

何凤仪,王弋,罗艳华,等. 桂枝茯苓汤对子宫内膜癌的药效及其机制初步探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 43-47.
He FY, Wang Y, Luo YH, et al. Therapeutic effect and mechanism of Guizhi Fuling decoction on endometrial carcinoma [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 43-47.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.03.007

桂枝茯苓汤对子宫内膜癌的药效及其机制初步探讨

何凤仪¹,王弋²,罗艳华¹,金海燕¹,邝少松^{2*}

(1. 广州医科大学附属第二医院,广州 510260;2. 广东省医学实验动物中心,广东 佛山 528248)

【摘要】 目的 研究桂枝茯苓汤对 HEC-1-B 人子宫内膜癌荷瘤裸鼠的疗效及其相关机制。方法 制备 HEC-1-B 人子宫内膜癌荷瘤裸鼠模型,成模后分为 3 组。模型对照组灌胃给予去离子水,桂枝茯苓汤组灌胃给予 2.4 g/kg 桂枝茯苓汤,卡铂注射液组腹腔注射给予 20 mg/kg 卡铂注射液。结果 卡铂注射液组肿瘤体积显著降低和桂枝茯苓汤组肿瘤体积显著降低($P<0.05$)。免疫组化结果显示,桂枝茯苓汤可以上调肿瘤组织表达 caspase-3,同时下调 Bcl-2 表达。结论 桂枝茯苓汤对子宫内膜癌具有抑制的效果。

【关键词】 桂枝茯苓汤;子宫内膜癌;抗肿瘤;裸鼠

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 03-0043-05

Therapeutic effect and mechanism of Guizhi Fuling decoction on endometrial carcinoma

HE Fengyi¹, WANG Yi², LUO Yanhua¹, JIN Haiyan¹, KUANG Shaosong^{2*}

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China.
2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248)

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of treatment with Guizhi Fuling decoction on human endometrial carcinoma HEC-1-B cancer in unde mouse models. **Methods** HEC-1-B cancer model nude mice were divided into three groups. The model group received intragastric gavage of deionized water, the Guizhi Fuling decoction group received intragastric gavage of 2.4 g/kg Guizhi Fuling decoction, and the carboplatin injection group received a single intraperitoneal injection of 20 mg/kg carboplatin. **Results** Both Guizhi Fuling decoction and carboplatin injection significantly reduced the HEC-1-B tumor volume ($P<0.05$). Guizhi Fuling decoction promoted the expression of caspase-3 and reduced the expression of Bcl-2 protein. **Conclusions** Guizhi Fuling decoction has inhibitory effects on endometrial cancer.

【Keywords】 Guizhi Fuling decoction; endometrial cancer; anti-cancer; nude mouse

桂枝茯苓丸出自东汉医学家张仲景《金匱要略·妇人妊娠病篇》,是妇科常用方剂。具有活血、化瘀、消癥之功,在临床上主要用于治疗妇女瘀血阻络所致癥块、经闭、子宫肌瘤、慢性盆腔炎包块、痛经、子宫内膜异位症等症状^[1-2]。现代药理学研究显示,桂枝茯苓丸所含桂枝、牡丹皮、桃仁、赤芍和茯苓 5 味中药中的很多活性成分均具有免疫调节的作用^[3-5]。本文通过研究桂枝茯苓汤对 HEC-1-B 子宫内膜癌荷瘤裸鼠的影响,并为进一步的研究提供基础。

【基金项目】广东省中医药局科研课题(20161171)。

【作者简介】何凤仪(1973—),女,副主任医师,研究方向:妇科临床研究。E-mail: hefengyi1003@163.com

【通信作者】邝少松(1973—),女,博士,副研究员,研究方向:药理与毒理学研究。E-mail: kuangss@126.com

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

4 ~ 5 周龄,雌性,BALB/c 裸小鼠,30 只,实验开始体重:13.3 ~ 14.7 g,SPF 级,购于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002],动物质量合格证号:44007200044449。实验地点为广东省医学实验动物中心比较医学实验室[SYXK(粤)2013-0002],实验证明编号:00179376。福利伦理审查证号:B201709-18,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 细胞株

HEC-1-B 人子宫内膜癌细胞,提供单位:中国科学院细胞库。细胞培养在广东省医学实验动物中心细胞室,培养条件:37℃,5% CO₂,选用 MEM 培养基,添加 10% 胎牛血清,1% 双抗。

