

基础研究

低氧预处理对大鼠子宫内膜异位病灶形成的影响

赵军^{1,2}, 刘肖³, 李亚里¹, 谭明华¹¹解放军总医院妇产科, 北京 100039; ²海军总医院²妇产科, ³病理科, 北京 100048

摘要:目的 了解低氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)对子宫内膜异位症(EMs)大鼠模型异位病灶形成的影响,藉此进一步阐明EMs发生发展的分子机制,从而为其防治供新思路。方法 Lewis雌性大鼠随机分为两组,分别给予HPC(8% O₂)和常压常氧(21% O₂)处理8 h,随即取其子宫组织移植至正常大鼠腹壁。术后14 d记录移植灶体积,并采用ELISA、免疫组化、Western blot、RT-PCR和Tunnel法,对血清和腹腔液以及移植前子宫组织和移植病灶进行检测。结果 HPC可显著上调大鼠子宫血管内皮生长因子(VEGF) mRNA($P<0.01$),并增加其低氧诱导因子(HIF)- α ($P<0.01$)表达;与未经HPC的比较,由经HPC的子宫组织所形成的移植病灶体积显著增大($P<0.01$),组织细胞凋亡率减少($P<0.01$),VEGF mRNA上调($P<0.01$),HIF- α ($P<0.01$)、VEGF($P<0.05$)、CD31($P<0.01$)、Ki67($P<0.01$)及Bcl-2($P<0.05$)表达均明显增加;且移植了经HPC子宫组织的大鼠血清及腹腔积液VEGF含量也明显增加($P<0.01$)。结论 HPC可通过激活HIF-1 α /VEGF体系,促进移植病灶内血管生成;并通过上调Bcl-2抑制凋亡因子表达,抑制移植病灶组织细胞凋亡,并促进其增殖,从而促进移植病灶的生长。基于此,我们推测对于EMs高风险对象或复发患者而言,避免其在位内膜组织反复接受低氧刺激,以及内膜组织脱落前即人为干预抑制HIFs/VEGF体系活化,有望成为控制EMs发生发展的措施之一。

关键词:子宫内膜异位症;低氧;大鼠;血管内皮生长因子;凋亡

Effect of hypobaric hypoxic preconditioning on surgically induced endometriosis by allotransplant of uterine tissue in rats

ZHAO Jun^{1,2}, LIU Xiao³, LI Yali¹, TANG Minghua¹¹Department of Gynecology and Obstetrics, General Hospital of PLA, Beijing 100039, China; ²Department of Gynecology and Obstetrics, ³Department of Pathology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Abstract: Objective To determine the effects of hypobaric hypoxia pretreatment on surgically induced endometriosis in rats. **Methods** Six rats were randomized into 2 groups and exposed to hypoxia (8% O₂) and normoxia (21% O₂) for 8 h. The uterine endometrium was intraperitoneally implanted into estrogen-treated ovariectomized Lewis rat, and the growth and quality of the implants were measured. The changes in apoptosis, protein and gene expressions in the serum, abdominis effusion fluids and implants were tested by ELISA, immunohistochemical staining, TUNNEL assay, Western blotting and RT-PCR. **Results** The volume of the implants in the hypoxic pretreatment group was significantly increased compared with the normoxia group. High expressions of Ki67, CD31, VEGF, and HIF-1 α and lowered cell apoptosis were found in the hypoxia-pretreated implants compared with the normoxic group. VEGF level in the serum and peritoneal fluid were increased in hypoxia-pretreated group, but TNF α level was comparable between the 2 groups. **Conclusion** Hypoxia play an important role in the occurrence and progression of endometriosis by increasing cell proliferation and angiogenesis and decreasing cell apoptosis in the implants in the rat model.

Key words: endometriosis; hypoxia; rats; vascular endothelial growth factor; apoptosis

子宫内膜异位症(EMs)指子宫内膜上皮和间质在宫腔以外的部位生长,所引起的疾病。EMs是育龄女性常见病之一,可导致月经紊乱、痛经、性交疼痛及不孕,甚至有可能发生恶变,严重影响了女性的生活质量^[27]。目前,EMs的确切病因及发病机制尚未完全明确。由于EMs属雌激素依赖性疾病,现有的治疗方法主要通过药

物阻断雌激素供给而使病灶萎缩,或通过手术彻底清除病灶。但停药后EMs往往复发迅速,术后2年复发率甚至高达40%^[25],可见现有的以EMs病灶为靶点的治疗方法有效性不高、费用高且副作用大。因此亟待通过进一步对EMs发病机制的研究,以寻求新的治疗思路。

近年来有研究提出“在位内膜决定论”^[1],认为EMs患者的在位内膜与正常女性的在位内膜存在本质不同,其脱落后具有更强的生存、增殖能力,从而更易形成异位病灶,因此EMs的启动部位应该是子宫。相关的动物研究由此展开,越来越多的研究结果证实,在位的

收稿日期:2016-07-02

作者简介:赵军,博士研究生,E-mail: dj3256@163.com

通信作者:李亚里,教授,电话:010-66957550,E-mail: weizhao3256@sina.com

子宫内膜经缺氧刺激后,其生理功能会发生一定改变,当其随月经脱落并逆流入盆腔后,更能适应盆腔的缺氧环境,从而更易存活、异位粘附和种植,并形成异位病灶^[2-5]。

低氧预处理(hypoxic preconditioning, HPC)指在组织细胞面临致死性低氧前,先给予数小时或数天的非致死性低氧处理,使细胞获得低氧保护性机制以抵抗致死性应激,这一方法最初应用于心肌缺血再灌注的研究,由于HPC对细胞的保护作用具有普遍性,故而逐步扩展到神经保护及其它领域的研究^[6-9]。目前关于HPC对在位子宫内膜影响的研究则较为罕见,且在大部分相关实验研究中^[2-4],移植与移植受体多为非同种属动物,而经手术切除获得的EMs患者内膜组织也已失去血供,无法准确反映其正常生理状态。为此,本研究将通过EMs同种异体移植动物模型,了解HPC对在位内膜及异位病灶形成的影响,进一步明确低氧与EMs发生的关联并初步探讨其分子机制,从而为EMs的治疗提供实验依据和新思路。

