

# 消异汤联合达那唑对大鼠 异位子宫内膜组织 VEGF 及 MVD 表达的影响\*

龚世雄, 姜慧君

(武汉市中西医结合医院, 湖北武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 探讨消异汤联合达那唑对大鼠异位子宫内膜组织血管内皮生长因子 VEGF 及微血管密度 MVD 表达的影响。方法: 采用自体移植法改良建立 Wistar 大鼠子宫内膜异位症模型, 4 周后将建模成功的大鼠随机分为生理盐水对照组 (U), 消异汤组 (XYT), 达那唑组 (D), 和联合用药小剂量组 (SS), 联合用药常规剂量组 (CS), 每组 10 只, 灌药 4 周后, 择动情期处死大鼠。采用免疫组化法测定血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 并通过 CD31 标记异位子宫内膜血管, 测定其微血管密度 (MVD)。结果: 消异汤组、达那唑组及各联合用药组 VEGF 和 MVD 的表达均低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 联合用药常规剂量组最低, 其中达那唑组和联合用药小剂量组间比较差异无统计学意义。结论: 消异汤可降低子宫内膜异位症模型大鼠的 VEGF 及 MVD 的表达水平, 消异汤与达那唑合用, 不仅可以提高疗效, 而且可以适当降低达那唑的用药剂量。

**[关键词]** 消异汤; 子宫内膜异位症; 血管内皮生长因子; 微血管密度

**中图分类号:** R275.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000—2723(2010)05—0023—05

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是指具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔以外的部位引起的病症, 至今其发病机理尚未完全阐明。大量的基础和临床研究表明血管生成可能在 EMs 的发生和发展中起重要作用。血管内皮生长因子 (vescular endothelial growth factor, VEGF) 是目前所知最关键的血管生成因子, 可特异地作用于血管内皮细胞, 导致新生血管形成, 为子宫内膜的异位种植、浸润和生长创造条件。在计数方法上, 最常选用微血管密度 (microvessel density, MVD)。消异汤是我院多年治疗 EMs 的经验方, 临床疗效显著。本研究通过对消异汤联合不同剂量达那唑对 EMs 模型大鼠血管生成的影响, 找到中西医结合治疗 EMs 的实验依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 动物

清洁级性成熟未交配雌性 wistar 大鼠, 鼠龄 (60 ± 5) d, 体重 (200 ± 10) g, 由湖北省疾病预防控制中心实验动物中心提供。饲料为省疾病预防控制中心实验动物中心提供的标准饲料, 饮用自来水, 室温

下饲养。该研究得到本院医学伦理委员会的批准。

### 1.2 实验药物与试剂

达那唑购自江苏联环药业股份有限公司, 100mg/粒。消异汤由本医院中药房提供, 由莪术 20g, 丹参 20g, 当归 10g, 淫羊藿 15g, 香附 20g, 炙甘草 6g 组成。抗鼠 VEGF 抗体、免疫组化用 SP 试剂盒、DAB 显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 主要仪器

OLYMPUS 光学显微镜, 型号: CX31, 医学图像分析系统, 型号: BI2000。

### 1.4 方法

#### 1.4.1 大鼠 EMs 模型的建立

造模前一天每鼠肌注雌二醇 0.1mg/ (kg · d) 使动物统一处于动情期。以 1% 的戊巴比妥腹腔注射来麻醉大鼠。固定大鼠于超净工作台的手术台上。下腹部剪毛后, 碘伏常规消毒皮肤。从尿道上端约 1cm 处, 正中切开皮肤约 2cm, 剪开肌肉及腹膜, 暴露子宫。钝镊找到并分离出大鼠右侧子宫, 结扎两端, 剪下中间的一段子宫, 迅速放入盛

