

来曲唑通过下调 bcl-2 和上调 caspase-3 的表达 促进人子宫肌瘤细胞调亡

龚霞红¹, 申清香², 刘 珏², 李 兴³, 王 光³, 周寿红³

(1. 安化县第二人民医院妇产科, 湖南 益阳 413522; 2. 南华大学附属第二医院妇产科;
3. 南华大学医学院生理学教研室)

摘要: **目的** 探讨来曲唑对人子宫肌瘤细胞增殖和调亡以及 bcl-2 和 caspase-3 表达的影响。 **方法** 来曲唑处理原代培养的人子宫肌瘤细胞, 用 MTT 法测定细胞生长曲线, 流式细胞术测定细胞调亡率, 放射免疫法测定培养基中雌二醇水平, 用实时定量聚合酶链反应和蛋白印迹检测 bcl-2 和 caspase-3 表达。 **结果** 来曲唑呈浓度和时间依赖性抑制子宫肌瘤细胞的增殖, 降低子宫肌瘤细胞的调亡率, 同时呈浓度依赖性降低子宫肌瘤细胞雌二醇的分泌。来曲唑呈浓度依赖性降低 bcl-2 的表达, 增加 caspase-3 的表达。 **结论** 来曲唑抑制子宫肌瘤细胞的增殖, 促进其调亡, 其机制可能与来曲唑减少雌二醇的分泌、降低 bcl-2 表达和增加 caspase-3 表达有关。

关键词: 来曲唑; 子宫肌瘤细胞; 增殖; 调亡; bcl-2; 半胱氨酸蛋白酶-3

中图分类号: R711.74 文献标识码: A

Letrozole Inhibits Cells Apoptosis Through the Down-Regulation of Bcl-2 Expression and Up-Regulation of Caspase-3 Expression in Human Uterine Leiomyoma Cells

GONG Xiahong, SHEN Qingxiang, ZHOU Shouhong, et al

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the Second Hospital of Anhua County,
Yiyang, Hunan 413522, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of letrozole on proliferation, apoptosis and the expression of bcl-2 and caspase-3 in human uterine leiomyoma cells. **Methods** Primary culture human leiomyoma cells were treated with letrozole (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L) for 24, 48 and 72 hours and MTT assay was used to detect the growth curve. The rates of apoptosis of cells were measured by flow cytometry. The level of estradiol in culture medium was measured by radioimmunity assay. The expression of bcl-2 and caspase-3 were detected by Real-time PCR and Western blot. **Results** The proliferations of uterine leiomyoma cells were significantly inhibited and the rates of apoptosis of uterine leiomyoma cells were markedly increased by treatment with 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L letrozole for 48 and 72 hours in a dose-dependent and time-dependent manner. The levels of estradiol in culture medium were decreased in a dose-dependent manner by treatment with 10^{-7} , 10^{-6} and 10^{-5} mol/L letrozole for 72 hours. The expression of bcl-2 was significantly decreased and the expression of caspase-3 was markedly increased by letrozole in a dose-dependent manner. **Conclusions** Letrozole inhibits the proliferation, promotes the apoptosis, which mechanism may be related to the decrease of estradiol secretion, the decrease of bcl-2 expression and the increase of caspase-3 expression induced by letrozole in human uterine leiomyoma cells.

Key words: letrozole; uterine leiomyoma cells; proliferation; apoptosis; bcl-2; caspase-3

子宫肌瘤(uterine leiomyoma)是源于子宫平滑肌细胞的常见良性肿瘤,在育龄期妇女中发病率高达 20%~30%。目前认为子宫肌瘤是一种雌激素依赖性肿瘤^[1]。芳香化酶是合成雌激素的关键酶,

研究发现芳香化酶在肌瘤组织中过度表达^[2]。来曲唑是第 3 代芳香化酶抑制药,是人工合成的茚三唑类衍生物,它通过抑制芳香化酶,使雌激素水平下降,从而消除雌激素对肿瘤生长的刺激作用^[3]。本研究旨在探讨来曲唑对子宫肌瘤细胞增殖和凋亡的影响,并初步探讨其机制,从而为临床上子宫肌瘤的保守治疗方法提供新的思路和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清(杭州四季青),DMEM 培养基(In-vitrogen),胰蛋白酶、I 型胶原酶、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)和来曲唑原药等为美国 Sigma 公司产品。 CO_2 培养箱(德国 Heraeus)、酶标仪(美国宝特)和流式细胞仪(美国贝克曼库尔特)。ABI7500 荧光定量 PCR 仪及分析软件(美国 ABI 公司);图像分析系统(武汉华海公司,HIPAS-1000 型);凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司,GOS7500 型);垂直电泳仪与转膜系统(美国 BioRad 公司)。兔抗人 α -actin、bcl-2 和 caspase-3 抗体以及辣根过氧化物酶标记二抗(Santa Cruz 公司,美国),所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 标本采集和细胞培养

