

鸦胆子油对大鼠增生型子宫内膜血管内皮生长因子表达的影响

贺丰杰,杜心洁,朱丽红,陈 静

(陕西中医学院临床医学院,陕西 咸阳 712046)



【摘要】 **目的** 观察不同浓度鸦胆子油对大鼠增生型子宫内膜血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响及意义,探讨鸦胆子油治疗功能失调性子宫出血的分子生物学机制。**方法** 建立大鼠增生型子宫内膜模型,设正常对照组(A)、模型对照组(B)、鸦胆子油宫腔注射低(C)中(D)高(E)剂量组并进行相应处理,用药结束后进行免疫组化法检测各组 VEGF 的表达及意义。**结果** 各组 VEGF 表达情况:A 组阳性表达,B 组强阳性表达,C 组弱阳性表达,D 组腺体结构不清,E 组无腺体结构。A 组与 B 组有显著性差异($P < 0.05$),B 组与 C 组之间及 A 组与 C 组之间有极显著差异(P 均 < 0.01)。**结论** 雌激素促使去卵巢大鼠子宫内膜增厚、腺体增生、子宫内膜腺上皮细胞 VEGF 表达增强。鸦胆子油靶向作用大鼠增殖型子宫内膜,破坏腺上皮细胞组织结构,影响其分泌 VEGF,致腺上皮细胞 VEGF 表达降低,进而影响内膜血管形成。

【关键词】 鸦胆子油;子宫内膜;增生过长;血管内皮生长因子

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8849(2009)03-0245-03

Influence of VEGF of brucea javanica oil on proliferative endometrium hyperplasia of rats

He Fengjie, Du Xinjie, Zhu Lihong, Chenjing

(Clinical Medical School of Shaanxin TCM College, Xianyang 712046, Shaanxi, China)

Abstract: Objective It is to observe the influence and significance of the brucea javanica oil on proliferative endometrium of rats, in order to discuss the molecular organism mechanism of brucea javanica oil in treating dysfunctional uterine bleeding. **Methods** The rats were divided into five groups, they are the normal contrasting group(A), the model group(B), the lower dosage group of brucea javanica oil (C), the medium dosage group of brucea javanica oil(D), the higher dosage group of brucea javanica oil (E). The models of proliferative endometrium of rats were established, and the rats were treated accordingly in all groups. The expressions of VEGF were detected by immunohistochemical SP staining in all groups. **Results** The expression of VEGF is mascline in group A, and strong mascline in group B, and weak mascline in group C, and the gland structure was unclear in group D, and there was no gland structure in group E. The difference of the expression of VEGF was significant between A and B group ($P < 0.05$), and it were extremely significant between group B and C, A and C separately ($P < 0.01$). **Conclusion** Estrogen makes the endometrium thicken, the glands hyperplasy, the VEGF in endometrium glandular epithelium strong express in rats without ovaries. The brucea javanica oil targetting proliferative endometrium, destroy the structure of glandular epithelium cell, affect the excretion of VEGF, decreases VEGF expression in glandular epithelium. So does the formation of endometrium blood vessel.

Key words: brucea javanica oil; endometrium; hyperplasia; vascular endothelial growth factor

功能性子宫出血(简称功血)是妇科常见病、多发病,临床以无排卵型为多见,其主要病理基础为子宫内膜过度增生,采用物理或药物祛除子宫内膜均可达到治愈功能血的目的^[1]。血管新生开关的平衡学说指出:血管内皮生长因子(VEGF)是目前已知特异性作用于血管内皮细胞的因子之一,有强烈促进内皮细胞增殖及新生血管形成的作用,在子宫内膜增殖过程中有重要作用^[2]。本研究通过检测鸦胆子油靶向作用大鼠增殖期子宫内膜、增生型子宫内膜中 VEGF 表达强度,以

探讨不同浓度的鸦胆子油靶向应用对增生型子宫内膜的作用机制。

1 实验资料

1.1 实验动物 选用健康成年 SD 雌性大鼠 60 只,体质量 180~220 g,购自西安交通大学实验动物中心,批号 08-005。随机分为 5 组。正常对照组(A 组):仅行开腹手术,模型对照组(B 组)与鸦胆子油低(C 组)中(D 组)高(E 组)剂量组分别行卵巢去势手术。A 组于术后第 1 天生理盐水灌胃 1 mL/(100 g·次),每天 1 次,连续观察阴道涂片,于阴道涂片示处于动情前期处死;B 组和 C、D、E 组均按下述方法造模:于术后第 1 天起用 100 mg/L 己烯雌酚溶液 1 mL/100 g 灌胃,每

