

儿黄散白及胶双层膜对宫颈癌 HeLa 细胞增殖和凋亡作用及毒性、刺激性研究

王艳宏¹, 盛开¹, 李洪晶¹, 杨柳¹, 关枫¹, 韩凤娟^{2*}

1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 通过儿黄散白及胶双层膜 (EHGBF) 对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖抑制及凋亡作用研究和急性毒性试验、皮肤刺激性试验、安全性试验, 探讨其有效性和安全性。方法 采用 MTT 法考察不同浓度 (0.1、1.0、5.0、10.0 mg/mL) 的 EHGBF、无白及胶儿黄散双层膜、白及胶双层膜及空白基质膜对 HeLa 细胞的增殖抑制作用; 流式细胞术检测 EHGBF 对 HeLa 细胞凋亡的影响; 通过膜剂阴道给药大鼠急性毒性试验, 对家兔完整皮肤及破损皮肤的刺激性试验, 及对用药后家兔阴道取材肉眼观察及石蜡切片病理学观察, 研究 EHGBF 对阴道刺激性。结果 空白基质膜对 HeLa 细胞无增殖抑制作用, EHGBF、白及胶双层膜、无白及胶儿黄散双层膜对 HeLa 细胞均发挥显著增殖抑制作用 ($P < 0.05$), 作用强弱为 EHGBF > 白及胶双层膜 > 无白及胶儿黄散双层膜; 经过 1、5、10 mg/mL 浓度的 EHGBF 处理后, HeLa 细胞凋亡率与对照组比较均显著升高 ($P < 0.05$); EHGBF 在大剂量使用下无致死性, 对皮肤及阴道几乎没有刺激性。结论 EHGBF 可抑制人宫颈癌 HeLa 细胞增殖并促进其凋亡, 无急性毒性, 对皮肤无刺激性, 对阴道黏膜几乎没有刺激性, 安全性较好。

关键词: 儿黄散白及胶双层膜; HeLa 细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 毒性; 刺激性

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 06-1033-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.009

Effect of Erhuangsan gum-bletilla double-film on proliferation and apoptosis of cervical cancer HeLa cells and its toxicity and irritation

WANG Yanhong¹, SHENG Kai¹, LI Hongjing¹, YANG Liu¹, GUAN Feng¹, HAN Fengjuan^{2*}

1. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the efficacy and safety of skin medication for human cervical cancer with HeLa cell proliferation inhibition and apoptosis by Erhuangsan gum-bletilla double-film (EHGBF). **Methods** MTT assay was used to investigate the effects of different concentrations (0.1, 1.0, 5.0, 10.0 mg/mL) of EHGBF, Erhuangsan double-film without gum-bletilla, gum-bletilla double-film and blank matrix film on cell proliferation inhibition. The effects of apoptosis were detected by flow cytometry. The vaginal irritancy of the film was investigated by the vaginal acute toxicity test of the film, the irritating test of the intact skin and the damaged skin of the rabbit, and the visual observation of the vaginal material of the rabbit after the administration and the pathological observation of the paraffin section. **Result** The blank matrix membrane had no inhibitory effect on HeLa cell proliferation, while EHGBF, gum-bletilla double-film, and erhuangsan double-film without gum-bletilla had significant inhibitory effect on HeLa cell proliferation ($P < 0.05$). The inhibitory effect on the proliferation of HeLa cells was that EHGBF > gum-bletilla double-film > erhuangsan double-film without gum-bletilla. The apoptosis rate of HeLa cells treated with EHGBF was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). EHGBF was not lethal at high doses, and had little irritation to the skin and vagina. **Conclusion** EHGBF can inhibit the proliferation and promote apoptosis of human cervical cancer HeLa cells, no acute toxicity and irritation to the skin, almost no irritating to vaginal mucosa, and good safety.