\* 基金项目: 武汉市卫生局资助课题

收稿日期: 2010—05—27 修回日期: 2010—06—09

作者简介: 龚世雄 (1967 ~), 男, 副主任医师, 主要研究方向: 妇科肿瘤, 子宫内膜异位症。

有温生理盐水的培养皿中。剔除多余的脂肪组织,眼科剪沿系膜部位剪开管状子宫,切割成大小均匀的子宫片包括肌层,注意区分内外膜。于腹壁切口两侧从腹肌与皮下筋膜层之间打一隧道,左右各一,分别将切割好的子宫片平整的置入两侧隧道底部,使内膜面紧贴腹肌,常规关腹。术毕将动物分笼单放,让其自然苏醒,每日腹腔注射4万u/mL庆大霉素0.1mL,连续使用3d。常规饲养。

#### 1.4.2 模型检测与纳入

造模后每周触摸包块2次,观察包块有无及大小。术后4周,观察移植物的生长情况和体积。移植存活标志是体积增大,呈透明的结节状、囊状,有澄清液体积聚(积液高度 $\geq 2\text{mm}$ ),移植物被结缔组织覆盖并有血管形成,质地软。随机抽取5只造模成功的大鼠,分别取在位及双侧异位内膜放入10%的甲醛液中,室温固定24h,常规脱水,石蜡包埋,切片厚 $4\mu\text{m}$ ,HE染色,显微镜下观察病理变化,如图1-2。

#### 1.4.3 实验分组与给药

将建模成功的大鼠随机分为对照组(U),消异汤组(XYT),达那唑组(D),和联合用药小剂量组(SS),常规剂量组(CS),每组10只,U组每日灌服生理盐水5mL,XYT组每日灌服消异汤5mL(含生药300mg),D组每日灌服达那唑5mL(含达那唑15mg),SS组每日灌服消异汤和达那唑的混合液5mL(其中含消异汤生药300mg、达那唑10mg),CS组每日灌服消异汤和达那唑的混合液5mL(其中含消异汤生药300mg、达那唑15mg),药物根据《实验动物学》大鼠换算标准“每200g大鼠给药剂量为60kg成人剂量的0.018倍”计算得出,连续灌药4W。

#### 1.4.4 异位内膜VEGF、MVD的测定

每只大鼠在疗程结束24h后处死,手术取出异位内膜组织,观察比较各组模型大鼠的异位内膜形态学变化,并用两脚规测量异位子宫内膜囊肿体积。常规置于10%甲醛溶液中固定,48h后常规石蜡包埋, $4\mu\text{m}$ 厚度连续切片,进行HE染色和SP免疫组化染色。采用BI2000医学图像分析软件,确定VEGF染色强并且阳性细胞分布密集的区域,并在高倍镜下( $40\times$ )随机选取100个阳性细胞,测定其平均光密度(OD值),以代表每张切片阳性细胞胞浆内VEGF的相对平均含量。采用Wei-

ner微血管计数方法,在低倍镜视野下选取微血管密集度区,然后在高倍镜视野下由3个不知道实验分组的观察者同时计数同一视野,每张切片各数3个高倍视野,取3人计数3个视野的平均值作为该例的微血管密度。

#### 1.5 统计学处理

采用SPSS13.0软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用方差分析检验。

## 2 结果

### 2.1 各组异位子宫内膜囊肿体积的动态变化(见表1)

表1 各组大鼠异位子宫内膜囊肿体积缩小率

组别	治疗前/ $(\bar{x} \pm s)$ $\text{mm}^3$	治疗后/ $(\bar{x} \pm s)$ $\text{mm}^3$	缩小率/%
U(对照组)	132.23 $\pm$ 6.78	133.34 $\pm$ 3.89	-0.84
XYT(消异汤组)	133.24 $\pm$ 5.36	128.56 $\pm$ 2.76	3.51 *
D(达那唑组)	130.89 $\pm$ 7.55	123.78 $\pm$ 5.71	5.43 *
SS(小剂量组)	134.34 $\pm$ 4.45	126.50 $\pm$ 3.24	5.83 * $\Delta$
CS(常规剂量组)	131.36 $\pm$ 5.28	120.30 $\pm$ 3.58	8.42 *

