

定坤丹对子宫内膜异位症模型大鼠的作用

何闰华, 王文艳, 卫 兵

摘要 自体子宫内膜移植法建立子宫内膜异位症(EMS)模型大鼠,比较给药前后移植物体积、大鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平、异位内膜中血管内皮生长因子(VEGF)的表达。经定坤丹治疗后移植物体积、血清TNF- α 水平、异位内膜中VEGF的表达与疾病模型组相比均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。定坤丹对EMS模型大鼠的异位内膜生长有一定的抑制作用,其作用机制可能与血清TNF- α 水平降低和VEGF的表达减少有关。

关键词 定坤丹; 子宫内膜异位症; 肿瘤坏死因子- α ; 血管内皮生长因子

中图分类号 R 711.71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)11-1693-03

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)在育龄期女性当中发病率为10%^[1],不孕、痛经、盆腔包块为其主要症状。EMS的病因不清楚,发病机制主要有异位种植学说、在位内膜决定论、血管形成学说及免疫炎症学说等^[2]。治疗上目前以腹腔镜手术为主,术后辅以药物治疗来减缓复发。常用的药物副作用大、远期复发率高、部分药物价格昂贵,因此需要寻找一种副作用小,患者易于接受,疗效确切的药物。王燕^[3]采用定坤丹治疗痛经及EMS的研究表明,其作用明显,副作用小。关于定坤丹对EMS的作用机制尚无文献报道。该研究使用定坤丹治疗EMS模型大鼠,初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雌性未孕SD大鼠50只,清洁级,(200±10)g,购于安徽医科大学实验动物中心。动物饲养于安徽医科大学动物实验室,室内平均温度25℃,平均湿度50%。

1.1.2 药品与试剂 定坤丹(山西广誉国药有限公司);达那唑胶囊(江苏联环药业股份有限公司);2%戊巴比妥钠(上海西塘生物科技有限公司);庆大霉素(芜湖康奇制药有限公司);苯甲酸雌二醇(宁波第二激素厂,兽用);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) ELISA试剂盒(武汉华美生物技术有限公司);抗鼠血管内皮生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)抗体(美国Abcam公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠EMS模型的建立 50只大鼠均在术前2d给予苯甲酸雌二醇0.1 mg/(kg·d)肌肉注射,统一动情周期。10只作为正常组,另外40只按张丽雅等^[4]自体子宫内膜移植方法建立模型。2%戊巴比妥钠(0.2 ml/100 g)腹腔注射麻醉,关腹前每只大鼠腹腔滴入庆大霉素4 000 U消毒。术后第1天开始给予庆大霉素4 000 U/只腹腔注射,每日1次,连续5 d,苯甲酸雌二醇0.1 mg/kg肌注,隔日1次,共3次,促异位内膜生长。术后常规饲养。手术后4周再次剖腹探查,观察移植部位有无移植物生长,测量其体积。

1.2.2 模型检测与纳入标准 异位子宫内膜组织在移植部位生长,形成圆形、透明或部分有咖啡色囊液的囊肿,囊肿周围可见大量细小的新生血管,体积明显增大,达8 mm³以上,病理见囊肿有子宫内膜腺体及间质即表示模型复制成功。

1.2.3 实验分组及给药 将造模成功的30只大鼠随机分为模型对照组、定坤丹组、达那唑组。第二次手术1周后,腹部切口生长良好,饮食及二便正常后,各组开始灌胃给药,药物剂量根据《实验动物学》,定坤丹组450 mg/200 g,达那唑组16 mg/200 g,正常组和模型对照组每只给予2 ml生理盐水灌胃,每日1次,共4周。

1.3 检测指标 用药4周后取颈内动脉血,行血清学检查,并再次开腹测量移植物体积,取移植物行免疫组化检查。

1.3.1 异位病灶体积测量 第3次开腹测量异位灶体积。

2015-06-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金(编号:81100412)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601

作者简介: 何闰华,男,硕士研究生;

卫 兵,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: weibing1965@ hotmail. com

1.3.2 ELISA 法检测大鼠外周血清中 TNF- α 含量

取大鼠颈内动脉血 3 ml, 离心 (2 000 r/min, 5 min) 后取血清, 按说明书进行操作。用酶标仪测定光密度值 (optical density, OD), 绘制标准曲线, 通过标准曲线来计算样品中 TNF- α 的浓度。