Key words: Erhuangsan gum-bletilla double-film; HeLa cells; cell proliferation; apoptosis; toxicity; irritation

收稿日期: 2019-12-10

基金项目: 哈尔滨市应用技术与开发项目(2016RAXXJ047); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(YJSCX2017058)

第一作者: 王艳宏, 博士, 教授, 从事中药经皮给药研究、中药药性理论研究。Tel: (0451)87266893 E-mail: wang.yanhong@163.com

*通信作者: 韩凤娟, 博士, 教授, 从事中西医结合治疗妇科肿瘤研究。Tel: (0451)82119168 E-mail: hanfengjuan2004@163.com

宫颈癌是通常发生在宫颈阴道部或移行带的鳞状上皮细胞及颈管内膜的柱状上皮细胞交界处的恶性肿瘤,是常见妇科恶性肿瘤之一。宫颈癌是全球女性第四大常见恶性肿瘤,发病机制尚未明确^[1],在中国,宫颈癌已成为中青年女性中的第二大高发恶性肿瘤^[2],仅次于乳腺癌,且经临床病例显示,宫颈癌患者逐渐趋于年轻化,严重威胁女性的生命健康。在临床上,早期患者无明显症状,随着病情发展,可能出现阴道流血、阴道排液,晚期可能表现出贫血、恶病质等症状^[4]。每年宫颈癌新发病例13.15万,占到全球癌症病例的28%以上,同时每天死于宫颈癌的患者大约5万例左右^[5-6]。目前,宫颈癌的治疗采用以手术、化疗、放疗为主的综合治疗方法,有效的化疗能提高治愈率和生存率^[3]。

儿黄散为我院名老中医王秀霞教授通过多年的临床实践经验提炼、总结的有效方剂,具有活血化瘀、清热解毒、止血消肿、祛腐生肌功效^[7]。儿黄散的主要组分有儿茶、黄连、明矾、白及等,方中儿茶具有止血生肌敛疮及辅助黄连起清热燥湿作用,而黄连则主要起清热燥湿、泻火解毒、清除体内风寒湿热的作用,白及和明矾具有生肌敛疮、止痒的功效。经现代药理学实验^[8-9]证明,儿黄散可以阻断宫颈浸润癌的发生,有促使宫颈癌前病变细胞向正常转化的作用,有减轻宫颈局部炎症反应、提高宫颈局部免疫功能的作用。

本实验通过体外培养人宫颈癌 HeLa 细胞,检测儿黄散白及胶双层膜(erhuangsan gum-bletilla double-film, EHGBF)对 HeLa 细胞增殖抑制能力及细胞凋亡的影响,以及膜剂对家兔皮肤及阴道的刺激作用进而初步判断药物的安全性。为进一步将 EHGBF 作为宫颈癌的一个有效的治疗药物推向临床,为广大宫颈癌患者减少手术、放疗和化疗带来的痛苦,提供理论依据。

1 材料

1.1 主要试剂

白及、明矾、儿茶、黄连药材(哈药集团世一堂中药饮片有限责任公司),经黑龙江中医药大学药学院孙慧峰教授鉴定,白及为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎;明矾为硫酸盐类矿物明矾石经加工提炼制成,主含含水硫酸铝钾 $[KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O]$;儿茶为豆科植物儿茶 *Acacia catechu* (L. f.) Willd. 的去皮枝、干的干燥煎膏;黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎;且均符合2015年版《中国药典》一部的相关要求。

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、甘油、液体石蜡(国药集团化学试剂有限公司);胎牛血清(FBS)(杭州四季青生物工程有限公司);胰酶消化液、青-链霉素、甲基噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)(碧云天生物技术有限公司);二甲苯(济南创世化工有限公司);中性树胶;RPMI-1640培养基(美国 Hyclone 公司);空白基质膜(自制);EHGBF(自制);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 主要仪器

多功能酶标仪(上海美谷分析仪器有限公司);倒置显微镜(CKX41SF, TOKYO, JAPAN);透射电子显微镜(荷兰 Philip 公司);流式细胞仪(FACSCalibur, 美国 BD 公司);恒温细胞培养箱(190D STANDRAD, 北京诚茂兴业科技有限公司);多功能兔固定架(YLS-Q3);医用病理切片仪(VCM-2508III, 新乡市维克科教仪器有限公司);大鼠灌胃器(上海玉研科学仪器有限公司)。

1.3 实验细胞与动物

人宫颈癌 HeLa 细胞(哈尔滨医科大学附属第二医院),HeLa 细胞在含有 10% FBS 及 1% 青-链霉素的 RPMI-1640 培养基中贴壁生长,且将其置于 37 °C、5% CO₂、90% 相对湿度的培养箱中培养。

