

论著·基础研究

桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症大鼠血清免疫球蛋白和炎症因子水平的影响^{*}

刘泽滨¹,林立鹏¹,晁艳²,梁齐桁²,吴晓宾^{2△}

(1. 深圳市福田区妇幼保健院,广东深圳 518026;2. 广州中医药大学第二附属医院,广东广州 510120)

摘要:目的 探讨桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症大鼠血清免疫球蛋白和炎症因子水平的影响。方法 采用自体移植法建立子宫内膜异位症大鼠模型,将造模成功的 60 只大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组,以及桂枝茯苓丸低、中、高剂量组,并选 10 只大鼠设为空白对照组,阳性对照组给予 38 mg/kg 的达那唑混悬液灌胃,桂枝茯苓丸组分别给予 0.62、1.24、2.17 g/kg 的剂量灌胃,模型对照组和空白对照组给予相同体积的消毒饮用水灌胃,灌胃 4 周后,采用散射比浊法和 ELISA 双抗体夹心法分别检测大鼠血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 和白细胞介素(IL)-6、IL-8 水平。结果 模型对照组血清 IgG、IgA、IgM、IL-6 和 IL-8 含量明显高于空白对照组($P<0.05$);与模型对照组比较,中、高剂量桂枝茯苓丸组 IgG、IgA、IgM 含量显著降低($P<0.05$);高剂量桂枝茯苓丸组可显著降低大鼠血清中 IL-6 和 IL-8 水平($P<0.05$)。结论 桂枝茯苓丸可以调节子宫内膜异位症大鼠的免疫功能,对子宫内膜异位症大鼠具有明显的治疗作用。

关键词:桂枝茯苓丸; 子宫内膜异位症; 免疫球蛋白; 炎症因子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.006

中图法分类号:R285.5

文章编号:1673-4130(2018)16-1955-03

文献标识码:A

The effect of Guizhi Fuling pills on serum immunoglobulin and inflammatory factor in rats with endometriosis^{*}

LIU Zebin¹, LIN Lipeng¹, CHAO Yan², LIANG Qiheng², WU Xiaobin^{2△}

(1. Shenzhen Futian Women and Children Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China; 2. the Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: Objective To explore the effect of guizhi fuling pills in serum immunoglobulin and inflammatory factor in rats with endometriosis. **Methods** A rat endometriosis model was established by autologous grafting operation method. 60 rats with successfully established model were randomly divided into the model control group, the positive control group, guizhi fuling pills groups with low-, middle- and high-dose, and another 10 rats were set as the blank control group. Rats in positive control group were given 38mg/kg of danazol suspensions by gavage. Rats in guizhi fuling pills group were given its suspensions with the dose of 0.62g/kg, 1.24 g/kg and 2.17 g/kg by gavage. Rats in the model control group and the blank control group were only given sterilize water by gavage. After 4 weeks, the levels of IgG, IgA, IgM and IL-6, IL-8 in serum were measured by immunoturbidimetric method and ELISA double antibody sandwich method, respectively. **Results** Compared with the blank control group, the serum levels of IgG, IgA, IgM, IL-6 and IL-8 in the model control group were significantly higher ($P<0.05$). Compared with the model control group, the serum levels of IgG, IgA and IgM in guizhi fuling pills group with middle- and high-dose group were significantly lower ($P<0.05$). The levels of IL-6 and IL-8 in serum were down regulated by high-dose guizhi fuling pills ($P<0.05$). **Conclusion** Guizhi fuling pills could regulate the body's immune function in the experimental rats with endometriosis, and this treatment has an obvious curative effect on rats with endometriosis.

Key words: Guizhi fuling pills; endometriosis; immunoglobulin; inflammatory factor

子宫内膜异位症(EMs)是指具有生长功能的子宫内膜细胞经输卵管进入盆腔异位生长而形成的一种女性常见妇科疾病,好发于孕龄阶段妇女^[1-2]。据

报道,其发病诱因多认为是在免疫力降低时,机体缺乏对异位子宫内膜的免疫监视、识别和破坏,并导致内膜组织细胞异位种植生长^[3]。目前,该病尚无有效

^{*} 基金项目:广东省中医药局课题资助项目(2015KT1606;20161093)。

作者简介:刘泽滨,男,主管检验师,主要从事病毒生物学研究及临床检验工作。△ 通信作者, E-mail: xiaobinwu888@163.com。

本文引用格式:刘泽滨,林立鹏,晁艳,等. 桂枝茯苓丸对子宫内膜异位症大鼠血清免疫球蛋白和炎症因子水平的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16): 1955-1957.

