

“连花汤”正丁醇提物对子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响

唐瑶 包晓霞 鲁周南 薛晓鸥

【摘要】 目的 研究“连花汤”正丁醇提物对子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响,为临床应用“连花汤”治疗子宫内膜癌提供实验依据。**方法** 提取物从 10 mg/mL 依次降浓度梯度至 0.078125 mg/mL 分成 8 组,即:10 mg/mL、5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL、0.15625 mg/mL、0.078125 mg/mL 组。MTT 法检测细胞抑制率;分别计算出两种细胞的半数抑制浓度(IC_{50}),流式细胞术检测细胞凋亡率。**结果** “连花汤”正丁醇提物在不同浓度、不同时间里对 2 种内膜癌细胞系的增殖有显著抑制作用。其中,作用 24 小时、48 小时,HEC-1A 细胞 1.25 mg、0.625 mg、0.3125 mg 组间细胞抑制率有显著性差异($P<0.01$);Ishikawa 细胞 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL、0.15625 mg/mL 组间细胞抑制率有显著性差异($P<0.01$);作用 24 小时,HEC-1A 细胞、Ishikawa 细胞 10 mg、5 mg、0.625 mg、0.078125 mg 组间细胞抑制率有显著性差异($P<0.01$)。与正常组相比,“连花汤”正丁醇提物细胞凋亡率显著增高,差异显著。其中,HEC-1A 细胞:高剂量组 0.4 mg/mL、中剂量组 0.2 mg/mL、低剂量组 0.1 mg/mL 与正常组比较,细胞凋亡率有显著性差异($P<0.01$);Ishikawa 细胞:Ishikawa 高剂量组 1.0 mg/mL、中剂量组 0.5 mg/mL、低剂量组 0.25 mg/mL 与正常组比较,细胞凋亡率有显著性差异($P<0.05$)。**结论** “连花汤”正丁醇提物能有效抑制子宫内膜癌细胞增殖、诱导细胞凋亡。

【关键词】 子宫内膜癌; “连花汤”正丁醇提物; 细胞增殖; 细胞凋亡

【中图分类号】 R711.74 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.012

Effect of N-butanol extract from Lianhua decoction on proliferation and apoptosis of human endometrial cancer cell TANG Yao, BAO Xiaoxia, LU Zhounan, et al. Dongzhimen Hospital Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: XUE Xiaou, E-mail: Pro_xue@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of N-butanol extract from Lianhua decoction on proliferation and apoptosis of human endometrial cancer cell, and provide the experimental evidence of endometrial cancer treatment. **Methods** N-butanol extract from Lianhua decoction was divided into 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL, 0.3125 mg/mL, 0.15625 mg/mL, 0.078125 mg/mL groups. Half inhibition concentration(IC_{50}) of cell was calculated, apoptosis rate was detected by flow cytometry. **Results** N-butanol extract from Lianhua decoction had significant inhibitory effects on the proliferation of two kinds of endometrial cancer cell lines at different concentrations and different time. The inhibition rates of HEC-1A cells in 1.25 mg group, 0.625 mg group, 0.3125 mg group were significantly different at 24 hours and 48 hours ($P<0.01$). Cell inhibition rate of Ishikawa cell in 5 mg/mL group, 2.5 mg/mL group, 1.25 mg/mL group, 0.625 mg/mL group, 0.3125 mg/mL group,

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(81403262)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院妇科[唐瑶(博士研究生)、包晓霞、鲁周南、薛晓鸥]

作者简介: 唐瑶(1985-), 2014 级在读博士研究生。研究方向: 中西医结合治疗妇科肿瘤。E-mail: tangyao@126.com

通信作者: 薛晓鸥(1963-), 女, 博士, 教授, 主任医师。研究方向: 中西医结合治疗妇科内分泌及肿瘤。E-mail: Pro_xue@163.com

0.15625 mg/mL goup had significant difference ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Cell inhibition rate of HEC-1A cells and Ishikawa cells in 10 mg goup, 5 mg goup, 0.625 mg goup, 0.078125 mg goup had significant difference in 24 hours ($P < 0.01$). Compared with normal group, the apoptosis rate of N-butyl alcohol extract from *Lianhua* decoction was significantly higher. The cell apoptosis rate of high dose of 0.4 mg/mL, middle dose group of 0.2 mg/mL and low dose of 0.1 mg/mL had significant difference compared with normal group in HEC-1A cell ($P < 0.01$). The cell apoptosis rate of high dose of 1.0 mg/mL, middle dose group of 0.5 mg/mL and low dose group of 0.25 mg/mL had significant difference compared with normal group in Ishikawa cell ($P < 0.05$). **Conclusion** The N-butanol extract from *Lianhua* decoction can effectively inhibit the cell proliferation and induce cell apoptosis.

