

妇科再造丸含药血清对人子宫肌瘤细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响*

胡颖¹, 罗俊¹, 张晴¹, 叶兰², 胡晓燕³, 郑涛^{4**}

(1. 贵州医科大学 基础医学院 药理学教研室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学 基础医学院 机能学实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州医科大学附院, 贵州 贵阳 550025; 4. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 探讨妇科再造丸(FKW)含药血清对体外培养人子宫肌瘤细胞凋亡相关蛋白 Bax 和 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达的影响。方法: 对人子宫肌瘤细胞进行原代培养、传代并进行鉴定;60 只 SD 雌性大鼠随机均分为空白组(无药血清组),FKW 高、中、低剂量组和桂枝茯苓胶囊(GZFL)组,利用各组大鼠制备无药血清和含药血清分别作用于子宫肌瘤细胞 72 h 时,采用 Western Blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达。结果: 培养的细胞经鉴定证实为人子宫肌瘤细胞;与无药血清组比较,FKW 含药血清各剂量组均能增加 Bax 蛋白相对表达量,降低 Bcl-2 蛋白相对表达量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用随剂量的增加而有增强的趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: FKW 含药血清可影响人子宫肌瘤细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达,这可能是 FKW 临床应用时缓解子宫肌瘤症状的机制之一。

[关键词] 细胞凋亡; 妇科再造丸; 子宫肌瘤细胞; 凋亡相关蛋白; B 细胞淋巴瘤-2 蛋白; B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)10-1156-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.10.008

Effect of Fukezaizao Pill Medicated Serum on the Expression of Bax and Bcl-2 Proteins in Human Uterine Fibroid Cells

HU Ying¹, LUO Jun¹, ZHANG Qing¹, YE Lan², HU Xiaoyan³, ZHENG Tao⁴

(1. Department of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Functional Laboratory, School of Basic Medical Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 4. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Fukezaizao pill (FKW) medicated serum on the expression of Bax and Bcl-2 in human uterine fibroid cells *in vitro*. **Methods:** Primary culture, passage and identification of human uterine fibroid cells were carried out. Sixty SD female rats were randomly divided into blank group (drug-free serum group), FKW high, medium and low dose groups and Guizhifulin capsule (GZFL) group. When the drug-free serum and drug-containing serum of each group of rats acted on uterine fibroid cells for 72 h respectively, western-blot was used to detect the expression of apoptosis related protein Bcl-2 and Bax. **Results:** The cultured cells were identified as human uterine fibroid cells. Compared with the non-drug serum group, the relative expression of Bax protein increased and the relative expression of Bcl-2 protein decreased in each dose group of FKW containing serum ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the effect was enhanced with the increase of dose (P

*[基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2014)2011]; 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY2013-93)

** 通信作者 E-mail: zhengtao_star@126.com

网络出版时间:2019-10-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20191022.2308.008.html>

<0.05 or $P < 0.01$). **Conclusion:** FKW containing serum can affect the expression of apoptosis related protein Bcl-2 and Bax in human uterine fibroid cells, which may be one of the mechanisms of FKW to relieve the symptoms of uterine fibroid.

[**Key words**] apoptosis; Fukezaizao pill; uterine fibroid cells; apoptosis-related protein; B-cell lymphoma-2 protein; B-cell lymphoma-2 related X protein

子宫肌瘤起源于子宫平滑肌细胞,多见于 30 ~ 50 岁女性,发病率高达 20% ~ 25%,是女性生殖器官中最常见的良性肿瘤,也是未绝经妇女行子宫全切术的最主要原因,严重威胁着女性的身心健康^[1-3]。目前多采用激素类药物治疗子宫肌瘤,但副作用大,停药后易复发,治疗效果并不理想^[4-6],因此临床上采用中药辅助治疗子宫肌瘤,取得了较满意的疗效^[7-8]。妇科再造丸(Fu Ke Zai Zao pill, FKW)系贵州名医王聘贤所创,至今已有 70 多年的历史,具有活血化瘀、行气止痛、益气健脾之功效,临床广泛用于月经不调、痛经、体虚带下和妇科炎症等妇科疾病,对子宫肌瘤症状亦具有缓解作用。本课题组前期研究显示 FKW 对于雌、孕激素诱发的大鼠子宫平滑肌瘤样增生有显著的抑制作用,并能促进体外培养人子宫肌瘤细胞的凋亡^[9-13]。有研究表明,细胞凋亡调控基因表达异常是子宫肌瘤发生、发展的重要因素之一,其中 B 细胞淋巴瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族起着重要的作用^[14],然而目前 FKW 促进子宫肌瘤细胞凋亡相关机制的研究尚未见报道。因此,本研究通过血清药理学方法,观察 FKW 对体外培养人子宫肌瘤细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 及 Bax 表达的影响,探讨 FKW 促进子宫肌瘤细胞凋亡可能的作用机制,为临床应用增加新的适应症提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 选择 2015 年 1 月 - 2017 年 4 月因子宫肌瘤行子宫全切或肌瘤剔除术的患者 4 例,35 ~ 50 岁,未绝经,术前 3 个月无类固醇激素使用史,术后经病理学诊断为子宫肌瘤。

