

## 实验研究

# 凋膜止崩液对人离体子宫内膜增生症(EH)腺上皮细胞中 Rb2/p130 表达的影响<sup>\*</sup>

严 谨<sup>1</sup> 贺丰杰<sup>2\*\*</sup>

(1. 陕西中医学院 2013 级硕士研究生, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医学院附属医院, 陕西 咸阳 712046)

**摘 要:** **目的** 通过体外培养人离体子宫内膜增生症(EH)腺上皮细胞, 比较凋膜止崩液靶向干预用药前后细胞中 Rb2/p130 的表达影响, 揭示凋膜止崩液靶向祛除增生子宫内膜的机制。 **方法** 对 30 例子宫内膜增生症患者的子宫内膜组织进行分离、提取腺上皮细胞, 应用细胞免疫荧光法对腺上皮细胞进行鉴定; 采用实时定量聚合酶链反应(Realtime PCR)分别检测用药组与空白组细胞中 Rb2/p130 的表达变化。 **结果** Rb2/p130 基因在用药组(大、中、小剂量)中表达量依次递减, 差异有显著性( $P < 0.05$ ), 空白对照组细胞中 Rb2/p130 的表达低于用药各组。 **结论** Rb2/p130 基因的表达在用药组(大、中、小剂量)中表达逐渐降低, 提示 Rb2/p130 可能参与了子宫内膜癌前病变的病理过程, 用药剂量与 Rb2/p130 的表达之间的关系对指导临床治疗有一定意义。

**关键词:** 凋膜止崩液; 子宫内膜增生症; Rb2/p130; 腺上皮细胞

中图分类号: R711.32 文献标识码: A 文章编号: 1002-168X(2014)05-0073-04

## Influence of Tiaomo Zhibeng Fluid Endometrial Hyperplasia in Isolated Human (EH) Rb2/p130 Expression of the Epithelial Cells

Yanjin<sup>1</sup> He Fengjie<sup>2</sup>

(1. 2013 postgraduate student of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046;

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046)

**Abstract:** **Objective** Through isolated human endometrial hyperplasia (EH) cultured in vitro and glandular epithelial cells, compared to Tiaomo Zhibeng fluid square target influence to the expression of Rb2/p130 in the cells before and after the treatment, explore the mechanism of intervention, Tiaomo Zhibeng fluid targeted dispel endometrial hyperplasia. **Methods** separated 30 patients with endometrial hyperplasia endometrium glandular epithelium cell extraction, identification of glandular epithelial cells were subjected to use cell immunofluorescence; quantitative real-time polymerase chain reaction (Realtime PCR) were detected the expression change of Rb2/p130 medicine group and blank group in cells. **Results** Rb2/p130 gene in the medication group (high, middle, low dose) the expression level of decreasing, the difference was significant ( $P < 0.05$ ), the expression of Rb2/p130 cells in blank control group is lower than the medication groups. **Conclusion** the expression of Rb2/p130 gene in the drug group (high, middle, low dose) decreased gradually, suggested that Rb2/p130 may be involved in the pathological process of endometrial precancerous lesions, the relationship between the expression of Rb2/p130 and dosages has certain significance for guiding the clinical treatment.

**Keywords:** Tiaomo Zhibeng fluid; endometrial hyperplasia; Rb2/p130; gland epithelial cells

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81173290)

\*\* 通讯作者: 贺丰杰, 硕士研究生导师。E-mail: hefengjie@tom.com.

子宫内膜癌为女性生殖道三大恶性肿瘤之一,属中医“崩漏,癥瘕,五色带”范畴。目前公认子宫内膜增生症(EH)是子宫内膜癌前病变,由EH向子宫内膜癌的转变是一个多步骤的复杂过程,其中,抑癌基因的异常在此过程中起着相当重要的作用。我们采用 Realtime PCR 法对子宫内膜增生症患者的内膜组织进行分离提取的腺上皮细胞进行用药前后的检测,研究调膜止崩方在用药组与空白组细胞中 Rb2/p130 表达的影响。探讨调膜止崩方对人离体 EH 腺上皮细胞中 Rb2/p130 表达的影响,进一步了解其内在规律,用以检测病变进展及预后分析和指导临床治疗有重要意义。

## 1 材料与方法

**1.1 组织标本的获取** 选取 2013 年~2014 年在陕西中医学院附属医院妇科行诊刮术的患者 30 例(30 例患者中医辨证符合血瘀证型、年龄 27~52 岁、B 超提示内膜厚度 >1 cm、子宫内膜病理检查符合 EH)。所有患者术前三个月均未用过激素治疗。在无菌条件下所取子宫内膜,立即用无菌 PBS 液冲洗两遍,置于 10 mL 无菌冰冷 DMEM/F12 培养液(含青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL),1 小时内用冰盒运往实验室进行分离培养。标本留取经医院伦理委员会批准,征得患者同意并签署知情同意书。

