

· 基础研究 ·

补肾温阳化瘀方对子宫内膜异位症肾阳虚血瘀证模型大鼠 HIF-1 α 、PHD2、VHL 表达的影响

贾云波¹ 杜惠兰^{1,2} 高 星¹ 边文会³ 林晓华³ 班光国¹ 田茜华¹

摘要 **目的** 观察补肾温阳化瘀方对子宫内膜异位症(endometriosis, EM)肾阳虚血瘀证模型大鼠缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 α)、脯氨酸羟化酶 2(proline hydroxylase2, PHD2)、希佩尔-林道抑癌基因(von Hippel Lindau disease, VHL)表达的影响,探讨 EM 发病机制及补肾温阳化瘀方治疗 EM 的作用机制。**方法** 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常组、假手术组、模型组、中药组、西药组,每组 10 只。其中正常组、假手术组常规饲养,模型组、中药组、西药组采用“延长冰箱冷冻加冰水浸泡”30 天,再结合“自体移植法”创建 EM 肾阳虚血瘀证模型。术后中药组给予补肾温阳化瘀方(3.33 g/mL)1 mL 灌胃,西药组予以孕三烯酮 0.5 mg/(kg·d)灌胃,模型组、正常组、假手术组灌服等体积的生理盐水,共给药 4 周。观察大鼠异位灶大小及形态,放免法检测血清 CA125、血浆环磷酸腺苷(cAMP)、血浆环磷酸鸟苷(cGMP)的表达,HE 染色光镜观察子宫在位内膜及异位组织形态学的变化,免疫组化 SABC 法、Western blot 法检测 HIF-1 α 、PHD2、VHL 蛋白表达及含量,RT-PCR 方法检测 HIF-1 α 、PHD2、VHL mRNA 表达。**结果** 模型组大鼠异位灶生长明显,中药组、西药组治疗后,异位灶体积明显缩小。与正常组及假手术组比较,模型组 CA125 及 cGMP 水平明显升高,cAMP 水平明显降低($P < 0.05$); HIF-1 α mRNA、蛋白表达及含量均升高($P < 0.05$),PHD2、VHL mRNA、蛋白表达及含量均降低($P < 0.05$)。与模型组比较,中药组及西药组 CA125 及 cGMP 水平明显降低,cAMP 水平明显升高,HIF-1 α mRNA、蛋白表达及含量均降低,PHD2、VHL mRNA、蛋白表达及含量均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与中药组比较,西药组 PHD2 蛋白含量更高($P < 0.05$)。HIF-1 α 与 PHD2 呈负相关($r = -0.799, P = 0.00$),HIF-1 α 与 VHL 呈负相关($r = -0.625, P = 0.003$)。**结论** 补肾温阳化瘀方可有效治疗 EM,其作用机制可能与降低 HIF-1 α 、CA125、cGMP 含量,上调 PHD2、VHL、cAMP 表达有关。

关键词 子宫内膜异位症;肾阳虚血瘀证;缺氧诱导因子-1 α ;脯氨酸羟化酶 2;希佩尔-林道抑癌基因;补肾温阳化瘀方

Effects of Bushen Wenyang Huayu Recipe on Expressions of HIF-1 α , PHD2, and VHL in Endometriosis Rats with Shen Yang Deficiency Blood Stasis Syndrome JIA Yun-bo¹, DU Hui-lan^{1,2}, GAO Xing¹, BIAN Wen-hui³, LIN Xiao-hua³, BAN Guang-guo¹, and TIAN Qian-hua¹ 1 Graduate College, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017); 2 Department of Gynecology, Hebei College of Chinese Medicine; Cooperative Innovation Center for Integrative Medical Genital Disease, Shijiazhuang (050091); 3 Department of Gynecology, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang (050011)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Bushen Wenyang Huayu Recipe (BWHR) on hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), proline hydroxylase2 (PHD2), von Hippel Lindau disease (VHL) suppressor gene expressions in endometriosis (EM) rats with Shen yang deficiency blood stasis syndrome

