

人绒毛膜促性腺激素治疗子宫内膜异位症大鼠的病理学变化

吴玲玲¹, 尹玉竹¹, 邓妮¹, 周静², 张培珍¹
(中山大学附属第三医院 1.妇产科; 2.病理科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】研究人绒毛膜促性腺激素(HCG)治疗子宫内膜异位症(EM, 简称内异症)大鼠的病理学变化。【方法】建立子宫内膜异位症模型大鼠24只, 分为3组, 分别以258 U/kg(低剂量组)、516 U/kg(高剂量组)的HCG进行治疗15 d(3个大鼠动情周期), 并以生理盐水作为对照组, 比较治疗前后异位病灶体积的变化及异位内膜、在位内膜组织HE染色光镜下的变化。【结果】治疗前, 3组异位病灶的体积[分别为(208 ± 99) cm³、(219 ± 109) cm³、(210 ± 124) cm³]差异无统计学意义($P > 0.05$), HCG治疗后, 低剂量组、高剂量组的异位病灶体积[分别为(64 ± 62) cm³、(54 ± 27) cm³], 均较对照组[(203 ± 102) cm³]缩小($P < 0.05$); 光镜下在位内膜、异位内膜的腺上皮细胞呈抑制状态, 表现为细胞浆减少、浓缩, 细胞核浓染、胞核缩小等。【结论】从组织形态学分析, HCG治疗子宫内膜异位症大鼠具有一定的疗效。

关键词: 人绒毛膜促性腺激素; 治疗; 子宫内膜异位症大鼠; 病理学

中图分类号: R714 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)05-0610-04

Pathology Change of Endometriosis Rats Treated by Human Chorionic Gonadotropin

WU Ling-ling¹, YING Yu-zhu¹, DENG Ni¹, ZHOU Jing², ZHANG Pei-zhen

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the pathology change of endometriosis (EMs) rats which were treated by human chorionic gonadotropin (HCG). 【Method】 Twenty-four endometriosis rat models were established and were divided into three groups, then were treated with 258 U/kg (low dose group) and 516 U/kg (high-dose group) of HCG respectively and 0.9% NaCl as a control for 15 days (3 estrous cycles), the ectopic lesion volume change and endometrium, ectopic endometrium endometrial tissue HE staining changes were investigated. 【Results】 There was no significant difference among the three groups [(208 ± 99) cm³, (219 ± 109) cm³, and (210 ± 124) cm³, respectively] of the ectopic lesion volume ($P > 0.05$). The ectopic lesion volume of low-dose group and high dose group of HCG [(64 ± 62) cm³ and (54 ± 27) cm³, respectively] were smaller than the control group (203 ± 102) cm³ ($P < 0.05$). Eutopic endometrium and ectopic endometrial glandular epithelial cells was inhibited state, the performance was as a reduction of the cytoplasm, enrichment of nuclear stain and the nuclear shrink and so on. 【Conclusion】 From histological morphology analysis, HCG treatment in endometriosis rats has a certain effect.

Key words: human chorionic gonadotropin; treatment; endometriosis rats; pathology

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(5): 610-613]

子宫内膜异位症(endometriosis, EM, 简称内异症)系生育期妇女的常见病和多发病, 全球发病率7% ~ 10%^[1]。内异症虽是一种良性疾病, 却具有恶性的种植性、复发性和转移性, 严重影响患者的健

康和生活质量。因其发病机制尚未完全明了, 因此临床治疗效果不理想。本研究采用自体组织移植方法建立EM大鼠模型, 探讨人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)对大鼠

收稿日期: 2012-02-09

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B030301065)

作者简介: 吴玲玲, 硕士, 副主任医师, E-mail: wll1990@sohu.com

EMs 模型组织形态学的影响,为临床应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 一般资料

1.1.1 实验动物 选用健康、体质量 220 ~ 250 g SD 雌性大鼠。购于中山大学中山医学院实验动物中心,饲养于中山大学中山医学院实验动物中心。

1.1.2 药 物 HCG 购于中山大学附属第三医院 丽珠集团丽珠制药厂,国药准字:H44020673。

1.2 研究方法

1.2.1 子宫内膜异位症模型的建立方法 采用非动情期 SD 大鼠子宫内膜异位症模型的建立方法^[2]。首先予 100 mL/L 水合氯醛 350 mg/kg 腹腔注射麻醉。手术方法:将大鼠固定于手术板上,常规消毒,取耻骨联合上 1 cm 行下腹纵切口,长约 3 cm,结扎局部子宫血管及需切除的子宫上下端(1/0 丝线),切下左侧子宫角长约 2 cm,残端分别结扎(1/0 丝线);立即放入 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)中,修剪去子宫浆膜外的脂肪组织,纵向切开子宫腔,分别切取两块 5 mm 长的片段,去浆膜层及肌层,用 3/0 可吸收线将内膜块反向缝合 4 针分别固定于左、右侧腹壁(注意远离切口,避免术后粘连,尽可能靠近血管,提高建模成功率);向腹腔滴入 9 g/L 生理盐水溶解的青霉素,16 万单位/kg,0 号丝线分层缝合关腹,待其自然苏醒。自术后第 10 天开始予乙烯雌酚 0.02 mg/kg 灌服,连续 5 d。

