

棉酚、GnRHa 等药物对在位、异位子宫 内膜细胞前列腺素含量的影响

浙江医科大学妇产科教研室(杭州 310006) 黄荷凤 王 曼

内容提要 采用放射免疫法测定正常人及子宫内膜异位症患者在位、异位子宫内膜培养细胞 6-酮-PGF_{1α}和TXB₂的含量,并观察醋酸棉酚、孕酮、丹那唑及GnRHa作用于实验细胞后前列腺素含量的变化。结果表明,患者在位、异位子宫内膜培养细胞 6-酮-PGF_{1α}和TXB₂含量高于正常人,除 GnRHa 外,醋酸棉酚等三药使患者在位、异位子宫内膜培养细胞 6-酮-PGF_{1α}或/和 TXB₂含量降低。提示前列腺素与子宫内膜异位症的病理生理变化有关,药物对前列腺素的直接抑制作用是抗子宫内膜异位症机制之一。

关键词 醋酸棉酚 促性腺激素释放激素类似物 子宫内膜异位症 前列腺素

体内外实验表明,前列环素(PGI₂)、血栓素(TXA₂)与子宫内膜异位症(简称异位症)关系密切^[1,2]。但正常人和患者子宫内膜前列腺素含量是否相同,不同的治疗异位症药物对前列腺素(PGs)是否有不同的作用等,至今尚不清楚。本实验对正常人及患者子宫内膜进行离体培养,测定培养细胞中 6-酮-PGF_{1α}(PGI₂的代谢产物)、TXB₂(TXA₂的代谢产物)含量,并比较观察在实验细胞中加入醋酸棉酚、孕酮、丹那唑和促性腺激素释放激素类似物(GnRHa)后,PGF_{1α}、TXB₂含量的变化,以阐明不同中西医药物对子宫内膜细胞合成或分泌PGs的直接作用。

材料与方 法

一、标本来源:子宫内膜来源于8名正常育龄妇女及4例盆腔异位症患者。其中患者在位和异位内膜均为自体来源。年龄26~28岁,3个月内未用过抗PGs药物和其它内分泌药物。无菌操作下,经刮宫或剖宫取内膜,异位内膜取自卵巢内膜囊肿之囊壁。

二、试剂制备

1. RIA缓冲液: Tris6.1g, EDTA Na₂0.4g, 1N HCl27ml, 加蒸馏水至1000ml, pH8.0。

2. PRMI1640 培养基(日本制药株式会社)含20%小牛血清、青霉素100u/ml、链霉素

100μg/ml。

3. ¹²⁵I-6-酮-PGF_{1α}和¹²⁵I-TXB₂放射免疫药盒由苏州医学院血栓室提供。

4. 药物应用液: 将醋酸棉酚、孕酮、丹那唑、GnRHa分别溶解于二甲基亚枫中, 用时加入培养基, 其药物终浓度均为10⁻⁶ mmol/L。

三、实验方法: 按Lindenberg^[3]方法略加改良行子宫内膜细胞单层培养。细胞生长第6天, 换无血清培养基, 随机分组。实验组中分别加入10⁻⁶ M醋酸棉酚、10⁻⁶ M孕酮、10⁻⁶ M丹那唑和GnRHa; 对照组未加药, 内含0.1%二甲基亚枫。每组3个标本, 每次实验重复4次。加药后的培养细胞继续孵育24h, 收集上清液于硅化试管中, -20℃保存。将含6-酮-PGF_{1α}和TXB₂1600pg/ml标准品用RIA缓冲液作倍比稀释, 按表1顺序加样。快速匀器

表1 加样程序 (单位 ml)

	总计数管	非特异管	零标准管	标准管	样品管
RIA 缓冲液	—	0.4	0.3	0.2	0.2
γ-球蛋白	—	0.2	0.2	0.2	0.2
标准品	—	—	—	0.1	—
待测样品	—	—	—	—	0.1
标记物	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
抗血清	—	—	0.1	0.1	0.1
混匀 4℃ 12小时以上					
25%PEG	—	0.7	0.7	0.7	0.7

混匀, 4°C离心(3000r/min)30min, 吸弃上清液, γ -免疫计数机测定沉淀物放射性。

四、统计方法: 方差分析、Neman-Keuls法。

结 果

一、细胞形态学观察: 在位内膜(包括正常人和患者)培养瓶中以上皮细胞为优势生长, 异位内膜培养细胞中以间质细胞为优势生长。醋酸棉酚、孕酮和丹那唑作用后, 见附壁细胞减少, 细胞膜增厚, 细胞形态向纤维样移行。

