

桂枝茯苓胶囊治疗大鼠子宫肌瘤及其机制研究

孙 兰^{1,2}, 宗绍波^{1,2}, 吕耀中^{1,2}, 李卓琼^{1,2}, 周 军^{1,2}, 王振中^{1,2*}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: **目的** 探讨桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤大鼠的治疗作用及其机制。**方法** 采用注射苯甲酸雌二醇和黄体酮复制大鼠子宫肌瘤模型, 造模大鼠按体重随机分为模型组、他莫昔芬(枸橼酸他莫昔芬片 3.6 mg/kg)组以及桂枝茯苓胶囊 0.14、0.27、0.54 g/kg 组, 另设对照组。连续给药 8 周后处死大鼠, 取子宫、脾脏、胸腺并计算其脏器系数, 比较子宫病理评分和组织形态, 放射免疫分析方法检测血清中雌二醇(E2)、孕酮(P)及子宫组织中表皮生长因子(EGF)水平。**结果** 桂枝茯苓胶囊显著降低大鼠子宫系数, 减轻子宫壁平滑肌增生, 显著降低血清 E2 和子宫组织 EGF 水平。**结论** 桂枝茯苓胶囊对大鼠子宫肌瘤具有治疗作用, 其作用机制可能与降低血清 E2、子宫组织 EGF 水平有关。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; 子宫肌瘤; 大鼠; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2015)04-0362-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.04.003

Therapeutic of Guizhi Fuling Capsule on uterine leiomyoma in rat and its mechanism

SUN Lan^{1,2}, ZONG Shao-bo^{1,2}, Lü Yao-zhong^{1,2}, LI Zhuo-qiong^{1,2}, ZHOU Jun^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd, Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To discuss the therapeutical effect of Guizhi Fuling Capsule on uterine leiomyoma in rats and its mechanism. **Methods** Uterine leiomyoma model in rats was made by injection estradiol benzoate and progesterone. The rats with uterine leiomyoma were randomly divided into model group, tamoxifen (Tamoxifen Citrate Tablets 3.6 mg/kg) group, and Guizhi Fuling Capsule (0.14, 0.27, and 0.54 g/kg) groups. There was also a control group. After treatment for eight weeks, the rats were killed by cervical dislocation. The organ coefficients of the uterus, thymus, and spleen were calculated. Pathological score and pathological changes of uterus tissue were detected. The levels of estradiol (E2), progesterone (P) in serum and epidermal growth factor (EGF) in uterus tissue serum were determined by radioimmunoassay. **Results** After treatment, Guizhi Fuling Capsule significantly reduced the uterus coefficient, alleviated hyperplasia of smooth muscle in uterus wall, significantly reduced the levels of E2 in serum and EGF in uterine tissue of rats. **Conclusion** Guizhi Fuling Capsule has therapeutical effect on uterine leiomyoma in rat, and the mechanism may be associated with reduction of E2 levels in serum and EGF levels in uterine tissue.

Key words: Guizhi Fuling Capsule; uterine leiomyoma; rat; mechanism

子宫肌瘤是女性生殖系统最常见的良性肿瘤, 发病率很高。西医对子宫肌瘤的治疗有手术、药物等方法。桂枝茯苓胶囊处方来源于东汉张仲景《金匮要略》, 由桂枝、白芍、茯苓、牡丹皮、桃仁组成^[1], 具有活血、化瘀、消癥之功效, 临床用于盆腔炎、原发性痛经及子宫肌瘤, 疗效显著^[2-3]。本实验采用

雌孕激素复制大鼠子宫肌瘤模型, 观察桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤的治疗作用, 并探讨其作用机制, 为临床应用提供实验基础。

1 材料

1.1 动物

SD 大鼠, 清洁级, 雌性, 体质量 180~220 g,

收稿日期: 2015-01-21

基金项目: 国家科技重大专项课题 (2013ZX09402203)

作者简介: 孙 兰, 副主任中药师, 从事中药复方作用机制与物质基础研究。Tel: (0518)81152297 E-mail: sunlan2012@126.com

*通信作者 萧 伟, 男, 研究员级高级工程师, 博士生导师, 研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152367

