

# 桂枝茯苓丸对子宫内皮异位症患者内膜组织 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF 的影响\*

刘 蓉, 秦 嶽\*\*

(西宁市第一人民医院 西宁 810000)

**摘 要:**目的:探讨桂枝茯苓丸对子宫内皮异位症患者在位和异位内膜组织低氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )和血管内皮生长因子(VEGF)的影响。方法:2011年6月~2013年6月间西宁市第一人民医院子宫异位症患者68例,所有患者均接受桂枝茯苓丸治疗,1次/日,连续治疗1个月,后对其疗效进行评估,并于治疗前后取在位和异位内膜组织,采用SP法对患者内膜组织中HIF-1 $\alpha$ 和VEGF蛋白水平和相关性进行分析。结果:桂枝茯苓丸治疗EM的总有效率为86.76%。与治疗前比较,治疗后异位和在位内膜组织HIF-1 $\alpha$ 和VEGF蛋白水平明显下降( $P<0.05$ )。VEGF蛋白下降与HIF-1 $\alpha$ 表达水平呈正相关( $P<0.05$ )。结论:桂枝茯苓丸治疗子宫内皮异位症具有较好的效果,其中异位内膜组织中HIF-1 $\alpha$ 和VEGF水平下调可能是导致该结果的原因之一。

**关键词:**桂枝茯苓丸 子宫内皮异位症 HIF-1 $\alpha$  VEGF

doi: 10.11842/wst.2014.05.038 中图分类号:R711.7 文献标识码:A

子宫内皮异位症(Endometriosis, EM)是妇科常见的一种良性具有侵袭性的疾病类型,好发于生育年龄的妇女,近年来其发病率呈现上升趋势,严重影响妇女的生育能力,已成为影响妇女健康的主要疾病之一<sup>[1]</sup>。关于EM的发病机理尚不完全清楚,目前普遍认为脱落的子宫内膜组织随经血倒流种植于卵巢和盆腔是导致EM发生的主要原因<sup>[2]</sup>。新生血管在EM发生和发展中发挥着重要作用,其中血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)是促进新生血管生成的主要因子<sup>[3]</sup>。缺氧诱导因子是调控VEGF表达的核心调控因子<sup>[4]</sup>。近年来,前临床和临床试验研究显示桂枝茯苓丸治疗EM具有较好的疗效,因此有望成为治疗EM的临床用药,但是其治疗机制目前尚不清楚<sup>[5-6]</sup>。本研究从血管生成角度出发,分析了其治疗EM的机

制,为临床推广使用提供一定的理论依据。

## 1 资料和方法

### 1.1 一般资料

西宁市第一人民医院于2010年6月~2013年6月间共收治EM患者68例。入选标准:①所有患者均符合《子宫内膜异位症诊断和治疗规范》标准<sup>[7]</sup>;②患者在接受治疗前均未服用激素或者桂枝茯苓丸等药物;③患者无不规则阴道出血病史;④排除盆腔炎或恶性肿瘤疾病者;⑤排除严重肝肾功能异常者;⑥排除严重心律失常以及器质性心脏疾病患者;⑦所有患者均签署知情同意书;⑧研究受本院伦理委员会许可和监督。68例患者其中异位子宫内皮异位症41例,年龄28~47岁,平均年龄(39.8 $\pm$ 6.15)岁;其中卵巢子宫内皮异位症23例,子宫腺肌症12例,腹壁子宫内皮异位症6例;增生型19例,分泌型22例。在位子宫内皮异位症27例,年龄28~48

收稿日期:2013-07-11

修回日期:2013-07-26

\* 教育部中央高校基本科研业务费专项(1508219042):盆底功能重建软组织修复材料的研究--脐血间充质干细胞转染NF1后构建生物复合材料在盆底重建中的研究,负责人:王建军。

