

• 药理 •

大鼠子宫肌瘤两种模型比较与免疫功能的相关性研究

李建荣*, 吴兰生, 张广平

(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 比较雌激素和雌、孕激素合用所致大鼠子宫肌瘤模型与其免疫功能的相关性。方法: 分别以雌激素和雌、孕激素肌肉注射造成大鼠子宫肌瘤模型, 并在此模型上观察大鼠免疫器官, 用流式细胞仪测定其T细胞表面分化群CD₃、CD₄和CD₄/CD₈的水平, 用放射配体结合分析法测定雌激素受体水平。结果: 雌、孕激素致大鼠子宫肌瘤模型表现出其免疫器官胸腺重量降低; CD₃、CD₄和CD₄/CD₈明显降低, CD₈明显升高; 雌激素及其受体水平升高。结论: 雌、孕激素致子宫肌瘤模型大鼠表现为免疫功能明显低下, 雌激素受体水平是其主要影响因素之一。

[关键词] 子宫肌瘤模型; 免疫功能; CD-细胞; 雌激素受体; 大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)07-0024-04

The Relation Between Immune Function and the Model of Hysteromyoma in Rat

LI Jian-rong*, WU Lan-sheng, ZHANG Guang-ping

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Traditional Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** The relation between immune function and the model of hysteromyoma of rat were studied. **Method:** Rats were injected with diethyl 1 stilbestrol, and progesterone and diethyl stilbestrol together. The immune organs were observed, levels of CD₃, CD₄ and CD₄/CD₈ in serum were measured by flow cytometer; estrogen receptor was analyzed by radioligand combination assay. **Result:** Compared with normal group, the weight of thymus, the levels of CD₃, CD₄ and CD₄/CD₈ of model group injected with diethyl stilbestrol and progesterone was significantly increased. **Conclusion:** It is suggested that the low immunologic functions in model rats with estrogen and progesterone together was lower, might be related to the levels of estrogen receptor.

[Key words] The model of hysteromyoma; Immune function; CD-cell; Estrogen receptor; Rat

目前文献报道, 大鼠子宫肌瘤模型有单用雌激素(以下简称单模)和雌、孕激素合用^[1,2](以下简称双模)两种造模方法, 我们在对该两种模型进行比较研究时发现, 随着造模时间的延长, 大鼠的免疫功能呈下降趋势。本文报道大鼠子宫肌瘤模型与免疫功

能低下相关性研究结果。

1 材料

1.1 药物与试剂 苯甲酸雌二醇注射液: 1mg/mL, 上海第九制药厂生产, 批号: 20021102; 黄体酮注射液: 20mg/mL, 上海通用药业有限公司生产, 批号 030601; CD₃、CD₄、CD₈ 抗体: FITC-CD₃ (61473)、PE-CD₄ (51859)、PECY5-CD₈ (61575), 碘¹²⁵I 雌二醇放射免疫试剂盒: 北京北免东雅生物技术研究所生产, 批号: 031125; DES (己烯雌酚): Sigma 产品, 货号 D-4628; E₂ 标记底物: 北京百安肽生物技术研究所, 比活度: 51.8MBq/mg, 批号: 20031220; 考马斯亮兰蛋白

[收稿日期] 2005-12-05

[基金项目] 科技部创新药物和中药现代化项目
(2002AA2Z3225)

[通讯作者] 李建荣, Tel: (010) 64056575; E-mail:
Jrongliem@sina.com

测定试剂盒: 南京建成生物工程研究所生产, 批号: 20031210。

1.2 动物 大鼠, SD 种, SPF 级, 雌性, 体重 200~250g, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(京)2002-0003。

1.3 仪器 DFM-96 型 16 管放射免疫 r 计数器: 合肥核仪器厂制造; 紫外双波长分光光度仪: UV-3000, 日本岛津公司制造; r 计数: FT-6030, 西安核仪器厂制造; 流式细胞仪: EPICS-XL, 美国 Coulter 公司制造。