【Key words】 Endometrial cancer; N-butanol extract from *Lianhua* decoction; Cell proliferation; Cell apoptosis

子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)是女性生殖系统最常见的三大恶性肿瘤之一。在中国,其发病率仅次于宫颈癌,约占女性生殖系统恶性肿瘤的 20%~30%,占女性全身恶性肿瘤的 7%^[1]。根据子宫内膜癌的临床特点和预后将其分为 2 型:I 型为雌激素依赖型,II 型为非雌激素依赖型^[2]。Ishikawa 细胞是 ER 阳性子宫内膜癌细胞系,HEC-1A 细胞为 ER 低表达细胞系。目前子宫内膜癌的治疗原则是以手术为主,辅以放疗、化疗、内分泌治疗及生物治疗等^[3]。

前期研究发现^[4],中药复方“连花汤”中部分单体多糖能通过抑制子宫内膜癌 Ishikawa 细胞即 I 型雌激素依赖型中 TAMS 活化下调 TLR4/MYD88 信号通路表达,抑制 TAMS 的活化,从而起到抗子宫内膜癌的作用。而“连花汤”对 II 型非雌激素依赖型 HEC-1A 子宫内膜癌细胞增殖、凋亡的研究尚未见报道。因此本研究即以清热解毒方“连花汤”复方正丁醇提取物分别作用于 2 种子宫内膜癌细胞系,观察其对两种子宫内膜癌细胞增殖和凋亡的影响,检验相互之间是否有差异,为临床提供实验学依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 细胞及 HEC-1A 细胞由北京大学人民医院妇科实验室友情赠送。

1.2 药物与试剂

“连花汤”正丁醇提取物制备:中药复方“连花汤”:黄连 10 g、白花蛇舌草 15 g、半枝莲 15 g、生黄芪 20 g,5 剂,采购自东直门医院中药药房,于北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室以正丁醇萃取,烘箱烘干,密封,冰箱 4 摄氏度保存。胎

牛血清购自 Gibco,DMEM 购自 Hyclone,MTS 试剂购自 Promega,凋亡试剂购自 BD 公司。

1.3 仪器设备

CO₂ 细胞培养箱、酶联免疫检测仪(美国 Thermo Scientific 公司),垂直超净工作台(ESCO 公司),节能型智能恒温槽(宁波新芝生物科技有限公司),倒置荧光显微镜(北京锐驰恒业仪器科技有限公司)、流式细胞仪(Epics Elite ESP 型,美国 Coulter 公司)。

1.4 方法

1.4.1 MTS 法检测子宫内膜癌细胞的增殖情况及计算 IC₅₀ 值 将 Ishikawa 及 HEC-1A 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养,培养条件在 5% CO₂、37℃ 及饱和湿度下进行,以 1×10^4 cells/well 接种于 96 孔板中,常规培养 24 小时,待细胞贴壁后,将“连花汤”正丁醇提取物溶解在含 0.1% DMSO 的培养液中,配成 20 mg/mL 的母液,于实验当天用 DMEM 培养液稀释。MTT 检测子宫内膜癌细胞的增殖情况,被试药物被稀释为 8 个浓度梯度,即:10 mg/mL、5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL、0.15625 mg/mL、0.078125 mg/mL。实验分为 18 个组:Ishikawa 8 个药物浓度组和对照组(培养液+细胞);HEC-1A 组 8 个药物浓度组和对照组(培养液+细胞),分别作用 24、48 小时。在细胞处于对数生长期时弃原培养基,加入 16 组干预药物工作液 100 μ L/孔。16 组细胞处理 24、48 小时(每组设 5 个复孔)后,弃药物工作液及对照组培养基,每孔加入 MTS 溶液(5 g/L)20 μ L+80 μ L 无血清培养基,继续孵育 4 小时,用酶联免疫检测仪在 490 nm 处读取每孔的吸光度(OD)值。按下列公式计算细胞抑制率(%)=(1-加药组测定的平均 OD 值/对照孔测定