二、正常人和患者在位、异位子宫内膜培养细胞中6-酮-PGF_{1 α} 、TXB₂自然含量: 比较取自三种不同来源的培养细胞的6-酮-PGF_{1 α} 、TXB₂, 异位内膜培养细胞两者的含量高于在位内膜($P < 0.01$); 而患者在位内膜培养细胞两者的含量又高于正常人($P < 0.01$)。见表2。

表2 三种子宫内膜培养细胞6-酮-PGF_{1 α} 和TXB₂的含量 (pg/ml, $\bar{x} \pm S$)

	例数	6-酮-PGF _{1α}	TXB ₂
正常人子宫内膜	4	28.21 $\pm$ 0.47	83.17 $\pm$ 4.25
患者在位内膜	4	89.07 $\pm$ 11.20	1037.73 $\pm$ 98.39
患者异位内膜	4	130.65 $\pm$ 16.56	1246.48 $\pm$ 53.87

三、醋酸棉酚、孕酮、丹那唑及GnRHa对培养细胞6-酮-PGF_{1 α} 、TXB₂含量的影响: 四

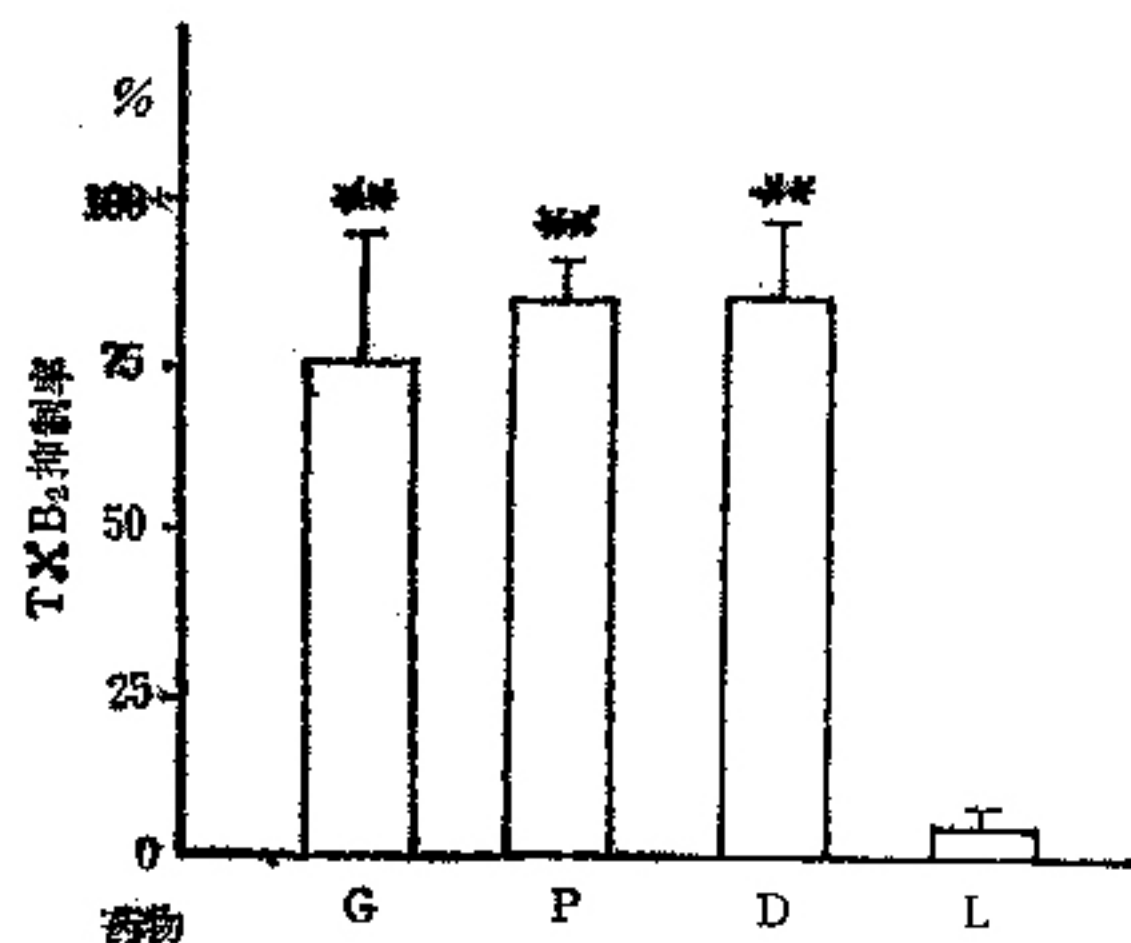


图1 四种药物对患者在位内膜培养细胞TXB₂的抑制率(%)
G: 醋酸棉酚, P: 孕酮, D: 丹那唑, L: GnRHa
与对照组相比 $P < 0.01$, 图2同

