

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.05.001

◇ 药学研究 ◇

桂枝茯苓胶囊对模型大鼠子宫肌瘤中孕激素受体及子宫平滑肌细胞的影响

范华农¹, 龚义凤²作者单位:¹浠水县中医院妇产科, 湖北 黄冈 438200; ²繁昌县中医院妇产科, 安徽 芜湖 242400

摘要:目的 研究桂枝茯苓胶囊对大鼠子宫肌瘤中孕激素受体(PR)和子宫平滑肌细胞蛋白激酶C(PKC)的影响。方法 正常组:14只,肌注0.9%生理盐水0.05 mL(3次/周);造模组:67只,Wistar雌性大鼠注射黄体酮、苯甲酸雌二醇建立子宫肌瘤模型,分别予以桂枝茯苓流浸膏和米非司酮灌胃,用免疫组化法测定药物对各组大鼠子宫平滑肌组织中PR及PKC。结果 ①用药后表明,PR阳性表达率,桂枝茯苓组较模型组下降显著[(32.25±2.8)%比(75.25±4.1)%, $P < 0.05$],接近正常组水平[(32.25±2.8)%比(28.34±2.4)%, $P > 0.05$]。②PKC细胞膜的活性表达,桂枝茯苓组较模型组下降显著[(21.62±5.23)比(37.24±7.12) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.05$],桂枝茯苓组更接近正常组[(21.62±5.23)比(19.31±3.84) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P > 0.05$]。③PKC细胞质的活性表达,桂枝茯苓组与模型组比较升高明显[(16.50±2.80)比(11.68±4.68) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.05$],桂枝茯苓组PKC细胞质的活性升高接近正常组表达[(16.50±2.80)比(15.43±4.59) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P > 0.05$]。结论 桂枝茯苓胶囊显著改善子宫平滑肌细胞的缺氧状态,抑制血管生成,切断子宫平滑肌细胞增殖分化信号传递通道,促使子宫平滑肌细胞的修复,这可能是桂枝茯苓胶囊抑制子宫肌瘤发展的重要机制之一。

关键词:子宫肿瘤; 肌瘤; 子宫平滑肌细胞; 孕激素类; 受体,孕酮; 蛋白激酶C; 雌二醇; 大鼠,Wistar; 桂枝茯苓胶囊

Guizhi Fuling capsule on progesterone receptor and uterine leiomyoma effect on vascular smooth muscle cells in model rats

FAN Huanong¹, GONG Yifeng²Author Affiliations: ¹Xishui TCM Hospital, Huanggang, Hubei 438200, China; ²Fanchang TCM Hospital, Wuhu, Anhui 242400, China

Abstract: Objective To observe the effect of *Guizhi Fuling* capsule on progesterone receptor (PR) and vascular smooth muscle cell protein kinase C (PKC) in rat uterine leiomyoma. **Methods** Wistar female rats were injected with Estradiol benzoate and Progesterone to establish an animal model of uterine leiomyoma. Both group were given *Guizhi Fuling* fluidextractum and Mifepristone by gavage. The effects of *Guizhi Fuling* to PR and vascular smooth muscle cells PKC in smooth muscle tissue of rats were determined by immunohistochemical. **Results** ① After administration, compared with the model group, positive expression rate of PR were decreased significantly, the *Guizhi Fuling* group [(32.25±2.8)% vs. (75.25±4.1)%, $P < 0.05$], close to the normal group [(32.25±2.8)% vs. (28.34±2.4)%, $P > 0.05$]. ② Active expression of PKC cell membrane, compared with the model group, the *Guizhi Fuling* group decreased significantly [(21.62±5.23) vs. (37.24±7.12) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.05$], the *Guizhi Fuling* group was closer to the normal group [(21.62±5.23) vs. (19.31±3.84) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P > 0.05$]. ③ The active expression of PKC cytoplasm, compared with the model group, the *Guizhi Fuling* group increased significantly [(16.50±2.80) vs. (11.68±4.68) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P < 0.05$], the activity of cytoplasm of PKC in *Guizhi Fuling* group was higher than that in normal group [(16.50±2.80) vs. (15.43±4.59) fmol·mg⁻¹·min⁻¹, $P > 0.05$]. **Conclusion** *Guizhi Fuling* capsule can significantly improve the hypoxia status of uterine smooth muscle cells, inhibit angiogenesis, cut off the signal transduction pathway of proliferation and differentiation of uterine smooth muscle cells, promote the repair of uterine smooth muscle cells, which may be one of the important mechanisms of inhibiting the development of uterine fibroids by *Guizhi Fuling* capsule.

