

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.05.014

益气消癥方对雌激素诱导子宫肌瘤模型豚鼠子宫组织血管生成的影响

张茜薇¹, 阮氏水¹, 王娜², 邢聪丽¹, 宋卓敏^{3*}

(1. 天津中医药大学, 天津市南开区鞍山西道 312 号, 300193; 2. 天津市武清区中医院; 3. 天津中医药大学中医药研究院)
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973768)

摘要 **目的** 探讨益气消癥方治疗子宫肌瘤的可能作用机制。 **方法** 采用去势+雌激素诱导建立豚鼠子宫肌瘤模型, 将 68 只造模成功豚鼠随机分为模型组 (15 只)、中药高剂量组 (14 只)、中药中剂量组 (12 只)、中药低剂量组 (13 只) 及西药组 (14 只), 并设正常对照组 (15 只)。去势术后第 21 日开始, 中药高、中、低剂量组分别给予益气消癥方 4 g/kg、2 g/kg、1 g/kg 干粉; 西药组给予米非司酮片 1.94 mg/kg。各组灌胃容积为 1 ml/(100 g·d), 正常对照组及模型组给予等容积蒸馏水, 连续 12 周。检测各组豚鼠子宫组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达, 并进行 HIF-1 α 与 VEGF 相关性分析。 **结果** 模型组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达显著高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 中药高、中剂量组和西药组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中药高剂量组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 蛋白表达显著低于中药中、低剂量组 ($P < 0.01$), 中药高剂量组豚鼠子宫组织 VEGF 蛋白表达显著低于中药中、低剂量组和西药组 ($P < 0.01$)。HIF-1 α 与 VEGF 相关性分析显示, 相关系数为 0.930, $P = 0.000$ 。 **结论** 益气消癥方可能是通过降低子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达, 抑制血管生成, 从而达到治疗子宫肌瘤的作用。

关键词 益气消癥方; 子宫肌瘤; 缺氧诱导因子-1 α ; 内皮生长因子; 血管生成

肿瘤细胞的增生易导致局部缺氧, 处于缺氧状态下的肿瘤细胞仍能不断增殖, 与此密切相关的重要细胞因子为缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)。HIF-1 α 可调控近百种缺氧反应性靶基因的表达式^[1], 其中直接参与肿瘤血管生成且最有价值的则属血管内皮生长因子 (VEGF)。VEGF 是肿瘤血管形成过程中最重要的刺激因子, 同时又是 HIF-1 α 重要的靶基因, 故 HIF-1 α 被认为是肿瘤血管生成环节中的中心启动分子^[2]。本实验研究 HIF-1 α 与 VEGF 之间的传导关系, 进而为抑制肿瘤血管生成、治疗肿瘤提供新的思路和途径, 现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

雌性清洁级豚鼠 96 只, 体重 (400 $\pm$ 50) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验

动物合格证号: SCXK (京) 2010-0001。

1.2 药物

益气消癥方组成: 党参 30 g, 续断 15 g, 莪术 15 g, 郁金 10 g, 白芥子 15 g, 鳖甲 30 g。将中药药材进行提炼取液, 直接掺入辅助剂实施喷雾干燥技术, 获得中药干粉与生药比例为 1: 4.5, 由天津中医药大学制药厂制备。米非司酮片: 25 mg/片, 国药准字 H10950003, 批号: 43100611, 北京紫竹药业有限公司生产。

1.3 主要试剂及器材

苯甲酸雌二醇注射液: 1 mg/ml, 批号: 1005071, 天津金耀氨基酸有限公司生产; 硫酸庆大霉素注射液: 2 ml: 8 万单位, 批号: 10051221, 天津药业焦作有限公司生产; 10% 水合氯醛溶液: 批号: 20080206, 中国医药集团上海化学试剂公司; HIF-1 α 免疫组化试剂: 货号 Sc-53546, Santa Cruz 公司; VEGF 免疫组化试剂: 货号 Sc-7269,

