基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.008

血管内皮生长因子及其可溶性受体 1 在多囊卵巢综合征患者血清和卵巢组织的表达

张家佳，赵纯全

（重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆 400016）

【摘 要】目的：研究多囊卵巢综合征（Polycystic ovary syndrome，PCOS）患者与正常对照组血液和卵巢组织中血管内皮细胞生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）及其可溶性受体 1（Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1，sFlt-1）表达水平，探讨其对 PCOS 发生和发展的影响。方法：应用酶联免疫吸附（Enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）法测定 46 例 PCOS 患者及 25 例对照者血清中 VEGF、sFlt-1 浓度。应用免疫组化 SP 法检测 9 例 PCOS 患者及 7 例对照患者卵巢组织 VEGF、sFlt-1 的表达。结果：(1)在血清中，PCOS 组的 VEGF、sFlt-1 浓度中位数分别 49.18 pg/ml、49.25 ng/L，对照组分别为 34.45 pg/ml、389.37 ng/L，两组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。(2)在卵巢组织中，PCOS 组的 VEGF、sFlt-1 灰度值表达分别为 0.24 ± 0.03、0.17 ± 0.04，对照组为 0.18 ± 0.02、0.26 ± 0.05，两组比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。(3)在血清和卵巢组织中，VEGF 生物利用度（VEGF/sFlt-1）均高于对照组，差异有统计学意义。(4)在血清中研究 VEGF 与 sFlt-1 相关性，两者为负性相关关系（$r_s=-0.435$，$P<0.05$）。结论：血清和卵巢组织中 sFlt-1 表达下降，可能引起了 VEGF 表达的增加，共同参与 PCOS 卵巢血管的形成，从而促进 PCOS 的发生和发展。

【关键词】多囊卵巢综合征；血管内皮生长因子；可溶性血管内皮生长因子受体

【中国图书分类法分类号】R711.75 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-05-29

Expressions of vascular endothelial growth factor and its soluble receptor 1 in ovarian tissues and serum of polycystic ovary syndrome

ZHANG Jia-jia, ZHAO Chun-quan

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor(VEGF) and its soluble receptor 1(sFlt-1) in ovarian tissues and serum of polycystic ovary syndrome (PCOS) and control group. *Methods*: Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to investigate the expressions of VEGF and sFlt-1 in the serum of 46 PCOS patients (experimental group) and 25 normal control subjects (control group). The levels of VEGF and sFlt-1 in ovarian tissues were detected by Sp immunohistochemical method (including 9 PCOS cases and 7 control cases). *Results*: 1. In serum, VEGF and sFlt-1 concentrations were 49.18 pg/ml and 49.25 ng/L respectively in PCOS group, and were 34.45 pg/ml and 389.37 ng/L respectively in the control group. There were significant differences in the two groups ($P<0.05$). 2. In ovarian tissues, VEGF and sFlt-1 expressions were 0.24 ± 0.03 and 0.17 ± 0.04 respectively in PCOS group, and were 0.18±0.02 and 0.26 ± 0.05 in control group.The differences were statistically significant($P<0.05$). 3. In serum and ovarian tissues, VEGF bioavailability (VEGF/sFlt-1) was higher than that in control group, and the differences were statistically significant. 4. Research in serum VEGF and sFlt-1 correlation found there was negative correlation($r_s=-0.435$, $P<0.05$). *Conclusion*: In serum and ovarian tissues, the decrease of sFlt-1 expression may increase the expression the VEGF, and they both may participate in the formation of ovarian blood vessels of PCOS, thus affecting the occurrence and development of the syndrome.

【Key words】polycystic ovary syndrome; vascular endothelial growth factor; soluble vascular endothelial growth factor receptor

多囊卵巢综合征（Polycystic ovary syndrome，PCOS）是一种发病多因性、临床表现呈多态性的内分泌综合征，是妇产科领域中最常见的内分泌疾病。以雄激素过多、排卵障碍以及多囊卵巢为主要特征[1]。发病率占育龄期妇女的 5%~10%，占无排卵性不孕患者的 70%~80%。PCOS 常引起月经失调、多毛、痤疮、肥胖、黑棘皮症、不孕等，远期并发症为 2 型糖尿病、心血管疾病及子宫内膜癌，严重威胁女性的健康和生活

