

肥大细胞在雌激素介导的子宫内膜异位症中的作用机制研究

林开清,朱丽波,张信美,林俊

浙江大学医学院附属妇产科医院普通妇科,浙江杭州310006

[摘要] 目的:探讨肥大细胞在雌激素介导的大鼠子宫内膜异位症模型中的作用及相关机制。方法:取健康雌性未孕SD大鼠24只,采用自体子宫内膜移植法建立大鼠腹壁子宫内膜异位症模型,按每天肌肉注射不同剂量雌激素将大鼠随机分成3组(每组8只):大剂量组(雌激素200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + 双卵巢切除)、小剂量组(雌激素100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ + 双卵巢切除)、模型对照组(仅作子宫内膜移植)。分别于造模后2周及4周后处死各组4只大鼠,采集血液和病灶组织标本,测量各组子宫内膜异位症病灶的大小,并对病灶组织进行苏木素—伊红(HE)染色观察组织形态及角蛋白和波形蛋白免疫组织化学染色以鉴定造模是否成功。用甲苯胺蓝染色法检测各组大鼠病灶组织肥大细胞总数及脱颗粒肥大细胞数,酶联免疫吸附试验测定血清肿瘤坏死因子 α 水平,酶免疫分析法测定血清雌二醇水平,免疫组织化学染色法检测子宫内膜异位症病灶组织类胰蛋白酶、神经生长因子的表达水平。结果:两雌激素组2周和4周时血清雌二醇水平均大于模型对照组(均 $P < 0.05$),4周时大剂量组血清肿瘤坏死因子 α 浓度大于模型对照组($P < 0.05$);两雌激素组2周和4周病灶体积均大于模型对照组(均 $P < 0.05$);无论是2周还是4周,小剂量组甲苯胺蓝染色脱颗粒/肥大细胞总数比值均高于模型对照组(均 $P < 0.05$);4周时大剂量组神经生长因子的表达大于模型对照组($P < 0.05$)。结论:雌激素可促进子宫内膜异位症病灶的生长,其机制可能与激活肥大细胞脱颗粒相关,而后者可能与子宫内膜异位症模型大鼠血清肿瘤坏死因子 α 、神经生长因子水平升高有关。

[关键词] 子宫内膜异位症/病理学;肥大细胞/病理学;雌激素类/药理学;雌激素类/投药和剂量;细胞脱颗粒;免疫组织化学;染色与标记;疾病模型,动物
[中图分类号] R711.71 [文献标志码] A

Role of mast cells in estrogen-mediated experimental endometriosis in rats

LIN Kai-qing, ZHU Li-bo, ZHANG Xin-mei, LIN Jun (Department of Gynecology,

收稿日期:2014-12-17 接受日期:2015-04-21

基金项目:国家自然科学基金(81471433,81270672);浙江省自然科学基金(Y2110128);浙江省公益性技术应用研究计划(2015C33110)

第一作者:林开清(1974-),男,博士,副主任医师,主要从事子宫内膜异位症和子宫腺肌症微创手术的研究;E-mail: kaiqinglin2006@sina.com;http://orcid.org/0000-0003-0315-1296

通讯作者:张信美(1964-),男,博士,主任医师,博士生导师,主要从事子宫内膜异位症和妇科内窥镜的研究;E-mail: zxm20130729@163.com;http://orcid.org/0000-0001-7122-6435

Women's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China)

Corresponding Author: ZHANG Xin-mei, E-mail: zxm20130729@163.com

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the role of mast cells in the pathogenesis of estrogen-mediated experimental endometriosis in rats. **Methods:** Endometriosis model was established by transplanting autologous fragments of uterus to the inner surface of the abdominal wall in 24 unpregnant female Sprague Dawley rats. The rats were divided randomly into three groups ($n = 8$ in each group), and were injected with different doses of estrogen: high-dose group ($200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low-dose group ($100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and the control group ($0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The ovaries were surgically removed in high-dose and low-dose groups. Four rats were sacrificed in each group at 2 and 4 weeks after surgery. Their serum estradiol levels, size of lesions, total number of mast cells and degranulations, serum TNF- α levels, expression of tryptase and NGF in tissues were analyzed and compared among groups. **Results:** The mean levels of serum estradiol 2 weeks and 4 weeks after model established and serum TNF- α at 4 weeks in estrogen-treated groups were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). The mean size of endometriotic lesions in the estrogen-treated groups was also significantly larger than that in the control group 2 weeks and 4 weeks after model established (all $P < 0.05$). Meanwhile, both at week 2 and week 4, the mean ratio of degranulation/total number of mast cells by toluidine blue staining in low-dose estrogen group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The expression of NGF in high-dose estrogen group was significantly higher than that in the control group at week 4 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Estrogen can promote the growth of endometriotic lesions and may mediate the pathogenesis of endometriosis by activating mast cells, which may be associated with increasing TNF- α and NGF levels.

[**Key words**] Endometriosis/pathology; Mast cells/pathology; Estrogens/pharmacology; Estrogens/administration & dosage; Cell degranulation; Immunohistochemistry; Staining and labeling; Disease models, animal

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2015,44(3):269-277.]

