助孕 3 号方防治大鼠自然流产的机理研究*

罗颂平 梁国珍 张玉珍 许丽绵 邓高丕 欧阳惠卿
宁艳[△] 张铭[△] 韩慧[△]

摘要 目的:研究助孕 3 号方防治肾虚、脾虚型大鼠自然流产的机理。方法(1)以羟基脲与米非司酮(RU486)建立肾虚加黄体抑制模型,利血平与 RU486 建立脾虚加黄体抑制模型。(2)观察助孕 3 号方对病证结合模型大鼠孕酮(P)分泌、蜕膜孕激素受体(PR)和雌激素受体(ER)的影响,酶联免疫法检测血清卵泡刺激素、雌二醇和 P,免疫组化法检测蜕膜 PR,光镜观察子宫、卵巢的形态学改变。(3)助孕 3 号方对大鼠离体与在体子宫兴奋性的影响,采用水提液与含药血清进行离体子宫兴奋试验。结果(1)助孕 3 号方能提高肾虚加黄体抑制与脾虚加黄体抑制模型大鼠蜕膜 PR 阳性率,与单纯黄体抑制模型组比较差异均有显著性($P < 0.05$)。(2)助孕 3 号方水提液和含药血清均能降低离体子宫肌条收缩的强度($P < 0.05$),在体子宫兴奋试验提示助孕 3 号组子宫收缩强度显著下降($P < 0.05$)。结论:补肾和补脾健脾中药保胎的主要作用环节是提高靶细胞 PR 以及对子宫平滑肌的舒缓作用。

关键词 助孕 3 号方 流产模型 肾虚 脾虚 黄体抑制

Study on Mechanism of Zhuyun No. 3 in Preventing and Treating Spontaneous Abortion LUO Song-ping, LIANG Guo-zhen, ZHANG Yu-zhen, et al *The First Clinical Medical College of Guangzhou TCM University, Guangzhou (510405)*

Objective: To study the mechanism of Zhuyun No. 3 (ZY3) in preventing and treating spontaneous abortion. **Methods:** Two types (Shen-deficiency type and Pi-deficiency type) of corpus luteum inhibitory abortion rat model were established by hydroxyurea and mifepristone respectively for observing the effect of ZY3 on secretion of progesterone (P) and estradiol (E_2), and their receptor (PR and ER) in deciduas by ELISA and immunohistochemical analysis. And the morphological changes of uterus and ovary were observed with light microscopy. Moreover, the water extract of ZY3 was used to observe its effect on uterine excitability in vivo and drug serum of ZY3 was used to test that in vitro. **Results:** ZY3 could significantly increase the positive rate of PR in deciduas of model of both types ($P < 0.01$), its water extract and drug serum could lower the potency of contractility of uterus in vivo and isolated uterine smooth muscle in vitro respectively (both $P < 0.01$). **Conclusion:** The major mechanism of TCM drugs for reinforcing Shen and strengthening Pi in protecting pregnancy is to elevate the target cell PR and to relax the uterine smooth muscle.

Key words Zhuyun No. 3, model of abortion, Shen-deficiency, Pi-deficiency, corpus luteum inhibition

助孕 3 号方是在罗元恺教授指导下拟定的安胎方药。该方以补肾与健脾并重,固本安胎。经临床观察,用于治疗肾虚或脾肾两虚型先兆流产、反复自然流产疗效较佳^[1,2]。为了研究该方的作用机理,我们设计了肾虚加黄体抑制与脾虚加黄体抑制的病证结合模型,研究其对大鼠妊娠期黄体分泌及蜕膜孕激素受体(PR)表达的调节作用,并观察了该方对 SD 大鼠离体

与在体子宫兴奋性的影响。

材料与方

1 实验动物 健康 SD 大鼠,雌性,8 周龄,未产,体重 200~250g,广东省实验动物中心提供。

2 病证结合模型的建立 肾虚模型:采用 DNA 合成抑制剂羟基脲建立肾虚模型,即于妊娠第 1~10 天,每天肌肉注射羟基脲 450mg/kg。脾虚模型:于妊娠第 1~10 天,每天肌肉注射利血平 0.15mg/kg。黄体抑制模型:采用孕酮受体阻断剂米非司酮(RU486)建立黄体抑制模型,即妊娠第 10 天灌胃给米非司酮 3.75mg/kg,给药后 48h 处死动物。