种药物对正常人子宫内膜培养无影响, 对患者在位内膜培养细胞6-酮-PGF_{1 α} 含量也无影响。但醋酸棉酚、孕酮和丹那唑使患者在位内膜培养细胞TXB₂含量显著下降($P < 0.01$), 三药同时使异位内膜培养细胞6-酮-PGF_{1 α} 、TXB₂两者含量显著下降($P < 0.01$)。GnRHa虽使两者有不同程度的降低, 但均无统计学意义。见图1、图2。

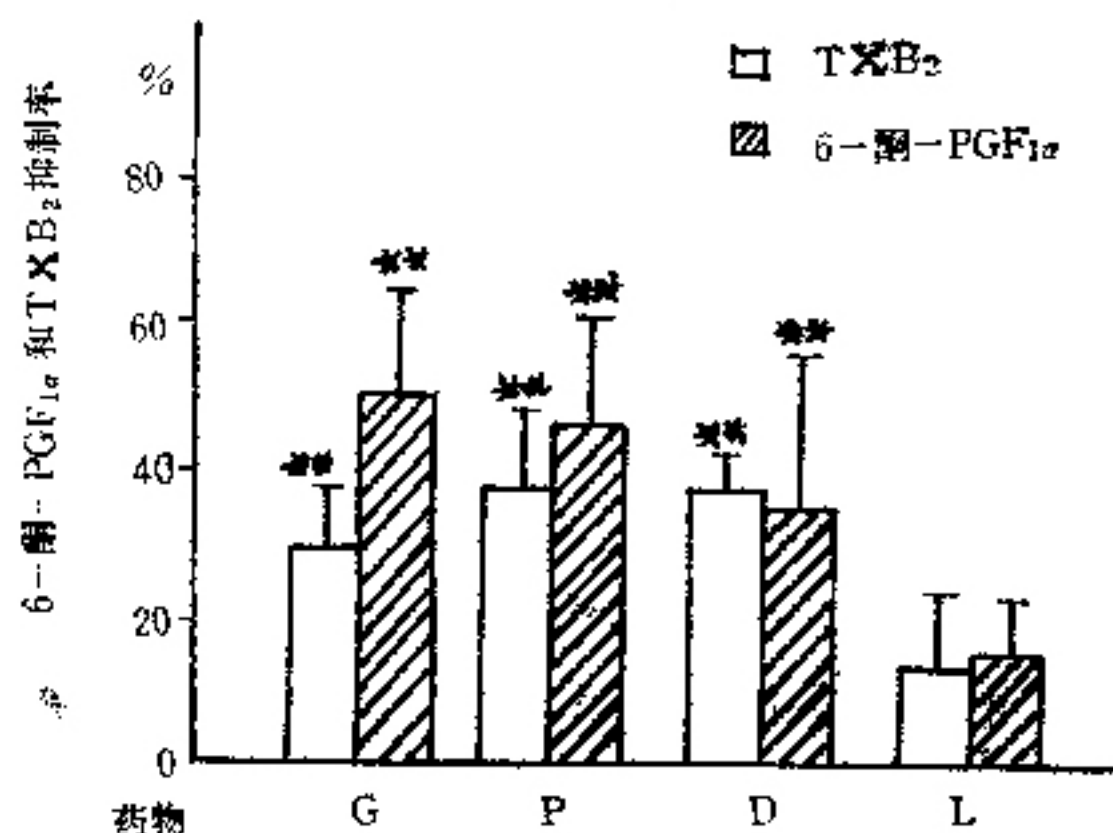


图2 四种药物对患者异位内膜培养细胞6-酮-PGF_{1 α} 、TXB₂的抑制率(%)

讨 论

一、PGI₂、TXA₂与异位症: Ylikorkala⁽¹⁾曾用组织培养方法测得异位症患者异位组织中含高水平的PGI₂和TXA₂, 但例数甚少, 且非自体比较。本实验表明, 在同一培养条件下, 自体异位内膜细胞6-酮-PGF_{1 α} 和TXB₂含量高于在位内膜细胞, 而患者在位内膜6-酮-PGF_{1 α} 和TXB₂含量又高于正常人。这一结果与张氏⁽⁴⁾的实验结果前列腺素F_{2 α} (PGF_{2 α})和前列腺素E₂(PGE₂)的高低顺序一致。有实验证实在培养基加入PGs合成酶抑制剂, 使子宫内膜细胞6-酮-PGF_{1 α} 、TXB₂含量显著下降⁽²⁾。结合本实验结果, 推测异位内膜细胞有较强的PGs合成能力, 关键在于异位内膜细胞中有活跃的磷脂酶A₂和环氧化酶存在。另一方面, PGs的升高又影响溶酶体的稳定性和通透性, 使PGI₂、TXA₂含量进一步升高。

