

# 重组人催乳素对大鼠子宫内膜异位模型作用的初步研究

徐成康<sup>1</sup>, 陈玉清<sup>1</sup>, 谢梅清<sup>2</sup>, 张凤丽<sup>2</sup>

(中山大学 1. 第一附属医院妇产科, 2. 第二附属医院妇产科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】初步了解重组人催乳素(rhPRL)对子宫内膜异位症(EM)的治疗作用。【方法】先建立大鼠 EM 模型 50 只,将建模成功大鼠随机分为 6 组:实验 1 组 10 例,实验 2 组 10 例,实验 3 组 10 例, Danazol 对照组 10 例,生理盐水对照组 6 例,空白对照组 4 例。然后用不同浓度的 rhPRL(每日分别为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )给实验大鼠腹腔内注射, Danazol 对照组每日灌喂 Danazol (80 mg/kg);生理盐水对照组以与实验组等量的生理盐水腹腔内注射;空白对照组不加干预。观察指标:肉眼观察 EM 模型的消长及粘连情况,用流式细胞术测定 CD3、CD4、CD8T 淋巴细胞,用 ELISA 法测量血清中 IL-2、IL-4 的含量,大鼠阴道涂片,观察动情周期的变化。【结果】建模后 60% 的大鼠动情周期发生了改变。用 rhPRL 治疗后大鼠动情周期全部呈抑制状态,显示出 rhPRL 对性腺功能抑制。用 rhPRL 治疗后,异位病灶缩小,粘连受到明显的抑制,与 Danazol 相比无明显差异( $P > 0.05$ ),与生理盐水及空白组有显著差异( $P < 0.05$ )。用 rhPRL 治疗后 CD4/CD8 比值升高,与生理盐水及空白对照组相比有显著差异( $P < 0.05$ )。用 rhPRL 治疗后,大鼠体内白细胞介素 IL-4 水平下降,而 IL-2 却明显升高,与生理盐水及空白对照组相比均有显著差异( $P < 0.05$ )。【结论】重组人催乳素对大鼠 EM 模型的生长及粘连有抑制作用,可能是通过对性腺功能的抑制及免疫功能的调节而发挥其作用。

关键词:子宫内膜异位症;动物模型;重组人催乳素

中图分类号:R711.7

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2006)05-506-04

## Effect of rhPRL on Endometriosis in Rat Model

XU Cheng-kang<sup>1</sup>, CHEN Yu-qing<sup>1</sup>, XIE Mei-qing<sup>2</sup>, ZHANG Feng-li<sup>2</sup>(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;  
2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:**【Objective】To investigate the effect of recombinant human prolactin (rhPRL) on endometriosis through giving rhPRL to rat endometriosis model.【Method】Fifty rat models with endometriosis were established firstly and were separated into 6 groups: Study group 1 (10 cases) group 2 (10 cases) and group 3 (10 cases), Danazol control group (10 cases), 0.9% saline control group (6 cases) and empty control group (4 cases). Different concentration [50  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 100  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ , 200  $\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ] of rhPRL were injected respectively into the abdominal cavity of study groups. Danazol [80 mg/(kg·d)] were given to Danazol controls. Observation index: diameter of nidus were measured by ruler; CD3, CD4, CD8 T lymphocyte were determined by flowcytometry; serum IL-2 and IL-4 were determined by ELISA; the estrus period was indirectly observed by pap smear.【Result】Sixty percent of rat estrus were changed after endometriosis were established, which were controlled by rhPRL. Endometriotic niduses shranked and adhesions were restricted after the injection of rhPRL. There was no statistic difference between study groups and Danazol control group ( $P > 0.05$ ), but there were statistic differences between study groups and 0.9% saline control group and empty control group ( $P < 0.05$ ). The rate of CD4/CD8 and IL-2 were elevated but IL-4 was lowed in study groups, there were statistic differences between study groups and 0.9% saline control group and empty control group in these indexes ( $P < 0.05$ ).【Conclusion】rhPRL can inhibit the growth and adhesion of endometriosis in rat model through inhibiting the function of gonad and regulating immune function.

