

桃红消癥散对子宫肌瘤模型大鼠雌、孕激素受体表达的影响

李明真^{1*}, 王迪生²

(1. 蚌埠医学院药理学系, 安徽 蚌埠 233040; 2. 蚌埠医学院第二附属医院药剂科, 安徽 蚌埠 233040)

[摘要] 目的: 研究桃红消癥散对子宫肌瘤模型大鼠雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的影响。方法: 采用雌孕激素负荷法建立大鼠子宫肌瘤动物模型, 通过放免法检测血清雌孕激素水平, 观察子宫组织病理改变, 免疫组化法观察大鼠子宫平滑肌细胞 ER、PR 及 PCNA 的表达。结果: 模型大鼠较正常大鼠子宫明显增大, 血清性激素水平升高, 子宫平滑肌细胞 ER、PR 及 PCNA 的表达明显高于正常大鼠。与模型对照组比较, 桃红消癥散可降低血清性激素水平, 改善子宫组织结构, 抑制平滑肌细胞 ER、PR 及 PCNA 的表达。结论: 桃红消癥散有治疗子宫肌瘤的作用, 其机制可能与调节血中雌孕激素水平, 抑制子宫平滑肌细胞 ER、PR 及 PCNA 的表达有关。

[关键词] 桃红消癥散; 子宫肌瘤; 雌激素; 孕激素; 雌激素受体; 孕激素受体; 增殖细胞核抗原

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)12-0090-04

Effect of Taohongxiaozheng Powder on the Expression of Estrogen Receptor and Progesterone Receptor in the Rat of Uterine Leiomyoma

LI Ming-zhen^{1*}, WANG Di-sheng²

(1. Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu 233040, China;

2. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233040, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Taohongxiaozheng(THXZ) Powder on the expression of ER, PR and PCNA in the Rat Model of uterine leiomyoma. **Methods:** The rat model of uterine leiomyoma was established by the method of estrogen and progesterone load. The radioimmuno assay was used to detect the level of serum estrogen and progesterone, the pathological changes in the uterus were observed, and the expression of ER, PR and PCNA of smooth muscle cells were detected by immunohistochemistry technique. **Results:** The level of serum sex hormone and the expression of ER, PR and PCNA in the model group increased obviously compared with normal group. Comparing with the model group, THXZ Powder could decrease the level of serum sex hormone, improve the organizational structure of the uterus, inhibit the expression of ER, PR and PCNA of smooth muscle cells. **Conclusion:** The results suggest that THXZ Powder have therapeutic effects of uterine fibroids, which may be related to the regulation of sex hormone and the inhibition of the expression of ER, PR and PCNA of smooth muscle cells.

[Key words] Taohongxiaozheng Powder; uterine leiomyoma; estrogen; progesterone; ER; PR; PCNA

子宫肌瘤是女性生殖器官中最常见的良性肿

瘤, 多发于 30~ 50 岁的育龄期妇女。现在多认为子宫肌瘤的发生与下丘脑-垂体-卵巢分泌轴功能失调有关^[1], 但是具体的发病原因至今尚未清楚, 另外, 平滑肌细胞增殖过度也是子宫肌瘤发生的重要因素之一。桃红消癥散由桃仁、红花、枳壳等药味组成,

[收稿日期] 2009-05-08

[通讯作者] * 李明真, Tel: (0) 15256576029; Email: yzsw810812@163.com

具调经活血、理气化痰之功效,临床用于治疗子宫肌瘤疗效确切。本文通过研究桃红消癥散对子宫肌瘤模型大鼠雌、孕激素受体及增殖细胞核抗原表达的影响,进一步探讨其可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 雌性SD大鼠60只,未孕,体重180~220g,由南京医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(苏)2002-0031。

1.2 药物 桃红消癥散(由桃仁、红花、当归、黄芪、三七、元胡、枳壳、海藻等13味中药组成,其成分比例为:6g,6g,9g,9g,3g,9g,9g,6g),系蚌医二附院临床验方,本散采用单味中药浓缩干粉临用时用蒸馏水配制而成,因该浓缩干粉系中药饮片浓缩提取,实际用量低于生药用量,两者用量比由该生产企业质量标准统一标定(桃仁,1:10;红花,2:6;当归,4:10;黄芪,1.5:10;三七,3:3;元胡,1:10;枳壳,1:6;海藻,0.5:10,为理解方便下文以生药量表示)。该单味中药浓缩干粉由江阴天江药业有限公司提供,批号:9063751。