普通级日本大耳白兔 15 只,体质量 2.0~2.2 kg,日龄 180 d,雌性;清洁级 Wistar 大鼠 15 只,体质量 160~200 g,日龄 60 d,雌性;均由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号 SCXK(黑)2015-003。

2 方法

2.1 各供试膜的制备

参照本课题组前期研究^[10],黄连明矾药膜层最优处方为 HPMC 质量分数 1.15%、白及胶质量分数 3.41%,甘油体积分数 10.02%;儿茶药膜层最优处方为 CMC-Na 质量分数 1.61%,白及胶质量分数 3.81%,甘油体积分数 8.49%。按最优处方取白及胶和 HPMC 加水溶胀,再加入甘油及黄连、明矾细粉搅匀,制备 50 mL,得黄连明矾药膜层基质胶浆;同法得儿茶药膜层基质胶浆;采用液体石蜡作为脱模剂,涂布、烘干,即得 EHGBF;同法制得无白及胶儿黄散双层膜、白及胶双层膜和空白基质膜。

2.2 各供试膜对 HeLa 细胞增殖抑制实验

2.2.1 供试药物的配制 由 50 mL 黄连明矾药膜层

基质胶浆及50 mL儿茶药膜层基质胶浆烘干得到的EHGBF中所含的黄连总生物碱、明矾、儿茶3种主药的总量约为1.7 g^[10],将所有EHGBF溶于170 mL无菌RPMI-1640培养液中,经过0.22 μm微孔滤膜过滤除菌除杂质,可得10 mg/mL EHGBF母液备用;同法可制得10 mg/mL无白及胶儿黄散双层膜母液、白及胶膜母液、空白膜母液备用;各母液临用前用无菌RPMI-1640培养液稀释成不同浓度即可。

2.2.2 MTT法检测各供试膜对HeLa细胞增殖抑制的影响 取对数生长期的HeLa细胞制成单细胞悬液,调整细胞浓度为1×10⁴/mL,接种于96孔板中,每孔200 μL;将各供试膜母液预先稀释为0、0.1、1.0、5.0、10.0 mg/mL的一系列浓度,每个浓度设立4个复孔,同时设立不加药物的对照组;在37℃、5% CO₂条件下培养24、48、72 h,加入20 μL MTT溶液(5 mg/mL),孵育4 h,加入150 μL DMSO,振荡10 min。用酶标仪测定570 nm波长处的吸光度(A)值^[11],计算细胞增殖抑制率,并应用SPSS软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)值^[12]。细胞增殖抑制率公式为:

$$\text{增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 流式细胞术测定细胞凋亡率

取对数生长期HeLa细胞经胰酶消化后制成单细胞悬液,调整细胞浓度为1×10⁶/mL,以每孔1 mL接种于6孔板中,培养24 h;分别加入质量浓度为0.1、1.0、5.0、10.0 mg/mL的EHGBF,每孔1 mL,将剩余两孔中加入1 mL新鲜培养液,培养24 h,收集上清液和细胞,1 000 r/min离心5 min弃去上清,收集细胞,PBS洗涤1次,加入300 μL Annexin V-FITC重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC和10 μL PI混

匀,25℃避光孵育20 min^[13],1 h内上机检测。

2.4 EHGBF大鼠阴道给药急性毒性试验

取Wistar大鼠15只,自由饮水,禁食24 h,随机分为对照组、空白基质组、EHGBF组,一次性给予药量为5 g/kg(以膜的质量计),给药体积为5 mL/kg,为大鼠的最大承受量,用灌胃器将膜剂推入阴道内不流出为最大承受剂量,对照组给予生理盐水5 mL/kg,使用灌胃器将药物推入大鼠阴道内,并用脱脂棉塞住避免药物渗出。给药后连续观察7 d,观察内容包括有无死亡、体质量、自主活动、行为及毛色。