1 材料和方法

1.1 动物分组

8~10周龄雌性Lewis大鼠30只,体质量 208 ± 19 g,购自并饲养于解放军总医院动物中心。室内12 h昼夜交替,室温 24°C ,相对湿度40%~60%,大鼠可自由进食水。本实验设计已通过解放军总医院动物中心伦理委员会审核。

大鼠以3%戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉后切除双侧卵巢,每日肌肉注射苯甲酸雌二醇(0.2 mg/kg) (天津金耀)直至实验结束。术后14 d,动物随机分为4组,其中常氧预处理组(Pre-Con)和低氧处理组(Pre-HPC)每组3只动物,常氧移植组(Con)和低氧移植组(HPC)每组12只动物。

1.2 低氧预处理

动物实验用低氧舱由解放军总医院动物中心提供,将Pre-HPC组大鼠置于舱中,舱内温度 23°C ,湿度50%;逐渐调节舱内压力,使舱内氧含量为6%~8%(相当于海拔6000 m),持续8 h。Pre-Con组大鼠置于同样温湿度的常氧环境内8 h。

1.3 EMs动物模型建立

Pre-Con组大鼠麻醉后,取出双侧子宫角,置于盛有DMEM(Gibco, USA)和青链霉素混合液(索莱宝,中国)的培养皿中,将子宫角完全剖开,并剪成内膜面积约 $5\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ 的组织块。Con组大鼠麻醉后,在下腹中部纵向切开皮肤约2 cm,逐层进入腹腔,分别于切口两侧腹壁表面,距切口2 cm处,以3-0丝线1针缝合上述子宫组织块1块,并使子宫内膜面贴合腹腔壁表面,常规

缝合术口。Pre-HPC组大鼠子宫角组织参照上述方法移植入HPC组大鼠腹腔。术后各组大鼠连续3 d注射青霉素钠(5U/只 , i.m.)抗感染。

术后观察见大鼠术口均无异常,精神状态好、活动灵活、进食水正常。

1.4 样本采集

Pre-Con、Pre-HPC组用于移植后剩余的子宫组织 -80°C 冻存待用。Con及HPC组大鼠,在移植手术完成后14 d,常规麻醉,切开腹壁充分暴露移植病灶,以游标卡尺测量病灶最长及最短直径;随后切除病灶,一半置于4%中性多聚甲醛,用于制作石蜡切片,另一半以生理盐水冲洗后, -80°C 冻存待用;腹主动脉取血并留取腹腔积液, 2000 r/min 离心3 min,取上清 -80°C 冻存待用。

1.5 ELISA法检测大鼠血清和腹水血管内皮生长因子(VEGF)、TNF- α 含量,以及移植病灶Bcl-2、Bax含量

将冻存的血清及腹水以生理盐水10倍稀释作为待测样本;将冻存的移植前子宫组织及移植病灶组织称重后置于生理盐水中,以超声仪(XO-1200,先欧科技, China)充分裂解为5%的组织悬液, 2000 r/min 离心3 min,取上清作为待测样本。参照Elisa试剂盒(上海哈灵生物, China)说明书,依次加样、孵育及显色后,上酶标仪(Model550, BIO-RAD, USA)在450 nm处检测各孔吸光值,根据标准孔浓度及吸光值,绘制标准曲线,随后计算出各样本对应浓度。

1.6 免疫组织化学法检测移植病灶CK18、SMA、CD31、VEGF、Ki67表达

移植病灶行常规石蜡制片,切片脱蜡至水,经EDTA(pH9.0)微波修复后,以3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶10 min,3% BSA室温封闭30 min,一抗(CK18 SMA VEGF, 谷歌生物, China. CD31, Santa Cruz, USA. Ki67, abcam, USA.) 4°C 孵育过夜,PBS浸洗,二抗(DAKO, Denmark)室温孵育60 min,PBS浸洗,DAB(索莱宝, China)显色,苏木素复染后常规脱水、透明、封片,光镜下观察。

Ki67染色切片在 $400\times$ 光镜下随机取6个含有上皮组织的视野拍照,计数所有视野中上皮细胞总数及阳性细胞数,计算得到每张切片的阳性细胞百分比。VEGF染色切片在 $200\times$ 光镜下随机取3个视野拍照,图像采用CMIAS软件(Beijing University of Aeronautics and Astronautics, China)进行分析,得到每个视野中对应抗原表达的面密度并求出均值。

1.7 Tunnel法检测移植病灶组织细胞凋亡

移植病灶石蜡切片脱蜡至水,参照Tunnel检测试剂盒(索莱宝,中国)说明书,切片依次以2%过氧化氢浸泡10 min, $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 蛋白酶K浸泡15 min,PBS浸洗,TdT酶缓冲液浸泡10 min,滴加TdT酶反应液 37°C 孵

育1 h,反应终止液浸泡5 min,PBS浸洗,Streptavidin-HRP室温孵育30 min,PBS浸洗,DAB显色,常规脱水、透明、封片,光镜下观察。每张切片在200×光镜下随机取3个视野拍照,图像采用CMIAS软件进行分析,得到每个视野的面密度并求出均值。