1.2.2 建模成功标准 于术后 4 周打开原切口取材,移植处见囊肿形成,内见透明液体。光镜下见移植物内有子宫内膜组织的上皮细胞或间质细胞存在,为建模成功。

1.2.3 动物分组及药物处理 建模术后 4 周再次开腹,完整切除建模成功的 SD 大鼠的左侧病灶,根据右侧异位病灶的体积分层随机法将大鼠分为 3 组,每组 8 只,低剂量组:予 HCG 258 U/kg 肌注;高剂量组:予 HCG 516 U/kg 肌注;对照组:9 g/L 生理盐水治疗 0.2 mL 每天肌注,疗程 15 d(3 个大鼠动情周期)。剂量系根据成人使用量^[3]来换算的大鼠使用剂量^[4]。

1.2.4 各组异位囊肿体积变化的测定 测量囊肿

的长度、宽度及厚度(高),按公式 $V = \text{长} \times \text{宽} \times \text{高}$ 计算体积^[5],治疗前后分别测定右侧异位病灶的体积。

1.2.5 组织形态学观察 光镜下:取建模前、建模成功后、治疗后大鼠在位子宫内膜及建模成功后左侧异位内膜及治疗后右侧异位内膜,分别予 100 mL/L 甲醛固定、常规制片,HE 染色,光镜下观察在位、异位内膜的组织形态学特点及差异。

1.3 统计学方法

运用 SPSS 13.0 统计软件进行秩和检验(非正态分布), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 治疗前后子宫内膜异位囊肿的大体表现

2.1.1 建模成功治疗前 肉眼可见移植植物增大,可呈隆起的小泡状,其内充满黄色或清亮浆液,移植植物被结缔组织覆盖,表面可见丰富血管(图 1A 箭头处)。

2.1.2 HCG 治疗后 囊泡体积均较治疗前缩小,部分囊泡近似消失,囊壁表面紧贴右侧腹壁(图 1B 箭头处)。

2.2 治疗前后异位囊肿体积的改变

成功建模 24 只(左右侧腹壁上均可见异位囊肿)。HCG 治疗后,低剂量组和高剂量组的异位病灶体积均较对照组明显缩小,差异有统计学意义($P < 0.05$);而治疗后低剂量组和高剂量组的体积差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体数值如表 1。

2.3 治疗前后光镜下异位内膜和在位内膜的变化

2.3.1 建模前子宫内膜的光镜下所见 腺体形态规则,腺上皮细胞呈柱状,排列整齐,胞浆丰富,核圆形或椭圆形(图 2A)。

2.3.2 建模后的光镜下所见 ①子宫内膜:腺体形态规则,腺上皮细胞呈柱状,排列整齐,胞浆丰富,核圆形或椭圆形,近细胞基底部,个别细胞可见核下空泡(图 2B)。②异位内膜:腺体增生,腺上皮呈高柱状,单层或呈假复层排列,排列尚整齐,核多呈椭圆形,近基底部,可见顶浆分泌现象及较多核下空泡(图 2C)。

