

◆实验研究◆

内异康复片对 EMT 大鼠 VEGF、MMP-9、HGF 及 Wnt4、Wnt5 α 的调控机制研究

黄映红, 徐晓娟, 秦旭华, 王张, 王秋香, 李宛静

成都中医药大学, 四川 成都 610075

[摘要] 目的: 分析内异康复片对子宫内位症 (EMT) 大鼠异位内膜黏附、浸润及增生的调控作用, 并探讨其作用机制。方法: 建立子宫内位症大鼠模型, 随机分为模型对照组、阳性对照组、中药低、中、高剂量组, 每组 10 只。治疗 3 周后, 测量各组大鼠异位内膜体积; 另取模型动物的异位内膜组织, 分离异位内膜细胞, 体外培养, 设空白对照组、阳性对照组、中药低剂量组、中药中剂量组、中药高剂量组, 每组 4 个复孔。采用 ELISA 法测定血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 (MMP)、肝细胞生长因子 (HGF) 含量; Western Blot 检测 Wnt4、Wnt5 α 的表达。结果: 动物实验结果: 与模型对照组比较, 中药各剂量组、阳性对照组的异位内膜体积显著缩小, 异位内膜厚度变薄, 腺体面积减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 中药高剂量组、阳性对照组的腺体数目显著少于模型对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 中药高剂量组 VEGF、MMP-9 含量显著低于模型对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。细胞实验结果: 中药低、中、高各剂量组培养上清液的 VEGF 含量显著低于空白对照组, 中药高剂量组 MMP-9 含量显著低于空白对照组, 中药高剂量组和阳性对照组 Wnt4、Wnt5 α 表达水平均显著低于空白对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 内异康复片治疗 EMT 的机理可能与抑制异位内膜细胞分泌 VEGF、MMP-9, 以及调节 Wnt 信号转导通路有关。

[关键词] 内异康复片; EMT 模型大鼠; 血管内皮生长因子 (VEGF); 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9); 肝细胞生长因子 (HGF); Wnt4; Wnt5 α ; 动物实验

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2016) 09-0217-05

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2016.09.097

Regulatory Mechanism Study of Neiyi Kangfu Tablet on VEGF, MMP-9, HGF, Wnt4 and Wnt5 α of Endometriosis Rats

HUANG Yinghong, XU Xiaojuan, QIN Xuhua, WANG Zhang, WANG Qiuxiang, LI Wanjing

Abstract: Objective: To analyze the regulatory function of Neiyi Kangfu tablet on adhesion, infiltration and proliferation of Ectopic endometrial in rats with endometriosis (EMT) and to discuss its mechanism. Methods: Established rat models with endometriosis, and divided them into model control group, positive control group, Chinese medicine (CM) low-dose, mid-dose, high-dose group, 10 cases in each group. After 3 week of treatment, endometriosis volume of rats in every group was measured. In addition, took endometriosis tissue and separated endometriosis cell, then cultured in vitro, divided into blank control group, positive control group, CM low-dose, mid-dose, high-dose group. Detected levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinase (MMP) and hepatocyte growth factor (HGF) by ELISA method, detected expression of Wnt4 and Wnt5 α by Western Blot. Results: Comparing with model control group, endometriosis volume of CM every dose group and positive control group was decreased obviously, endometriosis thickness was thinned, gland area was reduced, the differences being significant ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Gland numbers in CM high-dose group and positive control group were lower than that in model control group, the difference being significant ($P < 0.05$). Levels of VEGF

[收稿日期] 2016-04-05

[基金项目] 四川省中医药管理局应用基础研究项目 (2012-F-020); 四川省科技厅基础研究计划项目 (2013JY0184)

[作者简介] 黄映红 (1972-), 女, 副教授, 研究方向: 中西医结合基础研究。

[通讯作者] 徐晓娟, E-mail: 847956379@qq.com。

and MMP-9 in CM high-dose group were lower than those in model-dose group, the differences being significant ($P < 0.05$). The levels of VEGF in culture supernatant of CM low-dose, mid-dose, high-dose group were all lower than those in blank control group, the level of MMP-9 in CM high-dose group was lower than that in blank control group, expression levels of Wnt4 and Wnt5 α were all lower than those in blank control group, the differences being significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion: The mechanism of Neiyi Kangfu tablet for EMT can be related to inhibit endometriosis cell to secrete VEGF and MMP-9 and regulate Wnt signal transduction pathway.

