

## ◆实验研究论著◆

# 益气消癥法中药对雌激素诱导子宫肌瘤模型豚鼠 ADM 及其基因表达的影响

阮氏水<sup>1</sup>, 张茜薇<sup>1</sup>, 王娜<sup>2</sup>, 宋卓敏<sup>3</sup>, 邢聪丽<sup>1</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市武清区中医院妇科, 天津 301700

3. 天津中医药大学中医药研究院妇科教研室, 天津 300193

**[摘要]** 目的: 探讨益气消癥法中药对雌激素诱导子宫肌瘤模型豚鼠子宫组织肾上腺髓质素 (ADM) 蛋白及其基因表达的影响。方法: 将去势豚鼠随机分为模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组及西药组 (米非司酮), 并以正常组作对照。通过去势加皮下注射雌二醇 (E<sub>2</sub>) 建立子宫肌瘤模型, 通过免疫组化法检测 ADM 蛋白表达, 半定量 RT-PCR 法检测 ADM mRNA 的表达。结果: 豚鼠子宫肌组织 ADM 蛋白及其 mRNA 表达, 模型组显著高于其它各组 ( $P < 0.01$ ); 中药高剂量组显著低于中药中剂量、低剂量组及西药组 ( $P < 0.01$ ), 中药高剂量组与正常组比较, 差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。结论: 益气消癥法中药下调模型豚鼠子宫组织 ADM 及其 mRNA 表达, 是其治疗子宫肌瘤的作用机制之一。

**[关键词]** 子宫肌瘤; 益气消癥法; 豚鼠; 肾上腺髓质素 (ADM)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 10-0192-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.10.078

肾上腺髓质素 (Adrenomedullin, ADM) 是由 Sakata J 等<sup>[1]</sup> 从人嗜铬性细胞瘤中发现并提取的一种多功能活性肽类物质。它广泛分布于人体各个组织器官, Hague S 等<sup>[2]</sup> 发现 ADM 在正常和肌瘤子宫的子宫内膜和肌层中也有表达, 故近来 ADM 在子宫肌瘤中的作用也越来越受到人们的重视。本实验将研究 ADM 及其 mRNA 在子宫肌瘤模型豚鼠子宫组织中的表达, 探求其与子宫肌瘤发生发展的关系, 及益气消癥法中药治疗子宫肌瘤的作用机理, 为临床用药提供理论依据。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物** 雌性清洁级豚鼠 100 只, 体重 (400 ± 50)g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。

**1.2 药物** 益气消癥法中药组成: 党参、鳖甲各 30 g, 川续断、莪术、白芥子各 15 g, 郁金 10 g。喷雾干燥法得中药干粉 (由天津中医药大学制药厂制备)。

## 1.3 主要实验试剂及器材

**1.3.1 米非司酮** 规格 25 mg/粒, 国药准字 H10950003, 产品批号: 43100611, 北京紫竹药业有限公司生产。苯甲酸

雌二醇注射液: 规格 1 mL: 1 mg, 国药准字 H12020529, 产品批号: 1005071, 天津金耀氨基酸生产有限公司生产。硫酸庆大霉素注射液: 规格 2 mL: 8 万单位, 国药准字 H41020609, 产品批号: 10051221, 天津药业焦作有限公司生产。中性甲醛固定液, 天津中医药大学中医药研究院提供。

**1.3.2 免疫组化实验试剂及仪器** ADM 免疫组化试剂 [货号: BA-0629 (博士德)]; 显微镜 (日本奥林巴斯 BX51T-PHD-J11); CMOS (日本奥林巴斯); 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); 切片仪 (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); 移液器 (德国 EPPENDORF); 干燥箱 (日本三洋 MIR-153 型); 低温冰箱 (日本三洋 MDF-382E 型); 恒温水浴箱 (江苏太仓医用仪器厂 DSHZ-300 型); 医用微波炉 (浙江临安爱迪仪器厂 YWY781B 型)。