基金项目:河北省科技厅课题资助项目(No. 132777155)

作者单位:1.河北医科大学研究生学院(石家庄 050017);2.河北中医学院妇科教研室 中西医结合生殖疾病协同创新中心(石家庄 050091);3.河北省中医院妇科(石家庄 050011)

通讯作者:杜惠兰, Tel:0311-89926291, E-mail:duhuilan@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.10.1210

(SYDBSS), and to explore the pathogenesis of EM and the mechanism of BWHR for treating EM. Methods Totally 50 SD rats were randomly divided into five groups, i.e., the blank control group, the sham-operation group, the model group, the Chinese medicine (CM) group, and the Western medicine (WM) group, 10 in each group. Rats in the blank control group and the sham-operation group were fed routinely. Rats in the rest 3 groups received 30-day "extended refrigerator freezing and ice water immersion" and combined with "autotransplantation" to establish EM rat model with SYDBSS. One Milliliter BWHR at 3.33 g/mL was administered to rats in the CM group by gastrogavage. Gestrinone at the daily dose of 0.5 mg/kg was administered to rats in the WM group by gastrogavage. Equal volume of normal saline was administered to rats in the model group, the blank control group, and the sham-operation group. The size and morphology of ectopic foci in rats were observed after 4 weeks of medication. Expressions of serum CA125, plasma cyclic adenosine monophosphate (cAMP), and plasma cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were detected by radioimmunoassay. Morphological changes of eutopic endometrium and ectopic tissue were observed under the optical microscope by HE staining. Protein expressions and contents of HIF-1 α , PHD2, and VHL were detected by immunohistochemical SABC method and Western blot. mRNA expressions of HIF-1 α , PHD2, and VHL were detected by RT-PCR. Results The ectopic foci grew significantly in the model group. Their volumes were obviously contracted after treated by CM and WM. Compared with the blank control group and the sham-operation group, serum CA125 and plasma cGMP obviously increased, cAMP obviously decreased ($P < 0.05$); expressions and contents of HIF-1 α mRNA and protein all decreased ($P < 0.05$); mRNA and protein expressions and contents of PHD2 and VHL all decreased in the model group ($P < 0.05$). Compared with model group, levels of CA125 and cGMP obviously decreased; cAMP levels obviously increased, expressions and contents of HIF-1 α mRNA and protein all increased, mRNA and protein expressions and contents of PHD2 and VHL all increased in the WM group and the CM group ($P < 0.05$). Compared with the CM group, PHD2 protein contents were higher in the WM group ($P < 0.05$). HIF-1 α was negatively correlated with PHD2 ($r = -0.799, P = 0.00$). HIF-1 α was negatively correlated with VHL ($r = -0.625, P = 0.003$). Conclusions BWHR could effectively treat EM. Its mechanism might be associated with reducing contents of HIF-1 α , serum CA125, and plasma cGMP, and up-regulating expressions of PHD2, VHL, and cAMP.

KEYWORDS endometriosis; Shen yang deficiency blood stasis syndrome; hypoxia inducible factor-1 α ; proline hydroxylase2; von Hippel Lindau Disease; Bushen Wenyang Huayu Recipe

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)指具有生长功能的子宫内膜组织于子宫腔外部生长的疾病,有易复发、浸润、转移等临床特性,易发生恶变,目前EM的发病机制尚不明确。笔者前期的临床研究表明,EM发病与缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达异常升高有关^[1]。近期研究发现,HIF-1 α 有希佩尔林道抑癌基因(von Hippel Lindau disease, VHL)调控途径^[2],脯氨酸羟化酶(proline hydroxylase2, PHD2)在调控HIF-1 α 中也有重要作用^[3];癌抗原125(cancer antigen 125, CA125)也是EM的特异性指标。课题组多年临床研究发现,本病患者病程较长,“久病及肾”,易致肾虚,且结合患者临床表现,当属虚寒,肾阳虚血瘀是本病发生发展的主要病理基础。前期的临床及动物实验证实补肾温阳化瘀方治疗EM疗效确定。同时环磷酸

鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是代表肾虚证的两个重要指标^[4]。为进一步明确EM与乏氧关系及补肾温阳化瘀方治疗的作用机制,本研究在前期研究及预实验的基础上,建立EM肾阳虚血瘀证大鼠模型,观察补肾温阳化瘀方对模型大鼠子宫在位内膜和异位灶组织中HIF-1 α 、PHD2、VHL表达及血清CA125、cGMP、cAMP的影响,探讨补肾温阳化瘀方的作用机制,为临床治疗提供实验依据。

材料与方法

1 动物 清洁级50只健康SD大鼠,雌性,鼠龄3个月,体重(200 \pm 20)g,河北医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK2013-1-003,合格证

号:1407014。

2 药物 补肾温阳化瘀方[制附子 6 g(先煎)肉桂 10 g 延胡索 15 g 小茴香 10 g 川芎 10 g 桑寄生 30 g 制没药 10 g 党参 15 g 炒白术 15 g 川楝子 15 g 川牛膝 10 g],购自河北省中医院。将上述中药煎煮浓缩 3.33 g/mL,置于 4 °C 冰箱中保存;孕三烯酮胶囊 2.5 mg/粒,华润紫竹药业公司,批号:53140401113;庆大霉素,2 mL/支,天津金耀有限公司,批号:1405081。

3 试剂及仪器 一抗 HIF-1 α 兔抗 IgG 多克隆抗体(Bioworld 公司,美国);PHD2 兔抗 IgG 多克隆抗体及 VHL 兔抗 IgG 多克隆抗体(Affinity 公司,美国);SP9001 试剂盒、DAB 显色剂(均购自北京中山生物技术有限公司);cGMP 试剂盒、cAMP 试剂盒(北京华英生物技术研究,批号:20141125);CA-125 试剂盒(天津九鼎医学生物工程有限公司,批号:TC1411)。电热干燥箱(DGB-20,上海光华仪器厂)、恒温水浴震荡器(SHA-B,常州国华)、Olympus61 全能显微镜 BX-UCB(Olympus,日本)、Leica RM2135 石蜡切片机(Leica,德国)、倒置相差显微镜(IX-70 Olympus,日本)、CO₂ 培养箱(300/3000 美国 Revco)、基因扩增仪(PE-9600,美国 PE)、紫外-可见分光光度计(756MC 型,国产上海精密科学仪器有限公司)、红外荧光扫描成像系统(型号:Odyssey,美国 Gene 公司)、匀浆机(DY89-1,宁波新芝生物科技股份有限公司)等。

4 肾阳虚血瘀证 EM 模型的建立、分组及给药方法 参考徐丁洁等^[5]“延长冰箱冷冻加冰水浸泡”结合 EM“自体移植法”改进^[6]建立肾阳虚血瘀证 EM 模型。将动情周期正常的 SD 大鼠适应性喂养 1 周后按随机数字表法分为正常组、假手术组、模型组、中药组、西药组,每组 10 只。正常组及假手术组常规饲养,模型组、中药组、西药组大鼠冰冻笼中加入冰水(0 ~ 1 °C),深度 150 mm,置于 4 °C 冰箱中,2 次/天(9:00 am 及 9:00pm 冰冻),20 min/次,共 30 天,每天阴道涂片观察大鼠的动情周期,当模型组、中药组、西药组大鼠体温降低(与正常组比较差异有统计学意义)、阴道涂片显示动情周期紊乱、大鼠表现为身脏毛污,反应迟钝,蜷缩懒动,后肢行动迟缓、寒战,扎堆怕冷、爪尾部苍白,尾部皮下瘀紫、耳色苍白等时,提示肾阳虚寒证造模成功。模型组、中药组、西药组再行“自体移植法”造模,将大鼠称重后,3%水合氯醛麻醉,待麻醉满意后,将大鼠仰卧位,头部及四肢固定在手术板上,取下腹部 5 cm × 4 cm 大小的皮肤备皮,腹部剪毛。