Keywords: Neiyi Kangfu tablet; Endometriosis model; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Matrix metalloproteinase (MMP); Hepatocyte growth factor (HGF); Wnt4; Wnt5 α ; Animal experiment; Rats

子宫内膜异位症 (Endometriosis, EMT) 属于传统中医学痛经、月经不调、癥瘕及不孕症等范畴, 其发病机理是具有生长功能的子宫内膜组织在子宫内膜以外的部位生长、浸润、出血, 形成结节及包块, 从而引起女性下腹部疼痛, 甚至不孕^[1]。该病常见于育龄女性, 发病率为 10%~15%, 且逐年上升^[2~3], 为妇科难治性疾病之一。内异康复片是四川省中医院妇科数十年来治疗 EMT 的特色院内制剂, 是疗效明确的临床验方。课题组前期研究表明^[4~7], 该药可降低 EMT 模型动物血液黏度, 改善微循环, 促进异位内膜萎缩, 抑制其血管生成等。本文以课题组前期研究为基础, 对内异康复片治疗 EMT 的分子机制进行深入探讨。

1 材料与方法

1.1 实验药物和试剂 内异康复片由半枝莲、大血藤、熟地黄、桃仁、三棱、莪术、薏苡仁、土鳖虫、鳖甲等中药组成, 0.3 g/片, 由四川省中医院生产, 批号: 20120403; 来曲唑片, 每片 2.5 mg, 由江苏恒瑞医药股份有限公司生产, 批号: 2012-03-20。在进行离体实验时, 取内异康复片于乳钵内捣碎, 置锥形瓶中, 加 DMEM 培养液 (比例为 0.1 g/mL), 超声振荡助溶 2 h, 于 4℃ 密闭浸泡 72 h 后, 取上清液, 0.22 μ m 微孔滤器过滤, 得内异康复片贮存液, 备用, 实验时用 DMEM 培养液稀释至所需浓度; 来曲唑片用 DMEM 培养液溶解, 0.22 μ m 微孔滤器过滤后使用。DMEM 培养基 (批号: NXE0631, 赛默飞世尔生物化学制品 (北京) 有限公司); 无支原体胎牛血清 (批号: 111020, 浙江天杭生物科学有限公司); Rat-VEGF Elisa Kit、Rat-MMP-9 Elisa Kit (批号分别为: 13051201、13051203, 美国 R&D 公司进口分装); Rat-HGF Elisa Kit (批号: RT130371, 美国 ADL 公司进口分装); wnt4、wnt5 α 抗体 (批号: MAB1501, Santa Cruz 公司); 二抗 (批号: A5420, sigma 公司)。

1.2 实验动物分组、造模、给药及检测 SD 大鼠, SPF 级, 雌性, 体重 200~250 g, 成都中医药大学实验动物中心提供, 合格证号: SCXK(川)2013-24。雌性 SD 大鼠 50 只随机分为模型对照组, 阳性对照组, 中药高、中、低 3 个剂量组, 每组 10 只。适应性饲养 2 周, 监测大鼠动情周期, 参考文献方法^[8], 在动情期行手术异位移植子宫内膜, 建立大鼠 EMT 模

型。造模术后第 21 d 给药, 中药高、中、低剂量组分别给予内异康复片 1.512 g/kg (相当于成人剂量的 14 倍)、0.756 g/kg (相当于成人剂量的 7 倍)、0.378 g/kg (相当于成人剂量的 3.5 倍) 灌胃, 阳性对照组给予来曲唑片 0.35 mg/kg (相当于成人剂量的 7 倍) 灌胃, 每天 1 次, 连续 21 d, 模型对照组给予等体积生理盐水灌胃。末次给药后 24 h 眼眶取血, 离心分离血清, 采用 ELISA 法测定血清中 VEGF、MMP-9、HGF 含量。处死动物后分离其腹腔内的异位内膜组织, 用两脚规测量异位内膜的体积长 (mm) \times 宽 (mm) \times 高 (mm)^[9]。并取异位内膜组织制备病理切片, 行 HE 染色, 观察各组大鼠异位内膜形态学差异, 检测异位内膜腺体数量、腺体面积。实验中个别大鼠由于手术感染死亡, 其中模型对照组死亡 2 只, 阳性对照组死亡 1 只, 中药高剂量组死亡 2 只。

