

孕康口服液对化学损伤联合米非司酮致气血两虚型流产模型大鼠的保胎作用研究

陈少奇^{1,3}, 颜美秋¹, 苏洁¹, 俞静静¹, 蒋叔霏⁴, 陈素红^{2*}, 吕圭源^{1*} [1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江工业大学, 杭州 310014; 3.杭州市第一人民医院城北院区(杭州市老年病医院), 杭州 310005; 4.回音必集团浙江齐制药有限公司, 浙江 绍兴 311899]

摘要: 目的 探究孕康口服液对限饲联合乙酰苯肼、环磷酰胺及米非司酮致气血两虚型流产模型大鼠的保胎作用。方法 将妊娠大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、黄体酮组及孕康口服液低、中、高剂量组(4, 6, 9 mL·kg⁻¹), 每组 12 只。前 9 d, 一边造模一边给药。第 10, 11 天, 除正常对照组外, 其余各组均灌胃米非司酮。给药期间检测自主活动、肛温、体质量, 血液分析仪检测红细胞数(red blood cells, RBC)、血红蛋白数(hemoglobin, HGB)、白细胞数(white blood cells, WBC)。第 12 天处死大鼠后解剖计算胚胎丢失率、子宫、卵巢、胸腺和肝脏系数, 酶联免疫法检测血清中激素 β -人绒毛膜促性腺激素(β -human chorionic gonadotropin, β -HCG)、孕酮(progesterone, P)、雌二醇(estradiol, E₂)水平及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)、 γ 干扰素(γ levels of interferon, IFN- γ)、白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4)、白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10)的水平, 免疫组化法检测子宫组织中孕激素受体(progesterone receptor, PR)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达。结果 与模型对照组比较, 不同剂量孕康口服液组大鼠体质量、肛温、自主活动次数显著增加, 血液中 RBC、HGB 和 WBC 数目增多, 子宫、卵巢、胸腺和肝脏系数显著升高, 血清中 P、E₂、IL-4、IL-10 水平显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 胚胎丢失率明显下降, 血清中 TNF- α 、IFN- γ 水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 子宫内膜的病变程度减轻, 子宫组织 PR 和 VEGF 蛋白表达明显上调。结论 孕康口服液对乙酰苯肼+环磷酰胺+限饲联合米非司酮造成气血两虚型流产模型大鼠具有明显的保胎作用。

关键词: 孕康口服液; 先兆流产; 激素; 气血两虚

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2023)08-1096-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221011

引用本文: 陈少奇, 颜美秋, 苏洁, 等. 孕康口服液对化学损伤联合米非司酮致气血两虚型流产模型大鼠的保胎作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(8): 1096-1103.

Study on Tocolysis Effect of Yunkang Oral Liquid on Chemical Injury Combined with Mifepristone Induced Abortion Model Rats with Deficiency of Qi and Blood

CHEN Shaoqi^{1,3}, YAN Meiqiu¹, SU Jie¹, YU Jingjing¹, JIANG Shufei⁴, CHEN Suhong^{2*}, LYU Guiyuan^{1*} [1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 3.North District of Hangzhou First People's Hospital(Hangzhou Geriatric Hospital), Hangzhou 310005, China; 4.Huiyinbi Group Zhejiang Qiqi Pharmaceutical Co., Ltd., Shaoxing 311899, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the tocolysis effect of Yunkang oral liquid on the abortion model rats with Qi and blood deficiency induced by feeding restriction combined with acetophenazine, cyclophosphamide and mifepristone. **METHODS** The pregnant rats were randomly divided into normal control group, model control group, progesterone group and Yunkang oral liquid low, middle and high dose groups(4, 6, 9 mL·kg⁻¹), with 12 rats in each group. In the first 9 d, the drug was administered while building the model. On the 10th and 11th day, except for the normal control group, all the other groups were given mifepristone by gavage. The following indicators were tested during the administration period: autonomous activities, rectal temperature, weight, and the number of red blood cells(RBC), hemoglobin(HGB), white blood cells(WBC) were detected by the blood analyzer. Rats were sacrificed on the 12th day, and the embryo loss rate, uterus, ovary, thymus and liver coefficients were calculated by dissection, enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect serum levels of hormones β -human chorionic gonadotropin(β -HCG), progesterone(P), estradiol(E₂) level and tumor necrosis factor(TNF- α), γ levels of interferon(IFN- γ), interleukin 4(IL-4), and interleukin 10(IL-10), the expressions of progesterone receptor(PR) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in uterine tissue were detected by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with the model control group, the body weight, rectal temperature and the number of autonomous activities of the rats in different doses of Yunkang oral liquid group increased significantly, and the number of RBC, HGB and WBC in the blood increased, uterine, ovary, thymus and liver coefficients were significantly increased, the levels of P, E₂, IL-4 and IL-10 in serum were significantly increased($P < 0.05$ or

作者简介: 陈少奇, 男, 硕士, 初级中药师 E-mail: 929649210@qq.com *通信作者: 陈素红, 女, 博士, 研究员, 博导 E-mail: chensuhong@zjut.edu.cn 吕圭源, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: lv.gy@263.net

$P<0.01$), the embryo loss rate was significantly decreased, and the levels of TNF- α and IFN- γ in serum were decreased($P<0.05$ or $P<0.01$), the degree of endometrial lesions was reduced, and the expressions of PR and VEGF proteins in uterine tissue were significantly up-regulated. **CONCLUSION** It shows that Yunkang oral liquid has obvious effect on tocolysis in rats with Qi and blood deficiency caused by acetophenhydrazine+cyclophosphamide+restricted feeding combined with mifepristone.

