

益气消癥法对雌激素诱导子宫肌瘤模型豚鼠血管内皮生长因子及其受体蛋白表达的影响*

陆一竹¹, 黄照环¹, 张茜薇¹, 宋卓敏^{1**}, 王娜²

(1. 天津中医药大学临床实训教学部 天津 300193; 2. 天津市武清区中医院 天津 301700)

摘要:目的:观察益气消癥法对雌激素诱导子宫肌瘤模型豚鼠血管内皮生长因子及其受体蛋白表达的影响,探讨该法方药抑制血管生成治疗子宫肌瘤的作用机制。方法:通过去势+皮下注射苯甲酸雌二醇建立子宫肌瘤模型,并给予不同剂量益气消癥法中药进行治疗。采用免疫组化法检测子宫组织微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达水平;采用RT-PCR检测子宫组织VEGFR1 mRNA、VEGFR2 mRNA表达。并对以上指标进行统计学分析。结果:与正常对照组比较,模型组豚鼠子宫肌组织MVD、VEGF、VEGFR表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,中药各剂量组均有不同程度的降低,其中以高剂量组最为明显,说明益气消癥法高剂量中药组可以显著抑制MVD、VEGF及其受体的蛋白表达。结论:益气消癥法通过抑制血管生成进而抗肌瘤细胞增殖,这可能是该法治疗子宫肌瘤的作用机制之一。

关键词:子宫平滑肌瘤 益气消癥法 微血管密度 血管内皮生长因子 血管内皮生长因子受体

doi: 10.11842/wst.2013.09.033 中图分类号:R965 文献标识码:A

子宫平滑肌瘤是女性生殖系统最常见的良性肿瘤之一,在育龄期妇女中的发病率呈逐年上升趋势。中医认为子宫肌瘤虽发病因素多,病机复杂,但终属正虚邪实之证。宋卓敏教授根据20余年的临床疗效确立了“益气化痰祛湿涤痰软坚消癥”法对该病证进行组方治疗。

目前研究发现在子宫肌瘤的发生发展过程中血管新生是机体肌瘤细胞增殖生长和远处转移的关键,本实验采用雌激素诱导法建立豚鼠子宫肌瘤模型,以益气消癥法中药对其进行干预,旨在观察并确定益气消癥法中药是否通过抑制血管生成这一重要机制达到治疗子宫平滑肌瘤的目的。

1 材料

1.1 实验动物

雌性清洁级豚鼠100只,体重(375±25)g,由北

京维通利华实验动物技术有限公司提供。

1.2 药物

米非司酮(北京紫竹药业有限公司,产品批号:43100611);益气消癥法中药组成:党参30g,川续断15g,莪术15g,郁金10g,白芥子15g,鳖甲30g。喷雾干燥法得中药干粉(由天津中医药大学制药厂鉴定并制备)。

1.3 主要实验试剂及器材

苯甲酸雌二醇注射液(天津金耀氨基酸生产有限公司,产品批号:1005071);硫酸庆大霉素注射液(天津药业焦作有限公司,产品批号:10051221)。

微血管密度(Microvascular Density, MVD)采用Ⅷ因子法进行血管标记(博奥森,货号:bs-0434R);血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)免疫组化试剂盒(Santa,货号:Sc-7269);RNA抽提试剂Trizol(Invitrogen);反转录试剂盒MBI RevertAid First Strand cDNA Synthesis

收稿日期:2013-03-31

修回日期:2013-04-13

* 国家自然科学基金面上项目(30973768)基于ER α 及其信号转导通路探讨益气消癥法干预子宫肌瘤血管生成的分子机制,负责人:宋卓敏。

** 通讯作者:宋卓敏,教授,主要研究方向:中医妇科基础与临床。

Kit ;Ex Taq (宝生物工程大连有限公司);琼脂糖 (Invitrogen Agarose-Molecular Biology Grade)。

显微镜 (日本奥林巴斯 ,BX51T-PHD-J11);多功能真彩色细胞图象分析管理系统 (美国 Media Cybernetics 公司 ,Image-Pro Plus);切片机 (德国莱卡 ,RM2015);凝胶成像系统 (Bio-red Gel DocXR 凝胶成像仪);电泳槽 (Tanon TPS 100);PCR 仪 (Alpha unit Block Assembly for PTC DNA Engine Systems);台式高速冷冻离心机 (Sigma ,K3-18);MDF-192 型超低温冰箱 (日本三洋电机株式会社)。