【作者简介】 贺丰杰(1958—),男,主任医师,硕士生导师,研究方向为中西医结合治疗妇科良性出血性疾病。

天 1 次,连续 16 d。

1.2 宫腔内注药方法 B、C、D、E 组造模后各组大鼠用 10% 水合氯醛(300 mg/kg 体质量)腹腔注射全麻后,背位固定,在无菌条件下,耻骨联合上纵行切开腹部皮肤约 1 cm,逐层剪开,暴露子宫,在子宫颈内口上方用丝线结扎,用眼科镊子夹起子宫角。B 组用 1 mL 注射器自子宫角向宫腔内注射生理盐水 0.3 mL。C、D、E 组用 1 mL 注射器自子宫角向宫腔注入鸦胆子油乳。宫腔内注药后用 0.2% 甲硝唑溶液冲洗腹腔,以防感染,逐层缝合关腹。用青霉素 20 万 IU,肌注,每天 2 次,连续 3 d。宫腔用药 5 d 后脱臼法处死动物。

1.3 宫腔内注射鸦胆子油剂量 参照人用鸦胆子油乳静脉制剂安全使用量。鸦胆子油的有效提取率及人与大鼠体表面积比^[3]按照大鼠每克体质量灌注 0.000 18 mL 鸦胆子油计算出每只大鼠宫腔内注射的鸦胆子油量。按照鸦胆子油:乳化液:生理盐水 = 1:1:8 的比例加入吐温-80 和生理盐水,配成乳浊液。小、中大剂量分别以 1:2:4 的比例确定。因考虑到大鼠宫腔容积,按上述 1:2:4 的比例配置成的大剂量组,大于大鼠宫腔容积,故实际注射量按照 1:2:3 确定。

1.4 实验大鼠子宫内膜 VEGF 表达 VEGF(sc-7269)鼠抗人多克隆抗体,稀释度 1:80;PV-6001 二步法免疫组化检测试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒均购自北京中山试剂公司,操作按说明书进行。用已知 VEGF 阳性的胎盘组织切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.5 结果判定 以胞质染成棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞,采用常用的半定量计分法^[4]:即将每张切片内膜组织中阳性细胞着色强度与阳性细胞比例分别计 1 分、2 分、3 分,阳性细胞染成淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分;阳性细胞比例 < 1/3 为 1 分,1/3~2/3 为 2 分,> 2/3 为 3 分,每张切片随机选取 3 个视野,取其平均值。然后根据两项计分之总和判断其阳性强度,0 分阴性(-),1~2 分弱阳性(+),3~4 分阳性(++),5~6 分强阳性(+++),其中表达为(++)及(+++)者为高表达。

1.6 统计学处理 各组数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据用 SPSS 12.0 进行单因素方差分析,各组 VEGF 表达采用 Wilcoxon 等级分组秩和检验,并作组间比较。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠子宫内膜 VEGF 蛋白表达 VEGF 蛋白主要表达于细胞浆,呈棕黄色沉淀,在腺上皮细胞呈灶性分布;周围间质分布较分散、不连续、且较弱,为散在弱表达或不表达,偶有强表达呈局灶性,各组间无统计学意义;增殖期子宫血管不易观察,偶见血管内皮细胞有阳性表达不典型,各组间无统计学意义。各组 VEGF 表达情况见图 1~3。

2.2 腺上皮细胞 VEGF 阳性强度表达 见表 1。

2.3 间质部 VEGF 表达 VEGF 在子宫内膜间质细胞表达仅散在分布于少数细胞中,间质部 VEGF 表达在各组均为散在弱表达或不表达,偶有强表达呈局灶性不典型,无统计学意义。

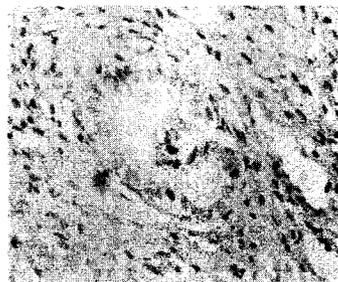


图 1 正常对照组 VEGF 表达情况(x40)

