

阿拉瑞林对 SD 大鼠正位与异位子宫内膜 雌孕激素受体的影响

郑澄宇, 谢梅青, 杨冬梓, 陈学煌, 蔡雪影

(中山医科大学孙逸仙纪念医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】观察阿拉瑞林对子宫内膜异位症大鼠异位病灶的抑制作用, 研究其对正位与异位子宫内膜雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)的影响。【方法】27只采用外科诱导法建立的子宫内膜异位症大鼠随机分成模型对照组和阿拉瑞林(alarelin)治疗组, 模型组在同等条件下观察4周, 阿拉瑞林组以 alarelin $30 \mu\text{g}(\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 皮下注射4周; 治疗结束后, 用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP)行正位与异位内膜ER、PR测定。【结果】阿拉瑞林组大鼠正位和异位子宫内膜生长活动受抑制, 异位病灶体积较治疗前明显缩小($P < 0.01$), 异位内膜抑制率为 $(68 \pm 44)\%$; 正位子宫内膜的ER较模型对照组明显下降($P < 0.05$); 正位子宫内膜上皮细胞的ER与异位内膜抑制率呈一定的负相关($r = -0.407, P < 0.05$)。而对异位子宫内膜的ER、正位与异位子宫内膜PR的影响无显著性差异。【结论】阿拉瑞林对子宫内膜异位症大鼠有显著的治疗作用, 其对正位子宫内膜的抑制作用可能通过ER介导, 而对异位子宫内膜的抑制作用与异位内膜局部总的ER、PR可能无直接关系; 检测正位子宫内膜上皮细胞的ER水平对阿拉瑞林的疗效有一定的预测作用。

关键词: 疾病模型; 动物; 阿拉瑞林; 子宫内膜异位症; 受体; 雌激素; 受体; 孕激素

中图分类号: R977.12

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)02-0114-04

The Effect of Alarelin on the Sex Steroid Receptors of Entopic and Ectopia Endometrium in Experimental Endometriosis in Rats ZHENG Cheng-yu, XIE Mei-qing, YANG Dong-zhi, CHEN Xue-huang, CAI Xue-ying. (Department of Obstetrics and Gynecology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objective】To study the effect of alarelin on experimental endometriosis in rats, measure the changes of the sex steroid receptors in entopic and ectopic endometrium for exploring the mechanism of the effect of alarelin on endometriosis. 【Methods】27 rat models of endometriosis were divided into 2 groups (at random), model group and non-treatment group, alarelin group with alarelin $30 \mu\text{g}(\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ injected subcutaneously for 4 weeks. After treatment, the immunoperoxidase staining method was adopted to measure the changes of sex steroid receptors in entopic and ectopia endometrium. 【Results】The entopic endometrium and the ectopia cyst were suppressed and atrophied dramatically in alarelin treated rats, profound suppression of explant volume was also occurred. The rate of inhibition in alarelin treated rats was $(68 \pm 44)\%$. Estradiol receptor (ER) was obviously depressed within entopic endometrium in alarelin treated rats, and a negative correlation between ER in entopic endometrium epithelial cells and the inhibition rate was found. However, alarelin failed to result in obvious change neither in ectopia endometrial ER nor in entopic and ectopia endometrial PR. 【Conclusion】The alarelin causes dramatic atrophy and suppression of endometriosis, and the suppressive effect on entopic endometrium in rat may be mediated by ER, while the mechanism involved in its inhibitory effect on endometrial implants may not be related to ER or PR. Measurement the changes of ER in entopic endometrium epithelial cells may do a favor in doping out curative effect on endometriosis.

Key words: disease model; animal; alarelin; endometriosis; receptors; estrogen; receptors; progesterone

子宫内膜异位症(简称内异症)的发病率逐年增高,已成为生育期妇女的常见病和多发病,临床处理十分棘手。其发病机制尚未完全明了,其中雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)在内异症的发生和发展中可能起着重要的作用,雌激素与孕激素生物活性依赖于这些激素和靶细胞相应受体的相互

作用。促性腺激素释放激素类似物(GnRH-a)是20世纪90年代子宫内膜异位症治疗的重要药物,探讨GnRH-a对子宫内膜的影响及其机制,是20世纪90年代生殖内分泌学科所关注的问题之一。本文观察了GnRH-a类药阿拉瑞林对SD大鼠在位与异位子宫内膜形态和雌、孕激素受体的影响;初步

收稿日期: 2001-09-23

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(991019); 广东省卫生厅医学科研基金资助项目(A1999170)

