

益气活血方药早期干预对盆腔炎大鼠模型的影响

吴杨 李军

【摘要】 目的 研究益气活血方药对盆腔炎大鼠模型病理组织学及免疫学的影响。**方法** 以 Wistar 雌性大鼠为实验对象,采用机械损伤加混合细菌法建立盆腔炎动物模型,观察各组大鼠组织学改变及血清 C3、C4、TNF- α 、IL-2 的浓度变化。分组方法:空白组——正常饲养;假手术组——损伤内膜,正常饲养;模型组——损伤内膜并注射菌悬液,正常饲养;早期干预组——损伤内膜并注射菌悬液第 2 天灌胃给药;常规治疗组——损伤内膜并注射菌悬液第 15 天灌胃给药。给药方法:按体表面积公式计算药量,每日给药一次,药量为 3.96 g/kg,均给药 14 天。指标检查方法:TNF- α 、IL-2: ELISA 法;C3、C4:免疫比浊法。**结果** 肉眼观察:早期干预组子宫形态基本正常,结构较清晰,与周围组织未见明显粘连;光镜下观察:早期干预组子宫内膜腺体结构较对照组清晰,间质分布较均匀;其大鼠血清 C3、C4、TNF- α 值与模型组相比,均有极显著性差异 ($P < 0.01$),并与常规治疗组相比亦有显著性差异 ($P < 0.05$);早期干预组及常规治疗组的 IL-2 值与模型组相比,均无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** 益气活血方药早期干预可有效抑制炎性子宫组织水肿及内膜腺体扩张,促进受损组织与细胞的形态结构及其生理功能的恢复,但尚不能明确此方药对盆腔炎大鼠模型 IL-2 有直接影响。

【关键词】 益气活血; 早期干预; 盆腔炎; 组织学; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 2; 补体 C3; 补体 C4

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.005

Influence of early intervention of herbs of supplementing qi for activating blood circulation on pelvic inflammation in experimental model WU Yang, LI Jun. *Traditional Chinese Medicine of Tian Jin University, Tianjin 300193, China*

Corresponding author: LI Jun, E-mail: lijun6403@126.com

【Abstract】 Objective To study the influence of herbs of supplementing qi for activating blood circulation on pelvic inflammation in experimental rats model on the immunology and histopathology. **Methods** Female Wistar rats were used and the pelvic inflammation model was established with mechanic injury combined with mixed bacteria injection, and observe the changes of histopathology and serum C3, C4, TNF- α , IL-2 in the concentration. Grouping method: blank group (feed normally), sham operation group (injury the endometrium, and feed normally), model group (injury the endometrium, inject bacterial suspension and feed normally), early intervention group (via intragastric administration on the second day after injuring the endometrium, and injecting bacterial suspension), routine treatment group (via intragastric administration on the fifteenth day after injuring the endometrium, and injecting bacterial suspension). Administration methods: Administer medicine once a day, and the dosage is 3.96 g/kg, which is calculated dosage with formula of body surface area. They are given the medicine for 14 days. Detection method of index: The methods of tumor necrosis factor alpha and Interleukin 2 are elisa, and methods of complement C3 and complement C4 are immune turbidimetry. **Results** Visual inspection: The uterine shapes were

作者单位:300193 天津中医药大学研究生院[吴杨(硕士研究生)];天津中医药大学第一附属医院妇科(李军)

作者简介:吴杨(1985-),女,2009 级在读硕士研究生。研究方向:月经不调、妇科炎症等妇科常见病。E-mail: wuyang1023@163.com

通讯作者:李军(1964-),女,本科,主任医师。研究方向:月经不调、各种妇科炎症等妇科常见病。E-mail: lijun6403@126.com

文献标引格式:

吴杨,李军.益气活血方药早期干预对盆腔炎大鼠模型的影响[J].环球中医药,2012,5(2):96-100.