的平均 OD 值)×100%, 绘制细胞抑制率曲线。

1.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡情况 根据 MTT 计算细胞 IC_{50} 值, 分别计算两种细胞系给药浓度, 分为高剂量组 (IC_{50} 组)、中剂量组 ($1/2 IC_{50}$)、低剂量组 ($1/4 IC_{50}$ 组), HEC-1A: 高剂量组 0.4 mg/mL、中剂量组 0.2 mg/mL、低剂量组 0.1 mg/mL、正常组及阳性对照组; Ishikawa 高剂量组 1.0 mg/mL、中剂量组 0.5 mg/mL、低剂量组 0.25 mg/mL, 正常组及阳性对照组。各组细胞加药干预 24 小时后收集细胞, 检测细胞凋亡, 培养基+细胞组作为空白对照。200 μ binding buffer 重悬细胞加入 10 μ L Annexin V 和 4 μ L propidium iodide, 室温中避光孵育 30 分钟, 最后加入 300 μ L binding buffer, 1 小时内流式细胞仪检测, Cell Quest 软件计算细胞凋亡率。每组实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

数据采用 SPSS 21.0 软件分析处理, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Probit 法用于计算 IC_{50} , HEC-1A 及 Ishikawa 两种细胞系多组间抑制率进行独立样本 t 检验 (时间、浓度), 细胞凋亡各组间采用单因素方差分析 LSD 法进行组间两两比较。

2 结果

2.1 “连花汤”正丁醇提取物对 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞增殖影响

HEC-1A 及 Ishikawa 两种细胞系多组间抑制率进行独立样本 t 检验 (时间、浓度), HEC-1A、Ishikawa 两组细胞随时间和药物浓度的增加, 细胞的抑制率增加。不同时间, 不同浓度组之间差异不同, 见表 1。

2.2 流式细胞仪检测“连花汤”正丁醇提取物对 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞凋亡影响

Probit 法用于计算 IC_{50} , 细胞凋亡各组间采用单因素方差分析 LSD 法进行组间两两比较。见表 2。

2.3 “连花汤”正丁醇提取物对 HEC-1A 及 Ishikawa 细胞凋亡流式细胞仪检测图

图 1~4 所示细胞凋亡检测结果, 其中 Q1 为死亡细胞, Q2 为晚期凋亡细胞, Q3 为活细胞, Q4 为早期凋亡细胞, Q2+Q4 即为各组细胞总凋亡率。从所有结果中选择四组作为示例, 结果可见, “连花汤”正丁醇给药组 HEC-1A、Ishikawa 细胞凋亡率与阴性对照组比较差异有显著性。

表 1 “连花汤”正丁醇提取物对 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞抑制率 (%) 的比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

剂量 (mg/mL)	HEC-1A 作用 24 小时	HEC-1A 作用 48 小时	Ishikawa 作用 24 小时	Ishikawa 作用 48 小时
10	85±4 ^c	85±5	85±6 ^c	95±2
5	93±2 ^c	87±9	100±2 ^{bc}	97±2 ^b
2.5	97±2	94±4	94±3 ^b	99±1 ^b
1.25	72±4 ^a	94±3 ^a	69±6 ^b	96±2 ^b
0.625	36±7 ^{ac}	77±7 ^a	47±4 ^{bc}	74±2 ^b
0.3125	18±7 ^a	46±8 ^a	19±5 ^b	50±5 ^b
0.15625	11±10	15±18	4±4 ^b	24±9 ^b
0.078125	18±10 ^c	-2±2	-2±2 ^c	1±9
对照组	0	0	0	0

注: HEC-1A 细胞作用 24 小时、48 小时两组间比较, 1.25 mg、0.625 mg、0.3125 mg 组间有差异, ^a $P<0.01$; Ishikawa 细胞作用 24 小时、48 小时两组间比较, 5 mg/mL、2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.625 mg/mL、0.3125 mg/mL、0.15625 mg/mL 组间有差异, ^b $P<0.01$; HEC-1A 细胞、Ishikawa 细胞作用 24 小时, 两组间比较 10 mg、5 mg、0.625 mg、0.078125 mg 组间有差异, ^c $P<0.01$ 。

表 2 “连花汤”正丁醇提取物对 Ishikawa 及 HEC-1A 细胞凋亡率 (%) 的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