2 试验方法

取成年雌性未孕大鼠, 随机分为正常对照组、雌激素模型组(单模组)和雌、孕激素模型组(双模组), 每组 30 只。除正常对照组外均肌肉注射苯甲酸雌二醇, 0.2mg/只, 3 次/周, 连续注射 3 个月。双模组于造模 3 个月后加黄体酮 1.5mg/只肌注, 2 次/周, 连续注射 1 个月。于造模 2, 3, 4 个月, 各组分别取 10 只大鼠, 以 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (1mL/kg), 称重, 腹主动脉取血, 离心得血清, 按照放射免试剂盒方法测雌二醇 (E₂) 水平; 取肝素钠抗凝全血 100μL 置一次性试管中, 每管加入用 PBS 稀释的 CD₃/CD₄/CD₈ 10μL, 0.25~0.5μg/test, 混匀, 于 4℃温箱放置 30min, 加溶解人 RBC 液, 每管 3mL, 混匀, 离心 1000 r·min⁻¹ × 3min, 加入 PBS 缓冲溶液 5mL, 混匀, 离心 1000r·min⁻¹ × 2min, 进行 2~3 遍, 300 目尼龙网过滤, 加入生理盐水 2~3mL, 流式细胞仪检测; 取胸腺和脾脏, 计算脏器系数, 取子宫、卵巢迅速称重, 用放射配体结合分析法^[3]测定雌激素受体水平; 做病理组织检查。

3 试验结果

3.1 两种子宫肌瘤模型大鼠子宫和卵巢重量的变化 与正常对照组比较, 随造模时间延长, 单模组和双模组大鼠的子宫重量增加, 卵巢重量减轻, 造模 90d 时子宫和卵巢的重量变化最明显。造模 120d 双模组大鼠给予孕激素后, 其子宫重量增加显著, 卵巢重量有明显降低。见表 1, 2。

3.2 两种子宫肌瘤模型大鼠胸腺和脾脏重量的变化 与正常对照组比较, 随造模时间延长, 单模和双模组大鼠的胸腺和脾脏重量出现下降趋势; 造模 90d, 单模和双模组大鼠的胸腺重量继续呈下降趋势, 与正常对照组比较无显著性差异, 脾脏重量明显降低; 造模 120d, 双模组大鼠的胸腺和脾脏重量明显

降低, 与正常组比较差异显著。见表 3, 4。

表 1 造模不同时间大鼠卵巢系数的变化($\bar{x} \pm s, n=10, g/100g$)

组别	剂量(mg/只) 雌二醇+ 黄体酮	造模 60d	造模 90d	造模 120d
正常组	—	0.5332 ± 0.1098	0.4478 ± 0.0781	0.3030 ± 0.0541
单模组	0.2	0.4473 ± 0.8526	0.1870 ± 0.0518 ¹⁾	—
双模组	0.2+ 1.5	0.4318 ± 0.9432	0.1893 ± 0.0156 ²⁾	0.1608 ± 0.0628 ¹⁾

注: 与正常组比较: ¹⁾ P < 0.05; ²⁾ P < 0.01(下同)。

表 2 造模不同时间大鼠子宫系数的变化($\bar{x} \pm s, n=10, g/100g$)

组别	剂量(mg/只) 雌二醇+ 黄体酮	造模 60d	造模 90d	造模 120d
正常组	—	1.8137 ± 0.3534	1.5490 ± 0.2569	1.2220 ± 0.1360
单模组	0.2	2.7932 ± 0.7316 ²⁾	2.4160 ± 0.5510 ¹⁾	—
双模组	0.2+ 1.5	2.8705 ± 0.5604 ²⁾	2.4900 ± 0.1747 ²⁾	2.3040 ± 0.3980 ¹⁾

表 3 造模不同时间大鼠胸腺系数的变化($\bar{x} \pm s, n=10, g/100g$)

组别	剂量(mg/只) 雌二醇+ 黄体酮	造模 60d	造模 90d	造模 120d
正常组	—	0.0801 ± 0.0251	0.0836 ± 0.02020	0.0707 ± 0.0148
单模组	0.2	0.0757 ± 0.0203	0.0712 ± 0.0215	—
双模组	0.2+ 1.5	0.0744 ± 0.0255	0.0695 ± 0.0265	0.0393 ± 0.0126 ¹⁾

表 4 造模不同时间大鼠脾脏系数的变化($\bar{x} \pm s, n=10, g/100g$)

