

# 盆炎方对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织 TNF- $\alpha$ 、EGF 蛋白表达的影响

戴月<sup>1</sup>, 匡继林<sup>2\*</sup>

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

**[摘要]** **目的** 观察盆炎方对盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、表皮生长因子(EGF)蛋白表达的影响。**方法** 以“机械性损伤+混合菌种接种法”建立盆腔炎性疾病后遗症SD雌性大鼠子宫模型。造模成功后随机分为模型对照组、妇科千金胶囊组及盆炎方高、中、低剂量组,另设空白对照组和假手术组共计7组,每组8只。分别以盆炎方高、中、低剂量药液、妇科千金混悬液及同等体积蒸馏水灌胃21 d。采用免疫组化法检测各组大鼠子宫组织中TNF- $\alpha$ 、EGF蛋白表达的差异。**结果** 与模型组比较,盆炎方各剂量组大鼠子宫组织的TNF- $\alpha$ 表达明显降低( $P<0.05$ );盆炎方中、高剂量组大鼠子宫组织的EGF蛋白表达明显升高( $P<0.05$ );**结论** 盆炎方高剂量组能够显著降低盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫中TNF- $\alpha$ 的表达,明显增强盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫中EGF的表达,盆炎方对盆腔炎性疾病后遗症有积极治疗作用。

**[关键词]** 盆腔炎性疾病后遗症;盆炎方;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;表皮生长因子;大血藤;败酱草

**[中图分类号]**R285.5

**[文献标识码]**A

**[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.04.004

## The Influence of Penyan Decoction on the TNF- $\alpha$ and EGF Expression of Uterus in Rats with Pelvic Inflammatory Disease Sequelae

DAI Yue<sup>1</sup>, KUANG Jilin<sup>2\*</sup>

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the influence of Penyan decoction (PYD) on the TNF- $\alpha$  and EGF expression of uterus in rats with pelvic inflammatory disease sequelae. **Methods** The uterus model rats with pelvic inflammatory disease sequelae were established by using "the mechanic injury and mixed bacteria inoculation" method. The successful model rats were randomly divided into model group, Fuke Qianjin capsule group, and high, medium and low dose of PYD groups and PYD low dose group, rats were also assigned into sham-operation group and normal control group, 8 rats in each group. The rats were intragastric administration with high, medium, low dose PYD liquid, Fufang Qianjin capsule and the same volume of distilled water for 21 days, respectively. The TNF- $\alpha$  and EGF expression of rats in all groups were detected by using the immunohistochemical method. **Results** Compared with the model group, the expression of TNF- $\alpha$  was significantly decreased in the rats with different dose groups ( $P<0.05$ ); the expression of EGF in medium dose group and high dose group was significantly higher ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PYF group with high dose could significantly reduce the expression of TNF- $\alpha$  and increase the expression of EGF in uterus of rats with pelvic inflammatory disease sequelae, and the PYD show positive treatment effect on sequelae of pelvic inflammatory disease.

**[Keywords]** sequelae of pelvic inflammatory disease; Penyan Decoction; TNF- $\alpha$ ; EGF; *Sargentodoxa cuneata*; *Dahurian patrinia* herb

盆腔炎性疾病后遗症 (sequelae of pelvic inflammatory disease, SPID)是指女性上生殖道及盆腔周围结缔组织的一种慢性炎症<sup>[1]</sup>。是妇科的常见病、

多发病。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )作为一种促炎症因子和免疫调节因子,在炎症反应中发挥着重要作用。当机体遭遇急、慢性炎

**[收稿日期]**2015-10-03

**[基金项目]**谢剑南名老中医传承工作室资助项目。

**[作者简介]**戴月,女,硕士研究生,研究方向:中医药防治不孕不育症的研究。

**[通讯作者]**\*匡继林,女,主任医师,教授,硕士研究生导师,E-mail:kuangjilabc@tom.com。

性反应或免疫反应时,它可根据程度不同而做出不同反应。罹患盆腔炎性疾病后遗症,多由于自身免疫力下降,对于外来疾病的防御力减弱,致使盆腔组织容易受到细菌、微生物等的混合感染,炎症细胞浸润子宫内膜组织、宫旁组织及盆腔结缔组织后产生炎性渗出、纤维化、粘连等一系列炎症表现。表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)对上皮细胞具有修复作用<sup>[2]</sup>。在其作用之下,能够加速细胞增殖,使已经分化成熟的细胞不断生成新生细胞,从而替代衰老及凋亡细胞,起到修复与再生的作用。

