

【基础研究】

通信作者:李玉洁(1972-),女,河南周口人,硕士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:不孕和生殖;E-mail:645482554@qq.com

smaller than that in the model group ($P < 0.05$); the volume of ectopic endometrium of rats in the middle-, high-dose mifepristone group was smaller than that in the low-dose mifepristone group ($P < 0.05$); the volume of ectopic endometrium of rats in the high-dose mifepristone group was smaller than that in the middle-dose mifepristone group ($P < 0.05$). There was no statistic difference in the relative expression of COX-2, VEGF protein of rats among the four groups before treatment ($P > 0.05$). There was no statistic difference in the relative expression of COX-2, VEGF protein of rats before and after treatment in the model group ($P > 0.05$); the relative expressions of COX-2, VEGF protein of rats after treatment were significantly lower than those before treatment in the low-, middle-, high-dose mifepristone group. The expressions of COX-2 and VEGF protein in ectopic endometrium of rats in the low-, middle-, high-dose mifepristone group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). The expressions of COX-2 and VEGF protein in ectopic endometrium of rats in the middle-, high-dose mifepristone group were lower than those in the low-dose mifepristone group ($P < 0.05$). The expressions of COX-2 and VEGF protein in ectopic endometrium of rats in the high-dose mifepristone group were lower than those in the middle-dose mifepristone group ($P < 0.05$). The expression of COX-2 in the ectopic endometrium was positively related with VEGF expression ($r = 0.782$, $P < 0.05$). **Conclusion** Mifepristone is effective in the treatment of endometriosis in rats and has a dose effect. It may play a therapeutic role by down regulating the expression of COX-2 and VEGF protein.

Key words: endometriosis; mifepristone; cyclooxygenase-2; vascular endothelial growth factor

子宫内膜异位症是生育期女性常见的妇科疾病,生育年龄大、生育次数少者多发,绝经后使用激素替代治疗者也有发病,患者多以慢性盆腔痛、性交痛、不孕、月经失调等为主要临床表现^[1],给生育期女性带来了严重困扰。子宫内膜异位症的发病机制尚不明确,可能与基因、新生血管形成、炎症反应、氧化应激、免疫和子宫收缩异常等有关^[2]。目前,临床医生多主张尽量给予药物治疗,但临床上治疗子宫内膜异位症的药物繁多,只有彻底明确药物的作用机制,才能保障用药安全性和合理性。本研究选取造模成功的子宫内膜异位症大鼠作为研究对象,观察不同剂量米非司酮对子宫内膜异位病灶及异位病灶中环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取8周龄健康清洁级雌性Sprague Dawley大鼠120只,体质量200~220 g,由新乡医学院实验动物中心提供,确认均为发情期的性成熟大鼠。

1.2 药物、试剂与仪器 米非司酮药粉剂(上海麦克林生化科技有限公司),放射免疫沉淀(radioimmunoprecipitation assay, RIPA)裂解液、二喹啉甲酸蛋白定量试剂盒(北京鼎国昌盛生物有限责任公司);组织切片机(浙江金华市科迪仪器有限公司),JY92-II超声波细胞粉碎机(上海新芝生物技术研究),DG-300C电泳仪(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)。

1.3 子宫内膜异位症模型大鼠制备及分组 SD大鼠采用 $100\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水合氯醛腹腔麻醉后在尿道口上方腹部做切口,切取部分子宫,置于生理盐水中,将子宫内膜与肌层分离后,取 $5\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ 的内膜组织将其缝于切口边缘内侧血管丰富的腹壁上,4周后再次开腹,在腹壁下发现颜色异常的浆液性水泡或质硬团块组织,并经病理组织学证实为存活的异

位内膜组织,说明建模成功。选取112只建模成功的大鼠随机分为模型组及低、中、高剂量米非司酮组,每组28只。模型组大鼠给予1 mL花生油灌胃,每日1次,共4周;低、中、高剂量米非司酮组大鼠分别按 1.04 、 1.24 、 $2.60\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予米非司酮混悬液灌胃,每日1次,共4周。低、中、高剂量对应临床用药分别为 10.0 、 12.5 、 $25.0\text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$,根据实验动物学药物计算公式换算得出低、中、高剂量米非司酮组大鼠用药剂量分别为 1.04 、 1.24 、 $2.60\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。米非司酮混悬液由米非司酮原药粉加入花生油中形成,质量浓度为 $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4 各组大鼠异位内膜组织体积测量 模型建立成功后,麻醉大鼠开腹测量大鼠异位内膜组织长、宽、高,根据体积 $= 0.52 \times \text{长}(\text{mm}) \times \text{宽}(\text{mm}) \times \text{高}(\text{mm})$ ^[3],计算异位内膜组织体积。灌胃治疗4周后,再次剖腹测量并计算异位病灶体积,同时取异位病灶组织,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存待用。

