

# 载药输卵管节育器合化瘀止痛散对子宫内膜异位症大鼠骨桥蛋白及高迁移率族蛋白 B1 水平的影响

王哲<sup>1</sup>, 王家历<sup>2</sup>, 李明<sup>2</sup>, 史盛娜<sup>2</sup>, 郭志丽<sup>2</sup>

1. 山东中医药大学附属医院妇产科, 山东 济南 250011;

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014

**摘要:** **目的** 探讨骨桥蛋白(OPN)及高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在子宫内膜异位症(EM)中的水平,观察载药输卵管节育器合化瘀止痛散对 HMGB1 的影响及对 EM 的治疗作用。**方法** 40 只大鼠随机分为 4 组,每组各 10 只,实验组采用逆流法造模并放置可逆性输卵管节育器并于术后 4 周加用化瘀止痛散灌胃,对照组 1 采用逆流法造模后仅放置可逆性输卵管节育器(术后 4 周蒸馏水灌胃),对照组 2 逆流法造模术后 4 周用化瘀止痛散灌胃,空白对照组不做造模但以蒸馏水灌胃。采用放射免疫法分别检测各组大鼠造模前、造模后、治疗后血清中 OPN 及 HMGB1 水平的变化。**结果** 与空白组(造模前)比较,各组大鼠造模后血清 OPN、HMGB1 的水平显著升高( $P < 0.05$ );实验组和对照组不同程度的降低血清 OPN 和 HMGB1 的水平,与造模后比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );其中实验组和两个对照组比较其差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** OPN、HMGB1 在 EM 发生发展中起重要作用,载药输卵管节育器合化瘀止痛散可能通过调节 OPN、HMGB1 的水平以抑制异位内膜的增生,促进炎症包块的消退,并有很好的抗炎镇痛作用。

**关键词:** 子宫内膜异位症; 载药输卵管节育器; 化瘀止痛散; 骨桥蛋白; 高迁移率族蛋白 B1

**中图分类号:** R 711.71 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)04-0480-03

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)是妇科常见病<sup>[1]</sup>,近年来其发病率逐年增加,普通人群中发病率达 3%~10%,在不孕症中达 20%~40%<sup>[2]</sup>。EM 基本特征是内膜组织在宫腔外的种植和生长,刺激周围组织产生炎症、黏连、包块,导致痛经、不孕、月经紊乱等典型临床症状。EM 可出现在身体的不同部位,但绝大多数位于盆腔内的卵巢、宫骶韧带、子宫下部后壁浆膜面及覆盖直肠子宫陷凹、乙状结肠的覆膜层<sup>[3]</sup>。本研究采用逆流法<sup>[4]</sup>建立 EM 动物模型,以载药输卵管节育器合化瘀止痛散治疗,以 ELISA 法检测造模前后和治疗后的骨桥蛋白(OPN)和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)值,探讨其在 EM 发病机制中的作用,研究该中西医结合方法对两因子的影响,试图为中西医结合方法治疗 EM 提供新的理论参考<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 山东大学实验动物中心提供健康、体重相似 Wistar 大鼠(10 周龄为经交配过)40 只,清洁级,体重 200~220 g,有动物合格证,动物实用许可证。

**1.2 实验试剂** 生理盐水、蒸馏水、3%~5% 苦味酸液、酒精、碘伏、10% 甲醛、大鼠 ELISA 试剂盒等。盐酸肾上腺素注射液,青霉素钠,戊酸雌二醇片,3.6% 水合氯醛,化瘀止痛散(当归 15 g,川芎 6 g,郁金 15 g,牡丹皮 9 g,赤芍 15 g,白芍 15 g,醋香附 12 g,炒川楝子 12 g,蒲黄 12 g,血竭 1.5 g,凌霄花 6 g,炙甘草 6 g)。

**1.3 实验动物分组** 40 只大鼠随机分为 4 组,每组各 10 只。实验组:手术逆流造模+双侧输卵管放置载药输卵管节育器+术后 4 周灌服化瘀止痛散;对照组 1:手术逆流造模+双侧输卵管放置载药输卵管节育器+术后 4 周灌服蒸馏水;对照组 2:手术逆流造模+术后 4 周灌服化瘀止痛散;空白组:不做造模但以蒸馏水灌胃。

