

# 消癥煎膏直肠给药诱导大鼠子宫肌瘤细胞凋亡的研究

蒋秋燕 唐玉云 蒋桂秀

(广西中医学院第一附属医院, 广西南宁市园湖路 2 号, 530023)

**摘要** 目的: 观察直肠给药(消癥煎膏)对子宫肌瘤模型鼠肌瘤细胞凋亡的干预作用。方法: SD 雌性大鼠(正常动物对照组除外)参照 Fujii S 法, 造子宫肌瘤模型, 随机分成 5 组, 即动物模型组、消癥煎膏高、中、低剂量组、桂枝茯苓胶囊对照组。放射免疫法测定雌二醇水平, 免疫组化法观察病理形态学的变化以及细胞凋亡基因 Bcl-2 蛋白的表达。结果: 高剂量组消癥煎膏能显著抑制模型大鼠瘤样增生 ( $P < 0.01$ ), 并降低模型大鼠血液中雌激素的水平 ( $P < 0.01$ )。模型组平滑肌 Bcl-2 蛋白阳性点数量明显增多, 阳性信号显著增强, Bcl-2 表达明显增多 ( $P < 0.01$ )。结论: 消癥煎膏具有诱导子宫肌瘤细胞凋亡的作用, 能降低子宫肌瘤模型鼠细胞凋亡蛋白 Bcl-2 阳性表达, 抑制子宫肌瘤细胞增殖, 缩小子宫肌瘤。

**关键词** 子宫肌瘤 中医药疗法; @ 消癥煎膏

## Study on Hysteromyoma Apoptosis Induced by Mass-Clearing Extraction per Rectum

Jiang Qiuyan, Tang Yuyun, Jiang Guixiu

(First Affiliated Hospital, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning Guangxi Province, 530023)

**Abstract Objective** To observe the intervention of Mass-Clearing Extraction (per rectum) on hysteromyoma apoptosis of rat model. **Methods** hysteromyoma models were established on SD female rats according to Fujii S method, and randomly divided to 5 groups, i.e. The model group, high-dosage, middle-level dosage, low-dosage group of the extraction, the control group (administered on Guizhi Fuling Jiaonang, Cinnamon Twig and Poria Capsule). Estradiol levels were detected by radioimmunity method, pathomorphological changes and expression of Bcl-2, a gene of apoptosis were observed by immunohistochemistry methods. **Results** high dosage of the extraction can inhibit tumor related accretion ( $P < 0.01$ ), and bring down estrin level ( $P < 0.01$ ). In the model group there were increased counting of positive cell of Bcl-2, intensified positive signal and more expression of Bcl-2 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Mass-Clearing Extraction can diminish hysteromyoma by inducing apoptosis of hysteromyoma, reducing Bcl-2 positive expression and inhibit hysteromyoma accretion.

**Key Words** Hysteromyoma/ Chinese Medical Therapy @ Mass-Clearing Extraction

子宫肌瘤是由子宫平滑肌组织或子宫肌层血管壁平滑肌组织增生而形成的子宫良性肿瘤。消癥煎膏是临床长期使用的中医验方, 本研究旨在探讨其在抑制瘤样增生、降低雌激素水平和促进肌瘤细胞凋亡中的作用, 以期为临床应用提供客观的实验依据。

## 1 实验材料

1.1 实验动物 大鼠, SD 品系, 雌性, 由广西医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验药物 消癥煎膏: 由南宁允上科技开发公司(南宁市批示的工程技术研究中心)提供。消癥煎膏由桃仁、红花、水蛭组成, 加水浓煎成 1.32g/ml 备用。桂枝茯苓胶囊: 0.31g/粒, 用 2% 的羧甲基纤维素钠(CMC)配成悬浮液备用, 浓度为 0.18g/ml。雌二醇注射液: 上海通用药业有限公司, 批号: 060601, 2mg/ml。黄体酮注射液: 天津金耀氨基酸有限公司, 批号: 0605021, 20mg/ml。Bcl-2 抗体: 由北京中彬生物技术有限公司提供。Max VisionTM 试剂盒: 由福建迈新生物技术有限公司提供。甲醛: 北京化工厂, 批号: 20061023。二甲苯: 北京化工厂, 批号: 20061042。石

