

甲蓉片对子宫内腺癌裸鼠移植瘤超微结构的影响*

★ 曾蕾^{1**} 陶莉莉^{1***} 黄真炎² 叶燕丽³ (1. 广州中医药大学第一附属医院妇科 广州 510405; 2. 广州中医药大学电镜室 广州 510405; 3. 中山大学肿瘤防治中心 广州 510060)

摘要:目的:观察甲蓉片对子宫内腺癌裸鼠移植瘤超微结构的影响。方法:利用子宫内腺癌细胞株 HEC-1-B 制备裸小鼠移植瘤模型。接种 10 天成瘤后,成瘤率 100%。将荷瘤裸鼠随机分为 3 组(甲蓉片组、雌激素组、空白对照组)。成瘤后每天分别灌服含甲蓉片、倍美力的药液及生理盐水,28 d 后处死裸鼠,在透射电镜下观察 3 组移植瘤的超微结构。结果:3 组均表现为肿瘤细胞增生分裂活跃与细胞凋亡、细胞坏死同时存在的现象。雌激素组与另 2 组比较,肿瘤细胞多处于增生活跃期。甲蓉片组肿瘤细胞中细胞溶解、死亡及凋亡的比例较多,与空白对照组一致。结论:甲蓉片对裸鼠移植瘤细胞生长无明显影响,可作为该药改善围绝经期诸证的安全性的重要依据之一。

关键词:甲蓉片;HEC-1-B;子宫内腺癌;裸小鼠;透射电镜;超微结构

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

Effect of Ultrastucture Change on Transplanted Endometrial Carcinoma of Nude Mice after Treatment of Pill Jiarong

ZENG Lei, TAO Li-li, HUANG Zhen-yan, YE Yan-li

The First Affiliated Hospital, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405

Abstract: Objective: To study the effect of ultranstructure change on transplanted endometrial carcinoma of nude mice after treatment of Pill Jiarong. Methods: At first HEC-1-B cell line was inoculated subcutaneously into nude mice and grew progressively. Nude mice were divided into three groups randomly: Pill Jiarong group, Premarin group and Control group. Treated with Pill Jiarong, Premarin and normal saline respectively for 28 days then killed them. To observe the ultrastructure of carcinoma of three groups under transmission electron microscopy(TEM). Results: Three groups of tumor cells represented both hyperplastic, fissiparous actively, and cytoclasis, apoptosis. Compare with the other two groups, tumor cells of Premarin group represented hyperplastic and fissiparous actively mostly. Tumor cells of group Pill Jiarong mostly represented miosis, cytoclasis, cytolysis and apoptosis. It is in an identical manner with Control group. Conclusion: Pill Jiarong has no distinct effect on transplanted endometrial carcinoma of nude mice, it will be one of the important prove for improving the symptom of Perimenopausal period.

Key words: Pill Jiarong; HEC-1-B; Endometrial carcinoma; Nnude mice; Transmission electron microscopy; Ultrastucture

子宫内腺癌是欧美国家发病率最高的妇科恶性肿瘤,在我国其发病率也日益升高。如果早期子宫内腺癌患者由于手术造成绝经,其患冠心病及骨折的风险也将增加 3 倍^[1]。因此相当一部分子宫内腺癌患者在治疗癌症后出现雌激素缺乏的相关症状,有应用激素替代治疗(HT)的需求。但是子宫内腺癌的发生与无保护的雌激素过度刺激密切相关,即

使已经切除了子宫,外源性的雌激素是否会刺激隐匿性的肿瘤细胞生长是人们关注的焦点。对于初次手术后的子宫内腺癌患者应用 HT 是否增加内腺癌复发的风险尚无最终结论^[2]。我们在临床上用甲蓉片治疗围绝经期综合征疗效明显,因此,我们考虑用甲蓉片来替代 HT 改善子宫内腺癌患者术后的生存质量问题。本研究通过观察中药甲蓉片对子宫内

* 基金项目:广东省科技厅资助项目(2KM0450S)