1.8 Western blotting 检测原位子宫和移植病灶中 VEGF、HIF-1 α 表达

常规提取移植前子宫组织及移植病灶组织总蛋白,采用BCA法(碧云天)蛋白定量,以4×上样缓冲液稀释(碧云天)后95℃热变性15 min后作为样本。样本上样量50 μ g,12% SDS-PAGE电泳,转PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,TBS-T浸洗,以HIF-1 α 、VEGF、 β -actin(谷歌生物,Chian)一抗4℃孵育过夜,TBS-T浸洗,以HRP标记的二抗(Bioworld, USA)室温孵育1 h,TBS-T浸洗,ECL发光液显色(Bioworld, USA),随后以凝胶扫描成像及图像分析系统(SCA/fluorCho, Alpha Inotech, USA)观察拍照,并对结果进行图像分析。

1.9 RT-PCR 检测原位子宫和移植病灶 VEGF mRNA 表达

移植前子宫组织及移植病灶组织经液氮充分碾磨后,加入Trizol reagent(Invitrogen, USA)常规提取RNA。引物信息为:VEGF-forward 5'-ACCATGAAC TTTCTGCTC-3'; VEGF-reverse 5'-GGACGGCTTGA AGATATA-3'; β -actin-forward 5'-GGAGATTACTGC CCTGGCTCCTA-3'; β -actin-reverse 5'-GACTCATCG

TACTCCTGCTTGCTG-3'。随后配置A液:样本RNA 9 μ L,加入Random primer 1 μ L,70℃金属浴5 min,立即0℃冷却5 min;B液:采用GoScript Reverse Transcription system(Promega, USA),参照说明书,配制10 μ L Reverse Transcription mix;混合A、B液,25℃退火5 min,42℃延伸1 min,70℃灭活逆转录酶5 min,完成cDNA合成。随后采用SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)配制反应体系,设定仪器7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) 40个PCR循环(95℃ 15 s, 60℃ 1 min)进行扩增,并读取各样本目的基因和内参基因的Ct值,随后计算出目的基因相对表达量,每个样本进行3个复孔实验,取均值作为该样本目的基因表达量。

1.10 统计学分析

数据以均数±标准差表示,采用SPSS17.0软进行单因素及两因素方差分析,以 $P<0.05$ 认为差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 HPC可增加大鼠血清及腹腔液中 VEGF 含量

统计结果显示,HPC组大鼠的血清($n=12$, $df=1$, $F=89.320$, $P=0.000$)及腹腔液($n=12$, $df=1$, $F=4.964$, $P=0.036$)中VEGF含量均显著高于Con组;但血清($n=12$, $df=1$, $F=0.142$, $P=0.710$)及腹腔液($n=12$, $df=1$, $F=0.001$, $P=0.971$)TNF- α 含量未见改变(图1)。

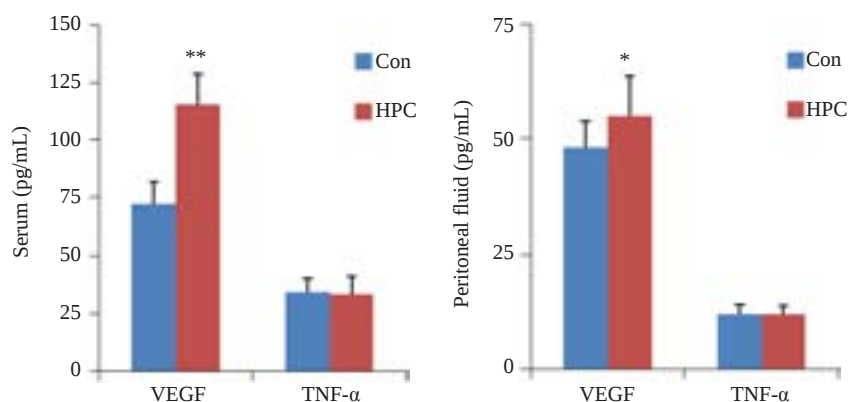


图1 HPC对大鼠血清及腹腔液中 VEGF 和 TNF α 含量的影响

Fig.1 Changes of VEGF and TNF- α levels in serum and peritoneal fluid after hypoxia pretreatment. vs Con, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, $n=12$.

2.2 移植病灶具有与 EMs 一致的形态结构及生理表现

移植术后14 d,大鼠腹腔移植处均形成单个囊泡状病灶,囊泡基底及表面均可见血管形成,内含清亮液体。免疫组化CK18、SMA、CD31染色结果显示(图2),病灶囊壁内表面为一层子宫内膜腺样上皮(CK18+++),

囊壁及基底组织内可见大量血管(CD31+++及平滑肌组织(SMA+++))分布;囊腔内可见炎性细胞。上述移植病灶组织形态结构符合EMs病变,提示建模成功。

2.3 HPC可增加移植病灶体积

根据测量所得病灶最短和最长直径,应用公式:体

积(mm^3)= $\pi/4 \times a^2 \times b$ (a 为病灶最短直径, b 为最大直径),计算出病灶体积。单因素方差分析结果显示,HPC组移