Gal⁽⁵⁾等人发现间质细胞是产生PGs的主要细胞, 并能协助上皮细胞产生PGs。本实验所

见,异位内膜培养细胞很少见典型的上皮细胞,以间质细胞为主。因此异位内膜细胞高水平的6-酮-PGF_{1α}、TXB₂还与细胞的类型有关。虽然患者和正常人在位内膜培养细胞的形态在光镜下无异,但是否有超微结构的改变或酶活力的改变尚待进一步研究。

PGI₂、TXA₂引起痛经的主要机制是子宫异常收缩或子宫缺血。一般认为非经期异位病灶持续分泌PGI₂、TXA₂,刺激局部产生缓激肽导致痛觉过敏,在经期病灶出血,大量溶酶体释放,PGI₂、TXA₂达高峰使痛经加剧。Veldhuis认为卵巢长期浸泡在高浓度的PGI₂腹腔液中,会丧失排卵前对LH峰的敏感性,干扰排卵而致不孕⁽⁶⁾。PGI₂和TXA₂平衡失调可使输卵管和子宫收缩紊乱而影响受孕^(2,4)。

二、药物与PGI₂、TXA₂:临床上异位症的药物治能不同程度地改善痛经,提高受孕率,然而这些药物与痛经、不孕及与PGs的因果关系报道不多。本实验表明,醋酸棉酚、孕酮、丹那唑使患者在位内膜培养细胞中TXB₂及异位内膜培养细胞6-酮-PGF_{1α}和TXB₂含量显著下降。Bonney⁽⁷⁾的研究指出,经期大量的PGs来源于溶酶体,故以上三药能降低溶酶体的活性,另一方面,这些药物还能影响细胞内DNA的合成⁽⁸⁾,从而使PGs合成的含量降低,使花生四烯酸转变成不同类型的PGs这一关键步骤受阻。正常情况下,整个月经周期中,PGI₂含量高于TXA₂。动物实验也表明,PGI₂和TXB₂的合成比是3.3:0.7,而释放比是1.5:0.6,可见PGI₂合成酶在体内对性激素的依赖性大于TXA₂合成酶。在培养条件下,PGI₂合成酶活性下降大于TXA₂合成酶,因而表现出外源性药物对患者在位内膜细胞TXA₂有明显的抑制作用,而对PGI₂含量的影响不大。

对在位、异位内膜加入800pg/ml棉酚行体外孵育,使PGF_{2α}、PGE₂含量显著下降⁽⁹⁾。结合本实验结果,提示醋酸棉酚的作用部分可能在抑制花生四烯酸的转化过程。Liggins⁽¹⁰⁾的实验指出,分泌中期子宫内膜PGI₂、TXA₂

为月经周期最低水平,此时正值孕酮分泌高峰期,故认为孕酮能抑制PGI₂、TXA₂的合成。还有人认为,孕酮有稳定溶酶体膜从而抑制磷脂酶A₂从细胞中释放的作用。丹那唑可能与孕酮一样,通过孕酮受体干扰细胞代谢而发挥疗效。GnRHa对离体子宫内膜细胞PGs合成无影响,其临床疗效可能通过抑制对卵巢或垂体的直接抑制作用所致。

本实验还观察到上述药物不影响正常人子宫内膜细胞6-酮-PGF_{1α}、TXB₂的分泌或合成,其可能的解释是:正常的子宫内膜存在着PGI₂和TXA₂低分泌基线现象,再则,正常人子宫内膜细胞溶酶体及PGs合成处于生理状态,外源性药不存在对磷脂酶A₂的封闭作用。

本文说明,过高的PGI₂、TXA₂可能影响着异位症病理生理整个过程,所以,异位症治疗药物对PGs的抑制作用有重要意义,这与异位症不孕、痛经等症状的改善密切相关。若能在上述药物同时或起效前,加用PGs抑制剂,可能有助于加强疗效和早日缓解症状。