盆炎方是湖南省中医院名老中医谢剑南教授在临床治疗 SPID 的经验效方,已临床效验多年,临床观察发现本方对湿热瘀结型 SPID 疗效显著<sup>[3]</sup>,但药理作用机制、作用原理尚未完全明确。本实验旨在通过采用“机械性损伤+混合菌种接种法”制备 SPID 大鼠子宫模型,并对盆炎方各剂量组干预治疗后的盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织中炎症因子 TNF- $\alpha$  及 EGF 蛋白表达的差异性进行观察,从而探讨盆炎方治疗该病的作用机制。现将结果报道如下。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

雌性、健康未孕的 SD 大鼠 60 只,体质量(205.72 $\pm$ 16.36) g,鼠龄 8~12 周,购自湖南斯达克实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2011-0003。

### 1.2 实验药物及菌种

干预用中药:盆炎方,由湖南中医药大学第二附属医院制剂室提供。药物组成:大血藤 20 g,败酱草 15 g,虎杖 15 g,续断 15 g,杜仲 15 g,当归 10 g,赤芍 10 g,丹参 10 g,泽兰 10 g,香附 10 g,牡丹皮 10 g,生蒲黄 10 g,三七粉 6 g,乳香 5 g,没药 5 g,甘草 5 g。阳性对照药:妇科千金胶囊,由株洲千金药业股份有限公司生产。0.4 g/粒。金黄色葡萄球菌(ATCC131101)、大肠杆菌(ATCC131102)、乙型溶血性链球菌(ATCC131103)按照为 1:1:2 配成 30 $\times$ 10<sup>8</sup>/mL 浓度的混合细菌悬液。实验菌种由湖南中医药大学微生物教研室提供。

### 1.3 试剂

TNF- $\alpha$  检测试剂盒、EGF 检测试剂盒(均购自武汉博士德生物工程有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 模型建立

在以往细菌感染致炎的基础上,加用机械性损

伤子宫内膜的因素来制备 SPID 大鼠子宫模型<sup>[4-5]</sup>。使用 2%戊巴比妥钠进行腹腔注射以麻醉大鼠(40 mg/kg),待麻醉生效后,用橡皮筋牵拉大鼠四肢并固定于实验解剖盘上,剪去下腹部被毛。在相对无菌条件下,取大鼠下腹正中切口约 0.8~1 cm,开腹后暴露 Y 型子宫。在注入菌液之前用无菌注射器机械损伤子宫内膜(注射器磨去针尖并轻柔来回搔刮左侧子宫),然后用 1 mL 注射器抽取 0.2 mL 混合细菌悬液<sup>[6]</sup>(金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、乙型溶血性链球菌以 1:1:2 的比例溶于无菌生理盐水配成 30 $\times$ 10<sup>8</sup>/mL 浓度的混合细菌悬液),向大鼠左侧输卵管-卵巢方向缓慢推注,注毕,用眼科镊夹闭针孔,防止菌液溢出。分层关腹,用 2%碘酊消毒术区。假手术组将大鼠麻醉后,依据上述步骤开腹,不做任何损伤性操作,直接分层缝合术野;空白组不造模。

### 2.2 分组

将 60 只 SD 雌性大鼠随机分为空白组 8 只、假手术组 8 只、模型对照组 44 只。观察性喂养第 15 天,随机抽取模型对照组大鼠 4 只行造模评价,待造模评价提示造模成功后,再随机将模型对照组大鼠分成:盆炎方高剂量组、中剂量组、低剂量组、妇科千金胶囊组、模型对照组,每组各 8 只。