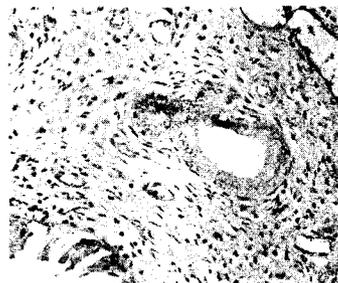


图 2 模型组 VEGF 表达情况(x40)

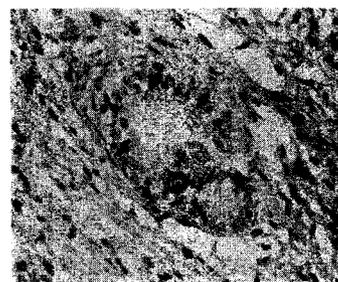


图 3 用药组 VEGF 表达情况(x40)

表 1 各组大鼠子宫内膜腺上皮 VEGF 表达情况 例

组别	总视野数	-	+	++	+++	高表达
A	24	2	5	14	3	17
B	27	2	3	9	13	22
C	24	5	14	4	1	5
D	24	21	3	0	0	0
E	24	24	0	0	0	0

注:A 组与 B 组比较, $t = 514, P < 0.05$; A 组与 C 组比较, $t = 729.5, P < 0.01$; B 组与 C 组比较, $t = 913.5, P < 0.01$ 。

2.4 血管内皮细胞 VEGF 表达 因增殖期子宫内膜血管不易观察,尤其增殖早期,偶见血管内皮细胞有阳性表达,药物作用使各组血管充血,血管着色呈棕黄色,不典型,无统计学意义。

3 讨论

血管形成的动态过程是在原有血管基础上,以出芽方式生长毛细血管,该过程受一系列因子调节,包括血管生成因子和抑制因子 2 个系统,Hanahan^[2]提出血管新生开关的平衡学说,指出生理情况下该系统常处于平衡状态,血管新生的开关

受血管新生诱导因子和抑制因子共同调节,若平衡被打破,如血管生成因子占优势,则诱导新的血管形成;反之,则使需要生成的血管受抑制。子宫内膜周期性增殖、分化和脱落,其再生修复需同步形成新的毛细血管,血管生成的意义就在于促进子宫内膜的增殖及修复。VEGF是目前已知特异性作用于血管内皮细胞的因子之一,有强烈促进内皮细胞增殖及新生血管形成的作用,在子宫内膜增殖过程中有重要作用,Shimizu等^[5]用雌激素处理大鼠,结果显示子宫内膜 VEGF mRNA 表达增强。杨芳等^[6]通过核酸保护分析发现,中增殖期、晚增殖期及分泌期人子宫内膜中 VEGF mRNA 水平分别比早增殖期升高 1.6, 2.0, 3.6 倍,因此雌孕激素有可能调节子宫内膜 VEGF 的产生。本研究发现,雌激素促使去卵巢大鼠子宫内膜增厚、腺体增生、子宫内膜腺上皮细胞 VEGF 表达增强,与上述研究结果一致。子宫内膜主要有腺上皮细胞和基质细胞组成,还包括少量血管平滑肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞和其他淋巴细胞。许多学者用 ELISA 等方法测定体外及体内培养的子宫内膜细胞能自分泌、旁分泌多种生长因子,VEGF 就是由腺上皮细胞和基质细胞分泌的,以腺上皮细胞分泌为主,引起 VEGF 发生改变的原因很多^[7],比较公认的有:①低氧可调节内膜 VEGF 的产生;②雌、孕激素可调节内膜 VEGF 的产生,但卵巢不是内膜产生 VEGF 的主要调节者;③肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、血小板源性生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)等对 VEGF 有正调节作用;④肝素调节,肝素酶可阻断其与受体的结合,而外源性的肝素酶可恢复其结合。

子宫腔物理方法祛除子宫内膜治疗功血已成为目前研究

热点,鸦胆子油子宫腔局部靶向用药促进子宫内膜凋亡甚至直接祛除子宫内膜的作用已经得到证实^[3]。本研究表明鸦胆子油能减弱子宫内膜中 VEGF 的表达,并随剂量增大而使 VEGF 的表达进一步减弱,这可能是鸦胆子油靶向应用治疗功能性子宫出血的分子生物学机制之一。

