

## GnRH-Ⅱ对子宫内膜异位症患者离体培养的 子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的影响

刘秋红, 黄凤英, 王焕萍, 邹颖

(中南大学湘雅二医院妇产科, 长沙 410011)

**[摘要]** 目的:检测体外培养的子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)患者在位和异位内膜间质细胞分泌的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的浓度,并观察不同浓度的Ⅱ型促性腺激素释放激素(GnRH-Ⅱ)对在位和异位内膜间质细胞分泌 VEGF 的影响。方法:分别给予原代培养的 EMs 患者在位与异位子宫内膜间质细胞不同浓度( $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L)的 GnRH-Ⅱ处理,不加 GnRH-Ⅱ组作为对照,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定培养液中 VEGF 浓度并进行比较。结果:体外培养的 EMs 患者异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF,培养 48 h 后分泌量与在位子宫内膜间质细胞比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 GnRH-Ⅱ可呈浓度依赖性地抑制体外培养的在位和异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF ( $P < 0.01$ ),且对异位子宫内膜间质细胞的抑制作用强于在位( $P < 0.01$ )。结论:EMs 患者的异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的能力与在位子宫内膜的相近,这对 EMs 的形成和发展可能起重要作用。GnRH-Ⅱ对 EMs 患者体外培养的异位子宫内膜间质细胞 VEGF 的分泌有明显的抑制作用,且作用明显强于对在位内膜间质细胞的。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; Ⅱ型促性腺激素释放激素(GnRH-Ⅱ); 子宫内膜间质细胞; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2009)09-0926-07

## Effect of GnRH-Ⅱ on VEGF secreted by stromal cells from endometrium of endometriosis

LIU QiuHong, HUANG Fengying, WANG Huanping, ZOU Ying

(Department of Gynecology and Obstetrics, Second Xiangya Hospital,  
Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract:** **Objective** To inspect the effect of gonadotropin-releasing hormonel Ⅱ (GnRH-Ⅱ) on the secretion of VEGF by eutopic and ectopic endometrial stromal cells cultured in vitro. **Methods** Eutopic and ectopic stromal cells cultured in vitro were treated with different concentrations ( $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L) of GnRH-Ⅱ, and the control group was not treated by GnRH-Ⅱ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the VEGF protein in the medium of the above 2 groups. **Results** There was no difference between the VEGF protein expressed by eutopic and ectopic stromal cells in the medium after culturing in vitro for 48 hours ( $P > 0.05$ ). The  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L GnRH-Ⅱ could dose-dependently reduce VEGF protein secreted by endometrial stro-

收稿日期 (Date of reception) 2008-06-17

作者简介 (Biography) 刘秋红, 硕士, 医师, 主要从事普通妇科方面的研究。

通讯作者 (Corresponding author) 刘秋红, E-mail: liuqiuHong81@163.com

mal cells ( $P < 0.01$ ), and the inhibition to ectopic endometrial stromal cells was stronger than that to eutopic endometrial stromal cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Ectopic stromal cells cultured in vitro can secrete VEGF, and so can eutopic stromal cells. This may play an important role in the formation and development of endometriosis. GnRH- II can reduce VEGF protein secreted by ectopic endometrial stromal cells cultured in vitro, and its inhibition is stronger than that of eutopic endometrial stromal cells.

**Key words:** endometriosis; gonadotropin-releasing hormone- II; endometrial stromal cell; vascular endothelial growth factor

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(9):0926-07]

