

引用:黄正迎,毛惠,李品英. 益母缩宫颗粒对药物不全流产大鼠子宫内膜修复的影响[J]. 湖南中医杂志,2021,37(8): 175-177,180.

益母缩宫颗粒对药物不全流产大鼠子宫内膜修复的影响

黄正迎^{1,2}, 毛惠^{1,2}, 李品英^{1,2}

(1. 西南医科大学, 四川 泸州, 646000;

2. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州, 646000)

[摘要] 目的:研究不同剂量益母缩宫颗粒对药物不全流产大鼠子宫内膜修复的影响。方法:选择雌性大鼠 60 只,雄性大鼠 25 只,随机挑选 10 只未合笼雌性大鼠为空白组,剩余大鼠按雌雄 2:1 合笼,合笼成功后,予以米非司酮(8.3 mg/kg)+米索前列醇(100 μg/kg)制备药物不全流产大鼠模型。将造模成功后的雌性大鼠随机分为模型组,益母缩宫颗粒低、中、高剂量组,缩宫素组,予以相应的实验药物与对照药物进行干预。采用 ELISA 法检测血清纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)、IV 型胶原蛋白(ColIV)的水平,采用免疫组化法检测子宫组织中基质金属蛋白酶(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIM-1)的平均光密度(OD)值。结果:益母缩宫颗粒中、高剂量组及缩宫素组血清中 FN、LN、ColIV 水平及子宫组织中 MMP-9、TIM-1 的 OD 值与模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:益母缩宫颗粒能通过干预子宫内膜细胞外基质的降解与修复,减少子宫异常出血。

[关键词] 药物不全流产;益母缩宫颗粒;子宫内膜修复;大鼠;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2021.08.057

Effect of Yimu Suogong granules on endometrial repair in rats with incomplete medical abortion

HUANG Zhengying^{1,2}, MAO Hui^{1,2}, LI Pinying^{1,2}

(1. Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China;

2. The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of different doses of Yimu Suogong granules on endometrial repair in rats with incomplete medical abortion. Methods: A total of 60 female rats and 25 male rats were selected, among which 10 uncaged female rats were randomly selected as blank group, and the remaining rats were caged with a female/male ratio of 2:1. Then mifepristone (8.3 mg/kg) and misoprostol (100 μg/kg) were given to establish a rat model of incomplete medical abortion. After successful modeling, the female rats were randomly divided into model group, low-, middle-, and high-dose Yimu Suogong granules groups, and oxytocin group and were given intervention with corresponding experimental drugs and control drugs. ELISA was used to measure the serum levels of fibronectin (FN), laminin (LN), and type IV collagen (Col-IV), and immunohistochemistry was used to measure the mean optical density (OD) of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in uterine tissue. Results: There were significant differences in the serum levels of FN, LN, and Col-IV and the OD values of MMP-9 and TIMP-1 in uterine tissue between the middle/high-dose Yimu Suogong granules groups and the model group, as well as between the oxytocin group and the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Conclusion: Yimu Suogong granules can reduce abnormal uterine bleeding by regulating the degradation and repair of extracellular matrix in endometrium.

[Keywords] incomplete medical abortion; Yimu Suogong granules; endometrial repair; rat; experimental study

基金项目:西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合项目(2020XYLH-020)

第一作者:黄正迎,女,2018 级硕士研究生,研究方向:中西医妇产科学

通讯作者:毛惠,女,主任中医师,研究方向:中西医妇产科学, E-mail: 2319436164@qq.com

2019年中国卫生健康统计年鉴的数据表明,2018年全国人工流产人数达974万人,占同年计划生育手术的52.9%,较2008年的611万人增长了26.1%^[1]。多次人工流产、20岁以下未婚女性人工流产以及半年内重复流产占据高危流产的前3位^[2]。终止早孕的人工流产方法包括药物流产(以下简称:药流)和手术流产。手术流产易导致妇女月经不调、人流不全、宫腔宫颈粘连等并发症,甚至造成不可逆的子宫内膜损伤、不孕等,加剧了患者的痛苦^[3-4]。2016年加拿大妇产科医生协会(SOGC)的临床指南指出,药物流产的有效率高达95%,且近年来在全世界范围内广泛应用并得到肯定。药物流产作为简便、有效的非手术终止妊娠方法,被大多数妇女接受,还具备减少住院次数及费用等优点^[5]。

