文章编号:1000-5404(2012)21-2167-04

论著

大七气汤对大鼠子宫内膜异位症P450与COX-2表达的影响

张沁舒,方 毅,王 力,陈 蓉 (400016 重庆,重庆医科大学中医药学院)

[摘要] **目的** 探讨大七气汤加减方(modified da qiqi decoction,MDQD)对子宫内膜异位症大鼠P450、COX-2表达的影响。**方法** 采用SD雌性大鼠子宫内膜自体移植法建模,3周后按随机数字表法分为大七气汤加减方高剂量组($n=9$)与低剂量组($n=9$)、孕三烯酮组($n=9$)、模型组($n=10$)及假手术组($n=10$)。给药3周后,用发光免疫分析法和ELISA法检测大鼠血清与异位内膜组织雌二醇(E_2)与前列腺素E_2(PGE_2),用免疫组化法和RT-PCR技术检测异位组织芳香化酶P450(P450arom)、环氧化酶-2(COX-2)蛋白与mRNA的表达。**结果** MDQD高剂量组大鼠血清E_2、PGE_2,组织E_2、PGE_2,P450与COX-2蛋白及mRNA明显低于模型组($P<0.01$),与孕三烯酮组比较无明显差异($P>0.05$)。**结论** 大七气汤加减方能降低内异症大鼠P450、COX-2和PGE_2的含量,通过抑制雌激素生成代谢降低外周血与局部病灶雌激素水平,抑制异位内膜生长。

[关键词] 大七气汤;子宫内膜异位症;芳香化酶P450;环氧化酶-2;雌激素
[中图法分类号] R285.6;R289.5;R711.71 [文献标志码] A

Effect of Da Qiqi decoction on expression of P450 and COX-2 in endometriosis of rats

Zhang Qinshu, Fang Yi, Wang Li, Chen Rong (College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the therapeutic mechanism of modified Da Qiqi decoction (MDQD, a traditional herbal prescription) for endometriosis. **Methods** The endometriosis model was established in 37 female SD rats and identified with pathological observation. After 3 weeks, they were randomly divided into high dose MDQD group ($n=9$, 5.072 g/kg), low dose MDQD group ($n=9$, 1.268 g/kg), gestrinone group ($n=9$, 0.5 mg/kg), and model group ($n=10$), and another 10 rats with sham-operation served as control. Corresponding agents or normal saline at same volume were given by intragastral administration for 3 weeks. The levels of E_2 and PGE_2 in the serum and ectopic endometrial tissues were measured by ECLIA and ELISA. The expression of P450 and COX-2 at protein and mRNA levels in the ectopic endometria were determined by immunohistochemistry and RT-PCR. **Results** Compared with model group, high dose MDQD treatment resulted in significant decline in the E_2 and PGE_2 levels in the serum and endometrial tissues, and decreased expression of P450 and COX-2 at protein and mRNA levels ($P<0.01$). There was no significant difference in above parameters between the high dose MDQD group and gestrinone group ($P>0.05$). **Conclusion** MDQD reduces the contents of P450, COX-2 and PGE_2 in endometriosis rats, which inhibits the growth of ectopic endometria through suppressing estrogenic generation to decrease the level of E_2 in serum and local lesions.

[**Key words**] Da Qiqi decoction;endometriosis;aromatase P450;cyclooxygenase-2;estrogen

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(CSCT2008BB5217) and the "Chunhui Projects" of Ministry of Education(2009-525). Corresponding author:Chen Rong, E-mail:ZQScqna@126.com

子宫内膜异位症(endometriosis,EMS)是一种多因素引起的疾病,性激素水平异常和炎性因子表达过多都可引起异位病灶生长及盆腔疼痛,被公认为雌激素依赖性炎症性疾病[1]。在EMS中,环氧化酶2(COX-2)、前列腺素E_2(PGE_2)、芳香化酶P450(P450arom)和雌二醇(E_2)共同形成雌激素生成正反馈环[2],维持体内高雌激素水平,促进着病变的发生、发展。专治妇人癥瘕的中医经典古方大七气汤[3]已被证实可抑制大鼠异位子宫内膜血管内皮生长因子(VEGF)和金属酶蛋白(MMP)-9表达,在最近几年治疗EMS的经验中,我们在其基础上加用补肾阴阳,益气扶正的中药,患者症状体征改善更明显,故本研究以雌激素生成代谢为切入点,通过动物模型实验,检测异位内膜P450、COX-2表

