

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.003

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.003>

黄连素对实验性子宫肌瘤大鼠的作用及相关机制

黄亚哲¹, 安爱平¹, 陈建玲¹, 王丽蕊², 王秋宇³, 李晓翔³, 祁彦萍³

(1. 南阳市中心医院生殖医学科, 河南 南阳 473000; 2. 河北省围场县医院妇产科, 河北 围场 0684501;
3. 南阳市中心医院妇产科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 观察黄连素对大鼠子宫肌瘤的作用并探讨其初步机制。方法: 建立子宫肌瘤大鼠模型。ELISA检测各组大鼠血清中IFN- α 和TNF- α 含量变化; 观察黄连素对血液黏度与子宫肌瘤子宫系数的影响; HE染色法观察各组大鼠子宫形态学; 免疫组织化学法观察子宫平滑肌细胞中雌激素受体- α (estrogen receptor alpha, ER- α)含量与bcl-2蛋白表达。结果: 给予黄连素处理后, 子宫肌瘤大鼠血清中IFN- α 的含量显著增加, 而TNF- α 的含量明显降低; 此外, 黄连素可降低全血黏度、血浆黏度与红细胞聚集指数, 减少子宫系数与平滑肌厚度和炎性细胞浸润, 抑制ER- α 含量与bcl-2蛋白表达。结论: 黄连素对子宫肌瘤具有改善作用, 作用机制可能于调节机体炎性因子含量水平以及凋亡因子bcl-2有关。

[关键词] 子宫肌瘤; 黄连素; 炎性因子; bcl-2

Effects and mechanisms of berberine on hystero-myoma in rats

HUANG Yazhe¹, AN Aiping¹, CHEN Jianling¹, WANG Lirui², WANG Qiuyu³, LI Xiaoxiang³, QI Yanping³

(1. Department of Reproductive Medicine, Nanyang Central Hospital, Nanyang Henan 473000;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Weichang Hospital, Weichang Hebei 0684501;

3. Department of Obstetrics and Gynecology, Nanyang Central Hospital, Nanyang Henan 473000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of berberine on hystero-myoma in rats. **Methods:** Hystero-myoma model was established in rats. Then the levels of IFN- α and TNF- α were analyzed by ELISA assay. Blood viscosity and hystero-myoma coefficient were examined. The morphological changes in uterus were observed using HE staining. The expressions of ER- α and Bcl-2 in uterine smooth muscle cells were detected by immunohistochemistry. **Results:** After Berberine administration, IFN- α levels significantly increased, while TNF- α levels decreased. Moreover, berberine treatment decreased whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation index, while reduced hystero-myoma coefficient and inflammatory cells infiltration, and inhibited ER- α and Bcl-2 expressions in uterine smooth muscle cells. **Conclusion:** Berberine can improve hystero-myoma in rats, which may be likely through regulation of the levels of inflammatory factors and bcl-2.

Keywords hystero-myoma; berberine; inflammatory factors; bcl-2

收稿日期 (Date of reception): 2016-09-13

通信作者 (Corresponding author): 陈建玲, Email: chengluya@yeah.net

子宫肌瘤是女性生殖器最常见的良性肿瘤, 在生育期妇女常见, 发病率为20%~30%, 是导致子宫切除的最主要疾病, 恶变率<0.3%^[1-2]。深入研究发现子宫肌瘤是子宫组织在各种性激素、生长因子等多因素介导下导致的局部微环境变化而产生的, 是一个多因素, 多环节的生物学过程。

黄连素已广泛应用于临床多个方面, 如2型糖尿病、心血管疾病和肿瘤等, 提取于黄连、黄柏等含小檗碱的药物。研究^[3]表明黄连素通过阻止细胞G₁期, 调节Bax与bcl-2蛋白表达促进卵巢癌细胞的凋亡。另外, 黄连素可能降低心力衰竭大鼠血清中TNF- α , IL-1和IL-6水平, 改善心力衰竭症状^[4]。尚未有关于黄连素对子宫肌瘤作用的研究, 本实验通过建立子宫肌瘤大鼠模型, 观察黄连素对子宫肌瘤的影响, 并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康SD大鼠50只, SPF级, 雌性未孕, 体重190~210 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号[SCXK(沪)2007-2013], 饲养于22~24 °C, 昼夜各12 h, 正常进食饮水, 进行适应性饲养7 d。