选择 35~50 岁子宫肌瘤患者 7 例,术后均经病理学证实。手术切除子宫后,无菌条件下取肌瘤组织约 1 cm^3 ,置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、无菌、含抗生素(青霉素 100 U/mL 和链霉素 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$)的 PBS 缓冲液中,保温密闭送至细胞培养室。无菌条件下,将肌瘤组织用 PBS 缓冲液洗 3 遍,剪碎至 $<1\text{ mm}^3$,吸入离心管内静置,去上清,加入含 800 U/mL I 型胶原酶的 DMEM 培养基于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 6 h 后,吸取少量消化液在倒置显微镜下观察,若组织块已分散成小的细胞团或单个细胞,遂加入含血清的 PBS 液终止消化。将消化液和分次收集的细胞悬液通过不锈钢网过滤,滤液经 $1\text{ }500\text{ r/min}$ 离心 10 min ,弃上清,收集细胞。加入 DMEM 培养基吹打悬浮后,接种于 50 mL 培养瓶中,置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、饱和湿度、含 $5\%\text{ CO}_2$ 的细胞培养箱中培养。培养 24 h 后,在倒置显微镜下观察见细胞贴壁生长,倒去未贴壁的细胞并换液。利用肌瘤细胞贴壁生长的特性分离肌瘤细胞。以后每隔天换液 1 次,并在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

当培养瓶中细胞生长接近铺满瓶底 $80\%\sim 90\%$ 即可传代。用台盼蓝染色,观察细胞活性并记数,以 5×10^5 个细胞/mL 的密度接种于 24 孔细胞培养板。培养基含 10% 胎牛血清,将细胞培养板置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 培养箱中继续培养。细胞用 α -actin 抗体进行免疫细胞化学法染色鉴定为子宫肌瘤细胞。取生长状态稳定、呈对数生长期细胞用于实验。

1.3 实验分组

将细胞分组为:(1)子宫肌瘤细胞组:加入相同量的二甲基亚砜(DMSO);(2) 10^{-8} mol/L 来曲唑组;(3) 10^{-7} mol/L 来曲唑组;(4) 10^{-6} mol/L 来曲唑组;(5) 10^{-5} mol/L 来曲唑组。来曲唑用 DMSO 溶解,DMSO 在培养基中的浓度控制在 1% 以内。

1.4 MTT 法测定细胞增殖

细胞用胰蛋白酶消化后,制成 1×10^5 个/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度来曲唑,继续培养 24、48、72 h,实验终止前 4 h 加入 MTT 溶液(5 mg/mL) $20\text{ }\mu\text{L}$,继续孵育 4 h,终止培养,吸去上清液,每孔加入 DMSO $200\text{ }\mu\text{L}$,振荡 10 min ,用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的吸光度 A 值。按下列公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率($\%$) = $1 - (A_{\text{药物处理组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

不同浓度的来曲唑处理人子宫肌瘤细胞不同时间后,将各组细胞悬液移入 15 mL 离心管中, $1\text{ }500\text{ r/min}$ 离心 5 min ,弃上清后用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, $70\%\text{ 乙醇}$ $4\text{ }^\circ\text{C}$ 固定过夜。将样品离心后 PBS 缓冲液洗涤 2 次,加入 PI($50\text{ }\mu\text{g/mL}$),Rnase ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$),Triton $100\times(10\%)$ 的染液 $300\text{ }\mu\text{L}$,于室温下避光染色 20 min 后,流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

1.6 放射免疫法测定细胞培养基中雌二醇含量

来曲唑作用 72 h 后,收集各组细胞培养基, $3\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 20 min 后取上清, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。放免法测定雌二醇(estradiol, E_2) 含量。具体方法按试剂盒说明进行。

1.7 实时定量 PCR 检测 bcl-2 和 caspase-3 mRNA 表达

来曲唑处理 72 h 后,按 Trizol 试剂盒说明提取各组细胞的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板,按试剂盒说明进行逆转录反应,合成 cDNA 第一链, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。选取 cDNA 样品进行 10 倍梯度稀释,