**1.3.3 半定量 RT-PCR 实验试剂及仪器** RNA 抽提试剂 Trizol: Invitrogen; 反转录试剂盒: MBI RevertAid First

**[收稿日期]** 2014-03-11

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30973768)

**[作者简介]** 阮氏水 (1974-), 女, 主治医师, 博士研究生, 研究方向: 中医妇科理论与临床研究。

**[通讯作者]** 宋卓敏, E-mail: gaos67@126.com; 邢聪丽, E-mail: 870996314@qq.com。

Strand cDNA Synthesis Kit ; Ex Taq ; 宝生物工程(大连)有限公司 ; 琼脂糖 : invitrogen Agarose- Molecular Biology Grade ; 三氯甲烷 : 国药集团化学试剂有限公司 ; 异丙醇 : 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。凝胶成像系统(Bio- red Gel DocXR 凝胶成像仪) ; 电泳槽(Tanon TPS 100) ; PCR 仪(Alpha unit Block Assembly for PTC DNA Engine Systems) ; 台式高速(冷冻)离心机(ependorf Centrifuge 5810R) ; K3- 18 台式高速冷冻离心机(Sigma) ; MDF- 192 型超低温冰箱(日本三洋电机株式会社) ; HVE- 50 高压灭菌锅(HILAVE, HIRAYAMA, JAPAN)。电子分析天平[梅特勒 - 托得多仪器设备(上海)有限公司]。GB1302 型天平[梅特勒 - 托得多仪器设备(上海)有限公司] ; 连续可调式移液器(德国 eppendorf 移液器) ; XK96- B 微型漩涡混合仪(江苏姜堰市新康仪器厂)。

1.4 实验动物分组 将实验动物, 按随机数字表法分为 6 组。正常组 ; 模型组 ; 中药高剂量组 ; 中药中剂量组 ; 中药低剂量组 ; 西药组。

1.5 模型建立 采用去势加雌激素诱导建立豚鼠子宫肌瘤模型<sup>[2]</sup>。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。

1.6 给药方法 造模第 21 天始, 各给药组按相应剂量给药, 给药容积为每天 1 mL/100 g, 正常组及模型组给等容积蒸馏水, 连续 12 周。

1.7 各组豚鼠子宫组织 ADM 的蛋白表达 (免疫组化测定) 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 μm 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, 0.1MPBS 洗 3 次× 5 min。将切片放入抗原修复液中加热至 97℃, 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℃ 过夜, 0.1MPBS 洗 3 次× 5 min。切片上滴加生物素化第二抗体(IgG), 37℃ 20 min, 0.1 MPBS 洗 3 次× 5 min 切片上滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S- A/HRP), 37℃ 20 min, 0.1MPBS 洗 3 次× 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。选择实验组和正常组的阳性和阴性组织相、进行 400× 的显微照相。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, 计算组氨酸(HIS)评分, 进行统计学分析。

1.8 各组豚鼠子宫组织 ADMmRNA 的表达 (半定量 RT- PCR 测定) 细胞处理后, Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA 第 1 链。PCR 反应体系: Mix12.5 μL+ 上下游引物各 1 μL+cDNA 模版 2μL+ ddH<sub>2</sub>O8.5 μL, 94℃ 45 s, 53℃ 30 s, 72℃ 30 s(35 个循环), 72℃ 延伸 10 min。2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色, 应用 GIS- 2010 凝胶图

像分析系统照相、读取灰度值。ADM 上游引物序列 ATAAGTGGGCTCTAAGTCGTG, 下游引物序列 TTCAGAA- ATCAGTTTGTGGG, 片段长度 832bp。引物合成与测序均由北京基诺莱普生物技术有限公司完成。