Key words: Uterine neoplasms; Myoma; Uterine smooth muscle cells; Progestins; Receptors, progesterone; Protein kinase C; Estradiol; Rats, Wistar; *Guizhi Fuling* capsule

子宫肌瘤又称子宫平滑肌瘤,由平滑肌及结缔组织组成,是女性生殖系统最常见的良性肿瘤,育龄期妇女平均发病率约为77%,发病率呈逐年上升

的趋势^[1-2]。其常引起月经过多、不孕、流产等疾病,也是女性子宫切除的常见原因,严重影响病人身心健康。据相关文献报道,雌、孕激素是子宫肌瘤形

成发展的重要因素,且与雌、孕激素受体(ER、PR)有很重要的联系,还与子宫平滑肌细胞蛋白激酶C(PKC)关系密切。PKC是调节平滑肌细胞收缩、受体结合、细胞增殖分化的信号传递通道的重要物质,其降低有促进体外培养的子宫平滑肌瘤细胞生长抑制的作用,桂枝茯苓胶囊由桂枝、茯苓、牡丹皮等中药组成,具有活血化瘀,缓消癥块之效。临床应用于子宫肌瘤疗效显著^[3]。笔者通过观察PR和PKC对造模大鼠子宫肌瘤的表达影响,进一步探析桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤的作用机制。

本研究起止时间为2016年1月至2017年1月。

1 材料与与方法

1.1 实验药物及试剂 桂枝茯苓流浸膏:桂枝茯苓胶囊(成分相同)(江苏康缘药业股份有限公司生产,浓度0.31 g/mL,批号20160507)用量按成人与大鼠等效用量换算而成。米非司酮片:每片25 mg(北京紫竹药业有限公司,批号43181709)配制成浓度为0.27 mg/mL的溶液备用(溶于丙二醇中)。黄体酮注射液:20 mg/mL(浙江仙琚药业,批号021603)。苯甲酸雌二醇注射液:2 mg/mL(天津金耀氨基酸药业,批号021865)。PR单克隆抗体(德国Biometro公司)。仪器:Leica荧光倒置显微镜(上海洛丰精密检测仪器有限公司);Thermo-CO₂培养箱(美国Thermo Forma公司);SP试剂盒(美国Beckman Coulter公司)。

1.2 动物分组 SPF级Wistar雌性大鼠体质量范围180~220 g,共81只,采用随机数字表法分为正常组14只,造模组67只。本研究符合一般实验动物伦理学原则。

1.3 造模方法 正常组:14只,肌注0.9%生理盐水0.05 mL(3次/周);造模组:67只,肌注苯甲酸雌二醇0.06 mL(含药量0.12 mg,3次/周),同时肌注黄体酮0.05 mL(含药量1 mg,1次/周);共16周。造模过程中正常组1只丢失,造模组2只丢失及6只意外死亡,造模结束时正常组共13只,造模组共59只。

1.4 给药方法 造模组59只模型大鼠分为三组:模型组17只,桂枝茯苓组21只,米非司酮组21只。每只模型组大鼠每天灌服0.9%生理盐水2 mL,其他两组每只大鼠每天分别灌服桂枝茯苓流浸膏或米非司酮溶液2 mL,共灌服12周(用量按成人与大鼠等效用量换算而成)。灌胃时间较长,结束时大鼠死亡11只,剩余正常组13只,模型组16只,桂枝茯苓组17只,米非司酮组15只。