分别进行 Real-time PCR 反应,反应体系 25 μL , 含 Hot Star Taq Master Mix ($2 \times$) 12.5 μL , PCR 上下游引物及探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.3 μL , cDNA 4 μL , 灭菌去离子水补足 25 μL 。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 激活 Hot Star Taq DNA 合成酶, 扩增循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 80 s, 共 40 个循环。Real-time PCR 反应在 ABI7500 实时定量 PCR 系统上进行。引物和探针序列上海生物工程有限公司合成, bcl-2 引物: 上游: 5'-TCT GGT CCC TTG CAG CTA GT-3', 下游: 5'-CAG GGA GGC TAA GGG GTA AG-3'。caspase-3 引物: 上游: 5'-CTT TCT CAA GGA CCA CCG-3', 下游: 5'-TCA CTT GGC ATA CAA ATC A-3'。同时扩增 β -actin 基因作为内对照, β -actin 引物: 上游: 5'-CCA TCA TCT TGC AGG AGC G-3', 下游: 5'-CTG GCA GTG AGC TAT ACT CG-3'。

1.8 Western-Blot 检测 bcl-2 和 caspase-3 蛋白质的表达

来曲唑处理 72 h 后, 提取各实验组细胞的总蛋白。BAC 法进行蛋白质定量。取 50 μg 蛋白质样本加入 $2 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液中, 煮沸使蛋白质变性。用 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 60 ~ 100 mA 1 h 将蛋白质用半干转膜仪转移至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 加入 1: 200 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 ~ 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 4 ~ 8 h, 洗膜 3 次。蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片, 显影、定影后凝胶图像分析系统对胶片扫描, 以内参的灰度值为 100% 进行比较和半定量分析。

1.9 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用单因素方差分析; 两两比较采用 SNK-q 检验; 用 SPSS 14.0 统计软件系统进行数据分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 来曲唑对子宫肌瘤细胞增殖的影响

如图 1 所示, 相同药物浓度 (10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L) 作用 48 h 与作用 24 h 比较, 其对肌瘤细胞增殖的抑制作用显著增加 ($P < 0.05$); 相同药物浓度 (10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L) 作用 72 h 与作用 24 和 48 h 比较, 其对肌瘤细胞增殖的抑制作用显著增加

(均 $P < 0.05$), 呈时间依赖性。 10^{-8} mol/L 来曲唑作用不同时间 (24、48 和 72 h) 对子宫肌瘤无明显抑制作用, 各组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。不同浓度来曲唑作用 48 和 72 h 时均抑制了子宫肌瘤的增殖, 随着药物浓度的增加, 增殖抑制作用越高, 各组之间的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 呈浓度依赖性。不同浓度来曲唑作用 24 h 对子宫肌瘤无明显抑制作用, 各组之间的差异无显著性 ($P > 0.05$)。

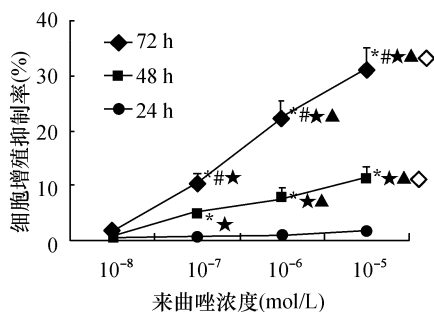


图 1 来曲唑对子宫肌瘤细胞增殖的影响 ($n = 6$). $P < 0.05$, *: 与 24 h 处理组比较; #: 与 48 h 处理组比较; ★: 与 10^{-8} mol/L 组比较; ▲: 与 10^{-7} mol/L 组比较; ◇: 与 10^{-6} mol/L 组比较

Fig. 1 Effect of letrozole on the cell proliferation of human uterine leiomyoma cells ($n = 6$)

2.2 来曲唑对子宫肌瘤细胞凋亡率的影响

对照组子宫肌瘤细胞未见明显凋亡现象, 来曲唑处理 72 h 后, 细胞出现不同程度凋亡, 而且细胞凋亡呈现浓度依赖性 ($P < 0.05$), 随浓度的增高凋亡率逐步上升; 细胞凋亡也呈现时间依赖性 ($P < 0.05$), 随时间的延长凋亡率逐步上升 (图 2)。

2.3 来曲唑对子宫肌瘤细胞分泌 E_2 的影响

与子宫肌瘤细胞组比较, 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L 组细胞培养基中 E_2 浓度显著性降低 (均 $P < 0.05$); 随着来曲唑浓度的增加, E_2 浓度逐步降低, 组间差异有显著性 (均 $P < 0.05$), 呈现浓度依赖性 (表 1)。