1.3 异位内膜细胞的培养及指标的检测 EMT 大鼠模型造模方法同 1.2, 造模第 21 天, 无菌条件下取出异位内膜组织, 此时异位内膜成囊泡状, 囊泡内可见淡黄色透明积液者为造模成功的异位内膜组织。参考文献^[10]方法, 分离细胞并接种培养。分为空白对照组、阳性对照组, 中药高、中、低剂量组, 每组设 4 个复孔。阳性对照组加入终浓度为 5×10^{-5} mg/mL 的来曲唑水提液, 中药高、中、低剂量组分别加入终浓度为 50 mg/mL、25 mg/mL、12.5 mg/mL 的内异康复片水提液, 空白对照组用等体积 DMEM 培养液代替受试药物, 孵育 48 h 后, 收集培养上清液, 用 ELISA 法检测 VEGF、MMP-9、HGF 含量。0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, 反复冻融裂解细胞, 取细胞裂解液行 Western Blotting 检测, 测定异位内膜组织细胞内 Wnt4、Wnt5 α 表达水平。Western Blot 结果用 Biorad 公司的 Quantity One 软件分析, 计算目的条带的相对灰度值, 即目的蛋白的免疫印迹灰度与内参 β -actin 蛋白的灰度的比值, 以表示目的蛋白的相对表达量, 单位为 DPI (dots per inch)。

1.4 统计学方法 HE 染色及 Western Blotting 结果用 SPSS17.0 进行统计分析; ELISA 实验结果数据用《中国医学百科全书·医学统计学》统计软件包 PEMS3.1 进行统计分析。

2 结果

2.1 各组大鼠异位内膜体积及内膜厚度比较 见表 1 和图 1。

与模型对照组比较, 中药各剂量组、阳性对照组的异位内膜体积显著缩小, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。中药各剂量组、阳性对照组的异位内膜厚度均显著小于模型对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。图1主要说明各组移植物的结构和生长情况, 各组移植灶结构完整, 由外向内依次为内膜层、肌层和浆膜层, 提示建模成功。图1-A中箭头所指可见模型对照组异位内膜上皮细胞呈长柱状或假复层上皮细胞, 间质较薄。图1-B~E中箭头所指可见阳性对照组及中药低、中、高剂量组异位内膜不同程度地萎缩变薄, 异位内膜上皮细胞呈扁平状。

表1 各组大鼠异位内膜体积及厚度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(只)	异位内膜体积(mm ³)	异位内膜厚度(um)
模型对照组	8	19.69 ± 1.60	23.88 ± 5.30
阳性对照组	9	6.89 ± 1.6 ^②	6.00 ± 1.58 ^①
中药低剂量组	10	15.50 ± 1.06 ^①	9.40 ± 1.80 ^①
中药中剂量组	10	12.01 ± 0.89 ^①	6.10 ± 1.80 ^①
中药高剂量组	8	8.00 ± 1.60 ^②	4.63 ± 1.32 ^①

与模型对照组比较, ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$

2.2 各组大鼠异位内膜腺体数目、腺体面积比较 见表2和图2。中药高剂量组、阳性对照组腺体数目显著少于模型对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 中药各剂量组、阳性对照组的腺体面积均显著小于模型对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。图2表明各组大鼠移植灶内腺体分布的情况。图2-A显示模型对照组异位内膜内有腺体分布, 图中箭头所指可见腺上皮层较厚, 上皮细胞为柱状; 图2-B~E图中箭头所指可见, 跟模型对照组比较, 阳性对照组及中药低、中、高剂量组异位内膜中腺体数量显著减少、腺体面积明显缩小, 腺上皮层变薄。

表2 各组大鼠异位内膜腺体数目、腺体面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数(只)	腺体数目(个)	腺体面积(mm ²)
模型对照组	8	12.50 ± 5.80	4.17 ± 1.03
阳性对照组	9	3.44 ± 2.60 ^①	0.96 ± 0.47 ^①
中药低剂量组	10	10.50 ± 4.48	2.96 ± 1.09 ^①
中药中剂量组	10	9.40 ± 6.31	1.43 ± 0.31 ^①
中药高剂量组	8	4.50 ± 2.56 ^①	1.20 ± 0.60 ^①