植病灶体积较Con组显著增大($n=12$, $df=1$, $F=8.404$, $P=0.008$,图2)。

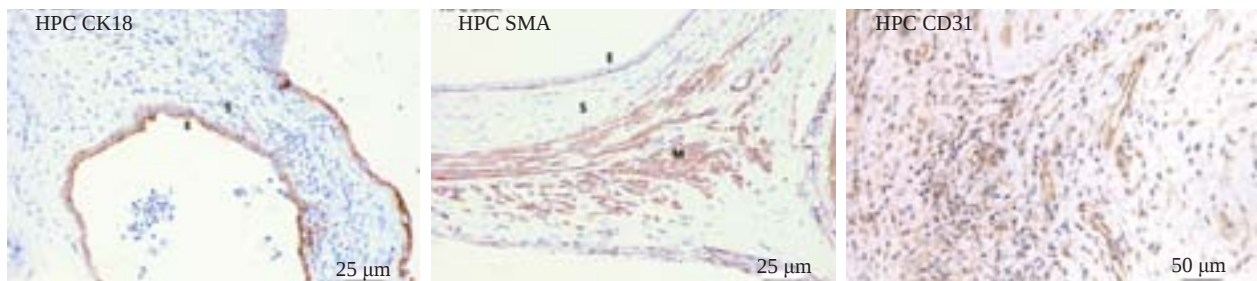


图2 大鼠移植病灶免疫组化鉴定

Fig.2 Immunohistochemical staining of CK18, SMA and CD31 in endometriotic implants. The lesions show a dilated endometrial glands surrounded by stroma. E: Endometrial gland; S: Endometrial stroma; M: Muscle.

2.4 HPC可增加大鼠移植病灶VEGF、Ki67表达

免疫组化染色结果显示,HPC组病灶囊壁及基底组织大量血管内皮增生,VEGF呈强阳性(+++)表达,上皮Ki67阳性细胞率约为25%;Con组病灶也可见新生血管形成,但VEGF阳性程度较弱(++),上皮Ki67阳性细胞率约为10%(图3、4)。图像分析及单因素方差分析

结果显示,HPC组病灶VEGF($n=12$, $df=1$, $F=5.539$, $P=0.028$)、CD31($n=12$, $df=1$, $F=10.175$, $P=0.004$)表达均较Con组显著增强,其上皮Ki67阳性细胞数量也显著多于Con组($n=12$, $df=1$, $F=59.831$, $P=0.000$)。以上结果提示,HPC有可能通过促进移植病灶组织血管生成及细胞增殖,从而促进移植病灶的生长。

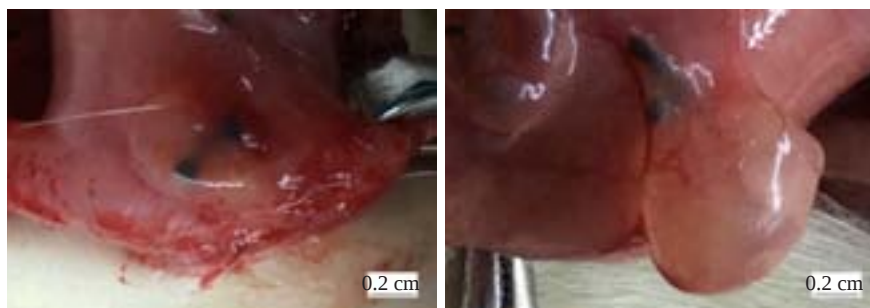
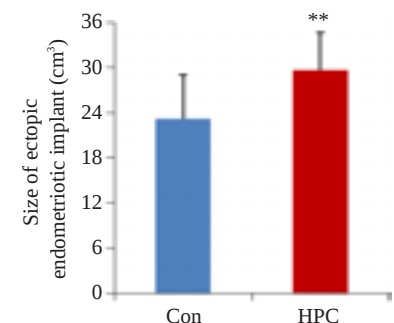


图3 HPC对移植病灶体积的影响

Fig.3 Changes of the volume of ectopic endometriotic implant after hypoxia pretreatment. ** $P<0.01$, $n=12$.



2.5 HPC可减少移植病灶细胞凋亡发生

Tunnel检测结果显示(图5),镜下可见Con组病灶约10~15%细胞发生凋亡,HPC组凋亡细胞较Con组少。单因素方差分析结果显示,HPC组移植病灶Tunnel染色切片面密度显著低于Con组($n=12$, $df=1$, $F=47.000$, $P=0.000$)。

ELISA检测结果显示(图5),HPC组移植病灶Bcl-2表达较Con组显著上调($n=12$, $df=1$, $F=5.778$, $P=0.025$),此外尽管二者Bax表达无显著差异($n=12$, $df=1$, $F=3.246$, $P=0.085$),但HPC组Bcl-2/Bax比值较Con组显著增加($n=12$, $df=1$, $F=7.832$, $P=0.010$)。以上结果提示,HPC有可能通过上调抑凋亡因子Bcl-2表达,

从而减少移植病灶组织细胞凋亡发生。

2.6 HPC可上调原位和异位内膜及其间质组织中VEGF mRNA表达,并增加低氧诱导因子(HIF)-1 α 、VEGF表达

检测结果显示(图6),经HPC 8 h后,大鼠子宫组织HIF-1 α 表达显著增高($n=12$, $df=1$, $F=47.107$, $P=0.002$),同时VEGF mRNA显著上调($n=12$, $df=1$, $F=12.812$, $P=0.023$),但VEGF表达未见显著变($n=12$, $df=1$, $F=12.812$, $P=0.097$);移植术14 d后,与由移植未经HPC子宫组织形成的移植病灶比较,由HPC组织形成的移植病灶组织中VEGF mRNA显著上调($n=12$, $df=1$, $F=10.136$, $P=0.004$),且VEGF($n=12$, $df=1$, $F=$