药流后出现的不全流产、绒毛蜕膜残留等是造成子宫异常出血的常见原因,使其在临床应用中受到严重限制,研究缩短和减少药流后子宫异常出血的干预方法备受关注。我院院内制剂益母缩宫颗粒广泛用于产后病,其临床研究已证实可通过帮助子宫内膜修复、促进子宫复旧、改善凝血功能、调节内分泌激素等有效减少产后子宫异常出血,但具体作用机制仍待进一步研究。本研究通过建立药物不全流产大鼠模型,经不同浓度益母缩宫颗粒干预后,测定大鼠血清中纤维粘连蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)、IV型胶原蛋白(ColIV)以及大鼠子宫组织中基质金属蛋白酶(MMP-9)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)的表达,从而探讨益母缩宫颗粒参与药流后子宫内膜修复和减少子宫异常出血的可能作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 选择2月龄性成熟SPF级SD大鼠,雌性60只,雄性25只。雌性大鼠体质量220~260 g,雄性大鼠体质量250~280 g。均由西南医科大学实验动物中心提供[许可证号SCXK(川)2018-17]。购买后分笼适应性喂养7 d,均饲养于西南医科大学实验动物中心[许可证号SYXK(川)2018-065]。

1.2 药物及试剂 1)药物。益母缩宫颗粒(西南医科大学附属中医医院,批准文号:川药制字Z20080304,批号:20191119,规格:10 g/袋)。米非司酮(华润紫竹药业有限公司,批准文号:国药准字H32025281,批号:432005041,规格:25 mg/片)。米索前列醇(华润紫竹药业有限公司,批准文号:国药准字H20000668,批号:43200304,规格:0.2 mg/片)。缩宫素(南京新百药业有限公司,批准文号:国药准字H32025281,批号:21908013,规格:10 U/1 ml/支)。注射用苯巴比妥钠(上海上药新亚药业有限公司,批准文号:国药准字H31020502,批号:190503,规格:0.1 g/瓶)使用时配制10%浓度,腹腔注射。2)试剂。Rat FN ELISA KIT,货号:ZC-37348;Rat LN ELISA KIT,货号:ZC-36446;Rat Col IV ELISA KIT,货号:ZC-36018。以上试剂规格均为96孔/盒,均由上海茁彩生物科技有限公司生产。一抗:MMP-9,兔多

克隆抗体,1:50(浓度),bs-4593R;TIMP-1,兔多克隆抗体,1:200(浓度),bs-4600R,均由北京博奥森生物技术有限公司。二抗:山羊抗兔工作液,SP-9001,北京中杉金桥生物有限公司。4%多聚甲醛,批号:20190312,国药集团化学试剂有限公司。PBS磷酸盐缓冲液,批号:ZLI-9062,北京中杉金桥生物技术有限公司。苏木素,批号:LM10N13,北京百灵威科技有限公司生产。柠檬酸盐缓冲液,批号:ZLI-9064,北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 主要仪器 转轮式切片机,型号:RM2125RTS,徕卡显微系统(上海)有限公司;酶标仪,型号:pectraMAX Plus384,美谷分子仪器有限公司生产;优普超纯水制造系统,型号:UPH-II-10T,成都超纯科技有限公司生产;高速微量离心机,型号:5424GI174620,德国艾本德股份有限公司;TSJ-II型全自动封闭式组织脱水机、BMJ-III型包埋机、PHY-III型病理组织漂烘仪,常州市中威电子仪器有限公司;图像分析软件Image Pro Plus 6.0,美国Media Cybernetics公司;数码三目摄像显微镜BA400Digital,麦克奥迪实业集团有限公司。