* 本项目由国家中医药管理局资助(No.97Z078)

广州中医药大学第一临床医学院妇科教研室(广州 510405)

△ 广州中医药大学研究生

通讯作者:罗颂平;Tel:020-36585434,36591337;E-mail:song-

3 药物制备 助孕 3 号方:由黄芪、党参、白术、菟丝子、续断等 8 味中药组成。寿胎丸由菟丝子 15g 桑寄生 15g 续断 15g 阿胶 10g 组成(作为补肾对照剂)。四君子汤由党参 15g 白术 15g 茯苓 15g 炙甘草 6g 组成(作为健脾对照剂)。上述制剂均在本院实验室制备,水提 2 次,浓缩成含生药 3.5g/ml 4℃ 保存。实验用量为成人剂量的 30 倍。黄体酮 20mg/支,广州明兴制药厂出品。

4 分组与给药 各组给药时间为妊娠第 1~10 天,除黄体酮隔天给药 1 次外,其他均每天给药 1 次。具体分组、给药情况见表 1。

表 1 分组与给药情况

组别	n	药物与剂量	给药途径
A(肾虚+黄体抑制+助孕 3 号方)	16	助孕 3 号方 4ml/kg	灌胃
H(肾虚+黄体抑制+寿胎丸)	13	寿胎丸 4ml/kg	灌胃
C(肾虚+黄体抑制+黄体酮)	13	黄体酮 4mg/kg	肌肉注射
I(肾虚+黄体抑制+生理盐水)	13	生理盐水 4ml/kg	灌胃
E(脾虚+黄体抑制+助孕 3 号方)	16	助孕 3 号方 4ml/kg	灌胃
F(脾虚+黄体抑制+四君子汤)	13	四君子汤 4ml/kg	灌胃
G(脾虚+黄体抑制+黄体酮)	13	黄体酮 4mg/kg	肌肉注射
J(脾虚+黄体抑制+生理盐水)	13	生理盐水 4ml/kg	灌胃
I(肾虚+生理盐水)	13	生理盐水 4ml/kg	灌胃
J(脾虚+生理盐水)	13	生理盐水 4ml/kg	灌胃
K(黄体抑制+生理盐水)	13	生理盐水 4ml/kg	灌胃
L(正常妊娠+生理盐水)	10	生理盐水 4ml/kg	灌胃

5 指标监测

5.1 形态学观察 妊娠第 12 天处死动物后观察记录卵巢、脾、肾、肾上腺重量;子宫重量与形态,计算脏器指数(脏器重量÷体重×100%)。光镜下观察卵巢次级卵泡、成熟卵泡与黄体数目,子宫蜕膜与胚胎的组织学改变。

5.2 流产判断标准 (1)完全流产:有阴道流血,子宫呈竹节状,胚胎已消失,体重下降>10g/48h (2)胚胎坏死:宫腔瘀血,胚胎呈紫黑色,直径缩小。

5.3 激素受体检测 采用 S-P 免疫组化方法检测子宫蜕膜雌激素受体(ER)与 PR。

5.4 血清激素测定 孕前、妊娠第 10、11、12 天,于米非司酮用药前后采血,-20℃ 保存血清。采用酶联免疫法测定卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E₂)及孕激素(P)。

5.5 其他 采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性,碘比色法测血清淀粉酶。

6 离体子宫兴奋试验 助孕 3 号方水提浓缩液:含生药 3g/ml。助孕 3 号方含药血清:以助孕 3 号方煎剂(水提 2 次,未经浓缩)按每天 20ml/kg,给大鼠灌胃,连续 5 天。末次灌药后 1~2h 采外周血,分离血清-20℃ 保存。雌性未孕大鼠实验前 72h 皮下注射己烯雌酚 0.2mg/100g。常规制备子宫肌条,置营养液