在无菌条件下,取下腹正中 1.5 cm 切口,进入腹腔后,分离后结扎右侧子宫及子宫系膜上的血管,再结扎需要切除子宫的两端,取中间段 2 cm,切下的子宫组织,迅速放入装有 PBS 溶液的玻璃皿中,纵向切开子宫组织,纵行剪开宫腔并剥离宫内膜,将宫内膜剪成同等大的两块,缝合于左侧卵巢及左侧腹膜壁层,检查腹腔内无出血,逐层缝合腹壁及皮肤,关腹前腹腔内注射庆大霉素 0.1 mL。将剩余的内膜组织进行组织学检查,以证实移植物为子宫内膜。术后 3 天连续肌肉注射庆大霉素(每只 0.1 mL,1 次/天)。假手术组开腹不做处理。术后第 4 天,手术大鼠腹部刀口无感染,继续冷冻,方法同前。总体造模成功率 96.6%,中药组大鼠因感染死亡 1 只。术后同时中药组每日灌服补肾温阳化瘀方 1 mL,西药组每日灌服孕三烯酮 0.5 mg/(kg · d),模型组、假手术组、正常组每日灌服生理盐水 1 mL,各组给药 4 周。

5 组织取材 末次给药后禁食 8 h,动情间期处死大鼠。大鼠 10%水合氯醛(0.6 mL/100 g)腹腔麻醉,股动脉取血约 3 mL,以 3 000 r/min,离心 10 min,分离血清,-20 °C 冰箱保存备用。采血后逐层开腹,观察异位灶的形态。随后迅速取出正常组、假手术组大鼠子宫以及模型组、中药组及西药组大鼠异位灶组织,各组子宫用于组织形态学观察。正常组、假手术组子宫在位内膜及模型组、中药组及西药组大鼠异位灶的部分组织立即置于 4%多聚甲醛溶液中固定,用于免疫组化检测;其余部分组织立即置于液氮灌中,后转入 -80 °C 冰箱用于 Western blot 及 RT-PCR 检测。

6 检测指标及方法

6.1 血清 CA125、cAMP、cGMP 检测 放免法检测血清 CA125、cAMP、cGMP 的含量,严格按照试剂盒说明书操作。

6.2 大鼠子宫及异位组织形态学观察 大鼠子宫及异位组织用 4%的多聚甲醛固定 24 h,再经梯度脱水、透明、浸蜡包埋、切片(4 μ m),常规 HE 染色,光学显微镜下观察。

6.3 免疫组化 SABC 法检测 HIF-1 α 、PHD2、VHL 蛋白的表达 免疫组化 SABC 实验步骤:二甲苯和梯度酒精对组织切片进行脱蜡、水化,自来水冲洗 5 min,0.3% H₂O₂ 去离子水孵育 30 min,缓冲液冲洗 5 min,血清封闭:稀释的正常血清室温孵育组织 20 min,血清尽量与二抗来源一致,除去多余的血清,忌洗,缓冲液稀释的一抗中孵育组织 30 min,缓冲液冲洗切片 5 min,滴加生物素标记的二抗中孵育组织 30 min,缓冲液冲洗切片 5 min,将组织置于 VEC-

TASTAIN ABC 试剂 30 min, 缓冲液冲洗切片 5 min, 组织在过氧化物酶底物溶液中孵育达到所需的染色强度, 自来水冲洗组织, 复染、脱水、透明。所有标本均在 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统内在相同的放大倍数下观察抗原表达量, HIF-1 α 、PHD2 及 VHL 以阳性细胞染色的平均光密度值(OD)表示抗原表达量。