basically normal, and the structures were clear which didn't adhere to surrounding tissues obviously in the group of early intervention. Light microscope inspection: endometrial gland structures are clearer than control group, and interstice are more uniform distribution in the group of early intervention. The group of early intervention of rats of the value of serum C3, C4, TNF- α compared with model group has significant differences ($P < 0.01$), and there are very significant differences compared with routine treatment group ($P < 0.05$). However, the value of serum IL-2 of the groups between early intervention and routine treatment group compared with model group has no significant differences ($P > 0.05$). **Conclusion** Early intervention of herbs of supplementing qi for activating blood circulation could control tissue edema of inflammatory uterus and dilate of endometrial glands efficiently, and promote the recovery of morphology and physiological function of damaged tissues and cells. Yet can not clear the direct effect of the herbs on pelvic inflammation in the rat model of IL-2.

【Key words】 Supplementing qi for activating blood circulation; Early intervention; Pelvic inflammation; Histopathology; Tumor necrosis factor alpha; Interleukin 2; Complement C3; Complement C4

盆腔炎指女性上生殖道及其周围组织的炎症,有急性和慢性两类,在急性期未能彻底治疗,则转为慢性盆腔炎,往往久治不愈,并可反复发作,导致不孕、输卵管妊娠、慢性盆腔痛,严重影响妇女健康,增加经济负担^[1]。中医认为本病多为邪热余毒残留,与冲任气血相搏结,凝聚不去,耗伤气血,虚实错杂^[2]。目前临床上已公认中医药治疗本病具有疗效显著、副作用小、复发率低的独特优势,具有广阔的发展前景。经多年临床疗效表明:盆腔炎尽早干预,进行益气活血方药治疗对其远期组织修复及免疫能力的提高具有积极治疗作用。本实验拟在盆腔炎大鼠模型上,进行益气活血方药对盆腔炎组织学及免疫学作用机制的研究,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 雌性大鼠 45 只,体重 (250 ± 20) g (天津山川红实验动物科技有限公司)。

1.2 菌液与试剂

菌液配制:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌以 2:1 的比例溶于无菌超纯水配成浓度为 3×10^9 /ml 混合菌悬液,由天津科技大学微生物菌种保藏管理中心提供;肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 2 (IL-2) 检测试剂盒(购于天津灏阳生物技术有限公司,进口分装);麻醉剂:1% 戊巴比妥钠溶液。

1.3 药物组成

丹参 15 g、赤芍 15 g、白芍 10 g、红藤 30 g、忍冬藤 30 g、川楝子 10 g、元胡 10 g、香附 10 g、没药 6 g、柴胡 6 g、甘草 6 g、炙黄芪 30 g、党参 10 g、白术 10 g,

熬制成膏剂。

1.4 分组

适应性饲养 5 天,称重,按完全随机法分组,将 45 只大鼠分 5 组,每组 9 只。具体方法:空白组——常规清洁饲养,于第 15 天晨取材;假手术组——注射器机械损伤子宫内膜后,常规饲养,第 15 天晨取材;模型组——损伤子宫内膜组织后,以 1 ml 注射器抽取 0.15 ml 混合菌悬液,注入左侧子宫,立即用止血钳钳夹片刻,防止菌液倒流,逐层缝合切口^[3],第 15 天晨取材;早期干预组——造模方法同模型组,造模后第 2 天灌胃给药,治疗 15 天后取材;常规治疗组——方法同上,造模后第 15 天给药(根据预实验提示:造模后 15 天子宫内膜出现慢性炎症的典型表现),治疗 15 天后取材。造模当天死亡 2 只;假手术组 1 只,解剖后观察大鼠肺野遍布黑色粟粒样斑点,考虑大鼠本身异常改变;模型组 1 只,解剖后观察无明显异常,考虑麻醉过量(假手术组、模型组各 8 只)。

1.5 取材与标本制备

取材前一天禁食水,取材时腹腔麻醉,抽取腹主动脉血液约 6 ml 置于无抗凝剂的试管内,37℃ 水浴 30 分钟,离心机(3000 r/min)离心 8 分钟取上清液分装,置 -40℃ 以下保存,以备 ELISA 法检测指标:TNF- α ; IL-2; 免疫比浊法检测 C3、C4。取血后的大鼠暴露子宫,取双侧子宫,剔除结缔组织,放入 10% 中性福尔马林溶液固定,石蜡包埋,常规 HE 染色,在光镜下观察大鼠子宫组织形态学变化。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 (中文版) 统计软件。先对补体 C3、补体 C4、TNF- α 、IL-2 的浓度进行方差齐性检