中,通过肌张力换能器与 BL-310 生物机能实验系统连接,以催产素诱发子宫平滑肌收缩。助孕 3 号方水提液与含药血清均设高、中、低剂量组。每个浓度记录 10min 子宫收缩曲线。

7 在体子宫兴奋试验 试验前给大鼠灌服助孕 3 号方水提液,每天 8ml/kg,连续 5 天。末次给药后 1h 麻醉下暴露并固定子宫,以丝线与肌张力换能器相连,记录子宫收缩曲线。对照组在实验前同法灌服生理盐水。

8 统计学方法 采用 NDST 统计软件。计量资料用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验。

结 果

1 肾虚与脾虚造模后的一般状态 肾虚造模后大鼠表现为毛色干枯、蜷缩、反应迟钝、食少、体重减轻。脾虚造模后大鼠表现为食少、粪便稀,体重减轻、蜷缩,说明两型造模成功。

2 各组大鼠流产率与蜕膜 ER、PR 阳性率比较见表 2。D 组 ER 阳性率与 L 组比较显著下降(P<0.05),其余各组的 ER 阳性率比较差异无显著性。D 组(肾虚+黄体抑制模型)和 H 组(脾虚+黄体抑制模型)的流产率均达到 86.30% 以上,与 K 组(黄体抑制模型)的 81.81% 接近。施加助孕 3 号方的 A、E 组和施加寿胎丸的 B 组流产率为 68.75% 和 66.67%,由于样本数较小,与 D、H、K 组比较差异无显著性;而 A、B、E、F 组子宫蜕膜 PR 的阳性率则显著高于 K 组(P<0.05);以肾虚与脾虚模型比较,则肾虚模型组(I 组)和肾虚+黄体抑制模型组(D 组)蜕膜 PR 阳性,与黄体抑制模型组(K 组)一致;而脾虚模型组(J 组)和脾虚+黄体抑制模型组(H 组)蜕膜 PR 阳性率则显著高于 K 组。提示肾虚模型有抑制黄体功能的表现,而助孕 3 号方和寿胎丸可改善肾虚和米非司酮所造成的

表 2 各组大鼠流产率、蜕膜 ER 与 PR 阳性情况比较 [只(%)]

组别	n	流产率	ER 阳性	PR 阳性
A	16	11.0(68.75)*	8.0(50.00)	6.0(37.50) [△]
B	12	8.0(66.67)*	9.0(75.00)	4.0(33.33) [△]
C	12	9.0(75.00)*	7.0(58.33)	3.0(25.00)
D	11	9.5(86.36)*	4.0(36.36)*	0
E	16	11.0(68.75)*	14.0(87.50)	8.0(50.00) [△]
F	12	11.0(91.67)*▲	7.5(62.50)	4.5(37.50) [△]
G	13	6.5(50.00)*	11.0(84.61)	10.0(76.92) [△]
H	12	10.0(86.30)*	9.0(75.00)	4.0(33.33) [△]
I	12	7.0(58.33)*	7.5(62.50)	0
J	13	7.0(53.85)*◆	11.0(84.62)	10.0(76.92) [△]
K	11	9.0(81.81)*	8.0(72.72)	0
L	9	0	7.5(83.33)	4.5(50.00)

注:与 L 组比较,*P<0.05;与 K 组比较,[△]P<0.05;与 A、C 组比较,[▲]P<0.05;与 H、K 组比较,[◆]P<0.05

黄体抑制状态。其主要作用是提高靶器官的激素受体水平。

3 各组大鼠激素的变化情况 P:妊娠第 10 天与孕前比较,各组 P 均上升。使用米非司酮各组在 24h 后(第 11 天)P 显著下降($P < 0.01$),第 12 天则 A、B 组呈回升趋势,其余各组继续下降。E₂:K、L 组妊娠后 E₂ 水平上升,而肾虚、脾虚造模各组第 10 天的 E₂ 水平下降,以肾虚模型下降最显著。A、B 组在第 12 天呈回升趋势。FSH:各组在妊娠前后 FSH 水平差异无显著性。