1.2 实验试剂

黄连素购自哈尔滨三精制药厂; 苯甲酸雌二醇注射液购自天津金耀氨基酸有限公司; 黄体酮注射液购自浙江仙居制药股份有限公司; 米非司酮购自南京森贝伽生物科技有限公司; ELISA试剂盒购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; ER- α 与bcl-2抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.3 方法

1.3.1 实验分组与子宫肌瘤大鼠模型的建立^[5]

将50只大鼠随机分为5组, 每组10只, 空白对照组(Control组), 模型组(Hys组), 黄连素低剂量组(Ber-L组), 黄连素高剂量组(Ber-H组)和阳性对照组(Mif组)。除空白对照组外, 其余各组大鼠肌肉注射苯甲酸雌二醇注射液0.5 mg/kg, 每周3次, 共12周, 继而肌肉注射黄体酮注射液5 mg/kg, 每周2次, 共4周; 空白对照组在相同时间给予等量生理盐水。造模结束后, 黄连素低剂量组和黄连素高剂量组分别给予10 mg/kg和20 mg/kg灌胃, 每

天1次; 阳性对照组给予米非司酮4.7 mg/kg灌胃, 每天1次, 共给药30 d; 空白对照组与模型组灌胃等量生理盐水。

1.3.2 血清中IFN- α 和TNF- α 的含量及全血黏度

末次给药当天, 给予10%水合氯醛腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 分为2份, 一份5 000 r/min, 取上清液, 按照ELISA试剂盒说明书检测IFN- α 和TNF- α 的含量水平; 另一份加入到含肝素的试管, 置于血液流变仪中检测在不同切变率下的全血黏度与血浆黏度。

1.3.3 大鼠子宫系数

实验结束后, 颈椎脱臼处死大鼠, 分离大鼠子宫, 称量, 计算子宫系数, 子宫系数=子宫重量/体重 \times 100%。

1.3.4 大鼠子宫形态学观察

将分离的子宫用10%甲醇固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 进行HE染色, 置于光学显微镜下观察子宫的组织病变程度, 评分标准: -, 子宫肌层未见增厚, 无炎性浸润, 结构完整; +, 子宫肌层增厚不明显, 轻微炎性细胞浸润; ++, 子宫肌层增厚, 明显可见炎性细胞浸润; +++, 子宫肌层显著增厚, 炎性细胞浸润严重。

1.3.5 免疫组织化学观察

将子宫组织的石蜡切片置于60 °C烘箱中烤片过夜, 常规二甲苯脱蜡, 依次加入梯度乙醇浸泡5 min, 3% H₂O₂室温孵育10 min, 蒸馏水冲洗3次; 将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸缓冲液, 电炉加热至沸腾, 冷却, 重复2次; 加入5% BSA封闭液室温孵育20 min, 弃去多余液体; 加入相应一抗, 4 °C孵育过夜, PBS洗涤, 加入相应二抗, 室温孵育30 min, PBS洗涤; 滴入SABC室温孵育20 min, PBS洗涤; 加入显色剂, 反应完成后蒸馏水洗涤, 苏木素复染2 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 置于显微镜下观察。以细胞浆中出现棕黄色颗粒为bcl-2阳性, 细胞核中出现棕黄色颗粒为ER阳性。通过染色强度与阳性细胞数所占比例进行标准评定: 结果分为4个等级, 阴性(-); 弱阳性(+); 阳性(++); 强阳性(+++)。

1.4 统计学处理

实验数据采用SPSS15.0进行处理, 所有数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用Bonferroni校正的t检验, 以P<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄连素对各组大鼠血清中 IFN- α 和 TNF- α 含量的影响

与空白对照组比较, 模型组大鼠血清中IFN- α 含量明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), TNF- α 含量明显上升, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 黄连素各剂量组和阳性对照组的IFN- α 含量明显上升, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), TNF- α 含量明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

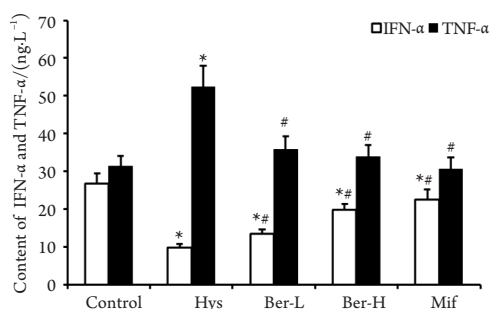


图1 黄连素对各组大鼠血清中IFN- α 和TNF- α 含量的影响

Figure 1 Effect of berberine on the levels of IFN- α and TNF- α
与Control组相比, * $P < 0.05$; 与Hys组相比, # $P < 0.05$; $n = 3$ 。
Compared with the Control group, * $P < 0.05$; compared with the Hys group, # $P < 0.05$; $n = 3$.