蜡: 上海华灵器械厂, 批号: 20060129。中性树脂: 上海标本模型厂, 批号: 20060527。

1.3 主要仪器设备 微电脑放射免疫  $\gamma$  计数器 SN-682/250 型; 离心机由美国生产, 型号: J-6B; 切片机由德国 Leitz 生产; 自动染色机由日本 Sakura 生产; 光学显微镜由日本 Olympus 生产; 自动照相生物显微镜由日本 Olympus 生产, 型号 BH-2。

## 2 实验方法

2.1 动物分组 66 只一级雌性 SD 大鼠, 3 月龄, 体重 270-310g 随机分成两组, 空白组 11 只, 造模组 55 只。

2.2 造模方法 正常对照组 11 只, 1 周 3 次肌注 0.9% 生理盐水 0.05ml。造模组 55 只, 给予子宫肌瘤模型的复制, 参照 Fujii S<sup>[1]</sup> 法每周一、三、五肌肉注射苯甲酸雌二醇 0.05mg/100g 连续 3 个月, 第 4 个月开始除每周 3 次肌肉注射苯甲酸雌二醇外, 每周 2 次肌肉注射黄体酮 0.5mg/100g 连续 1 个月。每周称取体重 1 次, 并根据体重调整造模激素用量。

造模周期满 4 个月时随机抽取造模鼠 5 只及 1 只

正常鼠,断头处死,剖腹摘取子宫行病理切片检查。镜下所见:正常鼠:子宫肌层无增厚,平滑肌束无增粗,平滑肌细胞无增多。细胞大小均匀,组织结构正常。造模鼠:大部分子宫肌层明显增厚,平滑肌束明显增粗,部分区域肌纤维排列紊乱,出现穿插现象,有的呈漩涡状结构,失去正常子宫平滑肌层次,肌束间有增多的肌纤维,被伊红染成粉色。平滑肌细胞增多,细胞大小不均匀,核浓染。似子宫肌瘤形态改变。证实造模成功。

2.3 给药方法 造模成功后,将剩余 50只造模大鼠随机分成消癥煎膏高剂量组、中剂量组、低剂量组以及模型对照组、阳性药物对照组(桂枝茯苓胶囊组),平均每组 10只。空白组与模型对照组每只每天灌服 0.9%生理盐水 0.5ml 阳性对照组给桂枝茯苓胶囊 1.2g/kg(约相当于 60kg成人常规用量的 25倍)。消癥煎膏 3组动物每周定期称体重 1次,并按体重计算药量给药:高剂量组:予消癥煎膏,按 1.632ml/kg/d(相当于成人用量的 30倍),肛门给药,每日 1次。中剂量组:予消癥煎膏,按 0.816ml/kg/d(相当于成人用量的 15倍),肛门给药,每日 1次。低剂量组:予消癥煎膏,按 0.4ml/kg/d(相当于成人用量的 7.5倍),肛门给药,每日 1次。

给药方法:给药前轻轻按摩并挤压动物肛门周围,促使排除直肠内积存的粪便,然后用特制注射器(医用注射器连接小段输液管)将药物注入大鼠直肠约 2-3cm。给药后观察 30min 内有无药物排出,如有排出,按相应比例补给药物。持续给药 1个月。

2.4 观测指标 所有大鼠最后一次给药 24h 后,称重,腹主动脉取血后处死大鼠,离心取血清,用放射免疫法测定大鼠血清雌激素水平。并剖腹观察子宫体各项指标及组织形态学变化,测子宫脏器系数:用扭力天平称子宫重量,以子宫重量(g)/100g·体重,计算脏器系数。根据子宫形态与重量的变化反映瘤样增生情况。并用免疫组化法观测各组子宫平滑肌组织凋亡细胞形态学情况及抑制细胞凋亡基因 Bcl-2 表达情况,实验操作按 Max Vision™ 试剂盒说明书进行。