与模型对照组比较, ① $P < 0.05$

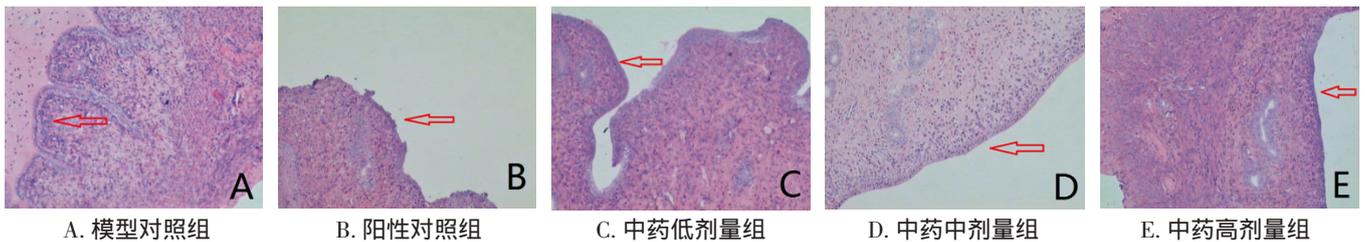


图1 各组大鼠异位内膜病理切片 (HE 染色, 100×)

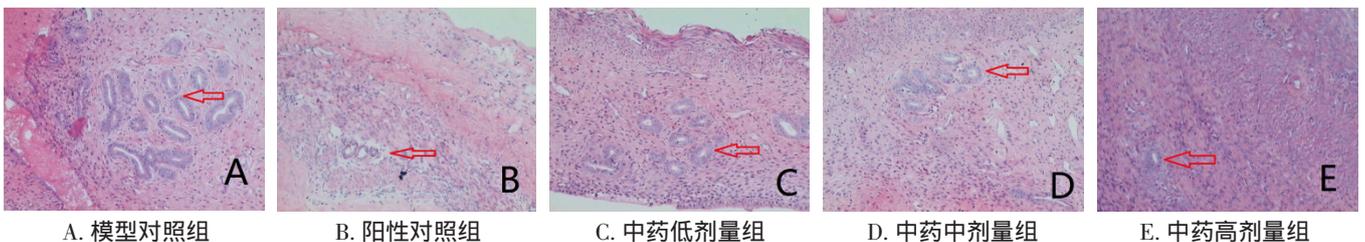


图2 各组大鼠异位内膜腺体病理切片 (HE 染色, 100×)

2.3 各组大鼠血清中 VEGF、MMP-9、HGF 含量比较 见表3。中药高剂量组 VEGF、MMP-9 含量显著低于模型对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠异位内膜细胞分泌 VEGF、MMP-9、HGF 含量比较 见表4。中药低、中、高各剂量组培养上清液的 VEGF 含量显著低于空白对照组; 中药高剂量组 MMP-9 含量显著低于空白对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠异位内膜细胞中 Wnt4、Wnt5α 表达水平比较 见图3、图4、表5。中药高剂量组和阳性对照组 Wnt4、Wnt5α 表达水平均显著低于空白对照组, 差异均有统计学意

义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表3 各组大鼠血清中 VEGF、MMP-9、HGF 含量比较($\bar{x} \pm s$) ng/L

组别	样本数(只)	VEGF	MMP-9	HGF
模型对照组	8	207.58 ± 31.61	33.33 ± 8.01	65.32 ± 22.70
阳性对照组	9	175.13 ± 30.57	25.98 ± 9.94	61.08 ± 21.12
中药低剂量组	10	170.47 ± 30.91	25.88 ± 8.95	60.18 ± 20.02
中药中剂量组	10	168.05 ± 33.02	22.80 ± 7.16	59.48 ± 21.14
中药高剂量组	8	150.31 ± 15.39 ^①	18.27 ± 4.96 ^①	59.93 ± 19.97

与模型对照组比较, ① $P < 0.05$

表 4 各组大鼠异位内膜细胞分泌 VEGF、MMP-9、HGF 含量比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	VEGF	MMP-9	HGF
空白对照组	129.25± 19.02	26.67± 7.52	28.65± 9.45
阳性对照组	105.13± 23.89	19.31± 6.10	26.08± 9.54
中药低剂量组	97.13± 14.77 ^①	20.88± 4.69	25.18± 6.80
中药中剂量组	91.38± 28.26 ^①	17.80± 6.07	21.15± 9.43
中药高剂量组	83.48± 24.07 ^②	13.43± 6.96 ^①	18.27± 6.46

