

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.011

## 米非司酮对大鼠子宫内膜异位病灶中 COX-2 及 VEGF 表达的影响\*

南燕,李玉洁<sup>△</sup>

(新乡医学院第三附属医院妇产科,河南新乡 453003)

**[摘要]** **目的** 探讨不同剂量米非司酮对大鼠子宫内膜异位症的疗效及对病灶中环氧化酶-2(COX-2)、血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 采用在位于子宫内膜局部种植的方法制造子宫内膜异位症大鼠模型,将 112 只成功造模大鼠随机分为对照组,米非司酮低剂量组、中剂量组、高剂量组。各组以不同浓度米非司酮灌胃 4 周后比较病灶体积,并取异位子宫内膜组织检测 COX-2、VEGF mRNA 水平。**结果** 造模成功后异位内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 的表达水平较造模前在位内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 的表达明显升高( $P<0.05$ )。与对照组比较,米非司酮治疗组大鼠异位病灶体积均缩小,其中高剂量组更明显( $P<0.05$ );不同剂量治疗组异位内膜组织 COX-2、VEGF mRNA 表达均较对照组下降( $P<0.05$ ),高剂量组更加明显( $P<0.05$ )。COX-2 mRNA 和 VEGF mRNA 的表达呈正相关( $r=0.782, P<0.05$ )。**结论** 米非司酮可有效改善大鼠子宫内膜异位症症状,其作用机制可能通过下调大鼠子宫内膜异位病灶中 COX-2、VEGF 表达,抑制病灶的进展,其作用呈浓度依赖性。

**[关键词]** 子宫内膜异位症;米非司酮;环氧化酶 2;血管内皮生长因子 A

**[中图分类号]** R71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0942-03

### Effect of mifepristone on expressions of COX-2 and VEGF in rat endometriosis\*

NAN Yan, LI Yujie<sup>△</sup>

(Department of Gynaecology and Obstetrics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

**[Abstract]** **Objective** To discuss the curative effect of different doses of mifepristone on rat endometriosis and its influence on expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in lesions. **Methods** The endometriosis rat model was made by adopting the endometrial local implantation. A total of 112 successfully model-constructing rats were randomly divided into the control group, low mifepristone dose group, middle mifepristone dose group and high mifepristone dose group. Each group was given the gavage by different concentrations of mifepristone for 4 weeks. Then the endometriosis tissue was taken for detecting the expression levels of COX-2 and VEGF mRNA. **Results** After successfully modeling, the expression levels of COX-2 mRNA and VEGF mRNA in ectopic endometrial tissue were significantly increased compared with those before modeling ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the volume of ectopic lesions in the mifepristone treatment group was all reduced, which in the high dose group was more obvious ( $P<0.05$ ). The COX-2 and VEGF mRNA expressions of ectopic endometrial tissue in different doses of group was decreased compared with the control group ( $P<0.05$ ), while which in the high dose group was more obvious ( $P<0.05$ ). COX-2 mRNA was positively correlated with VEGF mRNA expression ( $r=0.782, P<0.05$ ). **Conclusion** Mifepristone can effectively improve the symptoms of rat endometriosis. Its mechanism may down-regulate the expression of COX-2 and VEGF in endometriosis lesion and inhibit the lesion progress, and its role shows the concentration dependence.

**[Key words]** endometriosis; mifepristone; COX-2; Vascular endothelial growth factor A

子宫内膜异位症是一种常见的良性妇科病症,以慢性盆腔痛、性交痛、不孕、月经失调等为主要临床表现,对生育期女性的健康造成严重不良影响,在不孕患者中发病率高达 25%~50%<sup>[1]</sup>,但其作用机制尚未

