

引用本文:郭佩,周英惠,卿荣珍.复方麝香膏治疗外阴硬化性苔癣的临床疗效及对细胞周期蛋白D1、抑癌基因p16表达的影响[J].安徽医药,2021,25(3):607-610.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.044.



◇ 药物与临床 ◇

复方麝香膏治疗外阴硬化性苔癣的临床疗效 及对细胞周期蛋白D1、抑癌基因p16表达的影响

郭佩¹,周英惠²,卿荣珍¹

作者单位:¹广西中医药大学附属国际壮医医院妇科,广西 南宁 530000;

²广西中医药大学附属瑞康医院妇科,广西 南宁 530000

通信作者:卿荣珍,女,主任医师,研究方向为不孕症及生殖内分泌疾病,Email:18776702912@163.com

摘要: **目的** 探讨复方麝香膏治疗外阴硬化性苔癣的临床疗效及对病变组织中细胞周期蛋白D1(cyclin D1)及抑癌基因p16表达的影响。**方法** 选取2017年6月至2019年6月广西中医药大学附属瑞康医院的90例病人,经病理活检确诊为外阴硬化性苔癣,按随机数字表法分为两组,观察组及对照组各45例,对照组选择常规传统药物治疗,观察组选用复方麝香膏外用,连续用药3个月。治疗前、治疗完成后即刻、治疗后6个月取外阴原病变处组织行病理学检查,并采用免疫组化方法检测病变组织中cyclin D1与p16的表达水平,于治疗完成后即刻、治疗后6个月判定两组的临床疗效并比较有效率。**结果** 对照组与观察组治疗完成后即刻两组cyclin D1蛋白阳性表达率分别为31.11%、24.44%,与治疗前(71.11%、68.89%)比较均降低($P < 0.05$);p16蛋白阳性表达率分别为24.44%、26.67%,与治疗前(6.67%、8.89%)比较均升高($P < 0.05$)。治疗后6个月观察组cyclin D1蛋白阳性表达率28.89%仍低于治疗前68.89%($P < 0.05$),p16蛋白阳性表达率24.44%高于治疗前8.89%($P < 0.05$),对照组cyclin D1及p16蛋白阳性表达率与治疗前差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗完成后即刻两组cyclin D1及p16蛋白阳性表达率均差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后6个月,观察组cyclin D1蛋白阳性表达率28.89%低于对照组51.11%($P < 0.05$),p16蛋白阳性表达率24.44%高于对照组8.89%($P < 0.05$)。治疗完成后即刻两组总有效率分别为75.6%、82.2%,差异无统计学意义($P > 0.05$),治疗后6个月观察组总有效率77.8%高于对照组57.8%($P < 0.05$)。**结论** 复方麝香膏及糖皮质激素均是治疗外阴硬化性苔癣的有效方法,两者均能降低cyclin D1的表达水平,增加p16的表达水平,短期疗效相当,但复方麝香膏疗效稳定,治疗后6个月时复方麝香膏疗效优于糖皮质激素。

关键词: 外阴硬化性苔癣; 复方麝香膏; 氢化可的松; 细胞周期蛋白D1; 基因,p16

The clinical effect of compound musk ointment on vulva sclerosing lichen and its effect on the expression of cyclin D1, tumor suppressor gene p16 in the treatment of vulvar lichen sclerosus by compound musk ointment

GUO Pei¹, ZHOU Yinghui², QING Rongzhen¹

Author Affiliations:¹Department of Gynaecology, International Zhuang Medical Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530000, China;

²Department of Gynaecology, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530000, China