\*\* 通讯作者:秦嶽,主任医师,主要研究方向:妇产医学。

岁,平均年龄( $38.4 \pm 6.67$ )岁;增生型 12 例,分泌型 15 例。

## 1.2 治疗方法

所有患者均接受桂枝茯苓丸(东北制药有限公司)治疗,2 g/次,2 次/天,连续治疗 1 个月。对治疗效果进行评定。

## 1.3 标本采集及免疫组化

分别于治疗前后取子宫内膜组织标本,采用 10% 的甲醛固定,石蜡包埋,连续 4  $\mu\text{m}$  的切片,进行免疫组化。小鼠低氧诱导因子-1 $\alpha$ (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )和 VEGF 单克隆抗体购自 Abcam 公司,批号分别为 ab16066、ab1316。免疫组化实验步骤根据操作说明书进行。组织切片进行脱蜡和水化处理,然后用 3% 的过氧化氢室温孵育 30 min 去除内源性过氧化氢酶,置于柠檬酸钠溶液进行微波抗原修复,冷却后用 10% 的山羊血清室温封闭 1 h,取出封闭液,滴加按照工作浓度配制的小鼠 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 单克隆抗体(1:100),4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, PBST 洗涤切片 3 次,5 min/次。滴加生物素标记的羊抗鼠二抗反应 20 min,滴加试剂 SABC, DAB 显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,脱水、透明、封片,直接在显微镜下观察蛋白表达情况。

## 1.4 观察指标及评定标准

临床疗效评定按照以下标准进行<sup>[8]</sup>,治愈:症状全部消失,盆腔包块及局部体征基本消失;显效:症状消失,盆腔包块缩小 1/2 以上;有效:症状显著减轻,盆腔包块缩小 1/3 以上;无效:主要症状无变化或恶化,局部病变无变化或有加重趋势。治疗有效率=(治愈+显效+有效)/总例数 $\times 100\%$ 。②免疫组化采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件进行灰度分析,以平均灰度表示 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 蛋白的表达水平。每张切片选择 10 个视野进行灰度分析。

## 1.5 统计分析

所有数据均采用 SPSS 13.0 统计学软件进行分析,计量数据采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料比较采用  $t$  检验,计数资料比较采用卡方检验,采用 Pearson 相关分析法对 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 之间进行相关性分析, $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 疗效和安全性分析

桂枝茯苓丸治疗 EM 1 个月后,治愈 5 例,显效

26 例,有效 28 例,无效 9 例,总有效率为 86.76%。

## 2.2 治疗前后 HIF-1 $\alpha$ 和 VEGF 蛋白变化及相关性分析

VEGF、HIF-1 $\alpha$  阳性表达呈现棕黄色颗粒,VEGF 主要表达于腺体和间质细胞的细胞质中,HIF-1 $\alpha$  主要表达于腺上皮细胞细胞核中(如图 1)。治疗前异位内膜和在位内膜 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 平均灰度比较无统计学意义,与治疗前比较,无论是异位内膜还是在位内膜组织,HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 平均灰度均明显下降( $P < 0.05$ )。EM 异位和在位内膜组织中 HIF-1 $\alpha$  下调与 VEGF 表达水平呈正相关( $P < 0.05$ ,  $r = 0.897$ )。具体图 2。

## 3 讨论

子宫内膜异位症在中医上属于“瘕”、“痛经”、“不孕”等范畴,瘀血是导致其发生的主要原因,因此治疗应以活血化瘀,散结止痛为主<sup>[9]</sup>。桂枝茯苓丸是临床妇科常用的消瘀化癥之药物。目前研究显示其在治疗 EM 中具有较好的治疗效果<sup>[10]</sup>。本研究采用桂枝茯苓丸治疗 EM,临床治疗有效率高达 86.76%,显示桂枝茯苓丸治疗 EM 具有较好的疗效。

