

复方莪术散对子宫内膜异位症患者异位和在位内膜中 VEGF 表达的影响

李欣*, 曹保利

(天津市南开医院妇科, 天津 300100)

[摘要] **目的:**探讨血管内皮生长因子(VEGF)在内异症患者异位和在位子宫内膜中的表达变化及意义。研究复方莪术散对内异症患者异位和在位子宫内膜中 VEGF 表达的影响,从而探讨其临床治疗内异症的作用机制。**方法:**采用免疫组化 SP 法分别检测 2009 年 7 月至 2011 年 1 月我院妇科因卵巢型内异症行腹腔镜手术治疗的 23 例术前予复方莪术散治疗 3 个月的内异症患者(治疗组)、30 例未经治疗的内异症患者(内异症组),了解异位和在位子宫内膜及 30 例子宫肌瘤患者(对照组)的子宫内膜中 VEGF 的表达水平。**结果:**内异症患者在位内膜中 VEGF 的表达水平(0.3263 ± 0.0285)显著高于对照组子宫内膜(0.1730 ± 0.0143) ($P < 0.05$),异位内膜中 VEGF 的表达水平(0.2258 ± 0.0093)明显低于在位内膜($P < 0.01$),而高于对照组子宫内膜($P < 0.05$),差异均有统计学意义。复方莪术散治疗组异位、在位内膜中 VEGF 的表达水平(0.1820 ± 0.0056 , 0.2587 ± 0.0091)明显降低,与内异症组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论:**内异症患者异位和在位内膜中 VEGF 的表达明显增强,与内异症的发生、发展密切相关。复方莪术散可下调内异症患者异位、在位内膜中 VEGF 的表达水平,从而可能在抑制内膜组织新生血管形成方面发挥治疗作用。

[关键词] 复方莪术散; 子宫内膜异位症; 血管内皮生长因子; 血管形成

[中图分类号] R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)15-0293-04

Effect of Compound Rhizoma Curcumae Powder on Expression of VEGF in Ectopic and Eutopic Endometrium of Patients with Endometriosis

LI Xin*, CAO Bao-li

(Department of Gynecology of Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ectopic and eutopic endometrium in patients with endometriosis and significance of the expression, and to study the effect of compound Rhizoma Curcumae powder on expression of VEGF in ectopic and eutopic endometrium in patients with endometriosis, the mechanism of compound Rhizoma Curcumae powder was explored in order to further clinical application. **Method:** Using immunohistochemistry SP method, the expression level of VEGF was detected in ectopic and eutopic endometrium in hospitalized patients with endometriosis, who had undertaken laparoscopic surgery in Department of Gynecology in Tianjin Nankai Hospital from July 2009 to January 2011, twenty-three cases were given compound Rhizoma Curcumae powder for 3 months before surgery (treatment group) and 30 cases without treatment entered endometriosis group, compared with that in endometrium from hysteromyoma patients of 30 cases (control group). **Result:** Expression of VEGF was significantly higher in eutopic endometrium of endometriosis group than that of control group ($P < 0.05$). Expression of VEGF in ectopic endometrium was lower than that in eutopic endometrium ($P < 0.01$) and was higher than that of control group ($P < 0.05$). The expression of VEGF in ectopic endometrium and eutopic endometrium in patients of treatment group were significantly lower than that in endometriosis group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Significantly increased expression

[收稿日期] 20120211(012)

[基金项目] 天津市医药卫生科研专项基金(07020)

[通讯作者] * 李欣, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合治疗子宫内膜异位症研究, Tel: 13820514870, E-mail: easter1110@sina.com

of VEGF in ectopic and eutopic endometrium in patients with endometriosis may be closely related to pathogenesis of endometriosis. Compound Rhizoma Curcumae powder may reduce the expression of VEGF in ectopic and eutopic endometrium in patients with endometriosis, thus it may play a therapeutic role in inhibiting angiogenesis in the endometrium.

[Key words] compound Rhizoma Curcumae powder; endometriosis; VEGF; angiogenesis

子宫内膜异位症(以下简称内异症)是育龄期妇女的一种常见妇科疾病,其发病率高达 10% ~ 15%^[1],且有明显上升趋势。已有的研究证实,内异症虽是良性疾病,却具有类似恶性肿瘤的血管形成能力。血管内皮生长因子(VEGF)是已知的最为关键的血管形成因子,可以特异性地直接作用于血管内皮细胞,是上调血管生成的重要因子。本研究采用免疫组化 SP 法检测 VEGF 在内异症患者的异位、在位子宫内膜中的表达水平,探讨 VEGF 在内异症发病中的作用及在位内膜的独特生物学特质;观察中药复方莪术散对内异症患者 VEGF 表达的影响,为其临床治疗内异症探寻理论依据。

