

内皮抑素转基因治疗子宫内膜异位症大鼠模型的实验研究

方小玲 章婷婷 刚 君

(中南大学湘雅二医院 湖南 长沙 410011)

摘要 目的:了解内皮抑素(ES)转基因治疗子宫内膜异位症大鼠模型的疗效。方法 构建子宫内膜异位症大鼠模型,选择建模成功的大鼠为实验研究对象,随机分为ES转染组(I组)24只、载体对照组(II组)20只和阴性对照组(III组)20只。I组病灶局部注射 lipofectamine-endo-pBud 复合物进行基因转染,II组注射 lipofectamine-pBud 复合物,III组注射 PBS 用于对照。通过实时荧光定量 PCR 法检测异位病灶中 ES 基因的相对表达量,用 Western-blot 测定 ES-HA 融合蛋白及 ES 蛋白的相对表达量,来判断转染成功与否。用 ELISA 法对大鼠血清中 ES 及血管内皮细胞生长因子(VEGF)水平进行测定,用免疫组化 SP 法对 ES、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)以及微血管密度(MVD)的表达进行测定,用游标卡尺对转染前后各组大鼠异位病灶的长、宽进行测量,计算体积,分析各指标实验前后的差异,观察内皮抑素转基因治疗子宫内膜异位症大鼠模型的疗效。结果 注射相应试剂后2周,I组异位病灶组织中 ES 基因的相对表达量高于两对照组 ($P<0.05$),有 ES-HA 融合蛋白表达,且 ES 蛋白的相对表达量显著高于两对照组 ($P<0.01$);组血清中 ES 水平显著高于两对照组 ($P<0.01$),VEGF 水平显著低于两对照组 ($P<0.01$),三组 ES 与 VEGF 在血清中的表达水平呈负相关 ($r=-0.805$);组异位病灶组织中 ES 表达明显高于两对照组 ($P<0.01$);MMP-2 的表达明显少于两对照组 ($P<0.01$);MVD 明显少于两对照组 ($P<0.01$);三组 ES 与 MMP-2 在异位内膜中的表达呈负相关 ($r=-0.700$);组异位病灶体积明显小于两对照组 ($P<0.01$)。结论 阳离子脂质体 LipofectamineTM2000 介导的重组质粒 endo-pBud 病灶内直接注射法可以成功实现 ES 在子宫内膜异位症大鼠异位内膜中的表达,并对子宫内膜异位症大鼠模型有治疗作用。

关键词 子宫内膜异位症 大鼠模型 内皮抑素 基因 转染

中图分类号 Q95-3, R711.71 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1013-07

Experimental Studies of Therapeutic Effect of Endostatin Gene Transferred into Endometriosis Rat Model

FANG Xiao-ling, ZHANG Ting-ting, GANG Jun

(Department of Gynecology, Xiang-ya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT Objective: To observe the curative effect by transferring endostatin gene into endometriosis rat model. **Methods:** To establish endometriosis model in Lewis rats by deploying autotransplantation, choosing the sixty-four successful rat models as empirical study objects, divided them randomly into three groups: Injected 2 μ l lipofectamine-endo-pBud compounds to I group, 2 μ l lipofectamine-pBud compounds to II group and 2 μ l PBS to III group. Took the ectopic focus tissues to measure the opposing expression of endostatin gene by real-time fluorescent quantitative PCR, measure the opposing expression of endostatin protein and expression of ES-HA fusion protein by Western-blot. Detect the level of endostatin and VEGF in serum by ELISA. Detected the endostatin, MMP-2 and MVD in ectopic focus by immunohistochemical assay, and measured the volume of the ectopia focus by vernier cursor. **Results:** The opposing expressions of endostatin gene were difference between I group and the two control groups has statistical significance ($P<0.05$); ES-HA fusion protein can be detected in the ectopic focus in I group; The opposing expression of endostatin protein is much higher in the ectopic focus of I group than in the two control groups ($P<0.01$). The level of ES is much higher in I group than in the two control groups ($P<0.01$); The level of VEGF is much lower in I group than in the two control groups ($P<0.01$); There was an negative correlation between ES and VEGF in serum ($r=-0.805$). The expression of ES is much higher in I group than in the two control groups ($P<0.01$); The expression of MMP-2 is much lower in I group than in the two control groups ($P<0.01$); and there was an negative correlation between the expression of ES and MMP-2 in ectopia focus ($r=-0.700$). The MVD is much lower in I group than in the two control groups ($P<0.01$); The volume of the ectopia focus is smaller in I group than in the two control groups ($P<0.01$) two weeks after transferring. **Conclusions:** ES gene and protein can expressed in endometriosis rats successfully by injecting lipofectinmine-endo-pBud compounds to the ectopic focus directly, and it has definite curative effect in endometriosis rat model.