1.5 Western blot 检测大鼠异位内膜组织中 COX-2 和 VEGF 蛋白表达 将米非司酮干预后所取异位内膜组织碎块于冰块上粉碎,加入细胞组织快速裂解液及苯甲基磺酰氟,裂解粉碎, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $12\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,提取组织蛋白,以二喹啉甲酸法进行蛋白定量,制胶,电泳,转膜,封闭,逐步加入一抗、二抗孵育后曝光鉴定,对胶片进行扫描,结果采用Quantity One 分析软件进行分析,以 β -actin为内参,计算COX-2、VEGF蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析;相关性分析采用Pearson 相关; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠异位内膜组织体积比较 结果见表1。模型组大鼠治疗后异位内膜组织体积与治疗前比较差异无统计学意义($P > 0.05$);低、中、高剂量米非司酮组大鼠治疗后异位内膜组织体积均小于治

疗前,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗前各组大鼠异位内膜组织体积比较差异均无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,低、中、高剂量米非司酮组大鼠异位内膜组织体积均小于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);中、高剂量米非司酮组大鼠异位内膜组织体积小于低剂量米非司酮组,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量米非司酮组大鼠异位内膜组织体积小于中剂量米非司酮组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 4 组大鼠异位内膜组织体积比较

Tab. 1 Comparison of the volumes of ectopic endometrium of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	异位内膜组织体积/mm ³		t	P
		治疗前	治疗后		
模型组	28	163.82 ± 8.37	160.43 ± 5.23	-51.730	0.068
低剂量米非司酮组	28	159.44 ± 7.86	40.39 ± 3.89 ^a	30.406	0.000
中剂量米非司酮组	28	158.80 ± 8.99	37.58 ± 4.38 ^{ab}	33.205	0.000
高剂量米非司酮组	28	158.63 ± 9.49	30.73 ± 2.90 ^{abc}	38.366	0.000
F		239.522	10.661		
P		0.085	0.000		

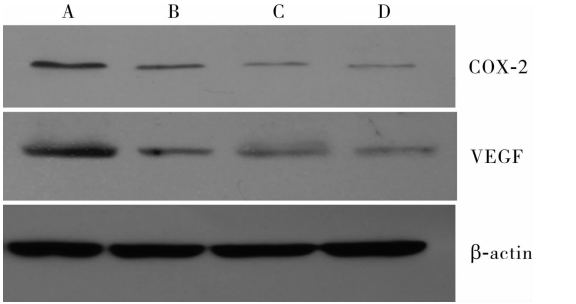
注:与模型组比较^a $P < 0.05$;与低剂量米非司酮组比较^b $P < 0.05$;与中剂量米非司酮组比较^c $P < 0.05$ 。

2.2 4 组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量比较 结果见表 2 和图 1。治疗前各组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组大鼠治疗后异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量与治疗前比较差异无统计学意义($P > 0.05$);低、中、高剂量米非司酮组大鼠治疗后异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量均低于治疗前,差异有统计学意义($P < 0.05$)。低、中、高剂量米非司酮组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量均低于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$);中、高剂量米非司酮组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量低于低剂量米非司酮组,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量米非司酮组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量低于中剂量米非司酮组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 4 组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白相对表达量
Tab. 2 Expression of COX-2 and VEGF protein in endometriotic tissues of rats among the four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	COX-2 蛋白	VEGF 蛋白
模型组	28		
治疗前		0.610 ± 0.012	0.618 ± 0.023
治疗后		0.608 ± 0.033	0.610 ± 0.031
低剂量米非司酮组	28		
治疗前		0.613 ± 0.046	0.604 ± 0.041
治疗后		0.487 ± 0.030 ^{ab}	0.485 ± 0.028 ^{ab}
中剂量米非司酮组	28		
治疗前		0.606 ± 0.032	0.624 ± 0.036
治疗后		0.427 ± 0.027 ^{abc}	0.420 ± 0.024 ^{abc}
高剂量米非司酮组	28		
治疗前		0.609 ± 0.036	0.615 ± 0.086
治疗后		0.384 ± 0.020 ^{abcd}	0.356 ± 0.023 ^{abcd}