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSCT2008BB5217);教育部"春晖计划"[教外司留(2009)525号]
[通信作者] 陈 蓉,E-mail:ZQScqna@126.com

达及相关产物血清和组织水平变化,探讨大七气汤加减方(modified Da Qiqi decoction,MDQD)治疗EMS的机理,为临床实践提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 50只11周龄SPF级SD雌性大鼠,体质量(200±20)g,购自重庆医科大学实验动物中心,合格证号为SCXK(渝)2007-0001。

1.1.2 实验药物 大七气汤加减方汤剂:以"大七气汤"《医宗金鉴》为基础方,根据EMS的中医病机特点与西医药理研究加减配伍而成,三棱9 g、莪术9 g、姜黄10 g、半夏9 g、陈皮6 g、青皮6 g、藿香6 g、木香6 g、菟丝子9 g、淫羊藿9 g、泽泻9 g、黄芪9 g、甘草3 g,共13味,购于重庆医科大学附属第一医院中药房,其材质由重庆医科大学中医药学院何先元副教授鉴定,煎成含生药1 g/ml的汤剂。苯甲酸雌二醇注射液购自杭州动物药品厂,孕三烯酮胶囊购自北京紫竹药业有限公司,羧甲基纤维素钠购自生工生物工程(上海)有限公司,批号或编号依次为:100716,53100201,S14L27-250g。

1.1.3 主要试剂 大鼠血清雌二醇ELISA试剂盒、免疫组化染色试剂盒、兔抗大鼠P450arom多克隆抗体、兔抗大鼠COX-2多克隆抗体均购于北京博奥森生物技术有限公司,编号依次为:ER-1602、S-P-0022、bs-0732R、bs-0114R。前列腺素ELISA试剂盒与雌二醇发光免疫分析试剂盒分别购于R&D和Roche公司,编号依次为:Wk30466、HC-XX01。浓缩型DAB显色试剂盒购于北京中杉金桥公司,编号ZLI-9018。RNAiso Plus提取试剂盒、反转录试剂盒、DNA聚合酶均购于宝生物(大连)有限公司,编号依次为:D9108A、DRR047A、D334A。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建造 造模前1 d对50只大鼠肌注(0.1 mg/kg)苯甲酸雌二醇,使之处于动情期,通过阴道脱落细胞涂片观察为大量无核角化细胞。用自体子宫内膜移植手术法对40只非假手术组大鼠建立内异症模型[4]。另取10只大鼠开腹后把剪下的左侧子宫中间8 mm段丢弃,行假手术。术后连续3 d肌注庆大霉素抗感染,4 d苯甲酸雌二醇促进内膜生长。

1.2.2 分组给药 40只造模大鼠,术后死亡2只,造模失败1只,造模成功37只。按随机数字表法将其分为4组:A组:MDQD高剂量组($n=9$);B组:MDQD低剂量组($n=9$);C组:孕三烯酮组($n=9$);D组:模型组($n=10$);另设E组:假手术组($n=10$)。根据等效剂量的直接折算法[5],分别选用2倍大鼠等效剂量(5.072 g/kg)与0.5倍(1.268 g/kg)作为MDQD高、低剂量组。C组给予0.5 mg/kg孕三烯酮,之前3组都用生理盐水加0.5%的羟甲纤维素钠配成体积为4 ml的终药液。D与E组则给予4 ml生理盐水。5组均每天1次灌胃给药,连续3周后,麻醉开腹,取腹主动脉血液与异位子宫内膜(假手术组取正常子宫内膜)待测。

1.3 观测指标

1.3.1 体积测量 用两脚规测量异位内膜组织体积V(长×宽×高,mm^3),比较治疗前后各组间的差异。

1.3.2 组织形态学观察 24 h内将取出的子宫内膜组织常规脱水、透明、浸蜡、包埋、5 μm厚度连续切片,进行HE染色观察。

1.3.3 发光免疫分析法与ELISA检测E_2和PGE_2表达 严格按试剂盒说明书用电化学发光免疫分析法检测组织E_2,ELISA法检测血清E_2、血清及组织PGE_2。

