DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.048
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1351-03

论著

子宫内膜异位症患者异位子宫内膜 VEGF 表达的研究

郝 群[1],史常旭,汪 灏 (第三军医大学附属西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 研究子宫内膜异位症(EM)患者异位子宫内膜 VEGF 的表达及其在 EM 发病机制中的作用。方法 应用 ELISA 法检测有或无 EM 的妇女腹腔液中的血管内皮生长因子(VEGF)水平、采用免疫组织化学 S-P 法分别测定 VEGF 及其受体 KDR 在 EM 患者异位与在位内膜及对照组子宫内膜组织中的表达,并以抗第八因子相关抗原(F8-RA)抗体标记间质微血管并进行微血管计数(MVD)。结果 EM 患者腹腔液中 VEGF 水平明显高于对照组;VEGF 与其受体在内膜腺上皮细胞及部分血管内皮细胞上存在共同表达。结论 VEGF 参与了 EM 的发病机制,自分泌或旁分泌是 VEGF 促进血管生成的重要途径。

关键词:子宫内膜异位症;血管内皮生长因子,血管内皮生长因子受体;血管生成
中图法分类号:R392.11;R711.71 文献标识码:A

VEGF expression in ectopic endometrium of patients with endometriosis

HAO Qun, SHI Chang-xu, WANG Hao (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objectives** To study the expression of VEGF in ectopic endometrium (EM) of patients with endometriosis, and its role in the pathogenesis of endometriosis. **Methods** VEGF concentrations in peritoneal fluid of women with EM and without were measured with ELISA. Immunochemical method was used to determine the expression of VEGF and its receptor KDR in ectopic and eutopic endometrium from patients with EM and the endometrium of controls. Microvessel density (MVD) was evaluated by using anti factor Ⅷ-related antigen (F8—RA) antibody to mark stromal microvessels. **Results** VEGF concentrations in peritoneal fluid of women with EM were significantly higher than those without. There existed the co-expression of VEGF and its receptor KDR in the glandular epithelium and a portion of vascular endothelial cells. **Conclusion** VEGF is involved in the pathogenesis of EM in autocrine or paracrine to improve angiogenesis.

Key words: endometriosis; vascular endothelial growth factor; KDR; angiogenesis

子宫内膜异位症(Endometriosis, EM)是生育期妇女的常见疾病,其发病机制至今尚不完全清楚,近年研究显示血管生成可能参与了 EM 的发病[1,2]。血管生成是指在原有血管基础上以出芽方式生成毛细血管,已发现许多肽类生长因子能以自分泌和/或旁分泌的方式诱导血管生成,包括成纤维细胞生长因子(FGF)、白介素-8(IL-8)及血管内皮生长因子(VEGF)等。本实验通过研究 VEGF 在子宫内膜异位症患者异位子宫内膜中的表达,拟进一步探讨 EM 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 EM 组 1997年3月至1999年8月因卵巢型 EM 在第三军医大学三所附属医院行附件切除(部分同时行子宫切除)的患者25例,年龄23~48岁,术后病理检查均可见明确的异位内膜腺体及间质。分别取蜡块标本异位内膜25份(组1)和在位内膜13份(组2)。同时选用1999年6月至9月因腹痛或不孕症在我院妇产科行腹腔镜检查的妇女,年龄25~45岁,按1985年美国生育协会修正标准(R-AFS)分期均为内膜异位症Ⅰ-Ⅱ期,共14例,同时采集腹腔液及刮取子宫内膜(子宫内膜归入组2,故组2共有27例)。

1.1.2 对照组 收集同期在我院妇产科行腹腔镜检查的妇女,年龄25~45岁,术中证实为正常盆腔或轻度输卵管炎且无 EM 存在,共20例,同时采集腹腔液及刮取子宫内膜(子宫内膜归入组3)。本研究中所有患者均为月经周期规则,术前3个月无甾体类激素治疗病史。具体分组情况见表1。

表1 临床资料分组情况

Tab 1 Clinical data grouping

Group	Source of endometrium	*n*	Proliferative phase (*n*)	Secretory phase (*n*)
Ⅰ	Ectopic endometrium of ovarian EM	25	15	10
Ⅱ	Eutopic endometrium of EM	27	15	12
Ⅲ	endometrium of controls	20	7	13