作者介绍：张家佳（1985-），女，硕士，研究方向：妇科内分泌。

通信作者：赵纯全，男，副教授，Email：zcq113@yahoo.com.cn。

质量。目前，PCOS 的发病机制仍不确切，有研究认为，卵巢血管的生成与 PCOS 的发病机制密切相关[1]。本文旨在研究PCOS 患者血清和卵巢组织中血管内皮细胞生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）及其可溶性受体 1（Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1，sFlt-1）表达及其相关性，以期进一步探讨 PCOS 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象

PCOS 组选择 2009 年 6 月至 2010 年 12 在重庆医科大学附属第一医院妇科门诊就诊的 PCOS 患者 46 例，选择其中进行卵巢打孔术的患者 9 例。纳入标准为 2003 年欧洲人类生殖和胚胎与美国生殖医学会的鹿特丹专家会议推荐标准：①稀发排卵或无排卵；②高雄激素的临床表现和（或）高雄激素血症；③卵巢多囊性改变[B 超示一侧或双侧卵巢有 12 个以上直径 2~9 mm 的卵泡，和（或）卵巢体积大于 10 cm^3]，以上 3 条中符合 2 条。排除标准：①其他高雄激素疾病如先天性肾上腺皮质增生、库兴综合征、分泌雄激素的肿瘤等；②其他引起排卵障碍疾病如高催乳素血症、卵巢早衰或下丘脑性闭经及甲状腺功能异常；③原发性高血压、1 型糖尿病等血管异常性疾病。

对照组选择同期就诊的年龄相匹配，月经规律，临床及生化检查排除高雄激素和体重指数（Body mass index，BMI）≥25 的患者。因其他不孕原因（如：输卵管不通畅，男性不孕等）就诊的患者或输卵管卵巢囊肿的患者 25 例，其中因卵巢囊肿需行剥除术或一侧附件切除术的患者 7 例。两组均排除有内分泌疾病，心血管疾病病史的患者。

本研究得到重庆医科大学附属第一医院伦理委员会同意，所有参与者均自愿参与，并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 B 超检查 由我院妇科超声室专科医师操作。有性生活的选用阴道 B 超，无性生活的选用腹部 B 超。月经规律者于月经干净第 2~5 天（卵泡早期）进行 B 超检查，月经稀发或闭经者随时或孕酮撤退性出血后第 3~5 天进行检查。统计 2~9 mm 卵泡数目，测量卵巢的长、宽、厚，用简化公式 0.5 × 长 × 宽 × 厚，计算出卵巢体积（cm^3）。

1.2.2 内分泌激素的测定 由我院妇科检验室同一时间段（早晨 8~10 点之间）抽取静脉血，月经规则者于月经周期第 2~5 天，月经稀发或闭经者孕酮撤退性出血第 3~5 天空腹取血 5 ml，标本 2 000 r/min 离心 10 min，吸取上层血清，在-20℃冷冻管保存待测。血清催乳素（Prolactin，PRL）、促黄体生成激（Luteinizing hormone，LH）、卵泡刺激素（Follicle stimulating hormone，FSH）、雌二醇（Estradiol，E_2）、睾酮（Testosterone，T）测定采用自动化学免疫发光法，标本送至妇科实验室检测。血清 VEGF，sFlt-1 测定采用酶联免疫法（Enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒，由美国 Bio-Rad 公司提供，操作按照说明书进行。

1.2.3 卵巢组织 VEGF，sFlt-1 测定 手术时取适当的卵巢表面组织，置于 10%福尔马林溶液内固定，石蜡包埋制成蜡片，4 μm 连续切片备用。采用免疫组化 SP 方法测定 VEGF，sFlt-1 的表达，鼠抗人 VEGF 抗体，兔抗人 sFlt-1 抗体分别购自博士德公司、中杉公司，按说明书进行操作。VEGF，sFlt-1 的测定以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照。采用 Image-Pro Plus6.0 分析软件测定阳性区域的平均灰度值，测定 5 个区域的阳性细胞，以平均灰度值均值反映蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS11.0 统计软件进行分析，将 PCOS 组与对照组所测的年龄、MRI、FSH、LH、E_2、T、PRL、P、卵泡数目、卵泡直径等计量资料采用 t 检验，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示进行比较，对方差不齐的计量资料，采用 *Wilcoxon* 秩和检验，以中位数 M 值表示进行比较，采用 *Spearman* 进行相关性分析。以 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组临床一般资料分析

