Results** During the experiment, the activity, behavior, gait and reaction to the outside world of rats in each group were normal, and there was no significant difference in body mass among groups; there was no significant difference in pregnancy rate among groups within the prescribed closure time, and no early embryo death occurred in each group; the number of implantation and live fetus in model group was significantly less than that in blank group and sham-operated group, and the number of implantation and live births in the Huoxue Xiaoyi Prescription of low and high dose group were significantly more than those in the model group ($P < 0.05$), the loss rate before implantation in the model group was significantly higher than that in the blank group and the sham operation group, and the loss rate before implantation in the low and high dose groups of Huoxue Xiaoyi Prescription was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). The number of corpus luteum, live fetus, implantation number, stillbirth number, absorbed fetus number, live fetus rate, pre-implantation loss rate and post-implantation loss rate of Huoxue Xiaoyi Prescription group were not significantly different from those of blank group. **Conclusion** EMs can reduce the fertility of rats, but have no toxicity on the early embryo development of rats; Huoxue Xiaoyi Prescription can improve the fertility of EMs rats to a certain extent, and there is no toxicity to early embryos development of rats.

Key words: endometriosis; Huoxue Xiaoyi Prescription; fertility; early pregnancy toxicity; rats

子宫内膜异位症(简称为内异症, endometriosis, EMs)是育龄期妇女的常见病、疑难病之一,主要临床症状表现为持续性加重的盆腔局部粘连、疼痛以及不孕,给患者带来了极大的精神负担,也为人口的可持续发展造成巨大影响。育龄期的EMs患者大多有生育需求,且妊娠是最佳治疗方案。中医学认为,EMs的病理实质为血瘀,临床辩证时使用活血消癥药物较多。大量前期研究表明^[1-4],活血消异方治疗EMs疗效肯定,能够有效改善EMs的临床症状、缩小异位病灶体积并抑制复发,还可在一定程度上提高EMs不孕的妊娠率、提高患者生存质量。但值得注意的是,该方临床一般需服药3个月经周期以上,且对于有生育要求的患者,用药期间多允许患者正常受孕,并多于排卵后方停用。方中莪术、丹参、赤芍活血消癥力强,且为妊娠禁用、慎用药物。本研究初步评价活血消异方对EMs大鼠生育力早期胚胎毒性的影响,为确保临床安全用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

性成熟、健康未孕的SD雌性大鼠,体重(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2012-0001。饲养条件:清洁级动物房,温度(22±3)℃,相对湿度50%~60%,人工照明,12 h光照,12 h黑暗,食用标准颗粒饲料,饮水自由。

1.2 药物与主要试剂

活血消异方由柴胡、制香附、丹参、赤芍、莪术、皂刺等药物组成,由中国中医科学院广安门医院制

剂室提供,上述药材加10倍水,煎煮3次,每次1 h,合并煎液,过滤,放置24 h后浓缩。活血消异方低剂量组每付生药浓缩至72 mL(药物浓度为1.8 g生药/mL),高剂量组每付生药浓缩至36 mL(药物浓度为3.6 g生药/mL)。药液在4℃冰箱保存。

注射用青霉素钠(批号F3092117,华北制药股份有限公司);水合氯醛(批号20140304,北京化工厂);硫化胺(批号12135-76-1,国药集团化学试剂有限责任公司)。

1.3 造模与分组

造模前,连续1周每日定时做阴道涂片检查,动情周期为4~5 d,选择动情周期正常的SD雌性大鼠。结合文献^[5]及课题组长期实践检验,采用改良同种异体移植法建立EMs大鼠模型。造模1周后,随机选取3只大鼠脱颈处死,固定于手术板上,常规消毒后,打开腹腔,肉眼观察并取出造模大鼠腹腔内异位组织,用生理盐水冲洗2~3次,清洗掉血块和多余的脂肪组织,放置在4%甲醛中以固定,随后进行石蜡切片HE染色,在显微镜下观察异位组织的形态学结构和特点,镜下显示有丰富的血管生成,并有大量腺体存在,证明是子宫内膜组织,说明造模成功。

