

GnRH-a 反加雌激素对大鼠子宫内膜异位症模型的疗效及复发的研究

张玲玉^{1,2}, 刘颖蕾¹, 乔海凤¹, 开海丽¹, 刘曼华^{1*}, 吴刘成³

(1. 南通大学第二附属医院, 江苏 南通 226001; 2. 南通市妇幼保健院, 江苏 南通 226001;
3. 南通大学实验动物中心, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 探讨 GnRH-a 反加不同剂量雌激素对子宫内膜异位症的治疗效果及对复发的影响。**方法** 将建成子宫内膜异位症模型的 51 只大鼠分为五组: 对照组 ($n = 10$), 予生理盐水 1 mg/kg 皮下注射, 共 1 次; 研究组: 反加组 I (低剂量雌激素组 $n = 10$)、反加组 II (中剂量雌激素组 $n = 10$)、反加组 III (高剂量雌激素组 $n = 10$)、GnRH-a 组 ($n = 11$)。研究组先予亮丙瑞林 1 mg/kg 皮下注射, 共 1 次, 反加组 I、II、III 分别在给药第 2 周开始予不同剂量的戊酸雌二醇 (25 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$) 灌胃, 同时 GnRH-a 组予生理盐水灌胃, 3 mL/只, 各研究组每天 1 次, 共 14 d。用药后第 4 周和 7 周开腹探查, 测量内异灶体积, 取其内异灶组织, 免疫组化法检测内异灶内的 TNF- α 、StAR 的表达, 眼眶内眦静脉丛的采血法采血, 酶联免疫吸附法检测血清 CA125 的水平。**结果** 用药前, 各组大鼠异位病灶体积比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 4 周, 研究组较对照组明显减小, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 第 7 周, 反加组 II、III 较反加组 I 和 GnRH-a 组体积增大明显, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。②用药前, 各组大鼠异位病灶组织中 TNF- α 、StAR 表达, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 4 周, 研究组内异灶 TNF- α 、StAR 表达较对照组明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 反加组 II、III 较反加组 I 和 GnRH-a 组 TNF- α 、StAR 表达高, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。③用药前, 各组大鼠血清 CA125 水平比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 4 周, 研究组血清 CA125 较对照组降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。第 7 周, 反加组 II、III 较反加组 I 和 GnRH-a 组血清 CA125 水平高, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** GnRH-a 反加低剂量雌激素对大鼠内异症模型有较好疗效, 反向添加中、高剂量雌激素可能通过诱导 TNF- α 、StAR 而促进大鼠子宫内膜异位症的复发。

【关键词】 大鼠子宫内膜异位症模型; 促性腺激素释放激素受体激动剂; 雌激素; 反添加; 复发

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0067-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.012

Effect of GnRH-a combined with estrogen on endometriosis in a rat model and its recurrence

ZHANG Lingyu^{1,2}, LIU Yinglei¹, QIAO Haifeng¹, KAI Haili¹, LIU Manhua^{1*}, WU Liucheng³

(1. The Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China. 2. Nantong Maternal and Child Health Hospital, Nantong 226001. 3. Experimental Animal Center of Nantong University, Nantong 226001)

【Abstract】 Objective To observe the therapeutic effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist combined with various doses of estrogen in a rat model of endometriosis and the recurrence of endometriosis. **Methods** Fifty-one rats

【基金项目】 南通市科技局重点病种的规范化临床诊疗研究 (HS2014074); 南通市科技计划项目 (MS12017013-4)。

【作者简介】 张玲玉, 女, 住院医师, 硕士研究生, 妇产科。E-mail: luqingyu15502@163.com

【通信作者】 刘曼华, 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 妇产科。E-mail: liumanhua2010@hotmail.com