\*  $P < 0.05$  vs U group.  $\Delta P > 0.05$  vs D group

治疗前各组大鼠异位子宫内膜囊肿体积无明显差异( $P > 0.05$ ),治疗后各治疗组比对照组异位子宫内膜囊肿体积有明显缩小( $P < 0.01$ )。组间比较,CS组缩小最明显,SS组与D组无明显差别( $P > 0.05$ )。

### 2.2 各组异位组织中VEGF含量的比较(见表2)

VEGF蛋白主要局限于腺上皮细胞胞浆中,同时也分散存在于周围间质细胞及血管内皮细胞胞浆中,如图3-7。

表2 各组异位组织中VEGF OD值的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	VEGF (OD值)
U(对照组)	1.216 $\pm$ 0.546
XYT(消异汤组)	0.907 $\pm$ 0.325 *
D(达那唑组)	0.683 $\pm$ 0.318 *
SS(小剂量组)	0.722 $\pm$ 0.264 * $\Delta$
CS(常规剂量组)	0.517 $\pm$ 0.103 *

\*  $P < 0.05$  vs U group;  $\Delta P > 0.05$  vs D group

经治疗后各治疗组异位组织中VEGF含量明显降低( $P < 0.05$ ),随着用药剂量的增大VEGF的含量逐渐降低;CS组VEGF的含量最低。但D组与SS组比较无明显差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3 各组异位组织中 MVD (CD31 标记) 数量的定位及比较 (见表 3)

CD31 存在于所有大小管径的血管内皮细胞胞浆内, 部分异位膜腺上皮周围微血管较为密集, 且管腔直径小, 如图 8-12。

表 3 各组异位组织中 MVD 数量的比较/ $(\bar{x} \pm s)$

组别	MVD
U (对照组)	23.91 ± 5.85
XYT (消异汤组)	19.36 ± 4.27 *
D (达那唑组)	16.06 ± 3.42 *
SS (小剂量组)	16.19 ± 3.23 * Δ
CS (常规剂量组)	12.38 ± 4.01 *

与对照组比较 \* $P < 0.05$ ; 与达那唑组比较 Δ $P > 0.05$

经治疗后各治疗组异位组织中 MVD 数量明显降低 (与对照组比较  $P < 0.05$ ), 随着用药剂量的增大 MVD 的数量逐渐降低; CS 组 MVD 的数量最低。但 D 组与 SS 组比较无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

EMs 发病机理复杂, 但体内任何移植物的成功种植都需要充足的血液供应。在内异症病灶形成过程中, 粘附、侵袭、血管形成是多数学者认定的病理生理过程, 同时内异症又是与免疫相关的炎症性疾病, 表现为病灶炎性因子增加和新生血管形成。国内外大量的基础和临床研究表明血管生成可能在 EMs 的发生和发展中起重要作用<sup>[1-3]</sup>。血管内皮生长因子 (vescular endothelial growth factor, VEGF) 是一具有多种功能的细胞因子, 为血小板衍生生长因子超家族的重要成员。主要分布于腺上皮及周围散在的间质细胞中, 能刺激内皮细胞增生, 并诱使内皮细胞的迁移和浸润, 形成新生血管, 是目前所知最关键的血管生成因子, 可特异地作用于血管内皮细胞, 导致新生血管形成, 为子宫内膜的异位种植、浸润和生长创造条件。MVD (microvessel density) 是反映血管活性的重要指标。MVD 评估血管生成状态直观、敏感。由于新生血管细小而无序, 因此需要借助于针对内皮细胞特异性标志物的免疫组化染色方法来加以计数, 目前最常用的是抗 CD31 单克隆抗体。CD31 是一血小板和内皮细胞

的黏附分子, 而抗 CD31 单克隆抗体对微血管内皮细胞敏感性强, 偶尔巨噬细胞、间质细胞和浆细胞也会引起免疫反应但可以通过与内皮细胞的形态学差异予以排除, 并不妨碍正确的微血管测定。本实验研究表明, 各组大鼠异位子宫内膜组织中 MVD 与 VEGF 均呈明显正相关关系。对照组大鼠异位子宫内膜组织中 MVD 与 VEGF 明显高于各治疗组, 提示内异症的发生与异位组织中 VEGF 及微血管的异常表达有密切关系。