1 对象和方法

1.1 临床资料 2009 年 7 月至 2011 年 1 月,选择在天津南开医院妇科因卵巢型内异症住院行腹腔镜手术治疗并经病理证实的患者,其中 23 例术前予复方莪术散治疗 3 个月的患者作为治疗组,平均年龄(33.26 ± 6.95)岁。30 例术前未经治疗的患者为内异症组,平均年龄(35.00 ± 6.94)岁,手术时子宫内膜期别增殖期 17 例,分泌期 13 例。按 r-AFS 分期法,Ⅱ期 4 例,Ⅲ期 15 例,Ⅳ期 11 例。另选取同期在我院妇科因子宫肌瘤行腹腔镜手术治疗的患者 30 例为对照组,平均年龄(35.70 ± 5.00)岁,手术时子宫内膜期别为增殖期 16 例,分泌期 14 例。3 组患者一般情况比较,差异均无统计学意义,且均无肿瘤病史、肝肾疾患及自身免疫性疾病,术前 3 个月均未接受激素类药物治。

1.2 用药方案 治疗组术前给予复方莪术散(药物组成:莪术 15 g,三棱 15 g,淫羊藿 15 g,黄芪 15 g,延胡索 10 g,分别由江阴天江药业有限公司制成颗粒剂),每日 2 次,早晚冲服,经期不停药,连服 3 个月。

1.3 标本采集 腹腔镜术中留取卵巢子宫内膜异位囊肿囊壁组织,切除子宫者,切取子宫内膜组织,保留子宫者,于术前或术中刮取子宫内膜组织。常规 4% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,切 4 μm 厚的石蜡切片,HE 染色后镜下观察到典型子宫内膜组织为入选标本,即选取的标本中应具有较为完整的

内膜腺体或囊壁内层为子宫内膜柱状上皮,上皮下为内膜间质细胞。

1.4 主要试剂 试剂一抗:兔抗人 VEGF 多克隆抗体,免疫组织化学 S-P 通用试剂盒,DAB 显色试剂盒,Triton-100 原液,即用型 PBS 粉剂(蒸馏水定容至 2 000 mL),均由天津津脉基因测绘技术有限公司提供。

1.5 检测方法 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 SP 法检测内膜组织中 VEGF 的表达,免疫组化操作流程按照试剂盒说明书进行。用已知的结肠癌病理片作为阳性对照,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。一抗工作液的效价为 1:200。

1.6 结果判定 胞浆内有棕黄色颗粒为阳性细胞。阴性对照为胞浆无着色,胞核呈蓝色。VEGF 主要表达于腺上皮细胞胞浆内,少量表达于间质细胞浆。免疫组化检测结果显示,治疗组、内异症组异位、在位内膜和对照组子宫内膜中均可检测到 VEGF 蛋白表达。治疗组 VEGF 阳性细胞的表达较内异症组减少,阳性蛋白的棕黄色减轻。采用德国 Leica LAS V3.7 进行图像采集,每张切片在腺上皮细胞染色集中区至少随机选取 4 个视野。采用 Imagepro Plus 6.0 图像分析软件进行定量分析,取每个视野平均吸光度(A)(累积 IA SUM/面积)的平均值,反映该切片上免疫反应物的表达水平。由同一人同一台机器测定。

1.7 统计学处理 运用 SPSS 16.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数的比较采用 *t* 检验,3 组间均数的比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 内异症患者异位、在位内膜中 VEGF 的表达

2.1.1 VEGF 在内异症组和对照组内膜中的表达水平比较 内异症患者异位内膜、在位内膜中 VEGF 的表达水平均显著高于对照组内膜($P < 0.05$),异位内膜中 VEGF 的表达水平明显低于在位内膜,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 1。

2.1.2 VEGF 表达与月经周期的关系 VEGF 在内异症组异位、在位内膜和对照组子宫内膜中各自的

表 1 VEGF 在 3 组患者子宫内膜中的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	分型	例数	VEGF
治疗	异位内膜	23	0.182 0 ± 0.005 6 ³⁾
	在位内膜	23	0.258 7 ± 0.009 1 ³⁾
内异症	异位内膜	30	0.225 8 ± 0.009 3 ^{1,2)}
	在位内膜	30	0.326 3 ± 0.028 5 ¹⁾
对照		30	0.173 0 ± 0.014 3

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;内异症组在位与异位比较²⁾ $P < 0.001$;治疗组与内异症组相应内膜比较³⁾ $P < 0.01$ 。