2.5 EHGBF皮肤刺激性试验^[14]

取家兔5只,每只家兔背部两侧对称脱毛,左侧用消毒后的刀片轻轻划4个相距2 cm左右的井字形伤口,以轻微渗血为度,作为破损皮肤,另一侧作为完整皮肤;分别将生理盐水、空白基质膜、EHGBF的黄连明矾药膜层一侧及儿茶药膜层一侧依次轻按于在左侧破损皮肤试验处,右侧完整皮肤试验区域相同位置贴敷相同的膜剂;连续给药7 d,每天1次,每次维持粘附时间4~6 h,在每次去除药物后立即观察及记录红斑及水肿形成,其中刺激指数平均值=(红斑形成总分+水肿形成总分)/动物总数;末次给药去除膜剂后,用温水清洗粘贴部位。观察去除受试物后1、24、72 h和7 d时用药部位组织有无充血、水肿和坏死等变化及变化恢复情况和时间^[15-16]。根据评分标准(见表1、2),对红斑及水肿进行评分。

2.6 EHGBF阴道安全性试验

取家兔9只,随机分为对照组、空白基质组、EHGBF组,每组3只;每天给药1次,连续给药7 d,将膜剂1.5 g(保证成膜的最大给药量,量过多会析

表1 皮肤刺激反应评分标准

Table 1 Skin irritation reaction score standard

红斑	分值	水肿	分值
无红斑	0	无水肿	0
轻度红斑(勉强可见)	1	轻度水肿(勉强可见)	1
中度红斑(明显可见)	2	中度水肿(明显隆起)	2
重度红斑	3	重度水肿(皮肤隆起1mm,轮廓清楚)	3
紫红色红斑到轻度焦痂形成	4	严重水肿(皮肤隆起超过1mm,范围扩大)	4

表2 皮肤刺激强度评价标准

Table 2 Skin stimulus intensity evaluation standard

平均积分值	评价
0~0.49	无刺激性
0.50~1.99	轻度刺激性
2.00~5.99	中度刺激性
6.00~8.00	强刺激性

出,能从外观看有到不均匀颗粒)推入阴道4~5 cm深处,固定4 h,观察家兔外阴有无红肿及分泌物增多等现象,于末次给药后24 h后处死家兔,进行切片并观察^[17-18]。按照阴道黏膜的刺激性反应进行评分(表3),最大分为16,算出刺激指数^[19],按照评分标准进行刺激强度分级(表4)。

表3 阴道刺激反应评分标准

Table 3 Vaginal stimulation intensity evaluation standard

上皮组织	分值	白细胞浸润(每个高倍视野)	分值	血管充血	分值	水肿	分值
正常、完好无损	0	无	0	无	0	无	0
细胞变性或变扁平	1	极少(<25)	1	极少	1	极少	1
组织变形	2	轻度(26~50)	2	轻度	2	轻度	2
局部糜烂	3	中度(51~100)	3	中度	3	中度	3
广泛糜烂	4	重度(>100)	4	重度	4	重度	4

表4 阴道刺激强度分级

Table 4 Vaginal stimulation intensity grading

阴道黏膜刺激指数	阴道黏膜刺激反应强度
<1	无
1~<5	极少
5~<9	轻度
9~12	中度
≥12	重度

2.7 统计分析

应用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各供试膜对 HeLa 细胞增殖抑制作用的影响

如表 5 所示, 不同浓度的空白基质膜组 HeLa 细胞的存活率均能达到 90% 以上, 且与对照组比较无显著性差异, 表明空白基质膜对 HeLa 细胞无增殖抑制作用。

表5 空白基质膜对 HeLa 细胞存活率影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 5 Influence of blank matrix film on survival rate of HeLa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100	100	100
空白基 质膜	0.1	97.30±2.26	95.86±1.05	94.97±1.11
	1.0	94.65±1.88	95.31±1.25	95.34±1.11
	5.0	96.19±2.45	94.95±1.41	91.32±2.56
	10.0	95.97±1.33	94.92±1.73	95.99±1.15

如表 6、7、8 所示, 不同浓度的 EHGBF 处理 24、48、72 h 后的 HeLa 细胞的增殖抑制率与对照组比较均显著升高 ($P < 0.05$); 不同浓度的无白及胶儿黄散双层膜、白及胶双层膜处理 24、48、72 后的 HeLa 细胞的抑制率与对照组比较, 除 0.1 mg/mL 处理 24 h 外均显著升高 ($P < 0.05$); 且抑制作用呈时间、浓度相关性, 但无白及胶儿黄散双层膜及白及胶双层膜