Key words: Endometriosis; Rat model; Endostatin; Gene; Transfection

Chinese Library Classification: Q95-3, R711.71 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1013-07

作者简介 方小玲, E-mail: f2_xiaolingfang@126.com

(收稿日期 2010-12-08 接受日期:2010-12-31)

子宫内膜异位症(EM)是生育年龄妇女的多发病,其发病机制至今尚未完全明确,治疗效果也不理想,最被公认的 Sampson 经血逆流种植学说指出,新血管的生成是子宫内膜异位症发生的必要条件,从而抑制新生血管生成作为治疗内异症的一种新思路成为研究的热点。迄今为止已经发现多种抑制血管生成的因子,其中 1997 年由哈佛大学 O'Reilly^[1]等发现的内皮抑素(Endostatin,ES)是目前已知的最强的内源性血管形成抑制因子,而将内皮抑素应用于内异症治疗方面的研究^[2],处于起步阶段,给药方式和给药途径也欠理想,特别是在基因治疗方面尚空白。本实验用自体子宫内膜移植法建立子宫内膜异位症 Lewis 大鼠模型,通过阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 介导的重组质粒 endo-pBud 病灶局部直接注射的方法把含有大鼠内皮抑素基因片断的质粒转染到模型体内,了解内皮抑素转基因技术应用于子宫内膜异位症治疗的可能,通过分析 ES、VEGF、MMP-2、MVD 及异位病灶体积在实验前后的变化,观察内皮抑素转基因治疗子宫内膜异位症大鼠模型的疗效。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

85 只 14 周龄健康成熟未孕雌性 Lewis 大鼠,平均体重为 $240.6 \pm 15.14\text{g}$,购自中国医学科学院实验动物研究所,在湘雅二医院动物实验中心饲养。分泌型大鼠 pBudCE4.1 endos 重组质粒,由福建医科大学附属第一医院神经外科林志雄教授惠赠。空白 pBudCE4.1 真核表达质粒、阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 (美国 Invitrogen 公司),SYBR(R) PrimeScript™ RT-PCR Kit (大连宝生物工程有限公司),兔抗鼠 β -actin 抗体、浓缩型兔抗鼠 Endostatin 单克隆抗体、浓缩型兔抗鼠 HA 多克隆抗体、浓缩型兔抗鼠 MMP-2 单克隆抗体及浓缩型兔抗鼠 CD34 单克隆抗体(晶美生物工程有限公司),大鼠血管内皮细胞生长因子 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),大鼠内皮抑素 ELISA 试剂盒(美国 CYTIMMUNE science inc 公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型的建立 采用自体子宫内膜移植法^[3]建立子宫内膜异位症大鼠模型,手术 4 周后开腹,以移植的子宫内膜存活、体积增大,表面有血管形成,呈内含清亮的液体的小囊状为判断建模成功的标准;并在转染后 2 周通过异位病灶病理组织学切片,HE 染色,进一步确认成模。

1.2.2 质粒扩增、提取及转染 用 bioDev-tech 质粒抽提试剂盒提取后取小量质粒送上海博亚公司测序,制备 lipofectamine-endo-pBud 复合物及载体脂质体 lipofectamine-pBud 复合物。用 $10\mu\text{l}$ 微量注射器行异位病灶局部一次性直接注射,ES 转染组注射 $2\mu\text{l}$ 脂质体 lipofectamine-endo-pBud 复合物,载体对照组注射 $2\mu\text{l}$ 载体脂质体复合物,空白对照组注 $2\mu\text{l}$ PBS。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 测定异位病灶组织中 ES 基因的相对表达量 以 β -actin 作为内参照,上游引物 5'-GGAGAT-TACTGCCCTGGCTCCTA-3',下游引物 5'-GACTCATCG-TACTCTGCTTGCTG-3',ES 基因上游引物 5'-GCC CG-CATCTTTTCTTTTCG-3',下游引物 5'-TGTAACC-CCAGTAGC-TTCAGTCC-3',RT 反应条件 37°C 15min, 85°C