子宫内膜异位症是指具有生长功能的子宫内膜组织(腺体和间质)出现在子宫腔被覆盖内膜及宫体肌层以外的其他部位的妇科常见疾病,其患病率在育龄妇女中达 10% ~ 15%,严重影响妇女身心健康。疼痛和不孕是子宫内膜异位症的主要临床症状。近年来,虽然对子宫内膜异位症的研究不少,但其病因和发病机制以及相应子宫内膜异位症疼痛的发生机制仍然不清楚。大量研究发现,子宫内膜异位症病灶内出血刺激导致无菌性炎症、免疫反应以及病灶神经异常生长导致中枢与外周神经敏化可能是子宫内膜异位症疼痛的主要发病机制^[1-2]。肥大细胞是免疫反应中的重要细胞之一,一些学者研究发现肥大细胞脱颗粒

与偏头痛、间质性膀胱炎、肠易激综合征、异位性皮炎等疾病的疼痛症状有明显的相关性。在神经病理性疼痛中,分布于神经和神经周围组织的肥大细胞即可脱颗粒释放类胰蛋白酶、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、神经肽、P物质、神经生长因子、细胞因子以及神经递质如乙酰胆碱等活性介质导致神经敏化,而敏化的神经可释放大量神经递质反过来激活肥大细胞促使其脱颗粒释放致痛物质,进一步促进神经敏化,从而导致神经病理性疼痛的持续状态。本研究建立了大鼠子宫内膜异位症模型,通过雌激素干预,观察子宫内膜异位症组织内肥大细胞活化状态及病灶的变化,旨在探索肥大细胞在子宫内膜异位症疾

病发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雌性未孕 SD 大鼠由浙江省实验动物中心提供,饲养在浙江大学医学院附属第一医院多器官联合移植重点实验室;4%的水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司;青霉素购自华北制药股份有限公司;雌激素购自杭州动物药品厂;甲苯胺蓝购自美国 Sigma-Aldrich-Fluka 公司;TNF- α 酶联免疫吸附试验试剂盒购自美国 R&D 公司;血清雌二醇酶免疫分析试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司;类胰蛋白酶单克隆抗体和神经生长因子多克隆抗体均购自美国 Abcam 公司;角蛋白单克隆抗体和波形蛋白单克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;二步法抗鼠/兔免疫组织化学染色试剂盒购自上海基因公司。

1.2 子宫内膜异位症大鼠建模

取健康雌性未孕 SD 大鼠 24 只,体质量为 200 g 左右,鼠龄 8~12 周,按 Vernon 和 Wilson^[3] 方法建立子宫内膜异位症动物模型,手术在无菌条件下,以 4% 的水合氯醛 7 mL/kg 腹腔注射麻醉大鼠,腹部去毛、皮肤消毒后,于尿道口上约 1 cm 处做一长约 1.5 cm 切口,在近卵巢处切取一侧子宫角处的一段子宫,长约 1 cm,迅速将其置于生理盐水中,将子宫内膜与肌层分离,并剪取 2 块各约 5 mm \times 5 mm 的内膜组织块,将子宫内膜层对着腹壁,缝合固定在腹壁上,缝合线为无损伤性 6-0 棉纶单丝线。同时取长约 0.3 cm 同侧正常子宫内膜予 10% 甲醛固定,常规脱水、包埋、石蜡固定、切片。关腹前予以青霉素 20 万单位腹腔注射,最后缝合各层组织,使其自然苏醒。2 周后进行第二次手术,观察病灶生长情况,测量并记录移植物的尺寸(最大横径 a,与其垂直的纵径 b),病灶体积的计算可以参照肿瘤体积的计算公式 $V = 1/2a \times b^2$,体积大于 2 mm³ 初步认为造模成功。

1.3 模型鉴定

取所有子宫内膜异位症病灶组织置于 10% 甲醛溶液固定后,常规脱水、包埋、石蜡固定切片后,行苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下进行病理组织学观察,病理检查见子宫内膜腺体和间质生长则认为造模成功。进一步采用免疫组织化学染色法分别检测异位病灶腺上皮和基质细胞中角

蛋白和波形蛋白的表达情况以鉴定子宫内膜异位症模型。操作方法按试剂盒说明书进行,即石蜡切片脱蜡、水化后,高压热修复 10 min 滴加过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,每张切片滴加 1:100 稀释的角蛋白或波形蛋白抗体 50 μ L,室温下孵育 2 h 后,滴加生物素化山羊抗小鼠/兔 IgG 50 μ L,室温下孵育 20 min,最后经二氨基联苯胺(DAB)显色后苏木素复染。用大鼠正常子宫内膜做阳性对照,磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。

1.4 模型分组及观察指标

大鼠造模时随机分成 3 组(每组 8 只):大剂量组给予外源性雌激素 200 μ g/kg 同时切除双侧卵巢,小剂量组给予外源性雌激素 100 μ g/kg 同时切除双侧卵巢,模型对照组未予外源性雌激素和不行双侧卵巢切除术。分别于治疗 2 周和 4 周后每组处死 4 只大鼠,采集下腔静脉血和病灶组织,观察各组血清雌二醇水平、子宫内膜异位症病灶的大小及组织形态,比较造模 2 周及 4 周时病灶肥大细胞总数及脱颗粒肥大细胞数,检测大鼠血清 TNF- α 和病灶组织类胰蛋白酶、神经生长因子水平。

1.5 甲苯胺蓝染色观察肥大细胞及其脱颗粒

组织石蜡切片采用甲苯胺蓝染色后,采用双盲高倍镜($\times 400$)下连续计数单位面积(个/mm²)每张 5 个视野中的肥大细胞数,取其平均值。将形态规则、边界清楚的肥大细胞定义为未脱颗粒的肥大细胞,将形态不规则、边界不清、周围可见大量明显散在颗粒的肥大细胞定义为脱颗粒的肥大细胞。