2.2 黄连素对各组大鼠血液黏度的影响

与空白对照组相比, 模型组大鼠全血黏度、血浆黏度与红细胞聚集指数明显上升; 与模型组相比, 黄连素低、高剂量组和阳性对照组的全血

黏度、血浆黏度与红细胞聚集指数均明显下降, 差异具有统计学意义(表1)。

2.3 黄连素对各组大鼠子宫系数的影响

与空白对照组相比, 模型组大鼠的子宫系数明显增加($P < 0.05$); 与模型组相比, 黄连素低、高剂量组和阳性对照组的子宫系数明显降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 表2)。

2.4 黄连素对大鼠子宫病理组织学的影响

空白对照组大鼠子宫平滑肌层无明显增生, 肌细胞排列整齐, 无炎性细胞浸润, 评分“-”; 模型组大鼠子宫平滑肌层显著增厚, 肌细胞增生, 可见炎性细胞浸润, 评分“+++”; 黄连素低剂量组子宫肌层轻度增厚, 轻度炎性细胞浸润, 评分“++”, 黄连素高剂量组和阳性对照组内膜腺体无明显增生, 少见炎性细胞浸润, 评分“+”(图2)。

2.5 黄连素对雌激素受体 ER 含量的影响

空白对照组大鼠子宫平滑肌细胞核中有ER阳性颗粒表达, 呈弱阳性(+); 模型组大鼠子宫平滑肌细胞核中ER呈强阳性表达(+++); 与模型组相比, 黄连素各剂量组和阳性对照组的ER含量明显降低(++ , 图3)。

2.6 黄连素对 bcl-2 蛋白表达的影响

空白对照组大鼠子宫平滑肌细胞浆中bcl-2蛋白呈弱阳性(+), 模型组平滑肌细胞胞浆中bcl-2蛋白呈强阳性(+++); 与模型组相比, 黄连素各剂量组和阳性对照组的bcl-2蛋白表达显著减弱(++ , 图4)。

表1 黄连素对血液黏度变化的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Berberine on the changes of blood viscosity($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	全血黏度		血浆黏度	红细胞聚集指数
	高切变率	低切变率		
Control组	4.67 \pm 0.24	9.81 \pm 0.58	1.39 \pm 0.16	6.13 \pm 0.52
Hys组	5.56 \pm 0.31*	12.41 \pm 0.84*	1.72 \pm 0.13*	7.61 \pm 0.50*
Ber-L组	5.11 \pm 0.22*#	10.74 \pm 0.49*#	1.51 \pm 0.14*#	6.57 \pm 0.39#
Ber-H组	4.78 \pm 0.13#	10.37 \pm 0.52#	1.43 \pm 0.18#	6.27 \pm 0.42#
Mif组	4.75 \pm 0.14#	10.05 \pm 0.38#	1.42 \pm 0.18#	6.21 \pm 0.39#