with endometriosis were established by autologous transplantation of the uterus and then randomly divided into five groups: control group ($n = 10$), 1 mg/kg NS subcutaneous injection once; treatment groups, add-back group I (low-dose estrogen group, $n = 10$), add-back group II (medium-dose estrogen group, $n = 10$), add-back group III (high-dose estrogen group, $n = 10$), GnRH-a group ($n = 11$), 1 mg/kg leuprolide subcutaneous injection once. Add-back groups I – III were administered various doses of estradiol valerate at week 2 (25, 50, and 100 $\mu\text{g/kg}$) and the GnRH-a group was administered 3 mL NS per rat once a day by gavage at week 2. At weeks 3 and 6 after intragastric administration of estradiol valerate, a laparotomy was performed to measure the volume of endometriosis. The protein levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and steroidogenic acute regulatory (StAR) protein were detected by immunohistochemistry. The levels of serum CA125 were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Before the treatments, there was no significant difference in the volume of ectopic lesions in each group ($P > 0.05$). At week 4, the mean volumes of ectopic lesions in the treatment groups were significantly reduced compared with that of the control group ($P < 0.05$). At week 7, the volumes of ectopic lesions in add-back II and III groups were significantly higher than those in the add-back I and GnRH-a groups ($P < 0.05$). Before the treatments, there was no significant difference in the expression of TNF- α and StAR in ectopic lesions of each group ($P > 0.05$). At week 4 of the treatments, the TNF- α and StAR expression in ectopic lesions of treatment groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). At week 7, TNF- α and StAR expression in add-back II and III groups was significantly higher than that in the add-back group I and GnRH-a groups ($P < 0.05$). Before the treatments, there was no significant difference in the serum level of CA125 in the each group ($P > 0.05$). At week 4, the serum level of CA125 in the treatment groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). At week 7, the serum levels of CA125 in the add-back II and III groups were significantly higher than those in the add-back group I and GnRH-a groups ($P < 0.05$). **Conclusions** GnRH-a combined with low-dose estrogen causes marked suppression of endometriosis in the rat. Replacement therapy by medium and high doses of estrogen may stimulate rapid recurrence of endometriotic implant growth induced by TNF- α and StAR.

[Keywords] endometriosis; rat model; gonadotropin-releasing hormone agonist; estrogen; replacement therapy; recurrence

子宫内膜异位症(endometriosis)是一种妇科常见疾病,在育龄期妇女中的发病率在2%~10%,在不孕妇女中发病率高达50%^[1]。临床主要表现为痛经、慢性盆腔痛及不孕,严重影响了妇女的健康和生活质量。子宫内膜异位症在治疗后5年复发率为45%~50%^[2]。这个数据在被手术确诊的年龄小于21岁的妇女中甚至可达到56%^[3]。子宫内膜异位症需要长期、个体化治疗。作为一种雌激素相关性疾病,抑制内源性雌激素是延缓内异症复发的关键。促性腺激素释放激素受体激动剂(gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRH-a)有药物去势的作用,可以迅速将血清雌二醇降低至绝经期水平,但随之而来的潮热、盗汗、情绪波动等低雌激素症状限制了GnRH-a的长期用药。为缓解低雌激素症状,近年来提出来反添加疗法,但目前反添加疗法开始时间和如何用药临床上尚无统一标准^[4]。本研究通过自体移植建立大鼠子宫内膜异位症模型,建模成功后,给予亮丙瑞林反加不同剂量的雌激素治疗,比较治疗前后大鼠子宫内膜异位灶体积大小、子宫内膜异位灶组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory

protein, StAR)以及血清糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)的表达水平,评估子宫内膜异位症的治疗效果以及治疗后复发情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠60只,每只体重180~200 g,2月龄,雌性,购自南通大学实验动物中心[SCXK(苏)2014-0001],动物从业人员上岗证号:220180114,饲养环境:南通大学实验动物中心[SYXK(苏)2017-0046],温度:22℃~24℃,湿度:45%~70%,12 h明暗交替,自然饲养。一切进入屏障系统的人、物、饲料、水、空气、铺垫物及各种用品均须经过严格的微生物控制。在常规条件下适应性饲养1周。实验方案经过南通大学实验动物中心动物伦理委员会批准,编号为:20161202-001。无菌手术在南通大学实验动物中心实验室进行[SYXK(苏)2017-0046]。并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

多克隆抗体 TNF- α 及 StAR 一抗(Abcam),

DAB 染色试剂盒 (V9000, 中杉金桥), CA125 ELISA 试剂盒 (ml6024076); 注射用醋酸亮丙瑞林微球 (天津武田药品有限公司)。光学显微镜, 石蜡切片机, 游标卡尺, 微波炉, 移液器, 冷冻离心机。

1.3 实验方法

1.3.1 建模

60 只 SD 大鼠术前 1 d 皮下注射苯甲酸雌二醇 (0.1 mg/kg), 使所有实验动物处于同一动情周期。手术当天禁食禁饮。SD 大鼠予水合氯醛 (7%) 麻醉后, 取大鼠下腹正中、尿道口上端 1 cm 做一长约 2~3 cm 纵行切口, 结扎子宫系膜血管, 再结扎需切除的子宫段的两端, 其左侧子宫角切下约 1.5 cm 长片段, 置于 37℃ 无菌 PBS 缓冲液中, 分离子宫内膜, 取其 0.5 cm × 0.5 cm 一段, 于腹壁切口两侧从腹肌与皮下筋膜层之间打隧道, 将分离的子宫内膜展平置于隧道内, 内膜紧贴肌层, 缝合切口, 整个手术控制在 15 min 左右^[5], 将手术完毕的大鼠置于干净的饲养笼中, 保温至苏醒。术后予庆大霉素 0.1 mL/d 肌注 3 d 预防感染。