2 方法

2.1 实验动物分组

将实验动物 ,按随机数字表法分为六组 :正常对照组、模型组、中药高剂量组、中药中剂量组、中药低剂量组、西药组 (米非司酮)。

2.2 模型建立

采用去势+雌激素诱导建立豚鼠子宫肌瘤模型^[1]。卵巢摘除术后 7 天行阴道涂片 ,观察阴道上皮角化情况 ,连续 15 天阴道监测未见动情周期证明去势成功。

2.3 给药方法

造模第 21 日始 ,各给药组按相应剂量给药 ,给药容积为 $1 \text{ mL} \cdot (100 \text{ g} \cdot \text{d})^{-1}$,正常对照组及模型组给予等容积蒸馏水 ,连续 12 周。

2.4 免疫组化测定各组豚鼠子宫组织 MVD (第Ⅷ因子)、VEGF 蛋白表达

采用常规免疫组化法染色 ,DAB 显色。选择实验组和对照组的阳性和阴性组织相、进行 400× 的显微照相。每个样本任选 5 个有意义的组织相 ,登记阳性细胞等级及百分比 ,计算出 HIS 评分 ,进行统计学分析。HIS 评分计算方法^[2] : $\text{HIS} = A \times B$,A 为阳性细胞数 ,分级 :0~1% 记为 0、1%~10% 记为 1、10%~50% 记为 2、50%~80% 记为 3、80%~100% 记为 4 ,B 为阳性细胞显色强度 ,分级 :0 (阴性)、1 (弱阳性)、2 (阳性)、3 (强阳性)。

2.5 RT-PCR 检测各组豚鼠子宫组织 VEGFR1 mRNA、VEGFR2 mRNA 表达

引物设计采用 Beacon 7.0 引物设计软件 ,引物合成与测序均由北京基诺莱普生物技术有限公司完成 ,具体引物序列如表 1。

提取总 RNA 并进行反转录后进行 PCR 扩增反

应 ,具体步骤如表 2。

取 PCR 产物 $5 \mu\text{L}$,2% 琼脂糖凝胶上电泳 ,溴化乙锭 (EB) 染色 ,应用 GIS-2010 凝胶图像分析系统照相、读取灰度值。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。全部实验数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示 ,多组间均数比较采用单因素方差分析 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组豚鼠子宫肌组织 MVD、VEGF 表达的比较

免疫组化染色结果显示 MVD、VEGF 均在胞浆中表达 ,棕黄色染色为阳性表达 (见图 1)。正常对照组豚鼠子宫平滑肌组织 MVD、VEGF 阳性表达较低 (图 A1/A2) ,模型组大鼠子宫平滑肌组织 MVD、VEGF 表达呈强阳性 ,表现为胞浆棕黄色表达增多 (图 B1/B2) ,与正常对照组比较有显著统计学意义 ($P < 0.01$) ;中药各剂量组及西药组豚鼠子宫组织 MVD、VEGF 的阳性表达均有不同程度的降低 ,其中中药高剂量组与模型组、其它剂量组及西药组比较具有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) (图 C1-F1/C2-F2)。具体见表 3。

表 1 VEGFR1 mRNA、VEGFR2 mRNA 引物序列

名称	引物序列	扩增片段长度/bp
VEGFR1	CCCTCGTGCTACTCCTCT CTGGTCCCCTATGACTTTT	481
VEGFR2	CCGCGAAGAGGTGAAG GCTGTGCTGGAGAAAC	268

表 2 PCR 反应程序

步骤	循环次数	温度/°C	时间
Soak	1	94	5 min
Cycle	35	94	45 s
		53	30 s
		72	30 s
Extend	1	72	10 min
Soak	1	4	∞