** 作者简介:曾蕾(1980-),女,在读医学硕士。研究方向:生殖免疫与内分泌。Tel:020-36591360, E-mail: winnalei@hotmail.com

*** 通讯作者:陶莉莉,(1962-),女,教授,主任医师,医学博士。研究方向:生殖免疫与内分泌。Tel:020-36591360

膜腺癌裸鼠移植瘤超微结构的影响,探讨甲蓉片用于提高子宫内腺癌术后患者的生存质量的安全性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

瘤株为 HEC-1-B 细胞株(ER、PR 均为阳性),由中国科学院上海生科院细胞资源中心提供,购自美国 ATCC。BABL/L 纯系裸小鼠 36 只,鼠龄 4~6 周,体重 18~22 g,雌性,购于广州中医药大学实验动物中心。采用直立式层流架式笼养,每笼 6 只。动物实验室温度控制在 18~24℃,湿度控制在 70%±15% 范围内。

1.2 实验用药

甲蓉片由西安博爱制药有限责任公司生产,批号 Z20026690,规格为 0.23 g/片,制成药液,含甲蓉片 0.082 892 g/ml。倍美力由惠氏艾尔斯特制药公司艾尔斯特药厂生产,批号 0303034,规格为栗色药片含有结合雌激素 0.3 mg/片,制成药液,含结合雌激素 0.009 01 mg/ml。

1.3 实验方法

HEC-1-B 细胞在 5% CO₂、37℃ 培养箱中用完全培养液(采用 DME(低糖 1 g/L 葡萄糖)+15% FBS(胎牛血清)+非必需氨基酸(GIBCOX)培养。细胞为上皮样贴壁生长,每 4~5 天用消化液(0.25% 胰酶+0.02 EDTA 混合液)消化后传代一次。培养的细胞处于生长旺盛时期进行移植。将已制备成细胞悬液的 HEC-1-B 细胞(19.8×10^6 个/ml),取 0.3 ml 于裸鼠肩胛区皮下注射。每只裸鼠接种 6.0×10^6 个细胞,注射后每天观察有无红肿、感染。

1.4 裸鼠的分组、给药方法及剂量

接种 10 d 成瘤后,成瘤率 100%。将 36 只子宫内腺癌移植瘤荷瘤小鼠随机分为 3 组,每组 12 只。

甲蓉片组:每只裸小鼠每天灌服甲蓉片 0.1 ml(含甲蓉片 0.082 892 g/ml);

雌激素组:每只裸小鼠每天灌服倍美力溶液 0.1 ml(含结合雌激素 0.009 01 mg/ml);

空白对照组:每只裸小鼠每天灌服生理盐水 0.1 ml。

接种 10 d 成瘤后,每组各处死 1 只裸小鼠,观察移植瘤大体形态学,取肿瘤组织作标本,行透射电镜检查。其余裸小鼠每天分别灌服含甲蓉片、倍美力的药液及生理盐水,每 4 天用游标卡尺测量肿瘤大小,共观察 4 周,绘制细胞生长曲线图。4 周后处死裸小鼠,取肿瘤组织作标本,行透射电镜检查。

1.5 透射电镜样品制作

快速取出标本,立即用 2.5% 戊二醛进行前固定,并将标本切细成大约 1 mm³ 大小。3 h 后,再用锇酸进行后固定、漂洗,逐级脱水,包埋,来卡 T 型超薄切片机切片,TEM-1200EX 透射电镜观察。