1.3.2 分组与给药

建模 4 周后开腹探查, 51 只大鼠建模成功。休息 3 d, 将建模成功的 51 只大鼠按随机数字表法分为五组: 对照组: 予生理盐水 1 mg/kg 皮下注射, 共 1 次; 研究组: 反加组 I (10 只)、反加组 II (10 只)、反加组 III (10 只)、GnRH-a 组 (11 只)。研究组先予亮丙瑞林 1 mg/kg 皮下注射^[6], 共 1 次, 其中反加组 I、II、III 分别在给药第 2 周开始予不同剂量的戊酸雌二醇灌胃反加^[7], 反加组 I (低剂量雌激素组): 25 μg/(kg·d), 反加组 II (中剂量雌激素组): 50 μg/(kg·d), 反加组 III (高剂量雌激素组): 100 μg/(kg·d), 每天 1 次, 共 14 d, GnRH-a 组在给药第 2 周予生理盐水灌胃反加, 3 mL/(只·d), 每天 1 次, 共 14 d。在治疗过程中对照组有 1 只大鼠因切口感染死亡; 反加组 I 有 1 只大鼠因切口感染死亡, 2 只大鼠因灌胃食道损伤死亡; 反加组 II 组有 2 只大鼠因切口感染死亡; 反加组 III 有 2 只大鼠因灌胃食道损伤死亡; GnRH-a 组有 2 只大鼠因切口感染死亡, 1 只大鼠因灌胃食道损伤死亡。

1.3.3 取材

分别在亮丙瑞林给药后第 4 周及第 7 周, 开腹探查, 测量内异灶大小, 取内异灶组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中保存, 石蜡包埋, 用于免疫组化检测; 用眼眶内眦静脉丛的采血法采血, 4℃ 1000 r/min 离

心 20 min, 收集上清, -80℃ 保存, 用于 ELISA 检测。

1.3.4 免疫组化

组织经中性福尔马林固定后, 取材, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, 采用 LSAB 法, 染色步骤按照说明书进行, 用 DAB (二氨基联苯胺) 显色后, 复染、脱水、透明、封片。以 PBS (磷酸盐缓冲液) 代替一抗作阴性对照。每批实验均同时设立阴性对照。

1.3.5 ELISA 法

用于测定血清中 CA125 的含量, 严格按试剂盒说明的实验步骤检测。

1.3.6 结果判定

显微镜下观察, 每张免疫组化切片随机选择 3 个不同的视野 (×400) 观察, 并判读阳性表达强度和阳性率。染色结果采用半定量分析方法: 以染色强度结合阳性细胞数百分比进行评分。染色强度计分: 无明显着色为 0 分, 淡黄色或轻微黄色为 1 分, 深黄或棕黄色为 2 分, 棕褐色或黑褐色为 3 分。阳性细胞百分比即每张免疫组化切片选择 3 个不同的视野 (×400) 观察, 每个视野计数 100 个细胞中阳性细胞数, 计算阳性细胞平均数: ≤5% 为评为 0 分, 6%~25% 评 1 分, 26%~50% 评 2 分, 51%~75% 评 3 分, >75% 均评为 4 分。对每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比乘积评分, 评分以阳性细胞百分比与染色强度的乘积: 0 分为阴性, 1~6 分为弱阳性, 7~12 分为强阳性。

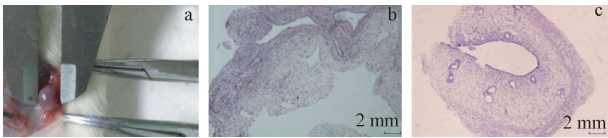
1.4 统计学方法

利用 SPSS 20.0 统计软件包, 计量资料以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料比较采用配对 *t* 检验; 同一时间点各组间比较采用方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠内异症模型建立