1.9 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。计量数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组豚鼠子宫肌组织 ADM 蛋白及基因表达的比较 见表 1。子宫肌组织 ADM mRNA 表达, 模型组显著高于其它各组( $P < 0.01$ ) ; 中药高剂量组显著低于中药中剂量、低剂量组及西药组( $P < 0.01$ ), 中药高剂量组与正常组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。子宫肌组织 ADM 蛋白表达, 模型组豚鼠显著高于正常组、中药高剂量、中剂量组及西药组( $P < 0.01$ ), 中药高剂量组显著低于中药中剂量、低剂量组及西药组( $P < 0.01$ ), 中药高剂量组与正常组比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

表 1 各组豚鼠子宫肌组织 ADM 蛋白及基因表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ADM mRNA	ADM
正常组	15	0.651± 0.015 <sup>①</sup>	0.247± 0.033 <sup>①</sup>
模型组	15	2.048± 0.027	0.651± 0.127
中药高剂量组	14	0.662± 0.014 <sup>③</sup>	0.301± 0.068 <sup>③</sup>
中药中剂量组	12	1.253± 0.019 <sup>②</sup>	0.453± 0.059 <sup>②</sup>
中药低量组	13	1.603± 0.021 <sup>②</sup>	0.604± 0.176 <sup>②</sup>
西药组	14	1.088± 0.026 <sup>②</sup>	0.364± 0.027 <sup>②</sup>

与模型组比较, ① $P < 0.01$  ; 与中药高剂量组比较, ② $P < 0.01$  ; 与正常组比较, ③ $P > 0.05$

2.2 ADM 半定量 RT- PCR 产物电泳分析图 图 1~6。M 代表 DNA 分子量标准。

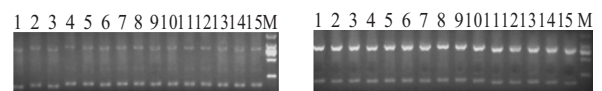


图 1 正常组

图 2 模型组

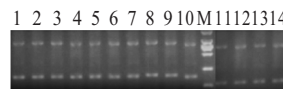


图 3 中药高剂量组

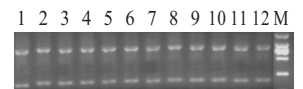


图 4 中药中剂量组

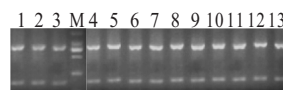


图 5 中药低剂量组

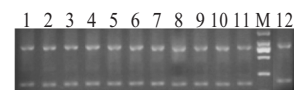


图 6 西药组

2.3 各组豚鼠子宫组织 ADM 免疫组化测定结果 图 7~12。豚鼠子宫组织 ADM 免疫组化测定结果(胞浆、细胞质中表达)。

3 讨论

ADM 是一种内源性多功能肽, 广泛分布于全身各系统,

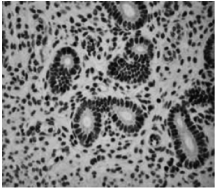


图 7 正常组 (×400)

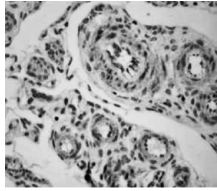


图 8 模型组 (×400)

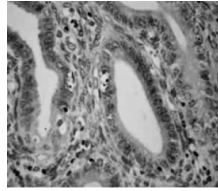


图 9 中药高剂量组(×400)

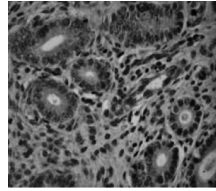


图 10 中药中剂量组(×400)

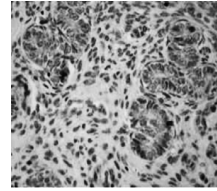


图 11 中药低剂量组(×400)

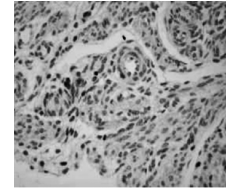


图 12 西药组 (×400)

