

- raceae) leaf infusion[J]. Phytotherapy Research, 1998, 12: 562-567.
- [3] Liu Y, Murakami N, Ji H, et al. Antimalarial flavonol glycosides from euphorbia hirta[J]. Pharmaceutical Biology, 2007, 45(4): 278-281.
- [4] Hansen K, Adersen A, Smitt UW, et al. Angiotensin converting enzyme(ace) inhibitory flavonoids from erythroxylum laurifolium[J]. Phytomedicine, 1996, 2(4): 313-317.
- [5] Yen CT, Hsieh PW, Hwang TL, et al. Flavonol glycosides from muehlenbeckia platyclada and their anti-inflammatory activity[J]. Chem. Pharm Bull, 2009, 57 (3): 280-282.
- [6] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1100.
- [7] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. Nature, 1980, 288: 373-376.
- [8] Furchgott RF. The Role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs[J]. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1984, 24: 175-197.
- [9] Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor[J]. Nature, 1987, 327: 524-526.
- [10] Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action[J]. Biochim Biophys Acta, 1993, 1178: 153-175.
- [11] Martin W, Villani GM, Jothianandan D, et al. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1985, 232: 708-716.
- [12] Masaki E, Kondo I. Methylene blue, a soluble guanylyl cyclase inhibitor, reduces the sevoflurane minimum alveolar anesthetic concentration and decreases the brain cyclic guanosine monophosphate content in rats[J]. Anesth Analg, 1999, 89: 484-489.
- [13] Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, et al. A enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation[J]. Nature, 1976, 263: 663-665.
- [14] Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions[J]. Physiological Reviews, 1999, 79 (4): 1193-1226.
- [15] Wise H, Jones RL. Focus on prostacyclin and its novel mimetics[J]. Trends Pharmacol Sci, 1996, 17: 17-21.

(编辑: 梁进权)

罗氏内异方含药血清对子宫内膜异位症合并不孕患者腹腔液细胞的影响

史云¹, 伍海鹰², 何金洋³, 陶莉莉¹ (1. 广州中医药大学第一附属医院妇科, 广东 广州 510405; 2. 广州市妇女儿童医疗中心妇科, 广东 广州 510400; 3. 广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨罗氏内异方对子宫内膜异位症合并不孕患者腹腔液细胞的影响。**方法** 分离、培养子宫内膜异位症不孕患者腹腔液细胞, 采用罗氏内异方与内美通含药血清刺激 6 h, 荧光定量聚合酶链反应测定血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血管内皮生长因子受体 1(FLT-1)与血管内皮生长因子受体 4(FLT-4) mRNA 表达水平的变化。**结果** 与生理盐水组比较, 罗氏内异方高剂量组 TNF- α mRNA 显著降低($P < 0.01$), 高、中剂量组 VEGF mRNA 均显著降低($P < 0.01$), 高、中、低剂量组 FLT-1 mRNA 均显著降低($P < 0.05$); 高、中剂量组 FLT-4 mRNA 均显著降低($P < 0.01$)。**结论** 罗氏内异方治疗轻型子宫内膜异位症不孕症的机制可能是通过降低患者腹腔液细胞 VEGF、TNF- α 、FLT-1、FLT-4 mRNA 的表达, 改善腹腔内环境而实现的。

关键词: 罗氏内异方; 子宫内膜异位症; 不孕症; 腹腔液细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)04-0344-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.04.005

Influence of Serum Containing *Luoshi Neiyi* Recipe on Peritoneal Fluid Cells in Endometriosis Complicated with Infertility Patients

SHI Yun¹, WU Haiying², HE Jinyang³, TAO Lili¹ (1. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of

收稿日期: 2013-02-25

作者简介: 史云, 女, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 中医药调节女性生殖障碍的临床与实验研究。Email: zysyun@163.com。