表6 EHGBF对HeLa细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Inhibition of HeLa cells growth by EHGBF ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
EHGBF	0.1	3.09±0.98*	7.09±3.74*	10.07±2.26*
	1.0	10.08±2.43*	17.84±2.35*	24.97±1.69*
	5.0	39.21±1.85*	47.41±1.06*	54.60±2.47*
	10.0	63.66±2.27*	70.48±0.73*	73.94±3.55*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

表7 无白及胶儿黄散双层膜对 HeLa 细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 7 Inhibition of HeLa cells growth by Erhuangsan double-film ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
无白及胶 儿黄散 双层膜	0.1	1.77±1.17	5.61±1.02*	7.94±2.32*
	1.0	6.31±2.66*	11.78±2.36*	18.14±1.15*
	5.0	33.03±1.09*	40.30±1.11*	42.34±1.78*
	10.0	52.69±1.29*	57.68±0.98*	63.87±1.68*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

表8 白及胶双层膜对 HeLa 细胞生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 8 Inhibition of HeLa cells growth by gum-bletilla double-film ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	抑制率/%		
		24 h	48 h	72h
对照	—	0	0	0
白及胶 双层 膜	0.1	2.49±1.20	5.59±1.25*	8.94±2.71*
	1.0	6.43±0.93*	15.24±1.72*	18.50±3.72*
	5.0	30.61±2.40*	40.91±2.57*	46.18±1.46*
	10.0	57.92±1.00*	61.46±1.19*	67.81±2.52*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

对 HeLa 细胞增殖抑制率均低于 EHGBF, 增殖抑制作用强弱为 EHGBF > 白及胶双层膜 > 无白及胶儿黄散双层膜, 提示全方膜剂的疗效优于拆方膜剂。

如表 9 所示, 3 种膜剂的 IC₅₀ 值均随作用增加而降低, 则提示作用时间越长药物作用越强。

表 9 各供试膜在各时间点 IC₅₀ 值比较

Table 9 IC₅₀ values of each test film at each time point were compared

组别	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)		
	24 h	48 h	72 h
EHGBF	6.775	4.677	3.294
无白及胶儿黄散双层膜	9.498	7.895	6.133
白及胶双层膜	8.887	6.836	5.045

3.2 流式细胞术测定细胞凋亡率

流式细胞仪检测结果视野分为 4 个区域: Q₁ 为 FITC⁺/PI⁺ 坏死细胞, Q₂ 为 FITC⁺/PI⁻ 晚期凋亡细胞, Q₃ 为 FITC⁻/PI⁻ 活细胞, Q₄ 为 FITC⁻/PI⁺ 早期凋亡细胞, 凋亡细胞率则为 Q₂+Q₄。

如图 1 及表 10 所示, 经过 1、5、10 mg/mL 浓度的 EHGBF 处理后, HeLa 细胞凋亡率与对照组比较均显著升高 (P < 0.05), 且呈浓度相关性。

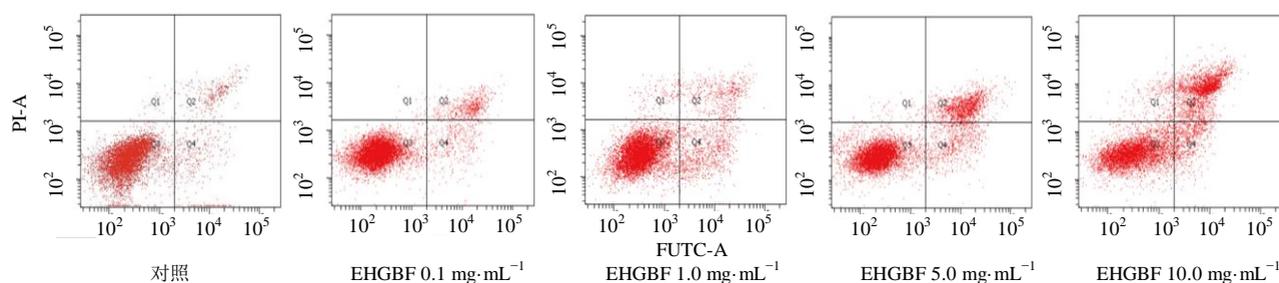


图 1 HeLa 细胞在不同浓度药物作用后细胞凋亡流式细胞仪分析对比

Fig. 1 Apoptotic flow cytometry analysis and comparison of a HeLa cells after action of drug at different concentrations