建模 28 d 后开腹探查, 60 只大鼠中 51 只建模成功。建模成功的大鼠腹壁, 肉眼可见异位病灶呈囊泡样, 内充满透亮液体, 表面被覆丰富脂肪组织, 移植物表明可见新生血管爬行生长, 周围结缔组织丰富。HE 染色镜下观察异位囊壁由内向外分别为上皮细胞层、间质细胞层及少量纤维结缔组织。上皮细胞呈柱状排列, 大部分上皮细胞有分泌现象可见核下空泡, 间质层薄, 少数可见腺体分布。见图 1。



注:a:治疗前大鼠内异灶肉眼观察;b:异位内膜(HE染色,×10);c:在位内膜(HE染色,×10)。

图1 大鼠子宫内膜异位灶及组织学观察

Note. a: Endometriosis in a rat model (gross appearance). b: Histology of the ectopic endometrium in a rat (HE staining, × 10). c: Eutopic endometrium in a rat (HE staining, × 10).

Figure 1 Endometriosis in a rat model and histological observation

2.2 大鼠内异症模型用药前后各组内异灶体积

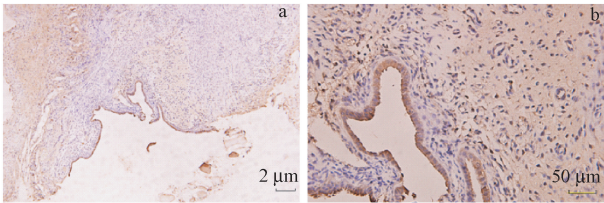
用药前,各组内异症的体积间差异无显著性($P > 0.05$)。第4周,反加组I、反加组II、反加组III、GnRH-a组大鼠腹壁异位病灶体积较用药前明显缩小,对照组的体积较用药前增大,差异均有显著性($P < 0.05$)。第7周,反加组I、反加组II、反加组III、GnRH-a组大鼠腹壁异位病灶体积较第4周均有增大,反加组I、反加组II、GnRH-a组较用药前明显减小,差异均有显著性($P < 0.05$),反加组III较用药前相比差异无显著性,对照组与第4周相比,差异无显著性($P > 0.05$);第7周时,反加应用中、高剂量雌激素组(反加组II、反加组III)较低剂量雌激素组和单纯应用GnRH-a组(反加组I、GnRH-a组)体积增大明显,差异有显著性($P < 0.05$)。见表1。

2.3 免疫组化表达

2.3.1 TNF-α在大鼠内异症病灶组织中的表达

TNF-α蛋白主要表达在子宫内膜异位症异位

内膜组织腺上皮细胞的细胞浆中,间质细胞浆中少量表达。阳性呈棕黄色至褐色(图2)。用药前,各组内异症病灶组织中TNF-α表达差异无显著性($P > 0.05$)。第4周,反加组I、反加组II、反加组III、GnRH-a组大鼠腹壁异位病灶TNF-α表达均较用药前缩小,且均较对照组明显缩小,差异均有显著性($P < 0.05$),而对照组的TNF-α表达与用药前相比差异无显著性($P > 0.05$)。第7周,反加组II、反加组III大鼠腹壁异位病灶TNF-α表达较第4周增加,差异有显著性($P < 0.05$);对照组、反加组I、GnRH-a组表达与第4周相比差异无显著性($P > 0.05$);反加组I、反加组II、GnRH-a组TNF-α表达较用药前明显减小,差异均有显著性($P < 0.05$),反加组III较用药前相比差异无显著性;第7周时反加应用中、高剂量雌激素组(反加组II、反加组III)较低剂量雌激素组和单纯应用GnRH-a组(反加组I、GnRH-a组)TNF-α表达高,差异有显著性($P < 0.05$)。见表2。



注:a:免疫组化(×10);b:免疫组化(×40)。

图2 TNF-α在大鼠内异症组织的表达

Note. a: Immunohistochemical staining (× 10). b: Immunohistochemical staining (× 40).

Figure 2 TNF-α expression in the ectopic endometrium

表1 GnRH-a用药后反加不同剂量雌激素大鼠异症病灶体积变化($\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$)

Table 1 Mean volume of endometriotic lesions in rats of the five groups before and after treatments

组别 Groups	<i>n</i>	用药前 Before treatment	第4周 At the 4th week	第7周 At the 7th week
对照组 Control group	9	62.05 ± 13.64	81.04 ± 18.97 ^a	80.80 ± 20.21 ^a
GnRH-a组 GnRH-a group	8	61.07 ± 22.95	10.38 ± 2.39 ^{ac}	13.74 ± 3.31 ^{abc}
反加组I Add-back group I	7	66.61 ± 33.31	11.41 ± 4.45 ^{ac}	18.11 ± 4.38 ^{abc}
反加组II Add-back group II	8	71.22 ± 22.73	11.38 ± 2.94 ^{ac}	25.64 ± 6.01 ^{abc}
反加组III Add-back group III	8	60.89 ± 16.80	11.81 ± 4.28 ^{ac}	52.58 ± 12.70 ^{bc}
<i>F</i>		0.398	92.156	48.372