KEYWORDS: Yunkang oral liquid; threatened abortion; hormones; Qi and blood deficiency

随着生活水平提高及观念转变, 优生二胎, 安胎保胎日益受重视, 但如今女性的社会工作压力大, 先兆流产发病率呈逐渐上升趋势, 严重影响女性的身心健康和生活质量^[1]。流行病学调查显示, 15%~20%妊娠期妇女出现先兆流产症状, 且先兆流产的发生率呈逐年上升趋势, 约 10%~15% 孕妇先兆流产最终发展为自然流产, 严重影响孕妇及胎儿的生命健康。中医认为肾脾不足, 气血冲任失调, 胎失所养, 轻则胞漏下血、动而不安, 重则胎萎不长而堕。肾系胞胎, 脾能载胎, 血能养胎, 治疗上以补养肾脾为本, 益气养血为辅。孕康口服液是根据安徽省已故名老中医杨新吾先生的经验方“无忧保胎方”研制而成。该口服液由山药、续断、黄芪、狗脊(去毛)、菟丝子、桑寄生、杜仲(炒)等 23 味药组成, 可健脾固肾、养血安胎, 临床用于肾虚型和气血虚弱型先兆流产和习惯性流产^[2]。临床研究显示, 孕康口服液对早期先兆流产的治疗具有很好的疗效^[3], 本课题前期研究也表明其对肾虚型、脾虚型先兆流产都具有良好的保胎效果^[4-5]。而妇女孕、产、乳皆以血为基础, 血能载气, 妇女生理活动以血为用, 阴血耗损常伴随气的损伤, 故女性机体常处于气血虚弱状态, 容易导致流产的发生^[6]。目前对孕康口服液治疗主症之一的气血两虚型先兆流产的研究甚少, 因此, 本研究根据其功效, 利用化学损伤联合限饲致气血两虚流产大鼠模型, 探究孕康口服液对气血两虚流产模型大鼠的保胎药效, 并初步阐释孕康口服液养血安胎机制的科学内涵。

1 材料与方法

1.1 药物

回音必®孕康口服液(回音必集团齐齐制药有限公司, 批号: 18051211); 黄体酮胶囊(浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 190723); 米非司酮片(浙江仙琚制药股份有限公司, 批号: 181003)。药液的配置: 用孕康口服液原液当作高剂量, 将原液加水稀释至 2/3 和 4/9 可得中、低剂量; 黄体酮胶囊用 0.3%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液配制成浓度为 3 mg·mL⁻¹ 的混悬液; 米非司酮片用蒸馏水配制成浓度为 0.44 mg·mL⁻¹ 的米非司酮溶液, 4 °C 冰箱保存备用。

1.2 动物

SD 大鼠, ♀, 体质量 180~200 g, 36 只; SD 大鼠, ♂, 体质量 180~200 g, 72 只; 合格证编号: 1908280094, 实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2019-0002, 实验动物使用许可证号: SYXK(浙)2018-0012, 由浙江省实验动物中心提供。

1.3 试剂

血清雌二醇(estradiol, E₂, 批号: 20032175R); 孕酮(progesterone, P, 批号: 20032151R); β -绒毛膜促性腺激素(β -human chorionic gonadotropin, β -HCG, 批号: 20032182R)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis facto, TNF- α , 批号: 20032180R)、 γ 干扰素(γ levels of interferon, IFN- γ , 批号: 20032198R)、白细胞介素 4(interleukin 4, IL-4, 批号: 20032191R)、白细胞介素 10(interleukin 10, IL-10, 批号: 20032195R)均购自江苏科特生物技术有限公司; 无毒环保苏木素染液(南京建成生物工程研究所, 批号: 20191127); 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF, 杭州市华安生物技术有限公司, 批号: ET1604-28); 孕激素受体(progesterone receptor, PR, 上海爱必信生物科技有限公司, 批号: abs121673)。

1.4 仪器

DS-671 电子计重称(上海寺冈电子有限公司); HC-TP11-50 架盘药物天平、FA2204B 电子天平均购自上海精科天美科学仪器有限公司; LP123 电子天平(江苏省常熟市衡器厂); MC-347 电子体温计(欧姆龙有限公司); Motic BA410 生物显微镜(英国 Moor 公司); Powerwave340 酶标仪(美国 Bio-TEK 公司); CXJ-IIB 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂); Tissue-TekVIP5Jr 自动脱水机(日本樱花检验仪器株式会社); LEICARM2245 型半自动切片机(德国 Leica 公司); MEIKOEC360 包埋机(德国 MEIKO 公司); XT-2000i 全自动血液分析仪(希森美康医用电子有限公司)。

1.5 方法

1.5.1 动物分组及给药 将动情期 SD 雄鼠与雌鼠按 1 : 1 单笼交配, 每日晨检雌鼠阴道, 以形成阴道栓为妊娠第 1 天, 随机将妊娠雌鼠分为正常对照组, 模型对照组, 黄体酮组(3 mg·mL⁻¹), 孕康口服

液低、中、高剂量组(4, 6, 9 mL·kg⁻¹)。除正常对照组外,其余每组于妊娠第1天开始边造模边给药,隔天限食(从大鼠妊娠第1天9点开始给予足量饲料,第2天9点取走饲料,同理操作至进行解剖操作);于第2天皮下注射 2.5 mL·kg⁻¹ 乙酰苯肼(15 mg·kg⁻¹),第5天再次注射 2.5 mL·kg⁻¹ 乙酰苯肼(30 mg·kg⁻¹),第6~8天连续3d腹腔注射 5 mL·kg⁻¹ 环磷酰胺(30 mg·kg⁻¹);同时每天下午各组按 9 mL·kg⁻¹ 体质量灌胃给予不同药物,正常对照组和模型对照组给予同体积蒸馏水作为对照,每日1次,连续9d。第10,11天,除正常组外,其余各组灌胃米非司酮(0.44 mg·mL⁻¹)。第12天处死大鼠后解剖。