6.4 Western blot 法检测 HIF-1 α 、PHD2、VHL 蛋白含量的表达 取大约 200 mg 组织加 0.4 mL 提取液匀浆提取, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 测定总蛋白浓度。加入等体积 2 \times SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min。每孔上样等量总蛋白, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。利用水浴式电印迹法将蛋白转移至膜上。室温振荡封闭膜 2 h 后, 加入 1:200(封闭液稀释)的第一抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 PBS-Tween 洗膜 3 次后, 再加入 1:8 000(封闭液稀释)的 HRP 标记的第二抗体, 室温振荡 1 h, PBS-Tween 充分洗膜后, 将膜浸入 DAB 显色液中, 室温充分显色后, 立即用蒸馏水洗膜, 然后将膜转入 PBS 中观察。Odyssey 发光仪扫描抗体特异性结合条带, 以 GAPDH 为内参, 进行半定量分析。

6.5 RT-PCR 法检测 PHD2、VHL 及 HIF-1 α mRNA 的表达 用 RNAiso Plus 提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 纯度及浓度。取总 RNA 2 μ g, 加入 RT 反应体系(含 AMV Buffer, dNTPs, Oligo dT Primer, AMV, Rnase Inhibitor 等)管中, 并用 DEPC 处理水补足到 50 μ L 反应液体积, 于 PCR 仪 42 $^{\circ}$ C 30 min(cDNA 合成), 99 $^{\circ}$ C 5 min(逆转录酶失活), 5 $^{\circ}$ C 5 min。引物序列及扩增条件为: HIF-1 α 上游引物: 5'-TGCTGGCTCCCTATATCCCA-3', 下游引物: 5'-TTCATCAGTGGTGGCAGTTG-3', 扩增片段为 182 bp; PHD2 上游引物: 5'-CAGTCCGTCCTGGC-3', 下游引物: 5'-CCTCCCCAGATGCTCCTGAA-3', 扩增片段为 430 bp; VHL 上游引物: 5'-ACATCCTGTAGAGGCCAGT-3', 下游引物: 5'-TCCCAATGCTGACACACTCC-3', 扩增片段为 325 bp; GAPDH 上游引物: 5'-CCTCCTGAACTT-GAGGCAGTTTA-3', 下游引物: 5'-CTCTGGGGCT-GTCAGTCTTG-3', 扩增片段为 638 bp。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min(94 $^{\circ}$ C 30 s, 各自的退火温度 40 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s) 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取每个标本的扩增产物 6 μ L 于 1% 的含 GV 核酸染料的琼脂糖凝胶电泳, 以 DNA Marker(DL2000)作为标准片段标记, 电泳后于紫外透射仪观察, 并用数码相机照相, 输入微机应用 Quantity One 凝胶图像分析软件对目的电泳条带进行分析, 以相应的内参电泳条带

作为参照, 结果以两者之积分吸光度的比值表示。

6.6 相关性检测 观察 HIF-1 α 与 PHD2、VHL 表达的相关性。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对所得数据进行正态性及方差齐性检验, 多组间比较用单因素方差分析。Pearson 直线相关法检测双变量的相关性。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠异位灶形态学观察 中药组、西药组、模型组均见移植物生长良好, 体积明显增大, 呈隆起暗红色或透亮的小囊状, 内部充满积液, 表面血管清晰可见, 异位组织周围血管丰富, 有些异位组织与腹腔脏器粘连。中药组、西药组治疗后, 异位灶体积明显缩小。

2 各组大鼠血清 CA125、cAMP、cGMP 结果比较(表 1) 正常组 CA125、cAMP、cGMP 表达与假手术组比较, 差异无统计学意义(P > 0.05); 与正常组及假手术组比较, 模型组 CA125 及 cGMP 水平明显升高, cAMP 水平明显降低, 差异有统计学意义(P < 0.05)。与模型组比较, 中药组及西药组 CA125 及 cGMP 水平明显降低, cAMP 水平明显升高, 差异有统计学意义(P < 0.05)。

