论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1046-03

去甲二氢愈创木酸治疗子宫内膜异位症的实验研究

马玉霞,王 琳,梁志清,孔 燕 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨血管生成抑制剂去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid,NDGA)对子宫内膜异位症巴马香猪动物模型的影响。方法 采用建模成功的巴马香猪 6 头,分为实验组 NDGA 组 4 头和对照组 PBS 组 2 头,实验组隔日皮下注射 NDGA 和对照组给予等体积的 PBS 溶液,连续给药 20 d。观察给药前、后血清激素水平和异位内膜包块的变化情况,以及 FⅧRAg 和 VEGF 的表达情况。结果 NDGA 组血清 E_2 显著降低($P<0.05$)。NDGA 组异位内膜包块不同程度的缩小,甚至少部分消失;PBS 组包块无明显变化,部分略有增大。NDGA 能显著抑制子宫内膜腺体数目减少,间质紧密;PBS 组子宫腺体数目多,间质疏松。NDGA 组减少微血管密度(MVD)的数目和 VEGF 的弱表达($P<0.05$);PBS 组微血管密度(MVD)的数目多和 VEGF 的强表达($P<0.05$)。结论 NDGA 组种植的异位灶缩小甚至部分消失。

关键词:血管生成抑制剂;去甲二氢愈创木酸;子宫内膜异位症
中图法分类号:R-332;R711.71;R977 文献标识码:A

Effects of nordihydroguaiaretic acid on the endometriosis in Bama miniature pigs

MA Yu-xia, WANG Lin, LIANG Zhi-qing, KONG Yan (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 endometriosis established in Bama miniature pigs. Methods Six Bama pigs that had been successfully established into animal model of endometriosis subcutaneously received 3% NDGA at dose of 20 mg/kg ($n=4$) or PBS solution ($n=2$) for 20 d. The grafts in abdominal cavity and subcutaneous tissues were observed and the serum concentrations of hormone, were measured by chemiluminoimmunoassay before and after the period of NDGA or PBS injection. The expressions of FⅧAg and VEGF in the endometriotic tissues were observed. Results The endometriotic masses were reduced to some degree after the time period of NDGA injection, even partially disappeared, while those treated with PBS showed no obvious changes. Histoimmunochemical analysis showed NDGA decreased the number of endometrial glands, the proliferation rate of the glandular epithelial cells, the endometrial stroma cells and the vessels, and inhibited the microvascular density and VEGF in the endometriotic tissues ($P<0.05$). The serum concentration of E_2 decreased significantly after the whole course of NDGA injection ($P<0.05$). Conclusion NDGA can reduce the endometriotic mass or even make partial endometriotic mass disappear.

Key words: angiogenesis inhibitor; nordihydroguaiaretic acid (NDGA); endometriosis

去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid,NDGA)具有多种生物学功能和治疗作用[1]。近年研究表明 NDGA 具有抑制在体、离体生物的血管生成作用。因子宫内膜异位的生长具有血管生成依赖性的特性,本研究通过 NDGA 对在位和异位内膜组织形态的影响来探讨血管生成抑制剂对子宫内膜异位症的治疗。

1 材料与方法

1.1 研究对象

实验动物雌性未孕巴马香猪(第三军医大学实验动物中心提供),适应环境,符合实验要求和标准,体质量 16~18 kg,5~6 月龄,在增殖期选取异位灶。手术方法成功建造动物模型,在腹腔和皮下形成异位病灶。采用随机分组方法实验组 4 头为 N 组,对照组 2 头为 P 组。

1.2 给药方法

给药前、后采取颈静脉血 2 ml,了解激素水平的变化。在巴马香猪成功建模后,实验组皮下注射 3% NDGA 按 20 mg/kg,对照组注射等体积的 PBS 液,隔日 1 次,共计 20 d。皮下种植灶每周 2 次观察变化情况。3 周开腹观察腹腔种植灶的变化情况。取标本,固定于 10% 甲醛溶液中。

1.3 形态学观察

1.3.1 种植子宫内膜包块标本常规石蜡包埋,切片,HE 染色(片厚 4~6 μm),子宫内膜异位灶采用 FⅧRAg 和 VEGF 免疫组化 SP 法染色切片,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),每个蜡块间隔 0.8~1 mm 各切片 3