1.5.2 体征指标观察 每天观察孕鼠皮毛(枯乱、不泽、稀疏)、行动(弓背蜷缩、倦怠懒动)等一般形态学指标及阴道口出血情况。测定大鼠妊娠后第1,5,9,10,11,12天体质量及第9天时自主活动和肛温。

1.5.3 血液学指标检测 所有孕鼠于妊娠第1天和第9天眼眶取血1~2 mL于肝素抗凝管中利用血常规仪测定RBC、HGB、WBC。

1.5.4 胚胎丢失率的确定 于妊娠第12天上午9点麻醉,解剖后取出双侧子宫置于冰上,打开子宫,观察情况,并记录胚胎存活数和胚胎丢失数,计算胚胎丢失率。胚胎丢失率计算公式:胚胎丢失率=胚胎丢失数(流产胚胎数)/总胚胎数×100%。

1.5.5 脏器系数的测定 孕鼠在处死前一天晚上9点禁食不禁水12h,第12天上午9点处死后解剖,分别取孕鼠子宫、卵巢、脾脏、胸腺,用生理盐水洗净,滤纸吸干,电子天平称重,计算脏器系数。脏器系数计算公式:脏器系数(mg·g⁻¹)=脏器质量(g)/对应孕鼠体质量(g)×1 000。

1.5.6 HE染色观察子宫病变情况 处死孕鼠后,剖开腹腔,剪取子宫,清除脂肪后剪取约0.5 cm的子宫组织,置于4%中性福尔马林中,固定、脱水、包埋、切片,制得4 μm石蜡切片,苏木精—伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)观察子宫病理学改变。

1.5.7 血清相关激素和因子的检测 孕鼠在处死前1天晚上9点禁食不禁水12h,第12天上午9点,水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,37℃水浴1h后,1 500×g离心10 min,取上清制备血清,存放于-80℃冰箱待测。采用酶联免疫分析法(ELISA)测定血清中β-HCG、E₂、P、TNF-α、IFN-γ、IL-10、IL-4的含量。

1.5.8 免疫组化法观察子宫组织中PR、VEGF蛋白的表达 制得4 μm石蜡切片,通过消除内源性过氧化氢酶的活性、抗原修复、封闭、4℃孵育一抗过夜、孵育二抗、二氨基联苯胺法显色(diaminobenzidine, DAB)、苏木素染色、脱水及中性树脂封片干燥后,显微镜下观察子宫组织PR、VEGF的表达情况。

1.5.9 统计学处理 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用SPSS 18.0统计软件进行分析,组间差异做两样本均数比较的 t 检验,胚胎丢失率选用 χ^2 检验, $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对模型大鼠体质量的影响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠自第9天起体质量显著下降($P<0.01$);与模型对照组相比,孕康口服液低、中、高剂量组大鼠自第11天起体质量明显上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示孕康口服液能增加模型孕鼠的体质量,改善形体消瘦症状。结果见表1。

表1 孕康口服液对模型大鼠不同时间体质量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of Yunkang oral liquid on the body weight of model rats at different times($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	体质量/g					
		第1天	第5天	第9天	第10天	第11天	第12天
正常对照组($n=11$)	—	258.82±18.52	283.27±20.05	296.45±21.88	302.00±23.77	304.64±18.65	306.64±21.61
模型对照组($n=12$)	—	272.33±19.34	292.00±20.50	268.42±20.78 ¹⁾	254.33±22.86 ¹⁾	247.17±21.18 ¹⁾	236.50±21.79 ¹⁾
黄体酮组($n=11$)	27 mg·kg ⁻¹	267.18±16.10	289.27±13.67	256.09±14.58	253.36±19.43	261.91±24.84	257.09±23.74 ²⁾
孕康低剂量组($n=12$)	4 mL·kg ⁻¹	259.75±15.73	281.58±16.27	267.17±24.37	268.00±27.34	269.17±28.97 ²⁾	268.00±31.65 ³⁾
孕康中剂量组($n=11$)	6 mL·kg ⁻¹	267.64±16.72	284.55±19.88	264.45±10.57	259.91±15.44	265.27±18.91 ²⁾	259.82±25.04 ²⁾
孕康高剂量组($n=11$)	9 mL·kg ⁻¹	269.55±18.16	288.09±20.24	272.09±26.18	265.91±25.96	272.00±26.53 ²⁾	268.27±34.96 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group,¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$.

2.2 对模型大鼠自主活动和肛温的影响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠的自主活动次数和肛温均显著下降($P<0.01$);与模型对照组相比,孕康口服液低、中、高剂量组大鼠自主活动次数和肛温均明显上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。提示孕康口服液能够增加模型孕鼠自主活动次数,升高肛温,改善模型大鼠气血两虚所致的“精神萎靡”“肢萎体冷”。结果见表2。

表2 孕康口服液对模型大鼠自主活动次数、肛温的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Effects of Yunkang oral liquid on the number of autonomous activities and rectal temperature in model rats($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量	自主活动次数/次	肛温/℃
正常对照组($n=11$)	—	91.00±9.46	35.49±0.25
模型对照组($n=12$)	—	49.92±16.60 ¹⁾	34.87±0.26 ¹⁾
黄体酮组($n=11$)	27 mg·kg ⁻¹	73.45±14.32 ³⁾	35.55±0.25 ³⁾
孕康低剂量组($n=12$)	4 mL·kg ⁻¹	67.25±13.94 ²⁾	35.48±0.27 ³⁾
孕康中剂量组($n=11$)	6 mL·kg ⁻¹	76.18±10.79 ³⁾	35.43±0.32 ³⁾
孕康高剂量组($n=11$)	9 mL·kg ⁻¹	75.45±11.46 ³⁾	35.62±0.29 ³⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