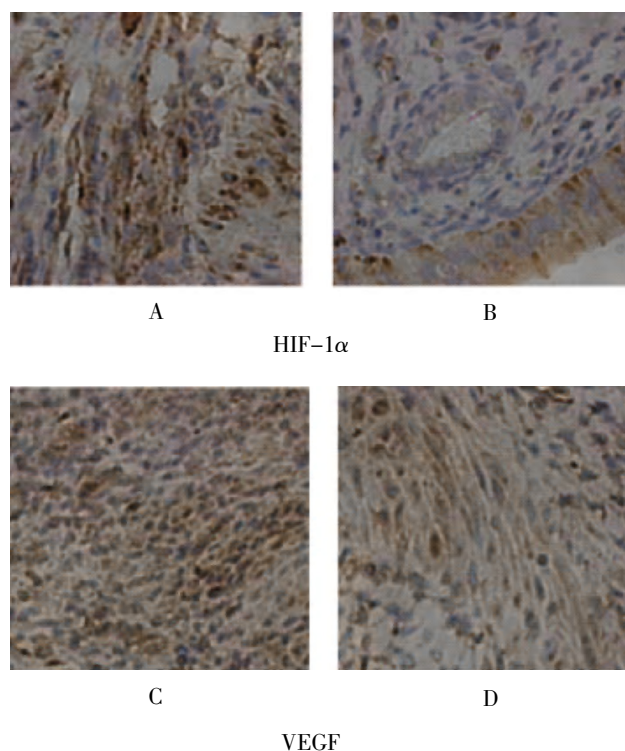


图 1 EM 患者治疗前后内膜组织 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达  
注 A. 治疗前 B. 治疗后 C. 治疗前 D. 治疗后。

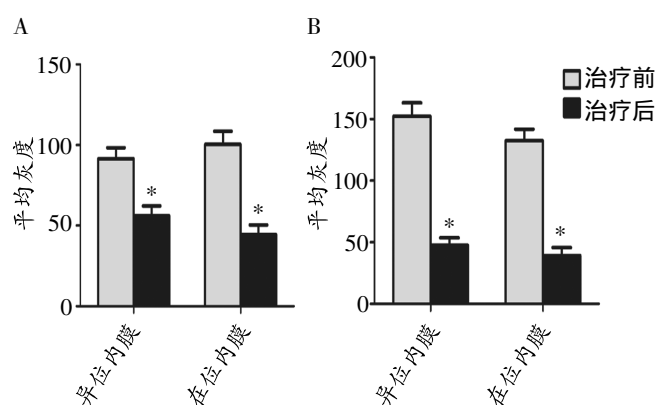


图2 EM患者治疗前后异位和在位内膜组织 HIF-1 $\alpha$  (A)、VEGF (B) 蛋白表达  
注:与治疗前比较, \* $P < 0.05$ 。

新生血管生成是 EM 发生和发展的主要过程。本研究从血管生成角度出发, 分析了其治疗 EM 的机理。HIF-1 在促进细胞增殖、新血管形成方面起着重要作用, 其由  $\alpha$  和  $\beta$  两个亚基组成,  $\beta$  亚基稳定性较高, 然而  $\alpha$  亚基是特异性的氧气调节亚基, 在有氧条件下, 其可迅速通过蛋白酶体泛素化降解, 在无氧条件下, 其稳定性增加, 可与  $\beta$  亚基相互作用形成二聚体, 从而介导下游目的基因的表达<sup>[11]</sup>。目前研究显示 HIF-1 $\alpha$  在 EM 组织中表达水平显著高于正常子宫内膜组织, 提示 HIF-1 $\alpha$  在 EM 过程中发挥着重要作用。而 HIF-1 $\alpha$  调节的血管形成主要通过 VEGF 来实现, 目前研究显示 VEGF 在 EM 组织中也呈现高表达状态, 可能促进 EM 血管形成, 进而促进了 EM 的发生和发展<sup>[12]</sup>。

研究结果显示治疗后异位内膜组织和在位内膜组织内 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 蛋白水平较治疗前均显著下调, 提示桂枝茯苓丸可下调 EM 患者异位和在位内膜组织的 HIF-1 $\alpha$  和 VEGF 水平。研究进一步分析了 VEGF 水平下调与 HIF-1 $\alpha$  之间的关系, 研究显示 VEGF 水平下调与 HIF-1 $\alpha$  水平呈现正相