1.6 酶联免疫吸附试验和酶免疫分析法检测 TNF- α 和雌二醇水平

分别取储存的 SD 大鼠血清按酶联免疫吸附试验试剂盒和酶免疫分析法试剂盒说明书操作检测 TNF- α 和雌二醇质量浓度,计算时以标准物的浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘出标准曲线,根据样品的吸光度值从标准曲线推算出相应的质量浓度。

1.7 免疫组织化学染色法检测类胰蛋白酶和神经生长因子的表达

标本经石蜡包埋,切片(厚 4 μ m)后行免疫组织化学染色检测异位病灶肥大细胞中类胰蛋白酶和神经生长因子的表达,方法同上,其中类胰蛋

白酶用 3-氨基-9-己基咪唑(AEC)显红色。类胰蛋白酶染色结果判定如下:双盲高倍镜下($\times 400$)下连续计数单位面积($\text{个}/\text{mm}^2$)每张 5 个视野中的类胰蛋白酶阳性细胞数,取其平均值。神经生长因子结果判定采用组织化学评分法:双盲下随机选择 5 个高倍镜视野($\times 400$),按胞浆的着色深浅评分,其中不着色为 0 分,淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,黄棕色甚至咖啡色为 3 分;计算阳性细胞百分数,以着黄色为阳性细胞,其中阳性细胞占 0% 为 0 分,占 1% ~ 25% 为 1 分,占 26% ~ 50% 为 2 分,占 50% 以上为 3 分。按公式(Σ 阳性细胞表达强度 \times 阳性细胞百分数评分)计算出该标本的阳性指数,即为该组织的神经生长因子的表达量。

1.8 统计学方法

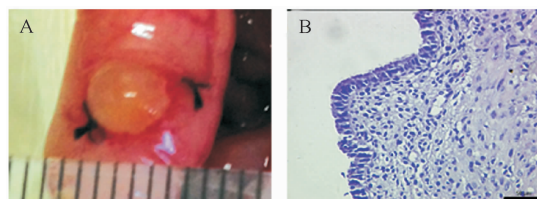
采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。实验数据先进行正态性及方差齐性检验,偏态分布数据采用非参数秩和检验(Mann-Whitney U 检验),结果以中位数和范围 [M ($Min \sim Max$)] 表示;正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析,结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠子宫内膜异位症模型鉴定结果

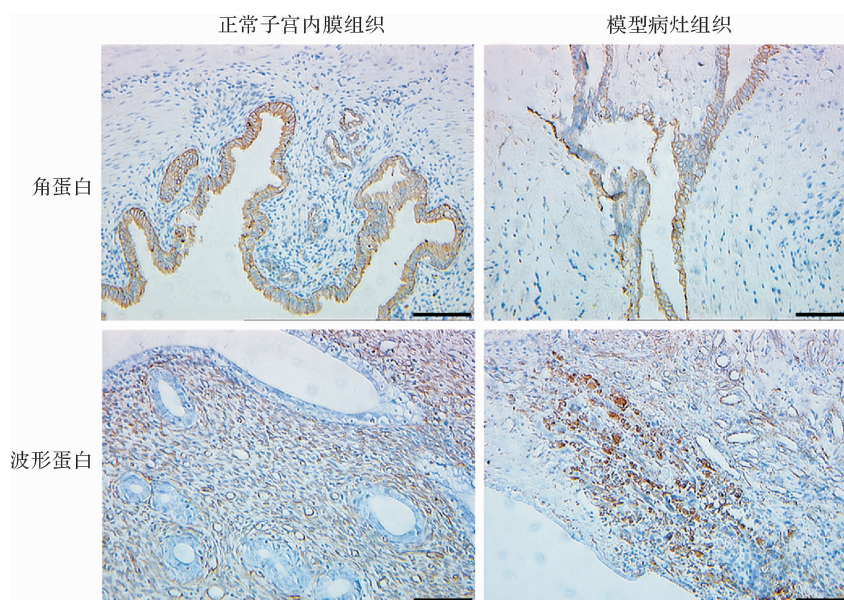
造模后再次剖腹观察病灶生长变化,在移植处可见大小不同的病灶,呈隆起透亮或咖啡色的小囊泡状,内部充满液体,表面血管清晰可见,极少移植病灶与腹部脂肪组织有轻度的粘连,粘连较易分离。病灶组织显微镜下可见明显的腺体和间质,间质纤维化伴有少许炎症细胞浸润,层次分明,结构整齐,生长良好,上皮细胞呈柱状或立方,腺体丰富,增生现象明显,病理学检查证实为子宫内膜腺体和间质(图 1)。在模型病灶腺上皮细胞中均可

见呈土黄色的角蛋白表达,间质细胞中均不表达角蛋白;相反,在模型病灶间质细胞中均可见呈棕色的波形蛋白表达,而在上皮细胞中均不表达波形蛋白,与正常子宫内膜表达一致。这进一步证实造模成功(图 2)。



A: 子宫内膜异位症病灶呈隆起透亮的小囊状,内部充满积液;病灶最大直径约 5 mm,与其垂直的最大横径约 4 mm;B: 大鼠子宫内膜异位症病灶组织 HE 染色,图中可见明显的腺体和间质,间质纤维化伴有少许炎症细胞浸润,标尺 = 50 μm .

