文章编号:1000-5404(2007)04-0307-04

论著

去甲二氢愈创木酸宫腔灌注对大鼠胚胎的影响

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 探讨去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)对大鼠早期胚胎及子宫蜕膜发育的影响,为计划生育新药研究奠定基础。**方法** 在大鼠妊娠第1、7天(E1和E7)分别宫腔内插管灌注NDGA,观察第9天的胚胎种植数、血清孕酮值和胚胎直径及足月胎鼠的数目和体质量,检测子宫蜕膜和胎盘中内皮细胞生长因子VEGF和增殖细胞核抗原PCNA的表达,测量微血管密度(MVD)。**结果** E1给药后,NDGA各组灌注侧的胚胎数较对侧减少($P<0.05$),胚胎直径显著减小($P<0.05$),足月胎鼠数较对侧减少($P<0.05$);E7给药后,胚胎直径减小($P<0.05$);E1给药比在E7给药的胚胎直径减小更有显著性($P<0.01$);蜕膜和胎盘中VEGF和PCNA表达显著减少,平均光密度值显著减小($P<0.01$),MVD显著减少($P<0.01$);血清孕酮值与对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 宫腔灌注NDGA对大鼠早期胚胎和蜕膜的发育有明显抑制作用,对大鼠血清孕酮值无明显影响。

关键词: NDGA;胚胎;蜕膜
中图法分类号: R321;R322.65;R715.2 **文献标识码**: A

Effects of nordihydroguaiaretic acid by intrauterine perfusion on embryos in rat

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 embryos growth and decidualization of rat by intrauterine perfusion and to investigate the new medication for planned parenthood. **Methods** Fifty-six pregnant SD rats were randomly divided into NDGA-treated group (N) and PBS-treated control group (P) and blank control group (B). By intubation, NDGA or PBS was perfused into the uterus on embryonic day 1 (E1) and day 7 (E7). Rats were killed on E9 to calculate the number and measure the diameter of the embryos, as well as the number and weight of litters. The expression of VEGF, PCNA and FⅧRAg in deciduas and placenta were detected by immunohistochemistry and image analysis. The serum concentration of progesterone on E9 was measured. **Results** In comparison with two control groups, the number and the diameter of embryos after perfusion were decreased with NDGA treatment on E1 ($P<0.05$). The number of full-term fetus was decreased ($P<0.05$). The diameter of embryos after perfusion with NDGA on E7 was significantly diminished ($P<0.05$). The expression of VEGF, PCNA and FⅧRAg in the deciduas and placenta were all reduced ($P<0.01$). The serum concentration of progesterone on E9 was not significantly different from that of control groups ($P>0.05$). **Conclusion** NDGA can inhibit the growth of early embryo and interfere with the progress of decidualization obviously by intrauterine perfusion, but has little effect on the serum concentration of progesterone.

Key words: NDGA; embryo; deciduas

去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是石碳酸灌木 *L. tridentata* 中的主要成分,也可人工合成,目前发现其广泛的生物学活性[1],近年在对NDGA抑制血管内皮细胞的增殖活性和在体的血管生成(angiogenesis)方面的研究比较深入,并已发现其能通过抑制肿瘤内血管内皮细胞的增殖来抑制恶性胶质瘤细胞的增殖,诱导其分化和凋亡[2-4]。血管生成过程中一个最重要的调控因子之一是血管内皮细胞生长因子(VEGF),Shweiki等[5]观察到在小鼠胚胎的种植部位血管通透性增加,VEGF有强烈表达。邵龙江等[6]也证实,VEGF在胚胎植入前(妊娠的第1~5天)的表达主要是在子宫内膜上皮细胞。

作者简介:吴晓华(1973-),女,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事血管生成抑制剂对女性生殖系统作用方面的研究。电话:(023)66752038, E-mail: ggsjc@sina.com
通讯作者:王 琳,电话:(023)68765399
收稿日期:2006-09-23;**修回日期**:2006-12-10

本研究采用免疫组化法结合图像分析及测定血清孕酮水平，通过宫腔灌注途径来探讨 NDGA 对大鼠早期胚胎的发育和子宫蜕膜生长的影响及可能的机制。

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，0.22 μm 微孔膜过滤除菌，抽吸空气后避光 4 ℃保存备用[4]，VEGF 单克隆抗体（Santa Cruz 公司），PCNA 单克隆抗体和 FⅧRAg 多克隆抗体（Zymed 公司），S-P 免疫组化试剂盒（中山生物试剂公司）。

