

二甲双胍对子宫内位异位症大鼠异位灶内 VEGF 和 MMP9 的影响研究

程 静 卢晓声 张慧娜 郝培培 吕杰强

摘 要 **目的** 探讨盐酸二甲双胍(metformin)对子宫内位异位症(EM)大鼠模型内异位灶体积、内异位灶内 VEGF 和 MMP9 的表达的影响,探讨二甲双胍治疗 EM 的可行性。**方法** 50 只 SD 大鼠自体移植方法建立 EM 大鼠模型,在造模成功后,给予 EM 大鼠亮丙瑞林每 21 天 1mg/kg 皮下注射和二甲双胍灌胃治疗,二甲双胍治疗分为高剂量[200mg/(kg·d)]、中剂量[100mg/(kg·d)]和低剂量组[50mg/(kg·d)]。二甲双胍连续用药 42 天后处死内异位症大鼠,取内异位灶,测量内异位灶体积,免疫组化、蛋白印迹法检测内异位灶内的 VEGF 和 MMP-9 的表达。**结果** 内异位灶体积:3 种二甲双胍剂量组与亮丙瑞林组内异位症大鼠内异位灶体积显著小于对照组($P < 0.05$)。免疫组化评分的结果提示:用药 42 天后,中剂量、低剂量二甲双胍组和亮丙瑞林组($P < 0.05$)显著降低内异位灶内 VEGF 的表达,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$);二甲双胍的 3 种剂量组和亮丙瑞林组均显著降低内异位灶内 MMP9 的表达,与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$)。蛋白印迹实验结果提示:中剂量二甲双胍组显著抑制内异位灶内 VEGF 的表达($P < 0.05$),而低剂量、高剂量二甲双胍和亮丙瑞林组并未抑制内异位灶内的 VEGF 的表达($P > 0.05$);中、高剂量二甲双胍组均能显著抑制内异位灶内 MMP9 的表达($P < 0.05$),低剂量二甲双胍和亮丙瑞林组并未抑制内异位灶内的 MMP9 表达。**结论** 盐酸二甲双胍可以显著抑制子宫内位异位症大鼠内异位灶,降低内异位灶内 VEGF 和 MMP9 的表达,有望成为治疗子宫内位异位症的新方法。

关键词 子宫内位异位症 盐酸二甲双胍 血管内皮生长因子 基质金属蛋白酶-9

中图分类号 R711.71 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.023

Effects of Metformin on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Expression of Endometriotic Lesions from Rats with Endometriosis. Cheng Jing, Lu Xiaosheng, Zhang Huina, et al. Reproductive Health Center, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To determine the role of metformin on volume of endometriotic lesions, on MMP-9 and VEGF expression of endometriotic lesions from rats with endometriosis. **Methods** Fifty SD rats with endometriosis were established by autologous transplantation method, and then were randomly divided into 5 groups: control group, GnRHa group[1mg/(kg·21d)], treatment with high dose metformin[200mg/(kg·d)], middle dose metformin[100mg/(kg·d)], low dose metformin[50mg/(kg·d)]. After continuously intra-gastric administration with metformin for 42 days and GnRHa twice, the morphological changes of ectopic endometrium tissue were observed, and immunohistochemical study and Western blot were administered to detect expression of VEGF and MMP9. **Results** Four groups with treatment consistently decreased the volume of endometriotic lesions ($P < 0.05$). In the immunohistochemical study, middle and low dose metformin group and GnRHa significantly decreased the expression of VEGF ($P < 0.05$), and all dose metformin and GnRHa reduced the expression of MMP-9 significantly ($P < 0.05$). In the Western-Blot, middle dose metformin decreased VEGF expression significantly ($P < 0.05$), as well as middle and high dose metformin reduced MMP-9 significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Metformin can inhibit the growth of endometriotic lesion and maybe a new therapy of endometriosis.