2 实验方法

2.1 模型制备 随机挑选10只未合笼雌性大鼠作为空白组。剩余大鼠参照王晓东等^[6]造模法按照雌雄2:1比例于18时合笼,次日晨8时检查阴道涂片,发现有精子者为妊娠第1天。若未受孕,则雌鼠继续于18时合笼,连续合笼3~5 d,然后换批次继续合笼。最终受孕大鼠50只,均于妊娠第7天8时灌服米非司酮(8.3 mg/kg),18时灌服米索前列醇(100 μg/kg),并在雌性大鼠阴道内置入一个棉球,次日检查大鼠阴道内棉球,查见血迹则认为造模成功。最终造模成功48只。

2.2 动物分组 将48只大鼠随机分为5组,模型组10只、缩宫素对照组(缩宫素组)10只、益母缩宫颗粒低剂量组(低剂量组)10只、益母缩宫颗粒中剂量组(中剂量组)9只、益母缩宫颗粒高剂量组(高剂量组)9只。

2.3 干预方法 上述各组大鼠分别于妊娠第8天(空白组除外)进行干预。灌胃药物根据人鼠剂量比换算成大鼠灌胃剂量,成人按60 kg计算,大鼠按1 ml/100 g计算灌胃量。模型组:连续灌胃动物饮用水7 d[1 ml/(100 g·d)];缩宫素组,连续3 d肌肉注射缩宫素0.9 U/(kg·d);益母缩宫颗粒各组连续7 d灌胃益母缩宫颗粒,低剂量组1.562 g/(kg·d)、中剂量组3.125 g/(kg·d)、高剂量组6.25 g/(kg·d)。空白组于妊娠第7天开始,灌胃动物饮用水1 ml/(100 g·d),连续8 d。

2.4 观察指标 大鼠于妊娠第15天8时行全身麻醉(10%苯巴比妥钠2 ml腹腔注射),待麻醉成功后,取大鼠腹主动脉血5 ml,3200 r/min,离心12 min,取上清液,冻存于-80℃冰箱。待采集血液后,剪取双侧子宫组织,多聚甲醛溶液固定。ELISA法检测血清FN、LN、ColIV水平;免疫组化法检测子宫组织中MMP-9、TIMP-1的平均光密度(OD)值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计学软件进行统计分析,所有资料均为数值变量,数据符合正态性且方差齐的多组资料,使用单因素方差分析进行数据统计,组间比较用 LSD-t 法进行分析,所有数值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠血清 FN、LN、ColIV 水平比较 与空白组相比,模型组、低剂量组大鼠血清 FN、LN、ColIV 水平升高,差异均有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,缩宫素组、中剂量组、高剂量组大鼠血清 FN、LN、ColIV 水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表1)

表1 各组大鼠血清 FN、LN、ColIV 水平比较($\bar{x}\pm s$,ng/ml)

组别	只数	FN	LN	ColIV
空白组	10	8.2703 $\pm$ 1.7576	20.8822 $\pm$ 9.1613	3.7842 $\pm$ 0.8602
模型组	10	11.4402 $\pm$ 2.5356 ^a	34.9478 $\pm$ 10.8182 ^a	5.9579 $\pm$ 1.4736 ^a
缩宫素组	10	8.4877 $\pm$ 1.6678 ^b	21.1163 $\pm$ 10.4158 ^b	3.9731 $\pm$ 0.7686 ^b
低剂量组	10	11.4288 $\pm$ 3.9116 ^a	33.6595 $\pm$ 10.4228 ^a	5.6358 $\pm$ 2.4139 ^a
中剂量组	9	8.6331 $\pm$ 2.585 ^c	24.7693 $\pm$ 9.5767 ^c	4.0447 $\pm$ 1.3264 ^b
高剂量组	9	8.5464 $\pm$ 1.3874 ^c	23.5878 $\pm$ 5.1522 ^c	4.0030 $\pm$ 1.2655 ^b

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$,^c $P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠子宫组织 MMP-9、TIMP-1 OD 值比较 与空白组相比,模型组、低剂量组大鼠 MMP-9 升高、TIMP-1 降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组相比,缩宫素组、中剂量组、高剂量组 MMP-9 降低、TIMP-1 升高,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见表2)