注:与治疗前比较^a $P < 0.05$;与模型组比较^b $P < 0.05$;与低剂量组比较^c $P < 0.05$;与中剂量组比较^d $P < 0.05$ 。



A:模型组;B:低剂量米非司酮组;C:中剂量米非司酮组;D:高剂量米非司酮组。

图 1 4 组大鼠异位内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白表达 (Western blot)

Fig. 1 Expression of COX-2 and VEGF protein in endometriotic tissues of rats among the four groups (Western blot)

2.3 各组大鼠异位内膜组织中 COX-2 与 VEGF 蛋白表达的相关性 Pearson 相关性分析结果显示,异位内膜组织中 COX-2 与 VEGF 蛋白表达呈正相关($r = 0.782, P < 0.05$)。

3 讨论

米非司酮用于治疗子宫内膜异位症已有 20 多年,其能改善患者盆腔疼痛,并使异位病灶萎缩。LI 等^[4]研究证实,米非司酮可降低子宫内膜异位症大鼠异位内膜组织中 COX-2 基因转录,从而降低前列腺素分泌。徐妍等^[5]研究显示,米非司酮可抑制子宫内膜异位症大鼠异位内膜组织内炎症因子、侵袭基因、凋亡抑制基因的表达,同时增加促凋亡基因的表达。临床上将米非司酮单独或联合其他药物用于治疗子宫内膜异位症,但是关于剂量的选择目前尚无统一论,临床用药剂量为 5 ~ 25 mg,均无明确标准说明治疗的最佳剂量。张晓平^[6]认为,腹腔镜手术联合米非司酮治疗子宫内膜异位症的疗效较理想,且安全性高。冯珀霖等^[7]研究显示,醋酸曲普瑞林治疗子宫内膜异位症的作用优于米非司酮,其能够降低复发率,但是潮热、围绝经期症状、胃肠道反应等不良反应明显多于米非司酮,临床长期用药应慎重考虑。还有学者采用米非司酮联合孕三烯酮^[8]、米非司酮联合中药^[9-12]等方案治疗了宫内膜异位症,结果显示,这些治疗方案均能有效改善患者症状,减轻盆腔疼痛,降低术后复发率,且不良反应轻。

COX-2 是一种膜结构蛋白,能将花生四烯酸代谢为各种前列腺素产物,可被多种生长因子、细胞因子、脂多糖、肿瘤启动因子等诱导产生。VEGF 与多种肿瘤及炎症疾病的发生有关,VEGF 在子宫内膜异位症的发生中参与新生血管内皮细胞增殖,促进

新生血管形成^[13-14],与子宫内膜异位症的发病、进展有关。秦江霞等^[15]研究显示,COX-2、VEGF 在子宫内膜异位症患者异位内膜组织中高表达,与子宫内膜异位血管的生成有关。JANA 等^[16]研究发现,基质金属蛋白酶-2 可通过环氧化酶 2-前列腺素 E₂-磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶途径参与血管细胞迁移和侵入,在子宫内膜异位症发病中起着重要作用。

本研究结果显示,米非司酮治疗后,大鼠体内异位内膜组织体积较治疗前明显减小,异位子宫内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白表达明显降低;且给药剂量越高,上述各指标下降越明显。本研究还发现,异位子宫内膜组织中 COX-2、VEGF 蛋白表达呈正相关。米非司酮可能通过抑制雌激素和炎症因子的产生减少 COX-2 生成,阻止异位内膜组织中新生血管生成来抑制疾病进展。有研究发现,低剂量米非司酮(6.25 mg)与高剂量米非司酮(12.50 mg)治疗子宫内膜异位症的效果相当,但服用小剂量米非司酮患者发生恶心、呕吐、头晕、皮疹等不良反应者较少^[17-18]。陈勇^[19]采用不同剂量米非司酮治疗腹腔镜下子宫内膜异位症患者病灶清除后的患者,结果发现,小剂量米非司酮组(6.3 mg)患者的症状缓解率和复发率均优于大剂量米非司酮组(12.5 mg),且对患者体内激素水平的影响小于大剂量米非司酮组。杨其伟^[20]也探讨了不同剂量米非司酮治疗子宫内膜异位症的临床疗效,结果发现,不同剂量米非司酮对子宫内膜异位症患者均有较好疗效,但低剂量米非司酮对患者内分泌水平影响更小,长期应用不影响患者骨密度。