的治疗方法。桂枝茯苓丸具有活血消癥化瘀之功效，临床常用于妇女血瘀经闭、癥块、恶露等顽疾，但其对 EMs 的作用及其机制尚不清楚。本文旨在探讨桂枝茯苓丸灌胃对 EMs 大鼠血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 和炎症因子白细胞介素 (IL)-6、IL-8 水平的影响及其免疫作用机制，为 EMs 的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 仪器与试剂 全自动特定蛋白分析仪 (SIE-MENS 公司)，ELX800 酶标仪 (BIO-TEK 公司)。IgG、IgA 和 IgM 检测试剂盒及其校准品购自 SIE-MENS 公司，IL-6 和 IL-8 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。桂枝茯苓丸：成分为桂枝、茯苓、牡丹皮、桃仁、白芍，310 mg/粒，主要能够优化血液流变性，防止血小板聚集，调节内分泌功能，起到抗炎症、镇痛、抗肿瘤等治疗效果^[4]，购自江苏康缘药业 (批号 20170501)。达那唑：200 mg/粒，购自江苏联环药业股份有限公司 (批号 20170402)。

1.1.2 实验动物 清洁级健康成熟未交配的雌性 SD 大鼠共 70 只，体质量 (200±30)g，由广东省医学实验动物中心提供 (ISO/IEC 17025 认可证书 No. CNAS L3623，使用许可证号 SYXK 粤 2013-0094)。

1.2 方法

1.2.1 自体移植法进行 EMs 模型大鼠的制备 参照文献^[5]，选择清洁级大鼠，每日进行阴道涂片检查，于动情期进行手术造模。以 2% 的戊巴比妥钠 0.5 mL 腹腔麻醉，将大鼠固定于操作台上，于下腹正中尿道上方作一斜向右侧的切口，长约 1.5 cm，切取右侧子宫角处的一段子宫约 1 cm，迅速将其置于生理盐水中，将子宫内膜与肌层分离，并切取 2 块各约 5 mm×5 mm 的内膜组织片段，令其表面上皮层对着腹壁，将组织块四角与腹壁肌肉缝合，左右各一。右侧宫角断端吻合结扎。建模 4 周后再次剖腹观察移植物生长情况，若体积增大，出现液体积聚，并有血管形成，表明 EMs 大鼠模型制备成功。

1.2.2 分组及给药 造模后 4 周，将造模成功的大鼠随机分为 5 个组，每组 12 只：(1)模型对照组，灌胃给予相同体积的消毒饮用水；(2)阳性对照组，灌胃给予达那唑混悬液 38 mg/kg；(3)桂枝茯苓丸 3 个剂量组，包括桂枝茯苓丸低、中、高剂量组，分别给予相当于生药 0.62、1.24、2.17 g/kg 的桂枝茯苓丸混悬液灌胃。同时设空白对照组：造模同时另取 10 只大鼠只行开腹手术，不剥离子宫内膜，关腹，其余操作相同，其灌胃与模型对照组相同。以上灌胃 1 次/日，连续给药 4 周。

1.2.3 血标本采集及指标检测 各组大鼠灌胃 4 周后，经内眦静脉采血 1 mL，离心后分离血清，-20℃ 保存待检。采用免疫比浊法检测大鼠血清 IgG、IgA 和 IgM 水平，并采用 ELISA 双抗体夹心法检测血清 IL-6 和 IL-8 水平。严格按照试剂说明书进行操作。

1.2.4 子宫内膜组织标本采集及处理 治疗结束

后，将大鼠处死，无菌采集子宫内膜组织，大小约 2.0 cm×2.0 cm×2.0 cm，用 10% 甲醛固定，常规石蜡包埋，行病理检查。

1.3 统计学处理 实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS16.0 统计软件进行数据统计分析，多组间均数比较均采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠子宫内膜细胞形态的变化 正常大鼠子宫内膜上皮细胞呈长柱状，排列规整，肌层较厚，腺体丰富；模型组子宫内膜上皮为低柱状或扁平状 (不规整)，大部分有分泌现象 (可见核下空泡)，间质较致密，血管丰富，腺体少量或未见，大部分上皮细胞有分泌现象 (可见核下空泡)；桂枝茯苓丸中、高剂量组大鼠子宫内膜上述病理变化均有不同程度的改善，如腺体细胞排列整齐、间质细胞增生、血管减少等。