2.4 来曲唑对子宫肌瘤细胞 bcl-2 和 caspase-3 表达的影响

用不同浓度来曲唑处理子宫肌瘤细胞 72 h 后, 采用实时定量 PCR 和 Western-Blot 检测 bcl-2 和 caspase-3 的表达, 结果显示来曲唑呈浓度依赖性降低 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达, 却呈浓度性方式上调 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达 (图 3 和图 4)。

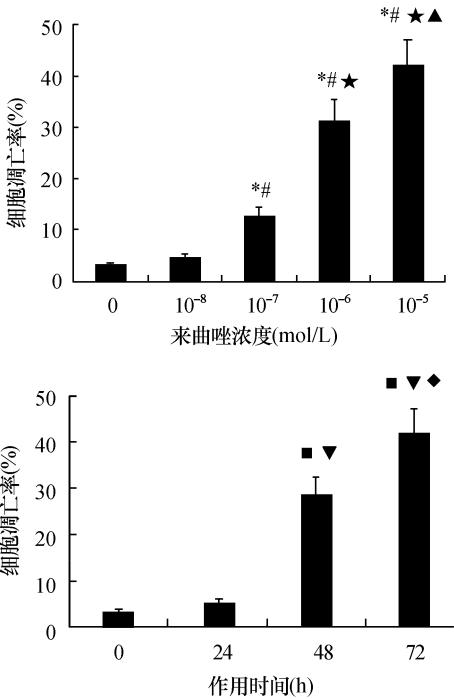


图 2 不同浓度来曲唑及 10⁻⁵ mol/L 来曲唑作用不同时间对子宫肌瘤细胞凋亡率的影响 (n = 6)。P < 0.05, * : 与子宫肌瘤组 (0 mol/L) 比较; #: 与 10⁻⁸ mol/L 组比较; ★ : 与 10⁻⁷ mol/L 组比较; ▲ : 与 10⁻⁶ mol/L 组比较. ■ : 与 0 h 组比较; ▼ : 与 24 h 组比较; ◆ : 与 48 h 组比较

Fig. 2 Effect of letrozole on the cells apoptosis of human uterine leiomyoma cells (n = 6)

表 1 来曲唑对子宫肌瘤细胞分泌 E₂ 的影响 (n = 6)
Table 1 Effect of letrozole on the secretion of estradiol (E₂) in human uterine leiomyoma cells (n = 6)

组 别	E ₂ 含量 (pg/mL)
子宫肌瘤组	874.39 ± 93.45
10 ⁻⁸ mol/L 来曲唑组	688.41 ± 63.38 ^a
10 ⁻⁷ mol/L 来曲唑组	579.16 ± 51.51 ^{ab}
10 ⁻⁶ mol/L 来曲唑组	479.82 ± 43.54 ^{abc}
10 ⁻⁵ mol/L 来曲唑组	403.52 ± 35.67 ^{abcd}

P < 0.05, a: 与子宫肌瘤组比较; b: 与 10⁻⁸ mol/L 来曲唑组比较; c: 与 10⁻⁷ mol/L 来曲唑组比较; d: 与 10⁻⁶ mol/L 来曲唑组比较

3 讨 论

研究认为子宫肌瘤是一种激素依赖性疾 病, 雌激素有诱发并促进子宫肌瘤生长的作用。研究证实子宫肌瘤比正常子宫肌层中的雌二醇浓度明显增高, 说明子宫肌瘤局部有高雌二醇环境的存在^[4-5]。子宫肌瘤细胞能够分泌 E₂, 成为子宫肌瘤局部高 E₂ 水平的重要来源。芳香酶是细胞色素 P450 与还原