## 1.2 主要试剂及仪器

**1.2.1 主要试剂** DMEM/F12 培养液(Thermo 公司)、胎牛血清、总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒(均购自北京全式金生物技术有限公司)、胶原酶 IV(Gibco 公司)、DNase I(Sigma 公司)、鼠抗人角蛋白抗体、SP 试剂盒、荧光标记二抗异硫氰酸荧光素 FITC(均购自博士德生物工程有限公司)、Rb2/p130 引物(南京金斯瑞生物科技有限公司) RT-PCR 所用引物序列:基因 Rb2/p130 上游引物序列(5'-3') GGGTGTGCAATGTCTGAGTG;基因 Rb2/p130 下游引物序列(5'-3') ACATTCCCAAAAGGTGGCTA; Beta-actin 上游引物序列(5'-3') AGAGCTACGAGCTGCCTGAC; Beta-actin 下游引物序列(5'-3') AGCACTGTGTTGGCGTACAG。

**1.2.2 主要仪器** 超净工作台、细胞离心机、倒置显微镜、荧光定量 PCR 仪、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱。

**1.3 调膜止崩方的组成** 由鸦胆子、莪术、元胡三味中药组成。提取有效成分(鸦胆子提取鸦胆子油、元胡提取生物碱、莪术提取莪术油)制成调膜止崩液,由陕西中医学院药物研究所生产提供。实验用药按注射剂工艺制成注射液定容,高压灭菌备用。

## 1.4 方法

**1.4.1 子宫内膜细胞分离、培养**在参考文献<sup>[1-4]</sup>的方法上略有改动:PBS 液清洗子宫内膜组织,去除血污,在冰浴上将组织剪碎至直径 <1 mm<sup>3</sup>;加入 IV 型胶原酶(终浓度 1 mg/ml),37℃ 恒温水浴摇床中消化 1 h 后,加入 DNase I(终浓度 15 U/ml),继续消化 30 min,加入含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化;经 100 目(孔径 150 μm)筛网过滤一次,滤去未消化组织,将所得的子宫内膜细胞悬液置入离心管,50 g,1 min 低速离心,此时沉淀中主要是腺上皮细胞;弃上清液,用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养液重新悬浮腺上皮细胞团,过滤 400 目筛网(孔径 40 μm),停留在筛网上的细胞团即为腺上皮细胞,将筛网反置于另一皿上,反洗筛网回收腺上皮细胞;将所得的腺上皮细胞悬液经 700 r/min,离心 5 min,弃上清液,加入适量完全培养基,调成细胞悬液;调整细胞浓度,腺上皮细胞团以 400 个团/cm<sup>2</sup> 接种于培养瓶内,置于 37℃,体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的孵育箱内培养;3 小时后吸出,离心 1000 r/min,离心 5 min,用胰蛋白酶消化沉淀细胞 5 min,使腺细胞团分散成单个细胞。以 5 × 10<sup>5</sup>/ml 的密度接种于 6 孔培养板(培养板内放有盖玻片)和培养瓶中。24 小时后换液,此后每隔 2 天换液一次,每日用倒置显微镜直接观察细胞形态和细胞生长情况。

**1.4.2 子宫内膜腺上皮细胞激光共聚焦显微镜免疫荧光染色细胞鉴定。**

**1.4.2.1 免疫细胞化学染色鉴定** 用细胞角蛋白-19 抗体对腺上皮细胞进行细胞爬片免疫化学染色。一抗:鼠抗人 CK-19 多克隆抗体(浓缩液) 1:50 稀释,二抗为生物素标记羊抗小鼠 IgG,及 SP 试剂盒。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。用 PBS 代替一抗作为阴性对照组。

**1.4.2.2 激光共聚焦显微镜免疫荧光鉴定** 当六孔板中的细胞汇合度达到 70% 左右,用 4% 多聚甲醛固定细胞,给细胞中加入 CK-19 多克隆抗

体,再滴入用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 IgG 抗体。室温置于暗室中 30 min,PBS 洗 3 次,立即封固,摄片。

**1.4.3 RT-PCR 分析** 用药组与空白组细胞中 Rb2/p130 的 mRNA 表达 提取总 RNA,严格按照总 RNA 提取试剂盒说明书进行;单链 cDNA 的合成;PCR 反应。

**1.5 统计学方法** 将所得数据经 EpiData 进行数据录入,并将数据导入为 Microsoft Office Excel 2007 工作表。数据结果采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,应用 SPSS17.0 统计软件包作统计处理,将所有实验结果进行方差齐性检验,组间比较采用 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 实验结果