Abstract: **Objective** To investigate the clinical efficacy of compound musk ointment in the treatment of vulvar lichen sclerosus (VLS) and its effect on cyclin D1 and tumor suppressor gene p16 expression in diseased tissues. **Methods** A total of 90 cases with VLS diagnosed by pathological biopsy from June 2017 to June 2019 in Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine were randomly divided into the observation group and the control group, with 45 cases in each group. The control group was treated with conventional traditional drugs, and the observation group was treated with compound musk ointment for external use for 3 months. Histopathological examination was performed before, after and 6 months after treatment. The expressions of cyclin D1 and p16 in pathological tissues were detected by immunohistochemistry, and the clinical efficacy of the two groups was compared. **Results** The positive expression rates of cyclin D1 protein in the control group and the observation group immediately after treatment were 31.11% and 24.44% respectively, which were lower than those before treatment (71.11% and 68.89%) ($P < 0.05$), and the positive expression rates of p16 protein of the two groups after treatment were 24.44% and 26.67%, respectively, which were higher than those before treatment (6.67% and 8.89%) ($P < 0.05$). Six months after treatment, the positive expression rate of cyclin D1 protein was 28.89%, which was still lower than that before treatment (68.89%) ($P < 0.05$); while the positive expression rate of p16 protein was 24.44%,

which was higher than that before treatment (8.89%) ($P < 0.05$). There was no difference between the positive expression rates of cyclin D1 and p16 protein in the control group at 6 months after treatment and those before treatment ($P > 0.05$). There was no significant difference in the positive expression rate of cyclin D1 and p16 protein between the two groups after treatment ($P > 0.05$); after 6 months of treatment, the positive expression rate of cyclin D1 protein in the observation group (28.89%) was lower than that in the control group (51.11%) ($P < 0.05$), and the positive expression rate of p16 protein in the observation group (24.44%) was higher than control group (8.89%) ($P < 0.05$). After treatment, the total effective rates of the two groups were 75.6% and 82.2%, respectively, with no significant difference ($P > 0.05$). After 6 months of treatment, the total effective rate of the observation group was 77.8%, which was higher than that of the control group (57.8%) ($P < 0.05$). **Conclusions** Both compound musk ointment and glucocorticoid are effective methods for the treatment of vulvar sclerosing tinea capitis. Both of them can reduce the expression level of cyclin D1 and increase the expression level of p16. The short-term effects of the two treatments are the same, but the curative effect of compound musk ointment is stable, and is better than that of glucocorticoid at 6 months after treatment.

Key words: Vulva lichen sclerosis; Compound musk ointment; Hydrocortisone; Cyclin D1; Genes, p16

外阴硬化性苔癣是由慢性淋巴细胞介导的最常见的外阴白色病变,好发于外阴、肛周,主要表现为皮肤萎缩伴黏膜色素脱失。其发病机制尚不清楚,是一种难治性妇科疾病,目前临床治疗方法主要包括聚焦超声、药物、激光及手术治疗等^[1-2]。激光治疗不能到达真皮层,仅局限于浅层,疗效有限;聚焦超声是近年来新兴物理治疗,见效快,但容易引起皮肤红肿及热损伤,且复发率高;而手术创伤较大,病人不易接受,且复发率高,并不作为首选^[3]。本研究通过应用复方麝香膏以局部涂抹药物的方式局部治疗,并与传统药物进行对比,探讨复方麝香膏治疗外阴硬化性苔癣的临床疗效及相关机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2017年6月至2019年6月广西中医药大学附属瑞康医院妇科门诊经病理活检确诊为外阴硬化性苔癣的90例病人,按随机数字表法分为两组:观察组45例,年龄(45.45±7.27)岁,范围为39~63岁;病程(4.16±0.47)年,范围为0.55~8.00年;对照组45例,年龄(46.11±6.84)岁,范围为38~65岁;病程(4.04±0.53)年,范围为0.65~7.80年;两组年龄、病程比较,均差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 选取标准 纳入标准:符合西医的诊断标准,暂无生育要求的女性;经病理诊断确诊;无糖尿病,无严重的心脑血管、肝肾疾病,并排除造血系统疾病所致阴痒者;排除泌尿、生殖道感染所致外阴瘙痒者;本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求,病人或近亲属对研究方案签署知情同意书。排除标准:外阴病理活检为外阴上皮内瘤样改变及外阴癌;滴虫、霉菌等感染性外阴炎;由糖尿病所致外阴病变;孕妇及哺乳期;依从性较差;对相关药物及治疗过敏;正在参加其他药物临床试验。