查,若呈正态分布,采用单因素方差分析,若呈非正态分布,采用秩和检验。

2 结果

2.1 子宫组织学肉眼观察(均取大鼠左侧子宫)

空白组:腹腔内无积液,子宫无明显充血及水肿,结构清晰,无宫腔增粗及积液,与腹腔周围组织无粘连;假手术组:子宫大小、形态无明显异常,结构清晰,与周围组织无粘连;模型组:子宫表面明显肿胀、充血,大多数宫腔迂曲扩张,末端球状膨大,管壁变薄,宫腔内可见清亮液体,部分子宫两侧分支后方与周围组织严重粘连;早期干预组:子宫形态基本正常,个别轻度水肿,结构较清晰,与周围组织未见明显粘连;对照组:子宫表面轻度充血、水肿,少数模型出现纤维组织粘连。

2.2 镜下观察

空白组内膜表层完整,腺体和间质分布均匀,未见炎细胞浸润,见图 1。

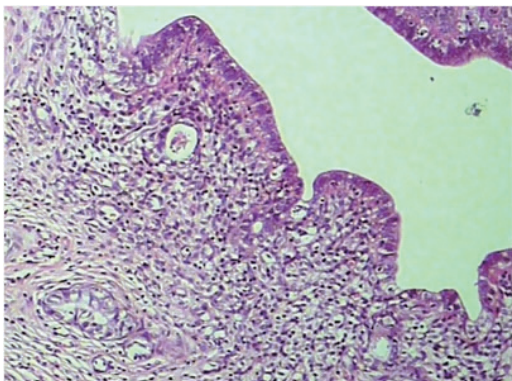


图 1 空白组大鼠子宫内膜(HE 染色,×100)

假手术组无明显组织结构破坏,间质少量淋巴细胞浸润,见图 2。

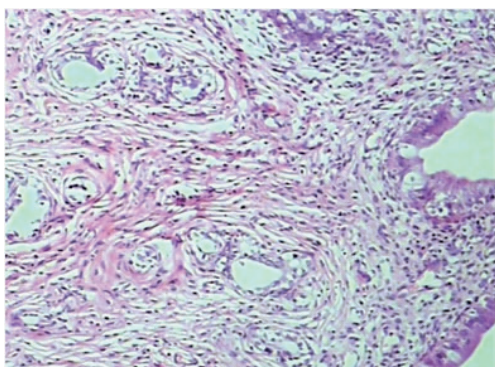


图 2 假手术组大鼠子宫内膜(HE 染色,×100)

模型组子宫内膜可见明显间质水肿及腺体扩张,大量淋巴、浆细胞及少量中性粒细胞浸润,部分

区域炎细胞浸润全肌层,见图 3。

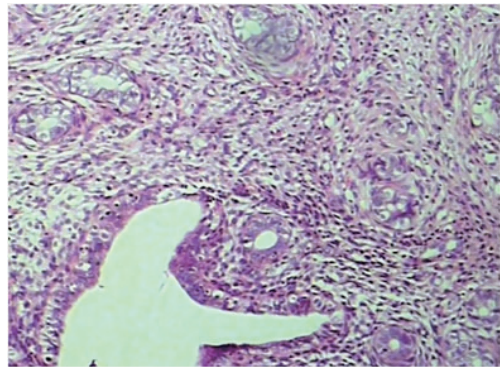


图 3 模型组大鼠子宫内膜(HE 染色,×100)