2.5 细胞凋亡形态学观察 1)取子宫分角根部组织,经固定后,常规石蜡包埋,4μm 切片;2)切片用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗处理:二甲苯(I) 5min → 二甲苯(II) 5min → 100%乙醇 2min → 95%的乙醇 1min → 80%乙醇 1min → 75%乙醇 1min → 蒸馏水洗 2min;3)苏木素染色 5min,自来水冲洗;4)盐酸乙醇分化 30s;5)自来水浸泡 15min;6)置伊红液 2min;7)常规脱水,透明,封片:95%乙醇(I) 1min → 95%乙醇(II) 1min → 100%乙醇(I) 1min → 100%乙醇(II) 1min → 二甲苯石

碳酸(3:1) 1min → 二甲苯(I) 1min → 二甲苯(II) 1min 中性树胶封片;8)光学显微镜观察。

2.6 凋亡基因 Bcl-2 表达免疫组化方法 1)切片常规脱蜡至水:二甲苯脱蜡,10min × 3次;100%乙醇(I) → 100%乙醇(II) → 95%乙醇 → 80%乙醇,依次水化各 5min,用 PBS(pH 7.4)冲洗 3次,每次 3min;2)用柠檬酸液对组织进行高压抗原修复;3)每张切片加 50μl 蒸馏水新鲜配置的 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下孵育 10min 以灭活内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 3次,每次 3min;4)每张片滴加 50μl 的 Bcl-2 抗体,4℃过夜, PBS 洗涤 3次,每次 3-5min;5)每张片滴加 50μl Max Vision™ 试剂,室温下孵育 15min, PBS 冲洗 3次,每次 3min;6)DAB 显色:每张片加 100μl 新鲜配置的 DAB 溶液(取 1ml 蒸馏水,加试剂盒中 A、B、C 试剂各 1滴,混匀)。室温显色,镜下控制反应时间,3-5min 左右;7)自来水洗,苏木素复染,自来水洗返蓝,1min × 3次;8)梯度酒精脱水(80%乙醇 → 90%乙醇 → 100%乙醇(I) → 100%乙醇(II),上行脱水各 3min),二甲苯透明,3min × 3次,中性树胶封片。镜下观察其 Bcl-2 蛋白阳性显色。

2.7 结果判定 Bcl-2 阳性显色为细胞浆内出现棕黄色的颗粒,未着色为阴性细胞。根据 Fromwitz<sup>[2]</sup> 综合计分法(综合阳性细胞所占比例和染色强度)进行半定量判定。按显色有无分为四个等级:阴性(-):无阳性细胞;弱阳性(+):阳性细胞 < 25%,显色淡;中等阳性(++):阳性细胞 > 25% 但 < 50%,显色深;强阳性(+++):阳性细胞 > 50%,显色深。

2.8 统计学处理 所有数据皆输入计算机用 SPSS for windows 10 版本软件进行统计分析,计量资料结果以均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $P < 0.05$  认为差异有显著性意义。

### 3 实验结果与分析

3.1 动物死亡情况 造模后第一、二天个别明显倦怠,活动减少,精神欠佳。第三天开始恢复,未发现动物死亡,体重均有增长。

3.2 各组大鼠脏器系数 见表 1。模型组与空白组相比,子宫的脏器系数增加,差异有显著性意义, $P < 0.05$  说明造模成功;各给药组与模型组相比,子宫脏器系数均减小,差异有显著性意义, $P < 0.05$ ,实验结果显示,消癥煎膏直肠给药对雌孕激素造模大鼠的子宫增生有抑制作用。

3.3 各组大鼠血清雌激素水平的测定结果 见表 2。血清雌二醇浓度,与空白对照组相比,模型对照组血清雌激素水平明显升高,有极显著的差异性, $P < 0.01$ ,消癥煎膏高、中、低剂量组及桂枝茯苓胶囊组与模型对照