**2.1 细胞培养结果** 倒置显微镜观察腺上皮细胞。经初次分离细胞接种后 2 小时内见子宫内膜腺上皮细胞呈分散的细胞团块(图 1:初次分离腺细胞团 x200)。细胞接种后第二天见腺上皮细胞平铺生长,细胞呈蝌蚪形,轮廓清晰,呈旋涡状排列,细胞排列紧密,胞浆呈颗粒状,核大而圆,核仁明显(图 2:2 天后贴壁的腺细胞)。

**2.2 子宫内膜腺上皮细胞激光共聚焦显微镜免疫荧光染色细胞鉴定**,腺上皮细胞成团,旋涡状排列生长,胞浆内见红色荧光标记,细胞核显示绿色荧光,证实培养细胞为 CK-19 阳性腺上皮细胞(图 3:腺细胞阳性)。

**2.3 Realtime PCR 结果:**与空白对照组相比,用药各组中 Rb2/p130 表达均高于对照组 ( $P < 0.05$ );用药各组间对比,Rb2/p130 表达由大剂量向小剂量依次递减 ( $P < 0.05$ )(图 4)。

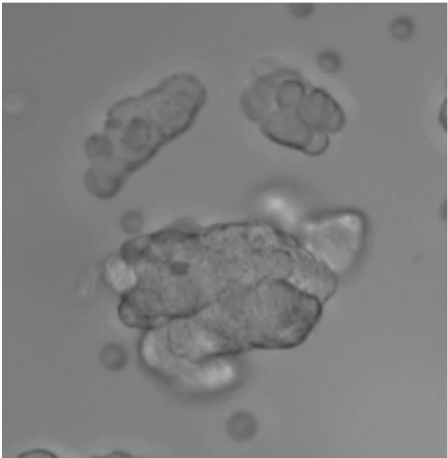


图 1 初次分离腺细胞团 x200

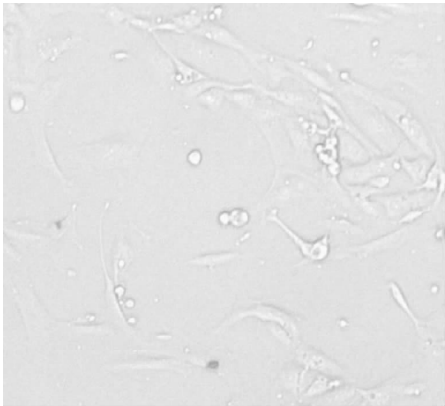


图 2 2 天后贴壁的腺细胞

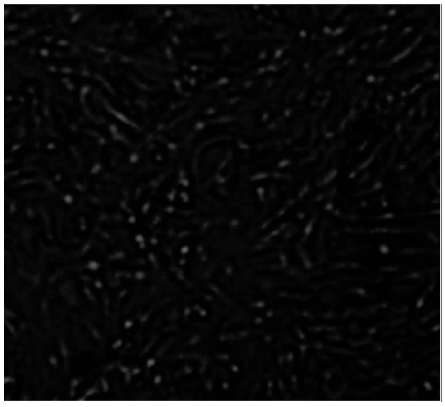


图 3 腺细胞阳性

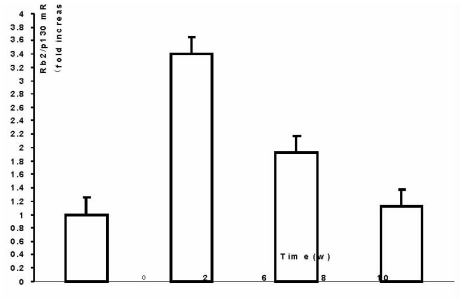


图 4 Realtime PCR 结果

## 4 讨论

Rb2/p130 是 1993 年被发现并克隆的抑癌基因,属 Rb 基因家族<sup>[5]</sup>。生理状态下 p130 和 pRb 通过对转录因子的活性进行调节而实现对细胞周期的负调节作用,将正在分裂的细胞阻滞于 G1 期<sup>[6]</sup>。Rb2/p130 普遍存在于正常组织内,其基因的突变或缺失与人类多种肿瘤的发生密切相关,在多种恶性肿瘤如卵巢癌、肝癌、和肺癌中低表达<sup>[7]</sup>。本研究发现,空白组中细胞 Rb2/p130 的表达较用药组(大、中、小剂量)降低,而用药组间对比发现,大剂量组依次到小剂量组中 Rb2/p130 的表达量逐渐降低。Rb2/p130 表达的变化使子宫内

膜细胞的增殖与凋亡失去平衡,导致子宫内膜异常增生,这可能是导致无排卵性功血发病的分子基础。空白组细胞中 Rb2/p130 表达明显减弱,而大剂量用药组中 Rb2/p130 表达量明显增加,说明调膜止崩方“上调 Rb2/p130 的表达,加速异常增生的子宫内膜细胞凋亡”可能是其祛除子宫内膜的机制之一。

本研究运用现代科技手段,从中医药对调节细胞抑癌基因 Rb2/p130 表达的影响出发进行研究,为临床治疗子宫内膜增生症的新方法——中药靶向干预子宫内膜增生症,提供了理论依据。

参考文献

[1] Ryan IP, Schriock ED, Taylor RN. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78: 642 - 649.