1.3 治疗方法 对照组:2%丙酸睾酮(浙江仙琚制药股份有限公司,批号H33021205,批次201718)50 mg 4支,1%丁酸氢化可的松软膏10 g:10 mg 1支(北京优华药业有限公司,批号H20093828,批次

20170102),凡士林10 g,混匀后均匀涂薄层0.2 mm于病变处,每天2次,治疗3个月为1个疗程,门诊定期随访。并于治疗后即刻及治疗后6个月按评价标准判定疗效。观察组:采用该院科室协定处方复方麝香膏,药物组成:麝香3 g,冰片10 g,龙血竭3 g,2%丙酸睾酮50 mg,凡士林10 g。方法同对照组。

1.4 组织病理学检查方法 所有标本经10%甲醛固定后常规石蜡切片包埋(厚度为4 μm)。苏木精-伊红(HE)染色,光镜观察。

1.5 免疫组化分析方法 细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、抑癌基因p16检测方法:采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法。切片置于涂有黏合剂的玻片上,进行烘烤、脱蜡、乙醇脱水处理,水洗后浸泡于3%过氧化氢溶液中,随后磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗。置入枸橼酸盐缓冲液中,使用PBS冲洗。加一抗,室温孵育后冲洗。加入二抗,静置后PBS冲洗。用过氧化氢-二氨基联苯胺显色,水洗。苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂胶封固后进行光镜检查。免疫组化结果判定参照文献^[4]的标准,阳性:细胞核、细胞质内出现棕褐色染色。阳性细胞分4级:不着色为阴性(-);浅黄色、无明显有色颗粒,阳性细胞数<10%者为弱阳性(+);棕色细颗粒,阳性细胞数为10%~50%者为中度阳性(++);深棕褐色粗大颗粒,阳性细胞数>50%者为强(+++)。用已知阳性乳腺癌组织切片做阳性对照,PBS代替一抗做阴性对照。最终判定标准:(-)记为阴性,(+),(++),(+++)记为阳性。

1.6 疗效评定标准 痊愈:无瘙痒症状,病变区域皮肤黏膜颜色、弹性恢复正常,病变面积缩小超过2/3或未见明显病变,病理检查为正常皮肤;显效:外阴瘙痒症状基本消失,病变区域皮肤颜色呈现粉红,弹性好转,病变面积缩小约2/3,病理检查接近正常;有效:外阴瘙痒症状部分减轻或缓解,皮肤组织颜色变为淡红色,弹性略好转,病变面积缩小约1/3,病理检查部分恢复正常;无效:外阴瘙痒症状仍然

存在,皮肤弹性、颜色、病变面积无明显变化甚至扩大,病理检查无明显变化。总有效率=(痊愈+显效+有效)/每组总数 \times 100%。

1.7 统计学方法 利用SPSS 18.0版统计软件对所得数据进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后病理变化结果 治疗前两组病理结果无明显差异,主要表现:表皮层过度角化,棘细胞层变薄、萎缩,上皮脚变钝或消失,黑色素细胞减少,可见真皮层炎性细胞浸润。治疗完成后即刻两组病理结果基本一致:各型病变组织过度角化明显减轻,外阴皮肤的表皮层逐渐恢复正常结构,黑色素细胞增多,炎性细胞浸润减少。但治疗后6个月与对照组比较,观察组病变组织角化明显减轻,外阴皮肤的表皮层黑色素细胞多,炎性细胞浸润少。

2.2 免疫组化结果 与治疗前比较,治疗完成后即刻两组 cyclin D1 蛋白阳性表达率均降低($P < 0.05$), p16 蛋白阳性表达率均升高($P < 0.05$);治疗后6个月观察组 cyclin D1 蛋白阳性表达率仍低于治疗前($P < 0.05$), p16 蛋白阳性表达率高于治疗前($P < 0.05$),对照组 cyclin D1 及 p16 蛋白阳性表达率与治疗前差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗完成后即刻两组 cyclin D1 及 p16 蛋白阳性表达率均差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后6个月,观察组 cyclin D1 蛋白阳性表达率低于对照组($P < 0.05$), p16 蛋白阳性表达率高于对照组($P < 0.05$)。见表1,2。

