

复方莪术散对子宫内位症大鼠异位内膜组织基质金属蛋白酶 2 和血管内皮生长因子表达的影响

张 敏* 曹保利

天津市南开医院妇产科, 天津市南开区三纬路 122 号, 300100

* 通讯作者: xingfuchibang@163.com, 13902163912

[摘 要] 目的 研究复方莪术散治疗子宫内位症(EM)的作用机制。方法 Wistar 大鼠 60 只, 采用自体移植法建立 EM 大鼠模型, 将造模成功的 40 只大鼠随机分为复方莪术散低、中、高剂量组[分别以 5.85g/(kg·d), 11.7g/(kg·d), 23.4g/(kg·d)], 孕三烯酮组[0.05mg/(kg·d)], 模型对照组(生理盐水 1ml/100g), 选取 8 只作为空白对照组(生理盐水 1ml/100g), 各组连续灌胃 28d, 每天 1 次。28d 后测定大鼠在位以及异位子宫内位组织中基质金属蛋白酶 2(MMP-2)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达水平。结果 EM 大鼠异位子宫内位组织中 MMP-2 和 VEGF 蛋白表达高于在位子宫内位组织($P < 0.05$); 复方莪术散在一定剂量关系上能显著抑制异位组织的生长, 缩小异位病灶体积, 抑制 MMP-2 和 VEGF 的表达, 与模型对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 与孕三烯酮组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 复方莪术散可抑制 MMP-2 和 VEGF 表达水平, 降低异位病灶的侵袭和血管生成能力, 这可能是其治疗 EM 的机制之一。

[关键词] 复方莪术散; 子宫内位症; 基质金属蛋白酶-2; 血管内皮生长因子

Influence of Fufang Ezhu San on MMP-2 and VEGF Expressions of Ectopic Endometrial Tissues of Endometriosis Rats

ZHANG Min, CAO Baoli

(Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100)

ABSTRACT Objective To study the function and mechanism of Fufang Ezhu San (Compound powder of aromatic turmeric) on endometriosis (EM). **Methods** The EM models were established by self-endometrium transplantation with 60 Wistar rats. The succeeded endometriosis models were randomized into 5 groups. Fufang Ezhu San low-dosage group, middle-dosage group and high-dosage group was given Fufang Ezhu San 5.85g/(kg·d), 11.7g/(kg·d), and 23.4g/(kg·d) respectively. Gestrinone of 0.05mg/(kg·d) was given to the control group. The model control group and blank control group including 8 normal rats were given normal saline 1ml/100g. The intragastric feeding was performed once a day, for 28 days in succession. Expression of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the uterus and ectopic endometrial tissues of all groups were detected with immunohistochemical method. **Results** The expression of MMP-2 and VEGF in the ectopic endometrial tissues were higher than those in the uterus tissues ($P < 0.05$). Fufang Ezhu San could inhibit significantly the growth of ectopic endometrial tissues, diminish the volume of ectopic foci, and decrease the expression of MMP-2 and VEGF in a dose-dependent manner. Compared with the model control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), and the effect was not significantly different as compared with that of gestrinone ($P > 0.05$). **Conclusion** Fufang Ezhu San is effective in inhibiting the expression of MMP-2 and VEGF and lowering the invasion of ectopic foci and ability of angiogenesis. This may be one of its mechanisms in treatment of endometriosis.