1.2 动物分组及处理

清洁级 SD 雌性大鼠 56 只（第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），体质量 200 ~ 250 g，适应环境饲养 1 周。每日定时作阴道脱落细胞涂片检查，发现雌鼠处于动情期时即与同种雄鼠合笼，发现阴栓当日计为妊娠 0 d（E0）[7]。

将妊娠大鼠按给药和终止观察时间，用随机数字表法将 56 只雌鼠分为 E_{1-9} 组、E_{7-9} 组、$E_{1-足月}$ 组和 $E_{7-足月}$ 组 4 个组，每组 14 只，各组根据处理不同再按 6∶4∶4 分为 NDGA 组（N_1、N_2、N_3、N_4）、PBS 对照组（P_1、P_2、P_3、P_4）及空白对照组（B_1、B_2、B_3、B_4）。

于妊娠第 1 天（E1）和第 7 天（E7），按 30 mg/kg 宫腔内插管按组分别灌注 3% NDGA 溶液和等体积的 PBS 液，空白对照组只插管不给药。

1.3 对胚胎的影响及激素测定

于 E9 时剖腹计数 N_1、N_2 组、P_1、P_2 组和 B_1、B_2 组双侧子宫的胚胎的种植数并测量其直径（平行于子宫角纵径），用 10% 的中性甲醛液固定含胚胎的子宫。N_2、N_3 组和 P_2、P_3 组剖腹前经心脏穿刺采集血液，1 000 r/min 离心 10 min，取上清，-20 ℃保存，用电化学发光法测血清孕酮值含量。

1.4 对足月鼠的影响

N_3、N_4、P_3、P_4、B_3、B_4 组各鼠任其妊娠至足月，当母鼠出现分娩预兆时剖腹计数各鼠双侧子宫的胎鼠数，再剖宫取出胎鼠称重（剪去脐带并擦干羊水后的重量）。

1.5 标本处理及指标判定

子宫标本用石蜡常规包埋，连续切片（片厚 4 ~ 6 μm），作 HE 染色和 VEGF、PCNA 和 FⅧRAg 免疫组化（IHC）染色，一抗工作浓度为 1∶100，设阳性和阴性对照（按试剂盒说明操作）。

阳性细胞被染成棕黄色，按 Nakopoulou 法[8]，选取 VEGF 和 PCNA 切片中阳性细胞最密集处，在高倍镜（×400）下观察 10 个视野，每视野计数 100 个细胞中 VEGF 和 PCNA 阳性细胞数。

按 Weidner 等[9]的方法，在低倍镜下（×200）计数 3 ~ 5 个视野中被 FⅧRAg 标记的内皮细胞和内皮细胞丛，管腔大且有较厚肌层或管腔中有 8 个以上的红细胞的不在计数之列。

用 Image-Pro Plus 软件分析 VEGF、PCNA 阳性片，计算平均光密度值（AOD）。

1.6 统计学处理

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

2 结果

2.1 对胚胎的影响

2.1.1 胚胎数目　E1 灌注者，灌注侧胚胎数与对侧比较，N_1 组：有 4 只鼠（4/6）少于对侧，1 只（1/6）双侧相等，1 只（1/6）多于对侧；P_1 组：2 只（2/4）多于对侧，2 只（2/4）少于对侧；B_1 组：2 只（2/4）少于对侧，2 只（2/4）多于对侧。各组灌注侧与对侧胚胎数比较有差异（$P<0.05$），但 N_1 组与 P_1 和 B_1 组灌注侧比较无统计学差异（$P>0.05$），见表 1。

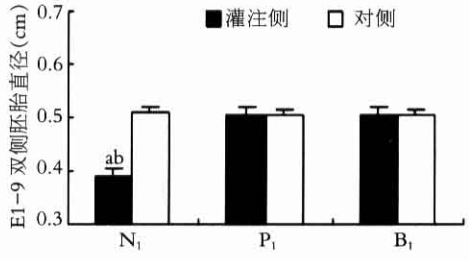
表 1　E1 宫腔内灌注 NDGA 对胚胎数目的影响（个，$\bar{x} \pm s$）