Key words: endometriosis; animal model; recombinant human prolactin

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):506-509]

收稿日期:2005-10-22

基金项目:广东省科委攻关基金资助项目(C30602)

作者简介:徐成康(1963-),男,江苏兴化人,副教授,硕士生导师

人们已熟知,妊娠和哺乳对子宫内位症(endometriosis, EM)患者有益。然而对其机理了解甚少。催乳素具有很强的抑制性腺作用,在妊娠和哺乳期明显升高,此激素是否在其中对EM产生了治疗作用值得研究。本研究利用动物模型,外源性给予重组人催乳素(recombinant human prolactin, rhPRL),初步了解PRL对EM有无治疗作用,对探索新的药物治疗方法有很重要意义。现报道如下。

## 1 资料及方法

### 1.1 建模及分组

清洁级SD雌性大鼠,并应用外科手术移植法成功建立EM动物模型,共50只。手术在无菌操作下完成,用43 g/L水合氯醛腹腔内注射麻醉。每日定时做阴道涂片检查,选择连续有2个正常动情周期的大鼠为试验对象。室内温度28~32℃,无菌操作下进行。手术操作步骤:浓度为43 g/L的水合氯醛300 mg/kg作腹腔注射麻醉,大鼠腹部剪毛,常规消毒皮肤后取下腹正中、耻联上1 cm起向上切口,长2~3 cm,结扎右侧子宫系膜血管,切下2 cm子宫段,置于生理盐水中纵行切开;将子宫内膜与肌层分离(部分子宫内膜较薄、与肌层粘连紧密者,内膜与肌层不分离,只剥去浆膜层),分别切取5 mm×5 mm的内膜片段,内膜面裸露在腹腔内,用3-0无损伤缝线缝一针或两针以固定在左侧子宫旁韧带系膜处、小肠系膜、右腹壁及卵巢近血管丰富处的系膜;然后全层缝合皮肤,皮肤消毒。术后常规饲养。1个月后,第二次手术开腹观察移植存活情况,用标尺测量移植三维径线大小,观察腹水、腹腔粘连情况,取部分异位子宫内膜病灶进行组织病理学检查。再1个月之后,将建模成功大鼠随机分为6组:实验1组10例,实验2组10例,实验3组10例,Danazol对照组10例,生理盐水对照组6例,空白对照组4例。然后给予用药治疗。另外设未建模的正常鼠10例作为对照。

### 1.2 治疗方法

分组后,粉剂rhPRL以生理盐水稀释,分别按rhPRL 200、100、50 μg/(kg·d)浓度分别给实验1、2、3组大鼠腹腔内注射,每周一、三、五注射1次;Danazol对照组每日灌喂Danazol(80 mg/kg);生理

盐水对照组以与实验组等量的生理盐水每周一、三、五腹腔内注射1次;空白对照组不加干预。共4周。未建模的正常鼠按实验组大鼠腹腔内注射药物。

### 1.3 疗效观察

停药后1周内,第3次开腹,测量移植物大小,观察腹水、腹腔粘连情况,取异位的子宫内膜组织行病理组织学检查;取腹主动脉血或心脏采血4 mL,其中0.5~1 mL抗凝血,用流式细胞术测定CD3、CD4、CD8T淋巴细胞;3 mL全血分离血清后储存-80℃冰箱。用药3个月后,用ELISA法测量血清中IL-2、IL-4的含量。采用大鼠阴道涂片,观察动情周期的变化。

### 1.4 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0版统计软件对均数比较行t检验

## 2 结果

### 2.1 模型大体及病理组织观察

术后第3周行第2次开腹,移植成功的指标为:肉眼可见移植物增大,可呈隆起的小泡状,有些形成多房的囊肿,囊肿内充满黄色或清亮浆液,移植物被结缔组织覆盖并有血管形成,部分移植物呈黄色或褐色小结(见图1)。经HE染色,病理示:移植物中有内膜上皮细胞、腺体及间质细胞生长,光镜下可见明显的子宫内膜腺体和间质,腺上皮呈柱状或高立方状,体积增大,胞浆浓染,核浆比增大,内膜腺体丰富,腹腔内并有分泌活动,可见核下空泡(图2)。



图1 模型成功建立后的异位灶

Fig. 1 Model of endometriosis

The graft enlarged to vacuole with connective tissue covering and vascular formation

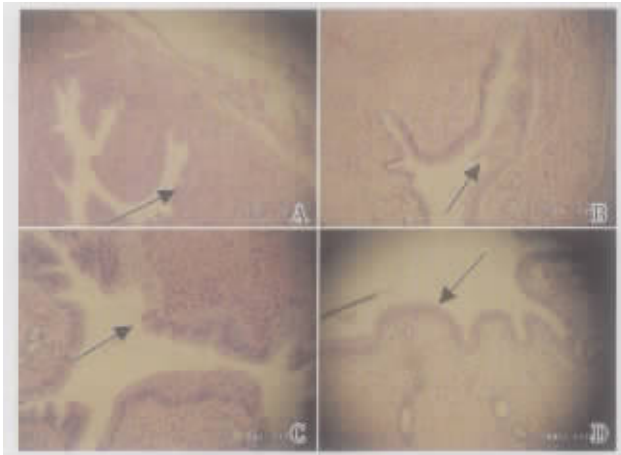


图 2 用药前异位子宫内层组织学表

Fig.2 Histologic presentation of EM before treatment

A: epithelium present hypocolumnar ( $\times 20$ ); B: there is hyponucleus vacuole in the endothelial cell ( $\times 20$ ); C: epithelial cell hyperchromatic ( $\times 20$ ); D: adenoid epithelium shows columnar distribution( $\times 10$ )