达那唑 (Danazol) 是一种人工合成的  $17\alpha$ -乙炔睾酮衍生物。经多年临床证实其疗效确切。但也有明显的雄激素样作用, 且随着达那唑用药剂量的增加, 其副作用有明显的增加趋势<sup>[4-5]</sup>。

中医认为子宫内膜异位症的主要病机是气滞血瘀。部分经血不循常道而逆行, 以至离经之血蓄积体内而成瘀血, 瘀血阻滞不去, 新血无以归经, 因为瘀血雍阻于冲任、胞脉, 结成包块, 发为癥瘕, 活血化淤为重要治疗原则。多项动物实验研究及临床观察已经证实中医药在治疗子宫内膜异位症的有效作用<sup>[6]</sup>。消异汤在我院临床运用于子宫内膜异位症的治疗多年, 疗效确切。方中以莪术、丹参为君药, 活血化瘀。莪术具有行气破血、消积止痛的功效, 用于瘀血经闭、食积胀痛、癥瘕痞块等。现代药理学研究证实, 莪术具有较好的抗血栓、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗早孕、保肝、抗纤维组织增生等作用<sup>[7]</sup>。丹参具有活血通络、祛瘀止痛的功效, 现代药理学研究证实, 丹参具有保护血管内皮细胞、抗心律失常、抗动脉粥样硬化、改善微循环、保护心肌、抑制和解除血小板聚集、增加冠脉流量、提高机体耐缺氧能力、抑制胶原纤维的产生和促进纤维蛋白的降解、抗炎、抗脂质过氧化和清除自由基等作用。以当归、淫羊藿为臣药, 增强丹参、莪术的活血化瘀作用, 并能补肾。有研究<sup>[8]</sup>表明子宫内膜异位症其病以肾虚为本, 血淤为标, 属本虚标实证, 提出以补肾活血治疗本病, 疗效明显优于单纯的活血化瘀治疗。当归有补血和血的功效, 为医家常用, 素有“十方九归”之称。此方中当归除了增强君药的活血化瘀作用外, 还能补血, 防止丹参、莪术伤正。方中以香附为佐药, 行气活血止痛。此处运用一能增强君药活血化淤作用, 气行则血行, 二有雌激素样作用, 能降低达那唑的雄激素样副作用。Indira M<sup>[9]</sup>等报道, 去卵巢

大鼠试验表明，香附挥发油有轻度雌激素样活性。以炙甘草为使药，调和药性。纵观全方，具有活血化瘀、温补肝肾的作用。

本实验研究表明，消异汤能够抑制腺上皮细胞 VEGF 的表达，使微血管密度下降，促进异位内膜的萎缩，与达那唑作用相同，但强度不如达那唑，消异汤组的 VEGF 表达、微血管密度高于达那唑组 ( $P < 0.05$ )。二者合用时，作用更强，且随着剂量的增加其药效增加（各组中联合用药大剂量组 VEGF 表达、微血管密度最低）。考虑其作用机制有两个方面，一方面抗血管生成，异位内膜本身及其周围组织新的血供的建立和维持是子宫内膜异位种植存活和 EMs 发生的基本条件，VEGF 的表达降低、微血管密度的下降，表明消异汤能阻止异位内膜本身及其周围组织的血管形成，从而达到治疗 EMs 的目的。另一方面能够调节机体的免疫功能，纠正机体的免疫失衡状态，促进机体排斥进入腹腔的异位内膜。而达那唑的作用机制则

是能阻断下丘脑促性腺激素释放激素和垂体促性腺激素的合成和释放及直接抑制卵巢甾体激素的合成，导致异位内膜缺乏足够的激素支持而萎缩，萎缩的腺上皮细胞合成功能下降，其表达的 VEGF 量自然降低。消异汤与达那唑合用，可针对引起子宫内膜异位症的不同病理环节，通过不同的药理作用机制，发挥药物的联合效应，较快地促进异位内膜细胞萎缩坏死。