对人体病理生理均具有重要意义。韩晓鹏等<sup>[3]</sup>认为 ADM 是新的内皮细胞生长因素，有促血管生成的作用，其机制<sup>[4]</sup>可能是通过 cAMP 依赖性蛋白激酶级联反应和细胞内钙离子迁移来实现的。蔡文钦等<sup>[5]</sup>认为 ADM 有抗内膜细胞凋亡作用，同时可以促进血管内皮生长因子表达。Stilla Frede 等<sup>[6]</sup>认为 ADM 可能在缺氧状态下表达上调，其机制可能是通过转录因子缺氧诱导因子 1(HIF-1)复合物的激活而形成的。Berk BC<sup>[7]</sup>认为 ADM 在肿瘤的生长过程中起有丝分裂、刺激因子的作用，其机制可能是通过酪氨酸激酶和有丝分裂原活性蛋白激酶的信号转导，参与细胞生长和凋亡的途径来实现的<sup>[3]</sup>。可见 ADM 是肿瘤细胞存活、增生、凋亡的驱动因素，并通过多种信号转导途径参与其发生发展过程。在多种妇科恶性肿瘤中，子宫肌层和内膜中均存在 ADM 的表达和其特异性结合位点<sup>[9]</sup>。Michishita M 等<sup>[10]</sup>发现，在子宫内膜癌上皮细胞中 ADM mRNA 有大量表达。李明群等<sup>[11]</sup>研究显示，ADM mRNA 表达水平与卵巢癌组织学分级有关，ADM mRNA 的表达越强，癌细胞恶性程度越高。

益气消癥法方药是以益气化痰、祛湿涤痰、软坚消癥为治疗大法及处方。方中党参益气健脾，鳖甲软坚消癥合为君药；川续断补肾，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，用为佐使。六药合力，共奏其效。本实验结果证实：子宫肌瘤模型豚鼠存在子宫组织 ADM 蛋白及 ADM mRNA 高表达现象，益气消癥法中药可以降低子宫肌瘤模型豚鼠子宫组织 ADM 蛋白及其基因的表达。说明 ADM 是子宫肌瘤发生的重要因子，可通过多种途径促进子宫肌瘤的生长而降低其表达，为该法方药治疗子宫肌瘤的作用靶点之一。

[参考文献]

[1] Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, et al. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 195: 921-927.

[2] Hague S, Zhang L, Oehler MK, et al. Expression of the hypoxically regulated angiogenic factor a-

drenomedullin correlates with uterine leiomyoma vascular density [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6 (7): 2808-2814.

[3] 韩晓鹏. 肾上腺髓质素的研究进展[J]. *中山大学学报：医学科学版*, 2009, 30(4S): 275-279.

[4] Miyashita K, Itoh H, Sawada N, et al. Adrenomedullin promotes proliferation and migration of cultured endothelial cells[J]. *Hypertens Res*, 2003, 26: 93-98.

[5] 蔡文钦, 苏津自, 俞登及. 肾上腺髓质素基因转染改善缺氧培养骨髓间充质干细胞的抗凋亡能力[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(32): 5913-5917.

[6] Stilla Frede, Patricia Freitag, Teresa Otto, et al. The proinflammatory cytokine interleukin 1 beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (11): 4690-4697.

[7] Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 999-1030.

[8] Oehler MK, Norbury C, Hague S, et al. Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 2937-2945.

[9] 靳钰, 袁捷, 田雪红. 肾上腺髓质素在生殖系统各部位及生殖器官肿瘤组织中的表达变化及其意义[J]. *中华妇产科杂志*, 2005(3): 68-70.

[10] Michishita M, Minegishi T, Abe K, et al. Expression of adrenomedullin in the endometrium of the human uterus [J]. *Obstet Gynecol*, 1999, 93: 66-70.

[11] 李明群, 刘少扬, 江大琼. ADM 在上皮性卵巢癌组织中的表达及其临床意义[J]. *实用癌症杂志*, 2006, 21(4): 373-375.

(责任编辑：马力)