作者简介: 郑澄宇(1974-),男,广东汕头人,临床硕士,医师

探讨阿拉瑞林的局部作用机制及雌、孕激素受体的表达与疾病预后的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康、性成熟的SD雌性大鼠共42只,鼠龄60~80 d,每只大鼠体质量200~300 g。大鼠由第一军医大学实验动物中心提供,由本院动物实验室饲养。

1.2 实验药物

阿拉瑞林(原名丙氨瑞林),为短效GnRH-a类药物,每支含阿拉瑞林150 μg,安徽省马鞍山生物化学制药厂生产。

1.3 实验方法

1.3.1 内异症模型的建立及分组 选择有正常动情周期的大鼠为试验对象,以外科诱导法^[1]将大鼠自体的内膜片段用3/0无损伤缝线固定在生殖道系膜和(或)肠系膜血管以建立模型;6周后移植物体积增大,呈透明的结节状、囊状,出现澄清液体积聚,被结缔组织覆盖并有血管形成,病检有内膜上皮细胞及间质生长者为造模成功。选择病灶生长良好的大鼠27只,按病灶体积大小以分层随机法分成:模型组;与阿拉瑞林组在同等条件下饲养4周,不做任何处理;阿拉瑞林组:阿拉瑞林30 μg/kg,每天注射1次共4周。

1.3.2 阿拉瑞林对异位病灶的作用 剖腹测量处理前后异位内膜体积变化($V=l \cdot b \cdot h$),观察光镜和电镜下异位内膜的形态结构改变。

1.3.3 正位与异位内膜的ER、PR测定 采用抗ER、PR单克隆抗体的SP免疫组化法行正位与异位内膜的ER、PR测定;ER、PR经SP染色后,细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性细胞;以典型阳性反应细胞的出现率分别评为±(≤25%)、+(26%~50%)、++(51%~75%)、+++(>75%)4个等级;初步探讨各实验组子宫内膜受体的变化。

1.3.4 正位与异位内膜的ER表达与异位内膜抑制率的相关性分析 计算阿拉瑞林组大鼠的异位内膜抑制率,抑制率=(1 - $V_{\text{治疗后}}/V_{\text{治疗前}}$)×100%;将每只大鼠正位与异位内膜ER阳性率的±、+、++、+++4个等级,分别以数值1、2、3、4表示,与其对应的异位内膜抑制率行相关分析,分析正位与异位内膜的ER表达与异位内膜抑制率的相关性。

1.4 统计学方法

计量资料数据以均数±标准差表示,采用秩和检验与Pearson相关分析。

2 结果

2.1 对内膜异位病灶的作用

阿拉瑞林组治疗后异位病灶体积明显缩小或萎缩,与治疗前比较,经Wilcoxon秩和检验,差异有显著性($P < 0.01$)。而模型组大鼠处理前后,异位病灶体积变化无显著性差异,见表1。阿拉瑞林组囊肿光镜下内膜呈增生早期改变,内膜极薄,内膜上皮呈低立方或扁平状,未见腺体;而模型组囊肿内膜呈增殖早期至分泌中期改变,内膜上皮柱状或立方状,部分可见到核下空泡和顶浆分泌,个别可见到假腺体改变;两组大鼠囊肿间质均极其致密,间质细胞小而稀疏。电镜下阿拉瑞林组内膜上皮细胞分泌颗粒数量明显减少、线粒体数量下降;而模型组内膜上皮细胞分泌颗粒丰富,细胞器、细胞核形态正常。

表1 阿拉瑞林组与模型组处理前后异位病灶生长情况比较
Table 1 The growth of the ectopia cyst after treatment ($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Before treatment (mm ³)	After treatment (mm ³)
Model	12	125±101	73±51
Alarelin	15	163±121	28±22 ¹⁾

1) vs before treatment, $P < 0.01$

2.2 异位与正位内膜的ER、PR测定

表2~表5显示:经成组设计的2个样本比较的秩和检验,阿拉瑞林使正位子宫内膜的内膜上皮细胞、间质细胞和腺体上皮细胞的ER较模型对照组明显下降($P < 0.05$),而对异位子宫内膜的ER、正位与异位子宫内膜的PR的影响无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 阿拉瑞林组正位与异位内膜的ER表达与异位内膜抑制率的相关分析