2.3.3 HCG 组治疗后光镜下改变 ①子宫内膜:腺体结构稍有破坏,腺上皮细胞排列欠整齐,胞浆较少,核呈圆形或卵圆形,多位于细胞顶端,可见

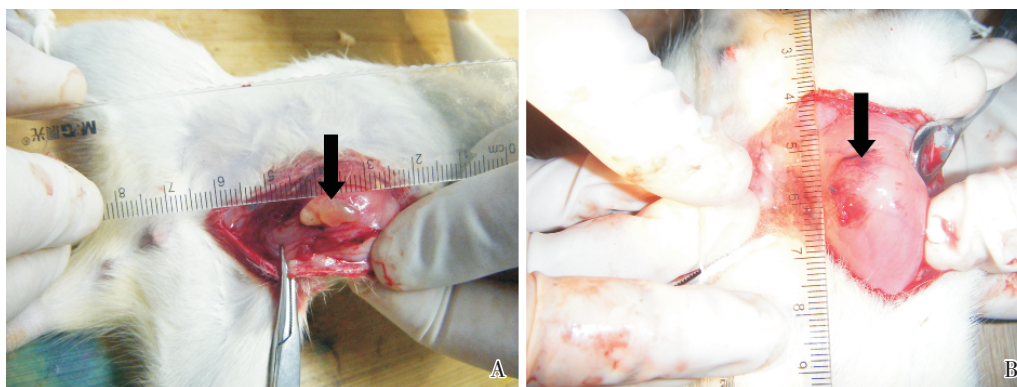


图 1 治疗前后大鼠异位囊肿大体所见

Fig.1 Ovarian cysts of rats before and after treatment

A: model of endometriosis; B: ectopic tissue after treatment

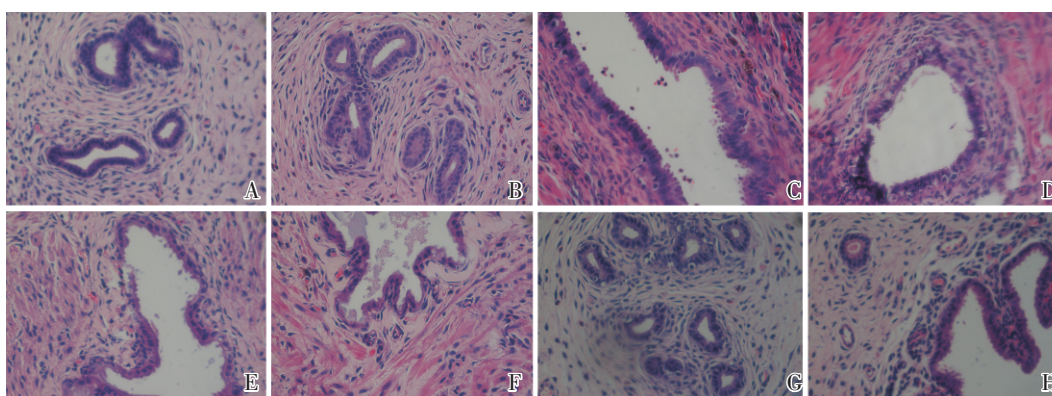


图 2 治疗前后在位内膜和异位内膜的组织学表现

Fig.2 Histological presentation of eutopic tissues, ectopic tissues, and normal controls before and after treatment

A: normal eutopic tissue; B: eutopic tissue of model endometriosis; C: ectopic tissue of model endometriosis; D: eutopic tissue after treatment; E: ectopic tissue after treatment (low dose); F: ectopic tissue after treatment (high dose); G: eutopic tissue of control; H: ectopic tissue of control; HE, $\times 40$

表 1 治疗前后 3 组异位囊肿的体积

Table 1 The volume of ectopic cysts in the three groups of rats before and after treatment

Group	<i>n</i>	$V_{\text{Before}}/\text{cm}^3$	$V_{\text{After}}/\text{cm}^3$
Low dose	8	$208 \pm 99^{1)2)}$	64 ± 62
High	8	$219 \pm 109^3)$	$53 \pm 27^6)$
Control	8	210 ± 124	203 ± 102

1) compared with high, $P = 0.833$; 2) compared with control $P = 0.968$; 3) compared with control; $P = 0.875$; 4) compared with high $P = 0.458$; 5) compared with control; $P = 0.013$; 6) compared with control, $P = 0.008$

核下空泡(图 2D;低剂量组)。高剂量组镜下改变同图 2D 类似。②异位内膜:异位的内膜腺体结构不规则,稍有破坏,细胞呈低柱状,体积较小,部分细胞胞浆稀少,核呈圆形,多居中,可见局灶性顶

浆分泌现象,未见明显核下空泡。见图 2E(低剂量组)和 F(高剂量组)。

2.3.4 对照组治疗后光镜下改变 其在位内膜(图 2G)和异位内膜(图 2H)光镜下改变与治疗前相似。

3 讨论

妊娠可以使内异症患者的病情缓解,但其机理一直在研究中。HCG 主要由妊娠期胎盘产生,通过荧光免疫方法可发现 HCG 定位于合体滋养层细胞内。HCG 是一种糖蛋白,由非特异的 α 亚基和特异的 β 亚基组成, α 亚基和其他垂体糖蛋白激素(FSH、LH、TSH)的 α 亚基具有相同的结构, β 亚基中的若干氨基酸片断和人黄体生成素(LH) β

