论著

文章编号:1000-5404(2005)10-1000-03

去甲二氢愈创木酸对大鼠卵巢功能的影响

吴晓华,王 琳,史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨血管生成抑制剂去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)对有规律动情周期大鼠卵巢功能的影响。**方法** 将有规律动情周期的雌性大鼠按不同的动情阶段随机分为NDGA组(N)和PBS组(P),隔日皮下注射16 d,观察给药前后血清雌二醇(E_2)、孕酮(P)、FSH和LH水平和给药后的交配情况及子宫和卵巢的形态学变化。**结果** NDGA各组大鼠在给药后皆不能成功交配。免疫组化染色显示NDGA能显著抑制子宫内膜基质细胞增殖,减少内膜腺体数目,抑制腺上皮细胞增殖,抑制内膜血管增殖和减少微血管密度(MVD)($P<0.01$)。卵巢有成熟的黄体,但数目和面积比对照组显著减少,闭锁卵泡明显增多($P<0.01$)。血清E_2显著降低,P在动情期和动情后期呈反向变化($P<0.01$),FSH在动情期和动情后期明显升高($P<0.05$),LH值与给药前比较没有统计学差异($P>0.05$)。**结论** 长时间使用NDGA可以引起大鼠的卵巢功能紊乱。

关键词: 血管生成抑制剂;去甲二氢愈创木酸;卵巢功能

中图法分类号: R322.65; R364.3; R914.3 **文献标识码:** A

Nordihydroguaiaretic acid causes the ovarian functional disorders in rats

WU Xiao-hua, WANG Lin, SHI Chang-xu (Department of Gynecology and Obstetrics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) on the ovary in rats. **Methods** Forty female SD rats in normal estrous cycles were randomly divided into PBS group and NDGA group, subcutaneously injected of PBS solution and 3% NDGA at the dose of 30 mg/kg respectively every other day for 16 d. The serum concentrations of follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estrogen (E_2) and progesterone (P) were measured by chemiluminoimmunoassay before and after administration and the mating was confirmed by the occurrence of vaginal plugs and the morphological changes of uterus and ovaries were examined by immunohistochemistry after administration. **Results** None of the NDGA-treated rats were able to successfully mate as the absence of vaginal plugs were detected. The endometrium could maturate in all of the NDGA-treated rats, but there had a decrease not only in the number of endometrial glands, but also the proliferation rate of the glandular epithelial cells, the endometrial stroma cells, the vessels and the microvacular density ($P<0.01$). The number and area ratio of both mature corpus luteums and follicles were lower than those of control group, but the number of the atretic follicles had increased ($P<0.01$). The serum concentration of E_2 had decreased significantly ($P<0.01$) and P had increased in estrus and decreased in metaestrus and FSH had increased in estrus and metaestrus ($P<0.05$), but that of LH had no statistical difference. **Conclusion** The long-term treatment of NDGA may make the ovarian functional disturbance in the rats.

Key words: angiogenesis inhibitor; NDGA; ovarian function

NDGA是一种从L. tridentata灌木中提取作为食品防腐剂的化合物,现已证明其具有多种生物学活性[1],近年又发现其有抑制血管内皮细胞的增殖活性和抑制在体血管生成(angiogenesis)的作用[2,3]。在女性生殖系统中,血管生成作用发生于内膜增殖、排卵、黄体生长、蜕膜化和胎盘形成等过程。本研究通过对子宫和

作者简介:吴晓华(1973-),女,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事女性不孕症方面的研究。电话:(023)66538733

通讯作者:王 琳,电话:(023)68765399

收稿日期:2005-01-20;修回日期:2005-04-09

卵巢的形态学观察和对性激素水平的测定，探讨 NDGA 作为血管生成抑制剂对大鼠动情周期的影响及其作用机制。

1　材料与方法

1.1　药品及试剂

NDGA(纯度 > 97%，Fluka 公司)用 PBS 缓冲液配制成 3% 溶液，抽吸空气后避光 4 ℃保存，增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体和第八因子相关抗原(FⅧRAg)多克隆抗体都来自 Zymed 公司，S-P 免疫组化试剂盒和 DAB 显色剂购自中山生物试剂公司。

1.2　实验动物的分组

清洁级 SD 雌性大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)，体质量 200 ~ 250 g，适应环境饲养 1 周，作阴道脱落细胞涂片检查连续 10 d，选择有规律周期者(4.5 ~ 5 d)进入实验。按实验当天的涂片将 40 只大鼠用随机数字表法随机分为动情前期(N_1)、动情期(N_2)、动情后期(N_3)和动情间期(N_4)4 个处理组，每组 6 只动物，各组分别设 4 只作为对照。

1.3　给药和标本采集

给药前 NDGA 组各鼠自心脏穿刺采血 2 ml(1 000 r/min 离心 10 min，取上清液，- 20 ℃保存作为正常对照)，按 30 mg/kg 剂量隔日皮下注射 3% NDGA，对照组注射等体积的 PBS 液，于第 16 天(大约第 4 个周期末)断髓处死部分实验鼠后取子宫和卵巢，固定于 10 %中性甲醛中。NDGA 组各鼠再次采集血清。