阐明,临床治疗难度较大,近些年来该病的发病率呈逐年上升的趋势。目前临床上治疗子宫内膜异位症的方法多种多样,但是只有彻底明确药物治疗的作用机制,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症的疗效,以及环氧合酶-2(COX-2)与血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 8 周龄健康雌性 SD 大鼠,体重 200~220 g,由新乡医学院实验动物中心提供,在室温 18~26 ℃、相对湿度 40%~70%的环境内饲养,自由饮水、饮食。通过阴道脱落细胞检查确认均为处于发情期的性成熟大鼠。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组 用 10%水合氯醛给予 SD 大鼠腹腔注射麻醉,在腹部正中做长约 2 cm 的纵行切口。分离大鼠子宫,切断中部的一段子宫,两端结扎。然后将管状子宫剪切成两块子宫片段,大小均为 5 mm×4 mm,其中一部分保存在-80 ℃冰箱冻存,另一部分缝合于腹部切口处腹肌与皮下筋膜层之间,常规关腹。术后每天观察腹部切口及包块情况,4 周后再次开腹,可见移植病灶体积明显增大,并有液体积聚的透明小泡,囊壁表面有新生血管形成,HE 染色显微镜下观察可见腺体及间质细胞,说明造模成功<sup>[2]</sup>。建模成功的 112 只大鼠分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 28 只。

1.2.2 药物及剂量 采用米非司酮原药粉,由浙江仙琚制药公司提供。低、中、高剂量分别对应临床用药 10、12.5、25 mg/d,根据实验动物学药物换算公式:大鼠用药剂量=(用药剂量/60 kg)×大鼠体质量(kg)×6.25,进行计算后得出低剂量组给药剂量为 1.041 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,中剂量组给药剂量为 1.24 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,高剂量组给药剂量为 2.604 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。将米非司酮原药粉与花生油进行融合,形成 1 mg/mL 混悬液后灌胃,对照组仅给予 1 mL 花生油灌胃。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 异位内膜病灶体积变化 建模成功后用游标卡尺测量异位囊肿的长、宽、高,根据公式 V=0.52×长×宽×高<sup>[3]</sup>,计算体积 V1。灌胃治疗 4 周后,再次剖腹测量并计算异位囊肿的体积 V2,处死大鼠取异位病灶组织,放入-80 ℃冻存。

1.2.3.2 RT-PCR 法检测 COX-2、VEGF 的表达水平 Trizol 裂解细胞,检测并计算出 RNA 的浓度和纯度,反转录后进行 PCR,条件为 94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 40 个循环,72 ℃再延伸 7 min,4 ℃保存。COX-2 上游引物:5'-AGA AGT TGA TAA TCG GGT AGT C-3',下游引物:5'-CCT AGT GAA GGA TGG GTC-3'; VEGF 上游引物:5'-ATC TTC AAG CCG TCC TGT GTG-3',下游引物:5'-TTC TCC GCT CTG AAC AAG GC-3';GAPDH 上游引物:5'-GGC AAG TTC

AAG GCA CAG-3',下游引物:5'-GCC AGT AGA CTC CAC GAC AT-3'。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算出 COX-2、VEGF mRNA 表达<sup>[4]</sup>。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用配对 t 检验和单因素方差分析,以及 Pearson 相关性分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 造模前后两种内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 的表达情况 造模成功后大鼠腹壁异位内膜组织中 COX-2 mRNA、VEGF mRNA 的表达水平较造模前在位内膜组织明显升高(P<0.05),见表 1。

表 1 造模前后不同内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | COX-2 mRNA  | VEGF mRNA   |
|------|-------------|-------------|
| 在位内膜 | 0.700±0.040 | 0.827±0.038 |
| 异位内膜 | 2.888±0.040 | 3.116±0.036 |
| t    | -242.922    | -313.336    |
| P    | 0.014       | 0.000       |

2.2 各组大鼠异位内膜病灶体积变化 治疗后,与对照组比较,其他 3 组异位内膜病灶体积明显缩小,差异有统计学意义(P<0.05);米非司酮各治疗组治疗后较治疗前均有缩小,差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

表 2 各组大鼠异位内膜病灶体积变化( $\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$ )

| 组别   | n  | V1            | V2                          | t       | P     |
|------|----|---------------|-----------------------------|---------|-------|
| 对照组  | 28 | 163.821±8.374 | 160.432±5.227               | -51.730 | 0.068 |
| 低剂量组 | 28 | 159.442±7.861 | 40.385±3.894 <sup>a</sup>   | 30.406  | 0.000 |
| 中剂量组 | 28 | 158.798±8.993 | 37.576±4.382 <sup>ab</sup>  | 33.205  | 0.000 |
| 高剂量组 | 28 | 158.625±9.492 | 30.734±2.903 <sup>abc</sup> | 38.366  | 0.000 |
| F    |    | 239.522       | 10.661                      |         |       |
| P    |    | 0.085         | 0.000                       |         |       |