增殖期与分泌期之间的表达水平比较,差异均无统计学意义。在位内膜中 VEGF 的表达强度在增殖期和分泌期中均明显高于相应期别的对照组内膜,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 VEGF 在异位、在位内膜中增殖期与分泌期的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	分型	增殖期		分泌期	
		例数	均值	例数	均值
内异症	异位内膜	17	0.224 7 ± 0.008 2	13	0.227 4 ± 0.010 7
	在位内膜	17	0.320 6 ± 0.026 7 ¹⁾	13	0.333 9 ± 0.030 2 ¹⁾
对照		16	0.164 2 ± 0.010 1	14	0.183 1 ± 0.011 8

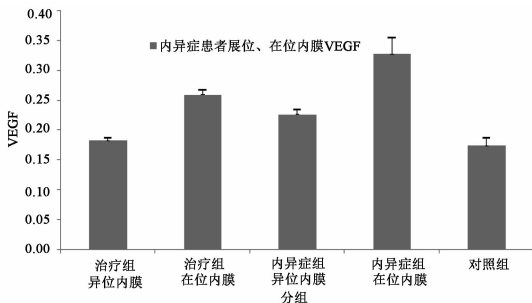
注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.1.3 VEGF 表达与临床期别的关系 在内异症患者异位和在位内膜中,VEGF 在不同临床期别的表达水平比较,差异均无显著性。见表 3。

表 3 VEGF 在异位、在位内膜中不同期别的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	II (n=4)	III (n=15)	IV (n=11)
异位内膜	0.223 ± 0.012	0.224 ± 0.009	0.229 ± 0.009
在位内膜	0.333 ± 0.042	0.325 ± 0.033	0.326 ± 0.016

2.2 复方莪术散对内异症患者异位、在位内膜中 VEGF 表达的影响 治疗组异位内膜、在位内膜中 VEGF 的表达水平均明显降低,与内异症组相应的异位、在位内膜比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1,图 1。

图 1 复方莪术散对内异症患者异位、在位内膜中 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

3.1 复方莪术散治疗内异症的组方分析 我科根据内异症“血瘀”机制,辨证辨病兼多年临床经验相结合,认为治疗宜扶正祛邪兼顾,潜心研制出中药复方莪术散,该方为颗粒剂型,以莪术、三棱为君药,行气止痛、破血祛瘀,治疗“瘀”这一主症;淫羊藿作为臣药,补肾气、填肾精、扶助正气、益精生血,同时温肾助阳,推动血液运行,使冲任调畅,瘀血得散;延胡索为佐药,化瘀软坚,同时兼用其止痛之功;黄芪则为佐使药,补益元气,使气旺而助血行,祛瘀而不伤正。本方针对内异症肾虚血瘀的病机,以活血化瘀、消癥散结、益肾扶正为治则,多年来在临床中取得了较好疗效。研究显示^[2],复方莪术散在中重度内异症腹腔镜术后药物巩固治疗中,能降低复发率,达到较好的临床疗效和疼痛缓解能力,且不良反应小,具有临床应用价值。

3.2 VEGF 在内异症发生发展中的作用 VEGF 又称血管通透性因子,是具有高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,越来越多的研究证实它具有强大的促内皮增殖、促血管形成能力。脱落的子宫内膜细胞接触并种植在腹膜上依赖于足够血液供应的建立和维持,种植灶子宫内膜的快速生长需要大量的新生血管,因此新生血管形成是子宫内膜异位种植存活和内异症发生的关键步骤。VEGF 可通过增加血管通透性,改变血管内皮细胞(EC)基因表达,促进血管内皮细胞的有丝分裂和趋化作用等途径导致新生血管形成,成为目前公认的最关键的促血管形成因子,在内异症的发生、发展中起着重要的作用^[3]。

3.3 VEGF 在内异症患者子宫内膜中的表达变化和意义 已有研究表明内异症患者的在位内膜中微血管的密度、血管的形成活性及 VEGF 的表达均明显升高^[4],异位内膜在子宫外必须依靠新生血管提供营养,异位病灶内部和周围可大量生成特征性的新生血管^[5]。本研究结果显示,VEGF 在异位内膜中的表达显著高于对照组内膜($P < 0.05$),提示异位内膜中 VEGF 的过度表达,使它具有很强的血管生成能力,得以在异位组织存活并进一步的侵袭、发展,使病灶不断扩大。本研究亦显示,VEGF 在异位内膜中表达水平低于在位内膜,差异有显著性($P < 0.001$)。内异症主要分为 3 种类型,即腹膜型、卵巢型、深部浸润型,已有研究显示^[6-7],不同类型内异症,其异位病灶及腹腔液中 VEGF 的表达水平是有差异的。腹膜红色病变一般是早期、活跃的内异症