基金项目: 广东省科技计划项目(83018)。

Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Department of Gynecology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510400 Guangdong, China; 3. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the influence of *Luoshi Neiyi* Recipe on peritoneal fluid cells in endometriosis complicated with infertility patients. **Methods** Peritoneal fluid cells were isolated from endometriosis complicated with infertility patients, and then were cultured in vitro with serum containing different concentrations of *Luoshi Neiyi* Recipe and Nemestran for 6 hours. Vascular endothelial growth factor(VEGF), tumor necrosis factor alpha(TNF- α), growth factor receptors 1 and 4(FLT-1 and FLT-4) mRNA expression levels were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction(PCR). **Results** Compared with the normal saline control group, TNF- α mRNA expression in high-dosage *Luoshi Neiyi* Recipe group was reduced obviously($P < 0.01$), VEGF and FLT-4 mRNA was reduced in high- and medium-dosage *Luoshi Neiyi* Recipe groups($P < 0.01$), and FLT-1 mRNA was reduced in high-, medium- and low-dosage of *Luoshi Neiyi* Recipe groups($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of *Luoshi Neiyi* Recipe in the treatment of mild endometriosis complicated with infertility is probably related with the reduction of VEGF, TNF- α , FLT-1 and FLT-4 mRNA expression in peritoneal fluid cells and with the regulation of abdominal internal environment.

Keywords: *Luoshi Neiyi* Recipe; Endometriosis; Infertility; Peritoneal fluid cells

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是严重影响育龄妇女生育能力和生活质量的常见妇科疑难病,临床上常导致痛经、月经不调、性交痛和不孕等,在 EMs 患者中,约 30 %~40 %的妇女合并不孕^[1]。因此,子宫内膜异位症导致不孕症是生殖医学界亟待解决的难题。重度子宫内膜异位症患者可能因盆腔解剖结构的改变而造成不孕,但造成轻度子宫内膜异位症患者不孕的机制至今尚不十分清楚。近年来,国内外学者在研究中发现,子宫内膜异位症患者腹腔微环境的改变对女性生殖功能的影响可能是此类患者不孕的原因^[1-2]。罗氏内异方是广州中医药大学第一附属医院院内制剂,对子宫内膜异位症具有显著的疗效^[3-4],本研究从影响腹腔内环境的角度进一步探讨其治疗子宫内膜异位症导致不孕症的机理。

1 材料与方法

1.1 试剂及药物 胎牛血清、RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);M-MLV 逆转录酶、RNase inhibitor 及 OligodT 引物(Fermentas 公司);dNTP(广州威佳生物科技有限公司);染料法定量 PCRmasterMix(东洋纺公司);罗氏内异方,由益母草、浙贝母、桃仁、丹参、海藻、牡蛎等组成,经水提制备成口服液,冷藏备用(广州中医药大学第一附属医院);内美通胶囊(东莞康宁药业有限公司,批号:53090208115)。

1.2 仪器 ABI2720 型 PCR 仪、ABI7300 型定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)、DL-6000B 型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.3 动物 21~25 日龄 Wistar 大鼠,雌性,SPF 级,体质量 65~70 g,广州中医药大学动物中心,动物合格证号:SCXK(粤)2008-0020。

1.4 含药血清的制备 将大鼠随机分为生理盐水对照组(给予等量生理盐水),罗氏内异方高、中、低剂量组(24, 12, 6 g·kg⁻¹,分别为临床等效剂量的 2, 1, 0.5 倍),内美通组(0.072 mg·kg⁻¹),每天 2 次,连续灌胃 4 d,于第 5 天采血前禁食 12 h,1 次服用全天剂量,给药 1 h 后下腔静脉取血。2500 r·min⁻¹ 离心 20 min,制备含药血清和空白对照血清。56 ℃,30 min 灭活后,在超净工作台内用 0.22 μ m 滤头过滤除菌,分装后置 -70 ℃冰箱中保存备用。

1.5 腹腔液细胞的分离、培养及分组 参照文献^[5]方法进行腹腔液细胞的分离及培养。选取因不孕症行腹腔镜检查的患者,经腹腔镜确诊为轻型子宫内膜异位症,在腹腔镜直视下吸取患者子宫直肠陷窝及膀胱侧窝的腹腔液,注入离心管中,1500 r·min⁻¹ 离心 10 min,弃上清,显微镜下计数,以含 20 %胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释为 1×10^6 /mL,加入 24 孔板中,每孔 1 mL。置于 37 ℃,5 % CO₂ 的细胞培养箱中孵育 1 h,使巨噬细胞贴壁,用 Hank's 液冲洗 3 次,除去未黏附的细胞。每孔加入含 10 μ g·mL⁻¹