阿拉瑞林组异位内膜抑制率为(68±44)%,正位子宫内膜上皮细胞的ER与异位内膜抑制率呈一定的负相关($r = -0.407$, $P < 0.05$);而正位子宫内膜间质细胞和腺体上皮细胞的ER,异位子宫内膜的内膜上皮细胞和间质细胞的ER的表达与异位内膜抑制率则未表现出相关性($P > 0.05$)。

表2 阿拉瑞林治疗4周对SD大鼠正位子宫内膜ER的影响

Table 2 The effect of alarelin on the ER of entopic endometrium in rats

Group	n	Endometrium epithelial cells(n)				Stroma cells(n)				Glandular epithelial cells(n)			
		±	+	++	+++	±	+	++	+++	±	+	++	+++
Model	12	5	3	2	2	4	2	4	2	5	3	3	1
Alarelin	15	12	2	1		10	3	2		12	2	1	

vs model group, $P < 0.05$

表3 阿拉瑞林治疗4周对SD大鼠正位子宫内膜PR的影响

Table 3 The effect of alarelin on the PR of entopic endometrium in rats

Group	n	Endometrium epithelial cells(n)				Stroma cells(n)				Glandular epithelial cells(n)			
		±	+	++	+++	±	+	++	+++	±	+	++	+++
Model	12	5	3	2	2	2	4	5	1	4	2	5	1
Alarelin	15	7	5	1	2	2	4	7	2	5	6	2	2

vs model group, $P > 0.05$

表4 阿拉瑞林治疗4周对SD大鼠异位子宫内膜ER的影响

Table 4 The effect of alarelin on the ER of ectopia endometrium in rats

Group	n	Endometrium epithelial cells(n)				Stroma cells(n)			
		±	+	++	+++	±	+	++	+++
Model	12	7	2	2	1	6	3	3	
Alarelin	15	9	3	3		10	3	1	1

vs model group, $P > 0.05$

表5 阿拉瑞林治疗4周对SD大鼠异位子宫内膜PR的影响

Table 5 The effect of alarelin on the PR of ectopia endometrium in rats

Group	n	Endometrium epithelial cells(n)				Stroma cells(n)			
		±	+	++	+++	±	+	++	+++
Model	12	3	3	2	4	6	5	1	
Alarelin	15	6	6	2	1	7	7	1	

vs model group, $P > 0.05$

3 讨论

3.1 大鼠内异症模型建立的可靠性探讨

试验采用SD大鼠为实验对象,主要考虑到:大鼠是周期性自发排卵动物,性周期短且规则、适于对甾体类激素药物的研究;其在遗传学分类上属于封闭群,具有杂合性,较接近于自然状态下的动物群体结构,有类似于人类群体遗传异质性的遗传组成,因此在药理学研究方面起着不可替代的作用。试验对42只大鼠以自体内膜手术移植法行建模,有27只大鼠出现生长良好的囊肿,建模成功率65%;病检示囊肿内壁有存活的内膜上皮细胞生

长,可见核下空泡、分泌活动和脱落现象,与Rajkumar等^[2]实验结果一致,表明该模型基本可靠。

3.2 阿拉瑞林对SD大鼠正位与异位子宫内膜雌、孕激素受体的影响

研究发现大鼠应用阿拉瑞林后正位子宫内膜生长受到抑制、萎缩退化,表明大鼠的卵巢功能低下;且异位病灶体积明显缩小甚至萎缩,组织学也显示异位病灶内膜上皮细胞分泌颗粒数量明显减少、线粒体数量下降,提示阿拉瑞林使异位内膜细胞功能及代谢降低。模型组异位病灶体积也有一定的缩小趋势,但与处理前比较差异无显著性,实验中也观察到模型组内个别大鼠的异位病灶体积