2.3 对模型大鼠 HGB、RBC 和 WBC 数目的影响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠第9天HGB、RBC和WBC显著减少($P<0.01$);与模型对照组相比,孕康口服液低、中、高剂量组第9天血常规HGB和WBC明显上升($P<0.05$ 或 $P<0.01$),孕康口服液低、高剂量组第9天血常规RBC显著上升($P<0.05$)。提示孕康口服液能够增加模型孕鼠血液中HGB、RBC和WBC数目,改善外周血象,从而改善血虚。见图1。

2.4 对模型大鼠胚胎丢失率的影响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠的胚胎丢失率显著升高($P<0.01$);与模型对照组相比,孕康口服液低、中、高剂量组大鼠胚胎丢失率均显著降低($P<0.01$),其中孕康口服液6 mL·kg⁻¹组效果最好。提示孕康口服液有良好的保胎效果。见表3。

2.5 对模型大鼠子宫、卵巢、脾脏和胸腺系数的影响

与正常对照组相比,模型对照组大鼠子宫、卵巢、脾脏和胸腺系数均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型对照组相比,孕康口服液低、中、

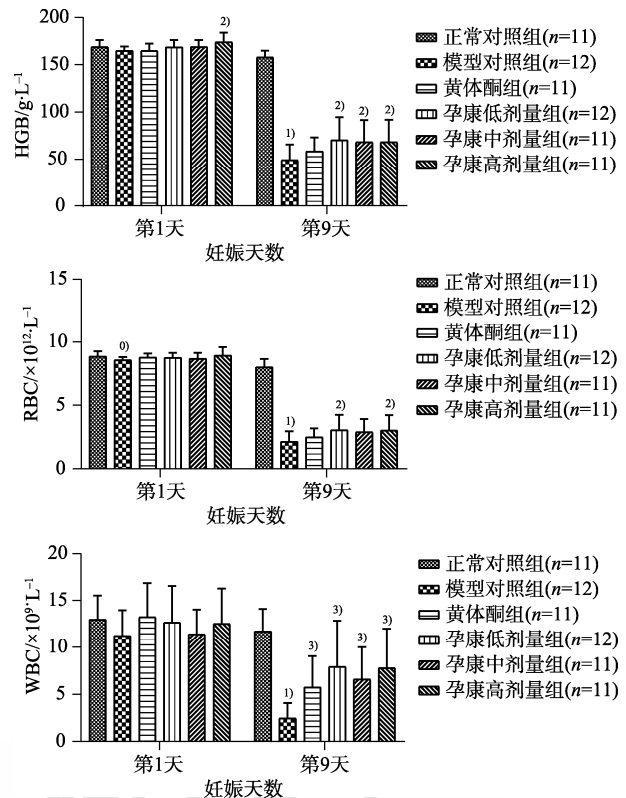


图1 孕康口服液对模型大鼠第1、9天HGB、RBC和WBC的影响($\bar{x}\pm s$)

与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effects of Yunkang oral liquid on HGB, RBC and WBC of model rats on the 1st and 9th day($\bar{x}\pm s$)

Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

表3 孕康口服液对模型大鼠胚胎丢失率的影响

Tab. 3 Effects of Yunkang oral liquid on embryo loss rate in model rats

组别	剂量	总胚胎丢失数/个	总胚胎数/个	胚胎丢失率/%
正常对照组($n=11$)	—	3	155	1.94
模型对照组($n=12$)	—	162	165	98.18 ¹⁾
黄体酮组($n=11$)	27 mg·kg ⁻¹	108	164	65.85 ²⁾
孕康低剂量组($n=12$)	4 mL·kg ⁻¹	118	138	85.51 ²⁾
孕康中剂量组($n=11$)	6 mL·kg ⁻¹	127	145	87.59 ²⁾
孕康高剂量组($n=11$)	9 mL·kg ⁻¹	98	150	65.33 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.01$.

高剂量组大鼠子宫、脾脏和胸腺系数均显著上升($P<0.01$),孕康口服液中、高 mL·kg⁻¹组大鼠卵巢系数明显上升($P<0.05$)。提示孕康口服液能够改善子宫、卵巢萎缩样病变及改善乙酰苯肼与环磷酰胺破坏免疫器官致气血两虚导致的脾脏和胸腺的萎缩。见表4。

表 4 孕康口服液对模型大鼠子宫、卵巢、脾脏和胸腺系数的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Effects of Yunkang oral liquid on the coefficient of uterus, ovary, spleen and thymus in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	子宫系数/mg·g ⁻¹	卵巢系数/mg·g ⁻¹	脾脏系数/mg·g ⁻¹	胸腺系数/mg·g ⁻¹
正常对照组(n=11)	—	6.03±0.89	0.40±0.03	3.21±0.29	1.20±0.29
模型对照组(n=12)	—	1.63±0.36 ¹⁾	0.37±0.03 ²⁾	2.61±0.82 ²⁾	0.44±0.12 ²⁾
黄体酮组(n=11)	27 mg·kg ⁻¹	2.06±0.58 ³⁾	0.42±0.06 ³⁾	4.28±0.98 ⁴⁾	0.65±0.19 ⁴⁾
孕康低剂量组(n=12)	4 mL·kg ⁻¹	2.39±0.64 ⁴⁾	0.39±0.05	4.12±0.77 ⁴⁾	0.72±0.15 ⁴⁾
孕康中剂量组(n=11)	6 mL·kg ⁻¹	2.41±0.75 ⁴⁾	0.43±0.06 ³⁾	4.14±1.31 ⁴⁾	0.67±0.18 ⁴⁾
孕康高剂量组(n=11)	9 mL·kg ⁻¹	2.41±0.78 ⁴⁾	0.42±0.05 ³⁾	4.12±1.07 ⁴⁾	0.71±0.19 ⁴⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05; 与模型对照组比较, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.05; compared with the model control group, ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01.

