

子宫腺肌病小鼠的药物疗效及其疼痛机制

李清, 王杰玉, 张晓丹, 张旭垠, 冯炜炜, 华克勤*

(复旦大学附属妇产科医院, 上海 200090)

【摘要】 **目的** 了解腺肌病小鼠药物治疗疗效及疼痛机制。**方法** 他莫昔芬法建模。以不同药物治疗后, 监测小鼠动情周期, 检测 5-HT、GnRH-R、NGF、NF 的水平。**结果** 对照组 5-HT 水平明显高于造模组。GnRH-R 及 NGF 在正常内膜、在位内膜的表达显著低于异位内膜。NF 在正常内膜的表达显著低于在位内膜、异位内膜。**结论** 与全量抑那通相似, 半量抑那通可减缓腺肌病进展, 但对动情周期影响无明显优势。全量抑那通后使用达英-35 可巩固疗效。5-HT 可能在腺肌病疼痛机制中发挥作用。

【关键词】 子宫腺肌病; ICR 小鼠; 模型; 疼痛; 治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0516-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.014

Drug therapy and mechanism of pain in mice with induced adenomyosis

LI Qing, WANG Jie-yu, ZHANG Xiao-dan, ZHANG Xu-yin,

FENG Wei-wei, HUA Ke-qin*

(Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200090, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of different drugs and to explore the mechanism of pain in mice with adenomyosis (ADM). **Methods** The mouse model of adenomyosis was induced by oral administration of tamoxifen. The vaginal smear was examined by cytology, and serum levels of 5-HT, GnRH-R, NGF and NF were determined. **Results** Higher level of 5-HT was detected in the controls compared with the models. The expression of GnRH-R and NGF in normal endometrium and eutopic endometrium were significantly lower than those in ectopic endometrium. The expression on NF in normal endometrium was significantly lower than that in the eutopic and ectopic endometria. **Conclusions** Similar with regular dose of GnRH-a, half dose of GnRH-a can slow down the progress of ADM as well as reducing pain. Combination of regular dose of GnRH-a and Diane-35 could consolidate the therapeutic effect and even achieve pathological cure. 5-HT may take an active part in the mechanism of pain in ADM.

【Key words】 Adenomyosis; ICR mice; Model; Pain; Treatment

Corresponding author: HUA Ke-qin, E-mail: huakeqin@126.com

子宫腺肌病是一种常见的妇科疾病, 在手术切除的子宫标本中, 6% ~ 40% 有子宫腺肌病^[1]。临床上 GnRH-a (gonadotropin-releasing hormone agonist, 促性腺激素释放激素类似物) 可有效缓解症状, 但长期应用易出现围绝经期症状; 低剂量 GnRH-a 可应用于子宫肌瘤及体重较轻的腺肌病患者, 改善症状同时降低围绝经期症状, 但应用尚不普遍。研究指出, 疼痛可能通过 5-HT (5-hydroxytryptamine, 5-羟色胺) 和其他神经系统起作用。而 5-HT 的代

谢产物-褪黑素, 可用来减轻内异症患者的疼痛。本文拟构造腺肌病小鼠模型, 并以褪黑素、GnRH-a、达英-35 等处理小鼠, 检测与疼痛密切相关的抗体 NGF (nerve growth factor, 神经生长因子), NF (neurofilament, 神经纤维) 的表达, 并检测小鼠血清中 5-HT 水平及小鼠子宫 GnRH-R (gonadotropin-releasing hormone receptor, 促性腺激素释放激素受体), 从而了解子宫腺肌病小鼠不同药物治疗方法及疼痛机制。

[作者简介] 李清 (1991 -), 女, 博士研究生, 专业: 临床技能。Email: liqing11@fudan.edu.cn

[通讯作者] 华克勤 (1962 -), 女, 主任医师, 博导, 主要从事妇产科研究。Email: huakeqin@126.com

1 材料与方法

1.1 动物模型的制作

SPF 级 ICR 雌性小鼠 70 只, 体重 1.8 ~ 2.2 g, 来源于上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2013-0016]。无菌术在复旦大学医学院实验动物部屏障动物实验设施[SYXK(沪)2014-0029]进行并按 3R 原则给予人道关怀。随机分为造模组与对照组(各 35 只)。造模组小鼠于 2 ~ 5 d (day, 日龄)滴喂 5 $\mu\text{L/g}$ 的花生油/卵磷脂/炼乳混合液(体积比 2:0.2:3), 并加入 2.7 $\mu\text{mol/kg}$ 的他莫昔芬(Sigma, T5648-100MG)。所有小鼠每天光照 12 h, 1 ~ 21 d 均由母鼠哺乳饲养, 22 d 起与母鼠分笼, 自由摄食饮水。