1.5 观测指标 大鼠在灌胃第12周时,取大鼠子宫组织放入甲醛溶液中固定,观察大鼠子宫各项指标并用SP法检测各组子宫平滑肌组织的PR,免疫

组化法计算各组PKC的活性。

1.6 免疫组化方法 (1)孕激素受体染色流程:标本切片脱蜡水化→甲醇处理切片→水洗、PBS洗→加血清孵育→PR单抗放置过夜→PBS洗→加入SP复合物孵育→PBS洗→链霉卵白素孵育→PBS洗→DAB-孵育→PBS洗,水洗→Harris苏木素复染→水洗→分化,蓝化,脱水封片。

(2)PKC提取:取大鼠子宫平滑肌细胞→缓冲液孵育15 min→粉碎细胞→离心→上清液为细胞质PKC提取物→沉淀→离心→胞膜PKC提取物(上清液)。

1.7 结果判定 (1)切片中不同高倍视野细胞计数共1 000个,得出阳性率,细胞核中棕黄色颗粒为孕激素受体阳性染色,其中无阳性细胞以(-)表示;阳性染色细胞<25%(+);25%<阳性染色细胞<50%(++),阳性染色细胞>50%(+++)。

(2)将PKC加入到含有组蛋白、 γ -32 P-ATP和磷脂酰丝胺酸的缓冲液中,温浴30 min,30℃,用 γ -闪烁计数仪检测放射性,计算PKC的活性(PKC活性单位:fmol·mg⁻¹·min⁻¹)。

1.8 统计学方法 采用SPSS 22.0软件处理数据。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析+HSD-*q*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠质量、子宫质量及子宫系数差异比较 本实验研究参照相关文献资料^[3-4]改进后建立子宫肌瘤模型。监测模型大鼠质量、子宫质量、子宫系数(即子宫质量/大鼠质量),其结果均明显大于正常组大鼠($P < 0.05$);而用药组大鼠质量、子宫质量、子宫系数低于模型组($P < 0.05$);桂枝茯苓组大鼠质量、子宫质量、子宫系数与米非司酮组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 各组大鼠质量、子宫质量和子宫系数/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	鼠质量/g	子宫质量/mg	子宫系数/%
正常组	13	185.2 ± 19.8	1.43 ± 0.56	0.77 ± 0.12
模型组	16	348.3 ± 50.3 ^a	4.67 ± 1.31 ^a	1.34 ± 0.11 ^a
桂枝茯苓组	17	335.2 ± 46.5 ^{ab}	3.55 ± 0.73 ^{ab}	1.06 ± 0.51 ^b
米非司酮组	15	325.7 ± 30.2 ^{ab}	3.50 ± 0.82 ^{ab}	1.07 ± 0.48 ^b
<i>F</i> 值		50.39	30.74	5.736
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.002

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.2 各组大鼠子宫平滑肌组织中PR阳性率及平滑肌细胞PKC的表达差异比较 模型组大鼠子宫平滑肌组织细胞核中PR的阳性率、细胞膜PKC的活性均极显著高于正常组($P < 0.05$),细胞质PKC的活性低于正常组($P < 0.05$)。

用药后, PR 阳性表达率, 桂枝茯苓组与模型组比较下降极其显著 ($P < 0.05$), 米非司酮组与模型组比较下降显著 ($P < 0.05$), 桂枝茯苓组下降更明显接近正常组水平 ($P > 0.05$)。

PKC 细胞膜的活性表达, 桂枝茯苓组与模型组比较下降极其显著 ($P < 0.05$), 米非司酮组细胞膜的活性下降不明显与模型组相比较多差异无统计学意义, 桂枝茯苓组更接近正常组。