* 通讯作者: gaos67@126.com, 13212278727

Santa Cruz 公司。显微镜 (日本 Olympus, BX51T-PHD-J11); 互补金属氧化物半导体 (CMOS, 日本 Olympus); 多功能真彩色细胞图象分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司, Image-Pro Plus); 切片机 (德国莱卡, RM2015); 离心机 (北京离心机厂, LDZ5-2 型); 电子天平 (瑞士 METTER, AE100 型); 干燥箱 (日本三洋, MIR-153 型)。

2 方法

2.1 模型建立

采用去势 + 雌激素诱导建立豚鼠子宫肌瘤模型^[9]。3% 戊巴比妥钠 (300 mg/kg 体重) 腹腔注射麻醉, 钝性分离逐层进入腹腔, 分离豚鼠两侧卵巢并剪去卵巢, 关闭腹腔。手术后肌肉注射庆大霉素 0.2 ml/只, 连续 5 天, 以防止术后腹腔感染。手术 20 天后, 皮下注射苯甲酸雌二醇注射液 100 μ g/只, 每周 2 次, 连续 12 周。卵巢摘除术后 7 天行阴道涂片, 观察阴道上皮角化情况, 连续 15 天阴道监测未见动情周期证明去势成功。

2.2 动物分组及给药方法

96 只豚鼠采用随机数字表法分为正常对照组、模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组、西药组, 每组 16 只。正常对照组完成实验 15 只; 成功造模 68 只, 其中模型组 15 只, 中药高剂量组 14 只, 中药中剂量组 12 只, 中药低剂量组 13 只, 西药组 14 只。术后第 21 日开始, 中药高、中、低剂量组分别给予益气消癥方 4 g/kg 干粉 (剂量为人等效剂量^[10]的 2 倍, 相当于 18 g/kg 生药)、2 g/kg 干粉 (相当于 9 g/kg 生药)、1 g/kg 干粉 (相当于 4.5 g/kg 生药); 西药组给予米非司酮片 1.94 mg/kg; 正常对照组及模型组给等容积蒸馏水。各组按相应剂量给药, 给药容积为 1 ml/(100 g · d), 连续 12 周。

2.3 观察指标及方法

免疫组化测定各组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 的蛋白表达。末次给药结束 1 h 后, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 子宫组织用 10% 甲醛固定, 常规乙醇脱水, 石蜡包埋, 5 μ m 的连续组织切片, 脱蜡、入水。1% 甲醇双氧水, 室温 10 min, 蒸馏水洗 1 次, 0.1 M PBS 洗 3 次 $\times$ 5 min。将切片放入抗原修复液中加热至 97 $^{\circ}$ C, 保持 15 min 后自然冷却, PBS 洗 3 次每次 5 min。切片上滴加正常山羊血清封闭液, 室温 20 min。甩去多余液体, 不洗。切片上滴加第一抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 0.1 M PBS 洗 3

次 $\times$ 5 min, 切片上滴加生物素化第二抗体 (IgG), 37 $^{\circ}$ C、20 min, 0.1 M PBS 洗 3 次 $\times$ 5 min, 切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 (S-A/HRP), 37 $^{\circ}$ C、20 min, 0.1 M PBS 洗 3 次 $\times$ 5 min。DAB 显色, 苏木素复染, 乙醇、二甲苯脱水透明, 中性树脂封片。选择各组的阳性和阴性组织相进行显微照相 ($\times$ 400), 每个样本任选 5 个有意义的组织相, 登记阳性细胞等级及百分比, 计算出免疫组织化学染色评分 (HIS 评分)^[11]。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 相关性分析采用 Spearman 相关性分析。

3 结果

表 1 示, 模型组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达显著高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 中药高、中剂量组和西药组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 中药低剂量组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药高剂量组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 蛋白表达显著低于中药中、低剂量组 ($P < 0.01$), 中药高剂量组豚鼠子宫组织 VEGF 蛋白表达显著低于中药中、低剂量组和西药组 ($P < 0.01$)。HIF-1 α 与 VEGF 相关性分析结果显示, 相关系数为 0.930, $P = 0.000$, 提示 HIF-1 α 与 VEGF 表达量呈正相关。