表1 两组外阴硬化性苔藓组织中细胞周期蛋白D1 (cyclin D1)蛋白阳性率的比较/例(%)

组别	例数	治疗前	治疗后即刻	治疗后6个月
对照组	45	32(71.11) ^{①②}	14(31.11)	23(51.11)
观察组	45	31(68.89) ^{③④}	11(24.44)	13(28.89)
χ^2 值		0.053	0.498	4.63
P值		0.818	0.480	0.031

注:①与对照组治疗后即刻比较, $\chi^2=8.331, P=0.017$ 。②与对照组治疗后6个月比较, $\chi^2=1.393, P=0.107$ 。③与观察组治疗后即刻比较, $\chi^2=10.829, P=0.011$ 。④与观察组治疗后6个月比较, $\chi^2=8.776, P=0.015$ 。

2.3 临床疗效评估 治疗后,两组总有效率相当($P > 0.05$)。治疗后6个月,观察组总有效率高与对照组($P < 0.05$)。见表3。

表2 两组外阴硬化性苔藓组织中p16蛋白阳性率的比较/例(%)

组别	例数	治疗前	治疗后即刻	治疗后6个月
对照组	45	3(6.67) ^{①②}	11(24.44)	4(8.89)
观察组	45	4(8.89) ^{③④}	12(26.67)	11(24.44)
χ^2 值		0.155	0.058	3.920
P值		0.694	0.809	0.048

注:①与对照组治疗后即刻比较, $\chi^2=11.996, P=0.009$ 。②与对照组治疗后6个月比较, $\chi^2=0.885, P=0.697$ 。③与观察组治疗后即刻比较, $\chi^2=12.164, P=0.009$ 。④与观察组治疗后6个月比较, $\chi^2=10.953, P=0.011$ 。

3 讨论

外阴硬化性苔藓是发生在女性外阴皮肤和黏膜的良性病变,常伴有外阴瘙痒及色素减退、皮肤弹性减弱,病程较长,容易复发,属于皮肤和黏膜非瘤样上皮病变,恶变率为2%~5%^[5-6]。目前临床常规多采用糖皮质激素联合丙酸睾酮治疗本病,研究证实,糖皮质激素对溶酶体膜具有稳定及防止溶酶体释放,减少炎症介质的产生并降低毛细血管壁及细胞膜的通透性、抑制组胺形成与释放的作用,进而控制局部瘙痒^[7-8]。而丙酸睾酮能使氨基酸分解减少,促进细胞分裂与生长,并维持其正常功能。糖皮质激素联合丙酸睾酮是目前临床治疗的一个常规疗法,疗效肯定,但是糖皮质激素长期使用存在外阴萎缩,复发率高的问题。本研究中丙酸睾酮作为治疗该病的基础用药,通过传统药物糖皮质激素与复方麝香膏的中药成分对比,观察病人临床症状及体征、病理切片的变化判定疗效,结果表明,两组治疗后临床症状及体征均较治疗前好转,疗效相当;而治疗后6个月复方麝香膏治疗效果优于对照组,疗效稳定,说明复方麝香膏长期疗效优于传统激素疗法。

外阴硬化性苔藓病理主要表现为表皮层过度角化和毛囊角质栓,上皮脚变钝或消失,基底层细胞内及细胞间液化,黑色素细胞减少,真皮层炎性细胞浸润,微血管数目减少。特殊染色可见弹力纤维消失,网状纤维稀疏。本研究中观察组与对照组治疗后病理均有明显好转,治疗后6个月观察组病理改变优于对照组,观察组病变组织角化较对照组明显减轻,外阴皮肤的表皮层黑色素细胞多,而炎性细胞浸润少,病理结果证实复方麝香膏长期疗效优于对照组。

