

软坚散结中药对子宫内膜异位症 模型小鼠内膜黏附因子的影响

俞而慨 程明军 王宜生 李大金 邹琴娣 徐丛剑

(复旦大学附属妇产科医院中西医结合科, 上海市方斜路 419 号, 200011)

[摘要] **目的** 观察软坚散结中药对子宫内膜异位症模型小鼠异位内膜黏附的影响。**方法** 用增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转基因和野生型 C₅₇BL/6J 小鼠建立子宫内膜异位症模型, 中药组给予软坚散结中药灌胃, 空白组、模型对照组(对照组)则给予等量的生理盐水灌胃, 2 周后成像并比较两组小鼠荧光表达的强弱; 流式细胞术检测异位病灶的凋亡情况; Western blot 和实时定量 PCR 等技术对异位内膜的细胞间黏附分子 1(ICAM-1)和透明质酸受体 CD44 进行检测。**结果** 镜下可见模型小鼠肠管间、腹壁下、肝小叶下或脾周形成绿色团块状或星点状内膜异位病灶, 中药组异位灶体积及荧光表达强度明显低于对照组($P < 0.05$), 中药组和对照组异位内膜细胞的凋亡率与空白组差异有统计学意义(均 $P < 0.01$), 且中药组高于对照组($P < 0.05$); 中药组 CD44、ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达显著低于模型对照组(均 $P < 0.01$)。对照组、中药组的 CD44 和 ICAM-1 mRNA 表达量分别是空白组的 16.34、2.75 和 1.53、1.19 倍。**结论** 软坚散结中药可抑制子宫内膜异位症模型小鼠异位内膜病灶的产生, 这种作用可能是通过降低黏附因子 ICAM-1、CD44 的表达而实现的。

[关键词] 子宫内膜异位症; 软坚散结; 细胞间黏附分子 1; 透明质酸受体; CD44

Effect of Herbs Softening and Resolving Masses on the Adhesion Factors of Endometrium of Endometriosis Model Mice

YU Erkai, CHENG Minjun, WANG Yisheng, et al.

(Obstetrical and Gynecological Hospital of Fudan University, Shanghai 200011)

ABSTRACT **Objective** To evaluate the effect of herbal medicines with the functions to soften and resolve masses of ectopic endometrium of mouse model of endometriosis. **Methods** The enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic and wild-type C₅₇BL/6J mice were used to establish the mouse model of endometriosis. For the herb group, the herbal medicine was administered by gavage. For the control and blank groups, the same amount saline was given by gavage. Two weeks later, all model mice were sacrificed and optical density of fluorescence of ectopic endometrium was calculated for comparison. The ectopic endometrium, uterus and ovaries were examined histologically and FCM analysis was performed to access cell apoptosis, Western blot and Real-time PCR was performed to access the expression of ICAM-1 and CD44 in the ectopic endometrium. **Results** Under fluorescent microscope, the green cake-like or punctiform ectopic endometrium were found between the intestines, under abdominal wall or under hepatic lobules or around spleen in the model mice. The volume and optical density of fluorescence of ectopic endometrium of the herb group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.05$), the cell apoptosis of the herb group and the control group was significantly different from that of the blank group ($P < 0.01$), and the herb group was also higher than the control group ($P < 0.05$). The expression of CD44, ICAM-1 and mRNA in the herb group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.01$). The expression of CD44, ICAM-1 and mRNA of the control and the herb group was 16.34 and 2.75, and 1.53 and 1.19 times respectively of the blank group. **Conclusion** The herbs with the functions to soften and resolve masses exert a growth-inhibitory effect on ectopic endometrium of model mice. It is may be realized by inhibiting the expression of CD44 and ICAM-1.

Key Words Endometriosis; Softening and resolving masses; ICAM-1; CD44

盆腔子宫内膜异位症的发病机制有多种学说, 以 1921 年 Sampson 提出的“经血逆流种植”学说最为经典。细胞间黏附分子 1(ICAM-1)、透明质酸受体 CD44 等在逆流入腹腔的内膜细胞异位生长中起到重要作用^[1]。本实验利用绿色荧光蛋白(EGFP)转基因小鼠同

系异体子宫内膜腹腔注射诱发模型, 采用 Western blot 和实时定量 PCR 等技术对 ICAM-1、CD44 进行检测, 探讨软坚散结中药在小鼠异位内膜与腹膜黏附过程中对黏附因子 ICAM-1、CD44 的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