5sec,PCR 反应条件 95°C 10 sec, 95°C 5 sec,45Cycles, 60°C 30 sec,45Cycles。

1.2.4 Western-blot 测定异位病灶组织 ES-HA 融合蛋白表达及 ES 蛋白的相对表达量 用实时荧光定量 PCR 中保存的酚层提取蛋白质,Bradford 法测蛋白浓度。

1.2.5 大鼠血清 ES 及 VEGF 水平的测定 分别按照大鼠内皮抑素 ELISA 试剂盒及大鼠血管内皮细胞生长因子 ELISA 试剂盒的操作说明进行实验,根据各样品的吸光值读出相应的浓度。

1.2.6 异位病灶处 ES、MMP-2 及 MVD 表达的测定 按免疫组化 SP 试剂盒说明书进行操作。采用半定量积分法,参照 Fromwitz 评分方法,根据切片阳性细胞率和阳性细胞着色强度评分,分别计算 ES 和 MMP-2 的积分。采用 Weidner 微血管计数方法^[4],计算平均微血管密度(/HPF)。

1.2.7 体积的计算 用游标卡尺测量异位病灶的长(L)和宽(W),根据公式^[5] $V=L \times W^2 \times 0.5$,计算体积。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 for windows 统计软件进行统计学分析,检验水准取 $\alpha = 0.05$ (双尾)。符合正态分布的实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,两组间均数比较用两样本 t 检验(方差齐性)或单因素方差分析(方差不齐);不符合正态分布的实验数据以最大值、最小值和中位数表示,两组间比较用两样本的秩和检验;指标间的相关性符合正态分布的用直线相关 Pearson 相关系数分析,不符合正态分布用秩相关 Spearman 相关系数分析,以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义, $P < 0.01$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 64 只大鼠建模成功

2.2 重组质粒提取后由上海博亚公司测序,与 AF189709 吻合

2.3 异位病灶处 ES 基因的相对表达量

ES 转染组 ES 基因的相对表达量高于载体对照组和阴性对照组,有统计学意义($P < 0.05$)。载体对照组与阴性对照组比较,结果无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 异位病灶处 ES 蛋白的表达

病灶内注射相应试剂后 2 周, Ia、IIa、IIIa 三组异位病灶组织中 ES 蛋白表达与 β -actin 表达的平均光密度比值的统计分析结果显示 ES 转染组 ES 蛋白相对表达量显著高于载体对照组和阴性对照组($P < 0.01$),而载体对照组与阴性对照组两组之间比较没有统计学差异。

2.5 血清 ES 及 VEGF 水平

转染前三组大鼠模型血清 ES 水平组间比较均无统计学意义($P > 0.05$)。转染后 2 周 ES 转染组与两对照组组间比较有显著性差异($P < 0.01$),ES 转染组血清 ES 水平明显升高,两对照组间比较无统计学意义($P > 0.05$)。转染前后三组大鼠血清 ES 水平组内比较,ES 转染组有显著性差异($P < 0.01$),转染后血清 ES 水平较转染前明显升高,两对照组转染前后比较无统计学意义($P > 0.05$)。血清 VEGF 水平的统计分析显示,转染前三组血清 VEGF 水平比较无统计学意义($P > 0.05$)。转染后 ES 转染组与两对照组组间比较有显著性差异($P < 0.01$),ES 转染组血

清 VEGF 水平明显降低, 两对照组之间比较无统计学意义 (P>0.05) 转染前后三组 VEGF 水平组内比较,ES 转染组有显著性差异 (P<0.01) , 转染后血清 VEGF 水平较转染前明显降低,两对照组转染前后比较无统计学意义 (P>0.05) 。