表 10 不同浓度 EHGBF 作用后 HeLa 细胞凋亡率变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Changes of apoptosis rate of HeLa cells after different concentrations of EHGBF ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/(mg·mL ⁻¹)	Q ₂ +Q ₄ /%
对照	—	8.6±0.4
EHGBF	0.1	9.9±0.9
	1.0	15.6±1.1*
	5.0	23.4±0.7*
	10.0	36.6±1.5*

与对照组比较: *P < 0.05

*P < 0.05 vs control group

3.3 EHGBF 大鼠阴道给药急性毒性试验

各给药组大鼠 7 d 内均未出现死亡现象, 与对照组比较, 空白基质组及 EHGBF 的大鼠自主活动、行为及毛色均无异常改变, 大鼠给药前后体质量变化见表 11。结果表明, EHGBF 在大剂量使用无致死性亦未见动物毒性, 初步证明 EHGBF 的使用安全性。

3.4 EHGBF 皮肤刺激性试验

EHGBF 的黄连明矾药膜层侧、儿茶药膜层侧及空白基质膜对于完整皮肤无刺激性; 但是破损皮肤处在第 1~4 次给药后发现对照组及各给药组均有轻度刺激, 但是随时间增长刺激程度逐渐降低直至无刺激性, 推测前 4 次产生刺激性可能与药物无关, 是皮肤破损后产生的应激性反应。去除膜剂后 1、24、48、72 h 和 7 d, 涂抹部位均未见红斑、水肿等现象, 刺激反应平均积分均为 0 分, 表明 EHGBF 对家兔完整或破损皮肤均不产生刺激性反应。

3.5 EHGBF 阴道刺激性试验

如图 2 所示, 家兔阴道典型视野可以看出, 对照组阴道黏膜层完整, 固有层致密, 未见水肿及充血, 偶见炎细胞浸润; 空白基质膜组阴道黏膜上皮组织完整, 固有层致密, 可见轻度水肿及红细胞浸润;

表 11 给药前后大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.11 Rat body weight changes before and after dosing ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	体质量/g	
	给药前	给药 7 d 后
对照	171.7±6.24	218.3±16.94*
空白基质	178.2±8.85	232.6±21.18*
EHGBF	176.8±11.88	244.2±21.25*

与给药前比较: *P < 0.05

*P < 0.05 vs same group before treatment

EHGBF组阴道黏膜层部分脱落,固有层致密性降低,可见中度水肿及红细胞浸润。结果表明,使用空白基质膜后的阴道形态与对照组相比差别不大,只可见轻度水肿及充血,有可能为使用膜剂操作时的机械性损伤;EHGBF组与对照组相比则差别稍大,可能对阴道黏膜具有轻度刺激性,但具有可恢复性。

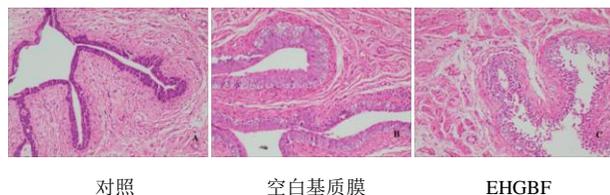


图2 家兔阴道典型视野($\times 100$)

Fig. 2 Typical view of rabbit vagina ($\times 100$)

由表12可知,对照组阴道黏膜刺激反应平均积分为0.6,刺激反应强度评价为无刺激性;空白基质膜组阴道黏膜刺激反应平均积分为3.2,刺激反应强度评价为极少刺激性;EHGBF组阴道黏膜刺激反应平均积分为4.8,刺激反应强度评价为极少刺激性,故可初步判断EHGBF对阴道黏膜几乎没有刺激性。

4 讨论

宫颈癌是发展中国家女性发病率高,死亡率高的恶性肿瘤之一,严重威胁众多女性健康^[20-21]。宫颈癌化疗以单用顺铂(DDP)或以DDP为基础的联合化疗为主,目前主要适用于姑息化疗、同步放化疗及新辅助化疗^[22];目前放射治疗仍是宫颈癌的基本治疗方法之一,其缺点为对正常细胞亦具有伤害