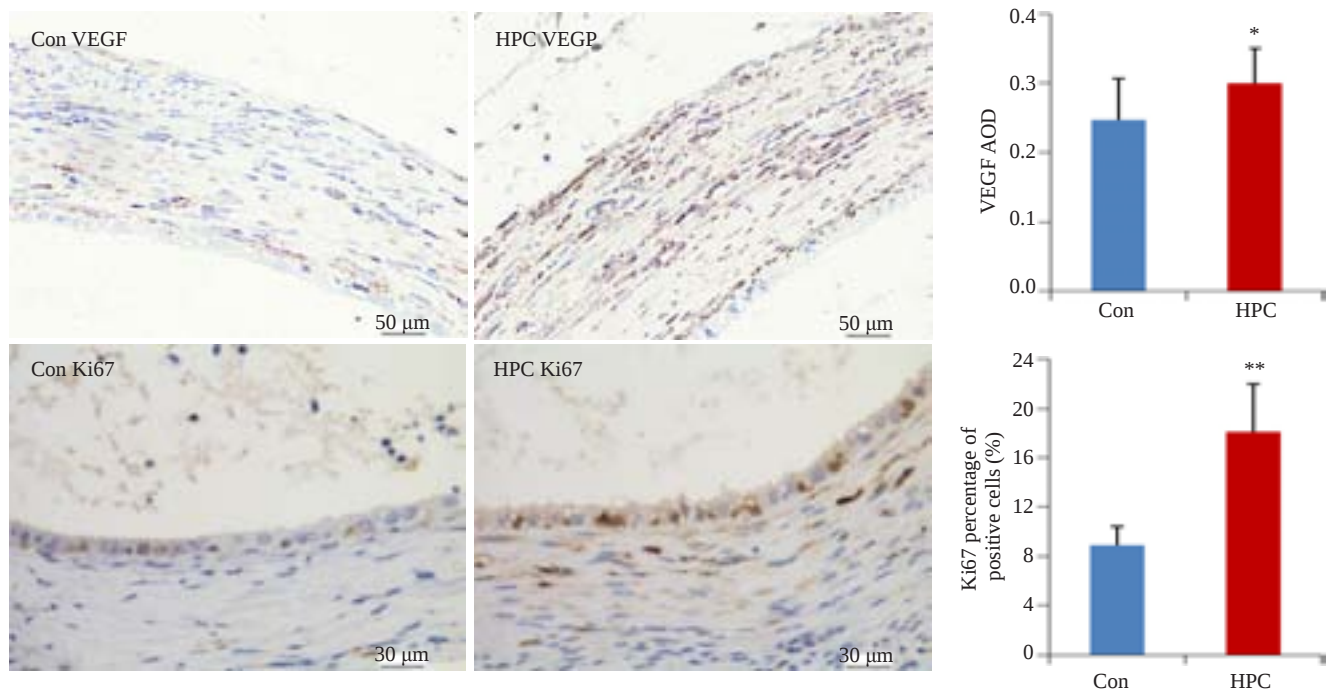


图4 HPC对移植病灶VEGF、Ki67表达的影响

Fig.4 VEGF and Ki67 expression of ectopic endometriotic implant after hypoxia pretreatment. vs Con, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, $n=12$.

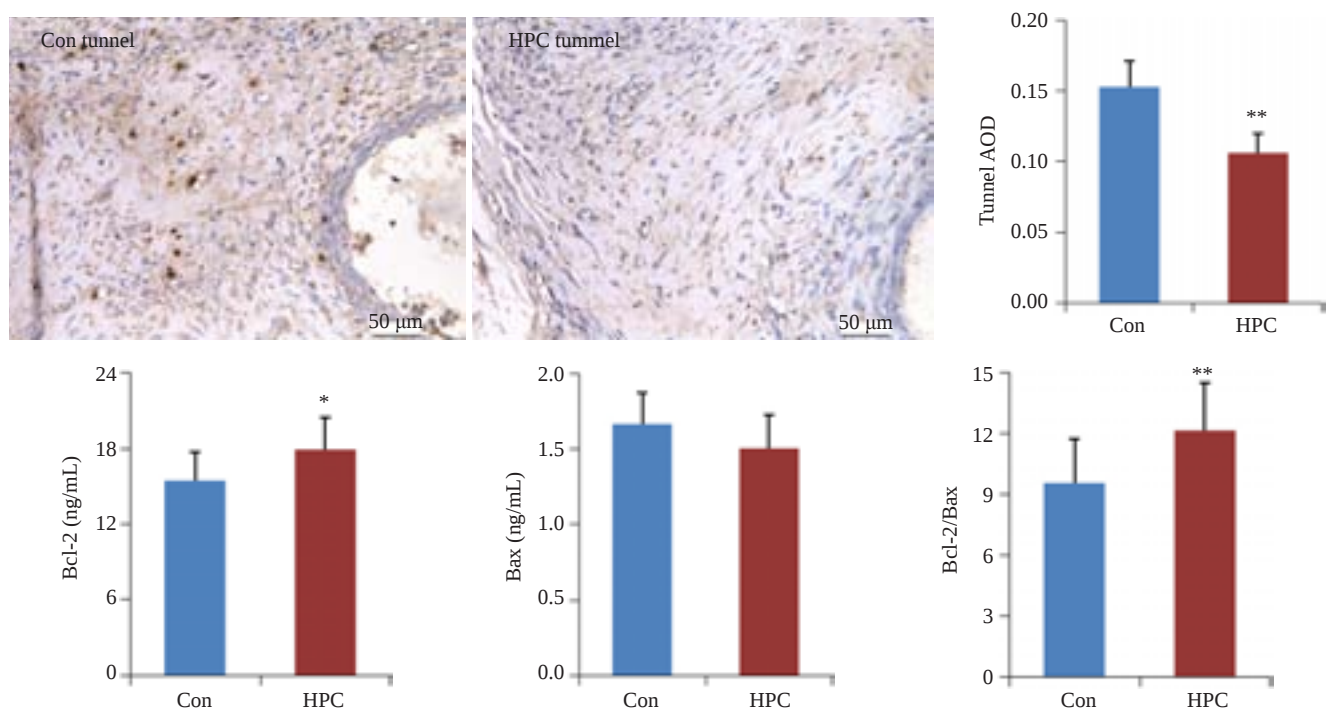


图5 HPC对移植病灶组织细胞凋亡及凋亡相关因子表达的影响

Fig.5 The VEGF, CD31, Ki67 expression of ectopic endometriotic implant after hypoxia pretreatment. vs Con, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, $n=12$.