1.2 动物分组及药物处理

造模组(M)及对照组(C)按照药物处理的不同各分为 7 个亚组, 每亚组 5 只小鼠。①模型验证组(M1, C1): 49 d 处死, 验证造模是否成功。②褪黑素组(M2, C2): 小鼠 50 d 起予褪黑素(上海源叶生物, Z01022LA13) 100 μg 灌胃, 共 10 d。③全量抑那通组(M3, C3): 小鼠 50 d, 予醋酸亮丙瑞林(上海源叶生物, TL0249-25MG) 20 μg 皮注处理, 51 ~ 71 d 予生理盐水 75 μg 灌胃。④全量抑那通后达英组(M4, C4): 小鼠 50 d, 予醋酸亮丙瑞林 20 μg 皮注处理, 51 ~ 71 d 予达英-35 75 μg 灌胃。⑤半量抑那通组(M5, C5): 小鼠 50 d, 予醋酸亮丙瑞林 10 μg 皮注处理, 51 ~ 71 d 予生理盐水 75 μg 灌胃。⑥半量抑那通后达英组(M6, C6): 小鼠 50 d, 予醋酸亮丙瑞林 10 μg 皮注处理, 51 ~ 71 d 予达英-35 75 μg 灌胃。⑦空白组(M7, C7): 小鼠 50 d 时, 予生理盐水每只 20 μg 皮注处理。

1.3 动情周期检测

随机选择造模组与对照组各组 10 只小鼠, 于 42、70 d, 连续 5 d 行阴道脱落细胞法以瑞氏染液染色观察其动情周期。

1.4 组织形态学观察

M1、C1 组于 49 d、余亚组于 75 d 摘除双侧眼球取血后处死, 取小鼠子宫石蜡包埋后行 HE 染色, 光学显微镜下观察肌层是否出现内膜成分浸润并拍照。

1.5 酶联免疫吸附法检测 5-HT 值

采用双抗体夹心 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, 酶联免疫吸附测定) 法检测小鼠血

清中 5-HT 水平。比色法测定 A (optical density, 光密度) 值, 通过标准曲线得到细胞因子的质量浓度 (ng/L)。试剂盒(北京城林生物, E-20434)。

1.6 免疫组化法检测小鼠子宫 NGF, NF, GnRH-R 的表达

免疫组化法检测小鼠子宫 NGF (Ab6199, 1:100), NF (Ab24574, 1:100), GnRH-R (Ab183079, 1:30) 的表达, 抗体均购自 Abcam 公司。两位研究者双盲阅片, 读取 400 倍视野中 PP 值 (percentage of positive cells, 阳性细胞百分比) (0: 0% ~ 25%; 1: 26% ~ 50%; 2: 51% ~ 75%; 3: > 75%) 及 SI 值 (staining intensity, 染色强度) (0 = 阴性, 1 = 弱阳性, 2 = 中阳性, 3 = 强阳性), 对于胞核表达指标, 计算 PP 与 SI 乘积, 采用 IRS (immunoreactive score, 免疫反应积分法) 系统进行评分; 对于胞质表达指标, 根据 SI 得出 IHC-score (immunohistochemical score, 免疫组化评分)。

2 结果

2.1 小鼠建模情况

70 只小鼠中, M5 组死亡 1 只, M7 组死亡 1 只, 病检未及明显异常, 余小鼠无死伤。各组小鼠子宫外形未见明显异常。以腺体或间质成分侵入子宫肌层诊断为小鼠子宫腺肌病。不同疾病进展的 HE 染色结果如图 1 所示, A、B、C、D 分别提示无腺肌病, 轻、中、重度腺肌病。对照组 35 只小鼠均未发展为腺肌病。造模组中, M1 组 5 只小鼠均发展为腺肌病(轻度 1, 中度 4), 造模成功率 100%。随着时间推移, M7 组小鼠腺肌病进展, 4 只小鼠均为重度腺肌病。经不同药物治疗后, M2-M6 组小鼠腺肌病病情较 M7 组均有所缓解, 甚至 M4 组中一只小鼠达到病理性治愈。具体造模情况为: M2 组(轻度 1, 中度 3, 重度 1), M3 组(轻度 1, 中度 4), M4 组(无病 1, 轻度 1, 中度 1, 重度 2), M5 组(轻度 1, 重度 3), M6 组(轻度 1, 中度 3, 重度 1)。