组别	n	灌注侧	对侧
N_1组	6	4.50 ± 1.76[a]	7.17 ± 2.04
P_1组	4	3.67 ± 2.04[a]	7.00 ± 2.65
B_1组	4	4.33 ± 1.53[a]	6.00 ± 1.00

a：$P<0.05$，与对侧比较

E7 灌注者，灌注侧胚胎数在灌注前后比较，N_2 组：除有 2 只（2/6）各减少 1 个胚胎外，其余各鼠（4/6）均无减少；P_2 组：4 只均无减少；B_2 组：2 只（2/4）减少 2 个，2 只（2/4）无变化。各组灌注侧在灌注前后的胚胎数比较、灌注后与对侧的胚胎数比较及灌注后两两间比较均无统计学差异（$P>0.05$）。

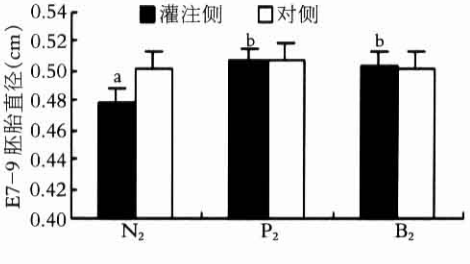
2.1.2 胚胎直径　E1 灌注后，各鼠灌注侧的胚胎平均直径在 N_1 组明显小于对侧，有统计学差异（$P<0.05$），N_1 组分别与 P_1 组和 B_1 组比较有统计学差异（$P<0.05$），见图 1。



a：$P<0.05$，与对侧比较；b：$P<0.05$，与 P_1 组和 B_1 组比较

图 1　E1 宫腔内灌注 NDGA 对胚胎直径的影响

E7 灌注后，各鼠胚胎平均直径在 N_2 组，灌注侧比对侧明显偏小（$P<0.05$），N_2 组分别与 P_2 组和 B_2 组比较有统计学差异（$P<0.05$），见图 2；并且灌注侧胚胎直径 N_1 组［(0.39 ± 0.05) cm］明显小于 N_2 组［(0.48 ± 0.05) cm］，有显著的统计学差异（$P<0.01$）。



a：$P<0.05$，与对侧比较；b：$P<0.05$，与 N_2 组比较

图 2　E7 宫腔内灌注 NDGA 对胚胎直径的影响

2.2　对足月胎鼠的影响

2.2.1　胎崽数目　　E1 给药后灌注侧胎鼠与对侧比较，N_3 组：有 4 只鼠(4/6)少于对侧，2 只(2/6)多于对侧；P_3 组：4 只(4/4)皆少于对侧；B_3 组：2 只(2/4)少于对侧，2 只(2/4)多于对侧。

灌注后 N_3 组、P_3 组、B_3 组各自与对侧比较有差异($P<0.05$)，但 3 组间两两比较无统计学差异($P>0.05$)，见表 2。

表 2　E1 宫腔内灌注 NDGA 对胎鼠数目的影响(个，$\bar{x}\pm s$)

组别	n	灌注侧	对侧
N_3组	6	4.67 ± 1.51^a	7.00 ± 0.09
P_3组	4	4.00 ± 1.00^a	7.33 ± 1.53
B_3组	4	3.67 ± 1.53^a	6.00 ± 2.65

a：$P<0.05$，与对侧比较

E7 给药后，同侧胎鼠数灌注前后比较，N_4 组：有 1 只(1/6)减少 2 个，1 只鼠(1/6)减少 1 个，其余各鼠均无变化；P_4 组：2 只(2/4)各减少 1 个，2 只(2/4)不变；B_4 组：2 只(2/4)减少 2 个，2 只(2/4)不变。各组灌注侧在灌注前后比较、灌注后各组分别与对侧比较及灌注侧 3 组间两两比较均无统计学差异($P>0.05$)。