1.3.3 免疫组化 SP 法检测 VEGF 在异位内膜组织的表达 取下异位内膜组织, 所有标本经 10% 中性福尔马林固定 12 h。脱水, 包埋, 切片后按照 SP 试剂盒说明书操作。评分标准: 根据阳性信号的强弱及阳性细胞的百分率综合评分, 每个样本随机选取 5 个不重叠高倍镜 (40 $\times$ 10) 视野进行观察。阳性信号为棕黄色或棕褐色, 根据阳性信号的强弱评分; 1 分: 无信号或信号很弱; 2 分: 信号中等呈淡黄色或棕黄色; 3 分: 信号很强呈棕褐色。根据阳性细胞的百分率评分, 1 分: 阳性率 $\leq 20\%$; 2 分: 阳性率 21% ~ 70%; 3 分: 阳性率 71% ~ 100%。上述两项评分相加作为每例的总积分。结果判断在双盲下进行, 每张切片由两位有经验的病理医师分别记数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 移植物体积、血清 TNF- α 水平变化、VEGF 的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 移植物体积变化比较 对移植物体积进行测量, 给药前, 模型对照组、定坤丹组、达那唑组 3 组间无显著性差异, 给药后, 定坤丹组和达那唑组体积减小, 体积要显著小于模型对照组 ($F = 118.1, P < 0.05$), 见表 1、图 1。

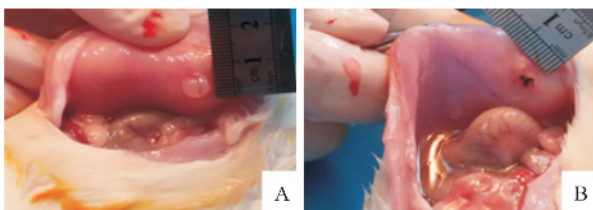


图 1 大鼠移植物体积变化情况
A: 模型对照组; B: 定坤丹治疗后

表 1 不同组别间给药前后体积、VEGF、TNF- α 的比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

指标	正常组	模型对照组	定坤丹组	达那唑组	F 值	P 值
给药前体积 (mm ³)	—	87.20 $\pm$ 4.24	89.00 $\pm$ 7.75	87.60 $\pm$ 6.38	0.226	0.799
给药后体积 (mm ³)	—	88.80 $\pm$ 6.20	37.00 $\pm$ 10.41*	37.70 $\pm$ 8.80*	118.100	<0.001
VEGF (分)	—	4.00 $\pm$ 0.67	1.80 $\pm$ 0.63 ^{##}	1.90 $\pm$ 0.56 ^{##}	39.690	<0.001
TNF- α (pg/ml)	60.8 $\pm$ 8.9	136.5 $\pm$ 14.7 [▲]	84.7 $\pm$ 9.1 ^{##}	87.5 $\pm$ 7.5 ^{##}	91.550	<0.001

与同组给药前体积比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与正常组比较: [▲] $P < 0.05$

2.2 血清 TNF- α 水平变化 模型对照组血清 TNF- α 显著高于正常组, 分别用达那唑及定坤丹治疗后, 血清指标较模型组明显下降, 4 组差异有统计学意义 ($F = 91.55, P < 0.01$), 见表 1。

2.3 VEGF 的免疫组化结果 与模型对照组比较, 定坤丹及达那唑均能减少异位内膜组织中 VEGF 表达, 差异有统计学意义 ($F = 39.69, P < 0.01$), 见表 1、图 2。

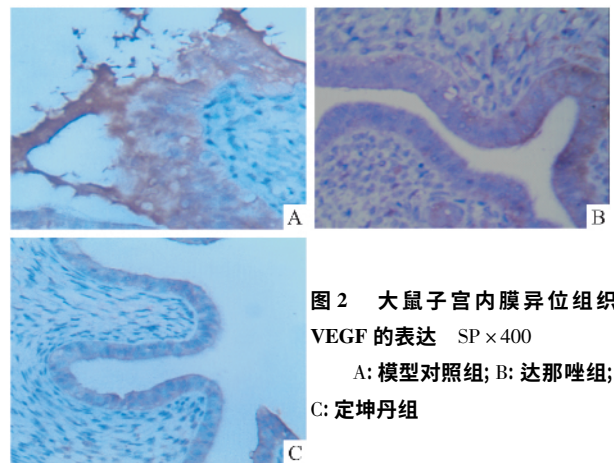


图 2 大鼠子宫内位异位组织 VEGF 的表达 SP $\times$ 400
A: 模型对照组; B: 达那唑组;
C: 定坤丹组

3 讨论

到目前为止, 尚未有一种理论能完整解释 EMS 的发病机制。经血逆流种植发生于约 90% 的育龄期女性, 而 EMS 发生率不足 10%; 所以经血逆流只是 EMS 发生的起始环节, 逆流至腹腔内的子宫内膜, 需逃避腹腔内免疫细胞的清除, 然后通过黏附-侵袭-血管形成才能发生发展。免疫炎症与血管生成是 EMS 两个关键步骤^[9]。

腹腔内免疫及炎症反应的改变导致 EMS。TNF- α 是由活化巨噬细胞分泌的一种细胞因子, 其具有调节免疫、血管生成等作用。TNF- α 能增加异位内膜细胞的侵袭功能^[9]。TNF- α 是重要的免疫调节因子, 分泌适量的 TNF- α 促进免疫应答, 清除异物。过量分泌则抑制免疫应答, 导致异位内膜不能