参 考 文 献

1. Ylikorkala O, et al. Prostaglandin and endometriosis. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 1983; 113: 105.
2. 黄荷凤,等.前列腺环素,血栓素A₂与子宫内膜异位症. 国外医学·妇产科分册 1990; 17:2.
3. Lindenberg S, et al. Isolation and culture of human endometrial cells. Fertil Steril 1984; 41: 650.
4. 张人捷,等.子宫内膜异位症的子宫在位和异位内膜结节的前列腺素测定. 中华妇产科杂志 1984; 19:93.
5. Gal D, et al. Mesenchyme-epithelial interaction in human endometrium. J Clin Invest 1982; 70: 798.
6. Veldhuis JD, et al. Luteinizing hormone stimulates the production of prostacyclin by isolated ovarian cell in vitro. Prostaglandins 1982; 23: 329.
7. Bonney RC, et al. Measurement of phospholipase A₂ activity in human endometrium during the menstrual cycle. J Endocrin 1985; 107: 183.
8. 黄荷凤,等.醋酸棉酚等药物对子宫内膜细胞DNA合成的影响. 中西医结合杂志 1990; 10(8):476.
9. 张人捷,等.醋酸棉酚对子宫内膜、前列腺素含量的影响. 中华医学杂志 1985; 65:176.
10. Liggins GC, et al. Production rates of 6-keto-PGF_{1α} and TXB₂ by perfused human endometrium. Prostaglandins 1983; 25: 443.

Abstracts of Original Articles

Changes of Leucocytic Estrogen Receptor Levels in Patients with Climacteric Syndrome and Therapeutic Effect of Liuwei Dihuang Pills(六味地黄丸)

Zhang Jia-qing(张家庆), Zhou Da-jing(邹大进)

Dept. of Endocrinology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200433)

The numbers of estrogen receptor (ER) in human peripheral leucocytes in 22 women with climacteric syndrome were measured by radioligand method. The results were compared with those of 12 normal child-bearing-age women. It was found that the contents of leucocytic ER in climacteric syndrome patients were significantly lower than normal child-bearing-age women. The authors used a Chinese prescription—Liuwei Dihuang Pills (LDP) to treat the patients for 2 months. The numbers of leucocytic ER were significantly increased after treatment. The data indicate that decrease of ER levels in cell may involve in the pathogenesis of climacteric syndrome. LDP not only increases plasma estradiol levels, but also increases the leucocytic ER levels. This may be the basis of the therapeutic effect on the disease.

Key Words estrogen receptor, estradiol, climacteric syndrome, Liuwei Dihuang Pills

(Original article on page 521)

Study on the Treatment of Endometriosis with Removing Blood Stasis and Purgation Method

Wang Da-zeng(王大增), Wang Zu-qian(王祖倩), Zhang Zhi-feng(张志枫)

Long Hua Hospital, Shanghai College of TCM, Shanghai (200032)

According to the method of differentiation of symptom complexes of traditional Chinese medicine (TCM), endometriosis is a disease of blood stasis and mass in the lower portion of abdomen. 76 cases were treated by TCM prescription named endometriotic pill No 1 with rhubarb as the main ingredient. The chief functions of the rhubarb were removing blood stasis, disintegrating mass and purgation. The total effective rate was 80.26%. Among them, the effective rate of dysmenorrhea was 88.89%, that of pelvic pain was 66.72%, that of intercourse pain 72.12%, and diminishing in size of mass or nodule 22.15%; 3 cases of 22 infertility got pregnant (13.63%). The results revealed that the endometriotic pill No 1 yielded distinct improvement in the treatment of endometriosis, including clinical symptoms and signs, laboratory assay of blood rheology, serum Ig, subgroup of T lymphocyte (OKT system) and PG.

Key Words endometriosis, method of removing blood stasis and purgation, blood rheology, humoral immunity, subgroup of T lymphocyte, prostaglandin

(Original article on page 524)

Effects of Gossypol and GnRHa on the Prostaglandins Contents of Endometriotic Cell and in Situ

Huang He-feng(黄荷凤), Wang Man(王曼)

Dept. of Obstetrics and Gynecology, Zhejiang Medical University, Hangzhou (310006)

In order to study a direct effect of some traditional and western medicine on the prostaglandins (PGs) of endometriosis, endometriotic cell and endometrial cell in situ were cultured in vitro. 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and thromboxane (TXB $_2$) were measured in the above cells using the RIA from the superfusates. These PGs changes after gossypol acetate, progesterone, danazol and gonadotrophin releasing hormone agonist (GnRHa) treatment were studied. High PGs levels were observed in endometriotic cell, and higher in endometrial cell in situ of patients than in endometrial cell of healthy persons ($P < 0.01$). After treatment with drug (but not GnRHa), the prostacyclin (PGI $_2$)