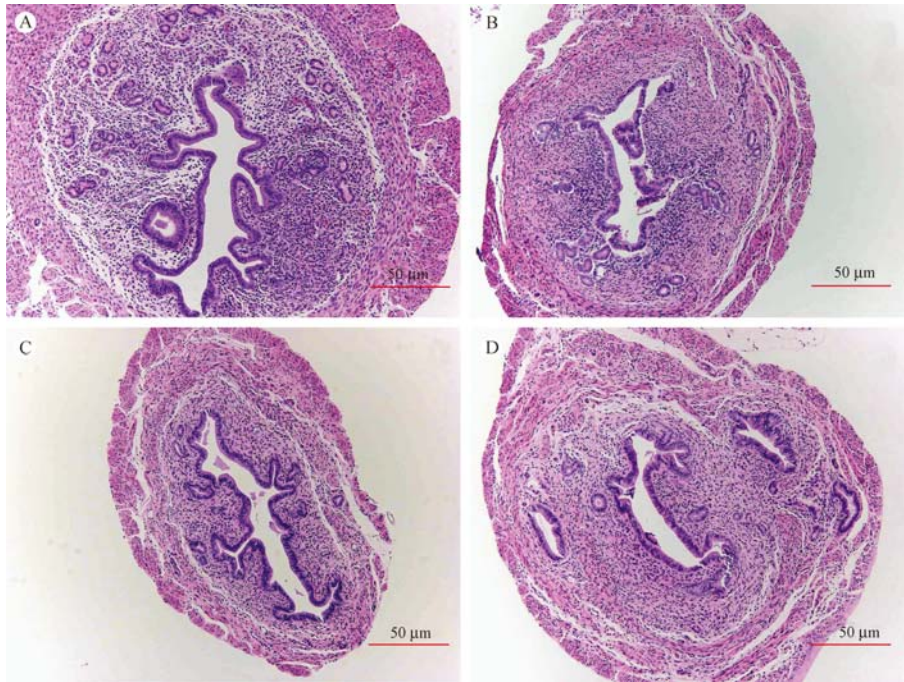
2.2 小鼠动情周期

小鼠动情周期为 4 ~ 6 d。本文连续 5 d 检测小鼠动情周期, 以 5 d 内出现 2 个及以下相为异常。统计后发现, 42 d, 对照组动情周期异常比例为 0%, 造模组异常比例为 20%; 70 d, 对照组异常比例为 50%, 造模组异常比例为 30%。42 d, 全量抑那通组异常比例为 0%, 半量抑那通组为 50%; 70 d, 异常比例分别为 25%, 50%。两组差异无显著性。

2.3 小鼠血清 5-HT 水平

由图 2 可见,对照组 5-HT 水平明显高于造模组

($P < 0.001$)。经药物处理后,C2 组 5-HT 水平高于 C7 组,M2 组 5-HT 水平高于 M7 组,但差异无显著性。

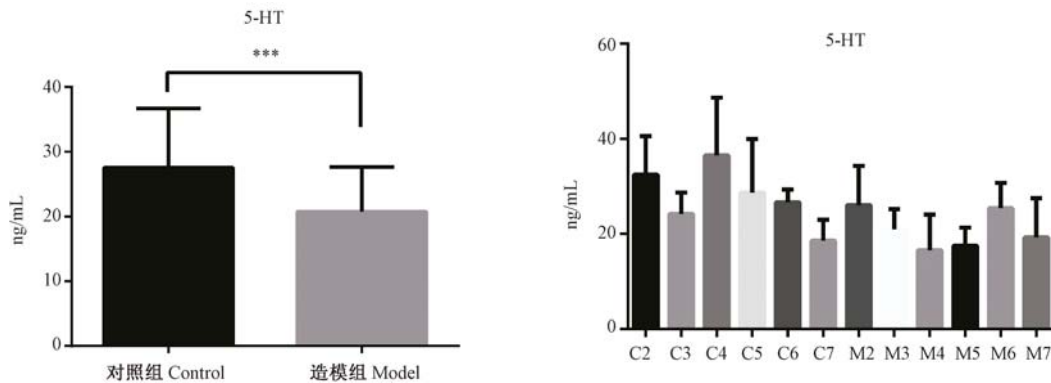


注:A.腺体及间质局限于内膜层;B.仅间质侵入子宫肌层;C.腺体及间质侵入浅肌层;D.腺体及间质侵入深肌层。

图 1 小鼠子宫 HE 染色

Note. A. Glands and stroma are confined to the endometrium; B. Only stroma invades myometrium; C. Glands and stroma invade shallow endometrium; D. Glands and stroma invade deep endometrium.