图 1 子宫内膜异位症病灶大体及组织学观察
Fig. 1 Morphology and HE staining of endometriotic lesions of rats



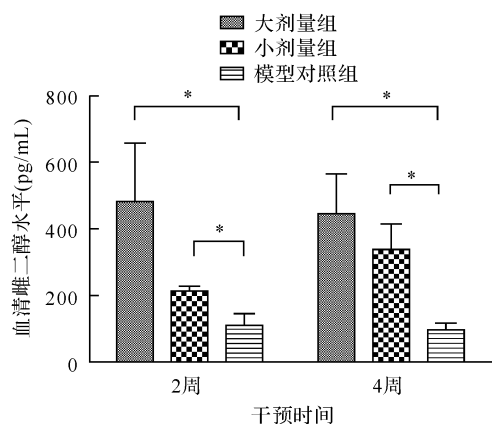
正常子宫内膜腺上皮细胞中可见土黄色角蛋白表达,模型病灶腺上皮细胞中也有土黄色角蛋白表达;正常子宫内膜间质细胞中可见棕色波形蛋白表达,模型病灶组织也可见棕色波形蛋白表达。标尺 = 100 μm 。

图 2 免疫组织化学染色法检测子宫内膜组织角蛋白和波形蛋白的表达
Fig. 2 Expression of keratin and vimentin in endometriotic lesions and normal endometrium by immunohistochemistry staining

2.2 雌激素干预对子宫内膜异位症模型大鼠血清雌激素水平的影响

2 周时大剂量组、小剂量组和模型对照组血清雌二醇的水平分别为 (482.47 ± 174.90) pg/mL、 (213.93 ± 13.80) pg/mL 和 (109.77 ± 36.78)

pg/mL, 三组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 周时上述三组大鼠血清雌二醇的水平分别为 (444.17 ± 120.91) pg/mL、 (338.93 ± 75.51) pg/mL 和 (97.31 ± 19.72) pg/mL, 差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示肌肉注射雌激素能提高大鼠血清雌二醇水平, 见图 3。



两两比较, * $P < 0.05$.

图3 不同剂量雌激素对子宫内膜异位症大鼠血清雌二醇水平的影响

Fig.3 Serum estradiol levels in rat with endometriosis after treatment with different doses of estrogen

2.3 雌激素干预对子宫内膜异位症模型病灶大

小的影响

雌激素干预 2 周时大剂量组、小剂量组、模型对照组病灶大小分别为 $57.50(47.25 \sim 91.50)$ mm³、 $53.75(40.00 \sim 88.31)$ mm³、 $35.72(18.00 \sim 62.50)$ mm³, 三组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 周时三组病灶大小分别为 $98.17(72.00 \sim 113.00)$ mm³、 $73.50(48.75 \sim 108.00)$ mm³、 $25.00(15.75 \sim 101.75)$ mm³, 三组间差异亦有统计学意义 ($P < 0.05$); 4 周时大剂量组病灶体积较 2 周时增大, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示雌激素能促进大鼠子宫内膜异位症位病灶的生长。

2.4 雌激素干预对子宫内膜异位症模型病灶肥大细胞数量及其活化的影响

甲苯胺蓝染色显示, 肥大细胞呈圆形或椭圆形, 体积较大, 细胞核呈蓝色, 胞浆内充满粗大的蓝紫色异染性颗粒。模型对照组肥大细胞大多分布于子宫腺体附近以及子宫内周周围的间质组织(图 4A、B), 在血管周围聚集着较多的脱颗粒肥大细胞(图 4C、D)。雌激素干预无论 2 周或者 4 周, 小剂量组脱颗粒肥大细胞/肥大细胞总数比值均高于模型对照组, 提示一定剂量的雌激素能促进肥大细胞脱颗粒。见表 1。

表1 不同剂量雌激素干预子宫内膜异位症模型大鼠肥大细胞计数

Table 1 Number of mast cells after treatment with different doses of estrogen in endometriosis model

组别	2 周			4 周		
	肥大细胞总数	脱颗粒肥大细胞数	脱颗粒肥大细胞数/肥大细胞总数	肥大细胞总数	脱颗粒肥大细胞数	脱颗粒肥大细胞数/肥大细胞总数
大剂量组	0.20	0	0	2.60	1.00	0.38
小剂量组	0.93(0.20 ~ 1.00)	0.53(0.20 ~ 1.40)	0.69(0.47 ~ 1.00)*	1.80(0.60 ~ 2.40)	1.20(0.40 ~ 1.00)	0.70(0.57 ~ 0.83)*
模型对照组	1.80(0.40 ~ 3.20)	0.03(0 ~ 1.80)	0.07(0.08 ~ 0.45)	1.9(0 ~ 0.62)	0.63(0 ~ 1.80)	0.25(0.2 ~ 0.36)

与模型对照组比较, * $P < 0.05$.