表 1 各组豚鼠子宫肌组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达 HIS 评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	HIF-1 α	VEGF
正常对照组	15	0.312 $\pm$ 0.080	0.301 $\pm$ 0.096
模型组	15	0.802 $\pm$ 0.099*	0.791 $\pm$ 0.204**
中药高剂量组	14	0.407 $\pm$ 0.073** Δ	0.451 $\pm$ 0.065 $\Delta\Delta$
中药中剂量组	12	0.618 $\pm$ 0.126** $\Delta\Delta$	0.581 $\pm$ 0.088** $\Delta\Delta$
中药低剂量组	13	0.764 $\pm$ 0.093* Δ	0.686 $\pm$ 0.231** Δ
西药组	14	0.408 $\pm$ 0.047* Δ	0.498 $\pm$ 0.238 $\Delta\Delta$

注: 与正常组对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta P < 0.05$; 与中药高剂量组比较, $\Delta P < 0.01$

4 讨论

缺氧是实体肿瘤微环境的基本特征之一, 缺氧状态可诱导一系列与血管生成、缺氧代谢等密切相关的基因表达, 以帮助细胞适应缺氧环境, 在此过程中 HIF-1 α 表达起非常重要的作用^[12]。血管生成的核心调控机制包括 VEGF 非依赖途径和 VEGF 依

赖途径,但缺氧条件下主要是通过 VEGF 依赖途径。VEGF 是一种内皮细胞专一性丝裂原和血管新生强烈的刺激因子^[1],在生理或病理状态下血管新生的过程中是一个主要调节因子^[2]。HIF-1 α 从多层次调节其下游靶基因 VEGF 的表达,从而启动“血管生成开关”,包括增强 VEGF 的转录活性以及增加 VEGF mRNA 的稳定性^[3]。VEGF 表达增加,与其受体结合,产生一系列细胞信号级联反应,导致新血管生长分化,血管生长失控,肿瘤组织内大量的新血管生成,使血液到达缺氧部位,最终促进肿瘤的生长。

以往临床研究表明,益气消癥方对子宫肌瘤疗效显著^[4]。方中党参益气健脾,鳖甲软坚消癥合为君药;续断补肾,配伍党参而强肾固冲;莪术破瘀,助鳖甲以消癥积,共为臣药;白芥子利气涤痰散结,郁金行气活血,二药相协以增强破积消坚之力,共为佐使。诸药合力,益气化瘀,祛湿涤痰,软坚消癥。本研究结果显示,模型组豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白存在高表达,且 HIF-1 α 与 VEGF 表达量呈正相关,提示 HIF-1 α 、VEGF 是血管生成、提供血液供应促使子宫肌瘤发生发展的重要因子。中药高、中剂量组和西药组均显著降低模型豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达,而中药低剂量组与模型组对比无统计学差异,提示中药治疗子宫肌瘤可能存在一个有效剂量。中药高剂量组与西药组对比,HIF-1 α 蛋白表达差异无统计学意义,但 VEGF 蛋白表达显著降低,提示益气消癥方治疗子宫肌瘤,不仅仅是通过 HIF-1 α 这一传导途径调节 VEGF 表达,应是多途径的治疗作用。本研究提示益气消癥方显著下调子宫肌瘤模型豚鼠子宫组织 HIF-1 α 、VEGF 的表达,抑制血管生成,是其