缩小甚至萎缩,这与文献报道的个别无症状内膜异位症患者未经治疗而发现异位病灶缩小甚至消失的情况相一致,提示异位内膜有一定的自然消退率。

对于ER、PR与子宫内膜异位症的关系。较早的研究认为:子宫内膜异位症是一种性激素依赖性疾病,异位内膜的内膜上皮细胞、间质细胞中有ER、PR的阳性细胞存在,理论上可选用抑制ER、PR的药物,使异位内膜组织的超微结构改变,达到抑制生长的目的;目前这一观点仍为较多的学者所认同。然而近来的一些研究则发现:异位子宫内膜细胞的ER不随月经周期变化,并且功能异常,无与雌激素结合者,雌激素不是通过与异位内膜的ER结合来促进增殖。Lessay等^[3]研究了内异症患者正位和异位子宫内膜ER和PR的表达,结果发现子宫内膜有典型的性激素调节后的周期性变化,但异位的内膜却无此变化;Brandenberger^[4]和Matsuzaki等^[5]则发现内异症患者正位与异位内膜中的ER- α 和ER- β 亚型的相对比例有显著的不同,作者认为ER配基的特异性和生物反应性的不同导致正位与异位内膜生长反应性的不同;Fujimoto等^[6]也认为ER- α 在内异症囊肿中的表达相对的降低,且其与雌激素相互作用的环节受到损害,以至其对内分泌激素不起反应,而ER- β 可能依赖于不同的激素效应起作用并广泛分布于内异症囊肿中;他还发现子宫内膜异位症异位内膜的ER基因中有20%发生融合,导致异位内膜中ER变异体ERE5SV的产生,这种变异体失去了与E₂结合的能力;这与Georgiou等^[7]认为的ER等位基因的变异与子宫内膜异位症病因有关的观点相似。Misao等^[8]则研究了卵巢子宫内膜异位症患者孕激素受体A表型(PR-A)和B表型(PR-B)mRNA的表达,发现异位内膜中PR-B mRNA的表达强度较正位内膜明显增高,他们认为PR-B mRNA表达的增高导致孕激素甚至其它甾体激素对异位内膜生长调节机制的改变。

本研究发现阿拉瑞林使大鼠正位子宫内膜的ER明显下降,且正位子宫内膜上皮细胞的ER表达与异位内膜抑制率呈一定的负相关。表明:阿拉瑞林确能直接或间接抑制正位子宫内膜ER的表达;根据已有研究GnRH-a制剂能使血清E₂水平显著下降而达到治疗子宫内膜异位症的目的,而E₂能诱导ER的合成,故阿拉瑞林对正位子宫内膜ER的抑制可能与血清的低E₂水平有关,且ER表

达的减弱导致内膜对E₂反应的减弱,故使正位子宫内膜生长受到抑制、萎缩退化。与正位子宫内膜不同的是,研究中阿拉瑞林对异位子宫内膜ER、正位和异位内膜PR的影响无显著性差异,这提示阿拉瑞林对异位子宫内膜的抑制作用与异位内膜局部的总ER、PR可能无直接关系;说明正位和异位内膜ER、PR可能由于本身受体结构或成分的不同,而存在着不同的激素调节机制,或是对激素的敏感性不同,或是激素赖以作用的周围环境不同;这和上述的ER、PR与子宫内膜异位症关系的新观点也有一定的一致性,不过这一推测还有待进一步的研究证实,特别是对子宫内膜异位症患者ER、PR亚型的分析,有利于揭示子宫内膜异位症的发病因素并为子宫内膜异位症的治疗提供新思路。

总的来说,阿拉瑞林对子宫内膜异位症大鼠确有显著的治疗作用;其对正位子宫内膜的抑制作用可能通过ER介导;而对异位内膜的抑制作用是否与异位内膜ER、PR有直接关系,尚需深入研究;检测在位子宫内膜上皮细胞ER的表达强度对阿拉瑞林的疗效及异位病灶的预后有一定的预测作用。

参考文献:

- [1] 郑澄宇,杨冬梓,谢梅青,等.大鼠子宫内膜异位症模型的建立及其组织学观察[J].中山医科大学学报,2001,22(2):106.
- [2] Rajkumar K, Schott P W, Simpson C W, *et al*. The rat as an animal model for endometriosis to examine recurrence of ectopic endometrial tissue after regression[J]. *Fertil Steril*, 1990, 53(5): 921.
- [3] Lessay B A, Metzger D A, Haney A F, *et al*. Immunohistochemical analysis of estrogen and progesterone receptors in endometriosis: comparison with normal endometrium during the menstrual cycle and the effect of medical therapy[J]. *Fertil Steril*, 1989, 51(3): 409.
- [4] Brandenberger A W, Lebovic D I, Tee M K, *et al*. Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(7): 651.
- [5] Matsuzaki S, Fukaya T, Uehara S, *et al*. Characterization of messenger RNA expression of estrogen receptor-alpha and -beta in patients with ovarian endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(6): 1219.
- [6] Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H, *et al*. Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometriomata[J]. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(8): 742.
- [7] Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, *et al*. Association of estrogen receptor gene polymorphisms with endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 1999, 72(1): 164.
- [8] Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J, *et al*. Dominant expression of progesterone receptor form B mRNA in ovarian endometriosis[J]. *Horm Res*, 1999, 52(1): 30.

(编辑 张恩健)