2.2.2　胎鼠发育　　所有胎鼠外观无畸形，灌注侧胎鼠体质量与对侧比较无统计学差异($P>0.05$)，各组之间比较也无统计学差异($P>0.05$)。

2.3　血清孕酮含量

无论是在 E1 时插管灌注还是在 E7 时灌注，注入 NDGA 者较灌注 PBS 者血清孕酮值偏低，但并无统计学上的差异($P>0.05$)。

2.4　VEGF 和 PCNA 的表达及 MVD 计数

N_1 组和 N_2 组中胎盘和蜕膜的 VEGF、PCNA 抗体 IHC 染色的阳性细胞较少，染色强度也分别弱于 P_1 组和 P_2 组，经图像分析，N_1 组和 N_2 组阳性区域 AOD 值明显低于 P_1 组和 P_2 组($P<0.01$)。N_1 组和 N_2 组胎盘和蜕膜中的血管内皮细胞被染成浅棕色，微血管内皮细胞丛较少，而 P_1 组和 P_2 组新生微血管内皮细胞丛明显比灌注 NDGA 者密集，血管内皮细胞多被染成棕色和深棕色($P<0.01$)，见表 3。

表 3　NDGA 对 VEGF 和 PCNA 的表达及对 MVD 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	AOD 值		MVD
		VEGF	PCNA	
N_1	6	0.162 ± 0.005^a	0.490 ± 0.015^a	4.92 ± 1.44^a
N_2	6	0.185 ± 0.003^a	0.237 ± 0.023^a	4.42 ± 1.16^a
P_1	4	0.507 ± 0.007	0.630 ± 0.044	11.13 ± 1.46
P_2	4	0.364 ± 0.002	0.372 ± 0.005	10.25 ± 1.49

a：$P<0.01$，与 P_1、P_2 组比较

3　讨论

宫腔灌注是一种较少用的局部给药法，本实验是在给大鼠皮下注射 NDGA 实验基础上改变给药途径后再来探讨局部用 NDGA 对大鼠早期胚胎发育和蜕膜生长的影响。从解剖上讲，大鼠是双子宫双宫颈型，两宫颈被包裹在同一层浆膜中，直视下往往只能辨认出 1 个宫颈口，单经阴道行宫腔盲插，很容易引起子宫穿孔，因此本实验采取了宫腹腔联合插管法进行灌注。

大鼠胚胎的着床发生在第 4.5 ~ 5 天(E4.5 ~ E5)，实验在着床前(E1)及着床完成后(E7)分别给予插管灌注 NDGA，双侧宫腔中的胚胎数除 N_1 组有差异外，在其余各组间并没有统计学差异，但在胚胎直径上 NDGA 灌注侧却明显小于对侧，与 PBS 对照组及单纯插管对照组的灌注侧相比也明显偏小，并且着床前(E1)灌注者较着床完成后(E7)灌注更明显。而对发育成熟的胎鼠来说，从数目上看，仅着床前(E1)灌注 NDGA 有一定的影响，但与对照组比较则无显著性差异；在着床前后灌注，比较其数目和体质量均无统计学差异。从微观方面来看，胎盘和蜕膜中 VEGF 和 PCNA 蛋白表达减弱，微血管密度减少，说明局部灌注 NDGA 对组织中血管和生成作用也能产生一定的影响，这与皮下注射的结果是一致的。

就灌注这种方式来说，对孕卵着床的影响可能是 NDGA 被局部组织吸收后发挥了其抗血管生成的生物学活性，抑制了子宫内膜局部的血管生成，使该部位的蜕膜发育与孕卵的发育不同步所致。但也不排除药物本身对宫内环境生成的直接影响，因为在有限的宫腔容积中灌注药物，势必增大宫内的压力，产生的机械性刺激引起子宫收缩而导致部分孕卵被排出或死亡后被逐渐吸收，从而减少了着床数目。实验中一些动物的胚胎数较灌药前减少可能也有这方面的原因。另外，文献[3,10]报道将 NDGA 处理后的细胞放入新鲜培养基中培养，细胞可以恢复原有的分裂增殖能力，以证明 NDGA 是相对无毒的，但这种无毒性具有浓度依赖性。本实验将 NDGA 注入子宫腔中，导致子宫内膜组织浸浴在大量药液中，局部药物浓度相对较高，也可能对局部组织产生了直接的破坏作用而产生上述影响。

在既往的实验中我们了解到 NDGA 长期应用对大鼠卵巢功能有影响[11]，而本实验给药后血清孕酮含量在 NDGA 组和对照组间没有统计学上的差异，说明 NDGA 对胚胎发育的影响并不是通过抑制孕酮的分泌起作用的，与皮下注射方式结果一致[12]。

在多数文献中，NDGA 都是应用于体外实验，而在体内实验中则是以腹腔灌注、静脉或口服给药方式为主，几乎没有见到局部灌注给药的报道。鉴于雌性动物生殖系统的特殊性，局部用药对全身的影响较小，本实验采用了这种经阴道宫腔内插管灌注的方式，为计划生育新药的研究奠定基础。

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] 郭德玉，陈意生，卞修武，等. 去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞增殖、分化和凋亡的影响[J]. 中华实验外科杂志，2001，18(6)：493-495.