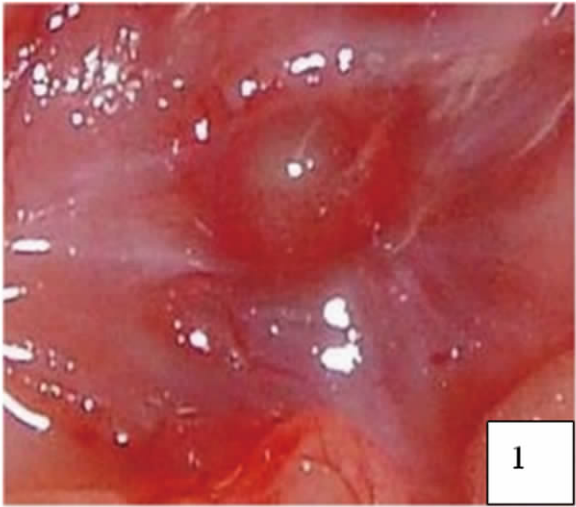


图 1 大鼠自体子宫内膜移植术后四周,建模成功大鼠腹膜处的异位病灶
Fig.1 On gross examination lesions varied from a single pink nodule, to multiple nodules, to dense tanned lesions, which was the same gross variation as seen in human endometriosis

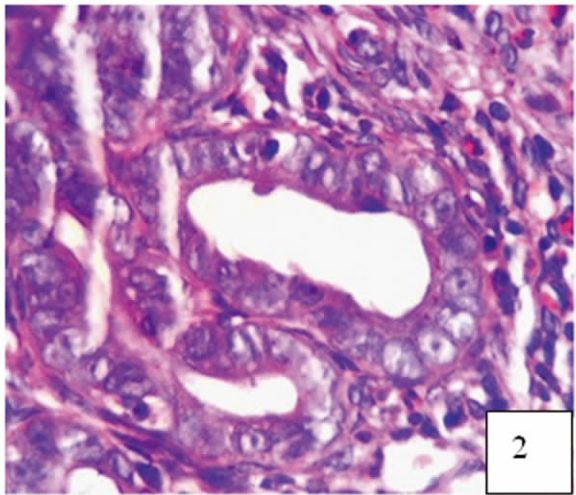


图 2 建模成功大鼠异位病灶组织,见子宫内膜腺体和间质(HE× 400)
Fig.2 Typical appearance of endometriosis with endometrial glandular epithelium surrounded by an intact basement membrane and adjacent endometrial stroma (HE× 400)

表 1 转染后三组异位病灶组织中 Endostatin 基因相对表达量 (X± S)

Table 1 Expression of endostatin mRNA in the endometriotic lesions of three groups

Group	n	ES/β -actin	p
Ia	12	31950.44± 10507.82*	0.034
Ila	10	19810.37± 14447.15	
Ia	12	31950.44± 10507.82*	0.001
IIIa	10	17803.22± 6650.7	
Ila	10	19810.37± 14447.15	0.695
IIIa	10	17803.22± 6650.74	

Note: Compared with Ila group and IIIa group, *P<0.05

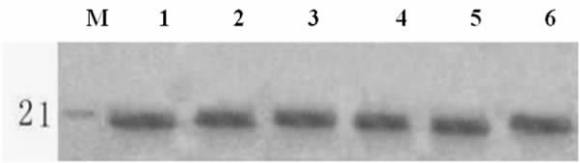


图 3 ES-HA 联合蛋白在 ES 转染组大鼠异位病灶中的表达
Fig.3 Expression of ES-HA protein in the endometriotic lesions of I group

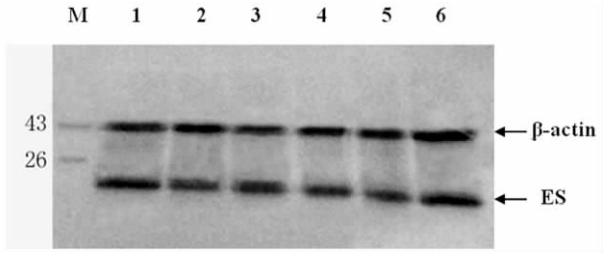


图 4 ES 蛋白在 ES 转染组大鼠异位病灶中的表达
Fig.4 Expression of endostatin protein in the endometriotic lesions of I group