1.3 主要试剂和仪器 桂枝茯苓胶囊,江苏康缘药业股份有限公司生产,批号:080425(在本文中剂量以颗粒量表示);苯甲酸雌二醇注射液,2mg·mL⁻¹,宁波第二激素厂生产,批号:051221;黄体酮注射液:20mg·mL⁻¹,浙江仙琚制药股份有限公司生产,批号:070816;雌二醇、孕酮放射免疫分析试剂盒,购自北京北方生物技术研究所,批号:090120;雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)兔抗人、大鼠、小鼠多克隆抗体,购自北京博奥森生物技术有限公司;增殖细胞核抗原(PCNA)(188)兔抗人、大鼠、小鼠多克隆抗体,购自美国ABZOOM公司,批号:ZA0737;SP9000抗兔二抗试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:485302A;GC-9112放免计数器:中国科学技术大学中佳公司生产;LEICA RM-2135切片机,德国制造;BX-51荧光显微镜,日本OLYMPUS公司;DP801形态学图像分析系统,江苏省捷达科技发展有限公司。

2 方法

2.1 动物分组、剂量设定 实验大鼠随机均分为6组,即正常对照组、模型对照组、桃红消癥散7.29,14.58,29.16g·kg⁻¹组(分别相当于临床人用量的1倍、2倍、4倍)、桂枝茯苓胶囊0.50g·kg⁻¹组(相当于人用量的2倍),每组10只。

2.2 模型制备 采用雌孕激素负荷法建立实验性大鼠子宫肌瘤动物模型^[2-3]。每周1,3,5股内侧im苯甲酸雌二醇注射液0.05mg·100g⁻¹,3次/周,12周后加im黄体酮注射液0.5mg·100g⁻¹,2次/周,连续4周,正常对照组im等体积生理盐水。

2.3 给药方法 造模第5周起,各给药组开始按相应剂量ig给药,给药容积为1.5mL·100g⁻¹体重,正常对照组、模型组均ig等容量蒸馏水,每天给药1次,连续12周。

2.4 血清雌、孕激素含量测定 末次给药后40min,用20%乌拉坦ip麻醉,腹主动脉取血,分离血清,按试剂盒要求检测血清中雌二醇(E₂)、孕酮(P)含量。

2.5 病理组织学检查 取出子宫,于分角以上相同部位横切取材0.5cm,10%甲醛溶液中固定,常规乙醇脱水,石蜡包埋,HE染色,光镜下进行子宫组织病理学检查。

2.6 免疫组化测定 将剩余子宫新鲜病变组织固定于4%多聚甲醛溶液中,石蜡包埋,5μm连续切片,进行免疫组化SP测定:①石蜡切片脱蜡水化。②3% H₂O₂去离子水室温孵育10min, PBS冲洗3min×3次。③0.01M枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波修复15min。④滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育15min,甩去多余液体,不洗。⑤滴加适当比例稀释的ER、PR和PCNA多克隆抗体,37℃孵育2h, PBS冲洗3min×3次。⑥滴加生物素化二抗工作液,室温孵育15min, PBS冲洗3min×3次。⑦滴加适量的辣根酶标记链霉卵白素工作液, PBS冲洗3min×3次。⑧DAB显色,镜下控制反应时间,自来水冲洗终止反应。⑨为了更好的观察阳性物,苏木素复染,常规酒精、二甲苯脱水透明,中性树胶封片,镜检。

2.7 图像分析 以组织切片中出现棕黄色颗粒聚集为阳性反应。封片后,随机选取8个不同视野,用DP801形态学图像分析系统对相关蛋白表达的着色强度进行量化处理,测定阳性表达物的平均光密度值(OD),计算均值进行统计学分析。

2.8 统计学处理 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPASS 12.0软件进行单因素方差分析和t检验,以P<0.05为差异显著性。

3 结果

3.1 对血清雌、孕激素含量的影响 与正常组相

比, 模型组大鼠血清 E_2 、 P 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 各用药组可不同程度降低血清 E_2 、 P 水平, 其中桃红消癥散 $29.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组具显著性差异 ($P < 0.05 \sim 0.01$); 桃红消癥散 $14.58 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组有降低 P 的趋势, 但无统计学意义。(见表 1)。