组别	剂量(mg/只) 雌二醇+ 黄体酮	造模 60d	造模 90d	造模 120d
正常组	—	0.2201 ± 0.0236	0.2071 ± 0.0179	0.1910 ± 0.0162
单模组	0.2	0.2096 ± 0.0195	0.1879 ± 0.0214 ¹⁾	—
双模组	0.2+ 1.5	0.2083 ± 0.0223	0.1747 ± 0.0149 ¹⁾	0.1612 ± 0.0345 ¹⁾

3.3 子宫肌瘤模型大鼠子宫病理组织学的变化 造模 60d, 两模型组仅有少数动物子宫出现病变; 造模 90d, 两模型组多数动物子宫出现病变; 造模 120d, 两模型组全部动物子宫均出现不同程度地明显病变, 子宫壁明显增厚, 宫腔内有少许清亮或淡黄色液体流出。随造模时间的延长, 子宫的病变程度明显增加, VG 染色的颜色逐渐加深。主要病理学变化为肌细胞肥大, 排列较紊乱, 肌层呈不均匀增厚, 显示平滑肌条索状为主, 排列方向呈旋涡, 细胞核呈长杆状, 有个别平滑肌细胞呈圆形或多边形, 部分动物的子宫肌间质有明显出血、子宫肌层有红色变性。造模 120d, 双模组动物的病变程度明显强于单模组。见表 5。

表 5 不同造模时间大鼠子宫病变程度比较

组别	造模 60d (n= 5)					造模 90d (n= 5)					造模 120d (n= 10)				
	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
正常组	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	10	0	0	0	0
单模组 ¹⁾	0	3	2	0	0	0	0	3	2	0	0	0	4	6	0
双模组 ¹⁾	0	3	2	0	0	0	0	4	1	0	0	0	3	4	3

分级标准:“-”:子宫肌层未见增厚,未见有炎性浸润,结构正常。“+”:子宫肌层增厚不明显,轻度炎性浸润。“++”:子宫肌层轻度增厚,炎性细胞浸润较明显,以中性分叶核为主。“+++”:子宫肌层明显增厚,炎性细胞浸润较重。“++++”:子宫肌层明显增厚,肌细胞排列紊乱,弥漫性炎细胞浸润。

3.4 子宫肌瘤模型大鼠 T 细胞表面分化群的变化

结果显示,与正常对照组比较,双模组大鼠 T 细胞表面分化群 CD₃、CD₄ 和 CD₄⁺/CD₈⁺ 明显降低,CD₈ 明显升高,但单模组与正常对照组比较无显著性差异,见表 6。

表 6 子宫肌瘤模型大鼠 T 细胞表面分化群的变化($\bar{x} \pm s, n= 10$)

组别	剂量(mg/只) 雌二醇+ 黄体酮	CD ₃	CD ₄	CD ₈	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
		%	%	%	
正常对照	-	59.3 ± 7.19	43.0 ± 5.03	16.3 ± 3.31	2.71 ± 0.53
单模	0.2	49.2 ± 8.47	27.2 ± 9.46	21.9 ± 3.53	1.30 ± 0.58
双模	0.2+ 1.5	43.6 ± 5.58 ¹⁾	21.3 ± 5.56 ¹⁾	22.3 ± 3.98 ¹⁾	0.99 ± 0.33 ¹⁾

3.5 子宫肌瘤模型大鼠雌激素及其受体(ER)水平的变化

结果显示,与正常对照组比较,单模和双模两种造模方法所致大鼠的雌二醇水平均明显升高,双模组大鼠的雌激素受体水平明显升高,单模组大鼠的雌激素受体水平则与正常组比较无显著性差异。即单、双模组大鼠的雌二醇水平无显著性差异,但双模法造模大鼠的雌激素受体水平明显高于单模法造模大鼠,见表 7。

表 7 子宫肌瘤模型大鼠血清雌激素及其子宫雌激素受体水平的变化($\bar{x} \pm s, n= 10$)

组别	剂量(mg/只) 雌二醇+ 黄体酮	雌激素受体(ER)	雌二醇(E ₂)
		/pmol·gprot ⁻¹	/pg·mL ⁻¹
正常组	-	44.40 ± 19.65	34.74 ± 11.84
单模组	0.2	41.40 ± 21.09	56.41 ± 17.55 ¹⁾
双模组	0.2+ 1.5	66.20 ± 18.01 ¹⁾	65.15 ± 19.45 ¹⁾