表 2 转染后三组间 ES/β -actin 平均光密度比值的比较 (X± S)

Table 2 Expression of endostatin protein in the endometriotic lesions of three groups

Group	n	ES/β -actin	p
Ia	12	1.080(0.983-1.102) *	0.000
Ila	10	0.677(0.566-0.795)	
Ia	12	1.080(0.983-1.102) *	0.000
IIIa	10	0.696(0.532-0.784)	
Ila	10	0.677(0.566-0.795)	0.199
IIIa	10	0.696(0.532-0.784)	

Note: Compared with Ila group and IIIa group, *P<0.01

表 3 转染前后三组大鼠血清 ES 水平的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 3 Serum levels of ES in endometriosis rat models

Group	n	Transfection	ES (pg/ml)	p
I	24	Before	127.48± 17.69	0.000
		After	173.03± 15.41	
II	20	Before	136.05± 16.70	0.589
		After	135.28± 14.82*	
III	20	Before	125.17± 19.48	0.808
		After	126.64± 18.68*#	

*P < 0.01, comparison with group I after the transfection; #P > 0.05, comparison with group II after the transfection.

表 4 转染前后三组大鼠血清 VEGF 水平的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 4 Serum levels of VEGF in endometriosis rat models

Group	n	Transfection	VEGF (pg/ml)	p
I	24	Before	58.97± 8.65	0.001
		After	48.90± 10.18	
II	20	Before	56.70± 8.26	0.900
		After	57.03± 7.81*	
III	20	Before	59.29± 9.60	0.496
		After	58.53± 8.57*#	

Note: *P < 0.01, comparison with group I after the transfection; #P > 0.05, comparison with group II after the transfection.

表 5 转染后三组大鼠异位病灶 ES 的表达的比较

Table 5 the immunostaining scores of ES in the endometriotic lesions of three groups

Group	n	ES	p
Ib	12	6(4-9) *	0.000
IIb	10	2.5(2-4)	
Ib	12	6(4-9) *	0.000
IIIb	10	3(2-4)	
IIb	10	2.5(2-4)	0.744
IIIb	10	3(2-4)	

Note: Compared with IIb group and IIIb group, *P < 0.01

2.6 异位病灶处 ES 及 MMP-2 的表达

转染后异位病灶组织 ES 与 MMP-2 的免疫组化积分的统计分析显示,ES 转染组与两对照组比较有显著性差异 ($P < 0.01$),ES 转染组中 ES 的表达明显增高,MMP-2 的表达明显减少 而两对照组之间进行比较,结果无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.7 异位病灶微血管密度 (MVD)

转染后异位病灶组织 MVD 的统计分析显示,ES 转染组与两对照组比较,结果有显著性差异 ($P < 0.01$),ES 转染组明显少于两对照组; 两对照组之间进行比较, 结果无统计学意义 ($P > 0.05$)

2.8 异位病灶的体积大小

三组异位病灶体积的统计分析显示,转染前三组病灶体积大小比较无统计学意义 ($P > 0.05$) 转染后异位病灶体积的大小比较,ES 转染组与两对照组组间比较, 结果有显著性差异 ($P < 0.01$),ES 转染组体积明显小于两对照组,两对照组之间进行比较,结果无统计学意义 ($P > 0.05$) 三组转染前后异位病灶体积大小的组内比较,三组转染前后体积变化均有显著性差异 ($P < 0.01$),ES 转染组异位病灶体积转染后比转染前明显缩小, 两对照组异位病灶体积转染后比转染前明显增大。

表 6 转染后三组大鼠异位病灶 MMP-2 的表达的比较

Table 6 the immunostaining scores MMP-2 in the endometriotic lesions of three groups

Group	n	MMP-2	p
Ib	12	3(1-4) *	0.004
IIb	10	4(3-6)	
Ib	12	3(1-4) *	0.001
IIIb	10	4(3-6)	
IIb	10	4(3-6)	0.573
IIIb	10	4(3-6)	