早期干预组内膜腺体及间质分布较均匀,少量淋巴细胞及嗜酸性粒细胞浸润,见图 4。

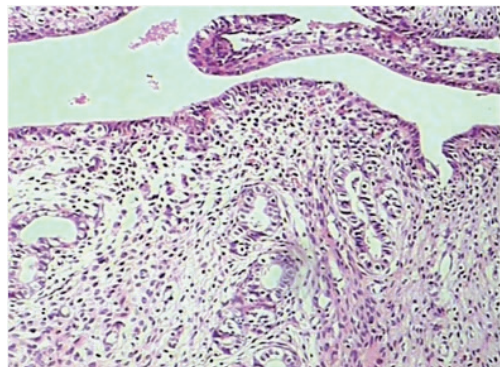


图 4 早期干预组大鼠子宫内膜(HE 染色,×100)

常规治疗组间质纤维组织轻度增生,腺体轻度扩张,可见少量淋巴细胞及嗜酸性粒细胞,见图 5。

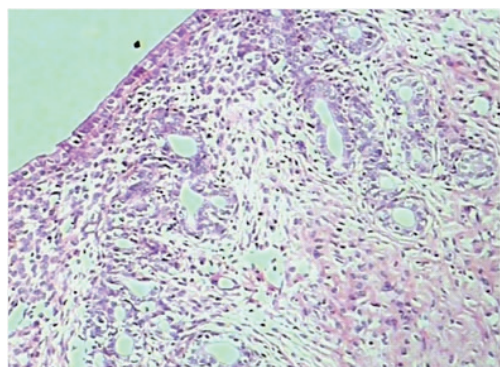


图 5 常规治疗组大鼠子宫内膜(HE 染色,×100)

2.3 免疫学结果

2.3.1 补体 C3、C4 浓度比较结果 补体 C3 方差齐性检验: $P=0.04$,呈非正态分布,采用秩和检验, $H=7.203$, $P=0.000$;补体 C4 方差齐性检验: $P=0.972$,呈正态分布,采用单因素方差分析, $F=5.909$, $P=0.001$ 。

由表 1 可得:空白组与假手术组无显著差异

($P>0.05$),与模型组存在显著性差异($P<0.01$),提示造模成功;治疗后,早期干预组、常规治疗组与模型组比较,差异具有显著性($P<0.05$),其中早期干预组与模型组相比,有极显著性差异($P<0.01$);且与空白组比较,均无显著性差异($P>0.05$),说明两组疗效均具有统计学意义,接近正常水平,且早期干预组疗效更佳;其中早期干预组与常规治疗组比较,两组间差异有显著性($P<0.05$),进一步说明早期干预组疗效明显优于常规治疗组。

表 1 各组大鼠血清 C3、C4 浓度比较($\bar{x} \pm s$, g/L)

组别	n	C3	C4
空白组	9	0.302±0.019 ^c	0.026±0.002 ^c
假手术组	8	0.301±0.022 ^{ab}	0.025±0.002 ^{ac}
模型组	8	0.269±0.010 ^d	0.022±0.001 ^d
早期干预组	9	0.298±0.007 ^{acd}	0.026±0.002 ^{acd}
常规治疗组	9	0.285±0.008 ^{ab}	0.024±0.002 ^{ab}

注:与空白组比较^a $P>0.05$;与模型组比较^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与常规治疗组比较^d $P<0.05$ 。

2.3.2 TNF- α 、IL-2 浓度比较结果 TNF- α 方差齐性检验: $P=0.013$,呈非正态分布,采用秩和检验, $H=25.237$, $P=0.000$;IL-2 方差齐性检验: $P=0.000$,呈非正态分布,采用秩和检验, $H=18.478$, $P=0.000$ 。

由表 2 可得:两指标的空白组与假手术组无显著差异($P>0.05$),与模型组存在显著性差异($P<0.01$),提示造模成功;治疗后,TNF- α 早期干预组、常规治疗组与模型组比较,有极显著性差异($P<0.01$);早期干预组与常规治疗组比较,有显著性差异($P<0.05$),说明两组治疗均有效,且早期干预组疗效优于常规治疗组,具有统计学意义。IL-2 空白组与模型组存在显著性差异($P<0.05$),提示造模成功;早期干预组、常规治疗组与模型组相比,均无显著性差异($P>0.05$),说明尚不能确定此方药与盆腔炎大鼠模型 IL-2 之间有必然联系。