Fig. 1 Histology of the mouse uteri. HE staining



注:纵坐标:5-HT 浓度;***,对照组与造模组 5-HT 的比较,差异有显著性($P < 0.001$)。

图 2 小鼠血清 5-HT 水平

Note. Ordinate scale: concentration of 5-HT; ***, $P < 0.001$. There was a significant difference for the level of 5-HT between control and model.

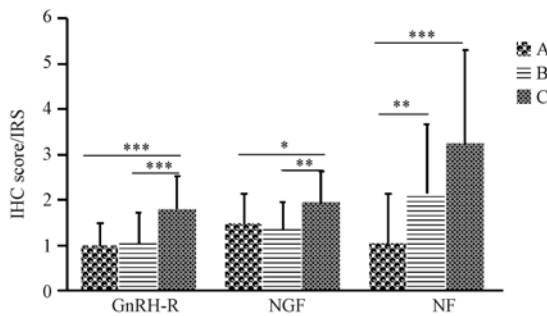
Fig. 2 Serum levels of 5-HT in the mice

2.4 小鼠子宫 NGF、NF、GnRH-R 表达情况

三个指标在在正常内膜及病灶的免疫组化半定量分析如图 3 所示,GnRH-R 在正常内膜($P < 0.001$)、在位内膜($P < 0.001$)的表达水平显著低于异位内膜。NGF 在正常内膜($P < 0.05$)、在位内

膜($P < 0.01$)的表达水平显著低于异位内膜。NF 在正常内膜的表达水平显著低于在位内膜($P < 0.01$)、异位内膜($P < 0.001$)。进一步分析各亚组表达情况,发现经抑那通治疗后,M3、M4、M5、M6 组小鼠在异位内膜 NGF、NF 的表达水平低于 M7 组,

但无统计学差异。经褪黑素治疗后 M2 组小鼠在异位内膜 NF 的表达水平低于 M7 组, 但无统计学差异。



注:纵坐标:免疫组化得分/免疫反应积分;A. 对照组正常内膜;B. 造模组在位内膜;C. 造模组异位内膜;*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ 。GnRH-R 在造模组异位内膜免疫组化评分明显高于对照组正常内膜及造模组在位内膜;NGF 在造模组异位内膜免疫组化评分明显高于对照组正常内膜及造模组在位内膜;NF 在对照组正常内膜免疫反应积分明显低于造模组在位内膜及造模组异位内膜。差异具有显著性。

图 3 GnRH-R、NGF 及 NF 三个指标在小鼠内膜及病灶的免疫组化半定量分析

Note. A. Control (normal endometrium); B. Model (eutopic endometrium); C. Model (ectopic endometrium); Ordinate scale: immunohistochemical score/ immunoreactive score; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. IHC-score for GnRH-R in group C was higher than in group A and group B; IHC-score for NGF in group C was higher than in group A and group B; IRS for NF in group A was higher than in group B and group C.

Fig. 3 Semi-quantitative immunohistochemical analysis of GnRH-R, NGF and NF in endometrium and lesions in the mice

3 讨论

3.1 动物模型

目前国际上主要以小鼠作为腺肌病模型动物。SHN 小鼠腺肌病自发率高,通过垂体-宫腔移植可显著缩短发病时间,加重疾病进展,故常用 SHN 小鼠作为模型动物^[2]。Suzuki^[3]则将临床患者腺肌病组织通过腹腔注射移植到裸鼠体内构造腺肌病小鼠模型。2001 年,Parrott 利用他莫昔芬诱导新生 CD1 小鼠构造腺肌病模型。2005 年,Green^[4]首次使用 ICR 小鼠构造腺肌病模型。因 SHN 系小鼠引进困难,并发症多,利用垂体移植术增加造模难度及小感染概率。故以他莫昔芬诱导新生 ICR 小鼠构造腺肌病这一模型在国内得以普及^[5]。本文于 ICR 小鼠 49