52.817, $P=0.000$)、HIF-1 α ($n=12$, $df=1$, $F=96.674$, $P=0.000$)表达均显著增加。

进一步的两因素方差分析结果提示,尽管HPC与移植术两因素间未见显著相互作用,但对原位和异位内

膜及其间质组织而言,HPC均可显著上调其中VEGF mRNA($df=1$, $F=11.968$, $P=0.002$),并增加HIF-1 α ($df=1$, $F=75.197$, $P=0.000$)、VEGF($df=1$, $F=30.368$, $P=0.000$)表达。此外,对无论是否经HPC的子宫内膜及其

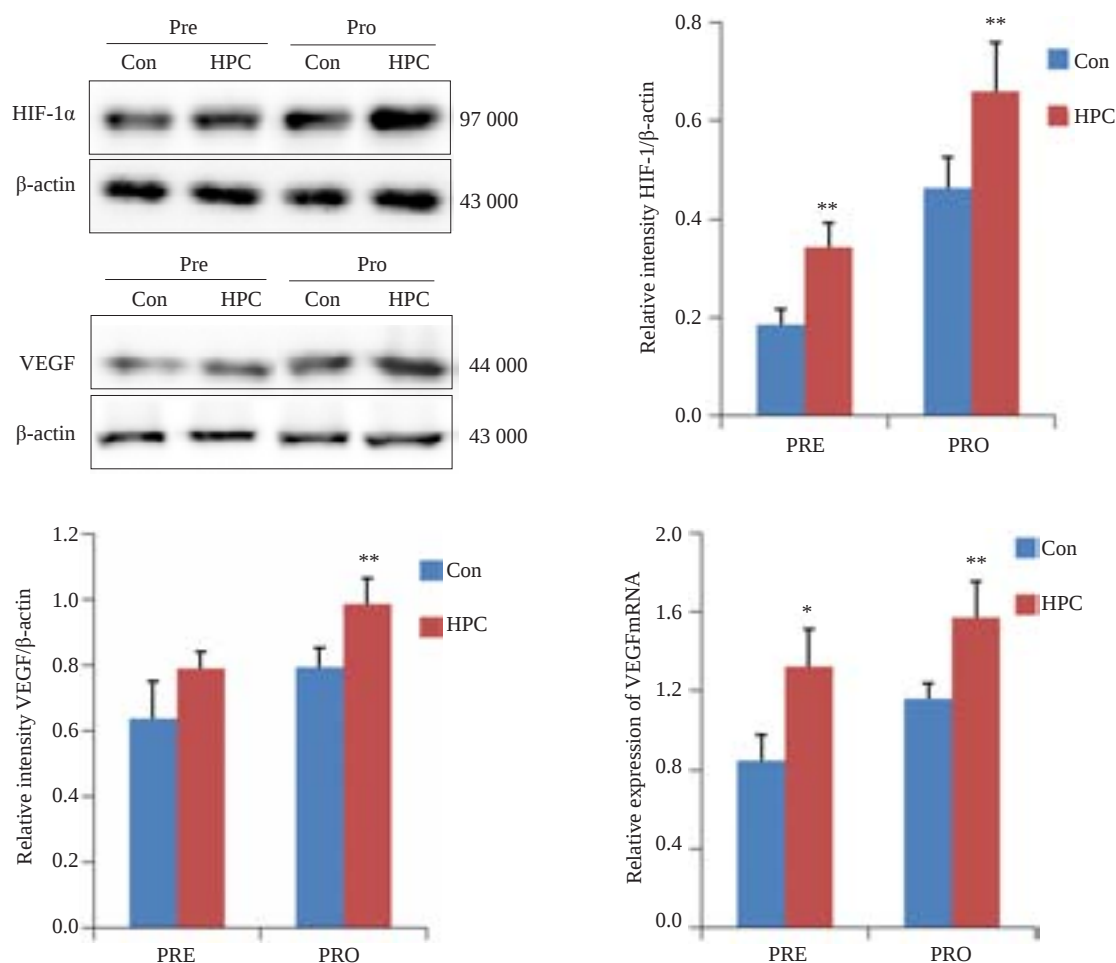


图6 HPC对大鼠子宫和移植病灶HIF-1α、VEGF及VEGFmRNA表达的影响

Fig.6 VEGF, VEGF mRNA and HIF-1α expression in ectopic endometriotic implant of pre-transplantation and pro-transplantation. vs Con, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, before hypoxia pretreatment $n=3$, after hypoxia pretreatment $n=12$.