6~8 周龄未交配健康雌性增强型绿色荧光蛋白(EGFP)转基因 C₅₇BL/6J 小鼠购于南京大学模式动物

遗传研究中心(许可证号:FC * K 苏2005-002),体重18~20g;同周龄雌性未交配野生型 C₅₇BL/6J 小鼠由中国科学院上海生命科学院实验动物中心提供(许可证号:SYXK 沪2004-0011),体重18~20g。实验期间所有动物均在中国科学院上海生命科学院实验动物中心 SPF 级环境中饲养,采用上海斯莱克实验动物有限责任公司提供的标准饲料。实验前适应性喂养2周。

1.2 药物和试剂

软坚散结中药(主要成分为血竭、三七、薏苡仁等)由江苏康缘药业股份有限公司代为加工制成含生药量0.2g/ml的无菌煎剂,密封,4℃保存。ICAM-1、CD44引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;Annxin-VPI 双染试剂盒(Becton Dickinson);蛋白抽提 RIPA 试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司);兔抗 CD44(武汉博士德公司);兔抗 CD54(Protein Tech Group);鼠抗 β actin(Protein Tech Group);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥公司);总 RNA 抽提试剂 TRIzol 试剂(Molecular research center);cDNA 合成试剂盒 Revert AidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas);SYBR Green Real time PCR Master Mix 试剂盒(TOYOBO)。

1.3 主要仪器

流式细胞仪(Becton Dickinson);紫外分光光度计 Quantity II (Pharmacia Beckman);Olympus SZX16 荧光体视镜;ABI 7000 实时定量 PCR 仪(Applied Biosystems)。

1.4 动物造模、分组及处理

参考文献[2],处死6~8周龄EGFP 转基因C₅₇BL/6J 小鼠,无菌条件下开腹切取荧光小鼠子宫,剥除子宫肌层,将内膜剪碎后置于DMEM/F12培养液中。以12号无菌针头将子宫内膜组织悬液以1:2的比例(即供体鼠与受体鼠的比例为1:2)于左侧鼠蹊部注射于同周龄野生型C₅₇BL/6J 受体鼠腹腔。将模型鼠随机分为中药组和对照组,每组10只,另设5只小鼠作为空白组(左侧鼠蹊部仅注射等量培养液)中药组按照生药量3g/kg 每日灌胃0.3ml(按临床用药剂量,以成人60kg 与小鼠的体重折算系数9.01折算成小鼠用量^[3]);对照组及空白组5只小鼠每日灌胃等量无菌生理盐水,两周后所有小鼠取材。

1.5 荧光定量分析及病理检测

处死小鼠后,于Olympus SZX16 荧光体视镜下观察异位病灶生长情况,进行荧光成像。用 Image ProPlus7.0 软件计量各视野荧光光密度(OD)值,将所有视野OD值相加即得总OD值;分析比较各组小鼠的

荧光表达强弱。

于镜下分别取异位病灶、子宫和卵巢放入4%多聚甲醛液中固定,常规脱水,石蜡包埋,切片厚5 μ m,HE染色,显微镜下观察。

1.6 流式细胞检测细胞凋亡

荧光体视镜下取各组小鼠异位病灶及所附着的腹膜组织(空白组取部分正常腹膜组织),眼科剪刀剪碎,边剪边PBS冲洗,尼龙网过滤,收集细胞。2000r/min离心5min,弃上清,PBS洗2次。按Annxin-VPI 双染试剂盒说明进行其余步骤。70%冷乙醇固定后PBS洗2次,加入RNA酶0.1mg/ml 37℃孵育30min,50mg/L的碘化丙啶(PI)1ml,染色30min,上机检测。用CELLQUEST 和ModFITLT for Macv1.01 软件分析细胞凋亡。

1.7 Western blot 检测

按 RIPA 试剂盒说明抽提并测定总蛋白浓度,取50 μ g 总蛋白与上样液混合,上样前煮沸3分钟。制备10%聚丙烯酰胺凝胶,上样、电泳、转膜、封闭。在硝酸纤维膜上滴加CD44(1:100)、ICAM-1(1:100)、 β actin(1:1000)一抗4℃孵育过夜。洗膜后滴加辣根过氧化物酶标记的二抗37℃孵育1h,DAB显色。扫描图片,Image Pro Plus7.0 软件分析条带灰度值,经内参 β actin 校正后进行统计学分析。