与空白对照组比较, ①P < 0.05, ②P < 0.01

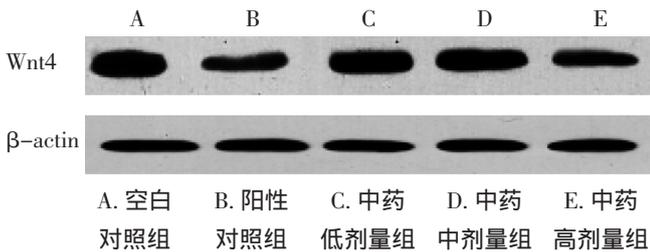


图 3 各组大鼠异位内膜细胞中 Wnt4 表达水平比较

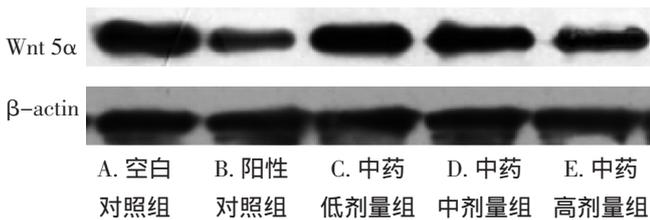


图 4 各组大鼠异位内膜细胞中 Wnt5α 表达水平比较

表 5 各组大鼠异位内膜细胞 Wnt4、Wnt5α 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	Wnt 4(DPI)	Wnt 5α (DPI)
空白对照组	1.00± 0.12	1.00± 0.19
阳性对照组	0.27± 0.06 ^②	0.21± 0.07 ^②
中药低剂量组	0.89± 0.14	0.92± 0.10
中药中剂量组	0.74± 0.08	0.79± 0.12
中药高剂量组	0.43± 0.05 ^①	0.46± 0.11 ^①

与空白对照组比较, ①P < 0.05, ②P < 0.01

4 讨论

内异康复片中半枝莲清热解毒, 大血藤活血通络^[11-12]; 桃仁活血祛瘀; 薏苡仁健脾渗湿; 土鳖虫、鳖甲破血祛瘀; 三棱、莪术破血行气, 全方具有清湿化痰, 行气止痛, 消癥散结之效。临床应用该方治疗子宫内膜异位症取得了较好疗效, 但对该方的作用机制尚需深入研究。Wnt/β-catenin 信号通路在介导雌激素促进异位内膜细胞黏附、侵袭和血管生成过程中可能起着关键的作用^[13-14]。该信号通路下游分子 VEGF 和 MMP 与 EMT 病变区微血管密度增高、异位内膜种植及生长

关系密切, 且 VEGF 与 MMP 的表达呈正相关^[15]。VEGF 是目前公认的最重要的促血管生成因子^[16], VEGF 的高表达可能是决定异位内膜成功种植及生长的因素之一^[17]。MMPs 是参与基质降解最重要的酶类, MMPs 可降解细胞外基质和基膜, 诱导血管生成^[18-19]。此外, HGF 具有诱发上皮细胞迁移、侵袭以及诱发血管生成的多重功能^[20-21], 临床研究发现, 内异症患者血清中、腹腔液中 HGF 浓度均升高^[22-24]。由此可见, Wnt 信号分子在异位内膜细胞的特征性表达以及 HGF 等生长因子的大量分泌在 EMT 的发生发展过程中发挥着极为重要的作用。

本研究结果表明内异康复片能使异位内膜变薄、甚至萎缩, 并可减少异位内膜内腺体数目、缩小腺体面积。内异康复片的上述作用与药物剂量呈正相关, 提示临床治疗 EMT 可使用较大剂量的内异康复片。Wnt4、Wnt5α 在异位内膜细胞特征性表达, 血清和异位内膜细胞上清液中 VEGF、MMP-9 含量明显增加, 说明 Wnt 信号通路可能参与了内膜细胞异位黏附-浸润性生长-血管生成的病理过程。内异康复片能下调 EMT 细胞中 Wnt4、Wnt5α 的表达水平, 同时抑制异位内膜细胞分泌 VEGF、MMP-9, 并降低 EMT 大鼠血清中 VEGF、MMP-9 含量, 提示内异康复片可能通过阻断 Wnt 信号通路以抑制异位内膜细胞分泌 VEGF、MMP-9, 从而防止异位子宫内膜的黏附、侵袭和血管生长。本研究探讨了内异康复片的作用机制, 为更好指导临床用药提供了重要的实验依据。