Note: Compared with IIb group and IIIb group, *P<0.01

表 7 转染后三组大鼠异位病灶 MVD 的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 7 MVD in the endometriotic lesions of three groups

Group	n	MVD (HPF)	p
Ib	12	7.52± 0.84 *	0.000
IIb	10	20.56± 2.34	
Ib	12	7.52± 0.84*	0.000
IIIb	10	21.37± 1.40	
IIb	10	20.56± 2.34	0.363
IIIb	10	21.37± 1.40	

Note: Compared with IIb group and IIIb group, *P<0.01

表 8 转染前后三组大鼠异位病灶体积大小的比较 ($\bar{X} \pm S$)

Table 8 volume in the endometriotic lesions of three groups

Group	N	Transfection	Volume (mm)	p
I	24	Before	96.37± 10.74	0.000
		After	39.33± 7.38	
II	20	Before	98.06± 11.54	0.000
		After	115.53± 13.64*	
III	20	Before	97.71± 9.73	0.000
		After	112.51± 11.75*#	

Note: *P<0.01, comparison with group I after the transfection; #P>0.05, comparison with group II after the transfection.

3 讨论

建立合适的子宫内膜异位症动物模型是研究子宫内膜异位症病因、发病机制、治疗以及预防等的主要途径。本实验 85 只大鼠中,有 64 只建模成功,建模成功率为 75.29%,在国内外报道成功率范围之内,进一步证实自体子宫内膜移植法建立大鼠子宫内膜异位症模型成功率较高,具有可行性和可重复性。虽然选择腹膜处种植可以减低粘连的发生,但我们实验中仍有部分大鼠异位病灶与周围组织有不同程度的粘连,这与 Erbil 等^[6]报道的实验结果相似,也与临床上子宫内膜异位症患者病灶多与周围组织粘连造结果相符。实验过程中我们还发现载体

对照组与阴性对照组两组大鼠异位病灶体积术后 6 周明显大于术后 4 周,表明此 2 周期间异位病灶处于增长活跃阶段,与国内外的实验结果相似。

内皮抑素是目前已知的最强的内源性新生血管生成抑制因子,有试验证明将内皮抑素基因导入动物体内,可持续表达内源性内皮抑素蛋白产物,并观察到与体外重组蛋白相似的生物学活性与功能^[7]。本实验采用体内导入方式,用病灶局部单次直接注射法避免了其他方法靶向性差,容易引起非靶器官副作用以及多次注射带来的操作繁杂、反复开腹引起的大鼠感染率与死亡率的增加的缺点,同时降低了用量。内皮抑素基因治疗方面,已成功构建了腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、逆转录病

毒和质粒载体等, 本实验选用的真核表达质粒 pBudCE 4.1 安全、简单、高效, 低毒、低免疫反应、其携带的外源基因整合到宿主基因组的机率很低, 不受基因插入片段大小的限制, 还有获得方便、便于保存和检验等明显的优势^[8], 它能在哺乳动物细胞系上同时独立高效表达 2 个基因的长 4.6kb 的真核表达载体, 含有巨细胞病毒立即早期启动子(CMV promoter)和肽链延长因子基因启动子(EF promoter)两个转录效率很高的强启动子和多个克隆酶切位点, 能够实现目的基因的高效表达。它可以使插入的基因形成独立完整的转录单位, 可用作在绝大多数的哺乳动物细胞系上高水平的稳定或瞬时的表达研究。本实验选择使用的阳离子脂质体 Lipofectamin™2000 是经过改良的阳离子脂质体, 其转染效率大约为 30%-40%, 远远高于传统的脂质体。且实验结果显示转染后异位病灶体积、MVD 以及 ES、MMP-2 表达在载体对照组与空白对照组之间均无差异, 提示阳离子脂质体 Lipofectamin™2000 没有毒副作用, 与 White RE^[9]等的实验结果一致。本实验结果显示转染 2 周后异位病灶组织中内皮抑素基因的相对表达量, ES 转染组高于载体对照组和阴性对照组 ($P < 0.05$), 从基因水平表明转染成功; 实验所使用的重组质粒在目的蛋白的基因片段上连接了标记蛋白 HA 的片段 (插入的 HA 标记蛋白不影响 endos 的生物学活性), 在基因转染后 2 周测得异位病灶组织中有 ES-HA 联合蛋白表达, 从而在蛋白的水平提示了转染的成功。在此基础上, 实验还用 ES 抗体通过 western-blot 的方法对 3 组大鼠转染后异位病灶组织中 ES 蛋白的表达进行了测定, ES 蛋白平均光密度比结果均显示 ES 转染组异位病灶组织中 ES 蛋白的表达明显高于载体对照组和阴性对照组 ($P < 0.01$), 表明转染 2 周后仍有较高浓度的 ES 蛋白的表达, 转染后表达的 ES 蛋白的活性至少可以为持续 2 周。