1.8 实时定量PCR检测

按照 Molecular research center 提供 TRIzol reagent 的操作步骤抽提总RNA,紫外分光光度计测得总RNA OD_{260/280}在1.8~2.0之间,用超纯水调整RNA浓度到1 μ g/ μ l。取cDNA样品2 μ l,上下游引物各0.8 μ l(10 μ M),SYBR Green Realtime PCR Master 混合液10 μ l,蒸馏水补足到20 μ l的反应体系。引物序列为ICAM-1:5'-AATGCCAGCTCGGAGGATCAC-3'(上游),5'-GCCGAGGACCATACAGCACGT-3'(下游);CD44:5'-GCAGCCAACACACAGGAGTAT-3'(上游),5'-TCGAAGGAATTGGGTAGGTCTGT-3'(下游); β -Actin:5'-AGGCCACAGCAAGAGAGGTA TC-3'(上游),5'-CGCAGCTCATTGTAGAAGGTG TG-3'(下游)。反应参数:95℃预变性60s,40个扩增循环,每循环95℃变性15s,60℃复性60s。反应结束后由实时定量PCR仪根据反应过程中产生的荧光信号进行数据处理得出Ct值。本次实验采用实时荧光定量PCR的相对定量法,以 β actin作为内参照,同时以空白组作为基准,空白组/对照或软坚散结组细胞RNA的表达量表示成空白组细胞的n倍。 $N = 2^{-\Delta\Delta Ct}$; $\Delta\Delta Ct = \text{对照或软坚散结组} \Delta Ct - \text{空白组} \Delta Ct = (Ct$

对照或软坚散结组 - Ct 对照或软坚散结组 β_{actin}) - (Ct 空白组 - Ct 空白组 β_{actin})。每次反应均做 5 个复孔。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 计量数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异用两个独立样本 t 检验, 组间率的比较采用 u 检验。

2 结果

2.1 各组子宫内膜异位病灶的荧光量比较

造模后各组分别灌胃 2 周, 处死小鼠并开腹, 置于荧光体视镜下可见异位种植的子宫内膜于腹壁下、肠管间、肝小叶下或脾周形成绿色团块状或星点状内膜异位病灶。对照组病灶体积较大, 荧光表达较强, 而中药组病灶体积较小, 荧光强度亦较弱。表 1 示, 对各组模型小鼠的平均荧光强度进行分析, 发现对照组的荧光强度较强, 而中药组平均荧光强度明显较对照弱, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠异位病灶凋亡率比较

对照组、中药组与空白组的小鼠异位病灶及所附着的腹膜组织凋亡率差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 且中药组与对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠异位灶的荧光 OD 值和凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	荧光 OD 值	凋亡率 (%)
空白组	5	—	2.71 $\pm$ 0.94
对照组	10	29109.27 $\pm$ 15081.91	24.07 $\pm$ 5.30 Δ
中药组	10	9637.93 $\pm$ 2489.54 **	32.82 $\pm$ 5.07 * Δ

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与空白组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组小鼠异位病灶 CD44、ICAM-1 蛋白表达的比较

表 2 示, 中药组 CD44、ICAM-1 蛋白表达显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

表 2 小鼠异位内膜 CD44、ICAM-1 蛋白和 mRNA 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	$\frac{CD44}{\text{蛋白表达}}$	$\frac{actin}{\text{mRNA}}$	$\frac{ICAM-1}{\text{蛋白表达}}$	$\frac{actin}{\text{mRNA}}$
对照组	10	1.7 $\pm$ 0.4	4.03 $\pm$ 0.30	2.5 $\pm$ 0.3	2.31 $\pm$ 0.43
中药组	10	0.2 $\pm$ 0.1*	1.46 $\pm$ 0.41*	0.7 $\pm$ 0.2*	1.95 $\pm$ 0.64*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

2.4 各组小鼠异位病灶 CD44、ICAM-1 mRNA 表达的比较

表 2 示, 中药组 CD44、ICAM-1 mRNA 表达显著低于对照组 ($P < 0.01$)。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 CD44、ICAM-1 mRNA 表达量 (空白组为 1), 对照组、中药组的