	HEC-1A 细胞凋亡率	Ishikawa 细胞凋亡率
高剂量组	88.90±4.12 ^{ab}	87.10±4.37 ^{cd}
中剂量组	92.13±2.29 ^{ab}	92.86±1.12 ^{cd}
低剂量组	67.83±17.20 ^a	86.63±9.12 ^{cd}
阳性对照组	61.33±8.08 ^a	70.93±3.80 ^c
正常组	7.40±2.20	14.13±5.36

注: HEC-1A 细胞: 高剂量组、中剂量组、低剂量组、阳性对照组与正常组比较, ^a $P<0.01$; 低剂量组与高剂量组、中剂量组比较, ^b $P<0.05$; Ishikawa 细胞: 高剂量组、中剂量组、低剂量组与正常组比较, ^c $P<0.05$ 。三个组与阳性对照组比较, ^d $P<0.01$ 。

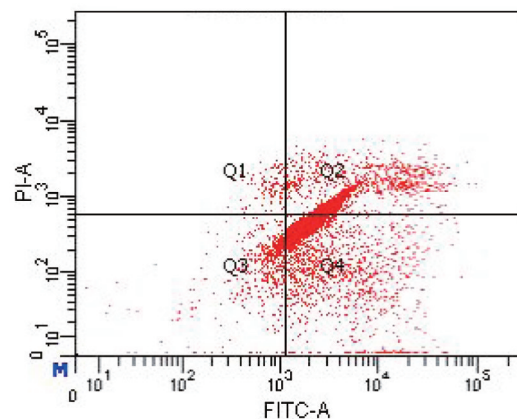


图 1 HEC-1A 细胞凋亡“连花汤”正丁醇提取物中剂量给药组 0.2 mg/mL

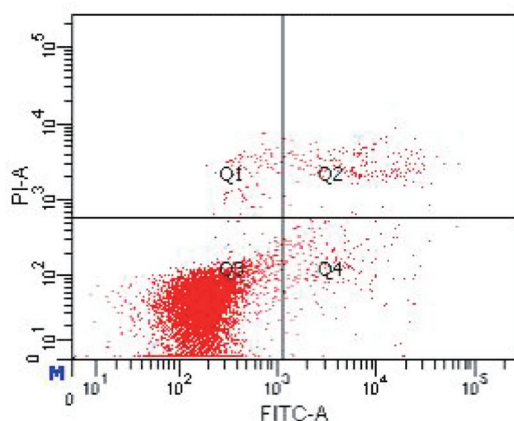


图2 HEC-1A 细胞凋亡正常对照组

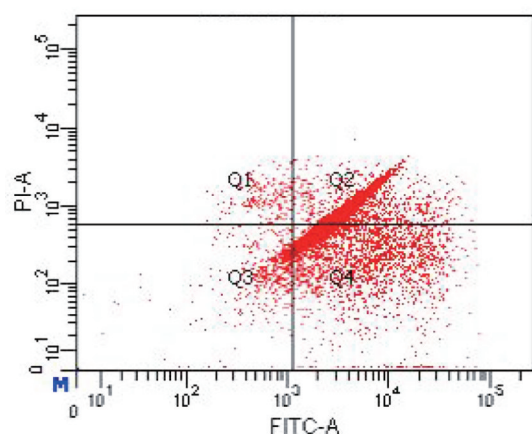
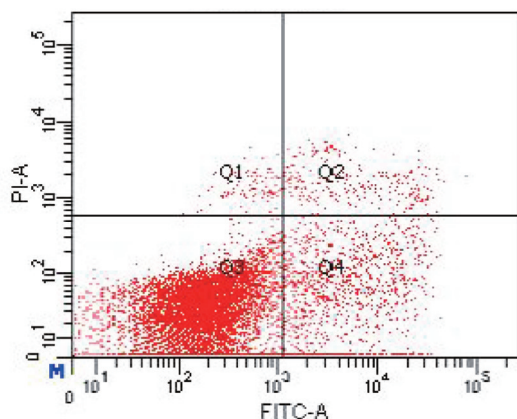