1.1.2 实验动物 清洁级 3 月龄 Sprague Dawley (SD)大鼠,雌性,体质量(200 ± 20) g,合格证号 SCXK(黔)2012 - 0001,由贵州医科大学实验动物中心提供。

1.1.3 药物、主要试剂与仪器 FKW(棕褐色丸剂,2.6 g/10 丸,贵阳德昌祥药业有限公司生产,批

号 20151021),桂枝茯苓胶囊(Gui Zhi Fu Lin capsule, GZFL,连云港康缘制药股份有限公司生产,批号 150106); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),二甲亚砜和胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体和兔抗人 Bax 单克隆抗体(美国 CST 公司),单克隆兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体和兔抗人平滑肌肌动蛋白单克隆抗体(英国 Abcam 公司);CO₂ 恒温培养箱(上海一恒科技有限公司),QL - 901 旋涡振荡器(海门市麒麟医用仪器厂),Mini 型蛋白电泳系统(美国 Bio - rad 公司)及 LG2000 数码凝胶图像分析系统(杭州朗基科学仪器有限公司)。

1.1.4 标本及药品制备 术中无菌条件下取子宫肌瘤组织 1 cm³,加入 3% 双抗(青、链霉素)的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)10 mL,冰浴密闭尽快送入细胞培养室。FKW 试验前用蒸馏水配制成高剂量组药液(终浓度 112 g/L),再依次稀释配制成中、低剂量组药液(终浓度分别为 56、28 g/L);GZFL 临用前用蒸馏水配制成浓度为 30 g/L 混悬液。

1.2 方法

1.2.1 给药和制备血清 取 SD 大鼠 60 只,随机分为空白组(无药血清组)、FKW 低剂量组(28 g/L)、中剂量 FKW 组(56 g/L)、高剂量 FKW 组(112 g/L)及 GZFL 组,每组 12 只。无药血清组大鼠每次灌服生理盐水 10 mL/kg,FKW 高、中、低剂量组每次灌服相应药液 10 mL/kg(分别为成人等效剂量 12.9 倍、6.5 倍、3.2 倍),GZFL 组每次灌服混悬液 10 mL/kg(为成人等效剂量 6.4 倍)。各组大鼠给药 2 次/d,间隔 6 h,连续 2 d,第 3 天末次给药 1 h 后股动脉取血,分离血清,56 ℃、30 min 灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后分装, - 20 ℃ 保存备用。

1.2.2 人子宫肌瘤细胞的原代培养及鉴定^[15]

无菌条件下用 3% 双抗 PBS 液漂洗肌瘤组织,眼科剪将标本剪碎为 1 mm³ 组织块,间距 2 ~ 3 mm 摆放于培养瓶中,置于 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱内,吸

出培养液,翻转培养瓶使瓶底朝上后加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,培养 4 h 后将培养瓶翻正培养,每 2~3 天换液 1 次,约 3~4 周出现致密细胞层后取出组织块,继续培养、传代,传代细胞均经 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -actin)免疫细胞化学法鉴定证实。

1.2.3 Western Blot 检测人子宫肌瘤细胞中 Bax、Bcl-2 的蛋白表达 实验分为无药血清组(加入 20% 无药血清)、FKW 低、中、高剂量组及 GZFL 组(加入 20% 含药血清)。收集经药物干预 72 h 的各子宫肌瘤细胞,PBS 洗涤 2 次,裂解液冰上常规裂解 30 min,12 000 r/min 离心 20 min,加入蛋白质上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,行 SDS-PAGE 电泳。电转法将蛋白质转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,常温下浸于 5% 脱脂牛奶,水平摇床上封闭 2 h 后加入一抗(鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体 1:1 000,兔抗人 Bax 单克隆抗体 1:1 000,单克隆兔抗 GAPDH 抗体 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜,含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBST)洗涤 PVDF 膜 5 min \times 6 次,加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 2 h,PBST 洗膜 5 min \times 6 次,用 ECL 显色试剂盒显色,PVDF 膜放入 Bio-Rad 图像摄取系统,保存图像。用 LG2000 数码凝胶图像分析系统进行条带光密度分析,计算目的蛋白吸光度与 GAPDH 吸光度的比值,作为目的蛋白的相对表达水平。每个样本重复测量 3 次。