CD44 mRNA 表达量分别是空白组的 16.34、2.75 倍; 对照组、中药组的 ICAM-1 mRNA 表达量分别是空白组的 1.53、1.19 倍。

3 讨论

子宫内膜异位症发病机理至今不十分清楚, 本研究由于采用 EGFP 转基因小鼠子宫内膜同系异体腹腔注射诱发模型, 开腹后可在荧光体视镜下观察, 病灶由于表达 GFP 蛋白而被激发出绿色荧光, 发现病灶更敏感, 并且成像后可通过活体成像分析系统对病灶的荧光表达进行量化分析, 可直接比较病灶荧光表达的 OD 值, 大大减弱了结果分析过程中主观因素的干扰, 使得实验结果更加准确、客观。

Braun 等^[4]通过子宫内膜异位症模型显示异位内膜细胞先天具有抗凋亡、消除免疫和利用免疫反应建立异位灶的能力。Gebel 等^[5]亦证实异位内膜自发凋亡率显著降低, 说明异位内膜对凋亡的反应性下降, 这可能是异位内膜细胞异位种植的主要原因之一。本研究中由于空白组所取的是正常腹膜组织, 而对照组和中药组为异位内膜及其附着腹膜组织, 实验时间为 2 周, 可能异位内膜尚处于黏附、侵袭期, 还未有血管新生, 故异位内膜凋亡率高。而中药组的异位内膜凋亡率高于对照组, 提示中药有诱导其凋亡的作用, 组方中的薏苡仁亦有文献报道其提取物能诱导肿瘤细胞的凋亡^[6]。

子宫内膜异位症的病因中“经血逆流学说”被广泛接受, 近来研究表明内膜要成功地异位种植, “黏附、侵袭和血管新生”是三个必不可少的环节, 而内膜组织异位生长的首要步骤是通过一系列位于细胞表面的细胞黏附分子所介导内膜细胞与种植部位的黏附, 作为调节细胞间黏附的重要相关因子 ICAM-1、透明质酸受体 CD44 等起到重要作用。ICAM-1 是含有 505 个氨基酸的跨膜糖蛋白, 属于免疫球蛋白超家族, 存在于许多细胞的表面和细胞外基质, 包括子宫内膜腺上皮和间质细胞, 介导细胞-细胞、细胞-基质之间的黏附^[7]。有研究提示^[8], ICAM-1 在异位内膜种植初期, 使异位病灶逃避免疫监视中起重要作用。在腹膜子宫内膜异位症中, 表面看似无异样的腹膜细胞中存在着 ICAM-1 的高表达^[9], 说明 ICAM-1 在内异症形成的早期阶段参与逆流子宫内膜细胞的黏附和种植起重要作用。CD44 是一种细胞表面跨膜糖蛋白分子, 参与细胞与细胞、细胞与基质之间的特异性黏附, 调节细胞的增殖与移动。在卵巢癌腹膜种植的体外实验^[10]表明, 腹膜种植灶的肿瘤细胞显示出明显地与腹膜间皮结合的能力, 这种能力可被 CD44s 抗体所阻断; 而从腹水得到的

肿瘤细胞,其CD44s表达阴性,与间皮的结合能力也很弱。张觐宇等^[1]研究显示,异位内膜表达CD44明显高于在位内膜和正常人,认为异位内膜CD44的高表达增加了异位子宫内膜上皮细胞的游动性,导致异位病灶的广泛播散。本研究结果显示,软坚散结中药能降低CD44、ICAM-1的表达,起到减少异位内膜黏附的作用。

以上结果显示,软坚散结中药在子宫内膜异位症模型小鼠异位内膜的早期黏附中,通过降低异位内膜组织CD44、ICAM-1的表达以及诱导异位内膜组织的凋亡,明显降低了异位内膜的黏附和生长。

参考文献

[1]Witz CA· Cell adhesion molecules and endometriosis[J]· Semin Reprod Med, 2003, 21(2) : 173-182.
[2]Hirata T, Osuga Y, Yoshino O, et al· Development of an experimental model of endometriosis using mice that ubiquitously express green fluorescent protein[J]· Hum Reprod, 2005, 20(8) : 2092-2096.
[3]徐叔云,卞如濂,陈修· 药理实验方法学[M]· 3版· 北京:人民卫生出版社, 2002:202-204.
[4] Braun DP, Dmowski WP· Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response[J]· Curr Opin Obstet Gynecol, 1998, 10(5) : 365-369.