4 SOD 与血清淀粉酶测定结果 肾虚造模后 SOD 水平下降($P < 0.01$),符合肾虚的病理特征。脾虚造模后血清淀粉酶下降($P < 0.05$)。

5 生殖器官组织学变化 光学显微镜观察显示, A、C、E 组卵巢成熟黄体数比 K 组明显增加($P < 0.05$)。A、C 组次级与成熟卵泡数也显著增加($P < 0.05$)。

6 脏器指数 造模后各组大鼠子宫系数均显著低于 L 组($P < 0.05$);卵巢系数组间比较差异无显著性;脾系数显著降低($P < 0.05$);肾与肾上腺系数均无降低(具体数据略)。

7 助孕 3 号方对大鼠离体子宫兴奋性的影响 见表 3。助孕 3 号方水提液各剂量组离体子宫肌条子宫收缩频率均显著降低(与生理盐水组比较, $P < 0.01$)。低、中剂量组比较差异亦有显著性,呈量效相关性。高剂量组子宫收缩的强度也显著降低($P < 0.05$)。

表 3 助孕 3 号方水提液对大鼠离体子宫收缩反应的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	强度差 (g)	张力差 (g)	频率差 (次/10min)	曲线下面积差 (g/ms)
中药低	8	0.14 ± 0.30	0.09 ± 0.19	1.38 ± 0.56 **	33401 ± 2093 *
中	8	0.44 ± 0.40 △	0.20 ± 0.19	2.72 ± 0.71 ** △	5573 ± 2551 *
高	8	0.98 ± 0.53 * ▲	0.18 ± 0.12	4.38 ± 0.83 ** ▲	7966 ± 3309 * △
生理盐水	8	0.24 ± 0.81	0.31 ± 0.26	0	2773 ± 1757

注:与生理盐水组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与本组低浓度比较, △ $P < 0.05$;与本组中浓度比较, ▲ $P < 0.05$

8 助孕 3 号方含药血清对离体子宫收缩的影响 见表 4。助孕 3 号方中、高剂量含药血清组离体子宫收缩强度显著下降,与空白血清组比较,差异有显著性($P < 0.05$)。但对张力和频率无显著影响。

9 助孕 3 号方对大鼠在体子宫兴奋性的影响 见表 5。灌服助孕 3 号方 5 天后,在体大鼠子宫收缩强度下降,张力增高(与对照组比较, $P < 0.05$)。万方数据

表 4 助孕 3 号方含药血清对离体子宫收缩功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	强度差 (g)	张力差 (g)	频率差 (次/10min)	曲线下面积差 (g/ms)
含药血清低	10	-0.05 ± 0.44	-0.21 ± 0.62	0	-260 ± 1279 **
中	10	1.05 ± 1.08 *	-0.30 ± 0.75	0	2336 ± 1775 ** △
高	10	1.70 ± 1.15 * △△	0.48 ± 0.81	0.30 ± 0.67	2971 ± 2423 ** ▲
空白血清	10	0.03 ± 0.94	-0.58 ± 0.66	0.00 ± 0.82	-2527 ± 2575

注:与空白血清组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与本组低浓度比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.05$;与本组中浓度比较, ▲ $P < 0.05$

表 5 助孕 3 号方对在体子宫收缩功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	强度(g)	张力(g)	频率(次/10min)
中药	10	2.90 ± 0.23 *	2.16 ± 0.30 *	22.50 ± 2.87
对照	10	3.35 ± 0.51	1.80 ± 0.42	25.90 ± 4.93