PKC 细胞质的活性表达, 桂枝茯苓组与模型组比较升高明显 ($P < 0.05$), 桂枝茯苓组 PKC 细胞质的活性升高多接近正常组表达; 米非司酮组与模型组比较升高不明显。见表 2。

表2 各组大鼠子宫平滑肌PR阳性率及平滑肌细胞 PKC活性表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	细胞膜/fmol· mg ⁻¹ ·min ⁻¹	细胞质/fmol· mg ⁻¹ ·min ⁻¹	PR 阳性率(给药 后第12周)/%
正常组	13	19.31±3.84	15.43±4.59	28.34±2.4
模型组	16	37.24±7.12 ^a	11.68±4.68 ^a	75.25±4.1 ^a
桂枝茯苓组	17	21.62±5.23 ^b	16.50±2.80 ^b	32.25±2.8 ^b
米非司酮组	15	36.54±6.79 ^a	13.23±3.45 ^b	40.22±3.5 ^b
F 值		37.27	4.90	656.10
P 值		0.000	0.004	0.000

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

目前研究发现, 子宫肌瘤是激素依赖性良性肿瘤, 雌、孕激素在子宫肌瘤的生长中起协同作用, 此外还与子宫平滑肌 PKC 活性密切相关^[4,5]。相关研究表明^[6-7], 子宫肌瘤内 ER 和 PR 的含量高于子宫正常肌组织, 使用促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH- α) 治疗后的子宫肌瘤中 ER 和 PR 的表达均明显下降, 说明肌瘤的生长与雌、孕激素受体有重要联系。Kawaguchi 等^[8]发现雌、孕激素均导致细胞有丝分裂率增加, 与单用雌激素或无激素培养基中培养细胞的相比, 在雌、孕激素培养基中培养的细胞肌丝和致密体显著增多, 增生最活跃。Matsuo 等^[9]发现凋亡抑制基因产物 Bcl-2 蛋白和增生抗原 Ki-67 在肌瘤组织中明显增多, 表明孕激素是通过增强细胞内转录活化作用, 实现提高有丝分裂率, 达到抑制细胞凋亡的目的以促进肌瘤生长。本研究与相关文献报道研究结果一致, 模型组子宫肌瘤平滑肌组织的细胞核中 PR 阳性表达率显著高于正常组。表明局部高 PR 浓度和高孕激素状态可能是子宫肌瘤发生发展的重要机制。桂枝茯苓组与模型组相比, 局部 PR 阳性表达率明显下降, 由于孕激素具有促进肌瘤生长并通过与 PR 结合发挥生

物学效应来降低 PR 含量的作用, 进一步证实了桂枝茯苓胶囊抗增生、抗肌瘤机制。

实体肿瘤微环境中缺氧是其基本特征之一, 细胞在缺氧状态下诱导血管生成、缺氧代谢等密切相关的基因表达是为适应缺氧环境^[10-12], 缺氧刺激子宫平滑肌细胞可以引起其细胞膜和细胞质 PKC 活性的明显改变。细胞质中的 PKC 活性下降, 显示缺氧可激活细胞质中的 PKC 信号传导通路使细胞质中 PKC 活化。PKC 是一种重要的信息传导蛋白, 介导生物信号从细胞膜向细胞核的传递, 构成细胞内重要的信号转导系统, 对细胞分化、增殖和凋亡起重要调节作用^[13-15]。本研究中细胞 PKC 是调节子宫平滑肌细胞收缩、受体结合、细胞增殖分化的信号传递通道的重要物质; 主要以非活性形式存在于细胞质, 当细胞质 PKC 激活时, 会发生质膜转位^[16], 桂枝茯苓胶囊与米非司酮组比较更能显著改善细胞 PKC 活性, 促进平滑肌细胞 PKC 从病理性异常状态恢复到接近正常水平, 而且改善了子宫平滑肌细胞的缺氧状态, 切断子宫平滑肌细胞增殖分化信号传递通道, 从而达到抑制肌瘤的目的。