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是妇科的常见病和多发病。促性腺激素释放激素 (GnRH- I) 类似物 (GnRH-a) 与腹腔镜手术结合治疗 EMs 受到普遍重视<sup>[1]</sup>。最近研究发现 II 型促性腺激素释放激素 (GnRH- II) 能抑制某些生殖组织肿瘤细胞生长<sup>[2]</sup>, 而且对某些肿瘤细胞的抗增殖作用比 GnRH- I 更强<sup>[3,4]</sup>。新生血管形成是 EMs 发生发展过程中的重要环节<sup>[5]</sup>。在众多的促血管形成因子中, 血管内皮生长因子 (VEGF) 是目前公认最关键的促血管形成因子<sup>[6]</sup>。本研究测定体外培养的异位及在位子宫内间质细胞分泌 VEGF 的浓度, 并在培养基中加入 GnRH- II, 观察其对子宫内间质细胞分泌 VEGF 的影响, 以探讨 EMs 新的治疗途径, 为 EMs 新药开发提供理论依据。目前, 关于这方面的研究, 国外少见报道, 国内尚未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 子宫内来源

所有 EMs 病例的诊断均经腹腔镜或开腹手术证实, 病理切片确诊。在位子宫内通过刮宫术或 EMs 患者切下的子宫标本取得<sup>[7]</sup>。异位内取自卵巢巧克力囊肿的囊壁新鲜组织, 并尽量多取些组织。EMs 患者为年龄 21 ~ 46 岁, 月经周期规则 (23 ~ 35 d)。无其他妇科疾患及内分泌、免疫和代谢性疾病, 术前 6 个月内未接受激素治疗。共有 16 例卵巢子宫内异位症患者被纳入。

#### 1.1.2 主要试剂

GnRH- II 为瑞士 Bachem 公司产品, DMEM/F12 培养基、新生牛血清为美国 Gibco 公司产品,

IV 型胶原酶、孕酮为美国 Sigma 公司产品, 胰蛋白酶为美国 Amresco 公司产品, 波形蛋白单抗、角蛋白单抗和催乳素单抗及 SABC 免疫组织化学试剂盒为武汉博士德公司产品。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及鉴定

细胞培养参照文献<sup>[8,9]</sup>。获取组织经漂洗后剪成碎块, 加入 0.1% 的 IV 型胶原酶溶液和 0.25% 的胰蛋白酶消化液 (pH7.4), 37 °C 恒温摇床震荡消化 2 ~ 3 h 至组织基本消失。再用 100  $\mu\text{m}$  和 38  $\mu\text{m}$  细胞筛过滤分离细胞, 滤液离心 (800 r/min) 后去上清, 加入 DMEM/F12 培养基 (含新生牛血清 20%), 进行细胞计数, 以  $1 \times 10^4/\text{mL}$  接种于 25  $\text{cm}^2$  的塑料细胞培养瓶中, 置 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育, 以后 2 ~ 3 d 半量更换培养基至细胞融合, 完成细胞原代培养。采用波形蛋白、角蛋白和催乳素 (PRL) 鉴定培养的细胞, 由于非孕子宫内 PRL 仅由子宫内间质细胞产生, 腺体和成纤维细胞不产生 PRL<sup>[10]</sup>, 因此笔者采用 PRL 进行间质细胞鉴定。细胞鉴定直接在 6 孔板内进行: 传代的细胞贴壁后, 更换培养基, 加  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 孕酮刺激 6 d。按试剂盒说明书进行免疫细胞化学鉴定。

#### 1.2.2 子宫内间质细胞的干预分组

取生长状态良好的第 3 代在位及异位内间质细胞培养至达 80% 融合时, 加入含 0.01% EDTA 和 0.1% 胰蛋白酶的消化液消化, 800 r/min 离心 3 min, 弃上清, 加入含 20% 新生牛血清的 DMEM/F12 培养基吹打成细胞悬液, 计数, 以每孔  $2 \times 10^4$  个细胞的密度接种于 48 孔培养板。待细胞接近融合时, 每孔分别加入含  $1 \times 10^{-10}$  ~  $1 \times 10^{-6}$  mol/L<sup>[11]</sup> 的 GnRH- II 的培养基 0.5 mL, 未加药组只加含 2.5% 新生牛血清的 DMEM/F12 培

培养基 0.5 mL/孔,每个浓度组及未加药组各设 2 个复孔,培养 48 h,吸尽培养液,于  $-20^{\circ}\text{C}$  下保存,待测 VEGF 的浓度。