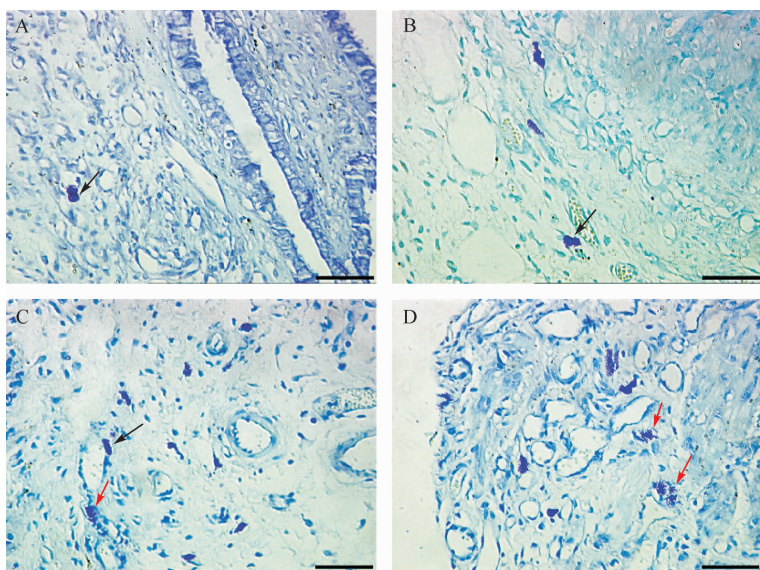
2.5 雌激素干预对子宫内膜异位症模型大鼠血清 TNF- α 水平的影响

雌激素干预 2 周时大剂量组、小剂量组和模型对照组血清 TNF- α 水平无明显差异; 雌激素注射至 4 周时, 大剂量组和小剂量组血清 TNF- α 水平均高于模型对照组, 见图 5。提示一定剂量的雌激素持续作用能提高子宫内膜异位症大鼠血清中 TNF- α 的水平。

2.6 雌激素干预对子宫内膜异位症大鼠病灶肥

大细胞类胰蛋白酶表达的影响

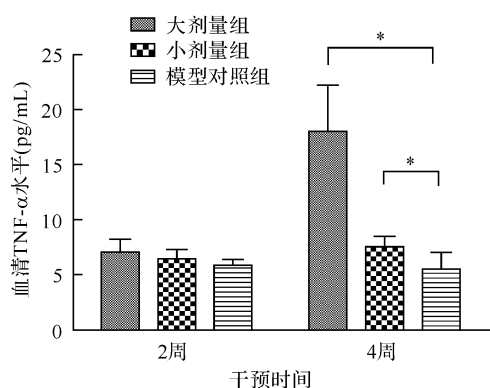
类胰蛋白酶免疫组织化学染色可呈红色, 位于异位子宫内膜病灶间质的类胰蛋白酶阳性肥大细胞(图 6A、B)。脱颗粒的肥大细胞形状不规则, 着色较不均匀, 细胞膜表面不完整; 未脱颗粒的肥大细胞呈圆形或椭圆形, 胞质中充满染色颗粒, 着色较均匀, 细胞膜表面光滑完整(图 6B、C)。2 周时大剂量组类胰蛋白酶表达多于模型对照组, 4 周时大剂量组和小剂量组类胰蛋白酶表



A: 病灶腺体周围可见肥大细胞浸润; B: 病灶间质可见肥大细胞浸润; C: 小剂量组病灶血管周围脱颗粒肥大细胞增多; D: 小剂量组血管周围脱颗粒肥大细胞增多. 黑色箭头: 未活化的肥大细胞; 红色箭头: 活化的肥大细胞. 标尺 = 50 μm .

图4 子宫内膜异位病灶肥大细胞的表达

Fig. 4 Mast cells stained with toluidine blue in endometriosis model



两两比较, $P < 0.05$.

图5 不同剂量雌激素干预对子宫内膜异位症模型大鼠血清 TNF- α 水平的影响

Fig. 5 Serum TNF- α levels in endometriosis model after treatment with different doses of estrogen

达均多于模型对照组。见表2。

2.7 雌激素干预对子宫内膜异位症大鼠病灶神经生长因子表达水平的影响

病灶上皮细胞和间质细胞均可见神经生长因子表达, 雌激素干预2周时大剂量组、小剂量组、模型对照组病灶神经生长因子的表达未见差异。雌激素干预4周时, 大剂量组神经生长因子的表达高于模型对照组。见图7和表2。

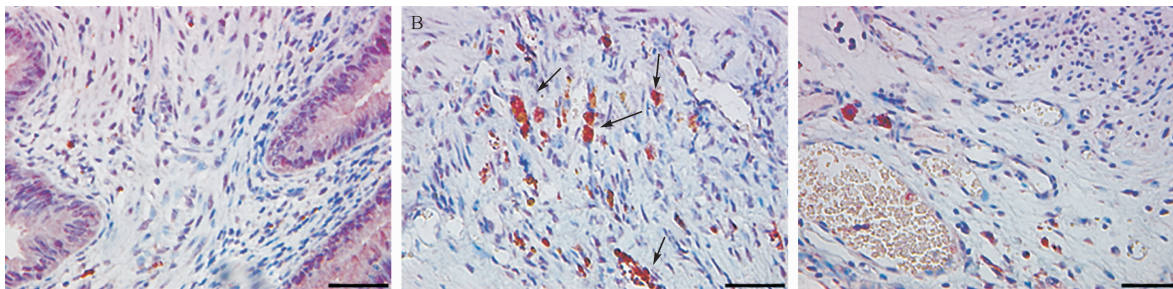
3 讨论

子宫内膜异位症的发病原因至今尚未明确, 许多学者提出了不同的学说, 包括经血逆流、体腔上皮化生、细胞免疫功能改变、转移、遗传因素、环境因素、特殊基因与环境间的多因素共同作用等^[4]。研究显示子宫内膜异位症也与盆腔局限性的炎症反应过程有关, 伴随着盆腔免疫细胞功能的改变。肥大细胞是免疫炎症反应体系中的重要细胞之一, 它存储很多炎症介质, 如组胺、类胰蛋白酶、细胞因子、趋化因子和花生四烯酸衍生物等, 可作用于脉管系统、平滑肌、结缔组织、黏膜腺体和炎症细胞等发挥作用^[5]。肥大细胞