组比较:  $E_2$  水平明显低于模型组, 差异有显著性意义,  $P < 0.01$ 。从以上实验结果看出, 消癥煎膏高、中、低剂量组和桂枝茯苓胶囊组均能降低血清雌激素水平, 但消癥煎膏高剂量组效果明显, 基本达到正常水平, 且优于桂枝茯苓胶囊组。说明消癥煎膏直肠给药对雌孕激素造模大鼠的子宫增生有抑制作用。提示消癥煎膏对子宫肌瘤有预防及治疗作用, 直肠给药是一种有效的给药方式。

表 1 大鼠脏器系数: 子宫(子宫湿重/体重  $\times 100$ ) ( $x \pm s$ )

| 组别      | 子宫重 (g)         | 体重 (g)           | 子宫系数 ( $g \cdot kg^{-1}$ )   |
|---------|-----------------|------------------|------------------------------|
| 空白组     | 0.66 $\pm$ 0.02 | 297.2 $\pm$ 6.06 | 2.22 $\pm$ 0.04              |
| 模型组     | 1.02 $\pm$ 0.07 | 267.8 $\pm$ 3.27 | 3.80 $\pm$ 0.22 <sup>△</sup> |
| 高剂量组    | 0.68 $\pm$ 0.02 | 281.0 $\pm$ 1.58 | 2.43 $\pm$ 0.06 <sup>△</sup> |
| 中剂量组    | 0.82 $\pm$ 0.05 | 272.2 $\pm$ 1.30 | 2.99 $\pm$ 0.17 <sup>△</sup> |
| 低剂量组    | 0.88 $\pm$ 0.03 | 267.6 $\pm$ 2.07 | 3.29 $\pm$ 0.10 <sup>△</sup> |
| 桂枝茯苓胶囊组 | 0.71 $\pm$ 0.03 | 262.8 $\pm$ 1.64 | 2.71 $\pm$ 0.10 <sup>△</sup> |

注: 模型对照组与空白组比较, <sup>△</sup>  $P < 0.05$  用药组与模型对照组比较, \*  $P < 0.05$

表 2 消癥煎膏对子宫肌瘤模型鼠血清雌激素的影响 ( $x \pm s$ )

| 组别      | 例数 | $E_2$ (pg/ml)                   |
|---------|----|---------------------------------|
| 空白对照组   | 10 | 236.8 $\pm$ 36.87               |
| 模型对照组   | 10 | 963.4 $\pm$ 266.73 <sup>△</sup> |
| 桂枝茯苓胶囊组 | 10 | 400.0 $\pm$ 93.58 <sup>△</sup>  |
| 高剂量组    | 10 | 279.3 $\pm$ 55.10 <sup>*</sup>  |
| 中剂量组    | 10 | 508.6 $\pm$ 103.05 <sup>△</sup> |
| 低剂量组    | 10 | 731.2 $\pm$ 141.48 <sup>△</sup> |

模型对照组与空白组相比, <sup>△</sup>  $P < 0.01$ ; 用药组与模型组对照组相比, \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

3.4 细胞凋亡形态学观察 大鼠子宫肌瘤模型, 子宫平滑肌层未见凋亡细胞, 子宫内膜偶尔可见散在分布的凋亡细胞; 中药消癥煎膏高剂量组出现明显凋亡细胞, 表现为细胞核蓝黑色, 细胞浆淡红色, 核染色质致密浓缩、碎裂等。

3.5 凋亡基因 Bcl-2 表达的测定 大鼠子宫组织免疫组化显色结果, 经图像分析系统观察, 阴性片子无棕黄色颗粒, 滴加抗体的片子均有棕黄色颗粒, 即 Bcl-2 蛋白在消癥煎膏高、中、低剂量组、模型组及桂枝茯苓胶囊组均呈阳性显色。棕黄色颗粒主要出现于细胞浆, 散在于子宫环行平滑肌, 内膜及浆膜未见。利用软件分析系统的统计结果显示, 与空白组相比, 模型组平滑肌 Bcl-2 蛋白阳性点数量明显增多, 阳性信号显著增强, Bcl-2 表达明显增多 ( $P < 0.01$ ); 各用药组与模型对照组相比, Bcl-2 蛋白阳性点数量明显减少, 阳性信号显著减弱, 尤其以消癥煎膏高剂量组明显。结果见表 3。空白组 Bcl-2 蛋白表达不明显, 模型对照组 Bcl-2 蛋白呈明显高表达, 给药组高、中低剂量及桂枝茯苓胶囊组 Bcl-2 蛋白表达较模型组明显减弱, 显示可不同程