注:与对照组比较, * $P < 0.05$

讨 论

1 病证结合流产模型适用于自然流产的研究 临床上自然流产的患者以肾虚、脾虚或脾肾两虚证多见,其西医病因则以黄体功能不全或效应不良为常见。补肾健脾治法具有防治流产的确切疗效^[2],但其作用机理尚未完全阐明。在以往的报道中,主要采用缩宫素或针刺造成子宫收缩的流产模型^[3],或假孕模型^[4],未能模拟上述证候与病理类型。本研究采用 PR 拮抗剂 RU486 建立黄体抑制模型,该药是目前用于终止妊娠的首选药物,效果确切。并建立羟基脲肾虚模型与利血平脾虚模型,均为公认的造模方法。而病证结合的流产模型,则为本研究之首创。采用该模型研究肾虚、脾虚证与黄体不健状态下激素与受体的变化,因临床研究中难以收集保胎患者妊娠子宫蜕膜进行受体检测,故本研究有着重要的临床指导意义。

2 黄体抑制与肾虚、脾虚的关系 本研究结果表明,妊娠期肾虚模型(I 组)流产率为 58.33%,与肾虚加黄体抑制模型(D 组)的 86.36% 比较,差异无显著性,而脾虚模型(J 组)流产率为 53.85%,显著低于脾虚加黄体抑制模型(H 组)的 86.30% ($P < 0.05$)。结合 PR 的变化,提示妊娠期肾虚造模与黄体抑制有相关性,而脾虚造模与黄体抑制则未见明显的相关性。

3 补肾与健脾法在防治自然流产方面的作用与机理 补肾健脾的助孕 3 号方对肾虚加黄体抑制和脾虚加黄体抑制模型均具有增进黄体功能和改善肾虚、脾虚证候的作用。对单纯黄体抑制模型也有提高孕激素水平和增加蜕膜 PR 阳性率之效^[5]。其效应可能在于激素受体的调节。助孕 3 号方对肾虚加黄体抑制模型具有与补肾安胎的寿胎丸相似的作用,而健脾补气的四君子汤对脾虚加黄体抑制模型仅有改善证候的作

用,未见促进黄体功能之效。本研究提示,对于黄体抑制流产模型,补肾和肾脾并补均优于单纯健脾,补肾法在增进黄体功能方面起主要作用。

离体子宫兴奋试验表明,助孕 3 号方水提液和含药血清均能降低离体子宫肌条收缩的强度,体外试验中药组的子宫收缩频率也显著降低。对子宫的舒缓作用呈量效相关性。在体子宫兴奋试验显示助孕 3 号方组子宫收缩强度减弱,提示该药具有直接抑制子宫收缩的作用。

综上所述,本项目建立的病证结合模型成功模拟了妊娠肾虚、脾虚和黄体抑制的状态,通过对妊娠期子宫蜕膜 PR 的实验研究发现补肾和补肾健脾中药保胎的主要作用环节是提高靶细胞 PR 及其基因表达。通过离体与在体子宫兴奋试验,还证实了助孕 3 号方对

子宫平滑肌的舒缓作用,为中医药防治自然流产提供了实验依据。

参 考 文 献

- 1 罗颂平,张玉珍,梁国珍,等.自然流产的免疫学因素与中医药治疗.中国医药学报 1996;11(4):219—221.
- 2 赵颖,张玉珍.助孕 3 号丸治疗脾肾虚证胎漏、胎动不安、滑胎疗效观察.新中医 1999;31(12):20—21.
- 3 王钦茂,姚道云,杨耀芳,等.孕康口服液保胎作用的实验研究.中国中西医结合杂志 1994;14(7):418—420.
- 4 朱金凤,余运初,周楚华.寿胎丸加味治疗先兆流产的临床观察及实验研究.中西医结合杂志 1987;7(7):407—409.
- 5 李小球,罗颂平.补肾健脾中药对妊娠大鼠孕激素及其受体的影响.广州中医药大学学报 1998;15(3):195—197.