表2 各组大鼠子宫组织 MMP-9、TIMP-1 OD 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	MMP-9	TIMP-1
空白组	10	0.3393 $\pm$ 0.0374	0.2577 $\pm$ 0.0381
模型组	10	0.4073 $\pm$ 0.0583 ^a	0.2050 $\pm$ 0.0255 ^a
缩宫素组	10	0.3414 $\pm$ 0.0243 ^c	0.2516 $\pm$ 0.0250 ^c
低剂量组	10	0.3952 $\pm$ 0.0671 ^b	0.2076 $\pm$ 0.0377 ^a
中剂量组	9	0.3479 $\pm$ 0.063 ^d	0.2428 $\pm$ 0.0385 ^d
高剂量组	9	0.3474 $\pm$ 0.0459 ^d	0.2478 $\pm$ 0.0297 ^c

注:与空白组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与模型组比较,^c $P<0.01$,^d $P<0.05$ 。

4 讨论

中医学将药物流产后子宫异常出血称为“产后恶露不绝”,中医辨证多虚多瘀,病机为瘀阻冲任,血不归经。中医治疗主要以活血化瘀、理血通经为主,辅以益气、养血、滋阴、补肾等法^[7]。我院院内制剂益母缩宫颗粒由生化汤加减化裁而来,药物组成为:益母草、当归、川芎、桃仁、炮姜、炙甘草、枳壳、生蒲黄,功能活血祛瘀生新、促进宫缩。前期研究证实其能促进子宫内膜脱落、修复、辅助子宫复旧,进而减少药物流产后子宫异常出血,与其活血化瘀功效相关^[8-9]。

细胞外基质(ECM)是组成子宫内膜的主要成分,子宫

内膜周期性的脱落、修复均涉及到它的水解^[10]。ECM 主要由基质和纤维2种成分构成:前者主要是基底膜,由 FN、LN、糖蛋白等组成;后者中胶原纤维占大部分,约为70%,其次是弹力纤维。细胞组织的正常生长发育除了依赖于细胞间质中的血管提供营养物质,也依赖于细胞间质的连接作用,使各类细胞构成完整的组织、器官;ECM 中 FN、LN、ColIV 正是为细胞的生长发育提供了框架结构;在妊娠早期发挥其紧密黏附的作用,对正常发育的孕卵起支持、保护和信息传递等作用^[11]。研究发现,运用米非司酮+米索前列醇流产后,蜕膜组织中的 FN、LN 较正常妊娠时明显下降,使胚胎的早期发育受到抑制,起到抗早孕以及促使胚胎从子宫内膜上剥离的作用。药物流产使妊娠囊和大部分蜕膜组织剥离并排出体外,但当有些蜕膜组织血供丰富或存在个体差异时,药物作用减弱,蜕膜细胞仍可分泌大量的 LN、FN、ColIV,使绒毛、蜕膜组织排出不全,干扰内膜组织的正常生长发育,导致子宫异常出血^[12-13]。MMPs 是一种蛋白水解酶,可降解和重塑 ECM。TIMPs 几乎是所有 MMPs 的天然抑制物。MMP-9 是 MMPs 众多成员中的一种,属于明胶酶类,主要作用是溶解明胶及 IV 型胶原,主要分布于子宫内膜的间质、血管外膜、腺上皮等部位,大量表达的 MMP-9 溶解胶原、破坏血管基底膜后,可引起间质及血管壁的退化,导致子宫异常出血^[14]。而 TIMP-1 作为 MMP-9 的特异性抑制剂,与 MMP-9 协同作用,共同维持子宫内膜 ECM 和基底膜的完整性。

本研究结果证实,益母缩宫颗粒、缩宫素组均可降低药物不全流产大鼠血清中 FN、LN、ColIV 的水平及子宫组织中 MMP-9 的表达,增加 TIMP-1 的表达。由此可推断,益母缩宫颗粒治疗药物流产后子宫异常出血的作用机制可能是升高子宫组织中 TIMP-1 的含量,从而抑制 MMP-9 的分泌,二者之间达到动态平衡后使 FN、LN 及 ColIV 适度降解,对绒毛和蜕膜组织的支持、连接作用消失,使其剥离更加完整,最后使得 ECM 的降解和修复也达到动态平衡,基底膜的完整性得以维持,子宫异常出血减少。