1.4 分组及给药

造模大鼠随机分为模型组和活血消异方低、高剂量组,行假手术操作的大鼠为假手术组,未经过任何处理的大鼠为空白组。

活血消异方低、高剂量组大鼠每日ig活血消异方低、高浓度(1.8、3.6 g生药/mL)药物1次,给药体积1 mL/100 g(剂量分别为18、36 g/kg,分别相当于

人临床用量10、20倍),连续给药至处死;空白组、假手术组、模型组同时ig蒸馏水1 ml/100 g。

1.5 观察指标及判断标准

给药3周后,将各组雌鼠分别与平行喂养的雄鼠以2:1合笼交配,第二天8:00时检查,阴道涂片显示有精子者视为交配成功,记录为孕0 d,交配期为2~3周。于给药前及给药1、2、3周称大鼠体质量,试验期间每天观察大鼠的活动、行为、步态和对

外界的反应情况,记录死亡情况。孕6 d称体质量后,各组随机选取17只大鼠处死,计算妊娠率;未孕大鼠进行子宫硫化铵染色,确定是否有早期胚胎死亡。孕14 d称体质量后,各组随机选取8只大鼠,脱颈处死,常规消毒后开腹,取出双侧子宫、卵巢,观察形态,纵行剖开子宫,记录着床数及活胎数、死胎数、吸收胎数(各类胚胎判断标准见表1^[6]),计算活胎率、着床前丢失率、着床后丢失率;并在显微镜下观察黄体数。

表1 大鼠、小鼠活胎、死胎和吸收胎的判断标准
Table 1 Criteria for judging live, stillborn and absorbed fetuses in rats and mice

类别	辨别依据
活胎	胎儿体型完整,颜色发红或粉红,有自然动作,胎盘大,色红
晚期死胎	可看清完整的胎儿,但颜色发紫或发白,无光泽、无自然动作,胎盘略小;用针头或尖物刺激胎儿无任何反应
早期死胎	子宫内有一个或数个紫黑色稍大的圆块,不能分清胚胎和胎盘
晚期吸收胎	在子宫内有一个或几个紫黑色圆形物块,不能辨认胚胎和胎盘
早期吸收胎	仅用硫化铵对新鲜子宫腔面进行染色后可见紫黑色着色点,肉眼不能辨别

1.6 统计方法

应用SPSS 17.0统计软件进行数据的统计分析,计量资料满足方差分析条件者(各组均服从正态分布且方差齐),采用单因素方差分析检验,两两比较用SNK法或LSD法;若不满足方差分析条件者(不服从正态或方差不齐),采用多个独立样本的非参数检验;数据描述均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料采用卡方检验。

2 结果

2.1 EMs大鼠造模结局判定

造模1周后随机抽取3只造模大鼠处死判定造模结局,结果显示,3只大鼠肉眼观察均可见异位内膜在肠系膜上生长良好,呈隆起囊状小包块,活动度小,内含黏液,上有丰富的血管。取病灶标本均进行HE染色,显微镜下进行组织学观察鉴定,镜下显示有丰富的血管生成,并有大量腺体存在,证明是子宫内膜组织,说明造模成功,造模成功率100%。见图1。

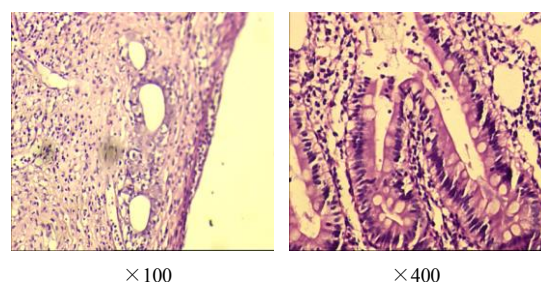


图1 光镜下EMs大鼠异位病灶组织形态学观察(HE染色)
Fig. 1 Histomorphological observation of ectopic lesions in EMs model rats under light microscopy(HE stain)

2.2 一般状态

试验期间各组大鼠的活动、行为、步态和对外界的反应情况正常。合笼前各组大鼠已给药3周,给药期间大鼠体质量逐渐增加,各组间比较差异无统计学意义。孕期各组大鼠体质量平稳增长,各组间体质量比较,差异均无统计学意义,体质量结果见表2。各组均未见大鼠死亡。