而造成皮肤敏感、脱发、呕吐及食欲减退的胃肠道反应。中医药对于宫颈癌有着很好的治疗作用,尤其对早期宫颈癌,以中药局部外用为主和辨证施治内服中药为辅进行治疗,不仅可以减低患者因手术及放化疗所带来的副作用,提高患者的依从率,改善生存质量,还可以控制瘤体大小,延长生存期^[23];可配合放化疗,减轻放化疗的不良反应,且可对放化疗起增敏作用从而顺利完成治疗,提高治愈率和生存率。

儿黄散是由儿茶、黄连、明矾、白及组成,具有活血化瘀、清热解毒、止血消肿、祛腐生肌的功效。方中儿茶味苦、涩,性凉,功效活血散瘀、收敛止血、生肌敛疮,又有清热解毒收湿之功。黄连味苦,性寒,功效清热燥湿、泻火解毒,为疡科要药,张元素曾称之为“诸疮必用”。明矾外用解毒杀虫,燥湿止痒;内服止血止泻,祛除风痰。白及的主要成分是白及胶,白及胶是一种杂多糖,通过白及块茎提取所得,白及的主要成分具有抑制肿瘤生长的作用^[24]。白及胶不仅在宫颈癌的治疗方面生物活性显著,其还能作为一种无毒、生物相容性好的载药基质,起到药辅双效的作用。儿黄散可以抑制HeLa细胞增殖,并有量效关系,其机制主要是通过阻滞细胞周期,抑制细胞增殖,降低细胞内线粒体的膜电位,抑制肿瘤血管生成,调节免疫功能等多种途径分别或协同发挥诱导肿瘤凋亡作用^[25]。

无白及胶儿黄散双层膜和白及胶膜也可抑制HeLa细胞的增殖,但抑制活性较EHGBF弱,空白膜对HeLa细胞无增殖抑制作用。白及胶作为EHGBF

表12 EHGBF对阴道黏膜刺激性评价

Table 12 Erhuangsan gum-bletilla double-film for evaluation of vaginal mucosa irritation

组别	编号	刺激反应评分				平均积分	刺激反应强度
		上皮组织	白细胞浸润	血管充血	水肿		
对照	2	0	1	0	0	0.6	无
	5	0	1	0	0		
	6	0	1	0	0		
	10	0	0	0	0		
	11	0	0	0	0		
空白基质膜	1	1	0	1	1	3.2	极少
	4	2	0	2	1		
	8	0	1	1	1		
	9	0	2	1	1		
	15	1	1	1	1		
EHGBF	3	1	2	2	2	4.8	极少
	7	3	2	1	2		
	12	2	3	1	2		
	13	1	3	1	1		
	14	1	1	3	3		

的成膜基质,亦具有一定的细胞增殖抑制作用,说明白及胶具有“药辅双效”的作用。

急性毒性实验表明,EHGBF在大剂量使用下对大鼠无致死性亦未见动物毒性,初步证明EHGBF的使用安全性。以家兔为实验动物的皮肤刺激性实验,在前4次给药后发现各给药组对破损皮肤均有轻至中度刺激性,但是随时间增长刺激程度逐渐降低直至无刺激性,则推测前4次产生刺激性可能与药物无关,是皮肤破损后产生的应激性反应。对给药后家兔阴道黏膜组织病理切片研究发现,空白基质膜组对阴道黏膜有轻度水肿及红细胞浸润反应,EHGBF组对阴道黏膜可见中度水肿及红细胞浸润;只可见轻度水肿及充血,有可能为使用膜剂操作时的机械性损伤。因此在阴道给药过程中需手法轻柔,避免因手法不当造成对阴道黏膜的机械性损伤,同时在取材过程中也应避免利器对阴道的损伤,故而影响后续实验结果的观察^[26]。由于阴道膜剂的使用过程中可能会接触到外阴皮肤,且置于阴道内部的药物也有可能泄露出来黏附在外阴及阴道口的可能,故需要评价膜剂对于外阴皮肤是否有刺激性,但由于外阴皮肤具有褶皱且面积较小,不便于膜剂的黏附,故根据“中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则”选择家兔的背部皮肤来进行检测膜剂刺激性试验。

参考文献

[1] Xu H H, Wang K, Feng X J, et al. Prevalence of human papillomavirus genotypes and relative risk of cervical cancer in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(20): 15386-15397.