PCOS 组的年龄为（27±7.13）岁，对照组的年龄为（31.33±4.8）岁，差异无统计学意义。女性激素 6 项的结果显示，两组血清 PRL、FSH、E_2、P 值差异无统计学意义。PCOS 组血清 LH、T、LH/FSH 均明显高于对照组，B 超示卵泡体积亦明显增大，差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 2 组临床一般资料比较

一般资料	PCOS组（n=46）	对照组（n=25）	t/*Wilcoxon* 值	P值
年龄（岁）	27.00±7.13	31.33±4.80	-1.325	0.205
PRL（nmol/L）	9.00	14.00	82.500	0.095
FSH（U/L）	6.79±1.67	5.05±1.99	1.928	0.073
LH（U/L）	14.00	3.20	24.000	0.000
E_2（pmol/L）	62.00	31.50	42.000	0.256
P（ng/ml）	2.40	3.05	91.500	0.462
T（nmol/L）	0.84±0.38	0.28±0.15	4.290	0.001
LH/FSH	2.8	0.61	21.000	0.000
卵泡体积（cm^3）	13.24±2.13	5.98±1.36	2.540	0.006

2.2 2 组血清中 VEGF，sFlt-1 及 VEGF/sFlt-1 的表达

PCOS 组的 VEGF 表达水平明显高于对照组，sFlt-1 明显低于对照组，差异均有统计学意义，PCOS 组的 VEGF 生物利用度（VEGF/sFlt-1）较对照组升高，差异有统计学意义。见表 2。

表 2 2 组血清 VEGF、sFlt-1 比较

指标	PCOS组	对照组	Wilcoxon值	P值
VEGF（pg/ml）	49.18	34.45	586.00	0.000
sFlt-1（ng/L）	49.25	389.37	1 081.00	0.000
VEGF/sFlt-1	0.98	0.08	325.00	0.000

2组 VEGF、sFlt-1 的相关性分析，通过制作散点图及 *Spearman* 进行相关性分析，r_s=-0.435，P<0.01，认为 VEGF 与 sFlt-1 之间存在负相关关系。见图 1。

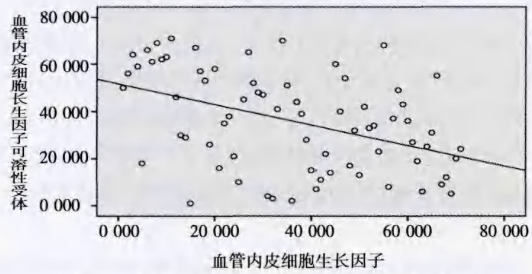
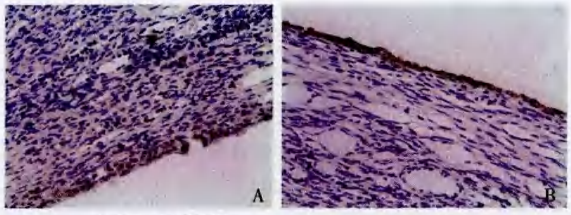


图 1 血清中 VEGF 与 sFlt-1 等级相关散点图

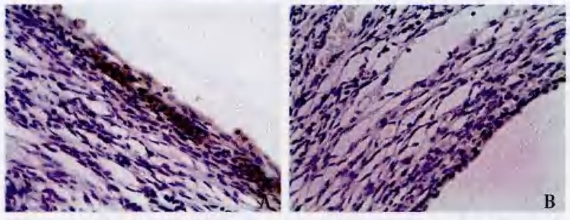
2.3 2 组卵巢组织中 VEGF、sFlt-1 及 VEGF/sFlt-1 的表达

2 组 VEGF 及 sFlt-1 主要是在卵巢颗粒细胞表达，PCOS 组的 VEGF 表达水平高于对照组，sFlt-1 低于对照组，差异均有统计学意义。PCOS 组的 VEGF 生物利用度（VEGF/sFlt-1）较对照组升高，差异有统计学意义。见图 2、图 3、表3。



A. VEGF 对照组　　B. VEGF 实验组

图 2 VEGF 在卵巢组织的表达(HE 染色 × 200)



A. sFlt-1 对照组　　B. sFlt-1 实验组

图 3 sFlt-1 在卵巢组织的表达(HE 染色 × 200)