【参考文献】

- [1] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症的诊断与治疗规范[J]. 中华妇产科杂志, 2007, 42(9): 645-648.
- [2] 郎景和. 关于子宫内膜异位症的再认识及其意义[J]. 中国工程科学, 2009, 11(10): 137-142.
- [3] 苏庆华, 张建伟. 子宫内膜异位症中医外治法研究进展[J]. 广西中医药大学学报, 2013, 6(1): 79-80.
- [4] 徐晓娟. 化瘀止痛片对血瘀模型大鼠血液流变学和小鼠微循环的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(4): 36-39.
- [5] 徐晓娟. 化瘀止痛片治疗子宫内膜异位症的临床观察[J]. 成都中医药大学学报, 2004, 27(2): 1-3.
- [6] 魏绍斌, 王妍, 李白雪. 内异康复片对子宫内膜异位症异位和在位内膜血管形成相关因子的实验研究[J]. 环球中医药, 2010, 3(5): 331-335.
- [7] 徐晓娟, 秦旭华, 王婧婧, 等. 内异康复片对 EM 大鼠血清及异位内膜细胞中 ARO、COX-2、E₂ 水平的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(5): 596-598.
- [8] 张婷婷, 秦保锋, 曹阳, 等. 中药红藤方对大鼠的异位

- 子宫内膜芳香化酶表达的影响[J]. 生殖与避孕, 2008, 28(7): 385- 390.
- [9] Halme J, White C, Kauma S, et al. Peritoneal macrophages from patients with endometriosis release growth factor activity in vitro [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1988, 66(5): 1044- 1046.
- [10] Ryan IP, Schriock ED, Taylor RN. Isolation, characterization, and comparison of human endometrial and endometriosis cells in vitro[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78(3): 642- 649.
- [11] 毛水春, 顾谦群, 崔承彬, 等. 中药大血藤中酚类化学成分及其抗肿瘤活性[J]. 中国药物化学杂志, 2004, 14(6): 326- 331.
- [12] 鲍思伟, 金则新, 陈菜明. 天台山不同生境大血藤蛋白质、可溶性糖和脂肪含量的变化[J]. 西南民族学院学报: 自然科学版, 2003, 29(1): 103- 104.
- [13] 郑婷婷, 刘义, 于岚, 等. 靶向 siRNA 阻断 Wnt/ β -catenin 信号通路对子宫内膜异位症裸鼠模型异位子宫内膜 VEGF 和 MMP-9 表达的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2011, 40(1): 22- 27.
- [14] 李艳, 郎景和. 基质金属蛋白酶 9 及其组织抑制剂 1 在子宫内膜异位症组织中的表达[J]. 中华妇产科杂志, 2006, 41(1): 30- 34.
- [15] 张婧, 唐良菖, 周敏, 等. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子、基质金属蛋白酶与血管内皮生长因子在子宫内膜异位症中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1278- 1281.
- [16] Barcz E, Ploski R, Malejczyk J, et al. An inverse association with vascular endothelial growth factor concentration [J]. Fertil Steril, 2012, 97(6): 1380- 1386.
- [17] 董倩, 邱晓红. 血管生成及抗血管生成与子宫内膜异位症关系研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(3): 235- 237.
- [18] Rothenberg ML, Nelson AR, Hande KR. New drugs on the horizon: matrix metalloproteinase inhibitors [J]. Stem Cells, 1999, 17(4): 237- 240.
- [19] 王喜梅, 孙雷, 郑仁恕, 等. 应用组织微阵列技术研究 MMP-9 与 TIMP-1 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及临床意义[J]. 肿瘤防治研究, 2005, 32(8): 484- 486.
- [20] 辛华, 韩振国. 肝细胞生长因子对肺癌细胞血管外游走的影响[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2002, 28(4): 360- 362.
- [21] 何新斌, 王杰军. 肿瘤患者体液中血管生长因子的临床意义[J]. 国外医学: 肿瘤学分册, 2001, 28(1): 7- 11.
- [22] Zong LL, Li YL, Ha XQ. Determination of HGF concentration in serum and peritoneal fluid in women with endometriosis [J]. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(8): 757- 760.
- [23] Matsunaga T, Gohda E, Takebe T, et al. Expression of hepatocyte growth factor is up-regulated through activation of a cAMP-mediated Pathway [J]. J Exp Cell Res, 1994, 210: 326- 335.
- [24] Gohda E, Matsunaga T, Kataoka H, et al. Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor[J]. Cytokine, 1994, 6(6): 633- 640.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)