1.3.4 免疫组化检测P450、COX-2蛋白表达 严格按试剂盒说明书要求用SP法测定各组异位内膜P450aron、COX-2表达。每张切片在高倍镜(400×)下随机选取5个不重复视野,用Image-Pro Plus 6.0软件分析,取其5个视野平均光密度值(mean density)作为该切片P450和COX-2蛋白的表达量。

1.3.5 RT-PCR检测P450、COX-2 mRNA表达 经提取、反转录、扩增、电泳四步后,在Bio-Rad凝胶成像系统下用Quantity One软件对各条带进行灰度值分析,分别以P450/GAPDH和COX-2/GAPDH的灰度值比值来代表mRNA的相对表达水平。引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成,P450正义链:5′-TGAGAGTCTGGATCAGTGGAGA-3′,反义链:5′-CCAGGAAGAGCGTGTTAGAAGT-3′,扩增长度360 bp;COX-2正义链:5′-TGTATCCTCCCACAGTCAAAGA-3′,反义链:5′-ACAAA GTGAGCAAGTCCGTGT-3′,扩增长度487 bp;GAPDH正义链:5′-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3′,反义链:5′-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3′,扩增长度252 bp。扩增条件为:94 ℃预变性5 min,按照94 ℃变性30 s、GAPDH 59.9 ℃退火30 s(P450为60.3 ℃,COX-2为56.4 ℃)、72 ℃延伸30 s进行36个循环,72 ℃终末延伸5 min。

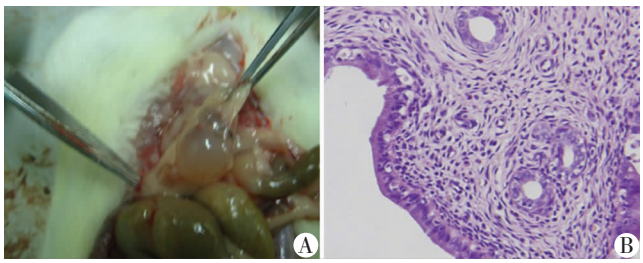
1.4 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析。实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,除了各组治疗前后体积比较采用配对t检验;其他采用单因素方差分析进行多组均数比较,方差齐时用LSD检验,不齐时用Games-Howell检验。

2 结果

2.1 造模后异位组织观察

造模3周后开腹,发现移植物体积增大,呈透明囊状;病理检验HE染色下异位子宫内膜上皮细胞内多见空泡,腺体数量少,腺腔狭窄,间质疏松,提示造模成功,见图1。

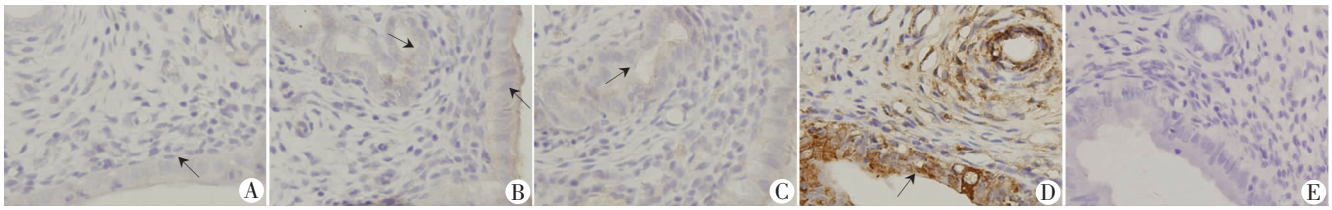


A:呈囊状的异位子宫内膜组织;B:病理变化(HE ×200)

图1 造模成功后各组模型组大鼠异位子宫内膜组织大体观察与病理学观察

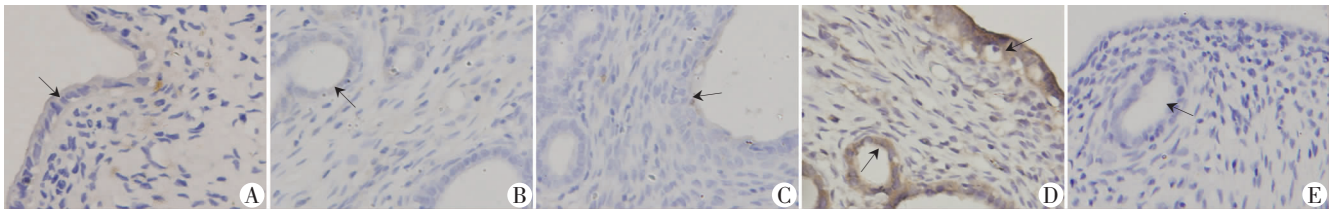
2.2 异位组织体积观察

治疗前后,模型组异位组织体积都较大,与治疗前各组相比无明显差别($P>0.05$)。治疗后,MDQD高、低剂量组与孕三烯酮组异位组织体积与给药前及模型组比较明显缩小($P<0.01$),MDQD高、低剂量组、孕三烯酮组间无明显差异($P>0.05$),具体见表1。