1.2 主要试剂与仪器

药物与配制:桂枝茯苓汤:由广东一方制药厂生产的中药浓缩提取物中药免煎配方颗粒制成,组方:桂枝颗粒:1.25 g、茯苓颗粒 1.0 g、赤芍颗粒 3.0 g、丹皮颗粒 1.8 g、桃仁颗粒 3.0 g、甘草颗粒 1.67 g。试验前称取中药配方颗粒加开水使其充分溶解,配制成所需浓度的桂枝茯苓汤。卡铂注射液:齐鲁制药(海南)有限公司生产,生产批号:BB2J7009,给药前用 5% 葡萄糖注射液稀释至所需浓度。

主要试剂:MEM 培养液,批号:8117148, Gibco; 胎牛血清,批号:42F5353 K, Gibco; 0.25% Trypsin-EDTA,批号:75030101100, Genview; 青霉素/链霉素,批号:69230101100, Genview; PBS 磷酸盐缓冲剂,批号:60A1001200,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;一抗 Caspase-3 抗体,货号:GB11009, Servicebio; 一抗 Bcl-2 抗体,货号:GB12008, Servicebio; 二抗 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG,货号:GB23301, Servicebio; 组化试剂盒 DAB 显色剂,货号:G1211, Servicebio; 二甲苯,国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇,国药集团化学试剂有限公司;柠檬酸(PH6.0)抗原修复液,货号:G1202, Servicebio; 3% 双氧水,货号:G0115, Servicebio; BSA, 货号:G5001, Servicebio; 苏木素染液,货号:G1004, Servicebio; 苏木素分化液,货号:G1309, Servicebio; 苏木素返蓝液,货号:G1340, Servicebio; 中性树胶,货号:G1403, Servicebio。

主要仪器:游标卡尺,上海台海工量具有限公司;电子天平,德国 Sartorius,天平感量 0.1 mg;脱水机,武汉俊杰电子有限公司,型号:JJ-12 J;包埋机,武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-P5;病理切片机,上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016;组织摊片机,浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P;烤箱,上海慧泰仪器制造有限公司,型号:DHG-9140 A;脱色摇床,Servicebio,型号:TSY-B;荧光显微镜,Olympus,型号:BX41。

1.3 实验方法

1.3.1 子宫内膜癌皮下模型的建立

裸鼠检疫合格后纳入试验,HEC-1-B 细胞培养至对数生长期,胰酶消化,台盼兰染色计数,用 PBS 配成浓度为 2×10^7 个/mL 的细胞悬液,于 30 只裸鼠左侧肩背部注细胞悬液,每次注射前需混匀细胞悬液(每只裸鼠 200 μ L,共计 4×10^6 细胞)。待肿瘤体积生长至约 100 mm³ ~ 200 mm³ 时,选取肿瘤体积较均匀的 18 只模型动物随机分为 3 组:模型对照组、卡铂注射液组、桂枝茯苓汤组,6 只/组。淘汰裸鼠采用颈椎脱臼处死。

1.3.2 给药方法

模型对照组动物每天按 0.2 mL/10 g 体重灌胃给予去离子水,桂枝茯苓汤组动物每天按 0.2 mL/10 g 体重灌胃给予 0.12 g/mL 桂枝茯苓汤,每天 1 次,连续给药 21 d;卡铂注射液组动物每天按 0.1 mL/10 g 体重腹腔注射给予 2 mg/mL 卡铂注射液,每天 1 次,连续给药 5 d。

1.3.3 动物观察

每天观察动物的饮食情况、精神状态、活跃程度、粪便情况,并进行记录,每周称量动物体重 2 次。

1.3.4 肿瘤体积及脾系数

从肿瘤成模后至实验结束,每周测量 2 次肿瘤长短径,绘制肿瘤生长曲线;肿瘤体积按公式: $V = 1/2ab^2$ 测量计算,a、b 分别表示长和宽;相对肿瘤增殖率 T/C(%):针对每一种人癌异体移植瘤模型的抗肿瘤活性评价指标。计算公式如下: $T/C\% = TRTV / CRTV \times 100\%$ 。(TRTV:治疗组 RTV;CRTV:模型对照组 RTV)。根据测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV),计算公式为: $RTV = V_t / V_0$ 。其中 V₀ 为分笼给药时(即 d1)测量所得肿瘤体积,V_t 为每一次测量时的肿瘤体积。实验结束后,取裸鼠脾脏称重,以脾重比体重计算脾系数。