表 1 桃红消癥散对 UL 模型大鼠血清 E_2 、 P 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	雌二醇 ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	孕酮 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常对照组	—	$160.36 \pm 38.29^{2)}$	$0.41 \pm 0.056^{2)}$
模型对照组	—	446.30 ± 118.50	0.90 ± 0.12
阳性对照组	0.50	$345.25 \pm 69.26^{1)}$	$0.49 \pm 0.14^{1)}$
桃红消癥散	7.29	$357.09 \pm 58.98^{1)}$	$0.48 \pm 0.13^{1)}$
	14.58	$317.72 \pm 49.14^{2)}$	0.69 ± 0.06
	29.16	$305.02 \pm 85.62^{2)}$	$0.46 \pm 0.11^{1)}$

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 组织形态学改变 镜下显示, 正常组大鼠子宫平滑肌层较薄, 肌纤维细长, 内环外纵, 排列整齐(图 1)。模型组大鼠子宫平滑肌层明显增厚, 肌纤维细胞丰富, 肌细胞肥大, 排列较紊乱, 粘膜腺体数量增多, 密度增加, 腺体体积增大, 少数出现复层上皮, 个别有鳞状上皮化生(图 2)。各给药组大鼠腺体增生及肌纤维增生与模型组比较均有不同程度减轻(图 3~ 6)。

3.3 免疫组织化学结果 免疫组化 SP 法染色结果显示, ER 和 PR 阳性表达均定位于细胞核内, 呈棕黄色染色。正常组大鼠子宫平滑肌组织 ER 和 PR 阳性细胞呈少量、散在分布(图 7~ 8), 模型组大鼠子宫平滑肌 ER 和 PR 表达呈强阳性, 表现为不同程度的棕黄色核染(图 10~ 11), OD 值升高明显, 与正常

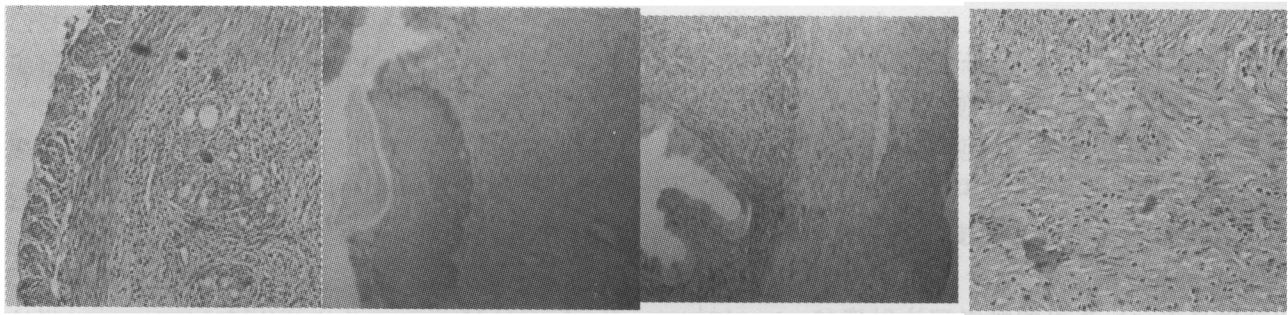


图 1 正常对照组 子宫组织
结构正常(HE × 100)

图 2 模型组 子宫组织腺体增生
并有鳞状上皮化生(HE × 200)

图 3 阳性药物组 子宫组织腺
体及肌层轻度增生(HE × 200)

图 4 THXZP 小剂量组
(HE × 400)