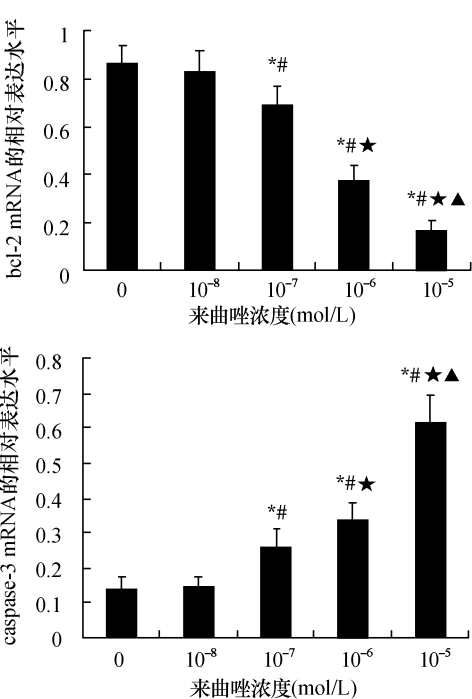


图 3 不同浓度来曲唑对子宫肌瘤细胞 bcl-2 和 caspase-3 mRNA 表达的影响 (n = 6)。P < 0.05, * : 与子宫肌瘤组 (0 mol/L) 比较; #: 与 10⁻⁸ mol/L 组比较; ★ : 与 10⁻⁷ mol/L 组比较; ▲ : 与 10⁻⁶ mol/L 组比较

Fig. 3 Effect of letrozole on the mRNA expression of bcl-2 and caspase-3 in human uterine leiomyoma cells (n = 6)

型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 2 细胞色素 P450 还原酶构成的复合物, 是雄激素转化为雌激素过程中的关键酶^[5]。研究显示子宫肌瘤组织中芳香化酶活性大大高于周围正常子宫肌组织, 并且芳香化酶活性倾向于远离肌瘤中心越大, 这说明转化雄激素为雌激素的芳香化酶有助于子宫肌瘤的发展^[6]。

芳香酶抑制剂就是通过抑制该酶的活性来阻断雌激素合成的。来曲唑为人工合成三苯三唑类衍生物, 是一种高度特异性的非甾体类第三代芳香化酶抑制剂^[7]。来曲唑与内源性底物竞争芳香化酶的活性位点, 从而可逆地抑制该酶的活性, 降低雌激素水平, 理论上可治疗雌激素依赖性疾 病。本研究结果显示用来曲唑处理体外培养的人子宫肌瘤细胞后, 呈浓度和剂量依赖性显著抑制了子宫肌瘤细胞的增殖, 促进了子宫肌瘤细胞的凋亡。肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡共同作用的结果。细胞增殖活性的增加和细胞凋亡活性的降低是子宫肌瘤发病的重要机制。因此提示来曲唑能抑制子宫肌瘤细胞增殖, 促进其凋亡, 为来曲唑用于子宫肌瘤的治疗提供实验依据。Shozu 等^[3]发现应用选择性的芳香化

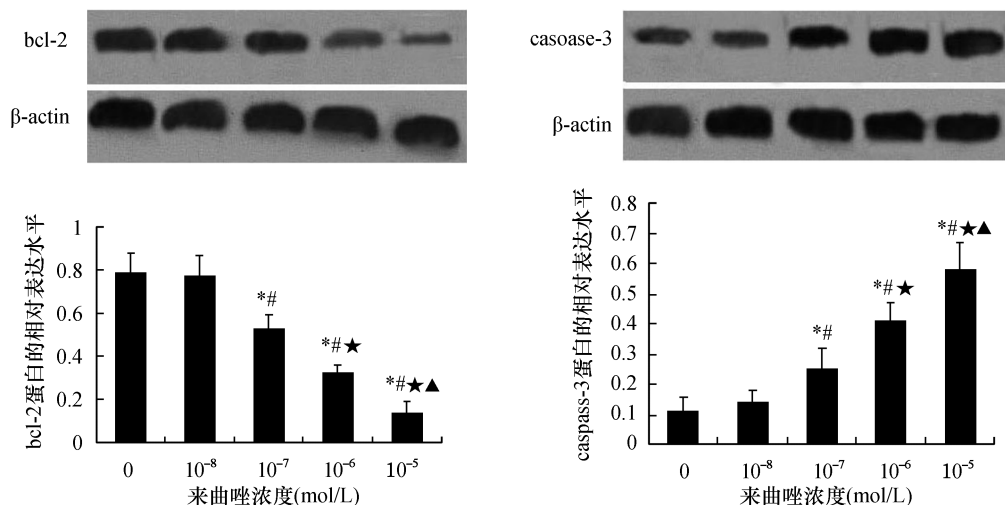


图4 不同浓度 (mol/L) 来曲唑对子宫肌瘤细胞 bcl-2 和 caspase-3 蛋白表达的影响 ($n=6$). $P<0.05$, *: 与子宫肌瘤组比较; #: 与 10^{-8} mol/L 组比较; ★: 与 10^{-7} mol/L 组比较; ▲: 与 10^{-6} mol/L 组比较

Fig. 4 Effect of letrozole on the protein expression of bcl-2 and caspase-3 in human uterine leiomyoma cells ($n=6$)