关, 提示桂枝茯苓丸下调 HIF-1 $\alpha$  的水平, 进而降低了 HIF-1 $\alpha$  启动的 VEGF 基因的表达。

综上所述, 桂枝茯苓丸治疗 EM 疗效显著, 可能通过下调 HIF-1 $\alpha$  的水平, 进而下调 VEGF 来实现, 为临床桂枝茯苓丸治疗 EM 提供了理论依据。

### 参考文献

- 1 Macer M L, Taylor H S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2012, 39(4):535~549.
- 2 Soares S R, Martínez-Varea A, Hidalgo-Mora J J, et al. Pharmacologic therapies in endometriosis: a systematic review. *Fertil Steril*, 2012, 98(3):529~555.
- 3 Machado D E, Berardo P T, Palmero C Y, et al. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29:4.
- 4 Ren X, He Y L, Pan S L, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in endometriosis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2007, 27(4):538~540.
- 5 令红艳. 桂枝茯苓丸治疗大鼠子宫内膜异位症的机制研究. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(23):270~273.
- 6 李晓丽, 崔晓萍. 桂枝茯苓丸治疗子宫内膜异位症探析. 现代中医药, 2010, (4):34~35.
- 7 郎景和, 冷金花, 赵栋, 等. 第八届国际子宫内膜异位症学术会议纪要. 中华妇产科杂志, 2002, 7(10):638~640.
- 8 王冲, 史玉林. 中西医结合治疗子宫内膜异位症 90 例. 实用中医内科杂志, 2011, 25(6):92~93.
- 9 魏郁清, 杨根林, 谈勇. 子宫内膜异位症的中医药研究进展. 陕西中医, 2011, 32(11):1559.
- 10 Ji X, Gao J, Cai X, et al. Immunological regulation of Chinese herb *Guizhi Fuling* Capsule on rat endometriosis model. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3):624~629.
- 11 Pouyssegur J, Dayan F, Mazure N M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, 2006, 441(7092):437~443.
- 12 Gu C J, Li M, Li Q Y, et al. Chronic intermittent hypoxia increases  $\beta$  cell mass and activates the mammalian target of rapamycin/hypoxia inducible factor 1/vascular endothelial growth factor A pathway in mice pancreatic islet. *Chin Med J (Engl)*, 2013, 126(12):2368~2373.

### Effect of *Gui-Zhi Fu-Ling Wan* on HIF-1 $\alpha$ and VEGF in Patients with Endometriosis

Liu Rong, Qin Yue

(First People's Hospital of Xining, Xining 810000, China)

**Abstract:** This study was aimed to explore effect of *Gui-Zhi Fu-Ling Wan* (GZFLW) on HIF-1 $\alpha$  and vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with endometriosis. A total of 68 endometriosis patients in the First People's Hospital of Xining from June 2011 to June 2013 were included. All patients received treatment of GZFLW, once a day. After one-month treatment, the treatment efficacy was analyzed. The endometrial tissues (both ectopic endometrium and eutopic endometrium) were obtained before and after treatment. The protein levels of HIF-1 $\alpha$  and VEGF as well as the relationship of HIF-1 $\alpha$  and VEGF were analyzed by SP immunohistochemistry. The results showed that the total treatment efficacy was 86.76%. Compared with pretreatment, the posttreatment protein levels of HIF-1 $\alpha$  and VEGF were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The decreasing of VEGF protein level and HIF-1 $\alpha$  expression level were positively correlated ( $P < 0.05$ ). It was concluded that GZFLW had better efficacy in the treatment of endometriosis. One of the reasons may be the downregulation of protein levels of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in endometriosis tissues.

**Keywords:** *Gui-Zhi Fu-Ling Wan*, endometriosis, HIF-1 $\alpha$ , VEGF

(责任编辑 张丰丰 张志华, 责任译审 王 晶)