表 3 各组豚鼠子宫肌组织 MVD、VEGF 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MVD(%)	VEGF(%)
正常对照组	15	0.318±0.147 ^{▲▲}	0.301±0.096 ^{▲▲▲▲}
模型组	15	0.803±0.222 ^{■▲▲}	0.791±0.204 ^{■▲▲}
中药高剂量组	14	0.427±0.113 ^{▲▲}	0.451±0.065 [▲]
中药中剂量组	12	0.656±0.182 ^{■▲}	0.581±0.088 ^{■▲▲▲}
中药低剂量组	13	0.734±0.270 ^{■▲▲}	0.686±0.231 ^{■▲▲}
西药组	14	0.660±0.173 ^{■▲▲▲}	0.498±0.238 ^{▲▲▲}

注:与正常组比较,■P<0.01;与模型组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01;与中药高剂量组比较,△P<0.05,△△P<0.01。

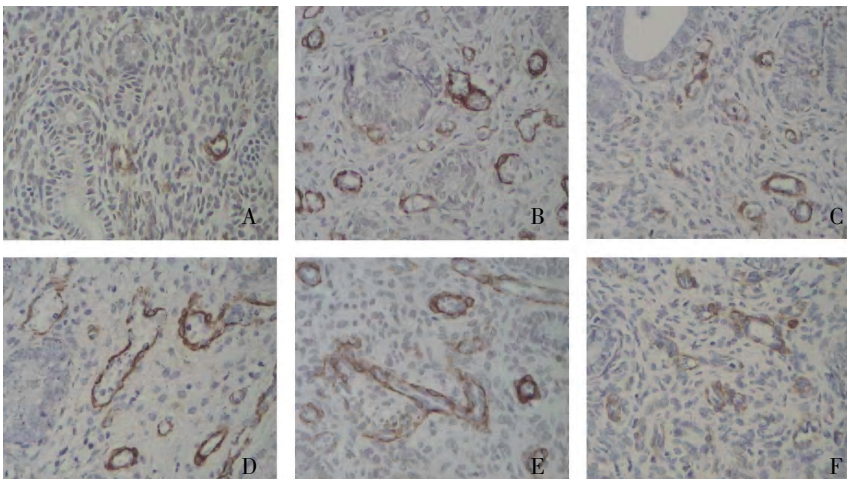


图 1 豚鼠子宫肌细胞 MVD 免疫组化图

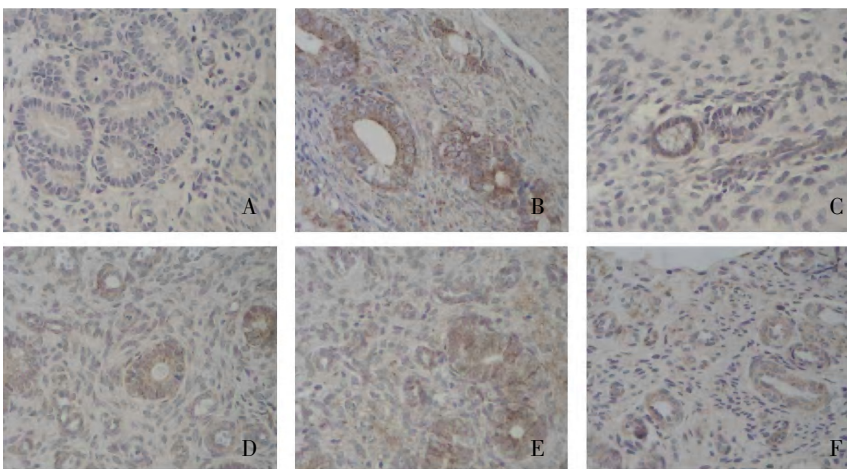


图 2 豚鼠子宫肌细胞 VEGF 免疫组化图

注:A 正常对照组,B 模型组,C 中药高剂量组,D 中药中剂量组,E 中药低剂量组,F 西药组。

3.2 各组豚鼠子宫肌组织 VEGFR 凝胶电泳分析

与正常组比较,模型组豚鼠子宫肌组织 VEGFR1 mRNA、VEGFR2 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$)(图 A3~B3/A4~B4);与模型组比较,中药高剂量组使得豚鼠子宫肌组织 VEGFR1 mRNA、VEGFR2 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)(图 C3/C4);且中药高剂量组的疗效显著优于中药中剂量组、中药低剂量组及西药组 ($P<0.01$)(图 D3~F3/D4~F4)。具体见表 4,图 2。