与Control组相比, * $P < 0.05$; 与Hys组相比, # $P < 0.05$ 。

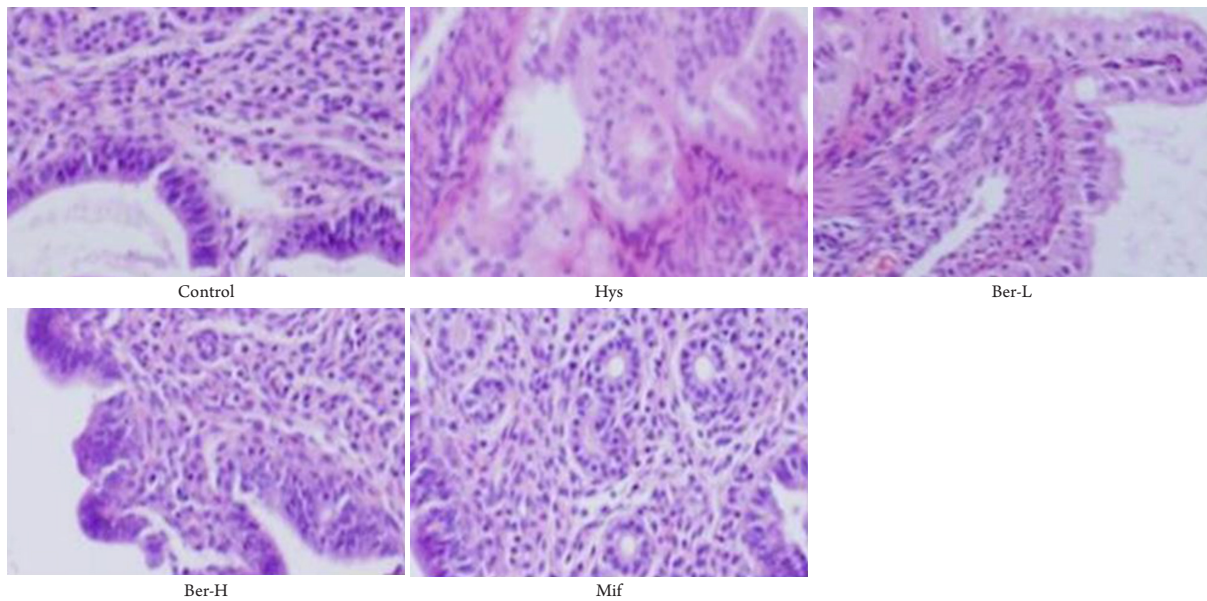
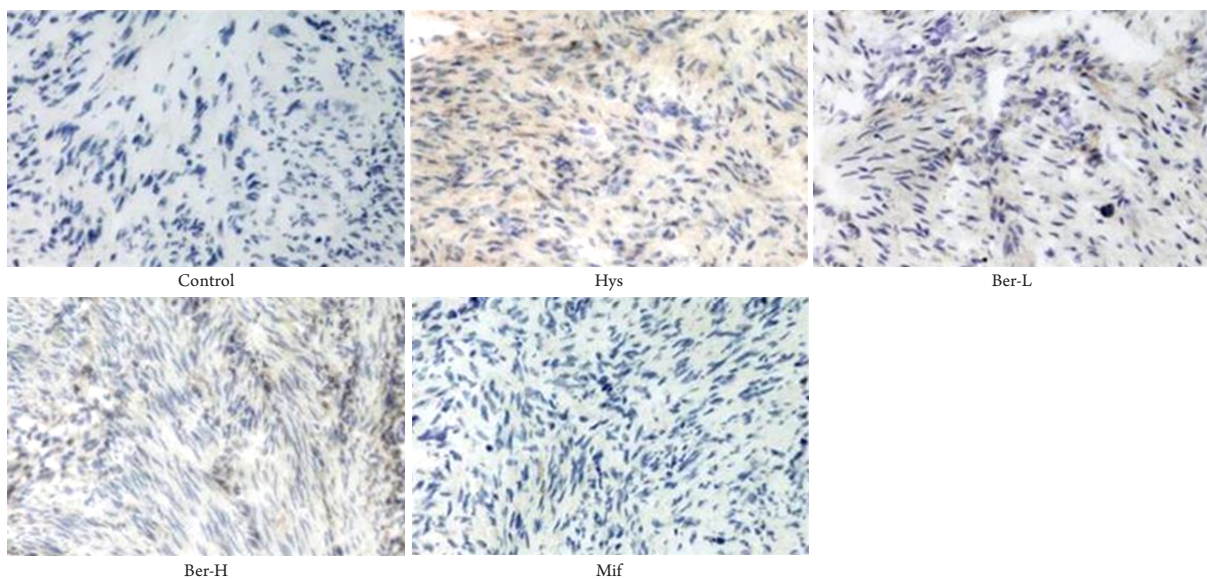
Compared with the Control group, * $P < 0.05$; compared with the Hys group, # $P < 0.05$.

表2 黄连素对各组大鼠子宫系数的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of berberine on the changes of uterus coefficient in rats ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	体重/g	子宫的重量/g	子宫系数/%
Control组	334.8 ± 29.7	0.583 ± 0.118	0.174 ± 0.041
Hys组	259.4 ± 17.6*	1.498 ± 0.298*	0.577 ± 0.104*
Ber-L组	296.3 ± 20.6	1.243 ± 0.327* [#]	0.419 ± 0.097* [#]
Ber-H组	293.4 ± 19.7	1.124 ± 0.318* [#]	0.381 ± 0.107* [#]
Mif组	289.7 ± 23.6	1.087 ± 0.286* [#]	0.376 ± 0.124* [#]

与Control组相比, * $P<0.05$; 与Hys组相比, * $P<0.05$ 。

Compared with the Control group, * $P<0.05$; compared with the Hys group, * $P<0.05$.

