

疏肝益肾方剂对小鼠子宫内膜癌 移植瘤的影响及其机制的研究

范秀华¹, 卢雯平^{2*}, 李晓¹, 李向英², 胡建秀¹, 李爱民¹

(1. 河北医科大学第二医院妇产科, 石家庄 050017;

2. 中国医学科学院广安门医院肿瘤科, 北京 100053)

[摘要] 目的: 以顺铂为对照药, 研究中药疏肝益肾方剂对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的小鼠模型的抑瘤效果。方法: 用免疫组织化学方法检测对照组、中药组、顺铂组和联合组小鼠荷瘤标本中 ER_α, ER_β 及 PR 的表达。结果: ER_α 蛋白在对照组表达最高, 依次为顺铂组、中药组、联合组, ER_β 蛋白在中药组表达最高, 依次为联合组、对照组、顺铂组, PR 蛋白在联合组表达最高, 依次为中药组、顺铂组、对照组。结论: 疏肝益肾方剂对子宫内膜癌有一定的抑制作用, 但更重要的是联合使用化疗药物后既可以取得好的抑瘤效果, 又针对性的对 ER_α 起到抑制作用, 提高 PR 的表达, 并且几乎不影响 ER_β 的表达。故该方剂联合常规化疗药后可以克服常规化疗药物对雌激素的抑制作用。

[关键词] 子宫内膜癌; 雌激素受体亚型; 孕激素受体; 中药疏肝益肾方剂; 顺铂; Ishikawa 细胞; 动物模型

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0175-04

Shuganyishen's Effect on Transplantable Endometrial Carcinoma in Mice and its Mechanism

FAN Xiu-hua¹, LU Wen-ping^{2*}, LI Xiao¹, LI Xiang-ying², HU Jian-xiu¹, LI Ai-min¹

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, the Second Hospital of Hebei Medical University,

Shijiazhuang 050017, China; 2. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical

Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** Compared with cisplatin, study on the inhibitory effect of shuganyishen on Ishikawa cells on mouse model. **Method:** Immunohistochemical method was used to detect the expressions of ER_α, ER_β and PR in the transplantable endometrial carcinoma of mice in control group, shuganyishen group, cisplatin group and shuganyishen-cisplatin group. **Result:** ER_α protein expressed highest in control group, and in cisplatin group, shuganyishen group and shuganyishen-cisplatin group in order. ER_β protein expressed highest in shuganyishen group, and in shuganyishen-cisplatin group, control group and cisplatin group in order. PR protein expressed highest in shuganyishen-cisplatin group, and in shuganyishen group, cisplatin group and control group in order. **Conclusion:** Shuganyishen has a certain effect on inhibiting endometrial carcinoma. Furthermore, shuganyishen combined with conventional chemotherapy is good to inhibit tumor and ER_α and improve the expression of PR, without affecting ER_β. So the combined prescription can solve the problem of estrogen inhibition caused by using chemotherapy alone.

[Key words] endometrial carcinoma; estrogen receptor subtypes; progesterone receptor; the traditional Chinese drugs Shuganyishen; Ishikawa cells; cisplatin; animal model

[收稿日期] 20100523(003)

[第一作者] 范秀华, 博士, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤的研究, Tel: 15130098086, E-mail: fanxiuhua6666@163.com

[通讯作者] * 卢雯平, 博士, 副主任医师, Tel: 010-88001016, E-mail: lu-wenping@sina.com

子宫内膜癌是原发于子宫内膜的一组上皮性恶性肿瘤, 发病率占女性生殖器恶性肿瘤的第二位, 目前对于早期子宫内膜癌以手术治疗为主, 治愈率达 70%; 但对于晚期和复发性的子宫内膜癌以激素及化疗等姑息治疗为主^[1], 然而, 目前对化疗或是姑息治疗带来的副作用无好的对策。疏肝益肾方, 其主要成分为黄芪、白术、山药、三棱、莪术、海藻、女贞子、枸杞子、泡穿山甲、花粉、全蝎、甘草等。本方已被证实在多种恶性肿瘤如肝癌、乳腺癌、子宫内膜癌的化疗辅助治疗中效果良好, 但其药用机制尚不明确, 本文就疏肝益肾方剂对子宫内膜癌细胞 Ishikawa 的 BABL/C 小鼠移植瘤的作用机制进行了初步探索。