**1.4 动物模型制作** 逆流法:在无菌条件下,以 3.6% 水合氯醛 10 ml 进行腹腔注射麻醉。腹部备皮,常规消毒后取大鼠下腹正中、耻骨联合上 1 cm 切口(长约 2~3 cm),进腹后在膀胱背侧找到子宫。暴露双侧子宫、输卵管、卵巢,于子宫近输卵管 1 cm 处行 5 mm 纵行切口(实验组和对照组 1 沿子宫切口将可逆性载药输卵管节育器置于输卵管内侧阻塞宫腔,其他两组不放置);用特殊毛刷搔刮子宫内膜 8 周,6-0 肠线缝合切口,用眼科无齿平钳夹起子宫下段,将

2 ml 生理盐水经子宫输卵管注入腹腔,使子宫内膜组织逆行入盆腔,逐层缝合皮肤和皮下组织。术后每只大鼠肌肉注射青霉素,共 7 d,预防感染术后第 10 天灌服戊酸雌二醇连续 5 d,促进子宫内膜生长。

1.5 术后用药 术后 4 周经病理组织学检查,确定逆流异位内膜已成活,则给予实验组和对照组 2 大鼠化癥止痛散灌胃,其余两组用同等量的蒸馏水灌胃,每只 3 ml,共连续服用 4 周。

1.6 观察指标 实验 8 周后,进行各组逆流异位内膜体积及组织形态学检查:打开腹腔,测量异位内膜体积作为观察指标,取出异位内膜用甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光学显微镜观察。从大鼠腹主动脉取血,分离血清,用放射免疫法测定,分别检测大鼠造模前、造模后、治疗后的血清 OPN、HMGB1 水平。

1.7 统计学方法 应用 SPSS 17 软件处理数据。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和两两比较的 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 病理变化 空白对照组与实验组大鼠治疗后子宫内膜上皮细胞排列完整,肌层较厚,结构完整,腺体和血管丰富,各组大鼠造模后异位内膜的上皮细胞扁平,呈长柱状或增生呈假复层结构,大部分有分泌现象,少数可见腺体分布,肌层较薄,结构不清(见图 1);异位内膜组织块均形成囊状,治疗前体积均数(85.62 ± 18.05) mm<sup>3</sup>。实验组、对照组 1、对照组 2 大鼠与造模后治疗前大鼠比较均有统计学差异( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 1。

2.2 实验组大鼠血清 OPN 和 HMGB1 水平的变化与空白组(造模前)比较,大鼠造模后治疗前血清 OPN、HMGB1 的水平显著升高( $P$  均  $< 0.05$ );实验组和对照组不同程度降低血清 OPN 和 HMGB1 的水平(除对照组 2 治疗后 HMGB1 水平),与造模后治疗前比较有统计学差异( $P$  均  $< 0.05$ );实验组和对照组

表 1 异位子宫内膜组织生长情况

组别	数量	异位内膜体积(mm <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s$ )
实验组治疗后	10	10.08 ± 3.18 <sup>①</sup>
对照组 1 治疗后	10	35.52 ± 8.85 <sup>①②</sup>
对照组 2 治疗后	10	38.21 ± 6.58 <sup>①②</sup>
造模后治疗前	30	85.62 ± 18.05
<i>P</i> 值		< 0.01

注:与造模后治疗前比较,<sup>①</sup> $P < 0.01$ ;与实验组治疗后比较,<sup>②</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 内膜异位症大鼠血清 OPN 和 HMGB1 水平(μg/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	数量	OPN	HMGB1
空白组(造模前)	10	18.233 ± 1.207	9.048 ± 0.946
造模后治疗前	10	21.989 ± 1.559 <sup>①</sup>	10.930 ± 0.970 <sup>①</sup>
实验组治疗后	10	18.045 ± 0.898 <sup>②</sup>	8.807 ± 0.730 <sup>②</sup>
对照组 1 治疗后	10	20.535 ± 0.733 <sup>②③</sup>	9.976 ± 1.283 <sup>②③</sup>
对照组 2 治疗后	10	20.509 ± 0.392 <sup>②③</sup>	10.150 ± 0.607 <sup>③</sup>
<i>P</i> 值		< 0.05	< 0.05