### 2.3 给药

盆炎方每剂含生药 171 g,妇科千金胶囊每日服用剂量 2.4 g。按成人平均体质量为 60 Kg 计算,根据“人和动物间体表面积折算给药剂量比率表<sup>[7]</sup>”折算成人等效剂量的 0.5、1、2 倍,分别为盆炎方高剂量组 3.56 g/Kg、中剂量组 1.78 g/Kg、低剂量组 0.89 g/Kg、妇科千金胶囊组 0.22 g/Kg 灌胃给药;上述各组给药体积均为 1 mL/100 g。空白组、假手术组、模型对照组分别给予以等容量蒸馏水灌胃,给药体积均为 1 mL/100 g。每日 1 次(上午 8:00-9:30),连续给药 21 d。每周称质量 1 次,根据大鼠体质量变化予以调整相应给药量。

### 2.4 取材方法

相对无菌条件下取出完整的大鼠子宫,用 10%福尔马林溶液浸泡固定标本,经脱水透明,石蜡包埋,石蜡切片机连续切片制成厚约 5  $\mu$ m 的石蜡切片,分别进行 HE 染色和免疫组化检测。

### 2.5 免疫组化法

依据试剂盒操作说明进行以下操作:将载玻片用 APES 防脱片剂处理,捞片后置烤箱 58~60  $^{\circ}$ C 30~60 min 以使切片紧密黏附;切片常规脱蜡至水化;3% $H_2O_2$  去离子水(无色液体),室温孵育 5~10 min 以消灭内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗,3 min $\times$ 3 次;滴加试剂 A(蓝色液体)室温孵育 10~

15 min,倾去,勿洗;按比例稀释的一抗,37  $^{\circ}$ C 孵育 2~3 h 或 4  $^{\circ}$ C 过夜;PBS 冲洗,3 min $\times$ 3 次;滴加试剂 B(黄色液体),室温或 37  $^{\circ}$ C 孵育 5~10 min;PBS 冲洗,3 min $\times$ 3 次;滴加试剂 C(橙色液体),室温或 37  $^{\circ}$ C 孵育 10~15 min;PBS 冲洗,3 min $\times$ 3 次;显色剂显色(DAB 或 AEC);自来水充分冲洗。封片。

2.6 结果判定

上述染色均设阳性对照片和阴性对照片,阳性对照片为已知切片,阴性对照片为 PBS 替代一抗,显微镜观察,阳性结果为:胞浆、胞核、胞膜为棕黄色颗粒。镜下组织细胞结构清楚,阳性颗粒定位好,染色高于背景。免疫组化阴性无染色。采用 Motic B5 显微摄像系统拍照,400 倍视野下每个切片随机摄取 4 个视野,用医学图像分析系统分析每个阳性细胞的平均灰度值,信号强度用平均灰度值表示,平均灰度值越大,说明表达越强。

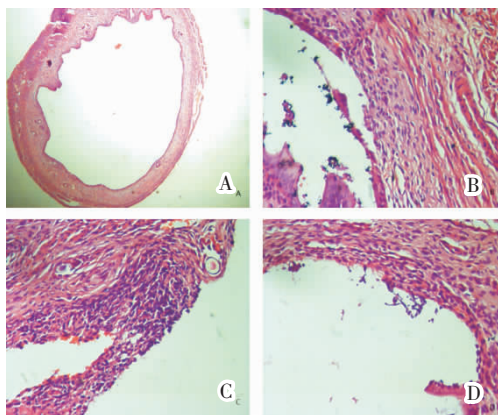
2.7 统计方法

实验数据采用 SPSS19.0 统计软件进行统计处理,数据处理与统计分析计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”进行表示。先检验样本方差齐性。如果符合正态性和方差齐性,可采用 One-Way ANOVA 检验,并进行组间的多重比较;如果不符合正态性和方差齐性时,可采用 Dunnett *t* 检验进行组间比较。 $P<0.05$  表示有统计学意义, $P<0.01$  表示有显著统计学意义。

3 结果

3.1 模型成功判定标准<sup>[8-9]</sup>

肉眼观察:子宫形态异常(迂曲或扩张)、子宫充血、肿胀、积液、积脓或与盆腔周围组织发生粘连;盆腔积液。病理学观察:宫腔积液、扩张或粘连、腔壁结构紊乱、固有层变薄或消失、上皮细胞脱落或坏死、内膜水肿或充血、炎性细胞浸润、脱落等。见图 1。