注:反加组I:低剂量雌激素组;25 μg/(kg·d);反加组II:中剂量雌激素组;50 μg/(kg·d);反加组III:高剂量雌激素组;100 μg/(kg·d)。与同组用药前比较,^a $P < 0.05$;与同组第4周比较,^b $P < 0.05$;与对照组比较,^c $P < 0.05$ 。

Note. Add-back group I: low-dose estrogen group; 25 μg/(kg·d); Add-back group II: medium-dose estrogen group; 50 μg/(kg·d); Add-back group III: high-dose estrogen group; 100 μg/(kg·d). Compared with the same group before treatment, ^a $P < 0.05$; compared with the same group at the 4th week, ^b $P < 0.05$; compared with the control group, ^c $P < 0.05$.

表 2 GnRH-a 用药后反加不同剂量雌激素大鼠子宫内膜异位病灶组织中 TNF-α 和 StAR 的表达 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 TNF-α and StAR protein levels in the ectopic endometrium of rats in the five groups before and after treatments

组别 Groups	n	用药前 Before treatment		第 4 周 At the 4th week		第 7 周 At the 7th week	
		TNF-α	StAR	TNF-α	StAR	TNF-α	StAR
对照组 Control group	9	6.33 ± 1.41	5.78 ± 1.64	7.22 ± 1.20	5.89 ± 1.45	5.89 ± 1.76	3.78 ± 0.44 ^a
GnRH-a 组 GnRH-a group	8	7.63 ± 1.77	6.75 ± 2.05	1.63 ± 1.41 ^{ac}	1.25 ± 1.16 ^{ac}	2.00 ± 1.17 ^{ac}	1.63 ± 1.30 ^{ac}
反加组 I Add-back group I	7	7.14 ± 1.86	7.00 ± 1.29	1.86 ± 1.35 ^{ac}	1.29 ± 1.38 ^{ac}	2.57 ± 0.79 ^{ac}	1.86 ± 1.21 ^{ac}
反加组 II Add-back group II	8	7.00 ± 2.07	7.13 ± 2.17	1.75 ± 1.17 ^{ac}	1.63 ± 1.06 ^{ac}	3.38 ± 0.74 ^{abcd}	3.25 ± 0.71 ^{abd}
反加组 III Add-back group III	8	6.75 ± 1.04	6.88 ± 1.64	1.88 ± 1.25 ^{ac}	1.75 ± 1.28 ^{ac}	5.25 ± 1.17 ^{bd}	5.50 ± 1.85 ^{bed}
F		0.697	0.7773	32.018	20.927	11.706	13.658

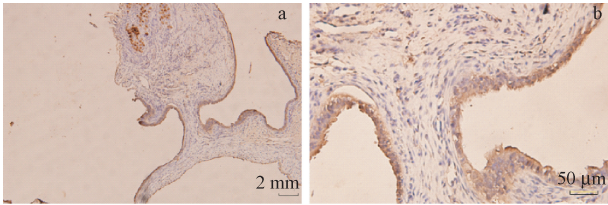
注:反加组 I:低剂量雌激素组;25 μg/(kg·d);反加组 II:中剂量雌激素组;50 μg/(kg·d);反加组 III:高剂量雌激素组;100 μg/(kg·d)。与同组治疗前比较,^a*P* < 0.05;与同组治疗 4 周比较,^b*P* < 0.05;与对照组同一时间点比较,^c*P* < 0.05;与 GnRH-a 组同一时间点比较,^d*P* < 0.05。
Note. Add-back group I: low-dose estrogen group; 25 μg/(kg·d); Add-back group II: medium-dose estrogen group; 50 μg/(kg·d); Add-back group III: high-dose estrogen group; 100 μg/(kg·d). Compared with the same group before treatment, ^a*P* < 0.05; compared with the same group at the 4th week, ^b*P* < 0.05; compared with the control group at the same time, ^c*P* < 0.05; compared with the GnRH-a group at the same time, ^d*P* < 0.05.