4 讨论

在肿瘤发生发展过程中,血管生成是肿瘤生长和转移的关键步骤,MVD 是影响肿瘤预后的重要因素^[3]。MVD 是衡量肿瘤组织血管生成的金标准,子宫肌瘤是依赖血管生成的肿瘤。肿瘤的新生血管不仅为肿瘤提供丰富的营养,带走大量的代谢产物,同时丰富的血管形成也对实体肿瘤的生长和转移起到加速作用^[4]。实验中这项指标直接反应子宫肌瘤组织中血管的数目与密度,间接反应肌瘤组织的生长速度与预后。益气消癥法中药干预后平滑肌组织 MVD 的表达下降,并且与剂量呈正相关,说明益气消癥法治疗子宫肌瘤的机制可通过抑制子宫肌瘤血管生成得到实现。

VEGF 是目前发现刺激肿瘤血管生长最重要而直接的因子,在促进肿瘤微血管

表4 各组豚鼠子宫肌组织 VEGFR1、VEGFR2 mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	VEGFR1 mRNA/灰度	VEGFR2 mRNA/灰度
正常对照组	15	0.4240±0.008 ^{▲▲▲△}	0.454±0.008 ^{▲▲▲△}
模型组	15	1.557±0.033 ^{■▲△}	1.400±0.054 ^{■▲△}
中药高剂量组	14	0.733±0.009 ^{■▲▲}	0.561±0.008 ^{■▲▲}
中药中剂量组	12	1.028±0.011 ^{■▲▲△}	1.027±0.007 ^{■▲▲△}
中药低剂量组	13	1.505±0.012 ^{■▲△}	1.237±0.007 ^{■▲▲△}
西药组	14	0.862±0.021 ^{■▲▲△}	0.678±0.030 ^{■▲▲△}

注:与正常组比较,■P<0.01;与模型组比较,▲P<0.01;与中药高剂量组比较,△P<0.01。

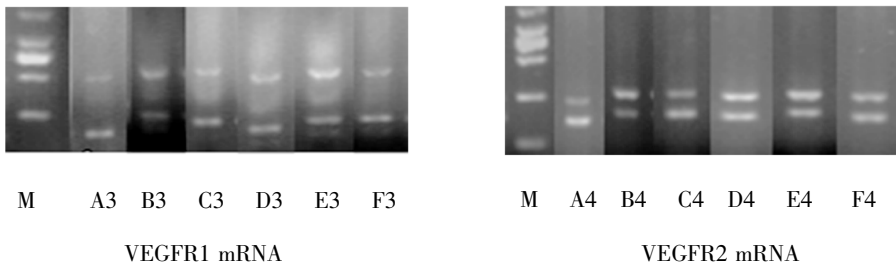


图2 VEGFR1(A3-F3)及 VEGFR2(A4-F4)RT-PCR 产物电泳图(M:分子量标准 marker)
注:A 正常对照组,B 模型组,C 中药高剂量组,D 中药中剂量组,E 中药低剂量组,F 西药组。

与微淋巴管生成中起着关键作用^[5]。在子宫肌瘤的发生发展过程中血管新生是机体肌瘤细胞增殖生长和远处转移的关键,其中 VEGF 是诱导和调节血管生成的最重要因子之一,且 VEGF 与 MVD 两者表达之间存在着正性相关^[6]。VEGF 在胚胎发育、女性生殖周期、伤口愈合等正常生理过程和肿瘤、炎症等病理生理过程中均是调控血管生成的关键细胞因子^[7]。研究表明,肿瘤组织缺氧,可明显增加 VEGF 的表达,促进肿瘤血管生成和细胞能量代谢,从而影响肿瘤的发生与发展^[8]。临床上,研究最多、也最有价值的是通过阻断血管内皮生长因子(VEGF)及其主要受体(VEGFR2)来达到抑制肿瘤新生血管形成的目的^[9]。实验证明^[10],经 Spearman 等级相关分析检验,VEGF 的表达与 MVD 值呈正相关,表明在介入栓塞治疗后的缺血、缺氧环境中,VEGF 的表达增强,而促进肿瘤新生血管及血管体系的形成,影响肿瘤的生物行为。本研究检测子宫肌瘤 VEGF 的水平,结果提示益气消癥法中药降