传统中医认为,硬化性苔藓病变属于中医“阴痒”范畴,多属肝肾阴虚血瘀证,血虚则不能濡养阴

表3 外阴硬化性苔藓治疗后两组临床疗效比较

时间	组别	例数	痊愈/例	显效/例	有效/例	无效/例	总有效率/%	χ^2 值	P值
治疗后即刻	对照组	45	4	11	19	11	75.6	0.600	0.438
	观察组	45	5	12	20	8	82.2		
治疗后6个月	对照组	45	3	8	15	19	57.8	4.121	0.042
	观察组	45	4	11	20	10	77.8		

部肌肤,则肌肤颜色减退或萎缩;血瘀则脉络瘀阻,因此阴部瘙痒并皮肤增厚。本制剂的主要成分麝香之辛香能通诸窍之不利,有疏通脉络、活血消肿之功,并使营养物质疏通至病变组织,因此对“阴痒”之证具有很好的濡养功效,促进阴部病变组织向正常组织分化。现代药理研究表明,麝香外用可改善微循环,且容易被皮肤组织吸收,有助于组织修复及促进皮肤胶原纤维的形成,此外,麝香还有抗菌、抗炎的作用^[9]。血竭为本制剂复方麝香膏的另一重要成分,血竭具有性平,味甘、咸特点,无毒,外用能生肌敛疮,祛瘀生新,有效改善病变组织微循环,是中药外治中最常用的活血生肌药物。硬化性苔癣病变病理表现为真皮层炎性细胞浸润,微血管数目减少,而龙血竭中含有血竭皂苷和植物防卫素等多种活性成分,具有强大的抗炎镇痛作用,植物防卫素为抗炎防腐物质,具有祛腐生肌的作用^[10],石聪^[11]发现龙血竭可促进皮肤创面真皮层中毛细血管的增生,并具有修复创面的作用。冰片是复方麝香膏中又一重要成分,具有清热解毒、抗炎的作用,因而广泛用于局部皮肤制剂中。冰片性质辛散,能引药由肌表直达腠理,清凉止痒。目前大量药理研究证实冰片能不同程度地促进药物的透皮吸收及促进黏膜吸收,冰片可促进麝香酮的胃肠吸收,冰片的作用时间越长,麝香酮的吸收越好^[12]。

复方麝香膏采用麝香、血竭与冰片结合,直接敷于患处,不仅促进局部组织血液循环,改善细胞通透性,促进药物吸收,而且简便易行,无设备要求,无感染及创伤的副作用,尤其对依赖性差的病人更为适用。随着免疫学及分子生物学技术的不断发展,细胞增殖学说越来越受到重视,国内外大量研究表明,外阴硬化性苔癣组织的细胞增殖活跃可能与多种细胞周期调控因子表达异常相关^[13-14]。研究表明,cyclin D1及p16是细胞周期内源性调控的核心因子^[15-16],且cyclin D1蛋白的表达水平升高与外阴白色病变密切相关,p16蛋白是参与调控外阴白色病变的另一重要因子,两者共同调控着细胞的分裂增殖及凋亡^[17-18]。目前研究证实,cyclin D1推动细胞从G1期向S期转化,启动细胞分裂增殖周期的进程^[19-20],cyclin D1蛋白的过度表达以及p16的不表达或表达水平低下都可使细胞增殖失常。本研究证实,观察组经复方麝香膏治疗后病变组织cyclin D1表达降低、p16表达升高,我们推断复方麝香膏治疗外阴硬化性苔癣可能通过调控cyclin D1及p16基因的表达,进而调节细胞周期依赖激酶的活性,使细胞的分裂增殖、凋亡恢复正常,从而使病变组织恢复正常。