度的下调凋亡调控基因 Bcl-2 的表达, 尤以消癥煎膏高剂量组为甚。说明通过直肠给中药消癥煎膏能诱导子宫肌瘤细胞凋亡。

表 3 各组大鼠子宫中 Bcl-2 表达 ( $x \pm s$ )

| 组别      | 例数 (n) | Bcl-2 蛋白的表达 |   |    |     |
|---------|--------|-------------|---|----|-----|
|         |        | -           | + | ++ | +++ |
| 空白组     | 10     | 2           | 8 | 0  | 0   |
| 模型组     | 10     | 0           | 0 | 0  | 10  |
| 高剂量组    | 10     | 0           | 8 | 2  | 0   |
| 中剂量组    | 10     | 0           | 6 | 2  | 2   |
| 低剂量组    | 10     | 0           | 4 | 3  | 3   |
| 桂枝茯苓胶囊组 | 10     | 0           | 7 | 2  | 1   |

## 4 讨论

子宫肌瘤归属中医“癥瘕”范畴, 为触之可及的有形癥块, 结合其临床症状多有月经血块较多, 伴有腹痛, 舌质紫暗或舌有瘀点瘀斑, 故本病当属血瘀。Maurro<sup>[3]</sup> 等发现 Bcl-2 在肌瘤细胞中的含量高于正常子宫肌细胞。由此推测, 子宫肌瘤组织中 Bcl-2 的升高与子宫肌瘤的细胞凋亡密切相关<sup>[1-3]</sup>。Bcl-2 表达越高, 肌瘤越增长, 反之, Bcl-2 表达越低, 肌瘤越小。本实验发现, 模型组大鼠子宫肌瘤组织中 Bcl-2 的表达明显高于空白对照组, 其差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。表明 Bcl-2 的高表达能抑制子宫肌瘤细胞凋亡, 可促进子宫肌瘤形成。Bcl-2 作为细胞凋亡抑制因子, 抑制子宫肌瘤细胞凋亡, 介导子宫肌瘤的发生和发展。本实验发现, 模型组大鼠出现明显的子宫肌瘤改变, 且子宫肌瘤病灶内有大量 Bcl-2 颗粒表达, 而正常组和中药治疗组无明显子宫肌瘤, 且 Bcl-2 在正常组少见, 在治疗组也较模型组明显减少, 再一次证明了子宫肌瘤的发生和发展的过程中存在着细胞凋亡。而凋亡调控基因 Bcl-2 正是介导细胞凋亡的增殖的细胞因子, 从而为 Bcl-2 在子宫肌瘤中水平的提高提供了依据。实验结果显示消癥煎膏对子宫肌瘤大鼠 Bcl-2 基因表达具有降调节作用, 且以高剂量组效果明显, 能使 Bcl-2 水平表达接近正常组。

## 参考文献

- [1] Fujii S, Nakashima N, Okamura H, et al. Profetone induced smooth muscle like cells in the subperitoneal modules produced by dihydrogen. Experimental approach to leiomyomas is pvtorelis disseminate. Am J Obstet Gynecol 1981; 139(2): 164-172
- [2] Fumwicz FB, Vial MV, Chao S, et al. Ras P21 expression in the progression of breast cancer. Hum Pathol 1987; 18(12): 1268-1275
- [3] 英焕春, 吕靖, 曲陆荣. 子宫肌瘤与细胞凋亡的研究. 中国医科大学学报, 2005; 34(1): 74-75.
- [4] Adams M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 1998; 281(5381): 1322
- [5] Mauro Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol 1994; 124: 1-6

(2007-09-05 收稿)