通常定居在结缔组织, 不随血流循环而流动。在炎症形成过程中, 肥大细胞能脱颗粒释放炎症介质, 可激活或致敏初级感觉神经元, 导致神经病理性疼痛。

在腹膜型子宫内膜异位症病灶中, 肥大细胞数量及其脱颗粒数量显著高于正常腹膜, 正常腹膜即使有肥大细胞存在也几乎没有脱颗粒现象及肥大细胞异质性改变, 包括类胰蛋白酶阳性细胞增多及内源性类胰蛋白酶表达增加, 子宫内膜异位症病灶附近靠近神经纤维有大量活化和脱颗粒的肥大细胞^[6-7]; 卵巢型子宫内膜异位症病灶肥大细胞大多出现在子宫内膜腺体附近以及子宫内膜周围的间质组织, 其数量高于在位子宫内膜及正常子宫内膜, 但与月经周期无明显相关性^[8-10]; 一般来说, 临床上深部浸润型子宫内膜异位症患者疼痛症状较腹膜型和卵巢型更明显, 前者较后者脱颗粒的肥大细胞数量更多^[5]。这些研究结果提示肥大细胞在各种类型的子宫内膜异位症中均有存在, 可能与子宫内膜异位症疼痛等症状的产生密切相关。

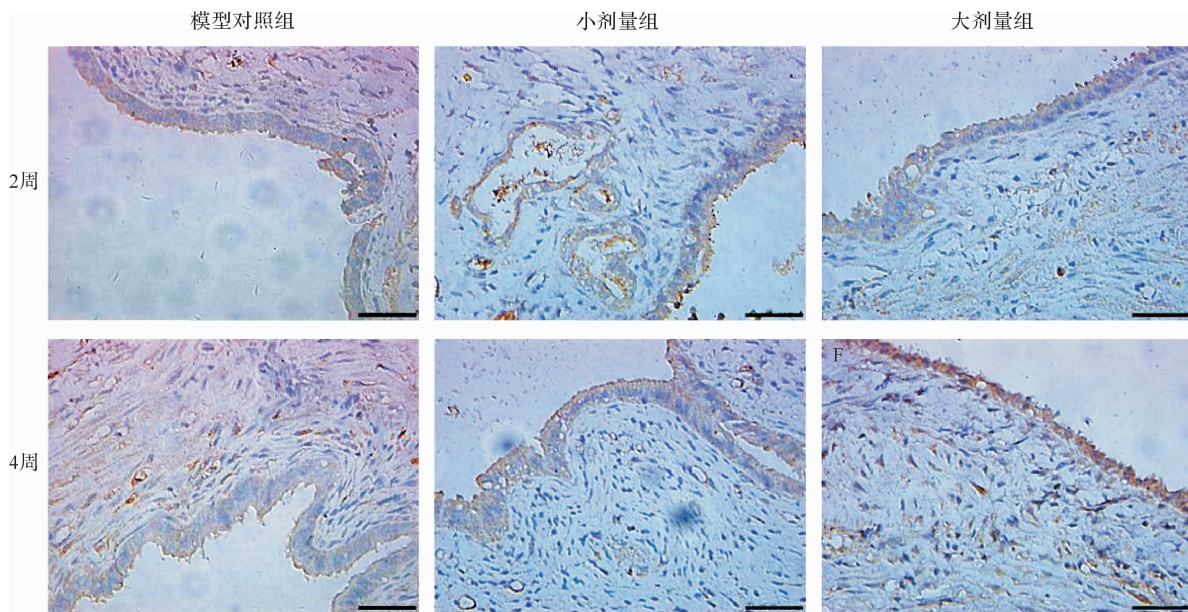
在本研究中, 我们首先采用大鼠肌肉注射雌激素进行干预, 观察雌激素对肥大细胞脱颗粒参与子宫内膜异位症发病的过程。子宫内膜异位症患者局灶性雌激素增多, 前期有研究发现雌激素



A: 病灶间质可见类胰蛋白酶阳性(↑)的红色肥大细胞; B: 病灶纤维化区域类胰蛋白酶阳性(↑)的红色肥大细胞数增多, 脱颗粒的肥大细胞形状不规则; C: 病灶血管周围可见类胰蛋白酶阳性(↑)的红色肥大细胞, 未脱颗粒的肥大细胞形态较规则, 着色均匀. 标尺 = 50 μm.

图6 子宫内膜异位症大鼠病灶肥大细胞类胰蛋白酶阳性表达

Fig. 6 Expression of tryptase-positive mast cells in endometriosis model



A: 模型对照组 2 周时神经生长因子的表达较弱, 呈淡黄色; B: 雌激素干预 2 周时小剂量组神经生长因子的表达较弱, 呈淡黄色; C: 雌激素干预 2 周时大剂量组神经生长因子的表达亦较弱, 与模型对照组及小剂量组相似; D: 模型对照组 4 周时神经生长因子的表达与 2 周时表达相似; E: 雌激素干预 4 周时小剂量组神经生长因子的表达与 2 周时表达相似; F: 雌激素干预 4 周时大剂量组神经生长因子的表达(呈棕色)多于模型对照组. 标尺 = 50 μm.