缩瘤、消瘤、临床疗效显著的重要作用机理之一。

参考文献

- [1] 赵菲,蔡慧云,安平.缺氧诱导因子-1 α 在结肠肿瘤中的表达及意义[J].中华消化外科杂志,2007,6(2):125.
- [2] Huang LE, Gu J, Schau M, et al. Regulation of hypoxia inducible factor-1 alpha is mediated by an O2 dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(14):7987-7992.
- [3] 朱焰,邱小燕,吴建辉,等.子宫肌瘤动物模型的建立[J].中国药理学通报,2006,22(3):374-378.
- [4] 秦川.医学实验动物学[M].北京:人民卫生出版社,2008:270.
- [5] Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. Cancer,2000,89(12):2637-2645.
- [6] 张呈艳.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):320-324.
- [7] Vincent KA, Shyu KG, Luo Y, et al. Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 alpha /VP16 hybrid transcription factor[J]. Circulation,2000,102(18):2255-2261.
- [8] Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia[J]. AM J Pathol, 2000,156(3):965-976.
- [9] Zolota V, Tsamandas AC, Aroukatos P, et al. Expression of cell cycle inhibitors p21, p27, p14 and p16 in gliomas. Correlation with classic prognostic factors and patients' outcome[J]. Neuropathology, 2008, 28(1):35-42.
- [10] 哈孝贤,董淑芹,刘永志,等.肌瘤丸治疗子宫肌瘤的临床研究(附 384 例病例报告)[J].天津中医,1996,13(2):1-3.

Effect of Qi-Boosting Mass-Eliminating Formula on the Angiogenesis in Uterine Tissue of Guinea Pigs With Estrogen-Induced Uterine Fibroids

ZHANG Qianwei¹, RUAN Shishui¹, WANG Na², XING Congli¹, SONG Zhuomin³

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193; 2. TCM Hospital of Wuqing District, Tianjin; 3. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the possible mechanism of Qi-Boosting Mass-Eliminating Formula for uterine fibroids. **Methods** The guinea pig models of uterine fibroids were established with castration and estrogen. Totally 68 guinea pig models were randomized into the model group (n = 15), Chinese medicine high-dose group (n = 14), Chinese medicine middle-dose group (n = 12), Chinese medicine low-dose group (n = 13) and western medicine group (n = 14). The normal control group was established with 15 pigs in it. The Chinese medicine high-dose, middle-dose and low-dose groups were given 4 mg/kg, 2 mg/kg and 1 mg/kg Qi-Boosting Mass-Eliminating Formula dry powder respectively from the 21st day after castration. The western medicine group was given 1.94 mg/kg Mifepristone

Tablets. The volume of intragastric administration was 1 ml / (100 g • d) in each group. The normal control group and model group were gavaged with the same volume of distilled water. The administration lasted for 12 weeks. The protein expressions of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in uterine tissue in each group were observed. The correlation between HIF-1 α and VEGF was analyzed. **Results** The protein expressions of HIF-1 α and VEGF in the model group were significantly higher than those in the normal control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the model group, the protein expressions of HIF-1 α and VEGF in the Chinese medicine high-dose and middle-dose groups and western medicine group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein expression of HIF-1 α in the Chinese medicine high-dose group was significantly lower than that in the Chinese medicine middle-dose and low-dose groups ($P < 0.01$). The protein expression of VEGF in the Chinese medicine high-dose group was significantly lower than that in the Chinese medicine middle-dose and low-dose groups and western medicine group ($P < 0.01$). The correlation analysis of HIF-1 α and VEGF showed a correlation coefficient of 0.930 and $P = 0.000$. **Conclusion** Qi-Boosting Mass-Eliminating Formula can treat uterine fibroids probably by reducing the protein expressions of HIF-1 α and VEGF in uterine tissue and inhibiting angiogenesis. **Keywords** Qi-boosting Mass-eliminating Formula; uterine fibroids; hypoxia-inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor; angiogenesis

(收稿日期: 2013 - 07 - 18; 修回日期: 2013 - 11 - 19)

[编辑: 邓 媛]

东华原煎药机 打造行业领军品牌

东华原医疗起草的 ISO/AWI 18665 《中药煎药机》
国际标准工作草案已获通过



十功能煎药机



常压循环2+1煎药包装一体机



均分包装机



东华原医疗

DONGHUAYUAN MEDICAL

更有效

均分包装

更经济

自动两煎

更安全

滑动锁紧

北京东华原医疗设备有限公司
网 址 : www.donghuayuan.com

电话 : 400-888-0258 800-810-0359