2.3.2 StAR 在大鼠内异症病灶组织中的表达

StAR 主要表达于异位内膜组织腺上皮细胞的细胞浆中,在位内膜中很少表达。阳性呈棕黄色至褐色(图 3)。用药前,各组内异症病灶组织中 StAR 表达差异无显著性(*P* > 0.05)。第 4 周,反加组 I、反加组 II、反加组 III、GnRH-a 组大鼠腹壁异位病灶 StAR 均较用药前减小,差异有显著性(*P* < 0.05),且均较对照组明显降低,差异有显著性(*P* < 0.05),而对照组的大鼠腹壁异位病灶 StAR 表达与用药前相比差异无显著性(*P* > 0.05)。第 7 周,对照组大鼠腹壁异位病灶 StAR 表达较用药前减小,差异有显著性(*P* < 0.05);反加组 II、反加组 III StAR 表达较第 4 周增加,差异有显著性(*P* < 0.05);反加组 I、反加组 II、GnRH-a 组 StAR 表达较用药前明显减小,差异均有显著性(*P* < 0.05);反加组 III 较用药前相比差异无显著性;第 7 周时反加应用中、高剂量雌激素组(反加组 II、反加组 III)较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-α 组(反加组 I、GnRH-a 组)StAR 表达高,差异有显著性(*P* < 0.05)。见表 2。

2.4 血清 CA125 在大鼠内异症模型中的表达

用药前,各组血清 CA125 浓度差异无显著性(*P* > 0.05),第 4 周,反加组 I、反加组 II、反加组 III、GnRH-a 组大鼠血清 CA125 浓度平均数均减小,与



注:a:免疫组化(× 10);b:免疫组化(× 40)。
图 3 StAR 在大鼠内异症组织的表达

Note. a: Immunohistochemical staining (× 10). b: Immunohistochemical staining (× 40).

Figure 3 StAR expression in the ectopic endometrium

用药前相比差异有显著性(*P* < 0.05),与对照组相比,差异有显著性(*P* < 0.05),而对照组的评分与用药前相比差异无显著性(*P* > 0.05)。第 7 周,反加组 II、反加组 III 大鼠血清 CA125 浓度较第 4 周增加,差异有显著性(*P* < 0.05);GnRH-a 组大鼠血清 CA125 浓度较 4 周同组减小,差异有显著性(*P* < 0.05);对照组、反加组 I 与第 4 周相比差异无显著性(*P* > 0.05);反加组 I、反加组 II、反加组 III、GnRH-a 组大鼠血清 CA125 浓度较用药前明显减小,差异均有显著性(*P* < 0.05);第 7 周时反加应用中、高剂量雌激素组(反加组 II、反加组 III)较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组(反加组 I、GnRH-a 组)血清 CA125 浓度高,差异有显著性(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 GnRH-a 用药后反加不同剂量雌激素大鼠血清 CA125 浓度的变化($\bar{x} \pm s$, U/mL)

Table 3 Serum level of CA125 in rats of the five groups before and after treatments				
组别 Groups	<i>n</i>	用药前 Before treatment	第 4 周 At the 4th week	第 7 周 At the 7th week
对照组 Control group	9	9.06 ± 1.25	9.19 ± 1.61	9.24 ± 1.12
GnRH-a 组 GnRH-a group	8	8.91 ± 1.96	5.47 ± 0.72 ^{ac}	3.60 ± 0.28 ^{abc}
反加组 I Add-back group I	7	8.86 ± 2.21	4.00 ± 0.77 ^{acd}	3.46 ± 0.35 ^{ac}
反加组 II Add-back group II	8	9.13 ± 2.07	4.34 ± 0.65 ^{acd}	6.24 ± 2.04 ^{abcd}
反加组 III Add-back group III	8	8.86 ± 1.29	4.38 ± 0.70 ^{acd}	6.47 ± 1.12 ^{abcd}
<i>F</i>		0.040	40.330	33.20

注:反加组 I:低剂量雌激素组;25 μg/(kg·d);反加组 II:中剂量雌激素组;50 μg/(kg·d);反加组 III:高剂量雌激素组;100 μg/(kg·d)。与同组治疗前比较,^a*P* < 0.05;与同组治疗 4 周比较,^b*P* < 0.05;与对照组同一时间点比较,^c*P* < 0.05;与 GnRH-a 组同一时间点比较,^d*P* < 0.05。

Note. Add-back group I: low-dose estrogen group; 25 μg/(kg·d); Add-back group II: medium-dose estrogen group; 50 μg/(kg·d); Add-back group III: high-dose estrogen group; 100 μg/(kg·d). Compared with the same group before treatment, ^a*P* < 0.05; compared with the same group at the 4th week, ^b*P* < 0.05; compared with the control group at the same time, ^c*P* < 0.05; compared with the GnRH-a group at the same time, ^d*P* < 0.05.