d 时已成功构造腺肌病小鼠模型,75 d 小鼠腺肌病程度进展;对照组小鼠均未出现内膜成分侵入肌层。故本文利用他莫昔芬造模成功,腺肌病严重程度与造模后时间有关。M2-M6 组小鼠腺肌病程度不一,内膜成分侵入肌层程度均低于 M7 组,其中 M4 组中一只小鼠子宫肌层完全无内膜成分侵入,提示药物作用后,腺肌病内膜入侵程度得到缓解,甚至病理上治愈。此外,42 d,对照组出现动情周期异常比例为 0%,造模组出现动情周期异常比例为 20%;70 d,对照组出现动情周期异常比例为 50%,造模组出现动情周期异常比例为 30%。提示腺肌病造模后,小鼠出现一定程度动情周期异常。而 70 d 对照组与造模组均出现动情周期紊乱,考虑药物应用所致。

3.2 5-HT 与褪黑素

5-HT 是调节疼痛的重要神经递质,随着疼痛的增加,表达水平下降^[6]。国内学者龚萍等^[7]发现痛经可能系激素与大脑雌孕激素受体结合,引起边缘系统 5-HT 水平下降。而 5-HT 的代谢产物褪黑素,经 Schwertner^[8]研究发现,可用来减轻内异症患者的疼痛。本文首次研究了腺肌病小鼠 5-HT 的表达水平,并使用褪黑素治疗。发现对照组小鼠 5-HT 水平明显高于造模组。经褪黑素治疗小鼠(C2、M2 组)的 5-HT 水平高于空白组(C7、M7),但其水平无统计学差异,可能与样本较小有关。相比空白组(M7),经褪黑素处理的小鼠,腺肌病严重程度较轻(见表 1),疼痛缓解,M2 组在异位内膜 NF 的表达水平低于 M7 组(无统计学差异)。本文大胆推测,5-HT 低表达与腺肌病疼痛密切相关,其代谢产物的应用可提高 5-HT 水平,抑制腺肌病疾病进展,减缓疼痛。

3.3 NGF、NF

NGF 本身是一种疼痛介质,随着腺肌病疼痛程度的加重,其表达水平不断升高^[9-11]。研究表明,NGF 可增加靶器官对疼痛的敏感性,可营养交感神经神经元,营养小感觉神经纤维,介导疼痛发生^[12]。此外 NGF 能够诱导 NF 等的表达,可作为疼痛评估指标之一^[13-15]。目前,有关腺肌病 NGF、NF 的研究较少。本研究检测了造模组与对照组小鼠用药后 NGF、NF 的表达情况,发现:NGF、NF 在腺肌病异位内膜中呈高表达,在正常内膜中呈低表达,而在腺肌病在位内膜中,NGF 呈低表达,NF 呈高表达。Yang^[16]实验得出,脂质体介导的 NGF 基因转染仅能增加磷酸化的神经纤丝水平,并不能增加其蛋白总量。考虑 NGF、NF 两者在腺肌病在位内膜、异位内膜的疼痛机制可能不同。子宫腺肌病在位内膜与

异位内膜的分离提纯存在技术难关,目前相关文献仍以免疫组化为主半定量分析蛋白表达,故其疼痛的具体机制、通路,有待进一步探索。

3.4 GnRH-R

GnRH-R 在在位内膜、异位内膜的表达,提示 GnRH 可直接作用并影响靶器官。本文发现,腺肌病小鼠在在位内膜、异位内膜均有 GnRH-R 的表达,与文献相符^[17],其在异位内膜的表达水平明显高于在位内膜,提示腺肌病疾病的进展伴随 GnRH-R 表达水平的改变。在抑那通治疗后,M3、M4 组小鼠疾病缓解,在经达英-35 后续处理后,M4 组中有一只小鼠甚至达到病理治愈。M3、M4 组小鼠子宫异位内膜 NF 的表达水平低于 M7 组(无统计学意义),提示 GnRH 可一定程度上缓解腺肌病进展。临床上 GnRH-a 应用广泛,可以有效缓解子宫腺肌病相关症状,但长期应用易出现更年期等副反应。在位内膜及异位内膜均存在 GnRH-R,这为低剂量 GnRH-a 的应用提供了理论依据。在低剂量抑那通治疗后,M5、M6 组小鼠疾病得到一定程度控制,M5、M6 组小鼠子宫异位内膜 NF 的表达水平低于 M7 组(无统计学意义),提示半量抑那通可也缓解腺肌病进展。鉴于小鼠卵巢较小本文未行卵巢切除及相关功能检查,且处死小鼠时无法保证所有小鼠处于动情间期,故未对其内分泌水平进行检测。本文随机抽取对照组与造模组各 10 只小鼠,检测其 5 d 动情周期的变化,发现 70 d M3、M4 组出现动情周期异常比例为 25%,而 M5、M6 组出现动情周期异常比例为 50%。并未能提示半量抑那通对动情周期影响小,可能与样本量相关。是否能够有效控制腺肌病症状,同时减少副反应,有待进一步推广研究。