图7 雌激素干预对子宫内膜异位症大鼠病灶神经生长因子表达的影响

Fig. 7 Nerve growth factor expression in endometriosis model

表2 不同组别子宫内膜异位症大鼠病灶类胰蛋白酶阳性的肥大细胞数和神经生长因子表达评分比较

Table 2 Tryptase and nerve growth factor expression after treatment with different doses of estrogen in endometriosis model

组别	2 周		4 周	
	类胰蛋白酶阳性的肥大细胞数	神经生长因子染色评分	类胰蛋白酶阳性的肥大细胞数	神经生长因子染色评分
大剂量组	15.00(8.80 ~ 16.20) *	3.67(3.00 ~ 4.00)	10.60(5.00 ~ 11.20) *	5.00(4.00 ~ 6.00) *
小剂量组	0.93(0.20 ~ 1.00)	3.33(3.00 ~ 4.00)	10.40(9.98 ~ 14.80) *	3.50(0 ~ 4.00)
模型对照组	1.80(0.40 ~ 3.20)	3.50(3.00 ~ 4.00)	7.60(0.60 ~ 11.00)	2.50(1.00 ~ 4.00)

与模型对照组比较, * $P < 0.05$.

可促进肥大细胞增殖和脱颗粒,其机制是肥大细胞可表达高亲和力的雌激素受体,进而启动快速的钙离子流^[11-14]。肥大细胞激活脱颗粒后可释放多种介质,如类胰蛋白酶、细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-1 α 、IL-1 β 等)、神经生长因子、5-羟色胺、白三烯、前列腺素及趋化因子等多种介质参与病理生理过程。同时,Pang等^[12]在豚鼠间质性膀胱炎模型中发现雌激素诱导肥大细胞增殖;性激素可以通过诱导生长因子受体的表达而引起肥大细胞数量增加^[15]。本实验也同样提示雌激素会促进肥大细胞活化脱颗粒,在小剂量组中肥大细胞脱颗粒显著增加,与有关研究结果相符,但大剂量组肥大细胞脱颗粒与模型对照组差异不显著,可能与本研究样本量少有关,有待进一步研究。

本研究发现,雌激素能促进子宫内膜异位症病灶的生长。应用雌激素处理后,血清雌二醇水平升高,子宫内膜异位症大鼠病灶体积大于模型对照组,随着用药时间延长,囊肿体积也有增加。本研究表明大鼠体内的雌激素水平与子宫内膜异位症病灶大小相关,提示雌激素在子宫内膜异位症的致病过程中发挥重要作用。

TNF- α 是炎症过程中的重要的细胞因子,可由多种细胞产生,如中性粒细胞、活化的淋巴细胞、巨噬细胞、肥大细胞和自然杀伤细胞等。有研究证实在子宫内膜异位症患者中TNF- α 可以促使间质细胞和间皮的黏附,同时能刺激子宫内膜间质细胞增殖,这是TNF- α 参与子宫内膜异位症发病的两种重要机制,是子宫内膜异位症发病和病程进展的必要因素之一^[16-17]。同时TNF- α 作为介导疼痛的前炎症细胞因子,能剂量依赖性地致敏初级感觉神经元,介导子宫内膜异位症发生疼痛。既往研究发现子宫内膜异位症妇女腹腔液中TNF- α 水平高于正常妇女,并且TNF- α 水平与子宫内膜异位症严重程度相关^[18-19];同时子宫内膜异位症患者血清中TNF- α 水平也较正常人高,尤其是早期的子宫内膜异位症患者^[20-22]。本研究发现应用雌激素2周时,血清TNF- α 水平各组间未见明显差异,而应用4周时两激素组血清TNF- α 水平高于模型对照组。因而我们推测在造模后连续使用4周雌激素对肥大细胞脱颗粒的作用更为显著。同样地,4周时大剂量组血清神经生长因子水平较模型对照组升高,可能为高浓度

的雌激素促进肥大细胞脱颗粒,活化的肥大细胞释放神经生长因子等介质所致。肥大细胞活化后可以释放神经生长因子,反之,后者可以促使募集更多的肥大细胞,激发其脱颗粒。神经生长因子可能通过致敏疼痛感受器,提高感觉神经元的数量,在子宫内膜异位症相关疼痛中发挥重要作用,同时促进炎症性疼痛的发生^[23]。神经生长因子可以作为一个疼痛介质发挥作用,直接参与痛觉过敏和持续炎症性疼痛;也可以引导参与中枢疼痛传递调制的神经肽如P物质和降钙素基因相关肽的表达。神经生长因子在子宫内膜异位症的过度表达可以解释在子宫内膜异位症患者中发生的疼痛和痛觉过敏现象^[24]。肥大细胞活化可促使类胰蛋白酶表达升高,但本研究免疫组织化学染色结果提示病灶类胰蛋白酶的表达虽有升高趋势,但无统计学意义。TNF- α 和神经生长因子在机体内广泛存在,与疼痛等症状产生相关,本研究数据表明它们的水平伴随着大鼠体内肥大细胞脱颗粒而升高,提示大鼠子宫内膜异位症的致病可能与肥大细胞释放的TNF- α 和神经生长因子存在一定的相关性;但其类胰蛋白酶表达并未随之增加,提示子宫内膜异位症致病过程中可能存在多种机制。