间质组织而言,由其形成的移植病灶VEGF mRNA($df=1$, $F=30.381$, $P=0.000$)、VEGF ($df=1$, $F=28.623$, $P=0.000$)、HIF-1α($df=1$, $F=26.542$, $P=0.000$)表达均较原位组织显著上调。

3 讨论

啮齿类动物易于管理且便于手术操作,是构建EMs模型的常用动物。基于子宫内膜同种异体移植的需要,本实验选用可耐受多次手术操作及异体移植的Lewis大鼠。正常雌鼠动情周期约4~5 d,部分血清指标及子宫内膜均呈一定周期性规律改变^[26]。为避免动情周期所造成的实验误差,本实验首先将所有大鼠予以去势术及人为雌激素干预处理,恢复14 d后,再次进行移植手术,并于移植术后14 d进行相关检测。两次术后,大鼠均活动自如、饮食正常,无感染或死亡。经免疫组化鉴定,移植灶具有与EMs病变形态结构及生理表现相符合的子宫内膜上皮及间质,该结果提示建模成功。

众所周知,不同强度和持续时间刺激可使细胞发生不同的应激反应。对于体细胞而言,严重低氧会刺激线

粒体发出凋亡信号,直接导致细胞死亡。研究发现,抗凋亡因子Bcl-2在分泌晚期子宫内膜腺上皮中基本不表达^[20];而月经期脱落的子宫内膜中,大部分细胞已分化为成熟的体细胞,失去子宫血液供应并处于严重缺氧状态。因此,生理状态下,脱落的内膜组织细胞已启动凋亡程序,进入腹腔后发生死亡,随后被腹腔免疫细胞清除,不会再生并形成异位病灶。但与严重缺氧不同的是,短暂、轻度的非致死性的低氧刺激,则可诱发细胞的适应性低氧反应。近年来越来越多的研究证实,EMs发生发展与低氧刺激关系密切^[2-4],有研究报道经HPC的EMs患者子宫内膜组织,移植至重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠皮下,术后病灶体积较未经HPC的显著增大。本实验证实,与未经HPC的比较,经HPC的子宫组织移植后,形成的移植病灶体积更大、表面新生血管更多。

HIFs是细胞应对低氧应激的主要调节因子之一^[10]。研究发现,在低于静脉氧分压(40 mmHg或<6% O₂)时,细胞往往将启动由HIF-1α所操控的一系列低氧反应^[15]。HIF-1α可直接或间接的诱导包括VEGF在内的多种促血管生成因子表达,最终促进血管生成^[16-18]。

本研究发现,大鼠经HPC 8 h,原位子宫组织中HIF-1 α 表达即显著增加,这一改变延续至原位组织被移植入正常大鼠腹腔并形成EMs病灶。该结果提示,短期HPC即可激活HIF-1 α ,HIF-1 α 的活化应为HPC影响EMs发生发展的上游机制。

VEGF具有强大的促内皮增殖作用,是促血管生成的主导因素。研究发现EMs患者血清及腹腔液中VEGF含量均较正常显著升高^[19];与正常在位内膜比较,EMs病灶VEGF表达显著增多,且早期病灶较晚期病灶更为丰富^[27]。以上提示VEGF表达水平可直接影响EMs的发生发展。本研究发现,经HPC 8 h,尽管大鼠子宫组织VEGF表达未见著变,但其mRNA显著上调,提示短期HPC即可激活VEGF基因转录。移植术后14 d,与未经HPC的比较,由经HPC的子宫组织形成的移植病灶VEGF mRNA依然显著上调,VEGF表达也显著增加;且HPC组大鼠的血清和腹腔液VEGF含量显著高于Con组。以上结果提示VEGF在HPC影响EMs发生发展中起重要作用。

研究证实,轻度低氧还可诱导VEGF之外多种其它因子表达的改变^[12]。有研究发现,HPC可通过减少体外培养细胞促凋亡因子Bax、Bad和Bid表达,同时增加其抗凋亡因子Bcl-2和Bcl-xL表达^[21],从而抑制细胞凋亡,增加其对致死性低氧应激的耐受,并增强其存活能力^[11]。本研究发现,与未经HPC的比较,由经HPC后的子宫组织所形成的移植病灶组织Bcl-2表达及Bcl-2/Bax值均显著增加,同时细胞凋亡发生率明显降低。由于Bcl-2和Bax是作用相互对立的一对因子,一般认为Bcl-2/Bax比值增大提示细胞抗凋亡能力增强^[28]。由此可见,HPC可通过上调Bcl-2表达,增强细胞抗凋亡能力,从而参与其对EMs发生和发展的影响。

Ki67是应用最广泛的细胞增殖标记物,当细胞增殖旺盛时Ki67表达显著增加。在正常子宫内膜及EMs患者在位内膜中,上皮Ki67表达均随月经周期发生改变,增生期高于分泌期;在EMs患者异位内膜上皮中Ki67则持续表达^[29]。本研究尚发现由经HPC后的子宫组织所形成的移植病灶上皮组织内,Ki67阳性细胞数量明显增多。该结果提示,HPC尚可促进移植病灶上皮细胞增殖。

TNF- α 由被内毒素激活的巨噬细胞产生,是机体免疫、炎症反应、凋亡等细胞生理功能的调节因子之一。在正常子宫内膜中,TNF- α 表达受雌、孕激素的调节。研究发现,TNF- α 基因多样性与EMs发生存在关联^[24],TNF- α 还可通过促进细胞增殖、炎细胞浸润、血管新生和组织粘连等,而参与EMs形成^[23]。有研究指出,EMs患者腹腔液中TNF- α 含量较正常女性显著增高,且TNF- α 含量与EMs的严重程度存在正相关^[22]。本实验

发现,移植术后14 d,HPC及Con两组大鼠,腹腔液及血清中TNF- α 含量无明显差异。由此可见,大鼠血清及腹腔液TNF- α 含量不受移植病灶来源组织是否经HPC影响。该结果尚提示,动物模型与真实疾病病灶的形成机理尚存在一定差异,因此动物模型尚未能完全模拟真实疾病的生理改变。