亚基的某些片段相类似,所以,HCG与LH有相似的生物学效应,具有垂体前叶黄体生成素的活性,可维持黄体继续存在和行使功能。整个妊娠期高水平的HCG是否为内异症缓解发挥了作用,值得探讨。2004年学者Huber等^[3]首次用HCG治疗难治型内异症患者31例,发现对内异症引起的慢性盆腔痛、失眠、情绪失调及全身不适均有较大的缓解率。Huber等^[6]进一步通过体外实验:以高度纯化的HCG作用于内异症患者异位病灶处提取的间质细胞,具有抑制作用。并且HCG通过调节一组与凋亡相关的基因,从而改变了炎症反应和重组细胞外基质,可能从转录水平对HCG治疗内异症以及妊娠可以使内异症缓解的机理得到部分解释^[7],但HCG治疗内异症的确切机理仍值得探讨,而且需要从其它角度如组织形态学等方面去进行治疗的有效性验证。

本研究通过建立SD大鼠的内异症模型,分别以低剂量、高剂量HCG治疗,肉眼见异位病灶处囊肿明显较治疗前缩小,部分囊肿近似于消失,经测量两组体积较对照组有明显缩小,并且低剂量、高剂量HCG治疗后两组病灶体积差异无统计学意义。通过对病灶组织的HE染色显微镜下观察,可见到建模成功后在位内膜与建模前相似,而建模后异位内膜的腺上皮细胞呈高柱状,有顶浆分泌现象及较多核下空泡,腺腔丰富,细胞呈活跃状态。经HCG治疗后,在位内膜及异位内膜的腺体结构被破坏,腺腔减少,细胞浆减少、浓缩,细胞核浓染、胞核缩小,腺上皮细胞均呈抑制状态,并且低剂量组和高剂量组的改变类似。与文献报道的中药对内异症大鼠治疗后的异位内膜改变相似^[8],并且本研究的重要贡献在于HCG治疗对在位内膜的干预,因在位内膜作为异位种植的物质主体,在EM的发生中起着决定性作用^[9],HCG改变了在位内膜的生物学特质,从而在源头上起到治疗作用。而对照组镜下改变与治疗前无明显差别。因此从组织形态学的改变可以证明HCG治疗内异症大鼠是有效的。

目前在临床上,HCG主要用于早孕先兆流产的治疗^[10]以及辅助生殖技术中的促排卵^[11]治疗,剂量可以用到2000U隔日肌注到妊娠12周,没有明显的不良反应。本研究从病理学角度分析,低剂量和高剂量HCG对内异症大鼠的治疗作用相似,而

低剂量组大鼠的用药量对应于人类剂量为2000U的HCG,因此根据此研究可以试用2000U的HCG给人类内异症患者进行治疗,每周肌注一次共3个月(3个月经周期)。但是对于应用于人类治疗的疗效、停药后有无复发以及增加疗程使用的疗效及不良反应等,尚需进一步进行临床研究。

参考文献:

- [1] Portelli M, Pollacco J, Sacco K, et al. Endometrial seedlings: A survival instinct? Immunomodulation and its role in the pathophysiology of endometriosis [J]. *Minerva Ginecol*, 2011, 63(6): 563-570.
- [2] 张曦,王鑫,王红静.大鼠子宫内异位症模型建立方法的探索[J].*华西医学*, 2007, 22(4): 831-832.
- [3] Huber AV, Huber JC, Kolbus A, et al. Systemic HCG treatment in patients with endometriosis: a new perspective for a painful disease [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2004, 116(24): 839-843.
- [4] 徐淑云,干如濂,陈修.药理学实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2002: 203.
- [5] 郑澄宇,谢梅青,杨冬梓.阿拉瑞林对SD大鼠正位与异位子宫内异症孕激素受体的影响[J].*中医科大学学报*, 2002, 23(2): 114-117.
- [6] Huber A, Hudelist G, Knöfler M, et al. Effect of highly purified human chorionic gonadotropin preparations on the gene expression signature of stromal cells derived from endometriotic lesions: potential mechanisms for the therapeutic effect of human chorionic gonadotropin in vivo [J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(10): 1232-1239.
- [7] Hudelist G, Huber A, Auer M. Administration of β HCG leads to dose-dependent changes of gene expression signature of endometriotic stromal cells [J]. *Reprod Biomed Online*, 2010, 20(5): 699-706.
- [8] 厉华卿,贾晓航.逐瘀消癥汤对子宫内异位症模型大鼠异位内膜组织形态学的影响[J].*中国中医药科技*, 2008, 15(7): 265-266.
- [9] 郎景和.子宫内异位症的研究与设想[J].*中华妇产科杂志*, 2003, 38(8): 478-480.
- [10] 段玉玲,陈妙华,李华维.主动免疫疗法联合HCG及黄体酮治疗习惯性流产[J].*疾病监测与控制杂志*, 2011, 5(9): 533-535.
- [11] De Ziegler D, Streuli MI, Borghese B, et al. Infertility and endometriosis: a need for global management that optimizes the indications for surgery and ART [J]. *Minerva Ginecol*, 2011, 63(4): 365-373.

(编辑 徐杰)