2.2 治疗效果观察

2.2.1 异位病灶的形态观察 用 rhPRL 治疗后, 异位病灶缩小, 粘连受到明显的抑制, 以低剂量效果较好(表 1)。镜下见异位内层上皮细胞坏死(图 3)。



图 3 用药后的异位内层组织学表现

Fig.3 Histologic presentation of EM after treatment

A: epithelium assumed monostratified growing, accompanied necrotic focus formation; B: epithelial cell partially necrosis and breaking off

表 1 各组治疗前后子宫异位内层病灶的大小变化

Table 1 Comparison of the size of endometriotic niduses between pre and post treatment

Group	n	Size of endometriotic niduse		A		B	
		Pre- treatment	Post- treatment	t	P	t	P
Group 1	10	58 $\pm$ 7	32 $\pm$ 5	3.755	0.002	2.977	0.006
Group 2	10	58 $\pm$ 5	32 $\pm$ 7	2.076	0.004	2.067	0.049
Group 3	10	58 $\pm$ 5	32 $\pm$ 5	3.676	0.002	3.425	0.002
Danazol control	10	57 $\pm$ 5	34 $\pm$ 5	1.865	0.009	1.945	0.007
Saline control	6	58 $\pm$ 5	58 $\pm$ 7	- 0.426	0.902		
Empty control	4	59 $\pm$ 6	57 $\pm$ 6	- 0.393	0.701		

A: Comparison of size between post- treatment and pre- treatment; B: Comparison of size between post- treatment and saline control

2.2.2 大鼠细胞免疫功能指标的变化 用 rhPRL 治疗后, 用 rhPRL 治疗后, 细胞免疫功能明显改善, 无论是高剂量还是低剂量, 都会提高细胞免疫功能(表 2)。

2.2.3 大鼠体内白细胞因子水平的变化 用 rhPRL 治疗后, IL- 4 水平下降, 而 IL- 2 却明显升高(表 3)。

3 讨论

人们已经熟知妊娠及哺乳对 EM 有治疗作用, 妊娠和哺乳期血 PRL 明显升高, 那么妊娠及哺乳对子宫内膜异位症产生的治疗作用是否由于高水平的 PRL 导致, 目前尚缺乏此方面的研究报道。

大量研究已经证实, PRL 具有强力的性腺功

表 2 各组大鼠治疗后的 T 淋巴细胞变化

Table 2 Comparison of lymphocyte subsets between study group and saline control group ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

Group	n	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8
Group 1	10	66 $\pm$ 8 <sup>1)</sup>	44 $\pm$ 4 <sup>1)</sup>	15 $\pm$ 5	3.2 $\pm$ 0.8 <sup>1)</sup>
t		3.514	5.088	- 2.007	5.721
P		0.000	0.000	0.045	0.000
Group 2	10	57 $\pm$ 10 <sup>1)</sup>	38 $\pm$ 10 <sup>1)</sup>	12 $\pm$ 3 <sup>1)</sup>	3.3 $\pm$ 1.4 <sup>1)</sup>
t		2.085	2.734	3.22	- 3.798
P		0.047	0.150	0.002	0.001
Group 3	10	59 $\pm$ 8 <sup>1)</sup>	38 $\pm$ 7 <sup>1)</sup>	12 $\pm$ 3 <sup>1)</sup>	3.4 $\pm$ 1.1 <sup>1)</sup>
t		3.111	3.293	- 2.198	3.714
P		0.005	0.004	0.041	0.004
Saline control	6	47 $\pm$ 6	23 $\pm$ 5	17 $\pm$ 5	1.4 $\pm$ 0.3
Empty control	4	45 $\pm$ 7	24 $\pm$ 5	19 $\pm$ 5	1.5 $\pm$ 0.5

1) Comparison of CD between study groups and saline control group

表3 各组大鼠治疗后 IL-4 和 IL-2 的变化  
Table 3 Change of IL-4 and IL-2 after treatment in each group ( $\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$ )