本研究提示桂枝茯苓胶囊显著下调子宫肌瘤模型大鼠平滑肌细胞 PR、PKC 阳性表达, 改善子宫平滑肌细胞的缺氧状态, 抑制血管生成, 切断子宫平滑肌细胞增殖分化信号传递通道, 是桂枝茯苓胶囊缩瘤、消瘤临床疗效显著的作用机制之一。

参考文献

- [1] 沈铿, 马丁. 妇产科学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 307.
- [2] 施长皋, 季德林, 朱先海, 等. 子宫腺肌瘤与子宫肌瘤的血管影像及栓塞术后并发症比较[J]. 安徽医药, 2016, 20(11): 2071-2073.
- [3] 周清, 杨孝军, 郑飞云. 桂枝茯苓胶囊配伍米非司酮治疗子宫肌瘤的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2013, 16(8): 911-915.
- [4] 鄂姝玉, 魏敏杰, 李智, 等. 蛋白激酶 C 在人子宫平滑肌正常细胞与肌瘤细胞中活性变化的研究[J]. 中国医科大学学报, 2001, 30(3): 176-178.
- [5] 康乐, 谢彦, 庞琴霞, 等. 低氧诱导的内质网应激在子宫肌瘤及子宫平滑肌中的差异表达[J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(36): 6592-6596.
- [6] ZASLAWSKI R, SUROWIAK P, DZIEGIEL P, et al. Analysis of the expression of estrogen and progesterone receptors, and of PCNA and Ki 67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle [J]. Med Sci Monit, 2001, 7(5): 908-913.
- [7] 李弦, 吴晓玲, 周美. 子宫肌瘤患者 IGF-I 和 IGF-II 水平变化与 ER、PR 的关系研究[J]. 河北医药, 2015, 6(19): 2986-2987.
- [8] KAWAGUCHI K, FUJII S, KONISHI I, et al. Ultrastructural study of cultured smooth muscle cells from uterine leiomyoma and myo-

- metrium under the influence of sex steroids [J]. *Gynecol Oncol*, 1985, 21(1): 32-41.
- [9] MATSUO H, KURACHI O, SHIMOMURA Y, et al. Molecular bases for the actions of ovarian sex steroids in the regulation of proliferation and apoptosis of human uterine leiomyoma [J]. *Oncology*, 1999, 57 Suppl 2: 49-58.
- [10] 王月刚, 金春华, 黄海潇, 等. 虎杖苷对缺血缺氧下平滑肌细胞蛋白激酶C的影响[J]. *中国药理学通报*, 2005, 21(4): 461-464.
- [11] 龚晓燕, 保永亮, 黄金玲. 血管内皮生长因子与肿瘤侵袭转移[J]. *安徽医药*, 2013, 17(1): 3-5.
- [12] 李岩, 胡冰. 恶性腹水的抗血管生成治疗进展[J]. *安徽医药*, 2013, 17(4): 541-543.
- [13] 孙桂丽, 王大鹏. 蛋白激酶C在细胞及肿瘤细胞凋亡中的作用[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(7): 1360-1363.
- [14] 丁金丽. 蛋白激酶C-theta (PKC θ) 在GIST尤其是C-KIT阴性的GIST中表达的临床病理意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [15] 刘燕. OTR、PKC β 及CPI-17在子宫腺肌病患者子宫结合带中的表达及意义[D]. 河南: 郑州大学, 2017.
- [16] 张呈艳, 王哲梅, 董建春. 缺氧诱导因子1 α 和VEGF及其受体与妇科恶性肿瘤[J]. *国际妇产科学杂志*, 2011, 38(4): 320-323.
(收稿日期: 2017-06-13, 修回日期: 2019-01-15)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.05.002