总之,本文利用他莫昔芬法成功建立腺肌病小鼠模型,该法易于操作,成功率高。与全量抑那通相似,半量抑那通可一定程度上减缓腺肌病进展,改善小鼠疼痛,但对动情周期的影响无明显优势。全量抑那通后序贯使用达英-35 可巩固其疗效,甚至达到病理性治愈。5-HT 在腺肌病疼痛机制中可能发挥一定作用,其代谢产物褪黑素可在一定程度上改善疼痛,减缓疾病进展。

参 考 文 献

[1] Wang F, Shi X, Qin X, et al. Expression of CD56 in patients with adenomyosis and its correlation with dysmenorrhea [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2015,194: 101 - 105.

[2] Greaves P, White IN. Experimental adenomyosis[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006, 20(4): 503 - 510.

[3] Suzuki-Kakisaka H, Murakami T, Hirano T, et al. Selective ac-

cumulation of PpIX and photodynamic effect after aminolevulinic acid treatment of human adenomyosis xenografts in nude mice [J]. *Fertil Steril*, 2008, 90(4 Suppl): 1523 - 1527.

[4] Green AR, Styles JA, Parrott EL, et al. Neonatal tamoxifen treatment of mice leads to adenomyosis but not uterine cancer [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2005, 56(4 - 5): 255 - 263.

[5] 李雁, 张绍芬, 夏贤, 等. 口服他莫昔芬法建立 ICR 小鼠子宫腺肌病模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5): 345 - 350, 插 3.

[6] Bardin L. The complex role of serotonin and 5-HT receptors in chronic pain [J]. *Behav Pharmacol*, 2011, 22(5 - 6): 390 - 404.

[7] 龚萍, 张明敏, 江利明, 等. 原发性痛经患者 18F-FDG PET 脑显像研究 [J]. *中华核医学杂志*, 2006, 26(2): 114.

[8] Schwertner A, Conceicao DSC, Costa GD, et al. Efficacy of melatonin in the treatment of endometriosis: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Pain*, 2013, 154(6): 874 - 881.

[9] Lertvikool S, Sukprasert M, Pansrikaew P, et al. Comparative study of nerve fiber density between adenomyosis patients with moderate to severe pain and mild pain [J]. *J Med Assoc Thai*, 2014, 97(8): 791 - 797.

[10] Li Y, Zhang SF, Zou SE, et al. Accumulation of nerve growth factor and its receptors in the uterus and dorsal root ganglia in a mouse model of adenomyosis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2011, 9: 30.

[11] 李雁, 张绍芬, 许琳娜. 子宫腺肌病病灶神经生长因子蛋白表达变化与神经植入及盆腔疼痛的关系 [J]. *中华妇产科杂志* 2014,49(2): 120 - 124.

[12] Apfel SC. Neurotrophic factors and pain [J]. *Clin J Pain*, 2000,16(2 Suppl): S7 - S11.

[13] 陈景伟, 仝瑞晓, 杨剑, 等. 补肾温阳化瘀方对实验性子宫内位异位症 TRPV1 及其致敏因子 NGF 的影响 [J]. *中国中西医结合杂志* 2015, 35(6): 717 - 723.

[14] Zevallos HB, McKinnon B, Tokushige N, et al. Detection of the pan neuronal marker PGP9.5 by immuno-histochemistry and quantitative PCR in eutopic endometrium from women with and without endometriosis [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 291(1): 85 - 91.

[15] Schimmelpfeng J, Weibezahn K F, Dertinger H. Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth [J]. *J Neurosci Methods*, 2004,139(2): 299 - 306.

[16] Yang K, Xue JJ, Qiu YH, et al. Cationic lipid-mediated NGF gene transfection increases neurofilament phosphorylation [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996, 43(1 - 2): 13 - 20.

[17] Borroni R, Di Blasio AM, Gaffuri B, et al. Expression of GnRH receptor gene in human ectopic endometrial cells and inhibition of their proliferation by leuprolide acetate [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000,159(1 - 2): 37 - 43.

[收稿日期] 2016-04-11