<sup>a</sup>:P<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:P<0.05,与低剂量组比较;<sup>c</sup>:P<0.05,与中剂量组比较

表 3 各组大鼠内膜异位组织中 COX-2、VEGF mRNA 表达( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别   | n  | COX-2 mRNA                 | VEGF mRNA                  |
|------|----|----------------------------|----------------------------|
| 对照组  | 28 | 2.948±0.051                | 3.043±0.058                |
| 低剂量组 | 28 | 1.136±0.047 <sup>a</sup>   | 2.121±0.055 <sup>a</sup>   |
| 中剂量组 | 28 | 0.984±0.047 <sup>ab</sup>  | 1.729±0.056 <sup>ab</sup>  |
| 高剂量组 | 28 | 0.859±0.053 <sup>abc</sup> | 1.094±0.058 <sup>abc</sup> |
| F    |    | 856.763                    | 582.384                    |
| P    |    | 0.000                      | 0.000                      |

<sup>a</sup>:P<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:P<0.05,与低剂量组比较;<sup>c</sup>:P<0.05,与中剂量组比较

2.3 各组大鼠 COX-2、VEGF mRNA 表达情况 不

同剂量米非司酮治疗组 COX-2、VEGF mRNA 表达水平均低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随剂量增加呈下降趋势( $P < 0.05$ ),见表 3、图 1。

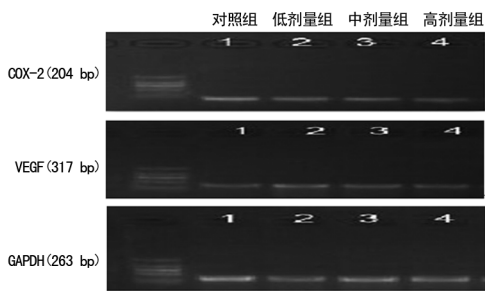


图 1 各组异位内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 的表达

**2.4 Pearson 相关性分析** COX-2 和 VEGF 的表达具有明显的相关性( $r = 0.782, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

子宫内膜异位症是一种激素依赖性疾病,其发病机制目前尚不清楚,可能与年龄、月经周期、口服避孕药等因素相关<sup>[5]</sup>,临床表现主要有盆腔疼痛、月经紊乱及不孕等,且存在恶变的可能<sup>[6]</sup>。根据患者病情严重程度、年龄、有无生育要求及意愿等可选择手术、药物及手术联合药物治疗等方法。目前临床上常用的药物有来曲唑、高效孕激素、促性腺激素释放激素激动剂等<sup>[7]</sup>,但这些药物均有明显不良反应。

米非司酮可拮抗雌、孕激素,以及下调其受体,影响体内多种细胞因子的代谢和产生,如黏附分子、抗侵袭因子、抗血管生成因子等。自 KETTLE 等于 1991 年首次将米非司酮用于临床治疗子宫内膜异位症,已有 20 多年,但其作用机制尚不明确,也无推荐的使用剂量。现有的治疗方案中使用腹腔镜与米非司酮联合治疗子宫内膜异位症,临床疗效好,复发率降低<sup>[8]</sup>。有研究证实雌激素能促进 COX-2 表达,从而诱导 PGE2 的产生,而米非司酮能通过其抗雌激素作用,干扰 PGE2 对异位子宫内膜的刺激作用<sup>[2]</sup>。也有研究表明,米非司酮能使宫内膜腺体及间质中雄激素受体(AR)表达增加,通过高雄激素抑制雌激素的作用。LI 等<sup>[9]</sup>通过大鼠异位症模型证实米非司酮能够降低 COX-2 基因转录,使其蛋白表达下降,从而达到降低前列腺素分泌。BOUCHARD 研究表明:米非司酮可以抑制异位内膜病灶组织在腹腔中的植入及促进凋亡<sup>[10]</sup>。