表 1 各组大鼠血清 CA125、cAMP、cGMP 结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CA125 (U/mL)	cAMP (pmol/mL)	cGMP (pmol/mL)
正常	10	16.91 \pm 2.08 *	22.98 \pm 2.72 *	4.61 \pm 0.63 *
假手术	10	9.59 \pm 3.03 *	22.29 \pm 3.97 *	4.73 \pm 0.69 *
模型	10	26.92 \pm 1.28	17.82 \pm 1.56	6.17 \pm 1.10
中药	9	21.75 \pm 5.67 *	21.79 \pm 4.36 *	5.16 \pm 0.84 *
西药	10	20.89 \pm 4.66 *	21.21 \pm 2.31 *	5.09 \pm 0.95 *

注: 与模型组比较, *P < 0.05

3 各组大鼠子宫及异位内膜组织形态学观察比较(图 1) 正常组子宫内膜规整, 中膜内有腺腔、完整、排列整齐, 细胞排列整齐; 假手术组子宫内膜较正常组稍增厚, 中膜内有腺腔, 细胞排列紊乱; 模型组异位内膜较假手术组内膜更厚, 腺体不明显, 管腔消失, 细胞排列紊乱, 炎性细胞增多; 中药组异位内膜管腔完整, 但形态不规则, 内膜排列整齐, 中膜细胞排列不整齐; 西药组异位内膜不完整, 腺腔不规则, 中膜细胞收缩, 细胞排列不整齐。

4 各组大鼠 PHD2、VHL、HIF-1 α 蛋白表达比较(表 2, 图 2-4) HIF-1 α 阳性颗粒呈棕黄色, 主要表达

在子宫内膜、中膜、腺腔细胞核及胞浆中;PHD2 主要表达在细胞膜上,胞浆少量表达;VHL 阳性染色主要位于细胞核、细胞浆中。正常组与假手术组各指标蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组及假手术组

比较,模型组大鼠 HIF-1 α 表达升高($P < 0.05$),PHD2、VHL 的表达降低($P < 0.05$);与模型组比较,中药组、西药组 HIF-1 α 表达降低($P < 0.05$), PHD2、VHL 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

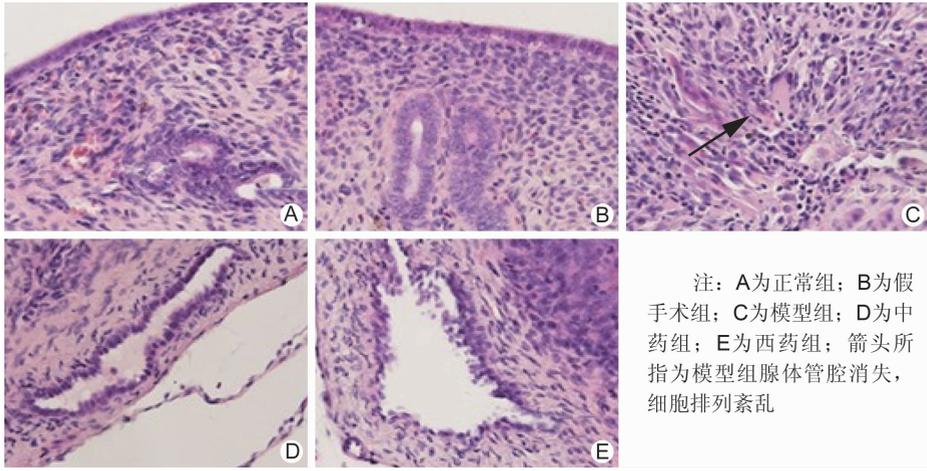


图 1 各组大鼠子宫组织形态学结果 (HE, $\times 400$)