[2] 谭先杰, 刘东远, 郎景和, 等. 子宫内膜腺上皮及基质细胞分离、培养作为子宫内膜异位症体外细胞模型的探

究[J]. 现代妇科进展, 2001, 11(1): 30 - 32.

[3] 陆品红, 刘嘉茵. 人子宫内膜基质细胞及腺上皮细胞的分离纯化和体外培养[J]. 南京医科大学学报, 2005, 25(5): 334 - 336.

[4] Matthew CJ, Redfern CP, Hirst BH, et al. Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture [J]. Fertil Steril, 1992, 57(4): 990 - 997.

[5] Mascinillo V, Bagella L, et al. Frequent loss of Rb2/p130 in human ovarian carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9): 3098 - 3103.

[6] Claudio PP, Deluca A, Howard CM, et al. Function analysis of pRb2/p130 interaction with cyclins. Cancer Res, 1966, 56(91): 2003 - 2008.

[7] 胡雪军, 金波, 马艳菊, 等. Rb2/p130 基因编码蛋白在非小细胞肺癌中的表达及临床意义[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(6): 631 - 633.

(收稿日期: 2014 - 07 - 30 编辑: 文颖娟)

(上接第 72 页)

嗽及肺风疮, 胸、面上疮。”益母草有清热、凉血、解毒、祛瘀生新等作用, 此三味药物为古今治疗痤疮常用药。且方中当归养血活血, 久病必虚, 久病必瘀, 长期服用当归, 可使面部重现红润光泽; 黄芩具有广谱抗菌作用, 能有效防止皮肤炎症的发生; 甘草调和诸药。总之, 消痤汤对于淡化面部色素, 缩短治疗时间有很好的积极作用。本研究采用 1064 nmNd: YAG 激光联合消痤汤, 经过五次治疗取得了显著的临床效果, 无明显副作用且使皮肤更光滑细腻, 毛孔缩小, 值得推广。

治疗中注意事项: ①能量密度不宜过大, 以免灼伤皮肤; ②对于合并黄褐斑等面部色素病患者应从低剂量开始, 否则可能刺激黑色素细胞, 加重色素沉着; ③治疗后要注意皮肤护理, 避免日晒, 建议防晒霜使用 SPF40 以上。

参考文献

[1] EMIL A, ARIANE K. Understanding the Burden of Adult Female Acne[J]. Clinical aesthetic, 2014, 7(2): 22 - 30.

[2] Katsambas AD, RALGA Diacnéal. a Retinaldehyde and Glycolic Acid Association and Postinflammatory Hyperpig-

mentation in Acne A Review[J]. Dermatology, 2005, 210(1): 39 - 45.

[3] WOO JIN LEE, YOUN JIN KIM. Formation of new melasma lesions in the periorbital area following, High - fluence, 1064 - nm, Q - switched Nd: YAG, laser[J]. Journal of Cosmetic and Laser Therapy, 2013, 15(6): 163 - 165.

[4] 张晶晶, 韦文朗. E 光治疗痤疮及痤疮后色素沉着疗效观察[J]. 中国美容医学, 2013, 22(3): 368 - 370.

[5] 郝玉玲. 光子嫩肤技术治疗面部色素性皮肤病的效果观察[J]. 中国医药导刊, 2013, 15(7): 1161 - 1162.

[6] 仲少敏, 刘慧贤. 乙醇酸换肤联合强脉冲光治疗痤疮炎症后色素沉着的疗效及耐受性观察[J]. 临床皮肤科杂志, 2013, 42(12): 731 - 734.

[7] 杨勤宇, 付红艺. 585nm 脉冲染料/1064nmNd: YAG 复合激光治疗痤疮的疗效观察[J]. 激光杂志, 2010, 31(4): 70 - 72.

[8] Chen Z, Tang, M. The Effects of Q - Switched Nd: YAG, Laser Irradiation in the Wavelength of 1064nm and 532nm on Guinea Pigs Skin Tissue[J]. Conf Proc IEEE Eng, Med Biol Soc, 2005, (14) 7: 6809 - 6812.

(收稿日期: 2014 - 07 - 04 编辑: 王益平)