3 讨论

子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病,治疗后易复发,其机制尚不清楚。临床上评估子宫内膜异位症复发的依据为:(1)症状:以盆腔疼痛为主诉,达到甚至超过术前水平;(2)盆腔检查:再次出现包块,直肠陷窝触痛结节等;(3)B 超示卵巢囊肿,囊肿为中低回声,甚至出现点状强回声;(4)血清 CA125 降低后再次升高。但确诊,仍需使用腹腔镜检查通过组织学证实。考虑到反复使用腹腔镜的伦理及实际应用问题,本实验采用大鼠子宫内膜异位症模型进行研究。

GnRH-a 现已广泛应用于治疗子宫内膜异位症,本研究应用亮丙瑞林治疗大鼠子宫内膜异位症模型发现,第 4 周,研究组较对照组体积明显缩小,血清 CA125 水平下降,而对照期内异症模型体积增大,提示亮丙瑞林对大鼠子宫内膜异位症模型疗效肯定。GnRH-a 治疗过程中机体血清雌二醇迅速降低至绝经期水平,若机体长期处于低雌激素血症状态,可出现潮热、盗汗、阴道干燥、头痛等血管舒缩症状及不可逆的骨丢失等不良反应^[8,14]。长期低雌激素血症,会引起原始卵泡减少,卵泡闭锁,导致卵巢功能受损^[9]。为缓解低雌激素血症症状,保护卵巢功能,近年来提出“反添加”疗法,即 GnRH-a 与类固醇激素联合应用。如何调节 GnRH-a 和类固醇激素的用量和应用时间的长短仍是值得我们研究的问题,脉冲式加用性激素是否会激惹隐伏的雌激素敏感组织,从而导致疾病提前复发的的问题值得我们进一步探讨。

本研究采用不同剂量雌激素进行反添加,在第 7 周时,研究组大鼠腹壁异位病灶体积较第 4 周均有不同程度增大,提示停药后可能出现了子宫内膜异位症的复发倾向,反加应用中、高剂量雌激素组较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组体积增大明显,且反加应用中、高剂量雌激素组血清 CA125 较治疗第 4 周升高,提示反加应用中、高剂量雌激素可能加速了内异症的复发。进一步说明内异症是一种雌激素依赖性疾病,对内异症的反加治疗应注意雌激素的应用剂量,与 Barbieri^[10]的研究结论一致。

TNF-α 是一类具有多种生物活性的细胞因子,由激活的单核细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等产生,在生理状态下,TNF-α 参与调节胚胎着床、卵泡发育、免疫监视、抗肿瘤等环节^[11];在病理状态下,TNF-α 可介导炎症反应和免疫反应。TNF-α 在子宫内膜异位症发生发展过程中炎症浸润、新生血管形成、粘连的形成等环节发挥了巨大作用。TNF-α 不仅可以诱导 IL-6、IL-8 等炎症因子释放,诱导新生血管生成,还可以促进间质细胞和间皮之间的粘附,刺激子宫内膜间质细胞的生成^[12],可能在子宫内膜异位症的形成和发展中发挥了重要作用。本研究发现,用药前,TNF-α 在子宫内膜异位组织中高表达,提示高水平的 TNF-α 可能促进了内异症的发生、发展的过程;第 4 周,研究组子宫内膜异位灶组织中 TNF-α 表达降低,提示 GnRH-a 对子宫内膜异位症大鼠模型有较好的治疗作用;在停药观察 3 周后,反加中、高剂量雌激素组较反加低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组大鼠子宫内膜异位症组织

TNF- α 表达高,提示中、高剂量雌激素可能通过提高 TNF- α 表达促进子宫内膜异位症的复发,其可能机制为中、高剂量雌激素刺激单核细胞、淋巴细胞和巨噬细胞再次分泌 TNF- α ,增高的 TNF- α 促进异位内膜炎症细胞因子 IL-6、IL-8 等的释放,进而诱发异位内膜及基质细胞增殖、血管再生、刺激成纤维细胞增殖及胶原合成,从而再次形成异位病灶。