本实验还表明，虽然消异汤组的 VEGF 表达、微血管密度与达那唑组有差别（高于达那唑组， $P < 0.05$ ），但联合用药小剂量组的 VEGF 表达、微血管密度与达那唑组无明显差别 ( $P > 0.05$ )，表明消异汤能减轻达那唑的用量，达那唑用药剂量越大其副作用越明显。因而，二药合用，不仅可以提高疗效，而且可以降低达那唑的用药剂量，减轻达那唑的肝功能损害及雄激素样副作用，有利于患者坚持治疗。

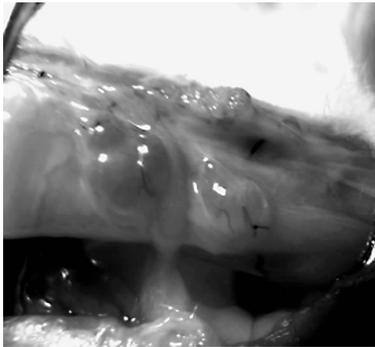


图1 大鼠模型异位病灶外观呈囊状，表面有血管

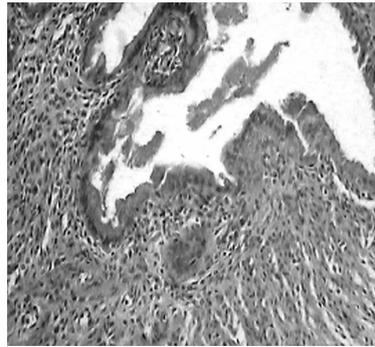


图2 大鼠子宫内膜异位病灶含子宫内膜上皮、腺体和间质细胞层，囊内为粘液和炎症细胞，相对于正常的子宫内膜，间质细胞层较薄，固有腺体较少 ( $\times 100$ )

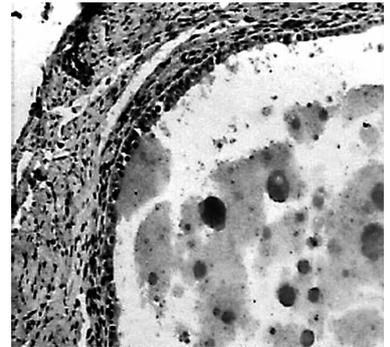


图3 对照组腺上皮细胞浆 VEGF 阳性 ( $\times 200$ )

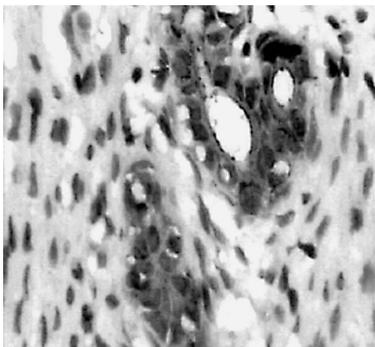


图4 消异汤组腺上皮细胞浆 VEGF 阳性 ( $\times 200$ )

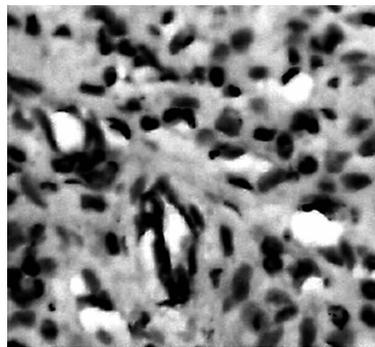


图5 达那唑组腺上皮细胞浆 VEGF 阳性 ( $\times 200$ )

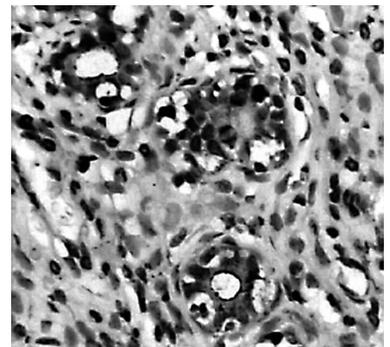


图6 联合用药小剂量组腺上皮细胞浆 VEGF 阳性 ( $\times 200$ )