综上所述,益母缩宫颗粒可能是通过调节子宫组织中 MMP-9 及 TIMP-1 含量,使二者维持动态平衡,影响 FN、LN 及 ColIV 的表达,从而进一步促进残留绒毛、蜕膜组织的排出,加速受损子宫内膜基质的修复。此作用机制可能与其活血化瘀的功效相关,是研究治疗药物流产后子宫异常出血的新的方向之一。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会.中国卫生健康统计年鉴[M].北京:中国协和医科大学出版社,2019.
- [2] 王玉,童焰,古玉婷,等.中国未婚女性人工流产现状及原因分析[C]//中国中西医结合学会妇产科专业委员会.2016 全国中西医结合妇产科研究进展学术研讨会暨 2016 年第一届江浙沪中西医结合妇产科高峰论坛论文及摘要集.上海:中国中西医结合学会妇产科专业委员会,2016:1. (下转第 180 页)

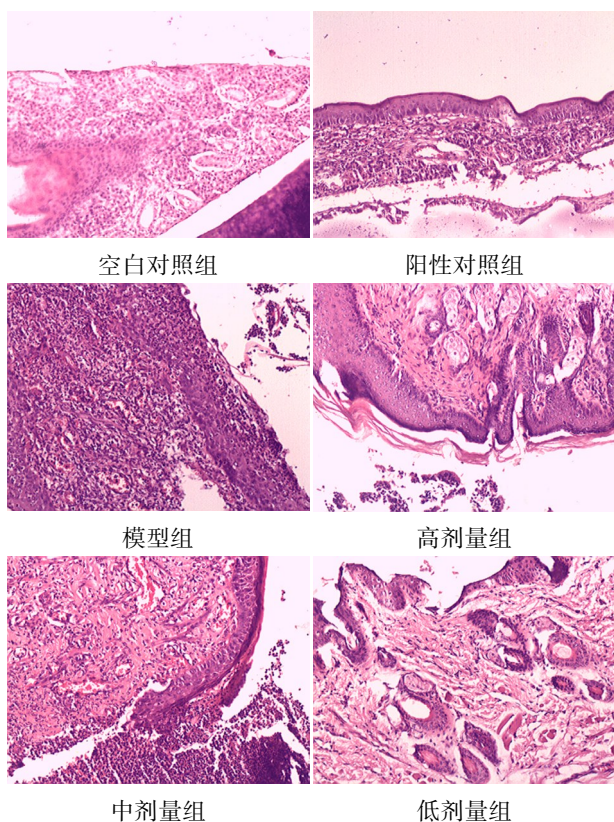


图1 各组大鼠干预后鼻黏膜形态变化图

4 讨论

现代医学认为,本病是机体对某些变应原敏感性增高而发生在鼻腔黏膜的一种 IGE 介导,T 细胞依赖,肥大细胞启动并以嗜酸粒细胞(EOS)浸润为特征,以突然和反复发作的鼻痒、喷嚏、流清涕、鼻塞为主要症状的一种变态反应疾病。在变态反应过程中 EOS、肥大细胞会发生脱颗粒现象,在脱颗粒过程释放大量的趋化因子,趋化各种炎性细胞。EOS 趋化因子促使血液中嗜酸性粒细胞向变态反应炎症部位聚集^[4]。变应性鼻炎属于中医学“鼻鼽”范畴,病位在鼻,主脏在肺,与脾、肾等相关,多为先天禀赋异常、外感六淫之

邪、脏腑内伤所致。《诸病源候论》认为肺脏虚冷是本病发病的主要原因,书中指出:“肺气通于鼻,其脏有冷,冷气入乘于鼻,故使津液不能自收。”笔者认为本病多由于肺气虚,卫表不固,风寒乘虚而入,犯及鼻窍,邪正相搏,肺气不调,津液停聚,鼻窍壅塞,遂致喷嚏、流清涕。鼻敏宁颗粒方中羌活、防风、细辛、白芷祛风散寒逐其邪;辛夷、鹅不食草、苍耳子开窍通鼻利其窍;五味子酸收敛肺止其涕;太子参、黄芪、茯苓、白术、炙甘草健脾益气固其本。诸药合用,共奏温肺祛寒、开窍通鼻、益气固表之功^[5]。该方在本院临床使用多年,收到了良好的效果。