Key Words Fufang Ezhu San (Compound power of aromatic turmeric); endometriosis (EM); matrix metalloproteinases-2 (MMP-2); vascular endothelial growth factor (VEGF)

子宫内位症(EM)是妇科常见病、多发病, 约 80% 的患者有明显的痛经, 50% 左右的患者合并不孕, 具有病程长、复发率高的特点, 严重危害育龄妇女的健康和生质量^[1]。本研究采用曹保利教授的临床经验方复方莪术散, 通过动物实验观察其对异位内膜组织基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、血管内

皮生长因子(VEGF)表达的影响, 探讨内膜侵袭性、血管生成在子宫内位症发病中的作用, 揭示复方莪术散治疗子宫内位症的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成熟未曾交配过的雌性 Wistar 大鼠 60

只, SPF 级, 体重 200~250g, 由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供, 动物许可证号: SCXK(津)2005-0001。

1.2 药物

复方莪术散药物组成: 三棱 10g, 莪术 10g, 淫羊藿 10g, 黄芪 10g, 延胡索 10g, 药物购自天津市南开医院中药房; 孕三烯酮胶囊: 2.5mg/粒, 北京紫竹药业有限公司生产, 批号: 53070110083。

1.3 主要试剂

鼠抗人 MMP-2 (批号: bs-0412R) 和 VEGF 多克隆抗体免疫组化染色试剂盒 (批号: bs-1957R) 均由北京博奥森生物技术有限公司提供。

1.4 动物模型制备分组与给药

采用手术自体移植子宫内块法建立 EM 大鼠模型^[2], 造模成功 40 例, 造模成功 3 周后按随机数字表法分为复方莪术散高、中、低剂量组, 孕三烯酮组, 模型对照组, 每组 8 只。另选未造模大鼠 8 只为空白对照组。

复方莪术散高、中、低剂量组大鼠分别以 23.4g/(kg·d)、11.7g/(kg·d)、5.85g/(kg·d) 与适量的蒸馏水混合研磨后灌胃给药, 分别相当于成人 1 日剂量的 2 倍、1 倍、1/2 倍; 孕三烯酮组将孕三烯酮与适量的蒸馏水混合研磨后以 0.05mg/(kg·d) 灌胃给药, 相当于成人 1 日剂量的 1 倍; 模型对照组和空白对照组分别以生理盐水 1ml/100g 灌服。各组连续灌胃 28d, 1 次/d。

1.5 取材

各组大鼠分别于最后 1 次灌胃 24h 后麻醉开腹, 取移植物, 用游标卡尺测量其体积, 统计各组用药后的移植物体积, 比较各组体积变化情况。

将移植组织及空白对照组的在位子宫, 以 4% 多聚甲醛固定, 24h 内常规石蜡包埋, 切片, 免疫组化检测 MMP-2 和 VEGF 在大鼠在位及异位内膜中的表达, 由天津市南开医院病理室协助测定。

1.6 结果判定方法

采用计算机图像分析系统^[3] (Image-Pro Plus 6.0, 美国 Media Cybernetics 公司生产) 对 MMP-2 和 VEGF 免疫组化切片进行图像分析处理。以胞浆见棕黄色颗粒为阳性染色细胞。采用彩色自动图像分析软件对染色结果进行分析, 每张切片保持光线强度不变, 低倍镜下先选取异位病灶区, 高倍视野 (×400) 输入计算机进行分析, 以平均光密度值作 MMP-2 和 VEGF 的相对表达强度, 每张切片随机

观察 5 个视野, 然后取平均值作为每张切片的观察结果。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组均数间的差异显著性经方差检验判断。

2 结果

2.1 各组大鼠异位子宫内 (移植) 体积比较

表 1 示, 模型对照组异位子宫内体积较大, 复方莪术散干预后体积明显减小, 并呈剂量依赖性改变。复方莪术散高、中剂量组及孕三烯酮组异位子宫内体积与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而复方莪术散低剂量组异位子宫内体积与模型对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 复方莪术散中、高剂量组与孕三烯酮组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠异位子宫内体积比较 ($\text{mm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体积
空白对照组	8	——
模型对照组	8	149.01 ± 70.22
复方莪术散低剂量组	8	115.62 ± 57.70
复方莪术散中剂量组	8	49.88 ± 8.57*
复方莪术散高剂量组	8	32.02 ± 9.75*
孕三烯酮组	8	33.17 ± 16.12*