作者简介:马玉霞(1977-),女,甘肃省临夏市人,硕士研究生,主治医师,主要从事女性不孕方面的研究。电话:(023)68773147
通信作者:王 琳,电话:(023)68765399,E-mail:drwangl@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-12-17;修回日期:2008-03-14

张。

1.3.2　MVD 计数　　按 Ki-Seok[2] 方法，每张切片先在 ×100 倍镜下寻找高密度血管区，再在 ×400 倍镜下计数 5 个视野中被染成棕黄色的内皮细胞和内皮细胞丛数，取平均值，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。

1.3.3　VEGF 表达　　选择具有代表性的 5 个高倍视野（×400）进行观察计数，根据染色程度和染色细胞百分率进行评分：不着色为 0 分，淡黄色为 1 分，黄色为 2 分，棕黄色为 3 分；着色细胞占记数细胞的百分率≤5% 为 0 分，6% ~25% 为 1 分，26% ~50% 为 2 分，≥51% 为 3 分，将每张切片平均着色程度得分与平均着色细胞百分率得分各自相乘为其最后得分：≤1 分为阴性（-），2 ~3 分为弱阳性（+），4 ~6 分为阳性（++），>6 分为强阳性（+++）。

1.4　统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，等级资料采用非参数 nemenyi 检验，计量资料采用方差分析。

2　结果

2.1　给药前后激素水平变化

给予 NDGA，雌激素（E_2）给药后降低（$P<0.01$）孕酮（P）给药后有所升高，FSH、LH 在给药前后无明显变化，均处于正常值下限。（$P>0.05$）无统计学意义。

表 1　NDGA 对激素水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	E_2(pg/ml)	P(ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH(mIU/ml)
空白对照	40.21 ±14.59	1.42 ±1.26	0.34 ±0.10	0.10 ±0.002
给药前	75.78.15 ±19.23[a]	4.85 ±1.02	0.21 ±0.10	0.10 ±0.01
给药后	31.50 ±2.38[b]	39.13 ±12.63	0.02 ±0.01	0.10 ±0.02

a：$P<0.01$，与空白对照组比较；b：$P<0.01$，与给药前比较

2.2　种植内膜变化

2.2.1　大体观察　　每周 2 次观察皮下种植灶变化 NDGA 组包块没有增大，逐渐缩小，少部分消失；PBS 组包块略增大。3 周开腹 NDGA 组异位灶有所缩小甚至极少数消失；PBS 组治疗后所形成的异位灶没有缩小而略有增大。

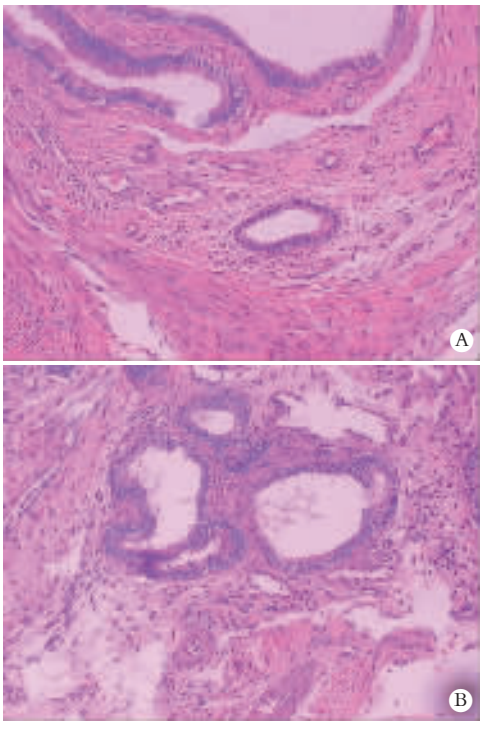
2.2.2　形态学变化　　3 周 NDGA 组子宫内膜腺体数目减少，间质紧密；PBS 组子宫内膜腺体数目多，间质疏松。见图 1。

2.2.3　FⅧRAg 染色标记的微血管密度（MVD）分析　　3 周 NDGA 组异位病灶中微血管内皮着色少而浅，血管血管数目减少，FⅧRAg 抗体表达成弱阳性；PBS 组异位病灶中微血管内皮着色多而深数目多，FⅧRAg 抗体表达成呈强阳性。（$P<0.05$），二者间有统计学差异。见图 2。