细菌脂多糖(LPS)及 10 %胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 1 mL, 置 5 % CO₂、37 °C 培养箱中培养 24 h。将培养细胞分为 5 组, 每组 3 孔, 共 15 孔。弃去上清, 分别加入含 100 mL·L⁻¹ 不同浓度含药血清的 RPMI1640 培养基稀释液 1 mL, 作用 6 h 后以 1500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 加入 Trizol 0.5 mL, 冻存于 -70 °C 冰箱中待检测。

1.6 荧光定量聚合酶链反应测定各细胞因子 mRNA 含量 提取总 RNA: 将标本常温放置解冻, 然后加入氯仿 0.1 mL, 混匀后室温放置 15 min, 4 °C 13000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清置另一个离心管中, 立刻加入异丙醇 0.25 mL, 混匀后室温放置 10 min, 于 4 °C 13000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 再加入 75 % 乙醇 1 mL, 4 °C 13000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃去上清, 用滤纸小心吸干管底及管壁的剩余液体, 用 DEPC 处理水 30 μL 溶解管底沉淀, 立刻进行逆转录。逆转录反应体系组成: 10 × buffer, 2 μL; 10 mmol·L⁻¹ dNTP, 1 μL; RNase inhibitor, 20 u; oligodT 引物 0.5 μL; M-MLV 逆转录酶 1 μL, 模板 RNA, 8 μL, 加无 RNA 酶的水至 20 μL。反应条件为: 30 °C、10 min; 42 °C、1 h; 99 °C、5 min; 4 °C、5 min。逆转录完毕后将标本保存于 -20 °C 冰箱中待检测。mRNA 的定量 PCR 检测, 采用 25 μL 体系, 引物浓度为 250 nmol·L⁻¹, 扩增条件为: 95 °C 变性 1 min; 然后 95 °C、15 s; 60 °C、1 min, 40 个循环。以模型对照组 cDNA 为标准品进行 10 倍梯度稀释为 4 个梯度, 第一个 10 倍稀释管赋值为 1 × 10⁷, 依次类推, 分别为 1 × 10⁶, 1 × 10⁵, 1 × 10⁴。PCR 反应完毕后进行分析, 以标准品所获得的标准曲线定量, 以检测基因值与内参基因(GAPDH)值的比值作为观察基因的相对量。定量 PCR 引物由上海英俊公司合成, 引物名称及序列见表 1。

表 1 定量 PCR 引物

Table 1 Quantitative PCR primer

基因名	探针和引物序列	扩增大小
FLT-1	HFLT-1 sense: aagagtcctttatcctggatgctg	108 bp
	HFLT-1 antisense: ccaaggtgtagccatcttattct	
FLT-4	HFLT-4 sense: agtgcacgtataaggtcatcttcg	117 bp
	HFLT-4 antisense: cagagaacaacctccagatctc	
TNF-α	HTNF sense: aacaataggctgttcccatgtagc	109 bp
	HTNF antisense: ggtaaccaaatcagcattgttag	
VEGF	HVEGF sense: tgacagtcactagcttatcttgaacag	104 bp
	HVEGF antisense: ccttatttcaaggaaatgtgtgct	

1.7 统计学处理方法 实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 用单因素方差分析

进行统计学处理。

2 结果

2.1 罗氏内异方对 TNF-α、VEGF mRNA 表达水平的影响 与生理盐水组比较, 罗氏内异方高剂量组 TNF-α mRNA 显著降低($P < 0.01$), 中、低剂量组仅有降低趋势($P > 0.05$); 罗氏内异方高、中剂量组 VEGF mRNA 均显著降低($P < 0.01$), 低剂量组仅有降低趋势($P > 0.05$); 内美通组 TNF-α mRNA 显著降低($P < 0.05$), 内美通组 VEGF mRNA 有所降低, 但无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 罗氏内异方对 TNF-α、VEGF mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Comparison of TNF-α and VEGF mRNA expression in the five groups