A.宫腔积液;B.子宫内膜脱落;C.子宫外膜炎;D.子宫内膜脱落

图 1 SPID 模型病理显微光镜图(HE 染色 $\times$ 400)

3.2 各组间大鼠子宫组织中 TNF- $\alpha$  蛋白表达

与空白组、假手术组比较,所有致病大鼠子宫组织中 TNF- $\alpha$  表达均增加,以模型对照组最高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),提示模型造模成功;与模型对照组比较,盆炎方低、中、高剂量组及妇科千金胶囊组子宫组织的 TNF- $\alpha$  表达明显下降( $P<0.05$ );与妇科千金胶囊组比较,盆炎方低、中剂量组的 TNF- $\alpha$  蛋白表达有统计学意义( $P<0.05$ );盆炎方高剂量组与妇科千金胶囊组比较无统计学意义( $P>0.05$ )。通过盆炎方低、中、高剂量组及妇科千金胶囊干预治疗后的盆腔炎性疾病后遗症大鼠子宫组织中 TNF- $\alpha$  蛋白表达具有明显的调节作用。结果见表 1,图 2。

3.3 各组间大鼠子宫组织中 EGF 蛋白表达

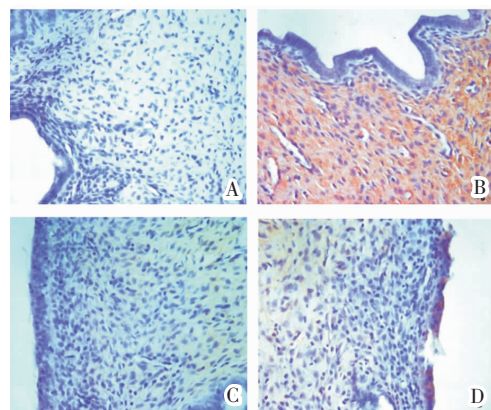
与空白组、假手术组比较,所有致病大鼠子宫组织中 EGF 表达均下降,以模型对照组最低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),提示模型造模成功;与模型对照组比较,盆炎方中、高剂量组子宫组织的 EGF 蛋白表达明显升高( $P<0.05$ );与妇科千金胶囊组比较,盆炎方低、中、高剂量组子宫组织的 EGF 蛋白表达无显著性差异( $P=0.410>0.05$ )。结果见表 1,图 3。

表 1 各组 SPID 大鼠子宫中 TNF- $\alpha$ 、EGF 蛋白表达

(灰度值, $\bar{x}\pm s$ , $n=8$ )

组别	给药剂量(g/Kg)	TNF- $\alpha$	EGF
空白组	-	129.2 $\pm$ 17.9	207.0 $\pm$ 10.7
假手术组	-	132.6 $\pm$ 19.8	192.4 $\pm$ 9.9
模型对照组	-	192.9 $\pm$ 15.5 $\Delta$	149.2 $\pm$ 31.4 $\Delta$
妇科千金组	2.2	142.8 $\pm$ 9.7 $\Delta\blacktriangle$	176.4 $\pm$ 11.5 $\Delta\blacktriangle$
盆炎方低剂量组	8.9	171.9 $\pm$ 16.3 $\blacktriangle^*$	151.6 $\pm$ 17.9 $\blacktriangle$
盆炎方中剂量组	17.8	155.3 $\pm$ 11.6 $\blacktriangle^*$	166.3 $\pm$ 9.2 $\blacktriangle$
盆炎方高剂量组	35.6	147.8 $\pm$ 29.8 $\Delta\blacktriangle$	178.9 $\pm$ 16.0 $\Delta\blacktriangle$
F 值		30.174	21.334

注:与空白组、假手术组比较, $\Delta P<0.05$ ;与模型对照组比较, $\blacktriangle P<0.05$ 。



A.空白组;B.模型对照组;C.盆炎方高剂量组;D.妇科千金胶囊组

图 2 各组免疫组化 TNF- $\alpha$  光镜图( $\times$ 400)