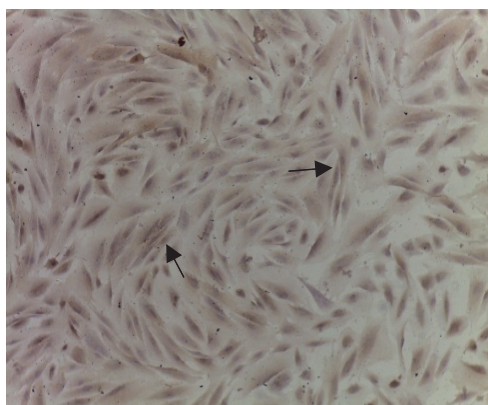
1.3 统计学方法

用 SPSS 13.0 软件包进行统计,所有数据结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人子宫肌瘤细胞原代培养及鉴定

人子宫肌瘤细胞培养至第 7~10 天组织块边缘开始有细胞游出,随着时间延长细胞逐渐分裂,最终融合成片;胞体细长,为梭形或不规则三角形,呈放射状或旋涡状生长,当细胞生长接近铺满瓶底 80% 时传代,传代周期约 3~5 d,传至 3~5 代的细胞形态均一,生长良好,经 α -actin 单克隆抗体免疫细胞化学染色证实,阳性细胞数接近 100%,说明培养的肌瘤细胞纯度较高,符合要求,可用于后续的实验观察。见图 1。



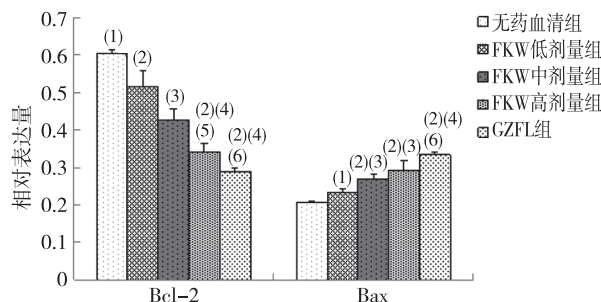
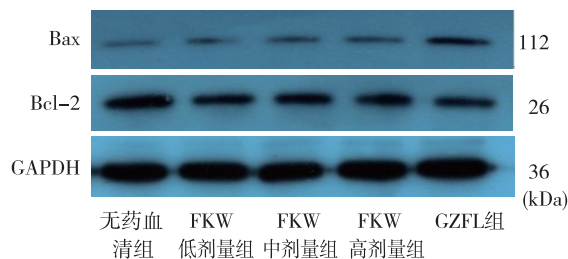
注:箭头处为肌瘤细胞(棕黄色)

图 1 体外培养的人子宫平滑肌瘤细胞(免疫细胞化学染色, $\times 400$)

Fig. 1 Identification of human uterine fibroid cells cultured *in vitro*

2.2 子宫肌瘤细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达

实验结果显示,与无药血清组比较,FKW 含药血清各剂量组均能增加 Bax 蛋白相对表达量,降低 Bcl-2 蛋白相对表达量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用随剂量的增加有增强的趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 2。



注:与无药血清组比较,⁽¹⁾ $P < 0.01$,⁽²⁾ $P < 0.05$;与 FKW 低剂量组比较,⁽³⁾ $P < 0.01$,⁽⁴⁾ $P < 0.05$;与 FKW 中剂量组比较,⁽⁵⁾ $P < 0.01$,⁽⁶⁾ $P < 0.05$ 。

图 2 FKW 对子宫肌瘤细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of FKW on the expression of apoptosis-related proteins in uterine fibroid cells