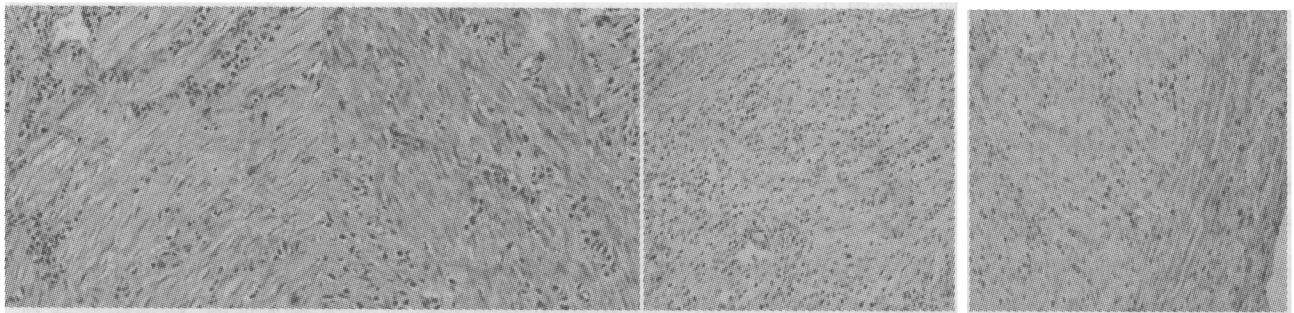


图 5 THXZP 中剂量组
(HE × 400)

图 6 THXZP 大剂量组 子宫组织
肌层增生情况减轻(HE × 400)

图 7 正常对照组 子宫平滑肌
ER 呈少量分布(SP × 400)

图 8 正常对照组 子宫平滑肌
PR 散在分布(SP × 400)

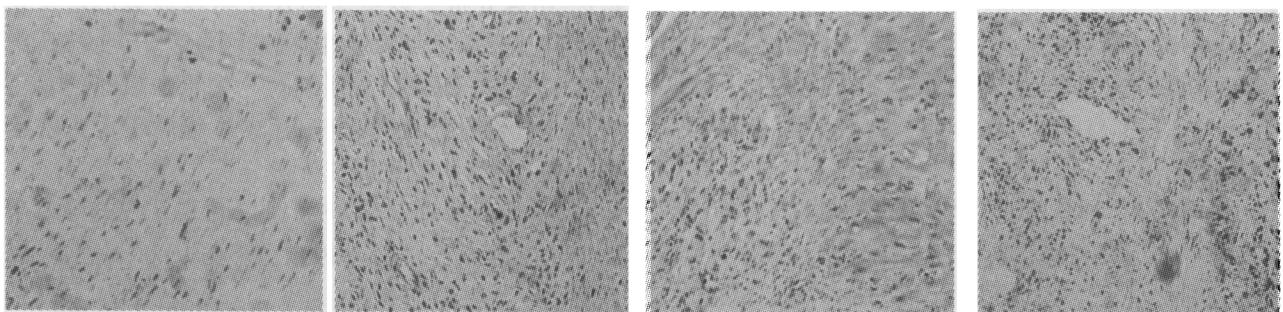


图 9 正常对照组 子宫平滑肌
PCNA 少量表达(SP × 400)

图 10 模型对照组 子宫平滑肌
ER 表达增多(SP × 400)

图 11 模型对照组 子宫平滑
肌 PR 表达增多(SP × 400)

图 12 模型对照组 子宫平滑
肌 PCNA 表达增多(SP × 400)

组比较差异显著 ($P < 0.01$); 桃红消癥散各剂量组及阳性对照组大鼠的 ER 和 PR 的 OD 值均有不同程度的降低, 与模型对照组相比差异明显 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。

PCNA 阳性信号为细胞核内呈现棕黄色至深棕色颗粒。正常组大鼠子宫平滑肌细胞 PCNA 少量表达(图 9), 模型组大鼠子宫平滑肌细胞 PCNA 呈强阳性表达, 阳性密度增强(图 12), OD 值明显高于正常组大鼠 ($P < 0.01$); 桃红消癥散各剂量组及阳性对照组大鼠的 PCNA 阳性信号减弱, 阳性细胞密度显著减低, OD 值降低明显 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。(见表 2)。

表 2 桃红消癥散对 UL 模型大鼠 ER, PR 和 PCNA 平均光密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	OD 值		
		ER	PR	PCNA
正常对照组	—	0.2684 \pm 0.0269 ²⁾	0.3192 \pm 0.0327 ²⁾	0.2184 \pm 0.0209 ²⁾
模型对照组	—	0.6252 \pm 0.0422	0.6890 \pm 0.0438	0.6052 \pm 0.0395
阳性对照组	0.50	0.5161 \pm 0.0236 ²⁾	0.5173 \pm 0.0216 ²⁾	0.4328 \pm 0.0128 ²⁾
桃红消癥散	7.29	0.5589 \pm 0.0222 ²⁾	0.4470 \pm 0.0209 ²⁾	0.5486 \pm 0.0112 ²⁾
	14.58	0.5808 \pm 0.0243 ¹⁾	0.6303 \pm 0.0203 ²⁾	0.5693 \pm 0.0176 ¹⁾
	29.16	0.4505 \pm 0.0193 ²⁾	0.5729 \pm 0.0188 ²⁾	0.4893 \pm 0.0117 ²⁾