药理研究表明黄芪对机体的免疫功能具有双向调节作用,茯苓、白术等药可增强机体免疫功能;黄芪、苍耳子、白芷、辛夷、鹅不食草等含有较多的挥发油,具有抗菌及抗过敏作用。辛夷具有抗组胺、收缩鼻黏膜血管、拮抗过敏递质、阻滞肥大细胞脱颗粒等作用,可有效缓解变应性鼻炎患者的临床症状^[6]。

本研究结果显示,鼻敏宁颗粒可明显降低 AR 大鼠的过敏反应行为积分,减轻鼻黏膜的炎症反应,降低 EOS 浸润,具有较强的抗炎作用。

参考文献

- [1] 程雷. 变应性鼻炎诊疗指南的修订要点及意义[J]. 中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,51(1):2-5.
- [2] 董培良,殷鑫,张天宇,等. 不同致敏原诱发过敏性鼻炎模型的比较[J]. 中国药师,2014,17(2):196-198.
- [3] 张华,赵娟,雍军,等. 实验性变应性鼻炎鼠类模型的建立[J]. 新疆医科大学学报,2006,29(1):56-57.
- [4] 续艳,孔德明,楚慧伦,等. 芪防鼻敏颗粒对变应性鼻炎大鼠行为学与组织病理学的影响[J]. 中国药师,2016,19(11):2045-2048.
- [5] 凌艳君. 鼻敏宁方治疗常年性变应性鼻炎 103 例临床观察[J]. 湖南中医药导报,2004,10(4):20-30.
- [6] 张茜. 香菊胶囊对变应性鼻炎患者 IgE、IL-4、IL-8 及 EOS 的影响[J]. 海南医学院学报,2016,22(5):490-492.

(收稿日期:2021-01-09)

(上接第 177 页)

- [3] 宫也. 我国每年人流 1300 万例[N]. 中国妇女报,2013-11-25 (B01).
- [4] 贝昭妍. 综合护理预防药物流产中并发症的效果[J]. 实用妇科内分泌杂志:电子版,2018,5(20):93-94.
- [5] VON HERTZEN H, HONKANEN H, PIAGGIO G, et al. WHO multinational study of three misoprostol regimens after mifepristone for early medical abortion. I: Efficacy[J]. BJOG an International Journal of Obstetrics & Gynaecology, 2003, 110(9):808-818.
- [6] 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(2):90-92.
- [7] 施后渊,毛惠,张露莎. 药物流产后阴道流血的中西医治疗进展[J]. 中国继续医学教育,2017,9(2):198-200.
- [8] 毛惠,戴晓蓉,王永周,等. 益母缩宫颗粒促进产后子宫复旧 68 例[J]. 陕西中医,2008,29(11):1460-1461.

- [9] 何青兰. 益母缩宫颗粒调节药物不全流产大鼠的 E、P、CG 及子宫复旧的实验观察[D]. 泸州:西南医科大学,2019.
- [10] 洪丽华,周馥贞,黄荷凤. 基质金属蛋白酶与子宫内膜[J]. 国外医学·妇产科学分册,2001,28(5):265-267.
- [11] 高玲,刘延,喇端端. 层粘连蛋白、纤维粘连蛋白在胚胎发育中表达及作用[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2009,28(4):227-229.
- [12] 滕宗荣,杨辰敏,高玲,等. 药流对人绒毛膜蜕膜内层粘连蛋白表达的影响[J]. 诊断学理论与实践,2013,12(4):432-435.
- [13] INAGAKI J, KONDO A, LOPEZ LR, et al. Pregnancy loss and endometriosis: pathogenic role of antilaminin1 autoantibodies[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 10(51):174-184.
- [14] DONG JC, DONG H, CAMPANA A, et al. Matrixmet-alloproteinases and their specific tissue inhibitors in menstruation[J]. Reproduction, 2002, 123(5):621-631. (收稿日期:2021-01-13)