1.3.5 免疫组化

(1)石蜡切片脱蜡:依次将切片放入二甲苯 I 15 min,二甲苯 II 15 min,二甲苯 III 15 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,85%酒精 5 min,75%酒精 5 min,蒸馏水洗。

(2)抗原修复:组织切片置于盛满柠檬酸(pH 6.0)抗原修复液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,中火 10 min 至沸,停火 5 min 保温再转中低火 5 min,停火 2 min 保温再转中低火 5 min 此过程中应防止缓冲液过度蒸发,切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。

(3)阻断内源性过氧化物酶:切片放入 3%双氧水溶液,室温避光孵育 25 min,将玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。

(4)血清封闭:在组化圈内滴加 3% BSA 均匀覆盖组织,室温封闭 30 min。

(5)一抗:轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的一抗,切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。

(6)二抗:玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的二抗(HRP 标记)覆盖组织,室温孵育 50 min。

(7)DAB 显色:玻片置于 PBS(pH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,自来水冲洗切片终止显色。

(8)复染细胞核:苏木素复染 3 min 左右,自来水洗,苏木素分化液分化数秒,自来水冲洗,苏木素返蓝液返蓝,流水冲洗。

(9)脱水封片:将切片依次放入 75%酒精 5 min,85%酒精 5 min,无水乙醇 I 5 min,无水乙醇 II 5 min,二甲苯 I 5 min 中脱水透明,将切片从二甲苯拿出来稍晾干,中性树胶封片。

1.4 统计学方法

将原始数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 21.0 软件通过方差分析及秩和检验进行模型对照组与其它给药组间的差异显著性检验,α 取 0.05。

2 结果

2.1 一般临床观察

给药期间,动物精神状态良好,饮食情况、精神状态、活跃程度、粪便情况均未见异常,模型对照组及桂枝茯苓汤组体重正常增加,卡铂注射液组体重下降。见表 1。

表 1 桂枝茯苓汤对 HEC-1-B 子宫内 膜癌荷瘤裸鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Guizhi Fuling decoction on body weight of the nude mouse models of HEC-1-B cancer

组别 Groups	受试样品 Test sample	剂量 Doses	开始给药体重(g) Weight at the start of medication	末次体重(g) End weight
模型对照组 Model group	去离子水 Deionized water	—	15.5 ± 0.6	17.5 ± 1.0
桂枝茯苓汤组 Guizhi Fuling decoction group	桂枝茯苓汤 Guizhi Fuling decoction	2.4 g/kg	16.0 ± 1.2	18.0 ± 1.3
卡铂注射液组 Carboplatin injection group	卡铂注射液 Carboplatin injection	20 mg/kg	15.6 ± 0.9	15.0 ± 1.5

表 2 桂枝茯苓汤对 HEC-1-B 子宫内 膜癌荷瘤裸鼠肿瘤的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Guizhi Fuling decoction on tumor volume of the nude mouse models of HEC-1-B cancer

组别 Groups	受试样品 Test sample	剂量 Dosage	首次肿瘤体积(mm ³) Start tumor volume	末次肿瘤体积(mm ³) End tumor volume	相对肿瘤增殖率(%) Relative tumor proliferation rate
模型对照组 Model group	去离子水 Deionized water	—	100.8 ± 44.3	1013.6 ± 185.3	—
桂枝茯苓汤组 Guizhi Fuling decoction group	桂枝茯苓汤 Guizhi Fuling decoction	2.4 g/kg	98.9 ± 41.6	669.0 ± 179.0 *	67.3
卡铂注射液组 Carboplatin injection group	卡铂注射液 Carboplatin injection	20 mg/kg	94.0 ± 41.2	550.0 ± 93.6 *	58.2

注:与模型对照组比较,*P<0.05。
Note. Compared with the model group, *P<0.05.

2.2 肿瘤体积

根据每周肿瘤测量情况,绘制肿瘤生长曲线图。卡铂注射液组肿瘤相对增值率为 58.2%;桂枝茯苓汤组肿瘤相对增值率为 67.3%;与模型对照组比较,卡铂注射液组和桂枝茯苓汤组肿瘤体积均显著降低($P<0.05$)。见表 2。

2.3 脾系数

与模型对照组比较,桂枝茯苓汤组脾系数略有增加,卡铂注射液组脾系数显著降低($P<0.01$),见表 3。

2.4 免疫组化结果

2.4.1 Bcl-2 表达

模型对照组颜色较深,表明肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达较多,桂枝茯苓汤组和卡铂组肿瘤组颜色较浅,表明肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达较少。见图 1。