表2 各组大鼠体质量比较($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Table 2 Comparison of body mass of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	体质量/g					
		给药前	给药1周	给药2周	给药3周	孕6 d	孕14 d
空白	—	220.0±11.3	232.2±11.9	245.5±13.2	260.6±12.6	276.4±13.6	300.3±9.9
假手术	—	221.2±10.7	234.2±10.0	247.9±11.4	265.3±13.1	276.8±15.2	305.6±15.5
模型	—	220.1±11.0	233.2±10.7	246.5±10.2	263.5±11.8	269.9±9.9	291.9±7.1
活血消异方	18	220.2±9.6	231.6±9.8	245.7±10.9	260.9±13.7	277.7±11.9	302.6±9.5
	36	222.5±10.5	236.2±10.6	250.2±10.4	267.1±11.3	280.1±7.0	305.5±5.3

2.3 各组大鼠妊娠率比较

孕6 d各组随机选取17只大鼠处死,计算妊娠率。结果显示,各组妊娠率无明显差异。结果见表3。

2.4 各组未孕大鼠子宫硫化胺染色

结果显示,各组未孕大鼠子宫硫化胺染色均显

表3 各组大鼠妊娠率结果比较($n=17$)

Table 3 Comparisons of pregnancy rates of rats in different groups ($n=17$)

组别	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	妊娠/ 只	未妊娠/ 只	妊娠率/%
空白	—	14	3	82.35
假手术	—	15	2	88.24
模型	—	14	3	82.35
活血消异方	18	15	2	88.24
	36	14	3	82.35

表4 各组大鼠妊娠早期各项指标比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Comparison of various indicators in early pregnancy of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	剂量/ ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	黄体数	着床数	活胎数	死胎数	吸收胎数	活胎率/%	丢失率/%	
								着床前	着床后
空白	—	17.00 $\pm$ 1.60	15.87 $\pm$ 1.55 [#]	15.12 $\pm$ 1.25 [#]	0	0.75 $\pm$ 0.71	95.27	6.62 [#]	4.72
假手术	—	17.12 $\pm$ 1.46	16.00 $\pm$ 1.31 [#]	15.12 $\pm$ 1.13 [#]	0	0.85 $\pm$ 0.83	94.53	6.57 [#]	5.47
模型	—	16.37 $\pm$ 1.68	11.75 $\pm$ 2.25	11.00 $\pm$ 2.27	0	0.87 $\pm$ 0.83	93.61	28.24	7.45
活血消	18	18.62 $\pm$ 1.85	17.25 $\pm$ 2.05 [#]	16.38 $\pm$ 1.77 [#]	0	0.87 $\pm$ 0.64	94.92	7.38 [#]	5.07
异方	36	19.12 $\pm$ 1.46	17.50 $\pm$ 1.60 [#]	16.75 $\pm$ 1.49 [#]	0	0.75 $\pm$ 0.46	95.71	8.49 [#]	4.29

与模型组比较:[#] $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs model group

3 讨论

在临床观察中发现,EMs患者自然妊娠率普遍较低,且妊娠早期更容易发生流产。EMs疾病自身引起的盆腔局部微环境恶化、盆腔粘连、卵巢功能损害、子宫内膜容受性改变等是导致不排卵、受精或着床失败的重要因素。祖国医学并没有“子宫内膜异位症”的病名,根据它的临床症状,可以归属于中医的“痛经”“不孕”“癥瘕”“月经不调”“血瘀”等范畴。“血瘀”是EMs的公认病机,瘀血占据血室,经血逆流腹腔,血不归经则成“离经之血”,或逆流于胞宫之外,或蕴结于肠膜络脉肌肉之间,瘀血阻滞下焦少腹,影响冲任的正常功能,致冲任失调,则可见月经不调,腹痛,或难以摄精成孕。治疗多以活血化瘀为准绳,莪术、三棱、丹参、赤芍等各类活血消癥类药物应用广泛。