图2 HE染色检验黄连素对大鼠子宫病理组织学的影响($\times 200$)Figure 2 Effect of berberine on the morphological changes in uterus measured by HE staining ($\times 200$)图3 免疫组织化学分析黄连素对雌激素受体ER- α 含量的影响($\times 200$)Figure 3 Effect of berberine on the expression of ER- α measured by immunohistochemical staining ($\times 200$)

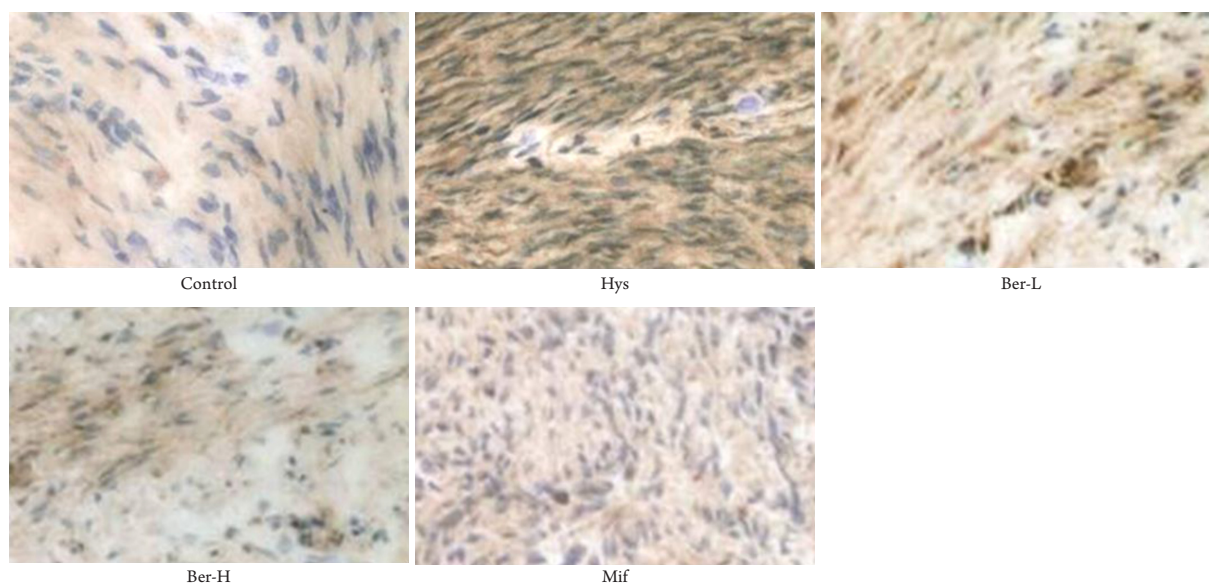


图4 免疫组织化学分析黄连素对bcl-2蛋白表达的影响($\times 200$)

Figure 4 Effect of berberine on the expression of bcl-2 measured by immunohistochemical staining ($\times 200$)

3 讨论

子宫肌瘤是一种由子宫平滑肌演变的良性肿瘤, 至今子宫肌瘤的发病机制尚未清楚。现代医学研究^[6]发现: 子宫肌瘤患者血液流变性处于浓、黏、凝、聚的病理状态, 采用血液流变学的指标可以有效反应子宫肌瘤患者病情变化。本研究发现: 黄连素能够有效改善子宫肌瘤大鼠的血液流变学各项指标, 改变血液的浓、黏、凝、聚的状态, 使血液流畅, 改善局部水肿的状况, 消散局部肿块, 从而抑制子宫肌瘤的生长。

IFN- α 是一种肿瘤抑制蛋白, 具有调节正常与恶变细胞生长和分化的作用; TNF- α 是炎症反应的重要细胞因子, 具有加剧平滑肌组织细胞损伤及增生病变。有研究^[7-8]发现: 子宫肌瘤患者血清中TNF- α 含量高于正常人水平。本研究发现: 黄连素能够增加IFN- α 的含量, 从而抑制子宫平滑肌细胞的增殖; 同时降低TNF- α 的含量, 缩小肌瘤, 提示IFN- α 与TNF- α 可能是子宫肌瘤治疗效果的一个指标。另有报道^[8]指出雌激素是子宫肌瘤生长的主要刺激因素, 可致有丝分裂, 对子宫肌瘤的增殖具有促进作用。国外研究^[9]发现子宫肌瘤局部的雌激素含量水平明显高于正常子宫平滑肌组织, 当外源性给予雌激素, 可刺激子宫平滑肌细胞增生, 体积增大, 从而引起子宫肌瘤的发生。本研究发现在子宫肌瘤大鼠模型的子宫肌瘤平滑肌细胞中雌激素含量显著增加, 给予黄连素后能降低雌激