2.4.2 Caspase-3 表达

模型对照组颜色较浅,表明肿瘤组织中 caspase-3 表达较少,桂枝茯苓汤组和卡铂组肿瘤组颜色较深,表明肿瘤组织中 caspase-3 表达较多。见图 2。

3 讨论

子宫内膜癌是发生于子宫内膜的一种上皮性恶性肿瘤,是最常见的妇科恶性肿瘤之一,并且近年来在世界范围内的发病率呈上升趋势^[6]。早期患者以手术治疗为主,晚期或复发患者需以化疗提高治疗效果^[7-8],然而反复化疗在抗癌的同时也带来了严重的毒副作用,降低机体免疫力,严重影响患者的生活质量^[9-12]。因此,抗癌效果好,且毒副作用低的治疗药物一直是研究热点。

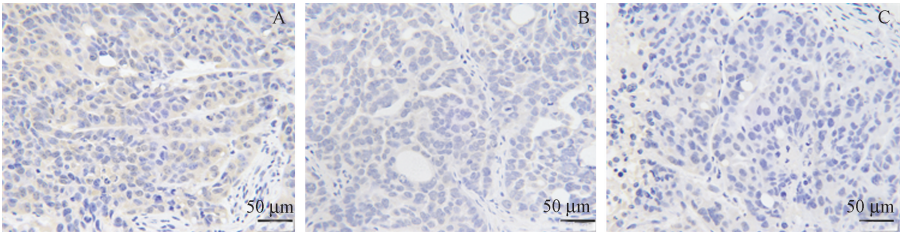
在本实验研究中,卡铂注射液组相对肿瘤增值率为 58.2%,桂枝茯苓汤组相对肿瘤增值率为 67.3%,两组肿瘤体积较模型对照组显著减小,表明桂枝茯苓汤及卡铂注射液对子宫内膜癌具有抑制的效果;同时桂枝茯苓汤组动物体重正常增加,卡铂注射液组动物体重有所下降,表明桂枝茯苓汤对裸鼠未见明显毒性反应;脾脏称量结果表明,卡铂注射液组脾脏重量及脾系数较模型对照组显著降低,桂枝茯苓汤组脾脏重量及脾系数较模型对照组未见显著变化,表明桂枝茯苓汤未见免疫抑制效果。

表 3 桂枝茯苓汤对 HEC-1-B 子宫内膜癌荷瘤裸鼠脾系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effects of Guizhi Fuling decoction on spleen coefficient of the nude mouse models of HEC-1-B cancer

组别 Groups	受试样品 Test sample	剂量 Doses	脾重(g) Spleen weight	脾系数 Spleen coefficient
模型对照组 Model group	去离子水 Deionized water	—	0.7565±0.0755	0.0060±0.0017
桂枝茯苓汤组 Guizhi Fuling decoction group	桂枝茯苓汤 Guizhi Fuling decoction	2.4 g/kg	0.5553±0.1979	0.0063±0.0010
卡铂注射液组 Carboplatin injection group	卡铂注射液 Carboplatin injection	20 mg/kg	0.3888±0.0733 **	0.0032±0.0005 **

注:与模型对照组比较, ** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the model group, ** $P<0.01$.

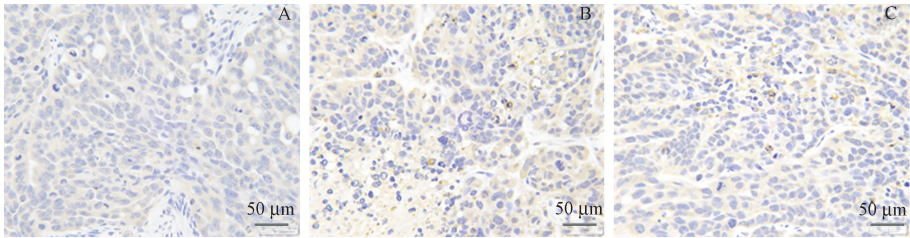


注:A:模型对照组肿瘤组织 Bcl-2 表达;B:桂枝茯苓汤组肿瘤组织 Bcl-2 表达;C:卡铂注射液组肿瘤组织 Bcl-2 表达。

图 1 模型对照组、桂枝茯苓汤组及卡铂注射液组 Bcl-2 表达

Note. A: Model group Bcl-2 protein expression. B: Guizhi Fuling decoction group Bcl-2 protein expression. C: Carboplatin injection group Bcl-2 protein expression.