1 材料与方剂

1.1 来源 疏肝益肾方: 由北京广安门肿瘤医院提供; Ishikawa 细胞: 购自河北医科大学第四医院实验中心; BABL/C 小鼠(4~6 周龄): 购自河北医科大学实验动物中心(合格证号 910079); 兔抗人 ER 多克隆抗体、兔抗人 ER 多克隆抗体、兔抗人 PR 多克隆抗体、生物素化二抗(山羊抗兔)及辣根过氧化物酶标记链酶卵白素: 北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 小鼠模型建立 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞于 1640(含 10% FBS) 培养基中培养并传代, 取生长良好的细胞经胰酶消化后, 用计数板计数, 将细胞密度调整至 5×10^7 个/0.2 mL。取 50 只 BABL/C 小鼠, 将 5×10^7 个(0.2 mL) Ishikawa 细胞接种于每只小鼠背部皮下, 接种 8 d 后开始抑瘤试验。

1.3 抑瘤试验 将造模成功荷瘤小鼠随机分成 4 组, 每组 10 只: 生理盐水组(对照组) 10 只, 腹腔注射生理盐水 0.2 mL/只, 每天 1 次, 连续 15 d; 中药组 10 只, 给予疏肝益肾方 0.2 mL/只灌胃, 每天 2 次, 连续 15 d; 顺铂组 10 只, 给予顺铂腹腔注射 0.2 mL/只(按照 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药), 每天 1 次, 连续 15 d; 顺铂与疏肝益肾方联合用药组, 给予疏肝益肾方 0.2 mL/只灌胃, 每天 2 次, 并给予顺铂腹腔注射 0.2 mL/只(按照 $2 \text{ mg}/\text{kg}$ 给药), 每天 1 次, 连续 15 d。观察各组小鼠的生存质量情况, 每 3 d 称取体重 1 次并用游标卡尺测量肿瘤长径(L)和短径(W), 并按肿瘤体积计算公式 $V = L \cdot W^2 / 2$ 计算肿瘤体积。描绘肿瘤生长曲线, 称量瘤重, 计算抑瘤率(IR) [肿瘤抑制率 = (生理盐水组肿瘤重量 - 实验组肿瘤重量) / 生理盐

水组肿瘤重量 $\times 100$ H]^[2]。

1.4 免疫组织化学检测 ER, ER, PR 首先进行肿瘤大体观察, 用剪刀将小鼠肿瘤部皮肤切开, 将皮剥离, 切开肿瘤, 观察其内部颜色、质地、有无坏死区。将肿瘤组织用 4% 中性甲醛固定液固定, 石蜡包埋, 切片, 苏木精 C 伊红(HE) 染色, 光镜观察组织形态学改变, 免疫组化 SP 法测定 ER, ER, PR。

1.5 结果判定 细胞内有棕黄色粗颗粒分布或棕黄色细腻颗粒弥漫分布者为阳性反应, 观察棕黄色颗粒染色深浅及染色范围, 判断 ER, ER, PR 表达情况。采用麦克奥迪数码医学图象分析系统对免疫组织化学结果进行定量分析。

1.6 数据分析 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用多样本均数比较的方差分析及两两比较的 LSD- t 检验, 数据分析采用 SPSS 14.0 统计软件完成, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组药物对小鼠皮下移植瘤生长体积的影响

接种后 1-8 d, 移植瘤生长基本相同; 9-17 d, 生理盐水组移植瘤生长明显快于其他组, 联合用药组肿瘤生长最慢; 17-23 d, 生理盐水组移植瘤继续长大, 而其余 3 组移植瘤开始变小, 其中又以联合组移植瘤变小最明显(图 1)。