低 VEGF 作用明确且优于西药米非司酮。

益气消癥法中药组方由党参、川断、莪术、郁金、白芥子、鳖甲组成。方中党参益气健脾,鳖甲软坚消癥合为君药;川断补肾,伍党参而强肾固冲;莪术破瘀,助鳖甲以消癥积,共为臣药;白芥子利气涤痰散结,郁金行气活血,二药相协以增强破积消坚之力,用为佐使。VEGF 在子宫肌瘤血管生成环节中具有重要的作用,经过益气消癥法中药干预,VEGF 及其受体的水平均降低,并且与剂量呈正相关,说明益气消癥法中药具有抑制血管生成因子水平,抑制其促血管生成受体及受体基因表达的作用,从而抑制子宫肌瘤的发生和发展,这也是其治疗子宫肌瘤的一个重要机制。

参考文献

- 1 朱焰,邱小燕,吴建辉,等.子宫肌瘤动物模型的建立.中国药理学通报,2006,22(3):374~378.
- 2 Soslow R A, Dannenberg A J, Rush D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer*, 2000, 89(12):2637~2645.
- 3 王欣,姚传臣,骈晶.肾上腺皮质癌中 COX-2、VEGF 的表达及与微血管密度的关系.现代肿瘤医学,2012,20(12):2577~2579.
- 4 Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86(3):353~364.
- 5 Regina S, Rollin J, Blechet C, et al. Tissue factor expression in non-small cell lung cancer relationship with vascular endothelial-growth factor expression, microvascular density, and Kras mutation. *J Thorac Oncol*, 2008, 3(7):689~697.
- 6 刘晓玲,张英娟,李敬东,等.兔 VX2 肝癌超声造影定量指标与肿瘤微血管密度及血管内皮生长因子的相关性分析.生物医学工程与临床,2013,1(2):1~5.
- 7 刘朵朵,王宝玲.血管内皮生长因子、微血管密度和促红细胞生成素在子宫肌瘤病中的作用探讨.陕西医学杂志,2010,39(3):313~315.

- 8 Birner P, Schindler M, Obermair A, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4693~4696.
- 9 Hicklin D J, Ellis L M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Clin Oncol*, 2005, 23(5):1011~1027.
- 10 郑延波,刘胜,王云强,等.肝动脉化疗栓塞术对兔 VX2 肝移植瘤 HIF-1 α 和 VEGF 表达及肿瘤血管生成的影响.中华肿瘤防治杂志,2009,17(24):2015~2018.

Influence on Angiogenesis Factor and Expression of Its Receptor Protein of Estrogen-induced Uterine Fibroids Rat Model with *Yi-Qi Xiao-Zheng* Method

Lu Yizhu¹, Huang Zhaohuan¹, Zhang Xiwei¹, Song Zhuomin¹, Wang Na²

(1. Clinical Teaching Department, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;
2. Tianjin Wuqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301700, China)

Abstract: This study was aimed to observe the influence on angiogenesis factor and expression of its receptor protein on estrogen-induced uterine fibroids rat models with *Yi-Qi Xiao-Zheng* (YQXZ) method, in order to explore the mechanism of this method in the inhibition of angiogenesis in the treatment of uterine fibroids. Castration and estrogen-induced method were used in the establishment of guinea pig uterine fibroids rat model. And then, different doses of Chinese medicine of YQXZ method were given. The immunohistochemical method was used in the detection of microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression of the uterine tissues. The RT-PCR method was used to detect the expression of VEGFR1 mRNA and VEGFR2 mRNA. Then, statistical analysis was given on indexes mentioned above. The results showed that compared with the normal control group, expression of MVD, VEGF and VEGFR of uterine muscle tissues in the model group was significantly higher ($P < 0.01$). Compared with the model group, Chinese medicine group of different doses showed different reducing. Among them, the high-dose group was the most obvious one. It showed that the high-dose Chinese medicine of YQXZ group was able to significantly inhibit the expression of MVD, VEGF and their receptors. It was concluded that YQXZ method can antagonize proliferation of the leiomyoma cell by inhibiting angiogenesis. Therefore, it may be one of the mechanisms of this method in the treatment of uterine fibroids.

Keywords: Uterine fibroids, *Yi-Qi Xiao-Zheng* method, microvessel density, vascular endothelial growth factor, vascular endothelial growth factor receptor

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 汪 晶)