3 讨论

肿瘤是细胞增殖和死亡均发生了异常的疾病^[16]。实体肿瘤细胞的死亡主要有坏死和凋亡两种形式,一般认为,细胞凋亡抑制在肿瘤发生和发展过程中比细胞过度增殖起的作用更为重要^[17]。细胞凋亡是有核细胞在凋亡基因调控下发生的细胞自我消亡的过程,是一种主动的、固有的程序化现象^[18]。细胞凋亡一旦受到抑制,这部分通过“非法途径”得以存活的细胞将持续异常“发展”,进而形成局在型肿物^[19]。研究表明,*Bcl-2* 基因家族在细胞凋亡的基因调控网络中起着关键作用^[20]。*Bcl-2* 家族成员含有 1~4 个同源结构域,现已至少发现 19 个同源物,根据蛋白在细胞凋亡中的功能可将 *Bcl-2* 家族分为两类:一类是抗凋亡的,如 *Bcl-2*、*Bcl-xl*、*Ced-9*、*Mcl-1* 等,另一类是促凋亡的,如 *Bax*、*Bcl-xs*、*Bak*、*Bad* 等^[21]。其中,*Bcl-2* 和 *Bax* 是 *Bcl-2* 家族中最具代表性的功能相互对立的凋亡调控基因^[22]。*Bcl-2* 来源于 B 细胞淋巴瘤,被发现于 B 细胞滤泡性淋巴瘤染色体断裂点,是凋亡抑制基因,在细胞中高表达时可对抗细胞凋亡、延长细胞寿命,故亦被称为“长寿基因”;*Bcl-2* 蛋白是一种膜蛋白,位于线粒体膜,滑面内质网膜及核膜上,可通过抗氧化通路、影响 Ca^{2+} 内流等多种机制抑制细胞凋亡^[23]。*Bax* 与 *Bcl-2* 有 21% 的同源性,主要的生物学功能是加速细胞凋亡,具有抑制肿瘤作用,*Bax* 编码的 *Bax* 蛋白可与 *Bcl-2* 形成二聚体来发挥作用^[24]。二者结合可形成 *Bcl-2/Bcl-2*、*Bcl-2/Bax* 和 *Bax/Bax* 三种二聚体形式,其中同二聚体 *Bax/Bax* 促进细胞凋亡,*Bcl-2/Bcl-2* 则抑制细胞凋亡,当二者形成异二聚体 *Bcl-2/Bax* 时,*Bax* 与 *Bcl-2* 就会相互对抗、彼此制约,因此二者对细胞凋亡形成正负调控,各自在细胞内所占的比例是调节细胞凋亡的重要因素^[25]。子宫肌瘤的发病机制与细胞凋亡关系密切^[14]。研究发现,*Bcl-2* 蛋白在子宫肌瘤标本中强阳性表达,在正常子宫肌层中弱阳性表达;*Bax* 蛋白在正常子宫肌层中强阳性表达,在子宫肌瘤标本弱阳性表达,*Bcl-2/Bax* 在子宫肌瘤组织中的表达显著高于正常^[26-27]。因此,*Bax* 表达水平过低、*Bcl-2* 表达水平过高是子宫肌瘤发生发展的分子基础。

本研究成功建立人子宫肌瘤细胞原代培养并传代,可用于后续的实验观察,结果显示 FKW 含

药血清各剂量组作用 72 h 后,子宫肌瘤细胞 *Bax* 蛋白相对表达量增加,*Bcl-2* 蛋白相对表达量降低,与无药血清组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且作用随剂量的增加有增强的趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示 FKW 促进子宫肌瘤细胞凋亡的作用与 *Bcl-2* 家族密切相关,即 FKW 可上调 *Bcl-2* 家族中抗凋亡成员 *Bcl-2* 的表达并降低促凋亡成员 *Bax* 的表达,从而 *Bax/Bax* 结合的同二聚体减少,*Bcl-2/Bax* 结合的异二聚体相对增多,进而对子宫肌瘤细胞凋亡实现正调控。FKW 是否还具有 *Bcl-2* 家族外的调控机制促进子宫肌瘤细胞凋亡,还有待进一步深入研究。此外,由于 FKW 由 42 味中药组成,组方及作用机制复杂,药理活性的发挥可能是源于 FKW 组方中特有的成分,也可能是各组分相互作用后的产物,或者是其在体内复杂的药物代谢过程中所产生的代谢物质,其具体发挥效应的成分亦有待进行进一步深入研究。