 图3 Ishikawa 细胞凋亡“连花汤”正丁醇提取物
中剂量给药组 0.5 mg/mL


图4 Ishikawa 细胞凋亡正常对照组

3 讨论

3.1 连花汤醇提取物能有效抑制 Ishikawa 及 HEC-1A 的增殖、诱导细胞凋亡

从 MTT 来看,“连花汤”正丁醇提取物均能有效抑

制 Ishikawa 及 HEC-1A 的增殖,呈明显时间依赖性,而从细胞凋亡来看,没有明显剂量依赖,HEC-1A 细胞药物中等浓度凋亡率高于高等浓度,然两者差异无统计学意义,Ishikawa 细胞也是中等浓度诱导细胞凋亡率最高,而三者差异无统计学意义,分析原因,其一可能在凋亡实验中高剂量用药浓度并未被完全利用,中等剂量就能诱导大部分细胞凋亡。其二,可能与重复次数少有关,今后实验可以加大样本量及重复次数,再做统计。

3.2 “连花汤”正丁醇提取物对 HEC-1A 细胞药效优于 Ishikawa 细胞

对 Ishikawa 及 HEC-1A 两个细胞系之间比较,“连花汤”正丁醇提取物在较高剂量组间的抑制率差异有统计学意义,在中等剂量间差异无统计学意义,可能与 MTT 的精确度不高有关,从凋亡的结果来看,“连花汤”正丁醇提取物对 HEC-1A 效果要好,最佳药效浓度在 0.2 mg/mL,而 Ishikawa 最佳药效浓度在 0.5 mg/mL。

3.3 “连花汤”正丁醇提取物对子宫内膜癌细胞的抑制可能不通过 ER 受体表达通路

既往研究发现中药有效成分对子宫内膜癌作用机制大致为影响雌激素受体拮抗雌激素作用,引起癌细胞 DNA 损伤,阻滞癌细胞周期,抑制癌细胞增殖,促进癌细胞凋亡,影响子宫内膜癌侵袭力,抑制子宫内膜癌新生血管生成及逆转耐药性等^[5]。Ishikawa 为 ER 阳性子宫内膜癌细胞系,HEC-1A 为 ER 低表达细胞系,达到同样的抑制率 Ishikawa 所需“连花汤”正丁醇提取物药物浓度比 HEC-1A 要高很多。因此可以推测“连花汤”正丁醇提取物对子宫内膜癌细胞的抑制机制可能不通过 ER 受体表达通路影响,而是通过其他机制作用。具体通过哪种机制作用,有待进一步细胞周期实验及信号通路实验研究探讨。

中医药治疗子宫内膜癌强调以“扶正祛邪、攻补兼施”为总则。“连花汤”以黄连、白花蛇舌草、半枝莲清热解毒,生黄芪益气扶正,可以弥补手术治疗、放射治疗、化学治疗的不足。手术固然能切除癌肿,但还有残癌区域淋巴结转移、血管中癌栓存在等,运用中医中药术后长期治疗,可以防止复发和转移;放疗、化疗治疗对消化道和造血系统有一定的毒副作用,损伤机体正气,运用中医中药治疗既能提高机体正气加强放疗、化疗的效果,又能减轻放、化疗的毒副作用,对于晚期子宫内膜癌患者

者或不能手术和放疗、化疗的患者可以采用中医中药治疗^[6]。本实验为进一步的实验研究提供了一定基础,本方对子宫内膜癌患者术前、术后的治疗均有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 杨越波,李小毛,向阳. 子宫肿瘤[M]. 北京:人民军医出版社, 2011:190-313.
- [2] Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. [J]. Gynecologic Oncology, 1983, 15(1):10-7.
- [3] 公苓苓,郭杨,孙浩罡,等. 子宫内膜癌的治疗进展[J]. 中国妇

幼保健, 2015, 30(11):1797-1799.

- [4] 包晓霞,李柳叶,薛晓鸥. 连花汤通过抑制子宫内膜癌细胞中 TAMs 活化下调 TLR4/MyD88 信号通路表达的分子机制研究 [C]//2015 全国中西医结合月经病专题学术会议论文及摘要集, 2015:3.
- [5] 任天贵. 子宫内膜癌的中医治疗[J]. 山西医药杂志(下半月版), 2012, 41(14):755-756.
- [6] 黄彩梅,夏亦冬,胡国华. 中药治疗子宫内膜癌作用机制研究进展[J]. 吉林中医药, 2015, (9):969-972.

(收稿日期: 2017-02-19)

(本文编辑: 禹佳)