表 3 2 组卵巢组织颗粒细胞 VEGF、sFlt-1 比较

灰度值	PCOS组	对照组	*t/Wilcoxon* 值	*P* 值
VEGF	0.24 ± 0.03	0.18 ± 0.02	4.441	0.001
sFlt-1	0.17 ± 0.04	0.26 ± 0.05	-3.982	0.001
VEGF/sFlt-1	1.38	0.80	28.000	0.000

3 讨 论

PCOS 是青春期和育龄期妇女发病率较高的疾病，且发病率有逐年增高的趋势。PCOS 的病理特点为双侧卵巢增大，为正常妇女的 2~5 倍，包膜增厚，呈灰白色，切面可见卵巢白膜均匀性增厚，其下可见许多直径<1 cm 的囊性卵泡。镜下见白膜增厚、硬化，皮质表层纤维化，细胞少，有明显的血管存在。研究表明[3]，PCOS 的显著特征为卵巢血管增生与扩张、血流丰富。是以卵巢间质及卵泡囊的血管增生引起的卵巢增大为主要特征，临床主要表现以卵巢多囊样变（Polycystic ovary，PCO）及高雄激素为主要特点[4]。

血管内皮生长因子属于血小板源性生长因子家族，在体内外都表现为特异性地促进血管内皮细胞的生长并诱导血管生成，提高血管通透性[5]。广泛分布在人体组织中，见于成年人肺、肾、肾上腺、心、肝及卵巢、子宫、胎盘等器官和组织中[6]。目前已知多种生长因子和细胞因子具有促进血管生成的作用，然而在众多的血管生成因子中，VEGF 是最有力的血管生成因子，它通过和血管内皮细胞的特异性受体结合，具有强大的促内皮增殖、促血管生成作用。VEGF 的作用是通过内皮细胞的酪氨酸激酶受体发挥，主要包括血管内皮细胞生长因子受体 1（Vascular endothelial growth factor receptor 1，Flt-1/VEGFR1）和血管内皮细胞生长因子受体 2（Vascular endothelial growth factor receptor 2，KDR/VEGFR2）。Flt-1 有 2 种形式，其中 sFlt-1 是一种被修饰的可溶性受体，能与配体结合阻止信号的传导。sFlt-1 通过诱导并结合游离的血管内皮细胞生长因子 A（Vascular endothelial growth factor A，VEGF-A），从而限制 VEGF 的血管生成作用[7]。有研究报道，sFlt-1 能作用于卵泡降低排卵率，扰乱配体和类固醇激素在卵巢的作用。

本实验研究证实 PCOS 组的 VEGF 无论是在血清还是在卵巢组织中均显著表达，在卵巢组织中主要在颗粒细胞胞浆表达，与对照组相比，差异具有统计学意义（P<0.05），表明该区域的血管生成增加，且在实验组中卵巢体积明显大于对照组，提示可能与 PCO 密切相关。sFlt-1 在 PCOS 组的血清和卵巢组织中均表达降低，与对照组相比，差异有统计学意义（P<0.05），在卵巢组织中也主要是在颗粒细胞层表达。VEGF 的生物利用度（VEGF/sFlt-1）在 PCOS 组的血清及卵巢组织中均升高，与对照组相比，差异具有统计学意义。研究 VEGF 与 sFlt-1 的相关性中，发现两者为负性相关关系，但并不是线性关系，根据相关文献报道，sFlt-1 可能一方面负性调节 VEGF，另一方面可能作用于类固醇激素，影响颗粒细胞层中雄激素的表达，间接性作用于雌激素。

因此从实验结果得出 VEGF 通过作用于卵巢颗粒细胞，增加血管的生成，引起 PCOS 患者 PCO 的发生，与其血管的生成密切相关。这与大多数国内外文献的报道相一致的，如 Agrawal、Van Blerkom 等的研究证明 VEGF 对血管的再生、卵泡血管化、卵泡内的氧化都发挥着重要作用，因此影响卵泡成熟卵母细胞质量、受孕及胚胎的生长发育[8,9]。sFlt-1 在PCOS 患者中的表达是降低的，但是与 VEGF 的升高无明显线性相关性，其有可能作为单一的因素影响着 PCOS 患者卵巢血管的形成及类固醇激素的表达。本文 VEGF 的表达与相关国内外的报道相一致，但是sFlt-1 的表达在国内外报道较少，可能存在选择性偏倚，但是从 VEGF 的表达来看，偏倚不大，期待大量的样本试验及更多的研究报道以进一步了解 sFlt-1 对 PCOS 发生及发展的影响。