表 2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-2 浓度比较($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	TNF- α	IL-2
空白组	9	302.94±7.93 ^c	583.96±35.26 ^{bd}
假手术组	8	301.41±11.97 ^{ac}	582.26±13.24 ^{acd}
模型组	8	332.93±4.67	532.38±7.99
早期干预组	9	305.05±4.74 ^{acd}	540.80±2.19 ^d
常规治疗组	9	313.34±5.49 ^{ac}	535.07±4.32

注:与空白组比较^a $P>0.05$;与模型组比较^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与常规治疗组比较^d $P<0.05$ 。

3 讨论

盆腔炎多为湿热瘀结证,其慢性炎症多因病程缠绵不愈,耗伤气血,正气不足而致虚实夹杂,本方药针对其少腹瘀结,正气不足之候,采用益气活血之治疗大法,既可驱邪,又可扶正,其疗效已在临床中得以证实^[4]。此外本实验组织学观察结果表明,在炎症形成初期,尽早使用益气活血中药干预治疗,有效控制子宫内膜的水肿及粘连,促进受损细胞及组织的生理功能修复,并大大减少炎细胞浸润,其疗效明显优于慢性炎症形成期给药。

TNF- α 主要由脂多糖激活的单核/巨噬细胞产生,低剂量 TNF 可活化血管内皮细胞,使其表达黏附分子,并使之分泌 IL-1 和趋化性细胞因子;激活局部募集的中性粒细胞和单核/巨噬细胞,增强其吞噬杀菌能力^{[5]43-45},有效发挥抗感染免疫能力。适当的炎症反应对机体有益,可产生抗感染免疫保护作用。严重感染时,体内产生过量促炎细胞因子和其他炎性介质,可产生有害的病理变化^{[5]80}。在实验研究中发现,模型组大鼠 TNF- α 含量与其它各组相比,均明显异常增高,具有极显著性差异($P<0.01$),说明此时大鼠的抗感染能力处于低下状态;经过治疗,早期干预组与常规治疗组的 TNF- α 值均显著性下降,且早期干预组的 TNF- α 值较常规治疗组更加接近正常,进一步说明早期干预治疗盆腔炎能够使机体抗感染免疫能力恢复趋于正常水平。

补体是正常人和动物血清中具有酶活性的一种复杂蛋白系统。它参与多种抗原抗体反应,辅助抗原呈递细胞对抗原的处理与呈递;调节免疫细胞的增殖与分化,以及增强杀伤细胞对靶细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用,从而在免疫和炎症反应中介导各种生物效应^[6]。补体 C3、C4 更是在细菌与吞噬细胞之间形成桥梁,促进吞噬细胞更为有效的发挥吞噬、杀菌作用,即为补体介导的调理作用^{[5]41}。本实验早期干预组与模型组相比,补体 C3、C4 有极显著性差异($P<0.01$),说明早期干预组疗效明显与补体介导的调理作用有关。实验中发现,模型组大鼠 C3、C4 含量与其它各组相比均明显降低,具有极显著性差异($P<0.01$),说明此时大鼠具有极低的炎症免疫功能;治疗后,早期干预组与常规治疗组的 C3、C4 值均显著性升高,且早期干预组的值升高更接近正常,与常规治疗组比较,具有显著性差异($P<0.05$),说明早期干预治疗更加有效。

促进补体 C3、C4 的释放,抑制炎症反应,从而有效地修复受损组织,加快机体生理功能恢复。

IL-2 主要由 T 细胞产生,其生物学作用有刺激 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖,是 T 细胞生长因子;促进 T 淋巴细胞分泌 γ 干扰素、集落刺激因子等;增强总胆固醇、自然杀伤细胞、单核巨噬细胞的细胞毒活性。IL-2 是参与炎症调控的重要细胞因子,IL-2 产生减少或被清除可使免疫应答明显下降^[7,8]。然而本实验中早期干预组及对照组的 IL-2 检测结果与模型组比较均无明显差异,此结果与之前众多盆腔炎模型实验结果有所不同,考虑以下因素可能导致此结果,如指标检测方法的灵敏度不同,导致实验结果的误差;或是此方药对此免疫调节系统的药理作用并不十分明确,甚至两者之间没有必然联系等,因此此方药的作用机制有待更加深入、全面研究,使其治疗的理论依据与现代科学更加紧密结合,为临床用药提供更充分依据。