Attar^[13]等发现子宫内膜异位细胞含有类固醇生成的完整基因,能将胆固醇从头合成雌二醇。StAR 是类固醇激素合成的重要限速酶,可将胆固醇从线粒体的外膜转运至内膜,在其它类固醇激素合成酶如 P450_{scc}、芳香化酶等的作用下,合成雌二醇^[15]。子宫内膜异位组织可以通过 StAR 从头合成雌激素,造成局部高雌激素状态,加速子宫内膜异位症进展。激活的巨噬细胞能够产生各种类型的细胞因子和 PGs, PGE₂ 能诱导 StAR 表达^[16],促进局部雌激素的合成,为子宫内膜异位症的形成与发展打下基础。本研究发现,用药前,StAR 在大鼠子宫内膜异位病灶组织中表达增高,提示 StAR 可能参与了大鼠内异症的发生发展,用药第 4 周,研究组 StAR 表达降低,再次说明 GnRH-a 对子宫内膜异位症大鼠模型有较好的治疗作用,在停药观察 3 周后,反加中、高剂量雌激素组较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组大鼠子宫内膜异位症组织 StAR 表达高,提示中、高剂量雌激素可能通过诱导 StAR 的高表达促进子宫内膜异位症的复发,其机制可能为中、高剂量的雌激素作用下,异位内膜组织中巨噬细胞的数量增加,激活的巨噬细胞分泌 PGE₂,上调了 StAR 的表达,外周组织中胆固醇芳香构化,局部合成雌激素,雌激素与雌激素受体结合,启动雌激素介导的信号通路,诱导相关细胞因子参与并促进子宫内膜异位病灶的再次形成。

综上所述,GnRH-a 反加低剂量雌激素治疗大鼠内异症模型可有效缩小病灶,降低 TNF- α 、StAR 及 CA125 的表达,疗效确切。但反向添加中、高剂量雌激素可能加速了大鼠子宫内膜异位症的复发,TNF- α 、StAR 表达的再次升高可能是子宫内膜异位症复发的机制。但本实验样本量较小,随访时间较短,尚需大样本、长时期随访进一步研究证实。另本实验为动物实验,在对人的临床应用中尚存在一定差距,还需循证医学证据。

参考文献:

[1] Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2014, 29(3): 400-412.
[2] Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control [J].

Human Reprod Update, 2009, 15(4): 441-461.
[3] Tandoi I, Somigliana E, Riparini J, et al. High rate of endometriosis recurrence in young women [J]. Pediatr Adolesc Gynecol, 2011, 24: 376-379.
[4] Granese R, Perino A, et al. Gonadotrophin-releasing hormone analogue or dienogest plus estradiol valerate to prevent pain recurrence after laparoscopic surgery for endometriosis: a multicenter randomized trial [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2015, 94(6): 637-645.
[5] 李龙卫, 王艳云, 陈琦, 等. 提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 81-85.
[6] Ercan CM, Kayaalp O, Cengiz M, et al. Comparison of efficacy of bromocriptine and cabergoline to GnRH agonist in a rat endometriosis model [J]. Arch Gynecol Obstet, 2015, 291(5): 1103-1111.
[7] Hurst BS, Gardner SC, Tucker KE, et al. Delayed oral estradiol combined with leuprolide increases endometriosis-related pain [J]. JSLS, 2000, 4: 97-101.
[8] Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, et al. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicenter, open-label trial [J]. Hum Reprod, 2010, 25: 633-641.
[9] 杨群爱, 伊碧霞. GnRH-a 联合反向添加疗法在卵巢恶性生殖细胞肿瘤患者保留生育功能手术后化疗中的临床观察 [J]. 浙江医学, 2013, 35(21): 1893-1896.
[10] Barbieri RL. Hormone treatment of endometriosis: the estrogen threshold hypothesis [J]. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166(2): 740-745.
[11] Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, et al. Tumor necrosis factor α and regulatory T cells in oncoimmunology [J]. Front Immunol, 2018, 9(2): 444.
[12] Burns KA, Thomas SY, Hamilton KJ, et al. Endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor α and IL-6 cross-talk [J]. Endocrinology, 2018, 159(1): 103-118.
[13] Attar E, Tokunaga H, Imir G, et al. Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(2): 623-631.
[14] Agarwal SK, Daniels A, Imir G, et al. Treatment of endometriosis with the GnRH-a deslorelin and add-back estradiol and supplementary testosterone [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 934164.
[15] Xu JN, Zeng C, et al. Metformin inhibits StAR expression in human endometrial stromal cells via AMPK-mediated disruption of CREB-CRTC2 complex formation [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(8): 2795-2803.
[16] Tian Y, Kong B, Su S, et al. Expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in endometriosis is associated with endometriosis severity [J]. J Int Med Res, 2009, 37(5): 1389-1395.