余下部分大鼠与同种雄性大鼠合笼交配，次晨检查辅料和做阴道试子涂片，发现阴栓或精子者即交配成功[4]，连续合笼 4 d后雌雄分开。为避免假阴性(怀孕而无阴栓或精子者)的出现，观察时限至交配后的第 27 天，即正常大鼠妊娠天数(21 ~ 23 d)后的 4 d。

1.4　激素测定

用化学发光法检测给药前后血清 E_2、P、FSH 和 LH 值。

1.5　形态学观察

子宫和双侧卵巢标本常规石蜡包埋，切片，HE 染色(片厚 5 μm)。另作子宫 PCNA 和 FⅧRAg 抗体免疫组化染色切片，一抗工作浓度皆为 1∶100，设阳性和阴性对照(按试剂盒说明操作)。每个卵巢蜡块皆间隔 0.8 ~ 1 mm 各切片 3 张。

1.5.1　PCNA 阳性细胞计数　　按 Nakopoulou 法[5]，每张切片选取 PCNA 阳性细胞最密集处，在高倍镜下(×400)观察 10 个视野，每视野计数 100 个细胞中阳性细胞数，进行 PCNA 阳性染色评分：1 分：0%；2 分：< 10%；3 分：10% ~ 50%；4 分：> 50%。

1.5.2　MVD 计数　　按 Weidner[6] 方法，每张切片在低倍镜下(×200)计数 3 ~ 5 个视野中被染成棕黄色的内皮细胞和内皮细胞丛数，管腔大且有较厚肌层或管腔中有 8 个以上红细胞的血管不在计数之列，须排除非特异性染色的肥大细胞。

以上计数均由 2 人在同一视野中分别进行，只有 2 人都认可的微血管和阳性细胞才予计数。

1.5.3　卵巢黄体数目、面积和闭锁卵泡计数　　在低倍镜下(×200)计数每只鼠的双侧卵巢 HE 染色切片中黄体和闭锁卵泡个数，测量每个黄体的面积。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　给药前后激素水平变化

经过 NDGA 作用后，雌激素(E_2)在各期都显著降低($P < 0.01$)；孕酮(P)在动情期和动情间期升高，而动情后期反而降低，FSH 在动情各期都有升高，以动情期和动情后期比较显著($P < 0.05$)，LH 在动情期稍有降低，其余期轻度升高，但与用药前比较没有统计学上的差异($P > 0.05$)，见表 1。

表 1　NDGA 对激素水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Effect of NDGA on the hormones ($\bar{x} \pm s$)

Treatment	Group	FSH(mIU/ml)	LH(mIU/ml)	E_2(pg/ml)	P(ng/ml)
NDGA	N_1	0.15 ± 0.09	0.28 ± 0.04	58.33 ± 8.69**	21.57 ± 6.79
	N_2	0.59 ± 0.36*	0.31 ± 0.13	42.67 ± 11.94**	166.34 ± 30.98**
	N_3	0.35 ± 0.29*	0.29 ± 0.09	46.50 ± 11.25**	28.74 ± 14.08**
	N_4	0.29 ± 0.39	0.26 ± 0.03	59.70 ± 16.18**	204.67 ± 98.39
Control	N_1	0.11 ± 0.18	0.26 ± 0.05	120.83 ± 18.85	22.84 ± 8.45
	N_2	0.20 ± 0.11	0.50 ± 0.19	166.00 ± 33.32	26.39 ± 8.19
	N_3	0.04 ± 0.04	0.24 ± 0.06	159.50 ± 44.05	163.02 ± 45.97
	N_4	0.03 ± 0.04	0.24 ± 0.08	125.33 ± 18.88	146.37 ± 50.02

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* control

2.2　交配情况

所有进行交配的 NDGA 组雌鼠(12/12)在接下来的 4 d 早晨都没有阴栓或精子出现，阴道涂片见大量白细胞，在交配后的第 21 ~ 23 天(正常大鼠妊娠天数)时仍没有表现出妊娠迹象；而 PBS 组中除两只雌鼠(2/8)没有阴栓或精子，其余雌鼠都有阴栓或/和精子出现，但该组所有雌鼠(8/8)都在交配后的第 13 ~ 15 天表现出了妊娠体征——腹部膨隆并能扪及胎崽，并都产下了正常的崽鼠。

2.3　子宫和卵巢形态学变化

2.3.1　子宫形态学变化　　NDGA 各组的子宫内膜都能发育成熟，但与对照组相比子宫腺体数目减少，内膜基质细胞、腺体上皮和血管内皮经 PCNA 染色的阳性细胞都明显减少，分别评 3 分、1 分和 2 分，FⅧRAg 染色标记的微血管密度(MVD)也显著减少($P < 0.01$)，见表 2。

表2 NDGA对子宫内膜发育的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effect of NDGA on the development of endometrium($\bar{x} \pm s$)