综上所述,FKW 可通过影响细胞凋亡相关蛋白 *Bcl-2*、*Bax* 的表达,促进子宫肌瘤细胞凋亡,抑制肌瘤生长。

4 参考文献

- [1] 丰有吉,沈铿. 妇产科学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2010.
- [2] VICTORIA A B, ERIN N H, PAUL A, et al. Laparoscopic myomectomy: clinical outcomes and comparative evidence [J]. The Journal of Minimally Invasive Gynecology, 2015, 22(1): 11-25.
- [3] 李竹,李丽. 子宫肌瘤对女性生育能力的临床影响分析[J]. 中国性科学, 2016, 25(12): 98-101.
- [4] MEAGAN C H, LU B Y, ABIGAIL F W. Ovarian vein thrombophlebitis related to large uterine myoma [J]. Obstetrics & Gynecology, 2014, 123(2): 450-453.
- [5] 陈鸣华,陈道桢,龚健. 绝经激素治疗对围绝经期子宫肌瘤患者的影响[J]. 中国医药导报, 2017, 14(26): 72-75.
- [6] 姬化革. 他莫昔芬联合米非司酮治疗围绝经期子宫肌瘤的疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(20): 4929-4932.
- [7] 刘宇,李冬华,陈超,等. 中药治疗子宫肌瘤的现代药理研究概况[J]. 世界中西医结合杂志, 2017, 12(9): 1326-1328;1332.
- [8] 王艳. 桂枝茯苓丸加减联合米非司酮治疗子宫肌瘤患者的疗效及对血清性激素和炎症因子水平的影响[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(11): 2485-2488.

- [9] 刘婉书,黄晓君. 妇科再造胶囊联合米非司酮对子宫肌瘤治疗作用的临床研究[J]. 中国医药, 2014,9(5): 713-715.
- [10] 薛小桂. 妇科再造丸联合坤泰胶囊治疗围绝经期综合征合并子宫肌瘤的临床研究[J]. 中国初级卫生保健, 2017,31(9):72-73.
- [11] 胡颖,罗俊,黄能慧. 妇科再造丸对子宫肌瘤模型大鼠的保护作用研究, 中国药房, 2012, 12(23): 4427-4429.
- [12] 胡颖,罗俊,黄能慧. 妇科再造丸对雌孕激素负荷大鼠子宫病理形态学的影响[J], 中国实验方剂学杂志, 2011,17(23):140-144.
- [13] 胡颖,张晴,叶兰,等. 妇科再造丸含药血清对子宫肌瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2019,44(8):898-902.
- [14] 朱丽,贡子琦,张雨婷,等. 细胞凋亡抑制在子宫肌瘤发病机制中的意义[J]. 实用临床医药杂志, 2018,22(24):58-65.
- [15] 韩虹娟,李冬华,钱睿亚,等. 人子宫肌瘤细胞原代培养方法的比较研究[J]. 中国妇幼保健, 2014,29(22):3656-3659.
- [16] 齐伟,徐扬,邱实. 细胞凋亡与肿瘤微环境作用的研究进展[J]. 医学综述, 2017,23(22):4433-4442.
- [17] 葛信艳,黄玮,李瑞琴,等. PI3K/Akt 信号转导通路与肿瘤发生相互作用的机制研究[J]. 中国现代医药杂志, 2017,19(7):98-101.
- [18] 李冀,李想,丁彦,等. 中药调控细胞自噬抗肿瘤研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019,21(9):8-11.
- [19] OKAMOTO T, SUZUKI T, KUSAKABE S, et al. Regulation of apoptosis during flavivirus infection[J]. Viruses, 2017,9(9):243.
- [20] PERINI G F, RIBEIRO G N, PINTO J V, et al. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2018, 11(1):65.
- [21] CHOUDHURY SHOUHARTHA. A comparative analysis of BCL-2 family[J]. Bioinformation, 2019, 15(4):299-306.
- [22] 许国平,杨鹏,祁宏. Bcl-2 蛋白家族调节凋亡和自噬信号通路的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2019,41(6):1127-1134.
- [23] 刘丁峰,章圣朋,刘晓平. 关于 Bcl-2 凋亡蛋白家族的研究进展[J]. 科技视界, 2017,(1):88-89.
- [24] SUBBARAYAN S, SUBRAMANIAN S, SENTHIL K N. Recombinant pierisin-5 induces apoptosis and differential expression of Bcl-2, Bax, and p53 in human cancer Cells. [J]. DNA and Cell Biology, 2019,38(8):773-785.
- [25] 尹智勇,杨俊元,祁宏. Bcl-2 蛋白质家族调控细胞凋亡机制的研究进展[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2017,30(2):340-344.
- [26] 王随郎,庾明玉. Bcl-2 高表达、Bax 及 Beclin1 表达缺失与子宫肌瘤发生的关系[J]. 解放军预防医学杂志, 2018,36(7):951-952.
- [27] 许苗,刁晓娣. 子宫肌瘤中细胞凋亡基因表达及其药物治疗的研究进展[J]. 医学综述, 2012,18(7):973-976.

(2019-07-08 收稿,2019-10-07 修回)

中文编辑:严征;英文编辑:周凌