### 1.2.3 VEGF 的测定

采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定培养液中 VEGF 的浓度,按试剂盒说明书操作。(1)从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条,设 1 孔作为 TMB 空白显色孔,1 孔只加样品稀释液作为零孔,分别将标本或不同浓度标准品( $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ )加入相应孔中后,盖上酶标板, $37^{\circ}\text{C}$  反应 90 min。(2)反应后甩去板内液体,再对着吸水纸拍几下,不洗。(3)按每孔 0.1 mL 依次加入准备好的生物素化抗人 VEGF 抗体工作液。 $37^{\circ}\text{C}$  反应 60 min。(4)用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 3 次,每次浸泡 1 min 左右。(5)将准备好的 ABC 工作液按每孔 0.1 mL 依次加入(TMB 空白显色孔除外)。 $37^{\circ}\text{C}$  反应 30 min。(6)用 0.01 mol/L 的 PBS 洗涤 5 次,每次浸泡 1~2 min 左右。(7)按每孔 90  $\mu\text{L}$  依次加入已在  $37^{\circ}\text{C}$  平衡 30 min 的 TMB 显色液, $37^{\circ}\text{C}$  避光反应 20~25 min。(8)按每孔 0.1 mL 依次加入 TMB 终止液,顺序同加 TMB。(9)用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值。

### 1.3 统计学处理

计量资料均以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,样本数值先做正态性检验和方差齐性检验,不服从正态分布或(和)不满足方差齐性的用 Wilcoxon W 秩和检验;服从正态分布,满足方差齐性的多样本均数两两均数之间的比较用 SNK-*q* 检验,两个独立样本均数的比较采用独立样本 *t* 检验。采用 SPSS10.0 统计软件包进行统计学分析,以  $\alpha = 0.05$

为检验水准, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 培养细胞形态学观察及鉴定

本研究对 16 例异位内膜和在位内膜进行了分离培养,结果 9 例异位内膜、10 例在位内膜培养成功,余因细菌污染培养失败。在倒置显微镜下观察,培养的异位内膜间质细胞形态和在位的内膜细胞相似,体积均较大,呈多角形或梭形排列,胞浆薄而透明。平铺生长,外观呈伸展、挺直状,类似成纤维细胞,也有中间宽两头尖纺锤形状的细胞,但此类细胞较在位内膜少见(图 1, 2)。细胞铺满瓶底后用消化液传代,传代后细胞多呈梭形,贴壁快,活性高,3~7 d 铺满瓶底。培养的细胞波形蛋白表达呈阳性,胞浆充满棕色颗粒(图 3, 4),角蛋白表达阴性(图 5, 6),经孕激素作用后 PRL 呈阳性反应,胞浆充满棕色颗粒证明为子宫内膜间质细胞(图 7, 8)。

### 2.2 在位与异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 比较

在位子宫内膜间质细胞在体外培养 48 h 后,培养液中 VEGF 蛋白的浓度为( $726.05 \pm 166.35$ ) pg/mL,取自卵巢内膜样囊肿囊壁的异位子宫内膜间质细胞在相同条件下培养 48 h 后,培养液中 VEGF 蛋白浓度为( $695.12 \pm 203.77$ ) pg/mL,较在位低,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示在位子宫内膜间质细胞与异位子宫内膜间质细胞在体外培养情况下,分泌 VEGF 的能力无明显差异。

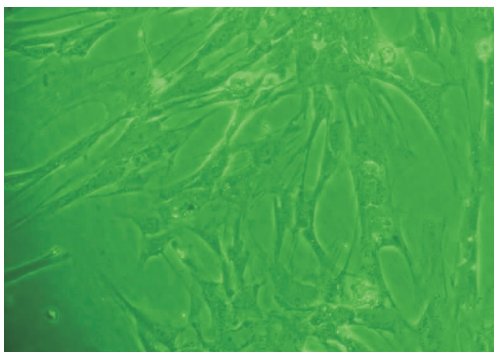


图 1 培养 3 d 的异位子宫内膜间质细胞( $\times 100$ )。

Fig. 1 Ectopic endometrial stromal cells after cultured for 3 d ( $\times 100$ ).