A:MDQD 高剂量组;B:MDQD 低剂量组;C:孕三烯酮组;D:模型组;E:假手术组 ↑:示 P450 阳性表达

图 2 P450 在各组大鼠异位子宫内膜的表达 (S-P×400)



A:MDQD 高剂量组;B:MDQD 低剂量组;C:孕三烯酮组;D:模型组 E:假手术组 ↑:示 COX-2 阳性表达

图 3 COX-2 在各组大鼠异位子宫内膜的表达 (S-P×400)

表 1 各组大鼠异位子宫内膜组织体积(mm^3, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药前	给药后
MDQD 高剂量组	9	154.91 ±5.51	36.01 ±3.49[ab]
MDQD 低剂量组	9	155.50 ±5.48	35.35 ±5.38[ab]
孕三烯酮组	9	157.83 ±7.71	33.95 ±3.41[ab]
模型组	10	155.06 ±6.17	158.95 ±6.26
假手术组	10	0	0

a:$P<0.01$,与模型组比较;b:$P<0.01$,与给药前比较

2.3 血清与组织 E_2、PEG_2的表达

与模型组比较,MDQD 高剂量组与孕三烯酮组大鼠血清和异位内膜组织 E_2、PGE_2均极显著下降($P<0.01$),MDQD 低剂量组除了血清 PGE_2与模型组比较无明显差异($P>0.05$)外,其它均极显著下降($P<0.01$)。与孕三烯酮组比较,MDQD 高剂量组无明显差异($P>0.05$),MDQD 低剂量组上述四者含量偏高($P<0.01$),见表 2。

表 2 各组大鼠血清与异位子宫内膜组织 E_2、PGE_2的含量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 E_2 (pg/ml)	组织 E_2 (ng/g)	血清 PGE_2 (ng/L)	组织 PGE_2 (ng/L)
MDQD 高剂量组	9	25.38 ±2.28[a]	1.07 ±0.10[a]	27.17 ±4.67[a]	20.73 ±3.78[a]
MDQD 低剂量组	9	30.30 ±3.48[ab]	1.44 ±0.06[ab]	35.96 ±5.43[b]	30.96 ±5.30[ab]
孕三烯酮组	9	24.43 ±2.30[a]	1.12 ±0.09[a]	28.17 ±6.37[a]	22.84 ±7.17[a]
模型组	10	40.88 ±3.89	2.66 ±0.23	40.81 ±5.17	49.61 ±8.06
假手术组	10	20.94 ±2.22	0.72 ±0.09	20.51 ±4.82	18.61 ±5.93

a:$P<0.01$,与模型组比较;b:$P<0.01$,与孕三烯酮组比较

2.4 免疫组化检测 P450、COX-2 蛋白的表达

P450 与 COX-2 在假手术组正常子宫内膜几乎不表达。而在其他 4 组异位内膜的腺上皮细胞及间质细胞细胞质中有不同程度的棕黄色颗粒表达:与表达最明显的模型组比较,MDQD 高、低剂量组及孕三烯酮组平均光密度值极显著降低($P<0.01$),而上述 3 组间无明显差异($P>0.05$),见图 2、3 和表 3。