被免疫细胞清除,同时 $\text{TNF-}\alpha$ 促进异位内膜黏附、生长。从实验数据可以看出,定坤丹明显降低血清 $\text{TNF-}\alpha$ 水平,与模型对照组相比差异有统计学意义。

异位内膜的存活依赖新生血管形成。异位内膜组织及腹膜巨噬细胞分泌 VEGF。研究^[7-8]表明 VEGF 是最强的促血管生成因子,VEGF 在 EMS 患者腹腔液中水平明显高于正常妇女,VEGF 刺激内皮细胞增殖、迁移,从而促进新生血管形成。周白等^[9]发现无论是腹膜型还是深部结节型内异灶,其内异灶在血管化程度上无差别。本研究显示与模型对照组相比,定坤丹显著降低异位内膜中 VEGF 表达。

腹腔镜下子宫内膜异位病灶切除手术治疗 EMS 已成为一种趋势,但术后复发的问題成为治疗的难点。中医认为 EMS 的发病机制为血瘀,定坤丹作为中医妇科常用药,其主要用于气血两虚、气滞血瘀所致的妇科疾病^[10]。EMS 形成的关键步骤 腹腔免疫炎症改变及异位内膜黏附 - 侵袭 - 血管(3A)形成^[11]表明调节免疫炎症及抑制 3A 形成的治疗能取得较好疗效。本研究提示定坤丹能抑制 EMS 模型大鼠的异位内膜生长,其作用可能是通过减少异位内膜黏附、侵袭、抑制异位内膜血管形成来实现的,这为临床使用定坤丹治疗 EMS 提供了实验依据。

参考文献

- [1] Hayashi A, Tanabe A, Kawabe S, et al. Dienogest increases the progesterone receptor isoform B/A ratio in patients with ovarian endometriosis [J]. J Ovarian Res, 2012, 5(1): 31 - 8.
- [2] Kobayashi H, Higashiura Y, Shigetomi H, et al. Pathogenesis of endometriosis: The role of initial infection and subsequent sterile inflammation [J]. Mol Med Rep, 2014, 9(1): 9 - 15.
- [3] 王 燕. 定坤丹治疗原发性痛经 300 例 [J]. 陕西中医, 2010, 31(3): 278 - 80.
- [4] 张丽雅, 裴 磊, 朱汉红. 重组人内皮抑素抑制大鼠子宫内异位移植灶的实验研究 [J]. 中国妇幼保健, 2013, 25(28): 4229 - 32.
- [5] Hey-Cunningham A J, Peters K M, Zavallos H B, et al. Angiogenesis, lymphangiogenesis and neurogenesis in endometriosis [J]. Front Biosci, 2013, 1(5): 1033 - 56.
- [6] Islimye M, Kilic S, Zulfikaroglu E, et al. Regression of endometrial autografts in a rat model of endometriosis treated with etanercept [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2011, 159(1): 184 - 9.
- [7] Ren Q Z, Qian Z H, Jia S H, et al. Vascular endothelial growth factor expression up-regulated by endometrial ischemia in secretory phase plays an important role in endometriosis [J]. Fertil Steril, 2011, 95(8): 2687 - 9.
- [8] Kianpour M, Nematbakhsh M, Ahmadi S M, et al. Serum and peritoneal fluid levels of vascular endothelial growth factor in women with endometriosis [J]. Int J Fertil Steril, 2013, 7(2): 96 - 9.
- [9] 周 白, 曹云霞, 沙玉成. 血管内皮生长因子与子宫内膜异位症相关性的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(3): 255 - 7.
- [10] 刘丹卓, 赵新广, 尤昭玲. 定坤丹组方研究及临床应用现状分析 [J]. 世界中医药, 2014, 9(8): 1108 - 10.

Effects of DingKunDan on the endometriosis model rats

He Runhua, Wang Wenyan, Wei Bing

(Dept of Gynecology and Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract We built rats model of endometriosis applying autologous endometrial transplants to compare the graft volume of the modeling rats before and after dosing, serum tumor necrosis factor alpha($\text{TNF-}\alpha$) levels in rats, and the expressions of vascular endothelial cell growth factor(VEGF) in ectopic endometrium. To compare with the control group, the graft volume of DingKunDan group was reduced and the serum $\text{TNF-}\alpha$ level declined, and also the expression of VEGF in ectopic endometrium was reduced. Their differences were statistically significant ($P < 0.05$). DingKunDan can inhibit the growth of ectopic endometrium in endometriosis model rats. The mechanism may be related to the decrease of the serum $\text{TNF-}\alpha$ level and the VEGF expression.

Key words DingKunDan; endometriosis; tumor necrosis factor alpha; vascular endothelial cell growth factor