表 2　各组种植子宫内膜病灶中 MVD 的表达（$n=16$，$\bar{x} \pm s$）

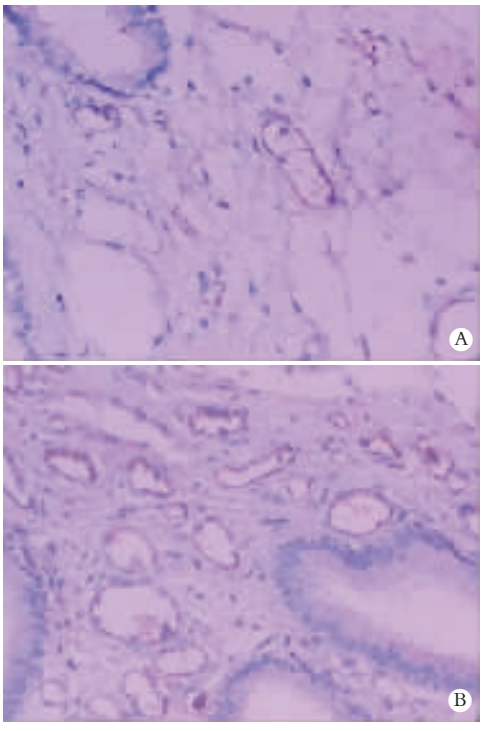
组别	在位	异位	皮下	卵巢	MVD
对照组	15.13 ±0.68	12.99 ±1.77	14.25 ±2.56	13.40 ±1.51	15. ±3.70
实验组	9.15 ±0.68[a]	9.12 ±1.03[a]	9.10 ±1.41[a]	8.15 ±0.70[a]	8.91 ±0.96[a]
t	10.241	10.691	3.527	6.324	8.55
P	0.001	0.001	0.012	0.001	0.001

a：$P<0.05$，与对照组比较



A：NDGA 组；B：PBS 组

图 1　3 周种植子腹腔子宫内膜病灶病理观察结果　（HE ×100）



A：NDGA 组；B：PBS 组

图 2　3 周种植子腹腔子宫内膜病灶 FⅧRAg 表达　（S-P ×200）

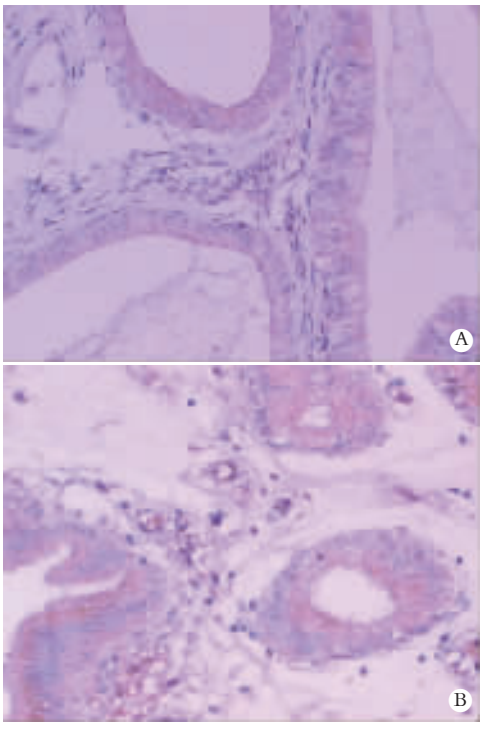
2.3　血管内皮细胞生长因子 VEGF 的表达

3 周 NDGA 组异位病灶中微血管内皮被染成浅棕色，VEGF 表达弱阳性；PBS 组异位病灶中微血管内皮被染成棕色，VEGF 抗体表达成呈强阳性；（$P<0.05$）。二者间有统计学差异。见图 3。