2 结果

2.1 各组裸鼠皮下移植瘤用药前透射电镜观察结果

接种 10 d 成瘤后,每组各处死 1 只裸小鼠,取部分肿瘤组织按上法制备超薄切片作透射电镜检查。三组电镜结果基本一致:(1)细胞大小形态各异,细胞排列失去正常极性,但细胞之间仍可见腺腔结构,腺腔形态各异,大小不一致,部分腺腔肿胀,腺腔内可见脱落的细胞胞质和皂泡样突起,腺细胞的游离面可见长短不一的微绒毛,常呈变异形态,其数量较正常的子宫内膜少^[4];(2)细胞间可见紧密连接,结构可见,部分细胞连接间隙扩大,桥粒结构部分发育不良;(3)胞浆内线粒体较多,形态大小不一,呈线状、卵圆状、杆状等,部分肿胀,线粒体嵴少、短,甚至消失,排列紊乱;粗面内质网较丰富,排列不规则,有的呈平行线状、盘绕环状、同心圆状或蜂窝状结构,许多粗面内质网呈不同程度囊状扩张;表面核糖体较多,游离的糖原颗粒较丰富,分布不均,含多种退化、结构不清的细胞器;(4)细胞核大小不一,核多形明显,可见双核、多核,多数肿瘤细胞核增大,核/浆比增加;核膜出现深浅不一的凹陷切迹,细胞核与细胞质间隙增宽,提示细胞核萎缩,核内以常染色质为主,异染色质较少,核质分布均匀,核仁增大,常偏位,有的肿瘤细胞有 2~3 个核仁,有的核仁呈网眼状结构,有的呈致密团块状,有的核内可见到核小体,核浆内未见到核包涵体^[3,5-7]。

2.2 各组裸鼠皮下移植瘤用药后 28 d 透射电镜观察结果

2.2.1 雌激素组 细胞大小形态明显不一,细胞排列更加紊乱。大部分细胞呈现增生活跃分裂期,具备新生细胞的特征:腺体较多,形态不规则,微绒毛较多,线粒体、糖原较丰富;粗面内质网较多,表面核糖体较用药前增多,可见细胞分裂相。细胞核形态极不规则,核浆内细胞核常染色质较多且分布均匀,异染色质较少,核浆分布均匀。核仁数目多,可见较多畸形核仁,核异型性更明显;核浆内可见核体,可见核包涵体。一小部分细胞处于成熟老化期,或变性溶解,或凋亡。腺体减少,腺腔肿胀,腺腔内微绒毛较用药前及其他各组更加减少;细胞间连接结构消失或严重发育不良;线粒体肿胀、空泡化,线粒体

嵴消失,形态大小悬殊;粗面内质网减少,部分呈囊性扩大,部分脱颗粒;细胞核变性溶解,核常染色质变稀变少,染色质浓集、边聚及空化,异染色质增多。或细胞空泡化增多,细胞膜固缩,细胞核染色质着色加深,呈实性细胞团块结构,并可见凋亡小体。雌激素组的透射电镜下表现以细胞增生活跃分裂期与成熟老化变性死亡及凋亡并存,而视野内以增生活跃期细胞为主。

2.2.2 空白对照组 (1)可见癌细胞大小形态不一,细胞排列失去正常极性;(2)腺腔结构可见,腺腔表面微绒毛较用药前少,较雌激素组多;细胞间连接结构可见;(3)线粒体肿胀、空泡化明显,嵴少短,排列紊乱,形态大小悬殊,粗面内质网部分肿胀扩张,部分脱颗粒;(4)细胞核变性,常染色质减少,异染色质增多。或见核固缩。小部分细胞处于活跃期:线粒体、糖原颗粒较多,无肿胀,形态大小不一,呈线状、卵圆状、杆状等,粗面内质网丰富,表面核糖体较多,但较用药前减少,增生活跃程度不及雌激素组;细胞核大小不一,可见双核、多核、不规则畸形核、分叶核,核仁明显,呈网眼状或较密团块形核仁状,亦可见不规则的畸形核仁,核膜可出现深浅不一的切迹,核浆内可见核体,未见到核包涵体。可见细胞处于成熟老化期,或变性溶解,或凋亡。