血管形成机制在子宫内位症发病机理中的重要地位已逐渐被证实, 新生血管腔的形成及连通通常是由正负调控两种因子共同决定的, 血管生成抑制因子可有效地抑制新生血管的形成, 有望成为治疗子宫内位症的新方法^[10]。内皮抑素作为内皮细胞增殖、迁移和血管生成的专一性抑制剂, 已证实对生理性的血管发生无抑制作用, 其抗血管生成的作用具有广谱、低毒、无抗药性的特点。在子宫内位症患者发病早期即有 VEGF 的增高, 在子宫内位症患者的腹腔液中 VEGF 的浓度明显高于非子宫内位症患者, 且其增高的水平与病变的程度成正比^[11]。有学者研究显示^[12], EMS 患者腹腔液中的内皮抑素较正常升高, 但增高幅度小于 VEGF, 两者动态平衡被打破, VEGF 获得相对优势, 因此刺激逆流并附着在腹膜或其他脏器表面的内膜碎片及其周围的组织形成新生血管, 建立并维持新的血供, 使异位病灶存活并发展。本实验显示转染后 ES 转染组血清 ES 水平明显高于两对照组, 而 VEGF 水平明显低于两对照组, 我们对两个指标进行相关性分析, 发现两者呈现负相关, 这些结果提示, 内皮抑素转基因治疗 EMS 大鼠可使血清 ES 水平增高, VEGF 水平降低, ES 可能通过抑制 VEGF 的活性, 发挥其抑制新生血管生成的作用。

MMP-2 是基质金属蛋白酶家族的主要成员, 它与 EMS 发生和发展有着密切的关系, 异位内膜中 MMP-2 的过度表达, 能

够降解异位内膜周围的基底膜及其他细胞外基质成分, 破坏腹膜间质细胞的连接, 进而侵袭腹膜及病灶周围的结缔组织, 使异位内膜在腹膜内种植生长并使病灶不断扩大, 随着 EMS 灶的侵袭强度增强, MMP-2 表达也增加。血管生成程度与 MMP-2 的表达同 EMS 病情发展相一致。有实验显示 ES 与 MMP-2 有密切的相互调控关系, MMP-2 通过胶原 XVIII 末端的 NC1 区位点水解激活 ES^[13], 反过来激活的 ES 又可以与 MMP-2 活化区结合, 阻断 MMP-2 的活化区及其活性区; 内皮抑素还可以与 MMP-2 的前体结合, 抑制 MTI-MMP 的活化, 使 MTI-MMP 与基质金属蛋白酶前体形成稳定的复合物, 进而抑制 proMMP-2 在细胞外活化为 MMP-2^[14], 从而阻断 MMP-2 的激活和催化活性。本实验将携带 ES 基因的质粒脂质体复合物转染至 EMS 大鼠异位病灶局部后, 通过免疫组化法测定转染后异位病灶处 ES 及 MMP-2 的表达, ES 与 MMP-2 的阳性信号为细胞浆中出现棕黄色颗粒, 实验组 ES 表达明显高于两对照组, 而 MMP-2 的表达明显低于两对照组, 我们对两个指标进行相关性分析, 发现两者呈现负相关。这些结果提示, 内皮抑素转基因治疗 EMS 大鼠可使病灶局部 ES 表达增高, MMP-2 表达减少, ES 可能通过抑制 MMP-2 的活性, 抑制新生血管的生成, 影响 EMS 的发生与发展。