Key words Endometriosis; Metformin; Vascular endothelial growth factor(VEGF); Matrix metalloproteinase-9(MMP-9)

子宫内位异位症(endometriosis, EM)是与生殖障碍密切相关的疾病,近年来发生率有增加趋势。EM 发病机制复杂,血管内皮生长因子(VEGF)和基质金

属蛋白酶 9(MMP-9)在 EM 异位子宫内位黏附、侵袭和血管生成过程中起着重要作用^[1-4]。EM 的临床特点表现为雌激素依赖的、炎性的、子宫内位细胞增殖的疾病。目前 EM 的药物包括孕激素、促性腺激素类似物(GnRH- α)、非甾体类抗炎药物、口服避孕药、芳香化酶抑制剂等,治疗多是通过抑制排卵或抑制垂体促性腺激素的分泌,造成体内的低雌激素状

基金项目:浙江省重点科技创新团队基金资助项目(2011R50013)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院

通讯作者:吕杰强,电子信箱:Jieqianglu@126.com

态。而对于合并内异症的不孕女性的治疗,患者多数是要保留生育功能,并需要助孕治疗,这就增加了EM转移和复发的机会。

二甲双胍作为一种常用的降血糖药已有40余年的历史,其不良反应小、无致畸作用,在生殖领域已被广泛应用到多囊卵巢综合征(PCOS)的治疗上。基础和临床研究已证实二甲双胍可以直接抑制卵巢颗粒细胞和卵泡膜细胞内激素的产生,还可以降低PCOS患者体内的C反应蛋白,甚至可以降低肥胖相关的炎症状态和其他的炎症反应^[5-8]。二甲双胍治疗的效应谱以及EM的临床特点的吻合为二甲双胍在内异症治疗上的应用提供了可能性。

本研究通过自体移植建立大鼠子宫内膜异位症模型,建模成功后,给予EM大鼠二甲双胍灌胃治疗,观察EM大鼠内异灶内VEGF、MMP-9表达,探讨二甲双胍治疗EM的可行性。

材料与方法

1. 实验动物:清洁级Wister大鼠50只,体重160~180g。雌性,购自浙江省医学科学院,实验动物许可证号:SCXK(沪)2013-0016。动物在常规条件下适应性饲养1周。

2. 主要仪器设备和试剂:光学显微镜、石蜡切片机、超薄切片机、游标卡尺、大鼠MMP-9、VEGF免疫组化试剂盒、微波炉、移液器、冷冻离心机、凝胶成像仪、电泳系统,盐酸二甲双胍和亮丙瑞林(Sigma公司)。

3. 研究方法:(1)建立EM模型:自体移植,大鼠水合氯醛(10%)麻醉后,取出其左侧子宫角切下约7mm长片段,置于37℃无菌PBS缓冲液中,从子宫肌层分离子宫内膜,修剪成约5mm×5mm,移植到大鼠右侧腹壁,缝合切口,整个手术控制在15~20min左右,术后抗感染3天。(2)分组及给药:建模成功后,休息3天后开始分组给药。分组:二甲双胍低剂量组:10只,50mg/(kg·d)灌胃;二甲双胍中剂量组:10只,100mg/(kg·d)灌胃;二甲双胍高剂量组:10只,200mg/(kg·d)灌胃;亮丙瑞林组:10只,1mg/(kg·21d)皮下注射1次;对照组:10只,不用药物治疗。(3)实验取材及指标检测:用药42天后各组大鼠处死取材,取内异灶,切出完整一半放于冷的4%多聚甲醛溶液中保存,石蜡包埋,用于免疫组化检测,另一半迅速放入液氮罐中并迅速转入-80℃冰箱,用于提取蛋白,蛋白印迹实验。(4)免疫组化法检测EM大鼠异位病灶VEGF及MMP-9的表达:采