2.6 对模型大鼠血清 P、E₂、β-HCG 的影响

与正常对照组相比, 模型对照组大鼠血清 P、E₂、β-HCG 水平显著降低(P<0.01); 与模型对照组相比, 孕康口服液中、高剂量组大鼠血清 P、β-HCG 水平显著升高(P<0.01), 孕康口服液低、中、高剂量组大鼠血清 E₂ 水平明显升高(P<0.05 或 P<0.01)。提示孕康口服液能够调节模型孕鼠血清激素水平。见表 5。

表 5 孕康口服液对模型大鼠血清 P、E₂、β-HCG 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Effects of Yunkang oral liquid on serum P, E₂ and β-HCG in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	P/ng·mL ⁻¹	E ₂ /pmol·L ⁻¹	β-HCG/mIU·mL ⁻¹
正常对照组(n=11)	—	13.39±3.14	52.60±6.92	79.93±17.02
模型对照组(n=12)	—	7.63±1.32 ¹⁾	28.61±4.56 ¹⁾	54.52±5.65 ¹⁾
黄体酮组(n=11)	27 mg·kg ⁻¹	11.36±1.91 ³⁾	43.31±6.81 ³⁾	77.46±9.21 ³⁾
孕康低剂量组(n=12)	4 mL·kg ⁻¹	8.37±2.19	34.33±6.05 ²⁾	58.07±8.43
孕康中剂量组(n=11)	6 mL·kg ⁻¹	10.21±1.67 ³⁾	36.54±5.86 ³⁾	63.91±8.47 ³⁾
孕康高剂量组(n=11)	9 mL·kg ⁻¹	12.38±1.60 ³⁾	39.89±7.15 ³⁾	69.58±9.66 ³⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与模型对照组比较, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾P<0.01; compared with the model control group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

2.7 对模型大鼠血清 TNF-α、IFN-γ、IL-4、IL-10 的影响

与正常对照组相比, 模型对照组大鼠血清 TNF-α 和 IFN-γ 水平均显著升高(P<0.01), 血清 IL-4 和 IL-10 水平均显著降低(P<0.01); 与模型对照组相比, 孕康口服液中、高剂量组大鼠血清 TNF-α 水平均显著降低(P<0.01), 低、中、高剂量组大鼠血清 IFN-γ 水平均明显降低(P<0.05 或 P<0.01); 孕康口服液高剂量组大鼠血清 IL-4 水平显著升高(P<0.01), 低、中、高剂量组大鼠血清 IL-10 水平均明显升高(P<0.05 或 P<0.01)。提示孕康口服液能够调节血清 Th1 和 Th2 型细胞因子的水平, 降低炎症反应和胚胎毒性。见表 6。

2.8 对模型大鼠血清 Th1/Th2 的影响

与正常对照组相比, 模型对照组大鼠血清 TNF-α/IL-4、TNF-α/IL-10、IFN-γ/IL-4、IFN-γ/IL-10 值均显著升高(P<0.01); 与模型对照组相比, 孕康口服液中、高剂量组大鼠血清 TNF-α/IL-4、IFN-γ/IL-4 值均显著降低(P<0.01), 孕康口服液低、中、高剂量组大鼠血清 TNF-α/IL-10、IFN-γ/IL-10 值均显著降低(P<0.01)。提示孕康口服液能够调节 Th1/Th2 的平衡, 使其趋向于 Th2 型, 使两者恢复动态平衡, 诱导母胎免疫耐受, 从而达到保胎作用。见表 7。

2.9 对模型大鼠子宫组织形态的影响

HE 结果显示, 正常对照组大鼠子宫内膜正常, 呈现蜕膜化状态, 腺体结构正常并且大量聚集, 黏膜上皮完整, 血管丰富; 与正常对照组相比, 模型对照组大鼠子宫内膜发育不完整, 蜕膜化不明显, 腺体数量减少且无聚集现象; 与模型对照组相比, 孕康口服液 3 个剂量组大鼠子宫内膜均发育良好, 肉眼可见腺体充足且聚集, 血管丰富。见图 2。

2.10 对模型大鼠子宫组织 PR 和 VEGF 表达的影响

2.10.1 对模型大鼠子宫组织 PR 表达的影响 孕激素受体 PR 在蜕膜细胞胞浆和细胞核均有所表达, 免疫组化结果显示, 阳性表达呈棕黄色。正常对照组大鼠子宫蜕膜组织 PR 表达明显, 呈明显的棕黄色表达; 与正常对照组相比, 模型对照组大鼠子宫蜕膜处只有较少的棕黄色表达; 与模型对照组相比, 孕康口服液 3 个剂量组子宫蜕膜处棕黄色表达均呈现出不同程度的加深。见图 3A。半定量分析结果显示, 与正常对照组相比, 模型对照组平均光密度值显著降低(P<0.01); 与模型对照组相比, 孕康口服液 3 个剂量组平均光密度值均明显上升(P<0.01 或 P<0.05)。结果见表 8。