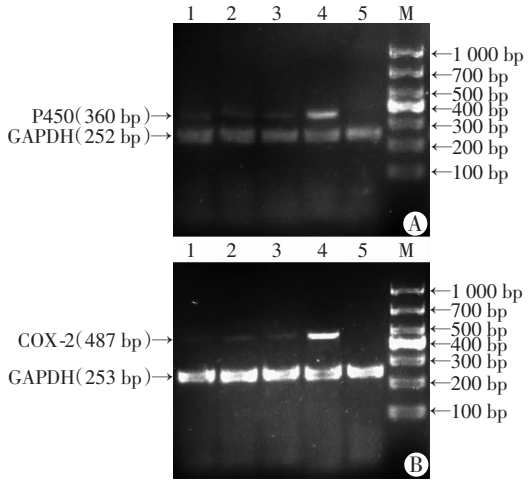
2.5 RT-PCR 检测 P450、COX-2 的表达

与模型组比较,MDQD 高、低剂量组和孕三烯酮组大鼠异位内膜 P450、COX-2 mRNA 的灰度值均极显著下降($P<0.01$),MDQD 高、低剂量组与孕三烯酮组间无明显差异($P>0.05$),见图 4、表 3。

表 3 各组大鼠异位子宫内膜 P450、COX-2 蛋白与 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	P450		COX-2	
		蛋白	mRNA	蛋白	mRNA
MDQD 高剂量组	9	22.58 ±4.84[a]	0.377 ±0.039[a]	4.70 ±0.73[a]	0.144 ±0.011[a]
MDQD 低剂量组	9	24.65 ±3.39[a]	0.390 ±0.037[a]	5.50 ±1.02[a]	0.150 ±0.007[a]
孕三烯酮组	9	25.27 ±3.35[a]	0.361 ±0.031[a]	4.26 ±0.84[a]	0.154 ±0.008[a]
模型组	10	37.03 ±4.01	0.913 ±0.053	14.89 ±1.65	0.488 ±0.039
假手术组	10	0	0	3.00 ±0.77	0.057 ±0.009

a:$P<0.01$,与模型组比较



1:MDQD 高剂量组;2:MDQD 低剂量组;3:孕三烯酮组;4:模型组;5:假手术组;M:标准

图 4 P450(A)与 COX-2(B) mRNA 在各组大鼠异位子宫内膜的表达

3 讨论

COX-2、PGE_2、P450 与雌激素生成代谢息息相关:COX-2 是 PGE_2合成的限速酶;PGE_2是 P450 的主要诱导剂,通过诱导 G 偶联蛋白膜受体 EP2、增加细胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平[6],促进 CYP19 基因启动因子Ⅱ与类固醇产生因子-1(SF-1)结合[2],增强 P450 的表达;P450 是合成雌激素的限速酶,能通过一系列环节使高生物学活性的雌二醇生成;雌二醇反过来又上调

COX-2的活性,继而上调PGE_2与P450,形成正反馈环[2,7]。雌二醇通过与雌激素受体ERα和ERβ结合产生一系列生物学效应,其能刺激异位内膜细胞增殖[7],使血管内皮细胞增生,还能刺激多种因子促进异位内膜的生长[8]。PGE_2和COX-2除了直接作用于雌激素生成代谢上,也可通过抑制异位内膜细胞凋亡与机体免疫清除,诱导细胞增殖因子和VEGF来间接促进异位内膜的生长[9-10]。

本研究中,P450arom和COX-2在正常内膜中几乎无表达,而在模型组异位内膜中表达非常明显,和国内外研究相符,也与内异症是雌激素依赖性疾病和内膜源头学说吻合,提示异位子宫内膜存在和正常内膜不同的生理缺陷,此缺陷在免疫-炎性异常环境中可上调自主合成雌激素酶系的表达。异位内膜组织P450、COX-2,外周血与局部病灶E_2、PGE_2及病灶体积经MDQD和孕三烯酮治疗后明显降低或缩小。说明MDQD和孕三烯酮通过抑制雌激素生成代谢酶及相关因子,降低血清与局部病灶雌二醇,使异位子宫内膜萎缩达到治疗EMS的目的。