COX-2 是一种膜结构蛋白,能将花生四烯酸转代谢成各种 PG 产物,多种生长因子、细胞因子、肿瘤启动因子、激素等可诱导 COX-2 产生。研究表明,COX-2 可能和子宫内膜异位症的发生、发展相关,它参与了异位内膜血管的生成。COX-2 对子宫内膜异位症患者异位内膜高表达的机制如下:(1)雌激素可以直接或间接调节 COX-2 表达;(2)异位内膜损伤可产生如 IL-1 和 IL-2 等多种细胞因子,能刺激 COX-2 的表达;(3)子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病,雌激

素可以增加自身抗体合成,但后者能增加上皮细胞 COX-2 的表达。

血管形成是子宫内膜异位症致病和病情进展的重要因素,VEGF 可通过促进血管内皮细胞的增殖,促进血管形成和生长<sup>[11-12]</sup>,作用尤为显著。黎俊伶<sup>[13]</sup>研究证实,VEGF 参与了新生血管内皮细胞的有丝分裂,促进了新生血管的形成能力,与子宫内膜异位症的发病、进展密切相关。秦江霞等<sup>[14]</sup>发现 COX-2、VEGF、MVD 在子宫内膜异位症中的高表达,与在子宫内膜异位的血管生成有关。近期 JANA 等<sup>[15]</sup>发现 MMP-2 参与细胞迁移和侵入,可通过 COX-2-PGE2-pAKT 轴途径促进子宫内膜异位症的血管生成。SUTRISNO 等<sup>[16]</sup>发现 COX-2 可以使肿瘤细胞内的 VEGF 表达上调,可能是通过一系列的转导机制调控了 VEGF 的表达,参与了血管的生成。

本实验结果显示,造模前后在位子宫内膜组织和异位子宫内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 水平明显升高。当给予米非司酮干预后,子宫内膜异位症模型大鼠异位内膜病灶面积明显缩小,说明米非司酮能有效抑制异位内膜的生长和侵袭,这与 BOUCHARD 研究结果一致。异位内膜组织中 COX-2、VEGF mRNA 水平明显降低,说明 COX-2、VEGF 与子宫内膜异位症的发生、发展密切相关,这些结果与秦江霞等的研究也相符。米非司酮对子宫内膜异位症模型大鼠异位内膜病灶的疗效具有剂量依赖性,米非司酮可通过下调 COX-2 的水平减少 VEGF 的生成,从而控制异位病灶蔓延,这也证实了 SUTRISNO 等的推理。本实验证明较短周期的高剂量米非司酮对子宫内膜异位症可取得较好临床疗效,而且米非司酮具有廉价、口服吸收快、生物利用度高、不良反应少等优势,临床应用价值高。但长期大量使用后伴随的药物副作用及药物副反应最低的理想治疗剂量的选取仍需进一步研究。本次实验样本量较小,后期仍需大样本量资料验证,期望为子宫内膜异位症的临床治疗提供动物实验参考。

### 参考文献

- [1] MEULEMAN C, VANDENABEELE B, FIEUWS S, et al. High prevalence of endometriosis in infertile women with normol ovulation and normospermic partners [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(1): 68-74.
- [2] 杨琳,熊英,乔林,等.不同方案米非司酮对大鼠异位子宫内膜基质金属蛋白酶-9 及其组织特异性抑制物-1 表达的影响[J]. *华西医学*, 2013, 28(6): 879.
- [3] GÜNEY M, ORAL B, KARAHAN N, et al. Regression of endometrial ex-plants in a rat model of endometriosis treated with melatonin [J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(4): 934-942.
- [4] YANG M, JIANG C F, HA C F, et al. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 via activation(下转第 948 页)