4 讨论

子宫组织的增殖与分化受卵巢类固醇激素的调节, 雌激素 (E_2) 是肌瘤生长的主要促进因素。抗雌激素药物或雌激素受体阻断剂可以使子宫肌瘤明显缩小; 子宫肌瘤组织中含有比正常肌层更多的催化类固醇转化为雌性激素的酶, 而使雌性激素分解的酶比正常肌层少^[4]。

近年来, 通过组织学、生物化学及临床循证证实孕激素在肌瘤的发生中发挥重要的作用^[5]。Maruo 等^[6]研究发现, 子宫肌瘤患者血清中分泌期的雌激素和孕激素水平明显高于正常者。本实验通过雌、孕激素负荷法复制大鼠子宫肌瘤动物模型, 模型组大鼠子宫肌层增厚, 平滑肌细胞排列紊乱, 细胞增大, 说明了高水平的雌、孕激素是子宫平滑肌细胞增生的主要原因之一。桃红消癥散各用药组能显著降低 E_2 和 P 水平, 与模型组相比差异明显, 提示其对子宫肌瘤治疗作用与改善机体内分泌环境有关。同一激素水平下, 激素在靶组织中产生生物学效应的强弱, 取决于其受体含量, 肌瘤内受体含量越高, 激素效应越大。免疫组化证实, 子宫肌瘤细胞雌激素受体的含量与子宫肌瘤的生长速度成正比, 子宫肌

瘤增长速度越快, 则子宫肌瘤细胞雌激素受体的含量也越高, 对雌激素的敏感性也越强^[7]; Massart 等^[8]研究发现, 子宫肌瘤组织中雌、孕激素浓度, 雌、孕激素受体浓度, 雌激素受体 (ER) mRNA, 孕激素受体 (PR) mRNA 水平明显高于正常子宫平滑肌组织。

增殖细胞核抗原 (PCNA) 与细胞 DNA 合成关系密切, 在细胞增殖的启动上起重要作用, 是反映细胞增殖状态的良好指标。本研究结果显示, 模型组大鼠子宫平滑肌组织 ER, PR 和 PCNA 呈强阳性表达, 阳性密度增强, OD 值明显高于正常组大鼠 ($P < 0.01$); 桃红消癥散各剂量组能降低 ER, PR 和 PCNA 的阳性表达, 阳性密度减弱, OD 值降低明显 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。提示子宫肌瘤的发生发展与局部雌、孕激素水平及相应受体含量密切相关, 肌瘤中细胞增殖活性远远高于正常肌层。桃红消癥散治疗子宫肌瘤的机理可能与降低体内雌、孕激素及其平滑肌细胞受体含量, 进而减轻瘤细胞的增殖速度有关。

[参考文献]

- [1] 秦保锋, 张婷婷. 子宫肌瘤发病相关因素研究进展[J]. 现代诊断与治疗, 2005, 16(4): 233.
- [2] 李建荣, 吴兰生, 张广平. 金草片对子宫肌瘤模型大鼠免疫功能的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(21): 2278.
- [3] 刘文苓, 肖承惊, 赵凤志, 等. 肌瘤内消剂对子宫肌瘤大鼠雌孕激素水平及受体表达影响[J]. 中医药学刊, 2003, 21(6): 867.
- [4] 程泾. 妇科疑难病现代中医诊断与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 517.
- [5] Rein M S. Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis. Environ Health Perspect, 2000, 108: 791-793.
- [6] Maruo T, Matsuo H, Shimomura Y, et al. Effects of progesterone on growth factor expression in human uterine leiomyoma[J]. Steroids, 2003, 68(10-13): 817-824.
- [7] Ichimura T, Kawamura N, Ito F, et al. Correlation between the growth of Uterine Leiomyoma and estrogen and Progesterone receptor content in needle biopsy specimens. Fertil Steril, 1998, 70: 967-971.
- [8] Massart F, Becherini L, Marini F, et al. Analysis of estrogen receptor (ER alpha and ER beta) and progesterone receptor (PR) polymorphisms in uterine leiomyomas[J]. Med Sci Monit, 2003, 9(1): 25-30.