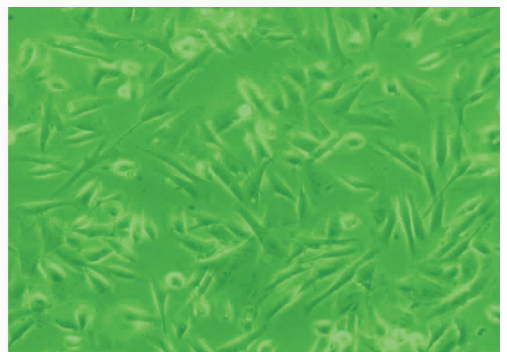


图 2 培养 9 d 的在位子宫内膜间质细胞( $\times 100$ )。

Fig. 2 Eutopic endometrial stromal cells after cultured for 9 d ( $\times 100$ ).

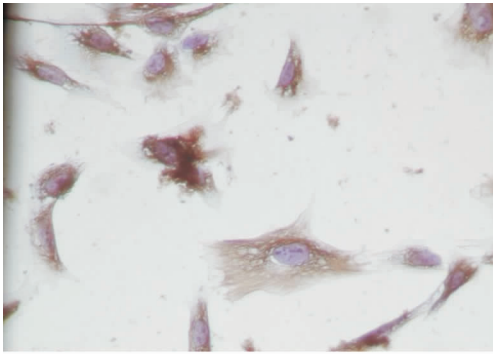


图3 在位内膜间质细胞,波形蛋白阳性表达(SABC法, ×200)。

Fig. 3 Stromal cells from eutopic endometrial tissues were positive for vimentin (SABC, ×200).

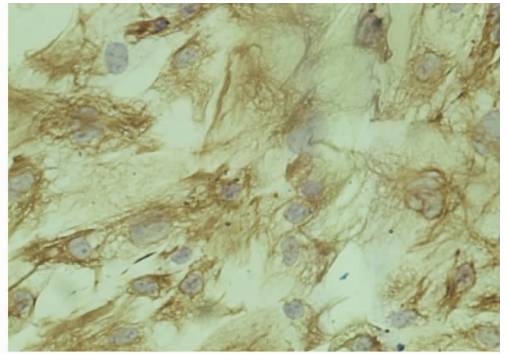


图4 异位内膜间质细胞,波形蛋白阳性表达(SABC法, ×200)。

Fig. 4 Stromal cells from ectopic endometrial tissues were positive for vimentin (SABC, ×200).

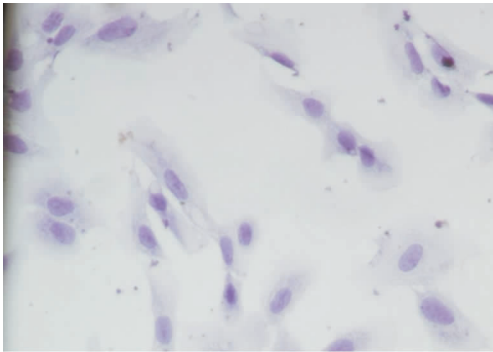


图5 在位内膜间质细胞,角蛋白阴性表达(SABC法, ×200)。

Fig. 5 Stromal cells from eutopic endometrial tissues were negative for cytokeratins (SABC, ×200).