表 6 孕康口服液对模型大鼠 TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10 的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Effects of Yunkang oral liquid on TNF- α , IFN- γ , IL-4 and IL-10 in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	Th1 型		Th2 型	
		TNF- α /pg·mL ⁻¹	IFN- γ /pg·mL ⁻¹	IL-4/pg·mL ⁻¹	IL-10/pg·mL ⁻¹
正常对照组(n=11)	—	166.16±32.99	1 013.01±194.08	121.57±13.20	48.36±6.74
模型对照组(n=12)	—	288.60±44.50 ¹⁾	1 776.05±299.70 ¹⁾	89.25±13.48 ¹⁾	30.43±5.87 ¹⁾
黄体酮组(n=11)	27 mg·kg ⁻¹	179.82±39.35 ³⁾	1 204.85±273.47 ³⁾	119.99±10.62 ³⁾	43.52±5.32 ³⁾
孕康低剂量组(n=12)	4 mL·kg ⁻¹	253.85±53.16	1 499.71±209.00 ²⁾	92.15±12.79	37.05±5.77 ²⁾
孕康中剂量组(n=11)	6 mL·kg ⁻¹	217.67±40.42 ³⁾	1 283.50±244.51 ³⁾	97.73±11.06	38.96±4.92 ³⁾
孕康高剂量组(n=11)	9 mL·kg ⁻¹	194.70±44.44 ³⁾	1 314.90±298.80 ³⁾	108.93±16.03 ³⁾	43.66±4.44 ³⁾

注：与正常对照组比较，¹⁾P<0.01；与模型对照组比较，²⁾P<0.05，³⁾P<0.01。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾P<0.01; compared with the model control group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01.

表 7 孕康口服液对模型大鼠 Th1 型和 Th2 型比值的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 7 Effects of Yunkang oral liquid on the ratio of Th1 type and Th2 type in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量	Th1/Th2		Th1/Th2	
		TNF- α /IL-4	TNF- α /IL-10	IFN- γ /IL-4	IFN- γ /IL-10
正常对照组(n=11)	—	1.37±0.24	3.46±0.70	8.43±1.88	21.27±4.75
模型对照组(n=12)	—	3.34±0.90 ¹⁾	9.75±2.08 ¹⁾	20.33±4.51 ¹⁾	56.89±14.07 ¹⁾
黄体酮组(n=11)	27 mg·kg ⁻¹	1.52±0.43 ²⁾	4.12±0.58 ²⁾	10.08±2.34 ²⁾	28.15±8.10 ²⁾
孕康低剂量组(n=12)	4 mL·kg ⁻¹	2.84±0.87	7.06±1.99 ²⁾	16.83±4.63	41.71±10.79 ²⁾
孕康中剂量组(n=11)	6 mL·kg ⁻¹	2.26±0.53 ²⁾	5.71±1.46 ²⁾	13.39±3.52 ²⁾	33.68±9.08 ²⁾
孕康高剂量组(n=11)	9 mL·kg ⁻¹	1.84±0.54 ²⁾	4.49±1.03 ²⁾	12.12±2.55 ²⁾	30.45±8.05 ²⁾

注：与正常对照组比较，¹⁾P<0.01；与模型对照组比较，²⁾P<0.05，²⁾P<0.01。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾P<0.01; compared with the model control group, ²⁾P<0.01.

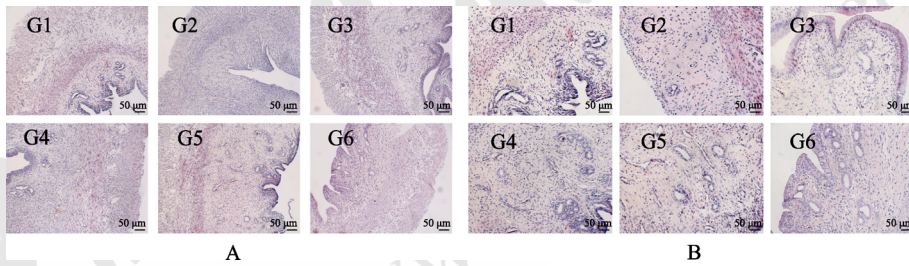


图 2 孕康口服液对模型大鼠子宫组织形态的影响(HE)

G1—正常对照组；G2—模型对照组；G3—黄体酮组；G4—孕康口服液低剂量组(4 mL·kg⁻¹)；G5—孕康口服液中剂量组(6 mL·kg⁻¹)；G6—孕康口服液高剂量组(9 mL·kg⁻¹)；A—100×；B—200×。

Fig. 2 Effect of Yunkang oral liquid on the morphology of uterus in model rats(HE)

G1—normal control group; G2—model control group; G3—progesterone group; G4—Yunkang oral liquid low-dose group(4 mL·kg⁻¹); G5—Yunkang oral liquid medium-dose group(6 mL·kg⁻¹); G6—Yunkang oral liquid high-dose group(9 mL·kg⁻¹); A—100×; B—200×.

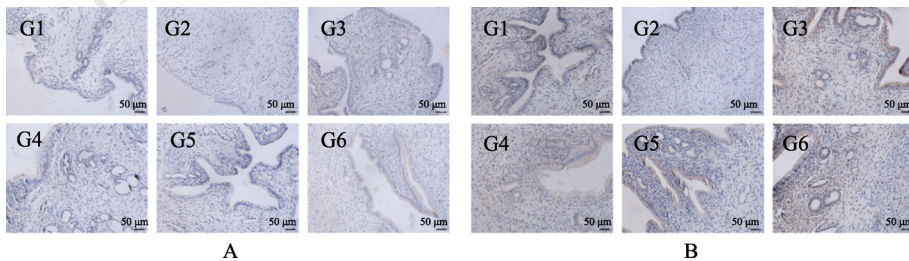


图 3 孕康口服液对模型大鼠子宫组织 PR 和 VEGF 表达的影响

G1—正常对照组；G2—模型对照组；G3—黄体酮组；G4—孕康口服液低剂量组(4 mL·kg⁻¹)；G5—孕康口服液中剂量组(6 mL·kg⁻¹)；G6—孕康口服液高剂量组(9 mL·kg⁻¹)；A—对子宫组织 PR 表达的影响；B—对子宫组织 VEGF 表达的影响。

Fig. 3 Effects of Yunkang oral liquid on the expressions of PR and VEGF in uterine tissue of model rats

G1—normal control group; G2—model control group; G3—progesterone group; G4—Yunkang oral liquid low-dose group(4 mL·kg⁻¹); G5—Yunkang oral liquid medium-dose group(6 mL·kg⁻¹); G6—Yunkang oral liquid high-dose group(9 mL·kg⁻¹); A—effect on PR expression in uterine tissue; B—effect on VEGF expression in uterine tissue.