表3 EMS 不同部位与对照组种植病灶中 VEGF 的表达

组别	例数	VEGF 表达			
		−	+	++	+++
对照组	16	2	3	6	5
实验组	16				
在位内膜[a]	4	1	2	1	0
异位内膜[b]	12	4	5	2	1

a（$z=2.912$ $P=0.04$），$P<0.05$，与对照组比较，b（$z=2.309$，$P=0.021$），$P<0.05$，与对照组比较



A：NDGA 组；B：PBS 组

图3 3周种植子腹腔子宫内膜病灶 VEGF 表达 （S-P ×200）

3 讨论

近年的研究表明子宫内膜异位症的形成与新生血管的存在有密切的关系[3]。异位内膜的种植必须有新生血管生成。抗血管生成治疗有望成为治疗子宫内膜异位治疗的新方法。NDGA 作为一种强效的血管生成抑制剂，已经证明 NDGA 通过抑制肿瘤血管形成而有抑制肿瘤生长的作用。子宫内膜异位的生长具有血管生成依赖性[4]。Fraser 等[5]认为，抗血管生成治疗将成为一个更好的治疗 EMs 的重要工具。

本研究结果：①血清 E_2 与给药前相比有明显的下降趋势，而 P 较给药前比较有所升高，FSH 和 LH 指标给药前后无明显化，均处于低水平，FSH、LH 结果无统计意义。文献[6]报道：异位种植的子宫内膜有芳香化酶 mRNA 和细胞色素 P450 蛋白的表达，提示异位内膜可产生雌激素，并通过雌激素的受体起作用。NDGA 能降低雌激素的水平，达到治疗子宫内膜异位症的目的。②NDGA 组皮下和开腹种植的异位灶有所缩小，甚至少部分消失；PBS 组观察包块无缩小，略有增大。这表明 NDGA 对种植异位灶有抑制生长的作用，这与孙慧勤等[4]的研究结果是一致的。③NDGA 组子宫内膜腺体数目的数目减少和间质紧密，PBS 组子宫内膜腺体的数目增多和间质疏松。这表明 NDGA 对异位内膜、在位内膜的生长有抑制作用。④免疫组化染色结果 NDGA 组减少微血管密度（MVD）的数目、FⅧRAg 抗体表达成弱阳性和血管内皮细胞生长因子 VEGF 表达呈弱阳性。PBS 组微血管密度 MVD 数目多、FⅧRAg 抗体表达成强阳性和血管内皮细胞生长因子 VEGF 表达呈强阳性。MVD 数目的减少表明血管生成抑制剂对异位内膜有抑制作用。这与 Nap 等[7]用血管生成抑制剂 TNP-470 给雌性裸鼠，能够明显的减少在裸鼠体内形成的血管数目和新生血管的形成结果是一致的。VEGF 主要表达于腺上皮细胞细胞质，呈灶性分布，在间质细胞中散在表达。有文献报道在位内膜 VEGF 表达分泌期明显高于增生期[8]，进一步表明 VEGF 与子宫内膜异位的形成有密切的关系。总之，上述的结果表明 NDGA 通过抑制血管的生长特性对异位内膜的生长产生抑制生长的作用。

本实验通过血管生成抑制剂 NDGA 对异位内膜生长有明显的抑制作用，表明 NDGA 能阻止异位内膜在子宫以外的部位生长。

参考文献：

[1] Arteaga S, Andrade-Cetto A, Cardenas R. Larrea tridentata (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 98(3):231 – 239.

[2] Jang K S, Han H X, Paik S S, *et al*. Id-1 overexpression in invasive ductal carcinoma cells is significantly associated with intratumoral microvessel density in ER-negative/node-positive breast cancer [J]. Cancer Lett, 2006, 244(2):203 – 210.

[3] Pandya N M, Dhalla N S, Santani D D, *et al*. Angiogenesis--a new target for future therapy[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 44(5):265 – 274.

[4] 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.

[5] Fraser H M, Lunn S F. Angiogenesis and its control in the female reproductive system[J]. Br Med Bull, 2000, 56(3):789 – 797.

[6] Bulun S E, Sebastian S, Takayama K, *et al*. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 86(3 – 5): 219 – 224.

[7] Nap A W, Griffioen A W, Dunselman G A, *et al*. Antiangiogenesis therapy for endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(3):1089 – 1095.

[8] Park A, Chang P, Ferin M, *et al*. Inhibition of endometriosis development in rhesus monkeys by blocking VEGF receptor: A novel treatment for endometriosis[J]. Fertil Steril, 2004, 82(Suppl 2):S71.

（编辑 王 红）