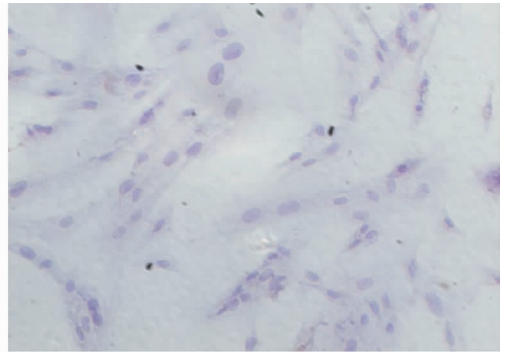


图6 异位内膜间质细胞,角蛋白阴性表达(SABC法, ×200)。

Fig. 6 Stromal cells from ectopic endometrial tissues were negative for cytokeratins (SABC, ×200).

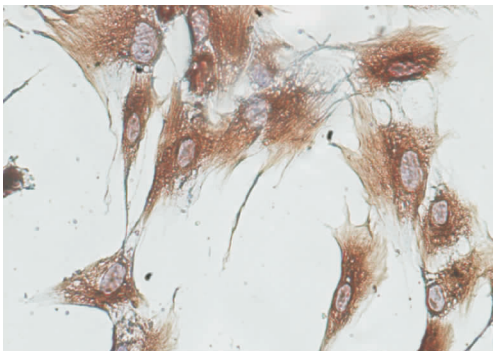


图7 在位内膜间质细胞,催乳素阳性表达(SABC法, ×200)。

Fig. 7 Stromal cells from eutopic endometrial tissues were positive for PRL (SABC, ×200).

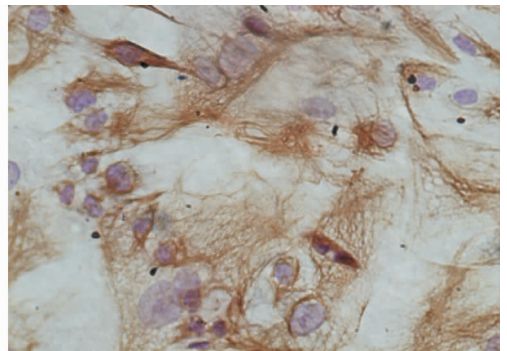


图8 异位内膜间质细胞,催乳素阳性表达(SABC法, ×200)。

Fig. 8 Stromal cells from ectopic endometrial tissues were positive for PRL (SABC, ×200).

### 2.3 GnRH-Ⅱ对子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的影响

在位内膜间质细胞体外培养 48 h 后,培养液中 VEGF 蛋白浓度为  $(726.05 \pm 166.35)$  pg/mL,

分别加入含  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 GnRH-Ⅱ 培养液后培养 48 h,培养液中 VEGF 蛋白浓度分别下降至  $(456.02 \pm 111.20)$ ,  $(307.89 \pm 73.61)$  和  $(158.37 \pm 65.91)$  pg/mL。与未加 GnRH-Ⅱ

组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。提示  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 GnRH- II 对体外培养的在位子宫内膜间质细胞 VEGF 的分泌有明显的抑制作用。

异位子宫内膜间质细胞在体外培养 48 h 后,培养液中 VEGF 蛋白的浓度为  $(695.12 \pm 203.77)$  pg/mL,分别加入含  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 GnRH- II 培养液后培养 48 h,培养液中 VEGF 蛋白的浓度分别下降至  $(322.56 \pm 140.57)$ ,  $(181.10 \pm 71.06)$  和  $(55.54 \pm 26.15)$  pg/mL。与未加药组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),提示  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 GnRH- II 对体外培养的异位子宫内膜间质细胞 VEGF 的分泌有明显的抑制作用。

#### 2.4 不同浓度的 GnRH- II 对在位和异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制率

不同浓度的 GnRH- II ( $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L) 对在位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制率分别为  $(38 \pm 13)\%$ ,  $(57 \pm 7)\%$  和  $(74 \pm 12)\%$ 。两两相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。即在  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度范围内,GnRH- II 对在位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制率呈剂量依赖性。

同样  $1 \times 10^{-10}$ ,  $1 \times 10^{-8}$  和  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 的 GnRH- II 对异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制率分别为  $(57 \pm 14)\%$ ,  $(76 \pm 7)\%$  和  $(93 \pm 3)\%$ 。两两相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。即在  $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L 浓度范围内,GnRH- II 对异位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制率呈剂量依赖性。