(收稿 2002-11-13 修回 2003-04-05)

中西医结合治愈输卵管间质部妊娠误诊 1 例

连方¹ 张宁² 张建伟² 穆琳² 孙振高² 李海仙² 张鹏²

病例简介 患者王某,女,26岁,住院号:103895,以停经时间>3个月,阴道不规则流血2个月,于2002年12月6日上午11:00急诊入院。患者既往月经规律(3~5/28~30天),末次月经2002年8月15日,量、色、质与以往相同。9月15日出现阴道不规则流血,量少,伴下腹隐痛,持续至10月中旬,伴恶心。10月21日于当地医院测尿绒毛膜促性腺激素(HCG,+),诊断为早孕,行药物流产。用药后阴道流血增多,未见胚胎组织排出。10月29日查血β-HCG为>10 000mU/ml,B超提示怀疑滋养细胞疾病,当地医院诊断为绒癌。给予5-氟尿嘧啶1500mg、氨甲喋呤20mg,静脉滴注,每日1次,连续8天。11月7日、23日分别复查血β-HCG>10 000mU/ml和591.1mU/ml。12月6日来我院就诊,查血β-HCG为148mU/ml(正常值<4.5mU/ml)。妇科检查:宫体略大,左宫底前方触及一约3cm×3cm突起,质软,压痛。B超示:子宫增大,内膜增厚1.2cm,宫腔内未探及妊娠囊样反射,横断面观察,子宫横径增大,左侧宫角膨隆,其内探及4.8cm×4.1cm妊娠囊样反射,囊内回声不均匀,有丰富血流信号,囊壁菲薄,直肠子宫陷凹探及4.9cm×1.1cm液性暗区。核磁共振提示:子宫左侧间质部妊娠(照片略)。临床诊断:异位妊娠(左侧输卵管间质部)。

治疗经过 入院后急行剖腹探查术,术中见:子宫略大,左侧宫角部膨隆约5cm×5cm大小,呈紫蓝色,囊壁行将破裂,立即阻断左侧子宫动脉,遂行子宫楔形切除术,保留生育功能。术后病理示:送检组织内见大量绒毛细胞,并有巢状淋巴细胞浸润。术后静脉滴注抗生素以预防感染及营养支持治疗,术后第2天给予术后通腹汤(大黄6g,厚朴12g,枳实9g,芒硝3g,党参15g,黄芪15g等)口服以促进肠蠕动,术后24h肛门排

气,即予饮食调理,加强营养。术后第3天给予归脾汤加减以益气养血、固本扶正,患者恢复良好,以治愈出院。

讨论 该患者10月21日就于当地医院即因未做B超检查,误诊为宫内妊娠而服用物流产药,从而延误了治疗的时机,于10月29日又以因B超误诊为绒癌,再一次延误了治疗的时机。绒癌是滋养细胞高度增生所致,故其HCG升高,妊娠性绒癌病变始发于子宫,可继发于正常或不正常的妊娠,虽有所谓的直接绒癌之说,前次妊娠至发病之间时间间隔约1~2年。其在临床常见症状为葡萄胎、流产或足月产后,阴道有持续不规则流血,量多少不定,检查子宫增大,变软,形态不规则,可触及双侧卵巢黄素化囊肿,B超下亦有其影像学特征。我们综合患者临床表现,结合妇科检查子宫左侧角部明显突起,考虑输卵管间质部妊娠的可能性大,立即行阴道彩色超声及核磁共振检查,从而纠正误诊,为治疗成功奠定了基础。四诊合参并结合现代诊疗方法是我们能够正确诊断的关键。在作出初步诊断的基础上,考虑输卵管妊娠囊壁菲薄,加之患者的病情延误时间过长,危险甚大,一旦囊壁破裂,会导致急性大出血,甚至休克而死亡。故我们采取果断的剖腹探查术,术中囊壁行将破裂,立即阻断左侧子宫动脉和卵巢子宫血管,行左侧宫角楔形切除术,保留了双侧卵巢及双侧输卵管,从而成功地为患者保存了生育功能,同时避免了腹腔内大出血为患者带来的不良损伤。异位妊娠患者盆腔粘连的发生率较高,所以术后第2天我们给予术后通腹汤以促进肠蠕动,预防盆腔粘连的发生,并可使患者早日进食,有利于身体康复。因患者手术前曾行化疗8天,免疫力低下,自身修复能力低,故于术后第3天给予中药归脾汤加减以益气养血、扶正固本,提高患者的免疫功能。

(收稿 2003-02-24 修回 2003-03-30)