用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(SP法),试剂盒及抗VEGF及MMP-9单克隆抗体为Abcam公司产品。染色步骤按试剂盒内说明进行。显微镜下观察,每张免疫组化切片随机选择3个不同的视野(×200)观察,并判读阳性表达强度和阳性率。染色结果采用半定量分析方法:评分以染色强度结合阳性细胞数百分比进行乘积。染色强度以多数细胞呈现的染色强度并减去背景着色计分:无明显着色为0分,淡黄色或轻微黄色为1分,深黄或棕黄色为2分,棕褐色或黑褐色为3分。阳性细胞百分比即每张免疫组化切片选择3个不同的视野(×200)观察,每个视野计数100个细胞中阳性细胞数,计算阳性细胞平均数:0~5%为评为0分,6%~25%评1分,26%~50%评2分,51%~75%评3分,>75%均评为4分。对每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比乘积评分,评分以阳性细胞百分比与染色强度的乘积:0分为阴性(-),1~6分为弱阳性,7~12分为强阳性。(5)蛋白印迹实验:蛋白印迹(Western blot)法检测各组大鼠内异灶MMP-9和VEGF表达。将异位灶组织剪碎、匀浆、裂解提取蛋白,经10%SDS-PAGE凝胶电泳分离,恒电流200mA转移至PVDF印迹膜。5%脱脂奶粉封闭1h后,加入MMP-9、VEGF抗体(1:500稀释),在室温、摇床上结合2h,BST洗膜后再用二抗(1:1000稀释),TBST洗膜后,移入凝胶成像分析仪中,化学光敏模式曝光显影。目的蛋白相对表达量=目的条带的灰度值/同一样本内参的灰度值。

4. 统计学方法:利用SPSS 17.0统计软件包,EM大鼠用药前后比较才有配对 t 检验;同一时间点各组间比较采用方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. EM建模及用药后各组内异灶测量结果:子宫内膜异位移植后21天再次开腹观察建模是否成功,并观察异位移植灶的情况。肉眼可见移植灶的体积较前增大,呈一囊泡状,内含澄清液体或血性液体。移植灶表明可见新生血管爬行生长,质地较软,此为建模成功(图1)。50只大鼠全部建模成功。分组治疗后,亮丙瑞林组和低剂量二甲双胍组能显著抑制内异灶生长($P<0.05$),与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$),而中高剂量组二甲双胍虽未能显著缩小内异病灶,但能限制内异灶的生长,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。



图 1 EM 大鼠内异灶

表 1 各组 EM 大鼠内异灶情况 (mm³)

组别	造模 21 天病灶体积	给药 42 天病灶体积
对照组	69.93 ± 30.06	359.20 ± 471.94
低剂量	68.66 ± 19.35	53.97 ± 25.64 ***
中剂量	87.01 ± 54.53	132.28 ± 91.04 *
高剂量	85.12 ± 35.92	195.42 ± 273.10 *
亮丙瑞林	65.23 ± 26.59	31.00 ± 7.74 ***

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与用药前相比, # $P < 0.05$

2. 免疫组化结果:免疫组化阳性显色显示,VEGF 免疫阳性主要定位在内膜腔上皮、血管内皮、间质细胞和巨噬细胞胞质中;MMP9 免疫阳性主要定位在内膜腔上皮、间质细胞和巨噬细胞胞质中,呈棕黄色至褐色(表 2、图 2、图 3)。

表 2 免疫组化检测大鼠子宫内异位组织 VEGF 和 MMP9 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	VEGF 阳性评分	MMP9 阳性评分
对照 9 周	5.67 ± 1.51	6.67 ± 1.63
高剂量 9 周	4.44 ± 1.33	5.00 ± 1.07 *
中剂量 9 周	3.56 ± 1.33 *	4.22 ± 1.20 *
低剂量 9 周	3.33 ± 1.41 *	3.78 ± 1.20 *
亮丙瑞林 9 周	3.67 ± 1.51 *	4.67 ± 1.03 *

与对照组比较, * $P < 0.05$

3. 蛋白印迹实验结果:用药 42 天后,中剂量二甲双胍组显著抑制内异灶内 VEGF 的表达 ($P < 0.05$),而低剂量、高剂量二甲双胍和亮丙瑞林组并未抑制内异灶内的 VEGF 的表达 ($P > 0.05$);中、高剂量二甲双胍组均能显著抑制内异灶内 MMP9 的表达 ($P < 0.05$),低剂量二甲双胍和亮丙瑞林组并未抑制内异灶内的 MMP9 表达(图 4)。