Figure 1 Bcl-2 protein expression in the model group, Guizhi Fuling decoction group, and carboplatin injection group



注:A:模型对照组肿瘤组织 caspase-3 表达;B:桂枝茯苓汤组肿瘤组织 caspase-3 表达;C:卡铂注射液组肿瘤组织 caspase-3 表达。

图 2 模型对照组、桂枝茯苓汤组及卡铂注射液组 caspase-3 表达

Note. A: Model group caspase-3 protein expression. B: Guizhi Fuling decoction group caspase-3 protein expression. C: Carboplatin injection group caspase-3 protein expression.

Figure 2 Caspase-3 protein expression in the model group, Guizhi Fuling decoction group, and carboplatin injection group

哺乳动物细胞依赖 caspase 引发凋亡主要有 3 条途径^[13]:死亡受体途径(TNF/TNFR, Fas/FasL)、线粒体途径和内质网途径^[14]。其中 caspase-3 是引起细胞凋亡的因子,本实验中免疫组化结果表明桂枝茯苓汤组肿瘤组织 caspase-3 表达高于模型对照组肿瘤组织,表明桂枝茯苓汤具有促进子宫内膜癌凋亡的功效。同时,Bcl-2 作为凋亡蛋白 Bcl-2 家族成员,在无外界凋亡刺激时,具有抑制凋亡作用,当 Bcl-2 高表达时,细胞凋亡被抑制^[15-16]。本实验得到的模型对照组肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达水平较桂枝茯苓汤组较高,表明 Bcl-2 蛋白表达水平的变化可能是桂枝茯苓汤可以抑制肿瘤生长,促进肿瘤凋亡的分子机制。本研究将进一步从细胞、分子水平来阐述桂枝茯苓汤的作用机制,为其临床应用提供更充足的依据。

参考文献:

[1] 莫肇江. 桂枝茯苓丸的临床应用及药理研究概况 [J]. 陕西中医学院学报, 2003, 26(2): 54-56.
[2] 董燕双, 白玉昊, 王博. 浅谈桂枝茯苓丸 [J]. 中国临床研究, 2011, 3(23): 47-49.
[3] 于晓红, 郑瑞茂, 杨宝华. 桂枝茯苓丸中单味药实验免疫学研究进展 [J]. 中医药信息, 2000, 10(5): 31-32.
[4] 于晓红, 郑瑞茂, 王雅贤, 等. 桂枝茯苓丸对小鼠免疫功能的影响 [J]. 中医药信息, 2001, 18(2): 52-53.
[5] 陈婉玲, 李宇清, 骆佩怡, 等. 桂枝茯苓丸对宫颈癌荷瘤小鼠免疫调节机制的实验研究 [J]. 实用中医内科杂志,

2010, 24(6): 27-29.
[6] 史丹红, 孙万邦. 子宫内膜癌手术及辅助治疗研究进展 [J]. 临床医学工程, 2012, 19(3): 483-485.
[7] 郝曼, 金平. 子宫内膜癌化疗进展 [J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(4): 414-418.
[8] 李小平, 王建六. 化疗在晚期和复发性耐药性子宫内膜癌治疗中的作用 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(3): 216-220.
[9] 钱超, 陆清均, 张晓春. 癌症患者顺铂化疗相关肾毒性的临床进展 [J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(5): 607-609.
[10] 杨琳琳, 杨宏英, 魏向群, 等. TP 化疗方案治疗晚期和复发性子宫内膜癌回顾性分析 [J]. 中外医学研究, 2011, 9(13): 19-20.
[11] 陈喜娟. TC、TP 联合方案用于子宫内膜癌术后辅助化疗的疗效比较 [J]. 肿瘤基础与临床, 2012, 25(3): 224-226.
[12] 李小毛, 王小韵. 紫杉醇在子宫内膜癌中的研究进展 [J]. 中国医疗前沿, 2008, 3(17): 20-22.
[13] Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response [J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5: 231-237.
[14] Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. [J]. Pharmacol Ther, 2004, 104: 1-16.
[15] 袁长青, 丁振华. Caspase 的活化及其在细胞凋亡中的作用 [J]. 生理科学进展, 2002, 33(3): 220-224.
[16] 陈荣, 于燕妮, 徐淋, 等. 慢性氟中毒大鼠肾组织 Beclin1、LC3、p62、Bcl-2 表达变化及意义 [J]. 山东医药, 2017, 57(14): 41-44.

[收稿日期] 2018-06-25