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	TNF-α	VEGF
罗氏内异方高剂量组	24	0.0027 ± 0.0010**	1.3105 ± 0.9877**
罗氏内异方中剂量组	12	0.0197 ± 0.0302	0.8821 ± 0.1628**
罗氏内异方低剂量组	6	0.0255 ± 0.0178	2.2456 ± 1.8713
内美通组	7.2 × 10 ⁻⁵	0.0155 ± 0.0030*	2.6531 ± 3.1993
生理盐水组		0.0707 ± 0.0258	4.3185 ± 0.7052

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 罗氏内异方对 FLT-1、FLT-4 mRNA 表达水平的影响 与生理盐水组比较, 罗氏内异方各剂量组和内美通组 FLT-1 mRNA 均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$); 罗氏内异方高、中剂量组 FLT-4 mRNA 均显著降低($P < 0.01$), 罗氏内异方低剂量组则有所升高, 但无统计学意义($P > 0.05$), 内美通组 FLT-4 mRNA 显著降低($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 罗氏内异方对 FLT-1、FLT-4 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Comparison of FLT-1 and FLT-4 mRNA expression in the five groups

组别	剂量 / g·kg ⁻¹	FLT-1	FLT-4
罗氏内异方高剂量组	24	0.0573 ± 0.0457**	0.2575 ± 0.3126**
罗氏内异方中剂量组	12	0.1461 ± 0.2099*	0.3220 ± 0.5378**
罗氏内异方低剂量组	6	0.1527 ± 0.2210*	4.7797 ± 3.5378
内美通组	7.2 × 10 ⁻⁵	0.1001 ± 0.1010**	0.3848 ± 0.3748**
生理盐水组		1.2524 ± 0.4783	3.0524 ± 1.0687

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

TNF-α 是单核 - 巨噬细胞、内皮细胞分泌的一种重要免疫活性物质, 具有潜在的促进血管增生的作用, 并能刺激子宫内膜间质细胞增生。研究证

实, EMs 患者血清及腹腔液中 TNF- α 水平升高^[6]。TNF- α 通过提高人脐静脉内皮细胞 $\alpha 4$ 整合素及其配体血管细胞黏附分子-1 的表达, 从而有利于逆流入腹腔的子宫内膜黏附于腹壁和其他脏器。此外, TNF- α 还能够激活核转录因子, 从而有利于血管的生成^[7-8]。因此, TNF- α 在促进异位内膜在腹腔内生长起着关键性的作用。VEGF 是目前发现的最强烈的血管生成因子, 可诱导内皮细胞增生、毛细血管祥形成, 同时还可增加微血管通透性, 通过诱导间质产生促进体内新血管的生成^[9], 因此在子宫内膜异位症的发生、发展中起着重要作用。VEGF 在子宫内膜异位症患者的腹腔液及异位内膜中的含量均明显高于正常妇女^[10]。目前已发现 VEGF 的受体有 5 种, 其中 FLT-4 主要是表达于淋巴管的内皮细胞表面^[11], FLT-1 在内异症患者的在位与异位内膜中有明显表达, 并在不同月经周期中产生相应的变化^[12], 提示 VEGF 受体与内异症发病机制存在相关性。

罗氏内异方是著名中医妇科专家罗元恺教授的经验方, 由益母草、浙贝母、桃仁、丹参、海藻、牡蛎等药物组成, 具有活血化瘀、行气止痛、软坚散结之功效, 临床应用治疗子宫内膜异位症安全有效^[3-4]。前期的学者研究已发现罗氏内异方能够纠正子宫内异症动物模型的血瘀状态, 保护血管内皮细胞, 改善盆腔微循环^[13], 也有学者研究发现该方能够促进异位内膜细胞的凋亡^[14], 从而起到治疗子宫内膜异位症的作用。本研究从影响腹腔内环境的角度进一步探讨其疗效机理, 结果表明, 罗氏内异方含药血清可显著降低腹腔液细胞分泌的 TNF- α 、VEGF、FLT-1、FLT-4 水平, 说明罗氏内异方治疗轻型子宫内膜异位症不孕症的疗效机理可能是通过影响腹腔内环境来实现的。