[2] 周琦, 吴小华, 刘继红, 等. 宫颈癌诊断与治疗指南(第四版) [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(6): 613-622.

[3] 彭茸, 赵纯全. 化疗药物在宫颈癌治疗中的应用及研究进展 [J]. *中国药房*, 2013, 24(12): 1143-1146.

[4] 唐练亭. 化疗药物在宫颈癌治疗中的应用及研究进展 [J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2019, 6(20): 17.

[5] Yang B H, Bray F I, Parkin D M, et al. Cervical cancer as a priority for prevention in different world regions: an evaluation using years of life lost [J]. *Int J Cancer*, 2004, 109(3): 418-424.

[6] 周晖, 林仲秋. 美国国立综合癌症网络“2016宫颈癌临床实践指南”解读 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2016, 32(3): 223-230.

[7] 陈海丽, 韩凤娟, 宫艳秋, 等. 中药复方儿黄散对宫颈癌Hela细胞增殖抑制及Bcl-2蛋白表达的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2010, 18(11): 2102-2104.

[8] 谭展望. 儿黄散对宫颈上皮内瘤变逆转机理的实验研

究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2006.

[9] 王建英. 儿黄散对宫颈癌Hela细胞凋亡影响的实验研究及对CIN的临床症状及宫颈局部情况 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2009.

[10] 王艳宏, 杨柳, 王超, 等. 星点设计-效应面法优化阴道用儿黄散白及胶缓释双层膜的处方 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 146-152.

[11] 杨秦梅, 崔青荣, 李彬, 等. 姜黄素调控Notch信号通路对肺癌干细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(20): 3199-3204.

[12] 陈海金, 张瑞琴. 应用MTT法分析青蒿素对人癌细胞系Hella细胞的体外细胞毒作用 [J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2004, 11(1): 30-31.

[13] 周一平. 用SPSS软件计算新药的LD₅₀ [J]. *药学进展*, 2003, 27(5): 314-316.

[14] 中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2005.

[15] 张趁华, 蔡家利. 大细胞肺癌免疫组化检测方法的优化 [J]. *莆田学院学报*, 2014, 21(2): 23-26.

[16] 刘文波, 高贝贝, 杨春燕, 等. 硝酸镧示踪大鼠肠上皮细胞糖萼的透射电镜观察 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2018, 27(4): 347-349.

[17] Kale J, Liu Q, Leber B, et al. Shedding light on apoptosis at subcellular membranes [J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1179-1184.

[18] 王明建, 巨少华, 谭友莉. 红藤瘀痛洗药的皮肤毒性和安全性研究 [J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(9): 164-166.

[19] 李力, 王薇, 杨柳, 等. 黑膏药鼻炎贴不同摊涂工艺的皮肤安全性比较研究 [J]. *中国药师*, 2018, 21(3): 411-414.

[20] Wang L F, Zhao Y Y, Wang Y S, et al. The role of galectins in cervical cancer biology and progression [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 1-11.

[21] Nair V B, Manasa V G, Sinto M S, et al. Differential expression of MicroRNAs in uterine cervical cancer and its implications in carcinogenesis; an integrative approach [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, 28(3): 553-562.

[22] 陈春林. 中国宫颈癌临床诊疗与大数据 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(1): 25-29.

[23] 王志影, 吴杨, 迟文成, 等. 中西医防治宫颈癌的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(80): 112-114.

[24] 刘松江, 佟颖, 张茗, 等. 白芨胶热灌注栓塞对兔VX2肝癌模型CT影像的对比研究 [J]. *中医药信息*, 2015, 32(4): 29-31.

[25] 赵令武, 万福生. 中草药诱导人宫颈癌HeLa细胞凋亡及其分子机制 [J]. *江西医学院学报*, 2006, 46(5): 176-177.

[26] 刘剑云, 史亚军, 施俊辉, 等. 贝加灵喷雾剂的纤毛毒性作用及粘膜刺激性实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(4): 881-882.