[参 考 文 献]

[1] 王晓静,贺丰杰. 功能性子宫出血的宫腔治疗进展与展望[J]. 陕西中医学院学报,2002,25(2):67
 [2] Hanahan D. Absence of telomerase and shortened telomeres have minimal effects on skin and pancreatic carcinogenesis elicited by viral oncogenes[J]. Cancer Cell,2004,6(4):373-385
 [3] 李楠. 鸦胆子油对大鼠增生过长子宫内膜祛除作用的实验研究[J]. 陕西中医学院硕士研究生毕业论文,2005
 [4] 项轶,黄绍光. 吸烟者肺小气道病理形态学半定量标准研究及其与肺功能相关性研究[J]. CNKI,ISSN:0253-9934. 2005-12-005
 [5] Shimizu T, Iijima K, Ogawa Y, Miyazaki H, Sasada H, Sato E. Gene injections of vascular endothelial growth factor and growth differentiation factor-9 stimulate ovarian follicular development in immature female rats[J]. Fertil Steril,2008,89(5 Suppl):1563-1570
 [6] 杨芳,马颖,何援利. VEGF 在人子宫内膜异位症裸鼠模型组织中的表达及意义[J]. 南方医科大学学报,2008,28(5):816-819
 [7] 范秀华. 血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子置上环出血子宫内膜中的表达及意义[A]. 河北医科大学硕士研究生毕业论文集[C],2003

[收稿日期] 2008-07-15

(上接第 244 页)液所诱导的豚鼠哮喘具有抑制作用,见表 5。

表 5 五味沙棘散对豚鼠的平喘作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/(g/kg)	给药前潜伏期/s	给药后潜伏期/s
生理盐水组	10	-	67.35±13.02	66.35±16.23
桂龙咳喘宁组	10	0.75	71.17±15.61	158.60±72.81 ^②
五味沙棘散低剂量组	10	0.5	66.12±18.95	111.21±38.76 ^①
五味沙棘散中剂量组	10	1.0	68.02±17.57	132.83±42.92 ^②
五味沙棘散高剂量组	10	2.0	69.68±22.56	138.47±57.50 ^②

注:①与给药前比较, P<0.05;②与给药前比较, P<0.01。

3 讨 论

咳痰、痰多、气喘是呼吸系统疾病的常见症状。五味沙棘散为蒙古族验方,在该复方蒙药中,沙棘中含有异鼠李素及其糖甙、槲皮素、山柰酚等 7 种黄酮物质,具有止咳、平喘祛痰、降低胆固醇等功效。沙棘膏为沙棘果实去杂质后,加水煎煮,滤取上层清液,残渣再以少量水煎煮,过滤,合并 2 次滤液,浓缩至膏状。梔子性味苦,寒;归心、肺、三焦经。具有泻火解毒,清热利湿,凉血散瘀等功效。木香具有行气止痛,健脾消食等功效。甘草具有补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和诸药等功效。根据上述单味药的作用,本实验对五味

沙棘散的止咳、化痰和平喘作用进行了初步观察,以验证其临床疗效,为其临床应用提供理论依据。

实验结果显示五味沙棘散可显著减少枸橼酸气雾刺激豚鼠呼吸道引起的咳嗽次数,明显延长二氧化硫气雾刺激小鼠呼吸道黏膜下感受器引起的咳嗽潜伏期,减少咳嗽次数;能促进小鼠气管酚红的排泌和增加大鼠玻璃管的排痰量;对组胺和氯化乙酰胆碱混合液引起的豚鼠哮喘具有抑制作用。提示五味沙棘散具有较好的止咳、化痰和平喘的作用。其作用机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 杨阿敏. 蒙药使用指南[M]. 呼和浩特:内蒙古教育出版社, 2001:33
 [2] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2001:1359-1364
 [3] 罗霄山,许家骝,张诚光,等. 咳喘乐颗粒镇咳、祛痰、平喘作用的实验研究[J]. 中药材,2004,27(7):520
 [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:636
 [5] 曾晓春,吴映明,凌敏. 广东大青镇咳平喘祛痰作用的实验研究[J]. 中医药学刊,2004,22(5):916

[收稿日期] 2008-08-25