总之,子宫内膜异位症的发病、发展与多种因素相关,其中雌激素促进子宫内膜异位症病灶的生长,可能与激活肥大细胞脱颗粒相关,而后者与体内增加的TNF- α 、神经生长因子可能有关。

参考文献

- [1] ZHANG G, DMITRIEVA N, LIU Y, et al. Endometriosis as a neurovascular condition: estrous variations in innervation, vascularization, and growth factor content of ectopic endometrial cysts in the rat [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(1):R162-R171.
- [2] ASANTE A, TAYLOR R N. Endometriosis: the role of neuroangiogenesis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73:163-182.
- [3] VERNON M W, WILSON E A. Studies on the surgical induction of endometriosis in the rat [J]. *Fertil Steril*, 1985, 44(5):684-694.
- [4] GIUDICE L C, KAO L C. Endometriosis [J]. *Lancet*, 2004, 364(9447):1789-1799.
- [5] ANAF V, CHAPRON C, EI NAKADI I, et al. Pain, mast cells, and nerves in peritoneal, ovarian, and

- deep infiltrating endometriosis [J]. **Fertil Steril**, 2006, 86 (5):1336-1343.
- [6] MATSAZAKI S, CANIS M, DARCHA C, et al. Increased mast cell density in peritoneal endometriosis compared with eutopic endometrium with endometriosis [J]. **Am J Reprod Immunol**, 1998, 40 (4): 291-294.
- [7] PAULA R J R, OLIANI A H, VAZ-OLIANI D A, et al. The intricate role of mast cell proteases and the annexin A1-FPR1 system in abdominal wall endometriosis [J]. **J Mol Histol**, 2015, 46(1):33-43.
- [8] FUJIWARA H, KONNO R, NETSU S, et al. Localization of mast cells in endometrial cysts [J]. **Am J Reprod Immunol**, 2004, 51(5):341-344.
- [9] KEMPURAJ D, PAPADOPOULOU N, STANFORD E J, et al. Increased numbers of activated mast cells in endometriosis lesions positive for corticotropin-releasing hormone and urocortin [J]. **Am J Reprod Immunol**, 2004, 52(4):267-275.
- [10] SUGAMATA M, IHARA T, UCHIIDE I. Increase of activated mast cells in human endometriosis [J]. **Am J Reprod Immunol**, 2005, 53(3):120-125.
- [11] ZAITSU M, NARITA S, LAMBERT K C, et al. Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx[J]. **Mol Immunol**, 2007, 44(8):1977-1985.
- [12] PANG X, COTREAU-BIBBO M M, SANT G R, et al. Bladder mast cell expression of high affinity oestrogen receptors in patients with interstitial cystitis [J]. **Br J Urol**, 1995, 75(2):154-161.
- [13] JING H, WANG Z, CHEN Y. Effect of oestradiol on mast cell number and histamine level in the mammary glands of rat [J]. **Anat Histol Embryol**, 2012, 41 (3):170-176.
- [14] JENSEN F, WOULDWYK M, TELES A, et al. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation [J]. **PLoS One**, 2010, 5(12):e14409.
- [15] LANLUA P, DECORTI F, GANGULA P R, et al. Female steroid hormones modulate receptors for nerve growth factor in rat dorsal root ganglia [J]. **Biol Reprod**, 2001, 64(1):331-338.
- [16] ZHANG R J, WILD R A, OJAGO J M. Effect of tumor necrosis factor-alpha on adhesion of human endometrial stromal cells to peritoneal mesothelial cells: an in vitro system [J]. **Fertil Steril**, 1993, 59(6):1196-1201.
- [17] BULLIMORE D W. Endometriosis is sustained by tumour necrosis factor-alpha [J]. **Med Hypotheses**, 2003, 60(1):84-88.
- [18] EISERMANN J, GAST M J, PINEDA J, et al. Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of women undergoing laparoscopic surgery [J]. **Fertil Steril**, 1988, 50(4):573-579.
- [19] CALHAZ-JORGE C, COSTA A P, BARATA M, et al. Tumour necrosis factor alpha concentrations in the peritoneal fluid of infertile women with minimal or mild endometriosis are lower in patients with red lesions only than in patients without red lesions [J]. **Hum Reprod**, 2000, 15(6):1256-1260.
- [20] BEDAIWY M A, FALCONE T, SHARMA R K, et al. Prediction of endometriosis with serum and peritoneal fluid markers: a prospective controlled trial [J]. **Hum Reprod**, 2002, 17(2):426-431.
- [21] PIZZO A, SALMERI F M, ARDITA F V, et al. Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis [J]. **Gynecol Obstet Invest**, 2002, 54(2):82-87.
- [22] MALUTAN A M, DRUGAN T, COSTIN N, et al. Pro-inflammatory cytokines for evaluation of inflammatory status in endometriosis [J]. **Cent Eur J Immunol**, 2015, 40(1):96-102.
- [23] PEZET S, MCMAHON S B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain [J]. **Annu Rev Neurosci**, 2006, 29:507-538.
- [24] KAJITANI T, MARUYAMA T, ASADA H, et al. Possible involvement of nerve growth factor in dysmenorrhea and dyspareunia associated with endometriosis [J]. **Endocr J**, 2013, 60 (10): 1155-1164.

[本文编辑 陈韶华 沈 敏]