4 讨论

4.1 我们在对单模和双模两种子宫肌瘤模型的造模方法进行比较研究时发现,随造模时间的延长,大鼠的免疫器官胸腺和脾脏的重量出现变化,双模法对胸腺重量的影响较大。进一步对该两种造模动物 T 细胞表面分化群进行观察的结果显示,双模组大鼠的 T 细胞表面分化群 CD₃ 和 CD₄⁺/CD₈⁺ 明显降

低,CD₈ 明显升高,尤其是代表机体免疫功能强弱的 CD₄ 水平明显降低,而单模组所测上述指标与正常对照组比较无显著性差异。提示雌孕激素合用的双模法子宫肌瘤模型大鼠的免疫功能呈现低下状态,而仅用雌激素的单模法对模型大鼠的免疫功能无明显影响。此研究结果进一步提示孕激素的作用。

T 细胞是机体免疫的核心细胞,末梢血 T 细胞发育为功能不同的亚群,各亚群的数量和功能发生异常时,就可能导致机体免疫功能紊乱并发生一系列的病理变化。临床研究表明,子宫肌瘤的发生与机体细胞免疫功能紊乱有关,各种生长因子的介导,使子宫肌细胞改变其遗传物质中肿瘤抑制基因的活性而产生肌瘤,有关介导因子包括 NK 细胞,CD₄、CD₈ 等^[4]。该雌孕激素所致大鼠子宫肌瘤模型造模机理的研究与临床患者的研究结果相一致。

4.2 子宫肌瘤是卵巢甾体激素依赖性肿瘤,激素通过受体起作用。肌瘤内存在高浓度的雌、孕激素受体,雌、孕激素能促使肌瘤生长^[5]。该研究结果显示,双模法大鼠的雌激素及其受体水平明显升高,单模组大鼠的雌激素受体水平则与正常组比较无显著性差异。

据对子宫肌瘤患者外周血大颗粒淋巴细胞(LGL)数量研究的报道,子宫肌瘤患者 LGL 百分率明显低于正常组,并认为外周血 LGL 数目降低与子宫肌瘤患者本身雌激素抑制 LGL 成熟,而致患者机体免疫力低下有关^[6,7]。因此,雌激素及其受体水平是造成子宫肌瘤患者免疫功能低下的主要影响因素之一。提示,双模法大鼠的免疫功能低下与其雌激素受体水平相关。

4.3 对子宫肌瘤发病机理的研究显示,孕激素在肌瘤发病中具有重要作用。雌激素能促进自身受体的生成,也能促进孕激素受体的生成,雌激素与其受体结合可促进子宫肌细胞的增殖,又在孕激素作用下

分化、肥大, 雌激素与孕激素的反复作用, 最终导致子宫局部有瘤样增生^[5]。对单模和双模法所致子宫肌瘤模型大鼠免疫器官 T 细胞表面分化群和雌激素及其受体水平的检测结果显示, 双模法所致大鼠子宫肌瘤模型的造模方法与临床子宫肌瘤患者的发病机理更接近。

[参考文献]

- [1] Fujii S, Nakashima N, Okamura H, et al. Progesterone induced smooth muscle-like cells in the subperitoneal nodules produced by estradiol. Experimental approach to leiomyomatosis peritonealis disseminata [J]. Am J Obstet Gynecol, 1981, 139(2) : 164-172.
- [2] 李玲, 叶伟成. 瘤净片对雌孕激素造模大鼠内分泌-免

疫调节作用的研究[J]. 上海第二医科大学学报, 2001, 21(4) : 320.

- [3] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 上册, 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 566.
- [4] 杨进. 子宫肌瘤患者细胞免疫状态的研究及临床价值[J]. 广东医学, 1993, 14(6) : 337-339.
- [5] 姜卫国. 黄体酮在子宫肌瘤发生机理中的重要作用[J]. 国外医学妇产科学分册, 1996, 23(2) : 95-96.
- [6] 苏光, 刘翠平, 宫丽平, 等. 子宫肌瘤患者外周血大颗粒淋巴细胞的观察[J]. 内蒙古医学院学报, 2001, 23(1) : 13-14.
- [7] Walker CL. Role of hormonal and reproductive factors in the etiology and treatment of uterine leiomyoma[J]. Recent Prog Horm Res. 2002. 57: 277.