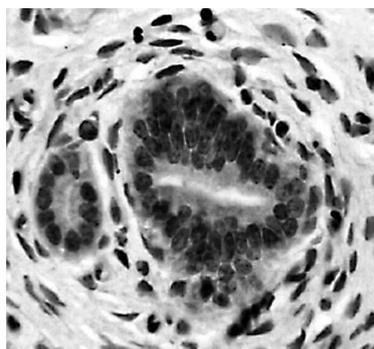


图7 联合用药常规剂量组腺上皮细胞浆 VEGF 阳性 (×200)

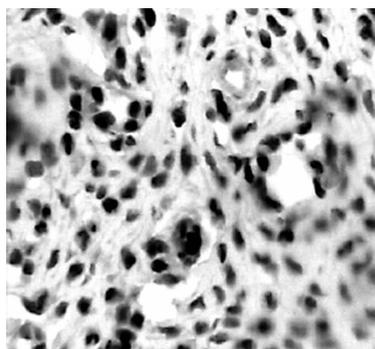


图8 对照组内皮细胞浆 CD31 阳性 (×200)

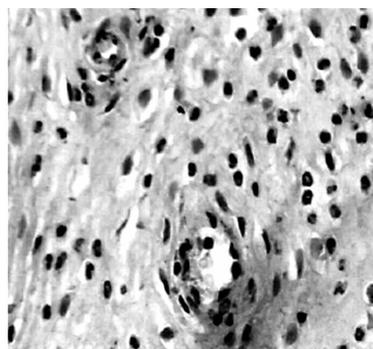


图9 消异汤组内皮细胞浆 CD31 阳性 (×200)

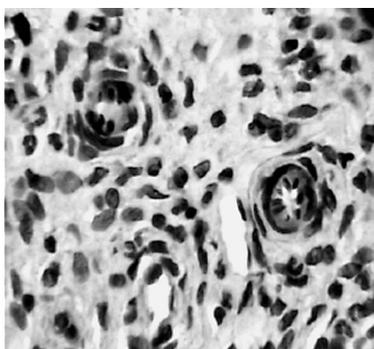


图10 达那唑组内皮细胞浆 CD31 阳性 (×200)

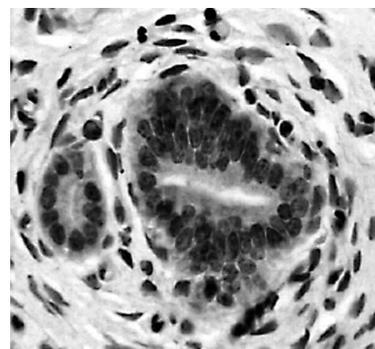


图11 联合用药小剂量组内皮细胞 CD31 阳性 (×200)

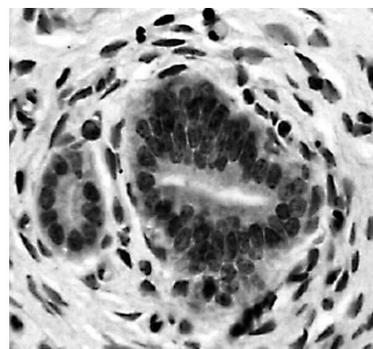


图12 联合用药常规剂量组内皮细胞浆 CD31 阳性 (×200)

[参考文献]

[1] Khan KN, Masuzaki H, Fujishita A, et al. Immunoexpression of hepatocyte growth factor and c - Met receptor in the eutopic endometrium predicts the activity of ectopic endometrium. *Fertil Steril*, 2003, 79 (1): 173 - 81.

[2] Ota H, Tanaka T. Stromal vascularization in the endometrium during adenomyosis [J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60 (4): 445 - 9.

[3] Guidi AJ, Abu - Jawdeh G, Tognazzi K, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in endometrial carcinoma [J]. *Cancer*, 1996, 78 (3): 454 - 60.

[4] ToshiakiHayashi, TohruTakahashi, Takaeminami, et al. Fatal acute hepaticfailure induced by danazol in a patient

with endometriosis and aplasticanemia [J]. *JEnterol*, 2001, 36 (11): 783 - 786.