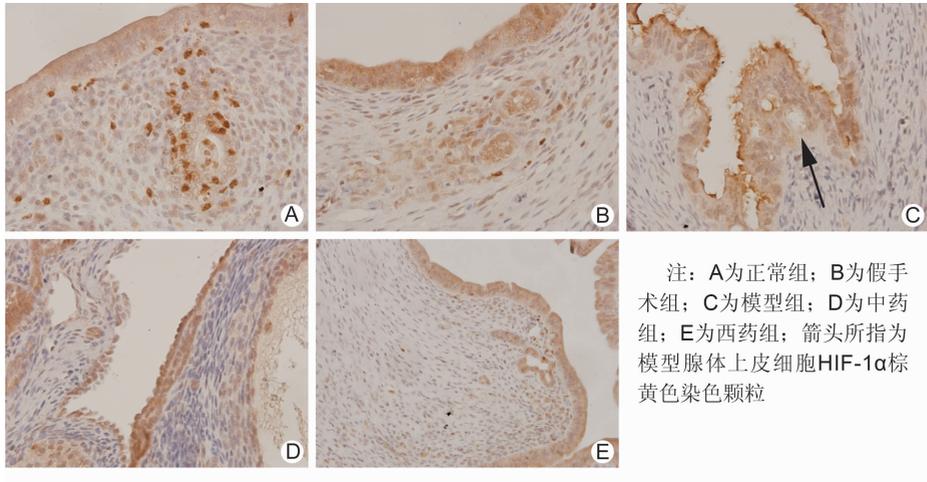


图 2 各组大鼠 HIF-1 α 免疫组化表达 (SABC 法, $\times 400$)

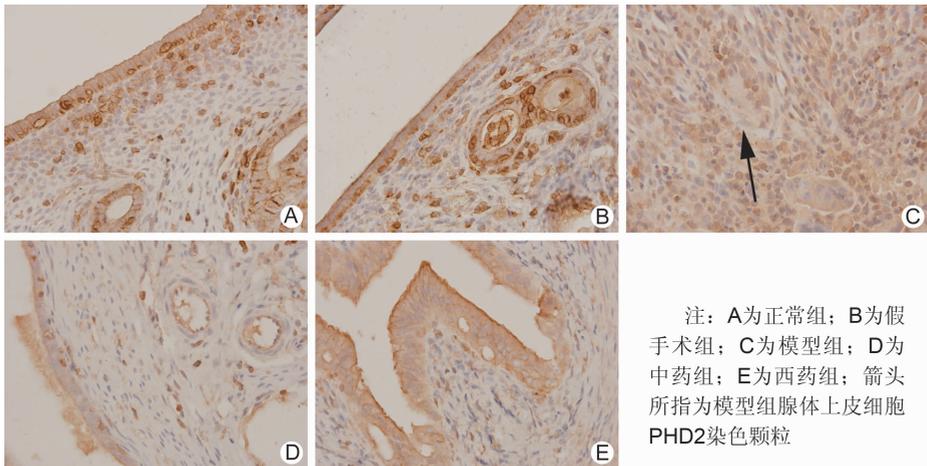


图 3 各组大鼠 PHD2 免疫组化表达 (SABC 法, $\times 400$)