1.2 方法

1.2.1 腹腔液采集 腹腔镜检查明确后,选择研究对象,在子宫直肠陷凹处吸取约3 ml腹腔液(血染者弃之),置于无菌离心试管中,以3 000 r/min离心10 min后吸取上清液,做好标记,储存于-30 ℃低温冰箱中备用。

1.2.2 内膜标本取材 腹腔镜检查明确后,在收集腹腔液的同时用小号刮匙刮取少许子宫内膜,10%甲醛液固定后乙醇脱水、石蜡包埋、制成3~5μm切片备检。

1.2.3 腹腔液 VEGF 含量测定 采用深圳晶美生物工程有限公司人 VEGF ELISA 试剂盒,由专人严格按照产品说明书操作,检测腹腔液中 VEGF 含量。

作者简介:郝 群(1973-),女,江苏省南京市人,硕士,医师,现在南京军区南京总医院工作,主要从事女性不孕症方面的研究,发表论文5篇。电话:(025)3609941

收稿日期:2000-12-28;修回日期:2001-08-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.4 内膜组织中 VEGF、KDR、F8-RA 测定 采用免疫组织化学 S-P 法测定。鼠抗人 VEGF 单抗、鼠抗人 F8-RA 单抗及超敏 S-P 试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司，兔抗人 KDR 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司，严格按照说明书方法染色。

1.2.5 图像分析 每张经 VEGF 免疫组化学染色后的标本，采用重庆大学 ICT 图像图形分析中心研制的 Tiger920 图像分析仪在腺上皮细胞表面随意取 3 个视野，取每个视野的光密度（光密度/面积）的平均值表示该切片腺上皮细胞 VEGF、ER 的含量。

1.2.6 KDR 表达评定 在显微镜下观察阳性细胞表现为胞膜或胞浆染成棕黄色。按细胞着色程度：浅黄色为弱阳性（+）；棕黄色为中度阳性（++）；棕褐色为强阳性（+++）；无染色反应者为（－）。

1.2.7 MVD 以抗 F8-RA 单抗标记微血管，在低倍镜视野中（10×）检查腺上皮细胞周围微血管密集区，然后在高倍视野（40×）下记数所有的微血管，选最大的 3 个数值的平均数作为 MVD。单个棕染内皮细胞或内皮细胞堆集无论有无管腔形成均参与计数，管腔较大且有较厚肌层或管腔内有 8 个以上红细胞不在计数之列。

1.2.8 统计学处理 实验数据采用 SPSS 软件进行统计学分析，计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两样本比较采用 t 检验、多样本比较采用方差分析。

2 结果

2.1 腹腔液中 VEGF 水平

EM 组（Ⅰ-Ⅱ期）与对照组相比腹腔液中 VEGF 浓度在增生期与分泌期差异均非常显著性（$P<0.01$），见表 2。

表 2 腹腔液中 VEGF 水平（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 VEGF level of peritoneal fluid（pg/ml，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Proliferative phase	Secretory phase
Endometriotic	14	77.6±25.9*	101.0±32.7*
Control	20	23.4±8.7	51.2±29.6

*：$P<0.01$ *vs* control

2.2 EM 患者异位与在位内膜及对照组子宫内膜 VEGF 的表达

无论在位与异位内膜，VEGF 蛋白主要局限存在于腺上皮细胞胞浆中，可在整个月经周期中检测到，同时也分散存在于周围间质细胞及血管内皮细胞胞浆中，见图 1。图像分析结果显示 3 组内膜腺上皮细胞 VEGF 含量均以分泌期内膜中含量最高。EM 患者的异位内膜、在位内膜比对照组子宫内膜要高，但三者无显著差异（$P>0.05$），见表 3。

表 3 EM 患者异位与在位内膜及对照组子宫内膜 VEGF 含量（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 VEGF content in ectopic and eutopic endometrium from patients with EM and the endometrium of control（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Proliferative phase	Secretory phase
Ⅰ	25	0.421±0.012*	0.423±0.099*
Ⅱ	27	0.375±0.084	0.412±0.092
Ⅲ	20	0.348±0.053	0.403±0.092

*：$P>0.05$ *vs* group Ⅱ and control



图 1 异位内膜 VEGF 蛋白表达阳性 主要为胞浆染色阳性 （S-P×400）

Fig 1 Positive expression of VEGF in ectopic endometrium mainly in cytoplasm （S-P×400）