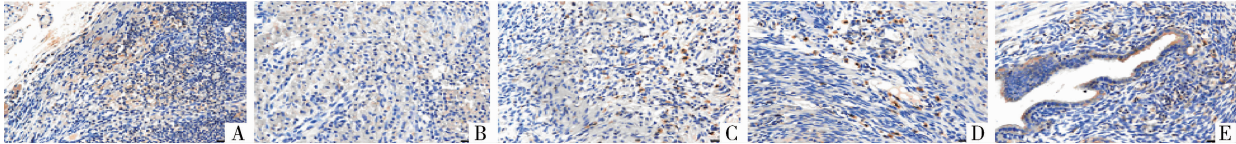


图 2 EM 大鼠内异灶 VEGF 免疫组化结果

A. 对照组;B. 高剂量二甲双胍组;C. 中剂量二甲双胍组;D. 低剂量二甲双胍组;E. 亮丙瑞林组

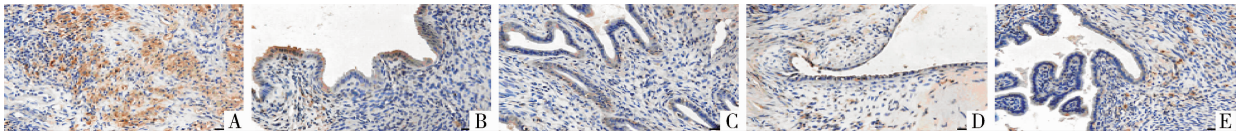


图 3 EM 大鼠 MMP-9 在各组中免疫组化结果

A. 对照组;B. 高剂量二甲双胍组;C. 中剂量二甲双胍组;D. 低剂量二甲双胍组;E. 亮丙瑞林组

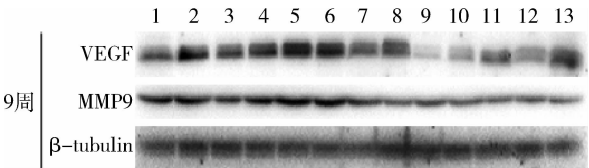


图 4 EM 大鼠异位灶中 VEGF、MMP-9 在各组中表达

1、2 为模型组;3、4 为亮丙瑞林处理组;5、6、7 为二甲双胍低剂量组;8、9、10 为二甲双胍中剂量组;11、12、13 为二甲双胍高剂量组

结 论

子宫内内异位症(EM)严重影响女性的身心

健康和生活质量,但到目前为止内异症的发病机制仍不清楚。目前普遍认为异位内膜的黏附-侵袭-血管形成(attachment-aggrasion-angiogenesis)等类似恶性肿瘤的生物学行为是 EM 发病的关键,而在这一类似恶性肿瘤的生物学行为中,VEGF 和 MMP-9 发挥了重要作用。MMP-9 是 MMPs 家族中分子质量最大的明胶酶,可降解 IV 型、V 型胶原及弹性蛋白等细胞外基质的主要成分,而异位内膜的生长依赖于新生血管的形成,VEGF 是促进血管形成的强有力的调

节因子,具有很强的促血管形成能力,在内异症的发病过程中起重要作用。异位内膜在发生侵袭种植过程中,必须形成新的血管网络,血管生成过程中的内皮细胞循环及血管结构形成均需要 ECM 的降解和重建,MMP-9 能够降解基膜糖蛋白及细胞外基质成分。MMP-9 和 VEGF 的共同作用有利于新生血管形成及基膜的破坏,这是异位病灶浸润生长的必要条件。

盐酸二甲双胍是临床上用于治疗糖尿病多年,具有安全、疗效好,不良反应少等优点,已经广泛用于治疗多囊卵巢综合征的治疗。而 2010 年的一项研究表明,二甲双胍可以通过上调 MMP-9mRNA 的表达,促进人肺腺癌的发生、发展^[9]。而最近在对乳腺癌细胞的研究发现,二甲双胍能够通过抑制 MMP-9 的表达和降低其活性来抑制乳腺癌的迁移和浸润^[10]。而在本项对于二甲双胍应用于 EM 大鼠内异病灶的研究中,笔者发现,无论是免疫组化还是蛋白印迹实验结果均表明二甲双胍可以降低 EM 大鼠内异灶内 MMP-9 的表达,从而可以降低内异病灶的浸润和转移能力,但二甲双胍的剂量至少要达到 100mg/(kg·d)。