酶抑制药治疗有症状但无恶化倾向的子宫肌瘤有显著疗效。研究发现来曲唑治疗能显著降低子宫肌瘤的大小和促进子宫肌瘤细胞的凋亡^[8-9]。

肿瘤的发生是细胞增殖与凋亡失衡共同作用的结果,细胞凋亡活性降低是子宫肌瘤发病的重要原因。人类和哺乳动物细胞凋亡主要由半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 家族介导,而 bcl-2 是细胞凋亡线粒体途径中起重要调节作用的因子。凋亡刺激因素可使线粒体膜上的 bax 表达增高,促进细胞色素 C 的释放,后者与人凋亡蛋白酶激活因子结合,活化半胱氨酸蛋白酶-29 (caspase-29),进而活化半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3),从而引起凋亡,而 Bcl-2 可通过多种途径抑制凋亡的发生,是重要的抗凋亡基因。研究显示在正常子宫肌层中 bcl-2 呈现低表达,在子宫肌瘤标本中 bcl-2 呈现高表达^[10-11]。本研究结果显示来曲唑呈浓度依赖性降低 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达,同时呈浓度依赖性增加 caspase-3 mRNA 和蛋白的表达。因此提示来曲唑能抑制子宫肌瘤细胞增殖,促进其凋亡,其机制可能与来曲唑降低了 bcl-2 的表达和增加 caspase-3 的表达有关。

本研究结果亦发现来曲唑显著性降低了培养的人子宫肌瘤细胞雌二醇的原位合成。因此来曲唑抑制子宫肌瘤细胞增殖,促进其凋亡,可能是通过抑制芳香酶,减少雌激素产生的途径实现的。但是,来曲唑抑制增殖促进凋亡的机制很复杂,也可能还有很多的作用途径没有被发现,以及其中涉及的信号通

路均有待进一步的研究。

总之,本研究证实来曲唑能抑制培养的子宫肌瘤细胞的增殖促进其凋亡,其机制可能与来曲唑抑制子宫肌瘤细胞分泌雌二醇,降低了 bcl-2 和增加了 caspase-3 的表达有关,为临床将来曲唑用于子宫肌瘤的治疗提供实验基础。

参考文献:

- [1] Okolo S. Incidence, aetiology and epidemiology of uterine fibroids [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2008, 22(4):571-588.
- [2] Sumitani H, Shozu M, Segawa T, et al. In situ estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/ intracrine mechanism [J]. Endocrinology, 2000, 141 (10):3852-3861.
- [3] Shozu M, Murakami K, Segawa T, et al. Successful treatment of a symptomatic uterine leiomyoma in a perimenopausal woman with a nonsteroidal aromatase inhibitor [J]. Fertil Steril, 2003, 79(3):1012-1017.
- [4] Nierth-Simpson EN, Martin MM, Chiang TC, et al. Human uterine smooth muscle and leiomyoma cells differ in their rapid 17beta-estradiol signaling; implications for proliferation [J]. Endocrinology, 2009, 150(1):2436-2445.
- [5] 周建斌, 袁萍, 欧阳征仁, 等. 米非司酮和子宫动脉栓塞术治疗子宫肌瘤的疗效比较 [J]. 南华大学学报·医学版, 2006, 32(2):232-234.

(上接第 160 页)

- [6] Chen D, Reierstad S, Lu M, et al. Regulation of breast cancer-associated aromatase promoters[J]. *Cancer Lett*, 2009, 273(1): 15-27.
- [7] Ishikawa H, Reierstad S, Demura M, et al. High aromatase expression in uterine leiomyoma tissues of African-American women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(5): 1752-1756.
- [8] Macedo LF, Sabnis G, Brodie A. Aromatase inhibitors and breast cancer[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1155(1): 162-173.

- [9] 张旭艳, 吕秀萍, 戴 森, 等. 来曲唑对 EM 大鼠 P450arom mRNA 及 COX2 mRNA 表达的影响[J]. *现代妇产科进展*, 2009, 18(8): 609-612.
- [10] Han M, Kim JY, Park JE, et al. Effects of letrozole on proliferation and apoptosis in cultured leiomyoma cells treated with prostaglandin E(2)[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008, 138(1): 83-88.
- [11] Kovacs KA, Lengyel F, Kornyei JL, et al. Differential expression of Akt/protein kinase B, bcl-2 and bax proteins in human leiomyoma and myometrium[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 87(4250): 233-240.