王振中, 博士, 高级工程师, 研究方向为中药新药的研究与开发。E-mail: wzzh-nj@163.net

购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (沪) 2008-0016。

1.2 药物与试剂

桂枝茯苓胶囊, 江苏康缘药业股份有限公司, 规格 0.31 g/粒, 批号 130816; 枸橼酸他莫昔芬片, 扬子江药业集团有限公司, 规格 10 mg/片, 批号 13062411; 水合氯醛, 国药集团化学试剂有限公司, AR, 规格 250 g, 批号 20130304; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 批号 20111219; 苯甲酸雌二醇注射液, 宁波第二激素厂, 规格 2 mL : 4 mg, 批号 20131116; 黄体酮注射液, 上海通用药业股份有限公司, 规格 1 mL : 20 mg, 批号 120708; 生理盐水, 规格 100 mL/瓶, 批号 130908, 山东齐都药业股份有限公司; 雌二醇放免试剂盒 (批号 20140720)、孕酮放免试剂盒 (批号 20140724)、表皮生长因子放免试剂盒 (批号 20140712) 均由北京华英生物技术研究所提供。

1.3 仪器

电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; Centrifuge 5840 型冷冻离心机, Eppendorf 公司; R-911 全自动放免计数仪, 中国科技大学实业总公司。

2 方法

2.1 模型复制^[4-7]

健康 SD 大鼠 60 只, 随机选取 10 只为对照组, 后肢 im 生理盐水 0.1 mL/只, 3 次/周, 共 18 周。其余 50 只注射雌孕激素进行模型复制, 后肢 im 苯甲酸雌二醇 0.1 mL/只 (含药量 0.2 mg), 3 次/周, 共 18 周, 第 11 周开始加黄体酮 0.05 mL/只 (含药量 1 mg), 2 次/周, 共 8 周。

2.2 分组及给药

造模后第 11 周开始灌胃给药, 50 只造模大鼠按体质量随机分为 5 组, 即模型组、他莫昔芬 (枸橼酸他莫昔芬片 3.6 mg/kg, 剂量设置依据: $40 \text{ mg/d} \times 0.018 \times 5 = 3.6 \text{ mg/kg}$) 组、桂枝茯苓胶囊低、中、高剂量组 (0.14、0.27、0.54 g/kg, 剂量设置依据: $0.31 \text{ g/粒} \times 9 \text{ 粒} \div 60 \times 35 \div 6 = 0.27 \text{ g/kg}$, 以此剂量为等效剂量, 2 倍剂量 0.54 g/kg 为高剂量, 1/2 倍剂量 0.14 g/kg 为低剂量)。对照组和模型组 ig 给予等体积 0.5% CMC-Na 混悬液, 枸橼酸他莫昔芬组 ig 给予枸橼酸他莫昔芬片混悬液 3.6 mg/kg, 桂枝茯苓胶囊高、中、低剂量组 ig 给予桂枝茯苓胶囊混悬液 (0.54、0.27、0.14 g/kg), 1 次/d, 连续 8 周,

ig 给药体积均为 10 mL/kg。

2.3 指标测定

给药第 8 周末, 用 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血 5 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 放射免疫分析方法检测血清中雌二醇 (E2)、孕酮 (P) 水平。

取子宫、脾脏、胸腺并称定质量, 计算子宫、脾脏、胸腺脏器系数。

子宫称定质量后, 取左侧子宫放入 10% 甲醛溶液中, 石蜡包埋, HE 染色, 检测子宫病理, 病理观察指标为: (1) 子宫腔有无减小或扩张; (2) 子宫腔内膜上皮细胞有无变性、坏死等病变; (3) 子宫壁炎细胞浸润状况; (4) 子宫壁平滑肌有无增生; 指标 (1)、(2) 根据病变由轻到重的程度分别记为 0~4 分: 无宫腔扩大或内膜上皮细胞变性、坏死的记为 0 分, 极轻度记为 1 分, 轻度病变范围 $<1/3$ 记为 2 分, 中度病变、范围在 $1/3 \sim 2/3$ 记为 3 分, 重度病变、范围在 $2/3$ 以上者记 4 分。指标 (3) 记为 0~3: 无炎细胞浸润记为 0 分, 少量记为 1 分, 黏膜固有层有少量或灶状、达肌层记为 2 分, 多数散在或层状浸润、并累及全层记为 3 分。指标 (4) 记为 0~3 分: 子宫壁层平滑肌厚薄无明显变化记为 0 分, 轻度弥漫性增生记为 1 分, 在上述基础上局部增厚, 致肌层厚薄不一, 记为 2 分, 多处平滑肌增生、致宫壁高度厚薄不一, 严重时伸入固有层或子宫系膜区的记为 3 分。累加所有分数。

右侧子宫采用放射免疫分析方法检测表皮生长因子 (EGF) 水平。

2.4 数据处理和分析

实验数据用 GraphPad Prism v5.0 统计作图软件分析, 组间比较采用 two-way ANOVA 分析, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对血清 E2、P 水平的影响