活血消异方是中国中医科学院广安门医院赵

示为均匀的浅绿色,未出现深染的蓝黑色斑点,提示无早期胚胎死亡。

2.5 各组大鼠黄体数、着床数、活胎数、着床前丢失率、着床后丢失率比较

各组孕14 d大鼠中随机选取8只处死,取材后肉眼观察子宫、卵巢形态,各组间未见明显差异。比较各组妊娠早期各项指标,结果显示,模型组着床数、活胎数明显少于空白组、假手术组,活血消异方低、高剂量组着床数、活胎数明显多于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);各组黄体数、死胎数、吸收胎数、活胎率比较,差异无统计学意义;模型组着床前丢失率明显高于空白组、假手术组,活血消异方低、高剂量组着床前丢失率明显低于模型组,差异均有统计学意义($P<0.05$);各组着床后丢失率比较,差异无统计学意义。结果见表4。

瑞华主任自我国著名妇科专家李光荣教授治EMs的核心方--丹赤饮化裁而来,着重于活血化瘀,同时加以宣畅气机、温经散寒、益气之品,因此气行血畅,瘀血可除,癥瘕可消。前期研究结果发现,活血消异方可从3A通路^[7]、免疫平衡^[8]、盆腔粘连、卵泡发育以及子宫内膜容受性^[9-11]多个角度治疗EMs、抑制EMs复发^[12]、改善EMs不孕^[2-3]。由于中药治疗的独特优势,越来越多的EM患者开始选择中药治疗,这就让中药的生殖发育毒性的研究显得更为重要。

本研究结果发现,模型组妊娠率、黄体数、死胎数、吸收胎数、活胎率、着床后丢失率与空白组比较无明显差异,但孕14 d着床数、活胎数明显少于其他各组,着床前丢失率明显高于其他各组,提示EMs疾病本身可降低大鼠生育力,但不存在早期胚胎毒性。活血消异方高、低剂量组的妊娠率、黄体数、着床数、活胎数、死胎数、吸收胎数、活胎率、着

床前丢失率、着床后丢失率与空白组比较无明显差异,提示活血消异方可在一定程度上提高EMs大鼠生育力,且不存在早期胚胎毒性。

参考文献

- [1] 孙伟伟,赵瑞华,李晶秋,等. 中医辨证治疗子宫内膜异位症临床观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(6): 70-71.
- [2] Zhao Ruihua, Liu Yong, Tan Yong, et al. Chinese medicine improves postoperative quality of life in endometriosis patients: A randomized controlled trial [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(1): 15-21.
- [3] 张 娟,赵瑞华. 中药治疗子宫内膜异位症相关不孕症的临床研究 [J]. 北京中医药, 2013, 32(11): 855-857.
- [4] ZHAO Ruihua, HAO Zengping, ZHANG Yi, et al. Controlling the recurrence of pelvic endometriosis after a conservative operation: Comparison between Chinese herbal medicine and western medicine [J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(11): 820-825.
- [5] 张 薇,邹移海,胡海勋,等. 同种异体移植子宫内膜异位症大鼠模型的建立 [J]. 热带医学杂志, 2010, 10(7): 770-772.
- [6] 李 勇,张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2000.
- [7] 赵瑞华,杨艳环,李 敏,等. 活血消异方对子宫内膜异位症大鼠 ICAM-1、MMP-9 及 VEGF 的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(12): 826-829, 872.
- [8] 孙伟伟,杨艳环,郝增平,等. 丹赤饮对子宫内膜异位症患者血清白细胞介素的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(6): 14-17.
- [9] 吴天思,崔阳阳,孙伟伟,等. 活血消异方对子宫内膜异位症模型小鼠子宫内膜容受性的影响研究 [J]. 河北医药, 2017, 39(7): 965-967, 972.
- [10] 杨艳环,赵瑞华,吴天思,等. 活血消异方对子宫内膜异位症妊娠功能低下模型小鼠 HOXA10 基因的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(12): 2639-2642.
- [11] 崔阳阳,孙伟伟,赵瑞华. 子宫内膜异位症模型小鼠胞饮突时间位点观察 [J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(1): 200-202.
- [12] 杨艳环,赵瑞华,徐 彩. 活血消异方对子宫内膜异位症复发风险大鼠模型的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 1911-1913.