参 考 文 献

- [1] 乐杰,谢幸,丰有吉,等. 妇产科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004:268.
- [2] 张玉珍. 中医妇科学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2008:321.
- [3] 黄丽,孙培文,罗隽,等. 慢性盆腔炎模型的建立与评价[J]. 中南药学,2010,8(6):469-472.
- [4] 罗美玉,张菁,王世钰. 银红丸治疗慢性盆腔炎 50 例临床总结//黄晖. 中国当代效验方药荟萃[M]. 北京:中国中医药出版社,1997.
- [5] 安云庆,姚智. 医学免疫学[M]. 2 版. 北京:北京大学医学出版社,2010.
- [6] 罗筱君. 血清清对重症急性盆腔炎患者炎性介质的影响[J]. 临床医药实践,2009,18(6):123-126.
- [7] 余传霖,叶天星,路德源,等. 现代医学免疫学[M]. 上海:上海医科大学出版社,1998:358-360.
- [8] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京:科学出版社,2000:66-82, 150-165.

(收稿日期:2011-11-01)

(本文编辑:钮丽霞)

筋脉通胶囊对糖尿病大鼠坐骨神经形态测量学及核转录因子 κ B 蛋白表达的影响

姜楠 梁晓春 屈岭 吴群励 孙连庆 赵丽

【摘要】 目的 观察中药筋脉通胶囊对糖尿病大鼠坐骨神经形态测量学及核转录因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 蛋白表达的影响。**方法** 采用链脲佐菌素糖尿病大鼠模型,随机分为模型组和筋脉通组及神经妥乐平组,设立正常对照组。灌胃 16 周后取坐骨神经进行形态测量学分析,免疫组化法测定其 NF- κ B 蛋白表达。**结果** 与正常对照组相比,模型组大鼠的有髓神经纤维密度、小纤维密度减少,小纤维比率下降,有髓神经纤维平均横截面积、轴索平均横截面积增大,差异显著($P<0.01$);筋脉通组、神经妥乐平组的有髓神经纤维密度、小纤维密度、小纤维比率均较模型组显著改善($P<0.05$);筋脉通组的有髓神经纤维平均横截面积、轴索平均横截面积较模型组改善显著($P<0.05$)。模型组大鼠 NF- κ B 蛋白的表达较正常组显著升高($P<0.01$);筋脉通组、神经妥乐平组上值均较模型组降低($P<0.05$)。**结论** 筋脉通胶囊可改善糖尿病大鼠坐骨神经的形态测量学异常,减少 NF- κ B 的异常高表达。

【关键词】 糖尿病周围神经病变; 核转录因子 κ B; 形态测量学; 筋脉通

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.02.006

基金项目:北京市自然科学基金项目(7082077)

作者单位:100730 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院中医科(姜楠、梁晓春、屈岭、吴群励、孙连庆、赵丽);北京中医药大学附属护国寺中医医院针灸科(姜楠)

作者简介:姜楠(1971-),博士,主治医师。主要从事糖尿病慢性并发症的中西医结合临床研究。E-mail:jiangnanbj@yahoo.com.cn

通讯作者:梁晓春(1956-),教授,博士生导师,中国中西医结合学会常务理事,中国中西医结合学会内分泌代谢病专业委员会副主任委员,北京中西医结合学会糖尿病专业委员会主任委员。研究方向:中西医结合防治糖尿病慢性并发症。E-mail:xcliang@vip.sina.com

文献标引格式:

吴杨,李军.益气活血方药早期干预对盆腔炎大鼠模型的影响[J].环球中医药,2012,5(2):96-100.