综上,复方麝香膏能使外阴硬化性苔癣病变组织中cyclin D1蛋白水平下降,并同时升高p16蛋白

水平,近期临床疗效确切。

参考文献

- [1] 李静然,杨莹超,谢亚静,等.点阵式二氧化碳激光与曲安奈德治疗外阴硬化性苔癣的对照研究[J].中国妇产科临床杂志,2018,19(2):107-110.
- [2] 郜宇,刘丽敏.自拟白斑膏联合氮氛激光照射治疗外阴白色病变的临床疗效观察[J].中国卫生标准管理,2017,8(19):111-112.
- [3] 杨欢,李成志.外阴硬化性苔癣的研究进展[J].重庆医科大学学报,2017,42(12):1531-1535.
- [4] 张云鹤,李广太.HER-2/neu和p16在外阴上皮内非瘤变中的表达及其意义[J].中国计划生育和妇产科,2017,9(1):64-68.
- [5] YANG M,WEN W,CHANG J.Vulvar lichen sclerosus:A single-center retrospective study in China[J].J Dermatol,2018,45(9):1101-1104.
- [6] DAVICK JJ,SAMUELSON M,KRONE JT,et al.The prevalence of lichen sclerosus in patients with vulvar squamous cell carcinoma[J].Int J Gynecol Pathol,2017,36(4):305-309.
- [7] 李茜,赵菊芬,段丽娅,等.氟轻松维生素B6软膏联合高聚焦超声刀治疗外阴白色病变的疗效观察[J].西南军医,2017,19(3):256-258.
- [8] 余作为,邢彦君,钟美雄.丁酸氢化可的松乳膏联合黄体酮注射液治疗上皮性外阴白斑的临床研究[J].中国现代药物应用,2019,13(15):111-112.
- [9] 刘源香,李谨,杨继国.麝香的药理作用及临床应用研究概况[J].山东中医杂志,2014,33(8):693-694.
- [10] 许明君,郭海亮,袁军,等.龙血竭胶囊对SD大鼠放射性皮肤损伤防护作用及机制的初步研究[J].赣南医学院学报,2019,39(5):460-464,478.
- [11] 石聪,张兰春,余晓玲,等.龙血竭凝胶剂的制备及对创面组织的修复作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(2):156-160.
- [12] 邹亮,林俊芝,胡慧玲,等.冰片对麝香酮在大鼠小肠吸收的影响[J].中国中药杂志,2012,37(22):3490-3493.
- [13] 肖雪莲,赵建武,梁文通,等.外阴白色病变组织中cyclin D1、p16和CD34表达情况及其与血清cAMP和cGMP含量的关系[J].中国现代医学杂志,2015,25(25):50-52.
- [14] CARLSON BC,HOFER MD,BALLEK N,et al.Protein markers of malignant potential in penile and vulvar lichen sclerosus [J].J Urol,2013,190(2):399-406.
- [15] 张宪军,陈志红,李明,等.高强度聚焦超声联合竹红菌素软膏对外阴上皮非瘤样病变组织中P16、CD34的影响[J].中国现代医学杂志,2018,28(33):71-75.
- [16] 李晓丽.补肾活血法治疗外阴营养不良的临床研究[D].太原:山西省中医药研究院,2018.
- [17] WANG H,WANG J,ZHAO B.Correlation of p16 and cyclin D1 expression with the incidence and prognosis of cardiac carcinoma [J].Oncol Lett,2019,17(6):4859-4864.
- [18] AIDÉ S,LATTARIO FR,ALMEIDA G,et al.Promoter hypermethylation of death-associated protein kinase and p16 genes in vulvar lichen sclerosus[J].J Low Genit Tract Dis,2012,16(2):133-139.
- [19] SHACO-LEVY R,BEAN SM,VOLLMER RT,et al.Paget disease of the vulva: a study of 56 cases[J].Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2010,149(1):86-91.
- [20] 罗利云,凌莉,王潇蓉,等.ZFP36L1通过下调细胞周期蛋白D1抑制舌癌细胞增殖[J].中国生物化学与分子生物学报,2019,35(1):67-73.

(收稿日期:2019-07-29,修回日期:2019-09-22)