Group	Gland	Epithelia	Stroma cell	Vessel of endometrium	MVD
NDGA	$6.29 \pm 1.08^{\triangle}$	$4.92 \pm 1.77^{\triangle}$	$32.83 \pm 4.99^{\triangle}$	$1.79 \pm 0.83^{\triangle}$	$1.17 \pm 0.82^{\triangle}$
PBS	9.94 ± 1.24	9.31 ± 0.79	67.88 ± 7.36	4.94 ± 0.77	3.19 ± 0.83

△: $P<0.01$, *vs* PBS

2.3.2 卵巢形态学变化 卵巢有成熟的黄体,但数目和平均面积比对照组减少,成熟卵泡减少而闭锁卵泡增多(HE染色,×200视野,$P<0.01$),见表3。

表3 NDGA对卵巢黄体和卵泡的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effect of the NDGA on the luteums and follicles ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number of mature luteum	Area of mature luteum(mm^2)	Number of atresic follicle
NDGA	$1.875 \pm 0.679^{\triangle}$	$0.010\,7 \pm 0.018^{\triangle}$	$2.708 \pm 1.122^{\triangle}$
PBS	3.375 ± 0.806	$0.017\,2 \pm 0.004$	1.438 ± 0.814

△: $P<0.01$, *vs* PBS

3 讨论

卵巢的主要功能表现为周期性的排卵和与其相一致的雌激素水平(E_2 和 P)的变化,因此 E_2 和 P 水平及动物的动情状况是反映卵巢功能的良好指标。正常大鼠在动情期雌激素分泌达高峰,子宫内膜腺体增多,腺腔大而多褶,腺上皮中可见分泌泡,内膜基质细胞多而排列紧密,新生血管密集;卵巢滤泡生长迅速,成熟卵泡丰富,黄体体积巨大;阴道涂片可见大量的无核上皮细胞,此期雌鼠表现出性冲动并能接受交配。而在动情间期雌激素分泌减少,内膜腺体小而少,腺腔窄而直,黄体功能退化,无成熟卵泡,阴道涂片表现为大量的白细胞,动物多安静,拒绝交配[7]。

实验结果显示,经过 NDGA 作用后的雌鼠没有产崽,说明在正常的动情周期时限内没有与雄鼠成功交配(未见阴栓或精子),血清学检查整个动情周期血清 E_2 的分泌水平都很低,子宫内膜基质细胞和腺体细胞的增殖明显减少,新生血管的密度明显减低,卵巢中成熟黄体减少,闭锁卵泡增多,阴道涂片表现为大量的白细胞,提示 NDGA 使雌鼠的动情周期停滞在动情间期阶段而不能循环至正常的动情期,破坏了正常的动情周期。这与 Klauber 等[7]用血管生成抑制剂 AGM-1470(TNP-470)给雌性小鼠皮下注射后,小鼠不能成功交配的结果相一致。

当动情前期和动情期 E_2 水平降低时,成熟卵泡的发育受到抑制,闭锁卵泡相对增多,而 P 提前(动情期)升高,会使黄体得不到孕酮的支持而发育不良。当动情后期 E_2 和 P 水平下降时,又会加速黄体的萎缩。P 在动情期升高可能是 E_2 分泌降低促使中间产物部分转化成孕酮所致。FSH 出现全线升高,尤其是在动情期和动情后期,可能与 E_2 水平低下,从而对 FSH 的负反馈作用减弱有关。LH 的含量虽有不规则的波动,但用药前后的测量值在统计学上并没有显著性差异。因此,我们推测 NDGA 主要通过抑制 E_2 的分泌,间接影响垂体分泌 FSH 的功能,由此引起的一系列激素水平的变化来影响大鼠的卵巢功能,干扰其动情周期。

从组织学角度上,我们观察到 NDGA 对子宫内膜基质细胞和腺体细胞的增殖有明显的抑制作用,并能显著减少新生血管的微血管密度。这与孙慧勤等[2,3]的研究结果是一致的,而子宫内膜的生长和黄体的成熟都具有血管生成依赖性,这提示血管生成抑制剂可能在治疗女性生殖系统中包括功血、子宫内膜异位症等有明显血管增生依赖的病理过程疾病上将发挥重要作用。

参考文献:

[1] Lambert J D, Dorr R T, Timmermann B N. Nordihydroguaiaretic acid: a review of its numerous and varied biological activities[J]. Pharmaceutical Biology, 2004, 42(2): 149 - 158.

[2] 孙慧勤, 陈意生, 史景泉, 等. 去甲二氢愈创木酸抗血管生成的鸡胚绒毛尿囊膜实验观察[J]. 中华病理学杂志, 2000, 29(2): 128 - 129.

[3] 孙慧勤, 陈意生, 史景泉, 等. NDGA 对内皮细胞增殖抑制的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(3): 245 - 248.

[4] 魏 泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998.

[5] Nakopoulou L, Janinis J, Panagos G, *et al*. The immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/Cyclin) in malignant and benign epithelial ovarian neoplasms and correlation with prognosis[J]. Eur J Cancer, 1993, 29A(11): 1599 - 1601.

[6] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169 - 180.

[7] Klauber N, Rohan R M, Flynn E, *et al*. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470[J]. Nat Med, 1997, 3(4): 443 - 446.

(编辑 陈聪连)