基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.009

紫龙金逆转人膀胱癌细胞多药耐药研究

王祥卫，张远宁，李　杰，方针强，易善红，叶　钢
（第三军医大学第二附属医院泌尿外科，重庆　400037）

【摘　要】目的：研究中药紫龙金逆转人膀胱癌细胞多药耐药（Multidrug resistance，MDR）机理。方法：应用 MTT 法检测紫龙金的细胞杀伤作用，采用流式细胞仪检测细胞凋亡，RT-PCR 法检测 Bcl-2、Bax 基因 mRNA 水平表达。结果：BIU-87/ADM 细胞生存率为（98.00±1.48）%，加入紫龙金后（浓度分别为 200、500 μg/ml），其细胞生存率分别为（68.14±5.62）%、（52.36±1.87）%，差异显著（$P<0.01$）；流式细胞仪检测发现：经 200、500 μg/ml 的紫龙金处理后，BIU-87/ADM 细胞凋亡率［（17.32±2.35）%、（22.76±3.65）%］明显高于对照组（5.86±1.37）%，差异显著（$P<0.01$）；RT-PCR 结果显示，紫龙金可以下调 Bcl-2 基因的表达，可使 Bax 基因表达增强。结论：紫龙金可通过下调 Bcl-2 基因的表达，增强 Bax 基因表达诱导人膀胱癌多药耐药细胞凋亡。

【关键词】膀胱癌；多药耐药性；紫龙金；细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R737.14　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-07-28

Reversal of multi-drug resistance by Zilongjin in human bladder cancer cell line

WANG Xiang-wei, ZHANG Yuan-ning, LI Jie, FANG Zhen-qiang, YI Shan-hong, YE Gang
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the reversal of multi-drug resistance by Zilongjin in human bladder cancer cell line. *Methods*: The cytotoxicity of Zilongjin on human bladder cancer cell line BIU-87/ADM was studied by MTT assay. Apoptosis was detected by flow cytometry; expression of Bcl-2/Bax gene was studied by RT-PCR. *Results*: BIU-87/ADM cell survival rate was (98.00±1.48)%. After being treated with Zilongjin, cell survival rate was

作者介绍：王祥卫（1969-），男，副教授，博士，
研究方向：人泌尿系统肿瘤研究。
基金项目：重庆市卫生局中医药科技项目基金资助项目（编号：2009-2-60）。

综上所述，本文进一步证明了 VEGF 与 PCOS 的密切关系，同时表明 VEGF 的生物利用度是增加的，VEGF 的调节作用可能受 sFlt-1 的调节，sFlt-1 也可能直接影响 PCOS 的发生发展，但是通过什么方式影响 PCOS 的发生，则有待进一步的研究证实。

参　考　文　献

[1] Qiao J, Huai F L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: mpact on oocyte maturation and embryo developmental competence[J]. Human Reproduction Update, 2011, 17(1): 17-33.

[2] Bokal E V, Vrtovec H M, Klun I V, et al. Prolonged HCG action affects antigenic substances and improves follicular maturation, oocyte quality and fertilization competence in patients with polycystic ovarian syndrome[J]. Human Reproduction, 2005, 20(6): 1562-1568.

[3] Pan H A, Wu M H, Cheng Y C, et al. Quantification of doppler signal in polycystic ovary syndrome using three-dimensional power dppler ultrasonography: a possible new marker for diagnosis[J]. Human Reproduction, 2002, 17(1): 201-206.

[4] Paloal P G, Massimiliano M, Cristian M, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimu-lation[J]. Gynecological Endocrinology, 2006, 22(8): 465-470.

[5] Lee E J, Oh B, Lee J Y, et al. Association study between single nucleotide polymorphisms in the VEGF gene and polycystic ovary syndrome[J]. Fertility and Sterility, 2008, 89(6): 1751-1759.

[6] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of hysiological angiogenesis[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001, 280(6), 1358-1366.

[7] Holmes D, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: antigenic factors in health and disease[J]. Genome Biology, 2005, 6(2): 209.

[8] Agrawal R, Jacobs H, Panyne N, et al. Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulose cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries[J]. Fertility and Sterility, 2002, 78(6): 1164-1169.

[9] Blerkom J V, Antczak M, Schrander R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics[J]. Human Reproduction, 1997, 12(5): 1047-1055.

（责任编辑：关蕴良）