2.3 EM 患者异位与在位内膜及对照组子宫内膜 KDR 的表达

KDR 主要表达于异位与在位内膜腺上皮细胞的胞膜与胞浆，持续存在于整个月经周期中，部分血管内皮细胞亦有阳性着色。阳性着色的血管内皮细胞大部分未形成明显管腔，而呈条梭状单细胞或多个细胞群（热点），此热点见于异位的腺上皮周围的间质中，而在位内膜间质中血管内皮细胞无明显着色。

2.4 EM 患者异位与在位内膜及对照组子宫内膜腺上皮细胞周围 MVD 及分布特点

F8-RA 存在于所有大小管径的血管内皮细胞胞浆内，EM 患者异位及在位内膜与对照组子宫内膜相比 MVD 无显著差异（$P>0.05$），见表 4。研究同时发现部分异位内膜腺上皮周围微血管较为密集，且管腔直径小，而在位子宫内膜间质内微血管分布均匀，无微血管密集现象，见图 2。

表 4 EM 患者异位与在位内膜及对照组子宫内膜中 MVD（$\bar{x}\pm s$）

Tab 4 MVD in ectopic and eutopic endometrium from patients with EM and the endometrium of control（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Proliferative phase	Secretory phase
Ⅰ	25	16.2±2.4*	19.7±4.3*
Ⅱ	27	15.9±2.5	17.9±2.1
Ⅲ	20	15.2±2.6	17.6±4.7

*：$P>0.05$ *vs* group Ⅱ and control

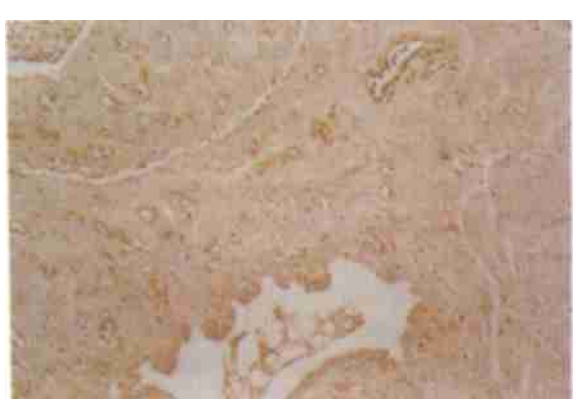


图 2 异位内膜腺体旁间质内微血管 F8-RA 免疫组化染色 （S-P×100）

Fig 2 Immunohistochemical staining of F8-RA in stromal microvessel of ectopic endometrium （S-P×100）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

VEGF 是一种特异地作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子, 与内皮细胞上的 KDR 和 Flt-1 受体高亲和力结合后可作为内皮细胞特异性有丝分裂原[3], 诱导内皮细胞增生、毛细血管袢形成; 同时还可增加微血管通透性[4], 通过诱导间质产生促进体内新血管的生成。本研究结果显示 EM 患者(Ⅰ-Ⅱ期)腹腔液中存在着 VEGF, 其含量在增生期与分泌期均较对照组明显升高; 图像分析显示 EM 患者的异位内膜、在位内膜的 VEGF 含量比对照组在位内膜要高, 但三者之间无显著差异($P>0.05$), 与 Donnez 等[5] 的研究结果相同。本实验中异位内膜均取自卵巢子宫内膜异位囊肿壁, 病程长(>1 年), 由于病灶纤维化的影响使局部血供不足, 且因病灶反复出血形成积血性囊肿, 囊壁异位腺上皮细胞长期受囊液压迫也可使间质血管减少, 种植物纤维化, 从而导致腺上皮细胞的 VEGF 表达有所下降; 而 EM 患者(Ⅰ-Ⅱ期)腹腔液大多取自盆腔内为红色内膜异位灶的腹腔液, 红色病灶为 EM 种植的最初阶段[5], 血管生成活性高有利于种植灶腹膜下血管网络增加, 从而有利于种植与生长, 故 VEGF 水平明显增高。由此推测, 异位内膜粘附以后, 高水平的 VEGF 可促进上皮下血管网的增生, 从而有利于腹腔逆流区域内膜的种植与生长。