GnRH- II 对异位和在位子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制率相比,对异位内膜间质细胞的抑制作用明显强于在位内膜间质细胞( $P < 0.01$ )。

### 3 讨 论

尽管 EMs 的发病机制众说纷纭,但可以肯定的是异位病灶在腹腔种植成功后,其进一步的发展则必须要有新生血管提供血液,因此血管形成在 EMs 的发病中起着重要作用<sup>[12]</sup>。研究发现,VEGF 在血管发生和形成中起着中枢性的调节作用,是最关键的血管形成刺激因子<sup>[13]</sup>。因此,VEGF 成为 EMs 研究中的重要观察指标。本研究观察了 EMs 患者在位和异位子宫内膜间质细

胞在体外分泌 VEGF 的功能和 GnRH- II 对其分泌的影响,为寻找 EMs 新的治疗途径提供了理论依据。

VEGF 作为最重要的血管生成因子,与内皮细胞上的受体高亲和力结合后可作为内皮细胞特异性有丝分裂原,诱导内皮细胞增生,毛细血管襻形成;同时还可增加微血管通透性,促进了包括纤维蛋白(fibrinogen)在内的血浆蛋白渗出,形成高度血管化的间质,为异位生长的腺上皮细胞提供赖以生存的物质基础,促进异位内膜增殖和浸润入盆腔、腹膜内组织,形成腹腔的异位病灶。有文献报道,VEGF 蛋白在子宫内膜腺上皮细胞及子宫内膜间质细胞均有表达<sup>[14-17]</sup>,VEGF 蛋白在异位内膜组、在位内膜组和正常内膜组表达强度依次减弱。增生期 VEGF 表达,异位内膜强于在位和正常内膜,异位和在位内膜组分泌期 VEGF 表达强于增生期 VEGF,而正常内膜组增生期和分泌期表达强度均较弱。研究发现,体外培养在位子宫内膜的间质细胞有分泌 VEGF 的功能<sup>[18]</sup>。本研究发现异位子宫内膜间质细胞也具有分泌 VEGF 的功能,而且其分泌 VEGF 的能力与在位子宫内膜的间质细胞分泌 VEGF 的能力相仿( $P > 0.05$ ),与 Rusnati 等<sup>[18]</sup>的报道一致。

继下丘脑促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone),GnRH- I, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) 发现之后,人们又在脊椎动物体内分离得到了 22 种不同结构的 GnRH。根据这些天然 GnRH 对受体的亲和力,人们将它们分为 3 类:GnRH- I、GnRH- II 和 GnRH- III<sup>[19]</sup>。II 型 GnRH (GnRH- II, pGlu-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>, 斜体代表与 GnRH- I 相比不同的氨基酸),又称鸡 GnRH (chicken GnRH, cGnRH),是 1984 年自鸡脑中分离得到的,其结构从硬骨鱼到人类完全保守<sup>[20]</sup>,在进化过程中保持了 5 亿年,可能是进化中最早形成的 GnRH; III 型 GnRH (GnRH- III, pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Trp-Leu-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>),又称鲑 GnRH (salmon GnRH, sGnRH),目前仅在硬骨鱼的前脑末端神经发现存在,很可能是在硬骨鱼自脊椎动物分化出来后进化形成的<sup>[19]</sup>。GnRH- II 在下丘脑外的脑区广泛存在。同时,有研究发现在人类许多周围组织也有 GnRH- II 的表达,如子宫肌层、子宫内膜、卵巢上皮细胞<sup>[21-23]</sup>以及肾、骨髓、前列腺<sup>[24]</sup>和乳腺组织;在某些肿瘤如卵巢癌和乳腺癌等也有表