Group	n	Size of endometriotic niduse		A		B	
		IL-4 (pg/mL)	IL-2 (pg/mL)	t	P	t	P
Group 1	10	8.0 $\pm$ 0.8	636 $\pm$ 86	2.715	0.026	2.735	0.030
Group 2	10	7.7 $\pm$ 1.8	206 $\pm$ 54	2.269	0.049	1.108	0.299
Group 3	10	8.4 $\pm$ 0.5	120 $\pm$ 43	2.342	0.052	0.745	0.477
Saline control	6	10.0 $\pm$ 1.4	86 $\pm$ 23				
Empty control	4	10.0 $\pm$ 1.6	84 $\pm$ 21				

A: comparison of IL-4 between study groups and saline control; B: comparison of IL-2 between study groups and saline control

能抑制作用及催乳作用, 利用其强有力的性腺功能抑制作用来治疗性激素依赖性疾病, 在理论上应该可以成立。EM 属性激素依赖性疾病, EM 的动物模型易得, 这为 PRL 治疗性激素依赖性疾病提供了极好的实验条件。本研究通过对 EM 大鼠模型外源性的给予 rhPRL, 人为造成其高 PRL 血症, 以了解 PRL 是否对 EM 起治疗作用。结果发现用 rhPRL 治疗后, 异位病灶缩小, 粘连受到明显的抑制, 说明 PRL 对 EM 确实有治疗作用。这就从实验上进一步证实 PRL 可以用来治疗激素依赖性疾病, 这一结果也预示在子宫内膜异位症的药物治疗上有了新的选择。

用 rhPRL 治疗后, 细胞免疫功能明显改善, 这与以往研究结果相一致<sup>[1,2]</sup>。许多研究发现 EM 患者存在免疫功能的异常, 特别是细胞免疫功能的抑制, 由 TH1 引起的细胞免疫应答减弱, 而由 TH2 引起的体液免疫应答增强, 导致 TH1/TH2 失衡。IL-2 由 TH1 分泌, IL-4 由 TH2 分泌。本研究发现用 rhPRL 后改善了细胞免疫功能, 使 TH1/TH2 趋于平衡, 这也许是 rhPRL 能抑制 EM 病灶生长的机理之一。从以上结果估计 PRL 可能通过对性腺功能的抑制及免疫功能的调节而发挥。由于体外的研究结果已发现高浓度 PRL 可抑制培养瓶中的内膜细胞生长<sup>[3]</sup>。因而也不能排除 PRL 对异位子宫内膜细胞的直接抑制作用。以往有关 EM 与 PRL 关系的研究报道发现<sup>[4]</sup>, EM 患者体内 PRL 水平偏高, 大多数属隐性高催乳素血症, 这种改变导致不排卵及黄体功能不全, 被认为是 EM 不孕和自然流产的原因之一。患者体内这种升高的 PRL 是否代表机体免疫系统抗击疾病的一种反应升高, 抑或是 EM 中的间质细胞分泌 PRL, 很难分

清。

尚需要进一步研究的是 rhPRL 进入体内后对血液中的 PRL 及其他激素的浓度是否产生影响, rhPRL 所起的治疗作用是否通过改变全身内分泌状态而起作用。本研究未能就用药对大鼠血液中的 PRL 浓度的影响及其与治疗的关系作研究。另外 PRL 导致的不排卵作用可以起到避孕作用, 有些药物可导致高 PRL 血症<sup>[5]</sup>, 如胃复安 (paspertin), 可否用来治疗 EM 或者避孕, 值得研究。虽然 PRL 所具有的抑制性腺功能作用可被利用, 但它又有明显的催乳作用, 如何控制这种副作用, 尚需进一步研究, 但与目前用于治疗 EM 的其他药物相比, 对于这种副作用, 也许患者的可接受性会好些。

#### 参考文献:

- [1] 李爱玲, 孙 纳, 张建华, 等. 基因工程人催乳素 (rhPRL) 对人 NK 细胞免疫活性的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2002, 18(7): 474-477.
- [2] 魏秀岩, 王淑芬, 陈 红. 催乳素对老年大鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2002, 22(6): 487-489.
- [3] NEGAMI A I, TOMINAGA T. Effects of prolactin on cultured human endometrial cells[J]. Horm Res, 1991, 35(suppl):50-57.
- [4] GREGORIOU G, BAKAS P, VITORATOS N, et al. Evaluation of serum prolactin levels in patients with endometriosis and infertility [J]. Gynecol Obstet Invest, 1999, 48(1):48-51.
- [5] CHIODERA P, VOLPI R, CAPRETTI L, et al. Oxytocin enhances the prolactin response to vasoactive intestinal polypeptide in healthy women[J]. Fertil Steril, 1998, 70(3):541-543.

(编辑 张恩健)