参考文献:

- [1] 徐丛剑, 程明军, 黄宇婷, 等. 子宫内膜异位症病因学研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2009, 25(9): 712-714.
- [2] 高文, 郭新华, 王凌云, 等. 子宫内膜异位症腹腔液中细胞活性物质的表达及其相关性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2009, 25(9): 705-707.
- [3] 王俊玲, 罗元恺, 欧阳惠卿, 等. 罗氏内异方治疗子宫内膜异位症的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(4): 238.
- [4] 王俊玲, 罗元恺. 罗氏内异方治疗子宫内膜异位症 - 附 40 例病例报告[J]. 成都中医药大学学报, 1996, 19(2): 18-21.
- [5] 刘义, 罗丽兰, 赵海波, 等. 达那唑体外对子宫内膜异位症患者腹腔巨噬细胞释放细胞因子的影响及其与胞浆游离钙浓度的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(8): 479-481.
- [6] 陈美一, 马利国, 任莉莉, 等. TNF- α 与 IL-6 的表达与子宫内膜异位症相关性不孕[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(23): 3591-3592.
- [7] 赵雨花, 张菊红, 马云宝. EMS 患者血清、腹腔液 TGF- β 、IGF-I、TNF- α 及 IL-8 水平测定[J]. 放射免疫学杂志, 2006, 19(6): 457-459.
- [8] Twabe T, Harada T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis associated infertility[J]. Gynecol Obstet Invest, 2007, 53(2): 19-25.
- [9] 徐红, 况燕, 张玮, 等. 血管内皮生长因子水平变化与子宫内膜异位症的关系[J]. 广西医科大学学报, 2005, 22(2): 220-222.
- [10] 史淑红, 李佃贵, 马秀菊. 子宫内膜异位症患者腹腔液中血管内皮生长因子及其可溶性受体的测定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 976-978.
- [11] 赵靖雅. PLGF/Flt-1 与子宫腺肌病关系的新进展[J]. 安徽医学, 2012, 33(2): 237-239.
- [12] 尼玛卓玛, 李亚里, 张韶峰, 等. 血管内皮生长因子受体 KDR mRNA 和 flt-1 mRNA 与子宫内膜异位症相关性研究[J]. 实用妇产科杂志, 2005, 21(11): 676-679.
- [13] 黄洁明, 欧阳惠卿, 许丽绵. 子宫内膜异位症血瘀证本质探讨及罗氏内异方对其血管内环境的影响[J]. 河南中医, 2006, 26(10): 23-25.
- [14] 杨洪艳, 欧阳惠卿, 郑高飞. 罗氏内异方对实验性子宫内膜异位症模型超微结构的影响[J]. 中医药研究, 2000, 16(4): 35-37.

(编辑: 梁进权)

二苯乙烯苷对肾虚大鼠 MSCs 增殖及旁分泌的影响

黄 进, 潘华峰, 张 进, 徐志伟(广州中医药大学, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 观察何首乌主要成分二苯乙烯苷(THSG)对去卵巢肾虚大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)增殖及旁分泌细胞因子 mRNA 的影响。**方法** 切除 SD 雌性大鼠双侧卵巢复制肾虚大鼠模型, 密度梯度离心法收集各组大鼠 MSCs 进行体外培养, 观察 THSG 对大鼠第 3 代 MSCs 增殖及旁分泌细胞因子 mRNA 的影响。**结果** 模型组

收稿日期: 2013-02-08

作者简介: 黄进, 女, 主治医师, 博士, 研究方向: 肾藏精的基础与应用研究。Email: kitty_jinjin@163.com。通讯作者: 张进, 副教授, 博士。Email: zhangjinok@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金(81202732); 广州中医药大学科研创新基金(11cx058)。