[5] 陈西平, 彭国庆. 子宫内膜异位症伴不孕患者腹腔镜术后加用米非司酮和达那唑的疗效比较 [J]. *中国内镜杂志*. 2006, 12 (4): 434 - 436.

[6] 李祥云. 子宫内膜异位症的中医药研究概况 [J]. *上海中医药杂志*. 2002, 10: 43 - 45.

[7] WangY, WangMZ. Study on the quality of Rhizoma Curcumae [J]. *Act - aPharmSin*, 2001, 36 (11): 849.

[8] 梁雪芳. 司徒仪主任医师诊治子宫内膜异位症经验 [J]. *天津中医*, 2002, 19 (3): 71 - 73.

[9] 刘成彬. 香附的现代药理研究进展 [J]. *光明中医*, 2009, 24 (4): 787 - 788.

(编辑: 迟 越)

(下转第 48 页)

结 [J]. 云南中医中药杂志, 1999, 20 (6): 4-5.

河北中医, 1999. 21 (2) 增刊: 34-35.

[7] 林丽, 曹惠芬. 加味增液汤治疗消渴病 33 例 [J].

(编辑: 李 平)

### Professor Meng Ru's Academic Thought Studies

LIN Li<sup>1</sup>, ZHAN Qing<sup>2</sup>, CAO Hui-fen<sup>3</sup>

(1. Yunnan Traditional Chinese medicine college sets up as an attachment Chinese medicine hospital, Yunnan Kunming 65011, 2. Shanghai Tongji University Attached Tongji University Hospital, Shanghai 200065, 3. Yunnan Province Chinese medicine Research institute of traditional Chinese medicine, the Yunnan Kunming 650223)

[**ABSTRACT**] Professor Meng Ru explores unceasingly in near 50 year Clinical diagnosing and treating professions, strives for newly, by the rich experience, the unique clinical diagnosing and treating mentality and the method, manifested own academic thought and the style. has the achievement especially, with autoimmune diseases integrative of Chinese and Western medicine diagnosing and treating aspect. This article from six aspects to its academic thought's origin, the diagnosing and treating mentality and the experience characteristic to the analysis and the explain.

[**KEY WORDS**] Famous doctor experience; Academic thought; Meng Ru

(上接第 27 页)

### Effect of Xiaoyitang and Danazol on the Expression of VEGF and MVD in Ectopic Endometrial Tissue in Rats

GONG Shi-xiong, JIANG Hui-jun

(Wuhan Integrated TCM and Western Medicine Hospital, Wuhan Hubei 430022, China)

[**ABSTRACT**] Objective: To explore the effect of Xiaoyitang and danazol on the expression of VEGF and MVD in ectopic endometrial tissue in female rats with endometriosis. Methods: Wistar rats endometriosis models were established, successful endometriosis rats were divided into control group, XiaoYiTang group, danazol group, minimal combination group, medium combination group, large combination group. Ectopic endometrium grafts volume and histomorphology were observed, vesicular endothelial growth factor (VEGF) was observed in ectopic endometrium by immunohistochemistry (SABC technique). MVD was determined by immunostaining for CD31. Results: It was confirmed with pathology that the rat model was made successfully by autotransplantation of its own endometrium between the superficial and muscular layer of the abdominal wall. Ectopic endometrium grafts volume has no significant difference in six group before treatment ( $P > 0.05$ ). there was diminished significantly after treatment ( $P < 0.05$ ), which effects are dose-dependent. MVD and the level of VEGF in the ectopic endometrium was decreased significantly after treatment, which effects are dose-dependent. And ectopic endometrium grafts volume, or MVD, or the level of VEGF has no significant difference between danazol group and minimal combination group after treatment. Conclusion: XiaoYiTang can decrease the quantity the microvessel and the expression of protein VEGF in heterotopic endometrium of endometriosis rats. XiaoYiTang not only can improve the curative effect of danazol but also can reduce the dose of danazol when combining with danazol.

[**KEY WORDS**] XiaoYiTang; endometriosis; vesicular endothelial growth factor; microvessel density