在大鼠子宫肌瘤细胞的体外培养过程中,二甲双胍可以有效抑制大鼠子宫肌瘤细胞 VEGF 的产生,在肝癌细胞的体外培养中,二甲双胍同样具有抑制 VEGF 产生的作用^[11,12]。本研究结果与上述研究结果类似,即二甲双胍可以抑制 EM 大鼠内异灶内 VEGF 的表达,二甲双胍治疗后促血管生成因子 VEGF 下降,抑制新生血管形成的重要因子,降低了局部病灶血管通透性,使血管内皮细胞分裂、增殖、细胞质钙聚集的过程受阻,减少了异位病灶的血液供应从而抑制其生长和发育。

本研究 EM 大鼠在二甲双胍治疗后,在对内异灶测量的过程中,笔者研究发现二甲双胍治疗后,低剂量的二甲双胍甚至可以有效缩小 EM 大鼠的内异灶,中、高剂量的二甲双胍治疗尽管没有达到缩小内异病灶的结果,但可以限制 EM 大鼠内异灶的发生、发展。其机制笔者分析如下:①可能是由于二甲双胍降低了内异灶内 MMP-9 蛋白表达,降解基膜的Ⅳ型胶原、Ⅴ型胶原、层黏连蛋白等成分的能力随之下降,不能破坏基膜的完整性,限制了细胞的生长空间,以及调节细胞黏附分子的功能和调控肿瘤细胞生长的作用降低,从而内异灶的侵袭、迁移能力随之降低;同时由于二甲双胍抑制了内异灶内 VEGF 的产生,降低了内异灶内的血液供应,使其形成新的血管网络过程受

阻,阻止或抑制了内异灶的迁移,浸润和转移;②中、高剂量二甲双胍未能有效缩小内异病灶而仅起到限制内异灶的生长作用可能与二甲双胍可以刺激卵泡膜细胞和卵巢颗粒细胞,促进激素合成,间接促进了内异灶发展有关。

综上所述,笔者的初步研究证实了二甲双胍可以降低 EM 大鼠内异灶内 MMP-9 和 VEGF 的表达,能够抑制异位子宫内膜的迁移和侵袭能力,抑制内异灶的发生发展过程,为进一步体内研究二甲双胍治疗子宫内膜异位症提供了很好的理论和实验基础,为临床上应用二甲双胍治疗子宫内膜异位症提供一个新思路。

参考文献

- 1 Wu MY, Ho HN. The role of cytokines in endometriosis[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2003, 49(5): 285-296
- 2 Mizumoto H, Saito T, Ashihara K, et al. Expression of matrix metalloproteinases in ovarian endometriomas: immunohistochemical study and enzyme immunoassay[J]. *Life Sci*, 2002, 71(3): 259-273
- 3 Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase as mediators of reproductive function[J]. *Mol Hum Reprod*, 1997, 3(1): 27-45
- 4 Huang JC, Papasakelariou C, Dawood MY. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor in peritoneal fluid of women with endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 1996, 65(5): 931-934
- 5 Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells[J]. *Fertil Steril*, 2001, 76(3): 517-524
- 6 Mansfield R, Galea R, Brincat M, et al. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(4): 956-962
- 7 Morin - Papunen L, Rautio K, Ruokonen A, et al. Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(10): 4649-4654
- 8 Bergheim I, Luyendyk JP, Steele C, et al. Metformin prevents endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 316(3): 1053-1061
- 9 Wu N, Gu HJ, Li Q. Effects of antidiabetic drug metformin on the migration and invasion abilities of human pulmonary adenocarcinoma A549 cell line in vitro[J]. *J Thorac Dis*, 2010, 2(2): 76-80
- 10 Jang SY, Kim A, Kim JK, et al. Metformin inhibits tumor cell migration via down-regulation of MMP9 in tamoxifen-resistant breast cancer cells[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(8): 4127-4134
- 11 Tadakawa M, Takeda T, Li B, et al. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway in ELT-3 cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 5: 399: 1-8
- 12 Qu H, Yang X. Metformin inhibits angiogenesis induced by interaction of hepatocellular carcinoma with hepatic stellate cells[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 71(2): 931-936

(收稿日期:2016-07-17)

(修回日期:2016-07-25)