与对照组比较, 模型组血清 E2、P 水平显著升高 ($P < 0.001$ 、 0.05); 与模型组比较, 他莫昔芬组血清 E2 水平显著降低 ($P < 0.05$), 桂枝茯苓胶囊 0.27、0.54 g/kg 剂量组血清 E2 水平显著降低 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

3.2 对子宫、脾脏、胸腺系数的影响

与对照组比较, 模型组大鼠子宫系数显著增加, 脾脏及胸腺系数显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 他莫昔芬组大鼠子宫系数显著减少, 脾

脏及胸腺系数显著增加 ($P<0.001$ 、 0.05), 桂枝茯苓胶囊 0.27 、 0.54 g/kg 剂量组大鼠子宫系数显著降低 ($P<0.01$ 、 0.05), 0.54 g/kg 剂量组大鼠脾脏系

表1 桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤大鼠血清 E2、P 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of Guizhi Fuling Capsule on serum levels of E2 and P in uterine leiomyoma rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	E2/(pg·mL ⁻¹)	P/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	55.15±8.62	1.96±0.36
模型	—	276.25±66.76 ^{***}	2.85±1.17 [*]
他莫昔芬	3.6 mg·kg ⁻¹	195.04±50.82 [#]	2.02±0.46
桂枝茯苓	0.14	225.50±79.43	2.14±1.19
胶囊	0.27	211.09±56.30 [#]	2.05±0.97
	0.54	177.68±45.76 [#]	2.58±0.87

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{***} $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$

^{*} $P<0.05$ ^{***} $P<0.001$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group

表2 桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤大鼠子宫、脾脏及胸腺系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effects of Guizhi Fuling Capsule on uterus, spleen and thymus coefficient in uterine leiomyoma rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	子宫系数/(g·100 g ⁻¹)	脾脏系数/(g·100 g ⁻¹)	胸腺系数/(g·100 g ⁻¹)
对照	—	0.16±0.03	0.20±0.02	0.11±0.01
模型	—	0.32±0.10 ^{***}	0.16±0.02 ^{**}	0.08±0.02 ^{**}
他莫昔芬	3.6 mg·kg ⁻¹	0.14±0.01 ^{####}	0.18±0.02 [#]	0.10±0.02 [#]
桂枝茯苓胶囊	0.14	0.25±0.06	0.18±0.06	0.08±0.02
	0.27	0.24±0.03 [#]	0.18±0.05	0.08±0.03
	0.54	0.22±0.04 ^{###}	0.19±0.04 [#]	0.09±0.02

与对照组比较: ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$

^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs model group

表3 桂枝茯苓胶囊对大鼠子宫肌瘤病理评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of Guizhi Fuling Capsule on pathological score of uterine leiomyoma rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	病理评分
对照	—	0.90±0.88
模型	—	6.50±1.65 ^{***}
他莫昔芬	3.6 mg·kg ⁻¹	0.80±0.59 ^{##}
桂枝茯苓胶囊	0.14	6.40±2.07
	0.27	4.90±0.99 [#]
	0.54	4.60±2.01 [#]

与对照组比较: ^{***} $P<0.001$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

^{***} $P<0.001$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

数显著增加 ($P<0.05$)。结果见表2。

3.3 对大鼠子宫组织病理影响

子宫由子宫内膜、肌层及外膜3层组成, 内膜衬覆单层柱状上皮, 固有层内有子宫腺体、血管、淋巴管, 并有少量嗜酸性白细胞, 肌层内层为环形肌, 外层为纵行肌。对照组大鼠宫壁固有层或肌层有少量炎细胞浸润, 炎细胞类型以嗜酸性粒细胞为主, 无明显增厚或变薄, 模型组主要表现为子宫壁平滑肌弥漫性增生致肌层增厚, 部分表现为局限性增生, 肌层排列紊乱, 严重者增生的平滑肌伸入子宫系膜区, 增生的平滑肌细胞体积较正常平滑肌大, 排列紊乱。胞核增大, 呈短梭形或椭圆形, 核仁清晰, 但无明显异型性, 无明显核分裂像。桂枝茯苓胶囊 0.27 、 0.54 g/kg 剂量组均有减轻子宫壁平滑肌增生的作用, 与模型组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。结果见表3、图1。