达甚至过表达<sup>[25,3]</sup>。

早在 2001 年 Cheon 等<sup>[25]</sup>就运用巢式 RT-PCR 和免疫组织化学的方法检测 GnRH-Ⅱ在正常人子宫内膜月经周期中的表达,他们发现在月经期,GnRH-Ⅱ在子宫内膜的间质细胞和腺上皮细胞中均有表达,尤以腺腔顶部表达为多,且在分泌早期和中期的表达要强于增生期和分泌晚期,这可能与人胚胎植入密切相关。基于此,最近 Morimoto 等<sup>[11]</sup>运用实时 RT-PCR 发现患有 EMs 的妇女子宫内膜在增生期和分泌期 GnRH-Ⅱ mRNA 表达量都较正常子宫内膜低,GnRH-Ⅱ还可抑制体外培养的异位子宫内膜间质细胞的增殖,且呈剂量依赖性,此外,他们还发现 GnRH-Ⅱ可降低与 EMs 发病有关的重要免疫反应因子白介素-8 (IL-8) 和环氧化酶-2 (COX-2) 的分泌。揭示 GnRH-Ⅱ对子宫内膜间质细胞有抗增殖和抗炎症作用,可能在 EMs 的病理生理学中起一定的作用。

本课题研究了 GnRH-Ⅱ对体外培养的子宫内膜间质细胞的作用。以不同浓度的 GnRH-Ⅱ作用于在位及异位子宫内膜间质细胞,结果发现对离体培养的子宫内膜间质细胞,无论是异位还是在位,GnRH-Ⅱ对其 VEGF 的分泌均有明显的抑制作用 ( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性 ( $P < 0.01$ ),随培养液中 GnRH-Ⅱ浓度的不断升高,其对子宫内膜间质细胞分泌 VEGF 的抑制作用增强。不同浓度的 GnRH-Ⅱ对异位内膜间质细胞 VEGF 分泌的抑制作用明显强于在位 ( $P < 0.01$ ),这为 GnRH-Ⅱ治疗 EMs 提供了理论依据。

综上所述,EMs 患者的异位子宫内膜间质细胞具有分泌 VEGF 的功能,分泌量与在位子宫内膜相近,这对 EMs 的形成和发展可能起重要作用。GnRH-Ⅱ对 EMs 患者的异位子宫内膜间质细胞 VEGF 分泌的抑制作用明显强于在位子宫内膜间质细胞,能更有效抑制子宫内膜间质细胞 VEGF 的分泌,从而抑制 EMs 的发生发展,使 GnRH-Ⅱ有望成为治疗 EMs 的一种有效的理想新药,并为之提供新的理论依据。

## 参考文献:

[1] Donnez J, Pirard C, Smets M. Surgical management of endometriosis [J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004, 18(2):329-348.  
[2] Enomoto M, Endo D, Kawashima S, et al. Human type II