2.2.3 甲蓉片组 (1)可见癌细胞大小形态不一,细胞排列失去正常极性;(2)腺腔结构可见,腺腔表面微绒毛较用药前少,较雌激素组多;细胞间连接结构可见或消失;(3)线粒体肿胀、空泡化明显,线粒体嵴消失,形态大小悬殊;粗面内质网减少,部分呈囊性扩大,部分脱颗粒;(4)细胞核变性溶解,核常染色质变稀变少,染色质浓集、边聚及空化,异染色质增多。或细胞空泡化增多,细胞膜固缩,细胞核染色质着色加深,呈实性细胞团块结构,并可见凋亡小体。小部分细胞处于活跃期:细胞核大小不一,可见双核、多核、不规则畸形核、分叶核,核仁明显,呈网眼状或较密团块形核仁状,亦可见不规则的畸形核仁,核膜可出现深浅不一的切迹,核浆内可见核体,未见到核包涵体。但总体上以细胞成熟死亡溶解及凋亡多见。

3 讨论

甲蓉片为多种中药组方的纯中药制剂,主要分为倒卵五叶加、熟地黄、菟丝子、肉苁蓉、女贞子,具有补精益气、养血安神、温补肝肾之功效,对围绝经期综合征及绝经后骨质疏松等临床疗效满意。近年来的研究提示,甲蓉片组方中的中药材中包含一

类具有雌激素活性的化学物质,它们的结构可能与雌激素相似,可能存在与雌激素受体结合的基团,也可能以其他方式与机体作用而表现为雌激素样效应,植物雌激素有防治绝经期综合征,绝经后骨质疏松的功效^[8,9]。

随着细胞动力学研究工作的进展,发现癌组织细胞群中有两大类不同性质的细胞同时存在,一类是增殖性细胞,另一类是非增殖性细胞。由于恶性肿瘤细胞增殖动力学的特点,肿瘤细胞在电镜下的表现为增生分裂活跃与细胞老化、死亡和凋亡同时并存的特点^[10]。我们研究发现,空白对照组与甲蓉片组电镜结果均不同程度表现为细胞器变性及细胞凋亡、变性死亡,甲蓉片组、空白对照组、雌激素组生长曲线斜率依次增大,表明各组肿瘤的生长速度依次增快。肿瘤生长速度在甲蓉片组、空白对照组之间无显著性差异($P > 0.05$),在雌激素组明显高于空白对照组、甲蓉片组($P < 0.05$)。以空白对照组作为恶性肿瘤自身生长的标准作为对比,结果发现无证据显示中药甲蓉片刺激肿瘤生长。本实验研究表明甲蓉片对裸鼠移植瘤细胞生长无明显影响,可作为该药改善围绝经期诸证的安全性的重要依据之一。

参考文献

- [1] Mueck AO, Seeger H. Hormone therapy after endometrial cancer [J]. *Endocrine Related cancer*, 2004, 11(2):305.
- [2] 廖秦平. 女性生殖道恶性肿瘤与激素替代治疗[J]. *中国处方药*, 2004, 32(11):10.
- [3] 张友忠. 早期子宫内膜腺癌及其癌前病变的超微结构研究[J]. *现代妇产科进展*, 1996, 5(3):220.
- [4] 王自能, 陈少霞. 正常人类子宫内膜上皮超微结构[J]. *暨南大学学报*, 1991, 15(2):38.
- [5] 苏杏满. 子宫内膜腺癌的透射电镜与扫描电镜观察[J]. *中华物理医学杂志*, 1994, 16(2):107.
- [6] 李万胜. 子宫内膜癌的电镜诊断研究[J]. *中华物理医学杂志*, 1998, 20(2):96-98.
- [7] 王素霞. 子宫内膜癌的超微结构研究[J]. *电子显微学报*, 2000, 19(6):777-780.
- [8] Murkies AL, Lombard C, Strauss BJG, et al. Dietary flour supplementation decreases postmenopausal hot flashes: Effect of soy and wheat[J]. *Maturitas*, 1995, 21:189.
- [9] Yan Z, Tong TS, Joan EC, Patricia AM, Suzanne H. Daidzein and genistein glucuronides in vitro are weakly estrogenic and activate human natural killer cells at nutritionally relevant concentrations[J]. *J Nutr*, 1999, 129(2):399.
- [10] 陈惠贞, 谭道彩, 吴绪峰. 现代妇科肿瘤治疗学[M]. 湖北: 湖北科学技术出版社, 1998:14.

(收稿日期:2008-06-17)