素的含量, 提示黄连素具有缩小肌瘤体的作用。

Bcl-2是一种位于线粒体与核周膜的原癌基因, 通过抵抗细胞程序性死亡, 导致细胞迅速增殖, 增加肿瘤发生的机会。国内研究^[10]发现子宫肌瘤组织中的bcl-2表达显著高于正常组织, bcl-2的高表达阻滞细胞凋亡而使子宫肌瘤得以生长。本研究发现黄连素能够抑制子宫肌瘤平滑肌细胞中bcl-2的蛋白表达, 提示黄连素可能通过抑制bcl-2的表达, 从而抑制子宫肌瘤的生长。

综上所述, 黄连素可能通过改善机体血液流变学, 调节IFN- α 与TNF- α 的含量, 降低子宫系数, 同时抑制子宫肌瘤平滑肌细胞中原癌基因bcl-2的表达, 从而达到缩小瘤体的功效。

参考文献

1. 沈杨, 许茜, 徐洁, 等. 子宫肌瘤危险因素的流行病学调查研究[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(3): 189-193.
SHEN Yang, XU Qian, XU Jie, et al. The epidemiological survey on the susceptibility to uterine leiomyoma[J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2013, 29(3): 189-193.
2. Brohl AS, Li L, Andikyan V, et al. Age-stratified risk of unexpected uterine sarcoma following surgery for presumed benign leiomyoma[J]. Oncologist, 2015, 20(4): 433-439.
3. Jin P, Zhang C, Li N. Berberine exhibits antitumor effects in human ovarian cancer cells[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2015, 15(4):

- 511-516.
4. Zhao GL, Yu LM, Gao WL, et al. Berberine protects rat heart from ischemia/reperfusion injury via activating JAK2/STAT3 signaling and attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(3): 354-367.
 5. 王占利, 李坤寅, 赵颖, 等. 长期与短期双模法子宫肌瘤大鼠模型制备的比较[J]. *中医研究*, 2012, 25(5): 54-57.
WANG Zhanli, LI Kuyin, ZHAO Ying, et al. Long-term and short-term dual-mode method of the preparation of the rat model with hysteromyoma[J]. *Traditional Chinese Medicinal Research*, 2012, 25(5): 54-57.
 6. 王莉琳, 时燕萍. 子宫肌瘤的血液流变学应用探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(11): 2409-2411.
WANG Lilin, SHI Yanping. The application of hemorheology in hysteromyoma[J]. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 28(11): 2409-2411.
 7. 季晋艳, 傅海燕, 傅文君, 等. 宫瘤宁对子宫肌瘤患者性激素及细胞因子水平的研究[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(10): 1200-1201.
JI Jinyan, FU Haiyan, FU Wenjun, et al. The study of gongliuning on the levels of sex hormones and cytokines in the patients with hysteromyoma[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(10): 1200-1201.
 8. 辛华, 周伟, 邓伟雄, 等. 米非司酮对子宫肌瘤患者血清IL-6和TNF- α 的影响[J]. *中国医药导报*, 2010, 7(11): 57-58.
XIN Hua, ZHOU Wei, DENG Weixiong, et al. The influence of Mifepristone on the IL-6 and TNF- α in hysteromyoma[J]. *China Medical Herald*, 2010, 7(11): 57-58.
 9. Rizzello A, Franck J, Pellegrino M, et al. A proteomic analysis of human uterine myoma[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2016, 18(2): 167-174.
 10. Csatlós É, Máté S, Laky M, et al. Role of apoptosis in the development of uterine leiomyoma: analysis of expression patterns of bcl-2 and bax in human leiomyoma tissue with clinical correlations[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2015, 34(4): 334-339.

本文引用: 黄亚哲, 安爱平, 陈建玲, 王丽蕊, 王秋宇, 李晓翔, 祁彦萍. 黄连素对实验性子宫肌瘤大鼠的作用及相关机制[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(8): 1565-1570. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.003

Cite this article as: HUANG Yazhe, AN Aiping, CHEN Jianling, WANG Lirui, WANG Qiuyu, LI Xiaoxiang, QI Yanping. Effects and mechanisms of berberine on hysteromyoma in rats[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(8): 1565-1570. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.003