- late; a systematic review of aspermia and retrograde ejaculation[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(5):1074-1081.
- [8] 宋成, 曾勇, 胡晓东, 等. ICSI 中不同来源精子对临床结局的影响[J]. *中华男科学杂志*, 2009, 15(9):822-824.
- [9] CUI X F, DING P, GAO G, et al. Comparison of the clinical outcomes of intracytoplasmic sperm injection between spermatozoa retrieved from testicular biopsy and from ejaculate in cryptozoospermia patients[J]. *Urology*, 2017, 102(1):106-109.
- [10] TSAI C C, HUANG F J, WANG L J, et al. Clinical outcomes and development of children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using extracted testicular sperm or ejaculated extreme severe oligo-astheno-teratozoospermia sperm; a comparative study[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(3):567-571.
- [11] BEN-AMI I, RAZIEL A, STRASSBURGER D, et al. Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men[J]. *Fertil Steril*, 2013, 99(7):1867-1871.
- [12] INAL H A, KAHYAOGU I, TURKKANI A, et al. Retrospective comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes of sperm retrieved from a testicular biopsy and freshly ejaculated semen in oligozoospermia[J]. *Rev Int Androl*, 2018, 16(4):131-136.
- [13] AMIRJANNATI N, HEIDARI-VALA H, AKHONDI M A, et al. Comparison of intracytoplasmic sperm injection outcomes between spermatozoa retrieved from testicular biopsy and from ejaculation in cryptozoospermic men[J]. *Andrologia*, 2012, 44(Suppl 1):704-709.
- [14] NARU T, SULAIMAN M N, KIDWAI A, et al. Intracytoplasmic sperm injection outcome using ejaculated sperm and retrieved sperm in azoospermic men[J]. *Urol J*, 2008, 5(2):106-110.
- [15] ESTEVES S C, SÁNCHEZ-MARTÍN F, SÁNCHEZ-MARTÍN P, et al. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm[J]. *Fertil Steril*, 2015, 104(6):1398-1405.
- [16] MOSKOVITSEV S I, JARVI K, MULLEN J, et al. Testicular spermatozoa have statistically significantly lower DNA damage compared with ejaculated spermatozoa in patients with unsuccessful oral antioxidant treatment[J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4):1142-1146.
- [17] HENKEL R, BASTIAAN H S, SCHUELLER S, et al. Leucocytes and intrinsic ROS production May be factors compromising sperm chromatin condensation status[J]. *Andrologia*, 2010, 42(2):69-75.
- [18] GRECO E, SCARSELLI F, IACOBELLI M, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(1):226-230.
- [19] SHIVA M, GAUTAM A K, VERMA Y, et al. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(4):319-324.

(收稿日期:2018-10-16 修回日期:2018-12-08)

(上接第 944 页)

- of the osteopontin induced by estrogen correlates with migration of endometrial epithelial cells in endometriosis[J]. *Chin General Prac*, 2016, 19(5):554-559.
- [5] 蔡柏岑, 周应芳. 子宫内膜异位症临床特点及相关因素分析[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2014, 28(5):483-484.
- [6] MELIN A, SPARÉN P, PERSSON I, et al. Endometriosis and the risk of Cancer with special emphasis on ovarian Cancer[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(5):1237-1242.
- [7] 李荣. 子宫内膜异位症的诊治进展[J]. *医学综述*, 2013, 19(13):2409-2411, 2417.
- [8] 李梅. 腹腔镜与米非司酮联合治疗子宫内膜异位症的疗效观察[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(25):4394.
- [9] 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.
- [10] BOUCHARD P, CHABBERT-BUFFET N, FAUSER B C. Selective progesterone receptor modulators in reproductive medicine: pharmacology, clinical efficacy and safety[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(5):1175-1189.
- [11] GUO Y, CHEN Y, LIU L B, et al. IL-22 in the endometriotic milieu promotes the proliferation of endometrial stromal cells via stimulating the secretion of CCL2 and IL-8[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(10):2011-2020.
- [12] 尉伟东, 阮菲, 余飞霞, 等. 细胞因子信号传导抑制物-3 和 caspase-3 在子宫内膜异位症中的表达及其相关性[J]. *中华病理学杂志*, 2013, 42(8):515-518.
- [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] 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.
- [15] JANA S, CHATTERJEE K, RAY A K, et al. Regulation of Matrix Metalloproteinase-2 Activity COX-2-PGE2-pA-KT Axis Promotes Angiogenesis in Endometriosis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10):e0163540.
- [16] SUTRISNO S, MASTRYAGUNG D, KHAIRIAH R, et al. The effects of genistein on estrogen receptor expression, cell proliferation, and apoptosis in endometriosis cell culture[J]. *Iet Control Theory Applications*, 2014, 4(3):205.

(收稿日期:2018-10-28 修回日期:2018-12-16)