2.2 桂枝茯苓丸对 EMs 模型大鼠血清免疫球蛋白的影响 结果显示，与空白对照组比较，模型对照组血清 IgG、IgA 和 IgM 含量明显升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；与模型对照组比较，桂枝茯苓丸中、高剂量组和阳性对照组其血清 IgG、IgA、IgM 含量均显著降低，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，但与空白对照组比较，桂枝茯苓丸的中、高剂量组血清 IgG、IgA、IgM 浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，且桂枝茯苓丸中、高剂量组和阳性对照组其血清 IgG、IgA、IgM 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠血清免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 测定结果 (g/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	IgG	IgA	IgM
空白对照组	4.02±0.71	1.18±0.64	1.44±0.17
模型对照组	5.46±0.30**	2.00±0.14**	1.82±0.15**
阳性对照组	4.20±0.40*	1.20±0.25*	1.39±0.177*
桂枝茯苓丸低剂量组	5.26±0.20	1.81±0.14	1.76±0.66
桂枝茯苓丸中剂量组	4.34±0.30*	1.55±0.35*	1.59±0.07*
桂枝茯苓丸高剂量组	4.01±0.50*	1.12±0.41*	1.40±0.04*

注：与模型对照组比较，* $P < 0.05$ ；与空白对照组比较，** $P < 0.05$

表 2 桂枝茯苓丸对 EMs 大鼠血清 IL-6 和 IL-8 的影响 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-8
空白对照组	165.32±23.46	0.20±0.05
模型对照组	223.20±38.75*	0.52±0.04*
阳性对照组	178.69±33.51**	0.22±0.03**
桂枝茯苓丸低剂量组	211.73±38.12	0.50±0.02
桂枝茯苓丸中剂量组	199.75±35.42	0.49±0.07
桂枝茯苓丸高剂量组	170.60±30.24**	0.35±0.04**

注：与空白对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型对照组比较，** $P < 0.05$

2.3 桂枝茯苓丸对 EMs 模型大鼠血清 IL-6 和 IL-8 的影响 与空白对照组比较，模型对照组血清 IL-6 和

IL-8 水平显著升高($P < 0.05$),而与阳性对照组比较,桂枝茯苓丸高剂量组血清 IL-6 和 IL-8 水平无显著差异($P > 0.05$)。与模型对照组比较,桂枝茯苓丸高剂量组与阳性对照组其血清 IL-6 和 IL-8 水平均有降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但桂枝茯苓丸低、中剂量组与模型对照组比较,其血清 IL-6 和 IL-8 水平均有降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

3 讨 论

EMs 是临床上常见的一类与炎症和免疫相关的妇科疾病,常伴随痛经、月经紊乱、性交痛和不孕等临床症状^[6]。据报道,EMs 患者的血清和腹腔液中多种细胞介导的免疫成分发生变化,这些免疫成分的改变则会降低了对异位的子宫内膜免疫监视、识别和破坏,从而促进异位的子宫内膜种植^[1,7]。目前,该病的发病机制尚未完全明确,且临床上主要使用常规西药治疗该病,但效果并不理想。桂枝茯苓丸是活血化瘀的名方,在临床上广泛应用于 EMs 等血瘀证的治疗,但是其对 EMs 的作用及机制尚不十分清楚。

EMs 可能是一种自动免疫性疾病,当 B 细胞分化为浆细胞,首先产生的免疫球蛋白是 IgM,然后通过转化产生 IgG 和 IgA^[8-9]。在缺乏任何内源性感染的情况下,腹腔腔会出现不同的抗体。IgG 主要参与慢性炎症和自动免疫反应,IgA 主要参与黏膜的免疫,IgM 主要参与急性炎症。既往研究发现,在 EMs 患者的腹膜液中,IgG 水平升高,且子宫内膜腺上皮染色发现 IgG、IgA 也显著升高^[10]。本实验发现,桂枝茯苓丸中、高剂量组和阳性对照组其血清 IgG、IgA、IgM 含量均显著降低,且桂枝茯苓丸中、高剂量组和阳性对照组其血清 IgG、IgA、IgM 含量无显著差异,提示 EMs 模型大鼠体液免疫应答反应增强,中、高剂量的桂枝茯苓丸可以降低 EMs 大鼠血清中 IgG、IgA、IgM 水平。但具体机制还有待进一步研究。