综上所述,本研究首次将HPC方法应用于在位子宫内膜同种异体移植,发现给予大鼠非致死剂量的HPC,可以使其子宫组织获得低氧保护性效应,HPC一方面可通过激活HIF-1 α /VEGF体系,使子宫组织分泌促血管生成因子,进而促进移植病灶内血管生成,增加病灶血供;另一方面还可通过上调Bcl-2抑制凋亡因子表达,抑制其凋亡,并促进其增殖;最终促进移植病灶的生长。

本研究为进一步明确EMs的发生机制及其治疗提供了一定实验依据。基于此,我们推测对于EMs高风险对象或复发患者而言,避免其在位子宫内膜组织反复接受低氧刺激,以及如何在其脱落前即人为干预抑制HIFs/VEGF体系活化,有望成为控制EMs发生发展的措施。

参考文献:

- [1] Brosens I, Brosens JJ, Benagiano G. The eutopic endometrium in endometriosis: are the changes of clinical significance [J]. *Reprod Biomed Online*, 2012, 24(5): 496-502.
- [2] Xu TX, Zhao SZ, Dong M, et al. Hypoxia responsive miR-210 promotes cell survival and autophagy of endometriotic cells in hypoxia [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(3): 399-406.
- [3] Tsuzuki T, Okada H, Shindoh H, et al. Effects of the hypoxia-inducible factor-1 inhibitor echinomycin on vascular endothelial growth factor production and apoptosis in human ectopic endometriotic stromal cells [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(4): 323-8.
- [4] Filippi I, Carrarelli P, Luisi S, et al. Different expression of hypoxic and angiogenic factors in human endometriotic lesions [J]. *Reprod Sci*, 2016, 23(4): 492-7.
- [5] Lu ZC, Zhang WY, Jiang SF, et al. Effect of Oxygen tensions on the proliferation and angiogenesis of endometriosis heterograft in severe combined immunodeficiency mice [J]. *Fertil Steril*, 2014, 101(2): 568-76.
- [6] Tang YL, Zhu W, Cheng M, et al. Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression [J]. *Circ Res*, 2009, 104(10): 1209-16.
- [7] Jahan A, Sybille DM. Hypoxic-preconditioning enhances regenerative capacity of neural stem/progenitors in subventricular zone of newborn Piglet brain [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 11(2): 669-86.
- [8] Hsiao ST, Dilley RJ, Gj D, et al. Ischemic preconditioning for cell-based therapy and tissue engineering [J]. *Pharmacol Ther*, 2014,

- 142(2): 141-53.
- [9] Yeh CH, Hsu SP, Yang CC, et al. Hypoxic preconditioning reinforces HIF- α -dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy[J]. *Life Sci*, 2010, 86(3/4): 115-23.
- [10] Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions[J]. *Exp Mol Med*, 2004, 36(1): 1-12.
- [11] Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, et al. Hypoxic conditioning as a new therapeutic modality[J]. *Front Pediatr*, 2015, (3): 58.
- [12] Cassavaugh J, Lounsbury KM. Hypoxia-Mediated biological control [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 735-44.
- [13] Dmitrovic R, Peter B, Cvitkovic-Kuzmic A, et al. Severity of symptoms in primary dysmenorrhea: a Doppler study [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 107(2): 191-4.
- [14] De Sanctis V, Soliman A, Bernasconi SA, et al. Primary dysmenorrhea in adolescents: prevalence, impact and recent knowledge[J]. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2015, 13(2): 512-20.
- [15] D'ignazio L, Rocha S. Hypoxia induced NF- κ B[J]. *Cells*, 2016, 5(1). pii: E10.doi: 10.3390/cells5010010.
- [16] Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: applications and therapies[J]. *Biomed Res Int*, 2015: 549412.
- [17] Sun XJ, Wei L, Chen Q, et al. CXCR4/SDF1 mediate hypoxia induced chondrosarcoma cell invasion through ERK signaling and increased MMP1 expression[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9(1): 17.
- [18] Kakudo N, Morimoto N, Ogawa T, et al. Hypoxia enhances proliferation of human Adipose-Derived stem cells via HIF-1 α activation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139890.
- [19] Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, et al. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle[J]. *Lancet*, 1994, 344(8914): 28-9.
- [20] Kianpour M, Nematbakhsh M, Ahmadi SM, et al. Serum and peritoneal fluid levels of vascular endothelial growth factor in women with endometriosis[J]. *Int J Fertil Steril*, 2013, 7(2): 96-9.
- [21] Harrison LR, Micha D, Brandenburg MA, et al. Hypoxic human cancer cells are sensitized to BH-3 mimetic-induced apoptosis via downregulation of the Bcl-2 protein Mcl-1[J]. *J Clin Investig*, 2011, 121(3): 1075-87.
- [22] Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(1): 1-10.
- [23] Yeniel AÖ, Erbas O, Ergenoglu AM, et al. Effect of oxytocin treatment on explant size, plasma and peritoneal levels of MCP-1, VEGF, TNF- α and histopathological parameters in a rat endometriosis model[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 175: 134-9.
- [24] Lyu J, Yang H, Lang JH, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and endometriosis in Asians: a systematic review and meta-analysis[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(9): 1761-7.
- [25] Greene AD, Lang SA, Kendzioriski JA, et al. Endometriosis: where are we and where are we going[J]? *Reproduction*, 2016, 152(3): R63-78.
- [26] Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging [J]. *Toxicol Pathol*, 2008, 36(3): 375-84.
- [27] Jiang Y, Jy T, Wu Y, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and the risk of endometriosis: a systematic review [J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2012, 74(4): 179-84.
- [28] Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of Life and death[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(8): 1339-50.
- [29] Jone RK, Bulmer JN, Searle RF. Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium [J]. *Hum Reprod*, 1995, 10(12): 3272.

(编辑:吴锦雅)