表 8 孕康口服液对模型大鼠子宫组织 PR、VEGF 蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 8 Effects of Yunkang Oral Liquid on the protein expressions of PR and VEGF in uterine tissue of model rats ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量	PR/平均光密度值	VEGF/平均光密度值
正常对照组	—	0.33±0.01	0.28±0.02
模型对照组	—	0.19±0.01 ¹⁾	0.16±0.01 ¹⁾
黄体酮组	27 mg·kg ⁻¹	0.28±0.02 ³⁾	0.24±0.01 ³⁾
孕康低剂量组	4 mL·kg ⁻¹	0.23±0.01 ²⁾	0.20±0.01 ³⁾
孕康中剂量组	6 mL·kg ⁻¹	0.25±0.01 ³⁾	0.23±0.01 ³⁾
孕康高剂量组	9 mL·kg ⁻¹	0.26±0.02 ³⁾	0.24±0.01 ³⁾

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型对照组比较，²⁾ $P<0.05$ ，³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

2.10.2 对模型大鼠子宫组织 VEGF 表达的影响 VEGF 在子宫组织中主要表达在蜕膜细胞胞浆中，腺上皮细胞也有表达，并且在蜕膜中阳性染色强。实验结果显示，正常对照组孕鼠蜕膜处 VEGF 表达明显，出现大量棕黄色表达，腺体周围也出现圈状棕黄色；而模型对照组大鼠蜕膜处和腺体周围仅出现少量表达；与模型对照组相比，孕康口服液 3 个剂量组大鼠蜕膜处和腺体周围的阳性表达均有不同程度增强，孕康口服液低、高剂量组较为明显。见图 3B。提示孕康口服液能提高子宫 PR、VEGF 的表达，从而改善胎儿宫内环境。

3 讨论

中医并无早期先兆流产的病名，将其归于“胎漏”“胎动不安”范畴。《万氏妇人科·产前治法》载：“漏胎乃气血不足之故。”认为母体气血虚弱、冲任不固是引起胎漏的重要原因。《景岳全书》载：“凡妊娠之数见堕胎者，必以气脉亏损而然……凡胎孕不固，无非气血损伤之痛，盖气虚则提摄不固，血虚则灌溉不周，所以多致小产。”中医往往将补气药和补血药相配伍，来调理孕妇身体。孕康口服液含有山药、续断、黄芪、当归、狗脊、菟丝子、桑寄生、杜仲、补骨脂、党参、茯苓、白术、阿胶、地黄、山茱萸、枸杞子、乌梅、白芍、砂仁、益智、苎麻根、黄芩、艾叶 23 味中药，其中黄芪、白术等可以益气健脾，当归、阿胶等补血养血，续断、桑寄生等固肾纳气，全方共济健脾固肾，养血安胎^[7]。

本实验造模采用化学损伤法有关联合限饲^[8-9]制备气血两虚型流产模型大鼠，其中乙酰苯肼^[10-11]

损伤红细胞，导致溶血；环磷酰胺杀灭增殖周期中的各期细胞，强烈抑制骨髓造血细胞；结合中医“饥则损气”理论，采用限饲法造成大鼠气虚；三者联合造成气血两虚动物模型，该模型动物存活率较高，血虚状态保持时间相对较长，更有利于中药药效评价，更加符合西医病因病理，在此基础上联合米非司酮制备气血两虚流产大鼠模型。结合传统中医学理论，“精神萎靡”“肢萎体冷”“形体消瘦”等是气血两虚在临床上的一般表现。本实验选用一些可量化指标对其临床表现进行了表征，如用自主活动量化“精神萎靡”，用肛温量化“肢萎体冷”，用体质量化“形体消瘦”等。研究结果显示孕康口服液可正向调节模型大鼠自主活动次数，肛温，体质量，血液中 HBC、HGB、WBC 数，胚胎丢失率。提示孕康口服液可以改善母体“精神萎靡”“肢萎体冷”“形体消瘦”等临床表现，从而使母体能够有良好的妊娠状态，达到抗流产效果。

化学损伤法联合溶血法综合造成的气血两虚模型由于乙酰苯肼致溶血、环磷酰胺致免疫抑制并损伤免疫器官，两者共同作用导致孕鼠脾脏、胸腺萎缩；孕鼠长时间处于免疫抑制以及机体虚弱受损状态，使子宫、卵巢也产生萎缩样病变^[12]。中医认为脾统血，卵巢又是人体的生殖器官，两者的病变将直接影响母体的状态，使胎儿受到损害。研究结果显示，孕康口服液可以改善免疫器官以及生殖器官的萎缩样病变，使其趋于正常。提示孕康口服液可能通过改善免疫脏器病变情况来调节母体营养健康状态，从而达到保胎效果。