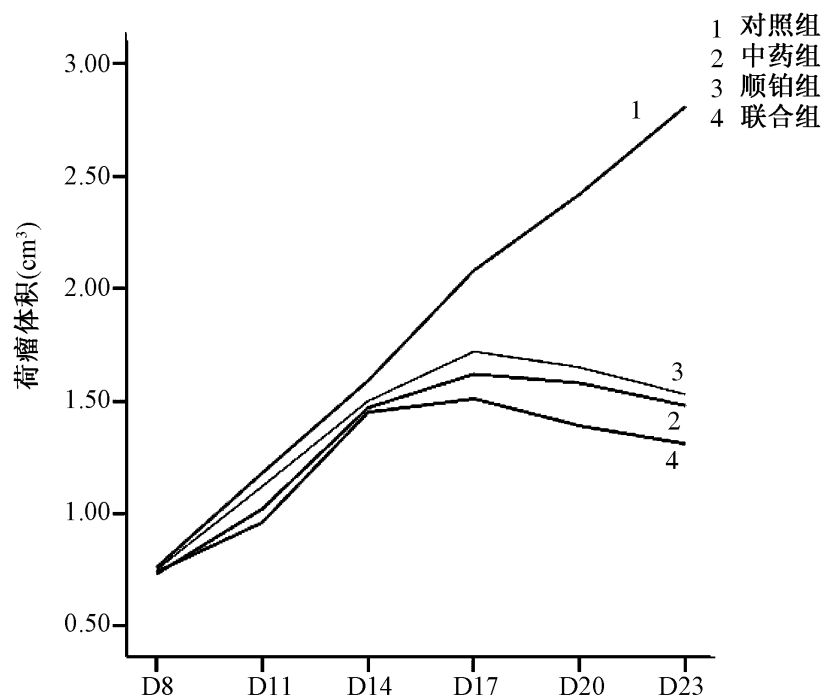


图 1 接种后小鼠肿瘤生长曲线

2.2 各组药物对小鼠皮下移植瘤瘤重的影响 各用药组对移植瘤生长均有抑制作用, 以联合用药组最为明显。实验结束后, 称取各组移植瘤瘤重, 各用药组瘤重均低于生理盐水组 ($P < 0.05$), 但各用药组间瘤重差异无统计学意义; 联合用药组抑瘤率最

高,其次为中药组、顺铂组,但 3 组间抑瘤率差异无统计学意义(表 1)。

表 1 小鼠移植瘤重和抑瘤率

组别	移植瘤重 /g	抑瘤率 /%
对照	3.40 ±0.06	-
中药	2.08 ±0.16	45.83
顺铂	2.12 ±0.13	44.79
联合	1.98 ±0.21	48.45

2.3 免疫组织化学染色结果 光镜下可见瘤细胞弥漫分布,核大深染,核圆形、卵圆形、或不规则形,核染色质不均匀,胞浆少,偶见核仁,可见病理核分裂。细胞内有棕黄色粗颗粒分布或棕黄色细腻颗粒弥漫分布者为阳性反应,观察棕黄色颗粒染色深浅及染色范围,判断 ER, ER, PR 表达情况。ER 和 ER 阳性表达于细胞核和细胞浆,PR 阳性表达于细胞浆。采用麦克奥迪数码医学图象分析系统对免疫组织化学结果进行定量分析(表 2)。

表 2 免疫组化法检测 ER, ER, 和 PR 蛋白的表达

分组	ER	ER	PR
对照	0.324 ±0.004	0.065 ±0.003	0.095 ±0.009
中药	0.117 ±0.008 ¹⁾	0.108 ±0.007 ¹⁾	0.208 ±0.005 ¹⁾
顺铂	0.187 ±0.002 ¹⁾	0.053 ±0.005	0.101 ±0.003
联合	0.098 ±0.007 ¹⁾	0.073 ±0.009	0.319 ±0.004 ¹⁾

注:与对照组比较,¹⁾ P < 0.01。

3 讨论

子宫内膜癌是常见的妇女生殖道 3 大恶性肿瘤之一,近年来,随着生活水平的提高,肥胖、糖尿病和高血压发病率的上升,以及不合理的激素替代治疗,子宫内膜癌的发病率明显上升^[3]。现阶段子宫内膜癌的治疗是以手术为主、放疗和化疗为辅的综合治疗,最常用的化疗方案为 PAC,即顺铂、阿霉素和环磷酰胺,有效率为 50% ~60%,但复发率为 19% ~20%^[4]。为进一步研究人子宫内膜癌生物学治疗和客观评价治疗手段的效果,需要一个合适的实验动物模型。本试验通过建立人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞小鼠皮下移植瘤模型,模拟人体子宫内膜癌的生长环境,符合人体子宫内膜癌的生物学特点,可以作为探索人子宫内膜癌中药治疗及生物治疗和客观评价治疗手段效果的合适的动物模型。