MVD 是评价血管生成的标志, EMS 病灶区 MVD 明显增高, 与正常内膜有显著差异, 提示内异症的发生发展与微血管的异常表达有密切关系, 可通过观察 MVD 来评价病灶的活性与治疗的效果。本实验实验结果显示, 转染后, 实验组大鼠异位病灶体积较转染前明显缩小, 而两对照组大鼠异位病灶的体积较转染前明显增大, 转染后实验组大鼠的异位病灶体积明显小于两对照组。转染后, 实验组病灶处 MVD 比两对照组明显减少, 说明转染至病灶局部的内皮抑素基因能有效发挥其抗血管生成的作用, 使 MVD 减少, 最终使异位病灶生长受到限制, 病灶体积缩小。这些结果提示, 内皮抑素转基因治疗子宫内位症大鼠模型能有效抑制异位病灶的生长。

总之, 本实验研究发现, 用自体子宫内移移植法可成功建立 Lewis 大鼠子宫内位症模型, 阳离子脂质体 Lipofectamine™2000 介导的重组质粒 endo-pBud 病灶内直接注射法可以成功实现 ES 在子宫内位症大鼠异位内膜中的表达, 对子宫内位症大鼠模型有治疗作用。

参考文献(References)

- [1] O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. Cell, 1997, 88 (2): 277-285
- [2] Becker CM, Sampson DA, Short SM, et al. Short synthetic endostatin peptides inhibit endothelial migration in vitro and endometriosis in a mouse model[J]. Fertil Steril, 2006, 85(1):71-77
- [3] Jones RC. The effect of a luteinizing hormone releasing hormone (LRH) agonist(Wy-40,972), levonorgestrel, danazol and ovariectomy on experimental endometriosis in the rat [J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1984, 106(2):282-288
- [4] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor Angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma [J]. N Engl J Med, 1991, 324(1): 1-8

- [5] Matsuzaki S, Canis M, Darcha C, et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitor prevent implantation of eutopic endometrium to ectopic sites in rats [J]. Fertil Steril, 2004, 82(6):1609-1615
- [6] Erbil D, Ligor S, Cerral P, et al. Regression of endometrial explants in rats treated with the cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib [J]. Fertil Steril, 2004, 82(3): 1115-1120
- [7] 杨丽娟, 翁绳美, 陈崇宏, 等. 大鼠内皮抑素 cDNA 真核表达载体的构建及 C6 细胞上的分泌表达 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 71-75
Yang Li-juan, Weng Sheng-mei, Chen Chong-hong, et al. Construction of eukaryotic vector for rat endostatin cDNA and secretive expression in C6 cells [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2006, 22(1): 71-75(In Chinese)
- [8] Tao K, Wu X, Dou K. Inhibitory effects of murine angiostatin on implant carcinoma of nude mouse [J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2002, 40(8):621-624
- [9] White RE, Wade-Martins R, Hart SL, et al. Functional delivery of large genomic DNA to human cells with a peptide-lipid vector [J]. J Gene Med, 2003, 5(10): 883-892
- [10] M Louise Hull, D Stephen Charnock-Jones, Clement L K, et al. Antiangiogenic Agents Are Effective Inhibitors of Endometriosis [J]. J Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003, 88(6):2889-2899
- [11] Deguchi M, Ishiko O, Sumi T, et al. Expression of angiogenic factors in extrapelvic endometriosis [J]. Oncol Rep, 2001, 8(6):1317-1319
- [12] 刘木彪, 何援利, 彭冬先. 子宫内异位症患者腹腔液血管内皮生长因子与内抑素的表达 [J]. 第一军医大学学报, 2004, 24(1):69-71 (In Chinese)
Liu Mu-biao, He Yuan-li, Peng Dong-xian. Expression of vascular endothelial growth factor and endostatin in peritoneal fluid of patients with endometriosis [J]. Journal of First Military Medical University, 2004, 24(1):69-71
- [13] Bellon G, Martiny L, Robinet A. Matrix metalloproteinases and matrixins in angiogenesis [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2004, 49: 203-220
- [14] Lee SJ, Jang JW, Kim Ym, et al. Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2 [J]. FEBS Lett, 2002, 519(1-3): 147-152

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元,全国各大书店有售。