总之,本研究结果显示,高剂量米非司酮治疗子宫内膜异位症可取得更好的疗效,但其是否会带来相关不良反应尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 郭耀省,孙青. 子宫内膜异位症的发病机制研究进展[J]. 新乡医学院学报,2018,35(5):439-443.

[2] 何丽清,蔡序子,王艳,等. 生育指数对子宫内膜异位症相关性不孕症术后妊娠率的预测及临床价值[J]. 解放军医学杂志,2018,43(8):674-679.

[3] GÜNEY M, ORAL B, KARAHAN N, et al. Regression of endometrial explants in a rat model of endometriosis treated with melatonin [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89 (4):934-942.

[4] LI X, BAO Y, FANG P, et al. Effect of mifepristone on COX-2 both

in eutopic and ectopic endometrium in mouse endometriotic model [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286(4):939-946.

[5] 徐妍,何珏. 子宫内膜异位症模型大鼠接受米非司酮干预后炎症因子、侵袭和凋亡基因表达的评估[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(9):1169-1171.

[6] 张晓平. 子宫内膜异位症患者腹腔镜手术联合米非司酮治疗的疗效及安全性分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(65):26-29.

[7] 冯珀霖,刘燕燕,李翠芬. 达菲林和米非司酮治疗腹腔镜术后子宫内膜异位症的效果比较[J]. 临床医学工程, 2018, 25(11):1431-1432.

[8] 周荣琴,马琳,王开叶. 米非司酮联合孕三烯酮治疗子宫内膜异位症临床观察[J]. 社区医学杂志, 2018, 16(13):1101-1104.

[9] 杨建敏,冯磊,张辉. 益气化瘀方预防子宫内膜异位术后复发的临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(7):1668-1670.

[10] 王丽娟,任坤坤,鄧雪莲,等. 活血消异方联合米非司酮对子宫内膜异位症患者 CA125 水平及免疫功能的影响[J]. 临床合理用药, 2018, 11(7B):72-73.

[11] 张媛媛,李丽,薛娟,等. 米非司酮联合小金胶囊治疗子宫内膜异位症的临床研究[J]. 世界中医药, 2017, 12(9):2047-2049.

[12] 徐桂平,李亚梅,秦杰,等. 莪棱胶囊联合米非司酮治疗子宫内膜异位症的疗效观察[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(17):2560-2564.

[13] 黎俊伶. 子宫内膜异位症发病机制及药物治疗研究进展[J]. 右江医学, 2013, 41(3):431-433.

[14] 许晓曦,胡裕翔,程艺,等. 早产儿视网膜病变抗血管内皮生长因子药物治疗新进展[J]. 眼科新进展, 2018, 38(9):883-886.

[15] 秦江霞,岳玉焕,杨爱银,等. COX-2、VEGF 以及 MVD 在子宫内膜异位症中表达及意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014, 22(6):69-71.

[16] JANA S, CHATTERJEE K, RAY A K, et al. Regulation of matrix metalloproteinase-2 activity COX-2-PGE2-pAKT axis promotes angiogenesis in endometriosis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10):e0163540. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0163540. eCollection 2016. pone. 0163540.

[17] 赵莹,宋静. 低剂量米非司酮应用于子宫内膜异位症治疗中的疗效分析[J]. 中国实用医药, 2019, 14(1):132-133.

[18] 刘伟明. 不同剂量米非司酮治疗子宫内膜异位症的临床疗效及安全性比较[J]. 中国冶金工业医学杂志, 2018, 35(3):329-330.

[19] 陈勇. 米非司酮不同剂量对子宫内膜异位症患者术后症状缓解的疗效比较[J]. 抗感染药物, 2016, 13(3):679-681.

[20] 杨其伟. 探讨不同剂量米非司酮治疗子宫内膜异位症的临床疗效[J]. 重庆医学, 2017, 46(28):3992-3994.

(本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)