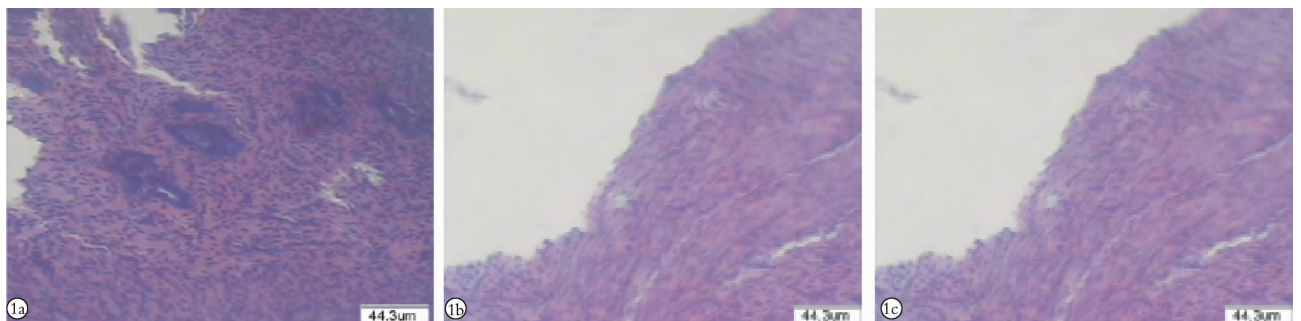
注:与空白组(造模前)比较,<sup>①</sup> $P < 0.05$ ;与造模后治疗前比较,<sup>②</sup> $P < 0.05$ ;与实验组治疗后比较,<sup>③</sup> $P < 0.05$ 。

1、2 比较亦有统计学差异( $P$  均  $< 0.05$ )。见表 2。

## 3 讨论

EM 指具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆内膜及宫体肌层以外部位,以增生、浸润、转移、复发等恶性行为造成痛经、慢性盆腔痛、性交痛、月经异常、不孕等症状的疾病,是一种常见、多发、难治性妇科疾病,对 EM 的发病机制及中西医治疗报道甚多,如何有效预防亟待深入研究。

骨桥蛋白(osteopontin, OPN)是近年发现的一种分泌型磷酸化糖蛋白,富含甘氨酸、精氨酸、丝氨酸、天冬氨酸残基<sup>[6]</sup>,在多种恶性肿瘤组织中高表达,与肿瘤的侵袭转移密切相关<sup>[7-8]</sup>,朱耀魁等<sup>[9]</sup>认为在孕激素的作用下,异位内膜表现为腺上皮及间质细胞正常分化,而 OPN 表达上升,OPN 在肿瘤高表达与肿瘤细胞的转移密切相关,血液中 OPN 含量可能成为多种肿瘤预后的监测指标<sup>[10-11]</sup>。



1a:造模后卵巢部位异位内膜;1b:实验组治疗后子宫内膜;1c:对照组治疗后卵巢部位子宫内膜。

图 1 大鼠子宫内膜病理图(HE 染色, × 200)

明显的抑制作用<sup>[2]</sup>,能抑制肺腺癌干细胞荷瘤裸鼠原发肿瘤和转移灶的生长<sup>[3]</sup>,诱导细胞分化<sup>[4]</sup>,通过改变磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路<sup>[5]</sup>,抑制细胞生长、增殖<sup>[6-7]</sup>,诱导细胞凋亡<sup>[8]</sup>。cAMP 作为信号转导系统的成分,具有抑制细胞增殖<sup>[9]</sup>、诱导分化作用<sup>[10]</sup>。因此,凡能使细胞内 cAMP 含量升高的因素均能降低细胞的生长速度,抑制细胞的增殖,促进细胞的分化。本实验结果显示,给予人乳腺癌细胞株 BT-20 不同浓度十二碳烯酸培养 48 h,细胞中 cAMP 含量显著升高,cGMP 明显降低,cAMP/cGMP 比值增加,细胞增殖抑制率升高,与对照组比,差异有统计学意义。提示,十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 具有显著毒性作用,其机制可能与 cAMP 升高、cGMP 降低,cAMP/cGMP 比值升高有关。

#### 参考文献

- [1] 李世伟,杨守梅,李苏宜.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对改善肿瘤病人临床结局的研究进展[J]. 肠外与肠内营养,2014,21(5):313-316.
- [2] 俞发荣,连秀珍,张红梅,等. 十八烯酸对人 A498 细胞毒性作用

的实验研究[J]. 中国临床研究,2014,27(4):398-400.