注: 与模型对照组相比, * $P < 0.05$

2.2 各组大鼠异位子宫内 MMP-2 表达比较

表 2 示, 模型对照组 MMP-2 蛋白阳性细胞高表达, 平均光密度与空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型对照组比较, 复方莪术散高、中、低剂量组及孕三烯酮组异位子宫内组织 MMP-2 蛋白阳性细胞的表达均明显降低 ($P < 0.05$); 复方莪术散高、中剂量组与孕三烯酮组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 复方莪术散低剂量组与孕三烯酮组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

表 2 各组大鼠异位子宫内 MMP-2 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	MMP-2
空白对照组	8	0.0462 ± 0.0206
模型对照组	8	0.1594 ± 0.1956 [△]
复方莪术散低剂量组	8	0.1220 ± 0.2693* [#]
复方莪术散中剂量组	8	0.0568 ± 0.1655*
复方莪术散高剂量组	8	0.0549 ± 0.1160*
孕三烯酮组	8	0.0525 ± 0.4740*

注: 与空白对照组比较, $\Delta P < 0.05$; 与模型对照组比较, * $P < 0.05$; 与孕三烯酮组比较, # $P < 0.05$

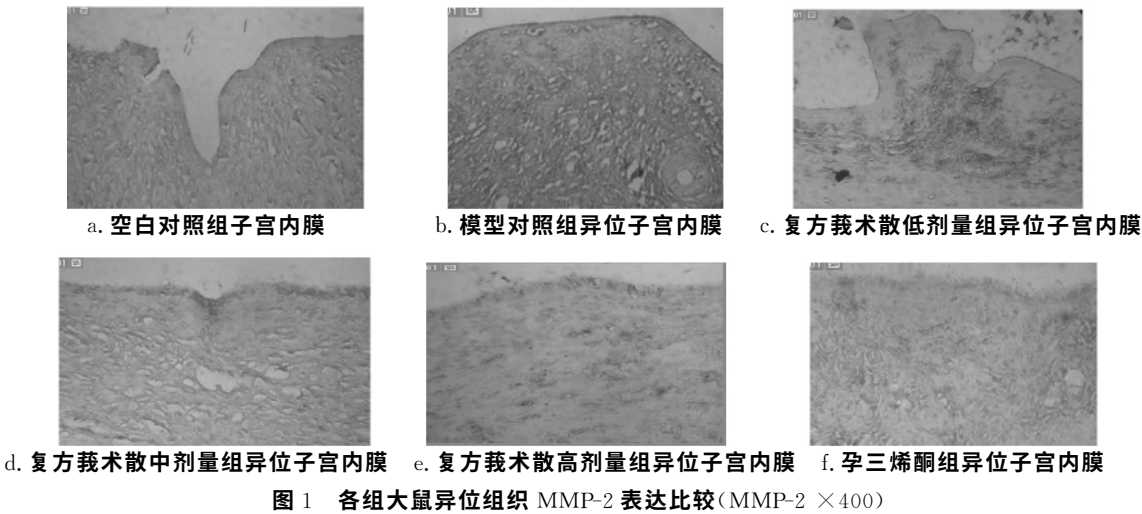


图 1 各组大鼠异位组织 MMP-2 表达比较(MMP-2 ×400)