病变,具有较高的增殖活性,血管化程度较高,其 VEGF 的表达水平亦较高。卵巢子宫内异位囊肿,一般被认为是晚期内异位症病变,尽管反复的囊内出血可使囊肿进一步增大,但其血管化程度和生长活性已不及腹膜红色病变,且囊壁异位内因膜因长期受囊液压迫也可使间质血管减少,种植物纤维化,这可能与其 VEGF 表达显著低于在位内因膜有关。VEGF 表达与内异位症病灶活性有关,将有可能成为内异位症的临床诊断及随诊指标。

本研究显示,内异位症患者在位内因膜 VEGF 的表达显著高于对照组内因膜($P < 0.05$),提示在位内因膜可能因 VEGF 的过度表达而具有比对照组内因膜更强的血管形成活性,一旦自身有机会逆流入腹腔,则比正常子宫内因膜更容易刺激周围腹膜形成新的血管,从而使患病的可能性增加。本研究从 VEGF 表达的角度佐证了“在位内因膜决定论”的观点。即在位内因膜的生物学行为与正常子宫内因膜有着本质的不同,是解释内异位症家族倾向和遗传性的理论基础。开发针对 VEGF 高表达的在位内因膜的检测标志物将可能成为预测和早期诊断内异位症的新方法。抗血管形成的相关药物临床试验也已被纳入考虑^[8]。

本结果亦显示,在内异位症患者异位和在位内因膜中,VEGF 在不同临床期别的表达水平比较,差异均无显著性。提示在卵巢型内异位症中,VEGF 表达的高低与临床期别无关。对 VEGF 是性激素反应因子的观点已达成共识,但其表达的周期性尚存争议。本研究显示,VEGF 在内异位症患者异位、在位内因膜和对照组内因膜中的表达均无周期性变化规律,且在位内因膜中 VEGF 在增殖期、分泌期的表达均显著高于相应期别的对照组内因膜($P < 0.05$),提示在位内因膜的强血管形成能力可能贯穿于整个月经周期,从而使病程迁延不愈。

3.4 复方莪术散对内异位症患者子宫内因膜中 VEGF 表达的影响及意义 动物实验显示^[9-10],具有化瘀散结功效的中药能显著抑制内异位症模型大鼠异位内因膜移植物的生长和血管生成。本实验研究表明,内异位症患者服用复方莪术散治疗 3 个月后,其异位、在位内因膜中 VEGF 的表达强度减弱,与空白对照组(内异位症组)比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示复方莪术散可明显减低内异位症患者异位内因膜、在位内因膜中 VEGF 的表达,从而降低异位、在位内因膜的血管形成能力,抑制新生血管形成及异位病灶的生长,这可能是复方莪术散治疗内异位症,发挥其活血化瘀、

消癥散结作用的一个重要机制。通过干预在位内因膜的特殊生物学特性,复方莪术散为中药治疗内异位症提供了新的思路。

综上所述,内异位症患者异位和在位内因膜中 VEGF 的表达明显增强,与内异位症的发生、发展密切相关。复方莪术散可通过下调内异位症患者异位、在位内因膜中 VEGF 的表达,干预在位内因膜的生物学特性,抑制新生血管形成及异位病灶生长,抗血管形成可能是其治疗内异位症的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Suchy T, Stepan J. Extragenital endometriosis as a subject of interest for the surgeon[J]. Rozhl Chir,2004, 83(5):239.
- [2] 李欣,曹保利,李继坤,等.中药辅助治疗中重度子宫内因膜异位症术后疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,2011,18(2):97.
- [3] Wu M Y, Ho H N. The role of cytokines in endometriosis [J]. Am J Reprod Immunol,2003,49:285.
- [4] Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, et al. The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions [J]. Reproduction, 2006, 132 (3): 501.
- [5] Na Y J, Yang S H, Back D W, et al. Patients on the release of vascular endothelial growth factor by neutrophils and monocytes [J]. Hum Reprod, 2006, 21 (7):1846.
- [6] Tan Xianjie, Lang Jinghe, Liu Dongyuan, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis [J]. Fertil Steril,2002,78 (1):148.
- [7] Khan N K, Masuzaki H, Fujishita A, et al. Higher activity by opaque endometriotic lesions than nonopaque lesions[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2004, 83(4): 375.
- [8] 冷金花,马彩虹.第十届国际子宫内因膜异位症学术会议纪要[J].中华妇产科杂志,2008,43 (6):475.
- [9] 李卫红,李莉,谭文举.罂痛饮对大鼠子宫内因膜异位症微血管密度的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2011,17 (22):181.
- [10] 崔丽娟,佟路芳,张硕峰,等.内异位丸对大鼠子宫内因膜异位模型的影响[J].中国实验方剂学杂志,2009,15 (8):74.

[责任编辑 邹晓翠]