- [3] 胡振东,尹荣,许林,等. 鱼油组分共轭亚油酸抑制肺腺癌干细胞成瘤的体内研究[J]. 肠外与肠内营养,2014,21(5):301-304,308.
- [4] 耿丽晶,曲兴源,孙竹萍,等. 海洋多不饱和脂肪酸 DHA 抑制肿瘤机制的研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(22):385.
- [5] 曾田,陆晓媛. 多不饱和脂肪酸对恶性肿瘤作用机制的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(18):3318-3320.
- [6] 汪成芬,崔玉兰,马鑫,等.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对卵巢癌细胞生长作用的实验研究[J]. 中国优生与遗传杂志,2013,21(4):20.
- [7] 王曙逢,赵志浩,刘竹君,等.  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸对人胃腺癌细胞系 AGS 的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版),2015,36(2):190-194.
- [8] 方仕,龙健婷,张冰,等. 结肠癌干细胞样细胞的体外培养、鉴定及 n-3 多不饱和脂肪酸对结肠癌干细胞样细胞的抗增殖作用[J]. 中国病理生理杂志,2014,30(12):2135-2141.
- [9] 叶华,吴琼,郭蒙,等. 半边旗活性成分 5F 对 C26 结肠癌细胞 cAMP 水平的影响[J]. 辽宁中医杂志,2012,39(11):2150-2152.
- [10] 胡晨旭,张晶蓉,黄丽华,等. 环磷酸腺苷在肿瘤临床治疗中的应用研究进展[J]. 天津药学,2013,25(6):49-52.

收稿日期:2015-11-29 修回日期:2015-12-20 编辑:王国品

(上接第 481 页)

OPN 和 HMGB1 是对异位内膜发挥较大黏附及侵袭促进作用的指标<sup>[12]</sup>,临床对其研究也可见,但是对其细致的研究不足。本实验就 EM 大鼠的血清变化进行分析,发现其较无 EM 大鼠表现出明显升高状态。因此,推测其临床检测价值及意义均较高。

本实验采用更为简单且有效的逆流法建立 EM 模型,实验结果表明模型组异位内膜增生,产生局部粘连,提示造模成功,实验组(载药输卵管节育器合化瘀止痛散)和对照组 1(载药输卵管节育器组)、对照组 2(化瘀止痛散组)均不同程度抑制异位内膜的增生,使其萎缩、凋亡,提示载药输卵管节育器和化瘀止痛散均对大鼠 EM 有明显的改善作用,而两种方法合用效果明显好于任何单一方法。

#### 参考文献

- [1] 乐杰. 妇产科学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,1996:345.
- [2] Olive DL, Schwartz LB. Endometriosis[J]. N Engl J Med,1993,328(24):1759-1769.
- [3] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:325.
- [4] 王哲,路芳,陈佃红,等. 可逆性输卵管节育器干预大鼠子宫内异位症的实验研究[J]. 国际妇产科学杂志,2015,42(1):54.

- [5] 金仙玉,文晓燕,张海珍. 子宫内异位症动物模型建立及应用的研究[J]. 大连医科大学学报,2007,29(5):506-508,514.
- [6] Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression[J]. Br J Cancer,2004,90(10):1877-1881.
- [7] Kim JH, Skates SJ, Uede T, et al. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer[J]. JAMA,2002,287(13):1671.
- [8] 朱耀魁,屈洋,夏明翰,等. 骨桥蛋白在子宫颈癌及子宫内膜癌组织中的表达[J]. 中国病理生理杂志,2005,21(12):2414-2417.
- [9] 朱耀魁,夏明翰,王晓玉,等. 骨桥蛋白在子宫内异位症患者异位和在位内膜中的表达[J]. 中华妇产科杂志,2006,41(5):343-344.
- [10] Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia,2001,6(4):419-429.
- [11] Pan HW, Ou YH, Peng SY, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma[J]. Cancer,2003,98(1):119-127.
- [12] Braza-Boils A, Mari-Alexandre J, Gilabert J, et al. Micro RNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors[J]. Hum Reprod,2014,29(5):978-988.

收稿日期:2015-11-10 修回日期:2015-12-23 编辑:王娜娜