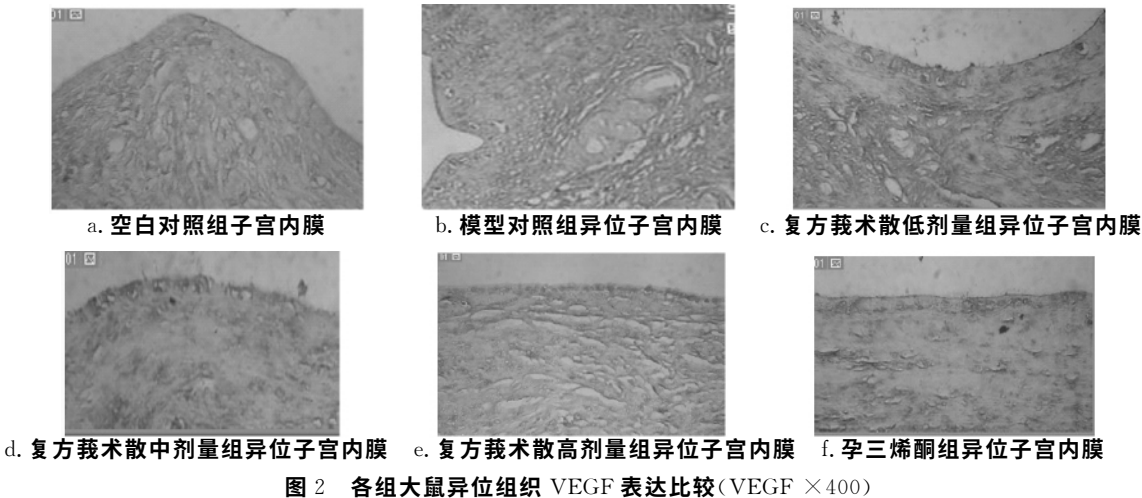


图 2 各组大鼠异位组织 VEGF 表达比较(VEGF ×400)

2.3 各组大鼠异位子宫内膜 VEGF 表达比较

表 3 示,模型对照组 VEGF 蛋白阳性细胞呈高表达,平均光密度与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$);复方莪术散高、中剂量组及孕三烯酮组 VEGF 蛋白阳性细胞均低表达,与模型对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$);复方莪术散低剂量组 VEGF 蛋白阳性细胞表达与模型组比较有下降趋势,但无统计学意义($P>0.05$);复方莪术

散高、中剂量组与孕三烯酮组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

3 讨论

目前 EM 确切的发病机制仍不清楚。其中 Sampson 的经血逆流学说^[4]普遍为学者接受。但该学说并不能解释 90% 的生育期妇女存在经血逆流现象,而只有 10%~15% 的妇女发病的原因。近年研究认为,经血逆流仅是 EM 发病的诱因,而脱落内膜细胞均必须完成内膜细胞的黏附—侵袭—血管形成过程,在卵巢、腹膜等处种植生长才是引起 EM 的主要矛盾^[5]。在这一过程中 MMPs、VEGF 等多种酶,细胞因子起重要作用。越来越多研究^[6-8]表明,这些酶和细胞因子在 EM 患者异位子宫内膜及在位子宫内膜表达异常是 EM 发病的原因之一。因此,研究异位内膜和在位内膜的各种酶及细胞因子是 EM 发病机制探索的新靶点,同时选择这些酶或细胞因子作为标志物,以 EM 形成过程为切入

组别	鼠数	VEGF
空白对照组	8	0.0481±0.0089
模型对照组	8	0.1382±0.0068 [△]
复方莪术散低剂量组	8	0.1291±0.1328
复方莪术散中剂量组	8	0.0814±0.0239*
复方莪术散高剂量组	8	0.0453±0.0080*
孕三烯酮组	8	0.0657±0.0090*

注:与空白对照组比较,△ $P<0.05$;与模型对照组比较,* $P<0.05$

点,抗黏附、抗侵袭、抗血管形成可能成为治疗 EM 的新突破点。

我们认为,本病病机为肾虚血瘀,病位在胞宫胞络,病性为本虚标实,虚实夹杂。复方莪术散具有补肾活血、软坚散结功效。方中三棱、莪术破血行气消积止痛为君;淫羊藿为臣药,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;又辅以延胡索化瘀软坚,同时兼用其止痛之功于方中;黄芪补益元气,使气旺而促血行,祛瘀而不伤正为佐使药。诸药合用益肾助阳,补益元气,又有活血化瘀、软坚散结之功,标本同治,使正气得复,瘀滞得散,胞宫得养,冲任调畅,其病自愈。