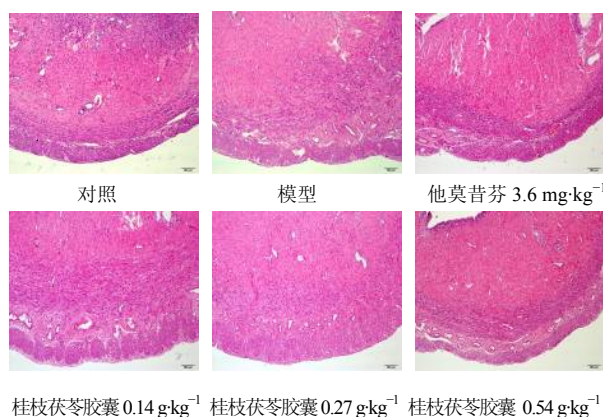


图1 桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤大鼠子宫组织形态的影响

Fig. 1 Effects of Guizhi Fuling Capsule on uterus pathology in uterine leiomyoma rats

3.4 对子宫组织 EGF 水平的影响

与对照组比较,模型组子宫组织 EGF 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,他莫昔芬组子宫组织 EGF 水平显著降低 ($P<0.05$),桂枝茯苓胶囊 0.27、0.54 g/kg 剂量组子宫组织 EGF 水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01)。结果见表 4。

表 4 桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤大鼠子宫组织表皮生长因子水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of Guizhi Fuling Capsule on levels of EGF in uterine leiomyoma rats ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组 别	剂量/(g·kg ⁻¹)	EGF/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	0.70±0.32
模型	—	0.96±0.14 [*]
他莫昔芬	3.6 mg·kg ⁻¹	0.73±0.21 [#]
桂枝茯苓胶囊	0.14	1.10±0.57
	0.27	0.72±0.31 [#]
	0.54	0.62±0.16 ^{##}

与对照组比较: ^{*} $P<0.05$;与模型组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$

^{*} $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs model group

4 讨论

雌激素可促进子宫肌瘤发生、发展。孕激素拮抗剂米非司酮可以抑制子宫肌瘤的生长,因此孕激素在子宫肌瘤的发生、发展中也有重要作用。雌激素和孕激素通过自分泌和旁分泌互相调节,其联合作用使细胞 DNA 合成及有丝分裂能力进一步增强,从而刺激肌瘤的生长^[8]。因此,本实验采取肌肉注射外源性雌激素、孕激素复制实验性大鼠子宫肌瘤模型。

实验结果表明,与对照组比较,模型组大鼠血清 E2、P 水平显著升高,子宫系数显著增大,组织学显示子宫内膜腺体大量增生,子宫肌层增厚。说明雌激素、孕激素同时采用的造模方法是成功的。

桂枝茯苓胶囊能够降低血清中雌二醇水平,降

低子宫系数,减轻子宫壁平滑肌增生,表明桂枝茯苓胶囊对子宫肌瘤具有一定的治疗作用。

目前认为肌瘤增殖局部产生的表皮生长因子与性激素之间的相互调节在肌瘤发展中起重要作用^[9]。本研究发现,桂枝茯苓胶囊组与模型组比较,子宫组织表皮生长因子也显著下降,结果提示桂枝茯苓胶囊治疗子宫肌瘤与降低雌二醇和表皮生长因子水平相关。

参考文献

- [1] 王洪庆,刘 超,方莲花,等.桂枝茯苓胶囊化学成分研究(Ⅳ)[J].中草药,2013,44(11):1386-1390.
- [2] 王刘英.桂枝茯苓胶囊治疗子宫肌瘤 70 例疗效观察[J].云南中医中药杂志,2003,24(2):27.
- [3] 史党民,孙国珍.桂枝茯苓胶囊治疗 60 例子宫肌瘤临床疗效观察[J].中草药,2000,31(5):365.
- [4] 陈海刚.雌激素制备大鼠子宫肌瘤动物模型[D].北京:北京协和医学院,2009.
- [5] Porter K B, Tsibris J C, Nicosia S V, et al. Estrogen-induced guinea pig model for uterine leiomyomas: do the ovaries protect? [J]. *Biol Reprod*, 1995, 52(4): 824-832.
- [6] Mozzachio K, Linder K, Dixon D. Uterine smooth muscle tumors in potbellied pigs (*Sus scrofa*) resemble human fibroids: a potential animal model [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(4): 402-407.
- [7] 刘文苓,肖承惊,赵凤志,等.雌孕激素负荷大鼠子宫平滑肌增殖及肌瘤内消制剂的干预作用[J].辽宁中医杂志,2003,30(5):346-347.
- [8] Wu X, Wang H, Englund K, et al. Expression of progesterone receptors A and B and insulin-like growth factor-I in human myometrium and fibroids after treatment with a gonadotropin-releasing hormone analogue [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(5): 985-993.
- [9] 李卫平,林其德,严隽鸿,等.子宫平滑肌细胞增殖与 EGFR 关系研究[J].上海医学杂志,2002,25(4):202-204.