母体内环境的稳定离不开各种激素的调节，下丘脑性腺轴在胚胎生成发育过程中起到了非常重要的作用，有研究表明，激素对于维持妊娠期母胎界面免疫微环境具有重要意义^[13]。Th1/Th2 的平衡对维持正常妊娠起重要的核心作用，若平衡向 Th1 偏移，可产生异源性排斥反应，对滋养层细胞造成细胞毒性作用而形成免疫损伤，直接或间接影响胚胎发育，导致流产的发生^[14]。本研究结果显示，孕康口服液可正向调节模型孕鼠血清 P、E₂、β-HCG、IL-4、IL-10、TNF-α、IFN-γ 水平，维持下丘脑性腺轴激素稳定，保持 Th1 和 Th2 的动态平衡，从而改善胎盘、子宫的血液循环，减轻炎症反应和胚胎毒性，为胚胎的顺利生长提供良好的内环境^[15]。

PR 是孕酮在体内发挥作用的载体, 在妊娠的建立和维持中起到非常重要的作用; VEGF 是胚胎形成中的重要促血管生长因子, 可直接、特异性地作用于血管内皮细胞, 对胚胎生理血管形成发挥积极的调节作用^[16], 胚胎的成功植入依赖于血管形成过程中自身的血液供应, 即在植入部位诱导血管形成, 而 VEGF 则是这一过程中最好的诱导剂^[17]。本研究结果显示, 孕康口服液能够正向调节模型大鼠子宫组织 PR、VEGF 的表达, 有利于妊娠的维持以及胚胎的血液供应, 从而达到保胎作用。

综上所述, 本研究从胚胎丢失率、母体健康状况、母体内分泌系统、免疫耐受以及子宫内环境等多方面来探究孕康口服液对气血两虚先兆流产模型的保胎作用。研究结果表明其对此模型具有良好的保胎作用, 保胎机制可能与以下有关:

- ①调节母体血清性激素水平, 改善内分泌紊乱;
- ②调节 Th1/Th2 细胞因子平衡, 降低炎症反应和胚胎毒性;
- ③增加子宫 PR、VEGF 表达, 改善胚胎内环境。

REFERENCES

- [1] 秦炜, 陆丹, 林芳, 等. 孕激素治疗早孕黄体功能不足 61 例临床观察[J]. 中国实用医药, 2016, 11(4): 146-147.
- [2] 乔秀霞. 早期先兆流产患者使用孕康口服液和烯丙雌醇片联合治疗的临床分析[J]. 中国实用医药, 2021, 16(18): 151-153.
- [3] CHEN S F, ZHAO X M. Clinical efficacy and safety of phloroglucinol injection combined with Yunkang oral liquid in the treatment of threatened abortion[J]. Chin J Clin Ration Drug Use(临床合理用药杂志), 2021, 14(12): 50-52, 55.
- [4] CHEN S Q, SU J, YU H H, et al. Effect of Yunkang oral liquid on kidney-deficiency abortion model mice induced by hydrocortisone combined with mifepristone[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2020, 31(7): 775-780.
- [5] XU W F, CHEN Q Q, LIU H F, et al. Anti-miscarriage effect of Yunkang oral liquid on spleen-deficiency abortion model mice[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理), 2020, 31(5): 553-558.
- [6] ZHAO Q, ZHANG E, CHEN P. Discussion on Professor Chen Ping's experience in treating threatened abortion with weak Qi and blood[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2020, 12(33): 1-3.
- [7] 杨青. 保胎灵胶囊联合孕康口服液治疗早期先兆流产的临床疗效及其对黄体酮水平的影响[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(27): 122-123.
- [8] 段树丽. 当归对血虚大鼠 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶的影响[J]. 甘肃畜牧兽医, 2021, 51(4): 50-53.
- [9] LI W X, LIU Y Y, WANG Y Y, et al. Effect of wine processing on the blood enriching and blood activating effect of siwu decoction[J]. Asia Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2019, 15(6): 16-19.
- [10] WAN X Q, CHEN S H, PENG Y S, et al. Comparative of notoginseng Radix et Rhizome and its processed products on enriching blood and supplementing qi of rats with blood-deficiency[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 696-699.
- [11] 钱宏梁, 潘志强. 中医血虚证及其动物模型制备方法评析[J]. 广州中医药大学学报, 2018, 35(1): 176-181.
- [12] SUN L, LIU H X, WANG C H, et al. Simulation and syndrome evaluation of mice animal model of insomnia of blood deficiency pattern[J]. Glob Tradit Chin Med(环球中医药), 2021, 14(8): 1385-1389.
- [13] CHEN J J, XU Z Y. Application value of serum estradiol, progesterone and human chorionic gonadotropin levels in early pregnancy in predicting threatened abortion[J]. J Math Med(数理医药学杂志), 2021, 34(9): 1388-1390.
- [14] XIE P, XIAO Y, LUO R Q, et al. Changes of serum inflammatory factors, Th1/Th2, and $\beta\text{-hCG}$ in pregnant women with GBS infection and their predictive value in occurrence of PROM and pregnancy outcome[J]. China J Mod Med(中国现代医学杂志), 2021, 31(21): 78-85.
- [15] WANG M M, ZHONG J X, XIANG Y Y. LncRNA-GAS5 related to the processes of recurrent pregnancy loss by regulating Th1/Th2 balance[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2021, 37(6): 479-486.
- [16] YANG C J, STONE P, STEWART A W. The epidemiology of recurrent miscarriage: A descriptive study of 1214 prepregnant women with recurrent miscarriage[J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2006, 46(4): 316-322.
- [17] ZHI Z F, YANG W M, LIU L L, et al. Early missed abortion is associated with villous angiogenesis via the HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 298(3): 537-543.

收稿日期: 2022-03-24
(本文责编: 陈怡心)