内异症病机当属本虚标实,肾虚为本,淤血内阻为标。元气肾精亏虚,无力化生元阴元阳,均可导致推动或生血功能减弱,久之冲任二脉交阻,淤积胞宫。结合“肾主生殖”、“肾主骨生髓”理论,本病主要表现为神经生殖内分泌失调和免疫功能异常[11],中医与西医不同的发病原理在于患者本身体质的气血阴阳盈亏不同,本病多血淤、肾虚,局部血淤循环障碍和先天免疫功能异常注定了此病的内在易感性。大七气汤源于中医经典古方《医宗金鉴·妇科心法要诀》,根据EMS本虚标实的病理属性及现代药理研究,我们在活血化淤、行气散结的基础上,兼以补肾阴阳,益气扶正:姜黄、三棱、莪术活血化淤;菟丝子、淫羊藿调理冲任,补肾阴阳;黄芪、甘草益气扶正;半夏、陈皮燥湿散结;青皮、藿香、木香行气止痛;泽泻泻肾经之浊,诸药相配不但改善盆腔淤血状态,还使冲任阴阳气血盈亏平衡,胞宫藏泻有道。其制备过程按中药汤剂标准统一进行,在临床应用中效果良好,主要成分为姜黄、黄芪、菟丝子与淫羊藿:姜黄是味活血化淤的中药,研究表明其除了一定抗炎作用,还能降低异位内膜VEGF、MMP-9的表达[12];姜黄素能降低异位组织MVD(微血管密度)[13]、抑制异位内膜细胞体外分泌雌二醇[14]。黄芪能抑制异位内膜间质细胞趋化因子RANTES和CCR5受体[15],阻断病灶免疫-炎症反应;上调T细胞、B细胞、NK细胞的活性,增强机体免疫监视与清除能力。菟丝子与淫羊藿能双向调节雌激素,在高雌激素环境中能发挥抗雌激素作用[16],且补肾化淤中药能调节下丘脑-垂体-卵巢轴的功能,维持正常的性激素水平。

本研究中MDQD可能通过改善盆腔血液循环,增强机体免疫功能,减弱炎症介质、细胞因子对P450、COX-2和PGE_2的刺激作用,阻断体内雌二醇生成。由于按中医辨证分型后的大鼠EMS模型没有统一标准,造模后3周大鼠体质特征也不能代表EMS患者长期的气血阴阳盈亏状态,故本研究只有按照以方测证的逆向思维进行反证。因MDQD副作用少,以后会继续对MDQD深入研究。

参考文献:

[1] Yamanaka K, Xu B, Suganuma I, *et al*. Dienogest inhibits aromatase and cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E_2 production in human endometriotic stromal cells in spheroid culture[J]. Fertil Steril, 2012, 97(2): 477-482.

[2] Attar E, Bulun S E. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(1): 49-56.

[3] 陈蓉, 刘浩, 姜蓉, 等. 大七气汤对大鼠异位子宫内膜VEGF、MMP-9表达的影响[J]. 生殖与避孕, 2010, 30(10): 659-664.

[4] 杨萍, 纳冬荃, 熊亚龙, 等. 大鼠子宫内膜异位模型的建立与组织学观察[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2): 139-141.

[5] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 203.

[6] 王婧, 赵志明, 黄向华, 等. PGE2信号通路对子宫内膜异位症发病机制的影响[J]. 生殖与避孕, 2011, 31(8): 544-548.

[7] Rizner T L. Estrogen metabolism and action in endometriosis[J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 307(1/2): 8-18.

[8] 关铮, 李亚里. 雌激素受体亚型与子宫内膜异位症相关性研究进展[J]. 武警医学, 2008, 19(4): 353-355.

[9] Wu M H, Lu C W, Chuang P C, *et al*. Prostaglandin E2: the master of endometriosis? [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2010, 235(6): 668-677.

[10] 金华, 冷维春, 张爱臣. COX-2与子宫内膜异位症[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(30): 4338-4340.

[11] 李健美, 谈勇. 补肾祛淤法治疗子宫内膜异位症的研究概况[J]. 江苏中医药, 2007, 39(12): 82-84.

[12] 陈蓉, 陈景龙, 方毅, 等. 姜黄对大鼠子宫内膜异位症影响的实验研究[J]. 中成药, 2011, 33(7): 1145-1148.

[13] 张颖, 曹洪, 彭海英, 等. 姜黄素抑制子宫内膜异位症血管形成的实验研究[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(5): 363-366.

[14] 余峥, 王文娟, 张昌军, 等. 姜黄素抑制子宫内膜异位症雌激素生成的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1147-1149.

[15] 闵治红, 张冀宁, 华克勤. 川芎嗪和黄芪在子宫内膜异位症发生发展中对RANTES及受体的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(11): 981-984.

[16] 赵丕文, 王大伟, 牛建昭, 等. 红花等10种中药的植物雌激素活性研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 436-439.

(**收稿**:2012-06-15;**修回**:2012-07-29)

(编辑 吴培红)