[5]Gebel HM, Braun DP, Tambur A, et al· Spontaneous apoptosis of endometrial tissue is impaired in women with endometriosis[J]· Fertil Steril, 1998, 69(6) : 1042-1047.
[6]曹国春,梁军,侯亚义· 薏苡仁油诱导乳腺癌细胞系MCFO-7细胞的凋亡及机理研究[J]· 实用临床医药杂志, 2007, 11(2) : 1-3.
[7]Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, et al· Alteration of E-cadherin, alpha- and beta-catenin mRNA expression in human uterine endometrium during the menstrual cycle[J]· Gynecol Endocrinol, 1996, 10(3) : 187-191.
[8]Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN· Immunobiology of endometriosis[J]· Fertil Steril, 2001, 75(1) : 1-10.
[9]Wu MH, Yang BC, Lee YC, et al· The differential expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and regulation by interferon-gamma during the pathogenesis of endometriosis[J]· Am J Reprod Immunol, 2004, 51(5) : 373-380.
[10]Cannistra SA, Kansas GS, Niloff J, et al· Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H[J]· Cancer Res, 1993, 53(16) : 3830-3838.
[11]张觐宇,史常旭· 子宫内膜异位症细胞粘附分子的表达及其意义[J]· 重庆医学, 2000, 29(5) : 404~406.
(收稿日期:2008-08-01;修回日期:2008-11-04)
[编辑:行之]

中国中医科学院针灸研究所北京国际针灸培训中心(国内培训部)
招 生 简 章

北京国际针灸培训中心自1975年创办以来,已经发展成为一所在全球享有盛誉的权威培训机构。中心一直以面向世界普及中医针灸知识为宗旨,为完成世界卫生组织“完善针灸培训方法,为世界各国医生提供培训”的任务而努力工作。30多年来,培训中心已为世界上100多个国家和地区的上万名医务工作者提供了中医针灸、推拿、中药、气功等方面的培训。

全国高级针灸进修班 学费:2260元。2009年3月6日~3月19日。此班为著名中医针灸专家临床经验传授班,属于国家级I类中医药继续教育项目,授予12学分。将主要讲授有关中风、类风湿、头痛、运动肌损伤、呼吸系、消化系、神经系、妇科、皮科等疾病治疗经验、验方效穴的临床介绍及火针、头针、耳针、眼针等多种针法临床应用和操作技巧。所聘专家,均为从事中医针灸临床30余年,知识渊博,技艺精湛,闻名中外的著名专家、名医。将邀请中国工程院院士、中国针灸学会高级顾问程莘农教授;中国针灸学会高级顾问、“三通法”创始人、北京针灸学会会长贺普仁教授;中国针灸学会高级顾问田从豁教授;及王岱、张士杰、金伯华、周德安、王居易、张世雄、李定忠、王本显、蒋达树、卢鼎厚、金嫣丽、王京喜、吴中朝、杨威、杨金生、彭增福等数十名著名专家亲自授课,表演手法、传授特技、答疑解惑。通过学习,学员的医术均有显著提高,并成为当地针灸骨干。持本班结业证书上岗、出国均有效。

全国高级推拿进修班及高级按摩师资格取证班 学费2280元。2009年3月20日~4月2日。本着使学员学到和掌握更丰富、更全面的推拿、按摩理论知识和技能,顺利通过考核,优先竞争上岗的办学宗旨,将高级推拿进修班与高级按摩师取证班合二为一,我校重视理论联系实际,突出名师指导下的操练,使学员打下扎实的技术功底,练就一身过硬的技术本领,通过多期培训,考试通过率达99%,此班将邀请著名骨伤推拿专家臧福科、赵永刚等数位教授亲自授课和指导操练。学习班结束后,考核通过颁发国家高级按摩师资格证书及中国中医科学院针灸研究所北京国际针灸培训中心结业证书。该班请提前报名,报名时务必将身份证复印件,蓝底彩色2寸照片二张寄到中心。

全国高级影像诊断进修班 学费:1680元。2009年4月4日~9日。

全国实用针灸、推拿(初级)进修班 学费:1200元。2009年2月25日~3月6日。

联系地址:北京市东直门内南小街16号中国中医科学院针灸研究所北京国际针灸培训中心 邮编:100700 电话/传真:010-84049008,64014411 转2781,手机短信:13391675516,13671280701,联系人:赵长龙,欢迎咨询并索取2009年招生简章。