本研究结果显示,模型对照组异位子宫内膜组织 MMP-2 和 VEGF 表达均高于空白对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);MMP-2 的增高使异位子宫内膜具有很强的蛋白水解能力,促进异位子宫内膜细胞周围基底膜与其他 ECM 成分的降解,导致异位子宫内膜细胞种植、生长。VEGF 是调节血管新生的重要生长因子,异位子宫内膜黏附、侵袭后,高水平的 VEGF 可促进腹膜下血管网形成,有利于腹腔逆流区域内膜的种植。在 EM 的发生和发展中起到了一定的作用。

本研究结果表明了复方莪术散能明显缩小异位病灶的体积,具有和孕三烯酮同样的抑制异位内膜中 MMP-2 和 VEGF 表达而达到抑制异位子宫内膜的生长、发育。从一个方面提示复方莪术散治疗

EM 的作用机理可能是通过抑制 MMP-2 和 VEGF 表达而降低了异位病灶的侵袭和血管生成能力。

参考文献

- [1] Bullimore DW. Endometriosis is sustained by tumor necrosis factor- α [J]. Med Hypotheses, 2003, 60(1): 84-88.
- [2] Jone 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, 1984, 106(2): 282-288.
- [3] Hamilton PW, Bartels PH, Montironi R, et al. Automated histometry in quantitative prostate pathology [J]. Anal Quant Cytol Histol, 1998, 20(5): 443-460.
- [4] 皇甫俊惠. 子宫内膜异位症病因研究进展 [J]. 国际医药卫生导报, 2003, 9(7): 113.
- [5] Matalliotakis IM, Goumenou AG, Koumantakis GE, et al. Serum concentrations of growth factors in women with and without endometriosis: the action of anti-endometriosis medicines [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(1): 81-89.
- [6] 吴平. 基质金属蛋白酶及其抑制物与子宫内膜异位症关系的研究进展 [J]. 陕西医学杂志, 2005, 34(6): 721-722.
- [7] 谭先杰, 朗景和. 子宫内膜异位症的基础与临床研究·血管形成调控分子与子宫内膜异位症 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 104.
- [8] 王淑美, 徐晓玉, 张文亮. 调控血管生成中药的研究现状 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(9): 613-614.

(收稿日期: 2010-10-20; 修回日期: 2010-12-18)

[编辑: 侯建春]

第十一次全国中医妇科学术大会 有奖征文通知

由中华中医药学会妇科分会主办“第十一次全国中医妇科学术大会”, 拟定于 2011 年 10 月在河南省郑州市举行。现将有关征文事宜通知如下:

征文内容: 1. 名老中医诊治妇科出血性疾病的学术思想及特色; 2. 妇科出血性疾病中医诊治新进展; 3. 新技术、新疗法、新工艺在诊治妇科出血性疾病及其在相关科学研究中的应用; 4. 妇科出血性疾病的文献综述; 5. 阿胶及其为主组方在妇科及其它相关学科领域的应用; 6. 阿胶药效物质基础、提取制备工艺及质量跟踪分析等研究技术新进展; 7. 阿胶及其为主组方文献综述等。

征文要求: 1. 论文不超过 4000 字, 并提供 200 字以内中文摘要, 摘要分目的、方法、结果及结论 4 部分撰写。2. 仅接收电子投稿(fkfh189@163.com)。3. 截稿日期: 拟定 2011 年 7 月 30 日。

论文一经选用, 即收入学术大会论文集, 颁发中华中医药学会论文证书, 并通知作者出席会议, 经考核合格授予国家级继续教育 I 类学分。届时还将评选优秀论文, 颁发“东阿阿胶杯”一、二、三等奖。欢迎中医、中西医结合妇科及其他相关学科领域临床、教学与科研人员投稿。

联系人: 刘丹卓, 电话: 13787132521, 传真: 0731-85381189, 电子邮箱: fkfh189@163.com

网址: <http://www.zhzyyfk.com>