[5] Shweiki D, Itin A, Neufeld G, *et al*. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis[J]. J Clin Invest, 1993, 91(5): 2243-2253.

[6] 邵龙江，王红梅，段恩奎，等. 围植入期大鼠子宫中血管内皮生长因子的表达与血管生成[J]. 科学通报，2001，46(5)：397-400.

[7] 魏 泓. 医学实验动物学[M]. 成都：四川科学技术出版社，1998：168.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Dethlefsen S M, Shepro D, D'amore P A. Arachidonic acid metabolites in bFGF-, PDGF-, and serum-stimulated vascular cell growth [J]. Exp Cell Res, 1994, 212(2): 262-273.

[11] 吴晓华，王 琳，史常旭. 去甲二氢愈创木酸对大鼠卵巢功能的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(10)：1000-1002.

[12] 吴晓华，王 琳，史常旭. 去甲二氢愈创木酸对大鼠早期胚胎的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，29(3)：237-239.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2007)04-0310-01

腰椎间盘突出症术后椎间盘炎的诊治体会

莫松全，吴天清，代富勇 （川北医学院附属三台医院骨科，三台 621100）

腰椎间盘术后椎间盘炎是一种严重的并发症，临床较少见。1997年5月至2004年10月本科收治术后腰椎间盘炎12例，现报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本组患者12例，男性9例，女性3例；年龄18～57岁，平均32岁。原发病部位L3～4节段1例、L4～5节段7例、L5S1节段2例、L4～5、L5 S1两节段2例。病程3个月至10年，平均28个月。开窗式手术7例，半椎板手术3例，全椎板切除术式2例。术后并发椎间盘炎7～22 d，平均8 d。采用保守治疗10例，卧床休息56～72 d，应用大剂量抗生素及地塞米松(20 mg/d)治疗，并用腰围带保护制动；5例用石膏腰围固定，5例行超短波理疗2周。手术治疗2例。

1.2 临床特点

10例为下午低热，最高不超过38 ℃。除2例WBC计数增高外，余均正常。腰部剧烈疼痛为痉挛性腰痛，特点是白天轻、夜间重，常因翻身、床铺震动或大声说话而诱发或加重。骶棘肌紧张，深部压痛，叩击痛阳性。术后原有神经根刺激症状减轻或消失，但原有疼痛放射到腹部、会阴部及双臀部，直腿抬高有不同程度受限，无坐骨神经受压症状。血沉1例正常，10例28～86 mm/h，1例未查，血培养均为阴性。C-反应蛋白13.4～56.2 mg/L。

发病后2周内X线平片多不能发现异常改变，3～4周后腰椎正侧位片可见病变椎间隙狭窄，密度增高，椎体骨质疏松，上下椎体终板毛糙模糊，骨皮质中断、缺损、吸收，有时可见椎间隙后部密度增高。未作CT扫描，腰椎MR可早期发现椎间盘信号改变，表现为椎体信号异常(T1低信号，T2高信号，强化明显)，椎体的上缘或下缘凹凸不平，椎间隙信号混杂，强化不均，见图1。



图1 腰骶MRI表现 示腰4、5椎体骨质邻近椎间隙面信号异常，呈T1低信号，腰4/5椎间隙稍窄，腰4/5椎旁软组织轻微肿胀

2 结果

采用保守治疗10例，因症状尤其严重保守治疗无效，手术治疗2例。术后第14天从原手术切口进入感染椎间隙，术中

（下转317页）

作者简介：莫松全(1971～)，男，四川省南充市人，主治医师，主要从事脊柱外科方面的研究，发表论文5篇。电话：(0816)5229580

收稿日期：2006-04-18；修回日期：2006-07-20