◇ 药学研究 ◇

紫草素对荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的抑制作用及机制

武向丽

作者单位: 邯郸市中心医院药学部, 河北 邯郸 056001

摘要: 目的 研究紫草素抑制荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的作用及其机制。方法 通过皮下注射肝癌细胞制备荷肝癌裸小鼠模型; 设模型组, 紫草素低、中、高剂量组和顺铂组, 每组 12 只, 分别隔天一次给予 0.9% 氯化钠溶液, 紫草素 0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg 和顺铂 2 mg/kg, 共给药 6 次。观察动物生存状态和移植瘤组织生长状态, 称量瘤重并计算抑瘤率; HE 染色法进行肿瘤组织形态检查, TUNEL 法进行细胞凋亡检查, 免疫组织化学法观察肿瘤组织凋亡相关蛋白表达。结果 与模型组比较, 紫草素各组裸小鼠食欲和精神状态都明显好转, 瘤体积小、活动度低、硬度低, 移植瘤组织出现片状坏死病变、移植瘤组织细胞凋亡数量明显增多, 凋亡指数显著升高 [(22.93±5.40)、(39.86±8.25)、(60.74±9.61) 比 (2.64±1.09), $P < 0.05$]; 瘤体质量显著减轻 [(1.32±0.21) g、(1.18±0.17) g、(0.83±0.12) g 比 (1.69±0.14) g, $P < 0.05$]、抑瘤率显著升高 [(21.89±3.75)%、(30.18±4.92)%、(50.89±6.43)% 比 (0.00±0.00)%、 $P < 0.01$]; 肿瘤组织中凋亡相关蛋白 [半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase-3)、bcl-2 相关 X 蛋白质 (Bax、bcl-2)] 中的 caspase-3 表达显著上调 [(0.16±0.05)、(0.21±0.04)、(0.27±0.06) 比 (0.05±0.02), $P < 0.05$]、Bax 表达显著上调 [(0.54±0.10)、(0.63±0.15)、(0.81±0.21) 比 (0.29±0.05), $P < 0.01$], 其中紫草素中、高剂量组 bcl-2 显著下调 [(0.37±0.05)、(0.30±0.05) 比 (0.50±0.07), $P < 0.05$], Bax/bcl-2 比值显著升高 [(1.17±0.25)、(1.70±0.39)、(2.71±0.68) 比 (0.59±0.20), $P < 0.05$]。结论 紫草素具有抑制荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的作用, 可能与其调节凋亡相关蛋白表达而促进细胞凋亡、诱导肿瘤组织坏死有关。

关键词: 肝肿瘤; 紫草素; 细胞凋亡; 顺铂; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; bcl-2 相关 X 蛋白质; 小鼠, 裸

The effects and mechanism of *Shikonin* on xenografts growth in liver cancer of nude mice

WU Xiangli

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Shikonin* on the growth of transplanted tumor in nude mice bearing liver cancer and its mechanism. **Methods** The nude mice models bearing liver cancer were made by subcutaneous injection of human liver cell line HepG2, and were treated with *Shikonin* (0.5, 1, 2 mg/kg) and Cisplatin (2 mg/kg), once every two days, for 6 times. The mice' general states and tumor growth conditions were observed, the histopathological changes of tumor tissue was observed by HE staining; the tumor cells apoptosis was detected by TUNEL; the expression of apoptosis-related protein were detected by immunohistochemistry (IHC). **Results** After treated with *Shikonin*, the diet and mental state of nude mice bearing liver cancer were improved, tumor size, activity and hardness decreased; the tumor tissue showed pathological changes such as necrosis, cell shrinkage, the number of apoptotic cells in tumor tissue increased significantly, and the apoptotic index increased significantly [(22.93±5.40), (39.86±8.25), (60.74±9.61) vs. (2.64±1.09), $P < 0.05$]; the tumor weight of *Shikonin* treated groups decreased significantly [(1.32±