VEGF 主要结合到 KDR 与 Flt-1 上, 这些受体主要表达于新生的毛细血管内皮细胞[6]。本实验中检测到异位与在位内膜腺上皮和部分血管内皮细胞同时表达 VEGF 与 KDR 提示自分泌或旁分泌是 VEGF 促进血管生成的重要途径, 也即异位内膜分泌的 VEGF 可以通过自分泌和旁分泌机制, 介导自身分化、迁移和浸润, 促进异位内膜种植部位血管生长发育和维持血管的通透性。

MVD 是衡量血管生成的定量指标, 本研究应用抗 F8-RA 抗体标记微血管并行显微镜下间质内微血管计数, 从而评估 3 组不同来源内膜的新生血管形成。实验结果表明虽然 EM 患者异位及在位内膜与对照组子宫内膜间质内 MVD 无显著性差异($P>0.05$), 但部分异位内膜腺上皮周围微血管较为密集, 且管腔直径小, 而在位子宫内膜间质内微血管分布较为均匀, 无微血管密集现象, 同时血管内皮细胞热点亦多见于异位的腺上皮周围的间质组织中, 而在位内膜间质中血管内皮细胞无明显着色提示部分异位内膜间质内新生血管增生明显, 可能该病例仍处于疾病的早期阶段, 血管生成较为旺盛, 从而异位病灶得以种植与生长。

以上实验结果提示进一步研究血管生成在 EM 的发生发展中的作用可为 EM 治疗方法的选择开辟新的思路。

参考文献:

[1] Oosterlynck D J, Menleman C, Sobis H, *et al*. Angiogenic activity of peritoneal fluid from women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 1993, 59(4): 778-782.

[2] Ramey J. Peritoneal fluid: Its relevance to the development of endometriosis [J]. Fertil Steril, 1993, 60(1): 1-14.

[3] Rosenstein J M, Mani N, Silverman W F, *et al*. Pattern of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration *in vitro* and *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 7 086-7 091.

[4] Bates D O, Curry F E. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca^{2+}-dependent pathway[J]. Am J Physiol, 1997, 273(2 Pt 2): H 687-694.

[5] Donnez J, Somes P, Gillerot S, *et al*. Vascular endothelial growth factor in endometriosis[J]. Hum Reprod, 1998, 13(6): 1 686-1 690.

[6] Connolly D T. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis[J]. J Clin Invest, 1994, 84(3): 213-217.

(编辑　陈聪连)

(上接 1350 页)

变化为输前 19×10^9/L, 输后为 78×10^9/L; 冰冻机采血小板输注后 Plt 计数变化不大, 可能与冰冻保存和融化所造成的血小板损伤有关。血小板输注后 Plt 计数仅能维持 1~3 d, 需每 2~4 d 输注机采血小板一个治疗单位以维持 Plt 计数及控制出血征象。患儿的 Hb 在移植后 35 d 前始终在 80 g/L 以下, 尽管输注洗涤红细胞后较输前升高明显, 平均升高 16.62 g/L, 但自身红细胞系统未正常生长, 虽输注 11 个单位的 O 型洗涤红细胞仍回升缓慢, 可能是患儿既往产生的血清凝集素不仅破坏供者血细胞, 也作用于红系祖细胞, 使红细胞系统不能正常生长, 导致血红蛋白回升缓慢。

此例为血型 A 与 B 之间的骨髓移植, 同时存在 ABO 主次侧均不合。由于受者体内存在着大量破坏供者红细胞的血清凝集素, 所以移植后的输血非常谨慎。虽然移植前受者经过处理, 大剂量的放疗和化疗破坏了其淋巴细胞产生血清凝集素的能力, 但受者已有的血清凝集素的半衰期约为 3 周[3]。因此在血型转变前应输不带 A、B 抗原的 O 型红细胞和不带与供受者血型抗原相对应凝集素的 AB 型机采血小板和血浆。同时加强输血前后的监测, 根据患者病情变化及血型改变的情况, 严格选用相应的血液制品, 以保证骨髓移植的顺利进行。

(此文承蒙本院肿瘤科孙贵银主任指导, 特此感谢!)

关键词: 骨髓移植; 输血

中图法分类号: R617　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Wernet D, Mayer G. Isoagglutinins after bone marrow transplantation with minor ABO-incompatebility[J]. Beitr Infusionsther, 1992, 30: 359-362.

[2] 吕　鹏, 主编. 最新输血技术学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 172.

[3] Wernet D, Mayer G. Isoagglutinins following ABO-incompatible bone marrow transplantation[J]. Vox Sang, 1992, 62(3): 176-179.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net