EMs 患者的病理改变主要是其异位的子宫内膜发生周期性出血,其间各种前炎症细胞因子参与了 EMs 的发病过程,并起着关键性作用。白细胞介素是活化 T 淋巴细胞和巨噬细胞产生的一些细胞因子,其中 IL-6 和 IL-8 是机体炎症反应及病理、生理过程的重要介质,具有激活和诱导 T 细胞和 B 细胞分化,增强单核细胞、NK 细胞杀伤靶细胞,趋化、激活中性粒细胞,促进中性粒细胞的溶酶体活性及吞噬功能^[11]。据报道,在 EMs 患者血清和腹腔液中,炎症因子 IL-6 和 IL-8 水平明显升高^[12-13],桂枝茯苓丸可下调 EMs 大鼠血清 TNF- α 水平^[14]。而桂枝茯苓丸具有活血化瘀、缓消症块的功效。本实验发现,桂枝茯苓丸高剂量组与阳性对照组其血清 IL-6 和 IL-8 水平均有显著降低,桂枝茯苓丸低、中剂量组其血清 IL-6 和 IL-8 水平均有降低,但不显著,提示桂枝茯苓丸可下调 EMs 大鼠血清 IL-6 和 IL-8 水平,对 EMs 具有一定的治疗作用。其机制可能是桂枝茯苓丸减少 T、B 淋巴细胞分化,减少炎症细胞及单核巨噬细胞进入异位子宫内

膜组织,阻断单核巨噬细胞活化及炎症浸润,阻碍了 EMs 的发生与发展^[15-16]。

4 结 论

桂枝茯苓丸可下调 EMs 模型大鼠血清中 IgG、IgA、IgM、IL-6 和 IL-8 水平,调节 EMs 大鼠的免疫功能,对 EMs 大鼠具有明显的治疗作用。其作用可能是通过调节机体的免疫活性细胞或者免疫活性细胞分泌的免疫活性物质来影响异位内膜生长的微环境,继而干扰异位内膜的存活和生长,控制病情发展。

参考文献

- [1] 杜鹏辉,张貽凤,王进. 子宫内异位症的病因学研究进展[J]. 湖北科技学院学报(医学版),2015,29(5):455-457.
- [2] 余贵媛,金平. 深部浸润型子宫内膜异位症的诊断研究新进展[J]. 国际妇产科学杂志,2017,44(4):459-462.
- [3] 吴修红,刘旭航,朴成玉,等. 中药治疗子宫内膜异位症的实验研究方法及展望[J]. 中医药信息,2013,30(1):124-126.
- [4] 高世荣. 桂枝茯苓丸药理及临床应用综述[J]. 河南中医,2016,36(2):358-359.
- [5] 李哲. 来氟米特对子宫内膜异位症 SD 大鼠模型作用的实验研究[D]. 郑州:郑州大学,2016.
- [6] KENNEDY S, BERGQVIST A, CHAPRON C, et al. ESHRE guideline for the diagnosis and treatment of endometriosis[J]. Hum Reprod,2005,20(10):2698-2704.
- [7] 阳泽彬. 子宫内膜异位症发病机制的研究进展[J]. 医学综述,2006,31(22):485-486.
- [8] 温丽,郭珍,常春红,等. 子宫内膜异位症患者血清和腹腔液中 VEGF、IL-6、TNF- α 、CA125 表达及临床意义[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(5):467-470.
- [9] 杨晓,胡红文,李寅. 子宫内膜异位症复发相关因素探讨[J]. 实用妇科内分泌杂志,2017(27):152-153.
- [10] 魏颖颖,方小玲. 子宫内膜异位症患者腹腔液肝细胞生长因子和血管内皮生长因子水平的检测[J]. 医学临床研究,2007,24(7):1104-1105.
- [11] 潘兆宝,范玉梅,韩守华,等. 血清 IL-6、IL-8、纤维蛋白原水平在 COPD 患者中的变化及其与预后的关系[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(9):1261-1263.
- [12] 曹伟丽,陈红. EMT 患者血清和腹腔液中 CA125、VEGF、炎症细胞因子水平的变化及意义[J]. 同济大学学报(医学版),2016,37(1):85-88.
- [13] 陈翠云. 子宫内膜异位症患者 CA125 和细胞因子水平及临床意义探讨[J]. 临床医学工程,2016,23(3):303-304.
- [14] 杨丽. 内异止痛汤对 EMs 大鼠关键基因的筛选及炎症相关机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
- [15] 开海丽,乔海凤,刘颖蕾,等. 不同治疗方法对大鼠子宫内膜异位症的疗效比较[J]. 中华妇幼临床医学杂志,2017(6):674-680.
- [16] 卞广玉,殷欣,王德莹,等. 子宫内膜异位症患者中巨噬细胞与不孕的关系[J]. 现代妇产科进展,2017,26(10):794-796.