本试验进行了中药疏肝益肾方治疗子宫内膜癌小鼠移植瘤的研究,并与顺铂进行比较。从各组小鼠肿瘤的生长曲线可以看出,从开始治疗的第 8 d

起,与对照组相比,各治疗组的肿瘤生长均受到不同程度的限制,其中以联合用药组的肿瘤生长最缓慢,其抑瘤率为 48.45%,高于顺铂组的 44.79%,说明中药疏肝益肾方联合顺铂用药的疗效好于单独顺铂用药。中医认为,子宫内膜癌主要是痰浊湿热瘀毒,蕴结胞宫,阻塞经脉,损伤冲任,日久成积,暗耗气血,败损脏腑造成^[5],疏肝益肾方,黄芪为君,臣以全蝎、三棱、莪术、海藻,佐用白术、天花粉、山药、枸杞子、女贞子,使药为甘草,本方攻补兼施,以补为主,以攻为辅,该方既对肿瘤有一定的调理作用,亦可以提高机体免疫力。在本试验过程中,联合用药组小鼠一般状态最好,其次为中药组,而顺铂组和对照组小鼠生长状态较差,

提示中药疏肝益肾方剂可能在一定程度上改善常规化疗药物顺铂的一些毒副作用。

有研究发现,ER 具有促进子宫内膜癌发病作用,ER 具有抑制细胞增殖的作用,并对 ER 具有抑制作用,对人体起保护作用^[6-8]。因此,不同雌激素受体亚型在子宫内膜癌的发生中发挥的作用可能不同^[9]。

本试验利用免疫组织化学方法对 4 组小鼠荷瘤标本进行了 ER, ER 及 PR 的检测。结果发现,ER 在对照组中表达最高,依次为顺铂组、中药组、联合组,提示 ER 可能在子宫内膜癌的发生发展中起着一定的促进作用。ER 在中药组表达最高,其次为对照组和联合组,在顺铂组中表达最低,提示疏肝益肾方剂可能轻微增加了子宫内膜癌中 ER 的表达;而疏肝益肾方剂协同顺铂对子宫内膜癌起到抑制作用的同时,几乎不影响 ER 的表达;单独应用顺铂却显著降低了子宫内膜癌中 ER 的表达。说明 ER 可能在子宫内膜癌的发生发展过程中起着一定的抑制作用。PR 蛋白在联合组表达最高,依次为中药组、顺铂组、对照组,提示 PR 可能在子宫内膜癌的发生发展中起着一定的抑制作用。

本研究通过观察中药疏肝益肾方剂以及常规化疗药顺铂对子宫内膜癌小鼠移植瘤的治疗作用,发现联合用药组的抑瘤率高于顺铂用药组,且联合组小鼠生长状态最好,选择合适的中药方剂能够协同化疗药物对肿瘤的抑制,减轻耐药及副作用,提示在临床上对于应用传统的 PAC 化疗方案疗效不理想、或化疗后复发的子宫内膜癌患者,可以辅以中药疏肝益肾方剂。

[参考文献]

- [1] Kuiper G G, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 5925.
- [2] Okuno S, Harada M, Kim K, et al. Complete regression of xenografted human carcinoma by camptothecin analogue carboxymethyl dextran conjugate (To128) [J]. Cancer Res, 2000, 60(1): 2988.
- [3] 高春英, 于伟, 郭盛菊. 子宫内膜腺癌治疗的新进展 [J]. 中国妇幼保健, 2005, 20(9): 1155.
- [4] Hirai M, Hirano M, Oosaki T, et al. Adjuvant chemotherapy in stage uterine endometrial carcinoma [J]. Int Gynecol Obstet, 2002, 78:37.
- [5] 彭炳先, 周欣, 石京山. 姜黄素类化合物的分离及其抗肝癌和子宫内膜腺癌的研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18: 95.
- [6] Saegusa M, Okaysau I. Changes in estrogen receptor alpha and beta in relation to progesterone receptor and status in normal and malignant endometrium [J]. Jap J Cancer Res, 2000, 9(5): 510.
- [7] Duffy D M, Chaffin C L, Stouffer R L, et al. Expression of estrogen receptor and in the rhesus monkey corpus luteum during the menstrual cycle: regulation by luteinizing hormone and progesterone [J]. Endocrinology, 2000, 141(6): 1711.
- [8] Paech K, Webb P, Kuiper G G, et al. Differential ligand activation of estrogen receptor ER alpha and ER beta at AP1 sites [J]. Science, 1997, 277: 1508.
- [9] Evinger A. J. Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function [J]. Steroids, 2005, 70: 361.

[责任编辑 邹晓翠]