GnRH receptor mediates effects of GnRH on cell proliferation [J]. Zool Sci, 2004, 21(7):763-770.  
[3] Grundker C, Gunthert A R, Millar R P, et al. Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(3):1427-1430.  
[4] Wang A F, Li J H, Maiti K, et al. Preferential ligand selectivity of the monkey type-II gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor for GnRH-2 and its analogs [J]. Mol Cell Endocrinol, 2003, 209(1-2):33-42.  
[5] McLaren J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis [J]. Hum Reprod Update, 2000, 6(1):45-55.  
[6] Wu M Y, Ho H N. The role of cytokines in endometriosis [J]. Am J Reprod Immunol, 2003, 49(5):285-296.  
[7] 秦莉花,秦明春,李晟,等. 人子宫内膜细胞原代体外培养方法[J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(3):8-10.  
QIN Lihua, QIN Mingchun, LI Sheng, et al. Establishment of Method for human endometrial cell culture in vitro [J]. Journal of TCM University Of Hunan, 2007, 27(3):8-10.  
[8] Ryan I P, Schriock E D, Taylor R N. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78(3):642-649.  
[9] Osteen K G, Hill G A, Hargrove J T, et al. Development of a method to isolate and culture highly purified populations of stromal and epithelial cells from human endometrial biopsy specimens [J]. Fertil Steril, 1989, 52(6):965-972.  
[10] 陈建林,林秋华,方小玲,等. 孕酮对异位子宫内膜间质细胞 MMP22 和 MMP29 表达的影响 [J]. 中南大学学报:医学版, 2005, 30(3):307-311.  
CHEN Jianlin, LIN Qiuhua, FANG Xiaoling, et al. Effect of progesterone on the secretion of matrix metalloproteinase 22 and matrix metalloproteinase 29 in human ectopic endometrial stromal cells [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban, 2005, 30(3):307-311.  
[11] Morimoto C, Osuga Y, Yano T, et al. GnRH II as a possible cytostatic regulator in the development of endometriosis [J]. Hum Reprod, 2005, 20(11):3212-3218.  
[12] Smith S K. Regulation of angiogenesis in the endometrium [J]. Trends Endocrinol Metab, 2001, 12(4):147-151.  
[13] Donnez J, Smoes P, Gillerot S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis [J]. Hum Reprod, 1998, 13(6):1686-1690.  
[14] Ferrinai R, Chanrock-Jones D, Prentice A, et al. Immunohistochemical localization of acidic and basic fibroblast growth factors in normal human endometrium and endometriosis and the detection of their by polymerase chain reaction [J]. Hum Reprod, 1993, 8(1):11-16.

- [ 15 ] Gordon J, Shifren J, Foulk R, et al. Angiogenesis in the female reproductive tract [ J ]. *Obstet Gynecol Surv*, 1995, 50 ( 9 ) : 688-697.
- [ 16 ] Charnock-Jones D S, Sharkey A M, Rajput-Williams J, et al. Identification and localization of alternately spliced mRNA for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell line [ J ]. *Biol Reprod*, 1993, 48 ( 5 ) : 1120-1128.
- [ 17 ] 杨梅, 曲银娥, 王毅峰. 血管内皮生长因子在子宫内膜异位症中的表达 [ J ]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2007, 10 ( 6 ) : 646-647.  
YANG Mei, QU Yine, WANG Yifeng. Expression of VEGF in endometriosis [ J ]. *Chinese Journal of Coal Industry Medicine*, 2007, 10 ( 6 ) : 646-647.
- [ 18 ] Rusnati M, Casaroti G, Pecorelli S, et al. Basic fibroblast growth factor in ovulatory cycle and postmenopausal human endometrium [ J ]. *Growth Factors*. 1990, 3 ( 4 ) : 299-307.
- [ 19 ] Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fuisawa Y, et al. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from Octopus vulgaris [ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291 ( 5 ) : 1187-1193.
- [ 20 ] Millar R P. GnRHIII and typeII GnRH receptors [ J ]. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14 ( 1 ) : 35-43.
- [ 21 ] Parker J D, Malik M, Catherino W H. Human myometrium and leiomyomas express gonadotropin-releasing hormone 2 and gonadotropin-releasing hormone 2 receptor [ J ]. *Fertil Steril*, 2007, 88 ( 1 ) : 39-46.
- [ 22 ] Choi K C, Auersperg N, Leung P C. Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells [ J ]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86 ( 10 ) : 5075-5078.
- [ 23 ] White R B, Eisen J A, Kasten T L, et al. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 ( 1 ) : 305-309.
- [ 24 ] Chen A. Two forms of gonadotropin-releasing hormone ( GnRH ) are expressed in human breast tissue and overexpressed in breast cancer : a putative mechanism for the antiproliferative effect of GnRH by down-regulation of acidic ribosomal phosphoproteins P1 and P2 [ J ]. *Cancer Res*, 2002, 62 ( 4 ) : 1036-1044.
- [ 25 ] Cheon K W, Lee H S, Parhar I S, et al. Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone ( GnRH-II ) in human endometrium throughout the menstrual cycle [ J ]. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7 ( 5 ) : 447-452.

( 本文编辑 郭征 )