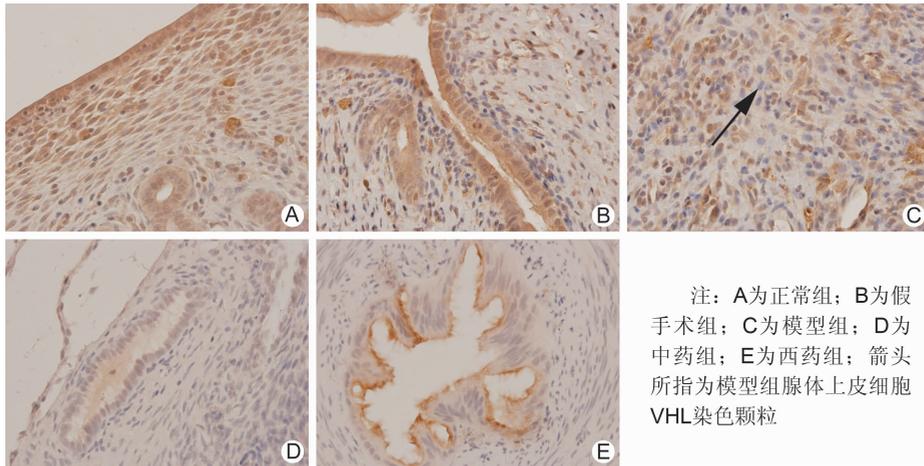


图 4 各组大鼠 VHL 免疫组化表达 (SABC 法, ×400)

表 2 各组大鼠 PHD2、VHL、HIF-1α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PHD2	VHL	HIF-1α
正常	10	0.591 ± 0.009 *	0.395 ± 0.008 *	0.303 ± 0.008 *
假手术	10	0.515 ± 0.008 *	0.375 ± 0.010 *	0.332 ± 0.102 *
模型	10	0.216 ± 0.006	0.219 ± 0.113	0.609 ± 0.102
中药	9	0.292 ± 0.400 *	0.287 ± 0.011 *	0.419 ± 0.009 *
西药	10	0.276 ± 0.100 *	0.267 ± 0.008 *	0.467 ± 0.011 *

注:与模型组比较, *P < 0.05

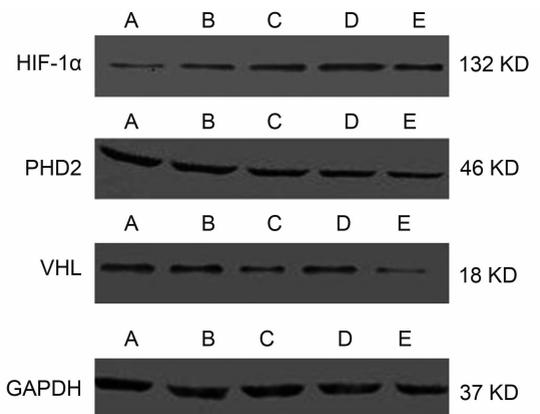
5 各组大鼠 HIF-1α、PHD2、VHL 蛋白含量比较 (表 3, 图 5) 正常组及假手术组各指标蛋白含量表达差异无统计学意义 (P > 0.05); 与正常组及假手术组比较, 模型组 HIF-1α 蛋白含量明显升高, PHD2、VHL 蛋白含量降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 与模型组比较, 中药组及西药组 HIF-1α 蛋白含量明显降低, PHD2、VHL 蛋白含量升高 (P < 0.05), 且西药组 PHD2 蛋白含量升高优于中药组 (P < 0.05)。

表 3 各组大鼠 PHD2、VHL、HIF-1α 蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PHD2	VHL	HIF-1α
正常	10	0.98 ± 0.00 *	0.72 ± 0.00 *	0.21 ± 0.00 *
假手术	10	0.92 ± 0.00 *	0.44 ± 0.00 *	0.37 ± 0.00 *
模型	10	0.48 ± 0.28	0.39 ± 0.22	0.77 ± 0.12
中药	9	0.55 ± 0.61 *	0.68 ± 0.91 *	0.55 ± 0.19 *
西药	10	0.80 ± 0.39 * [△]	0.59 ± 0.71 *	0.59 ± 0.15 *

注:与模型组比较, *P < 0.05; 与中药组比较, [△]P < 0.05

6 各组 PHD2、VHL 及 HIF-1α mRNA 表达比较 (图 6, 表 4) 正常组及假手术组 PHD2、VHL 及 HIF-1α mRNA 表达水平比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05); 与正常组及假手术组比较, 模型组 HIF-1α mRNA 表达升高, PHD2、VHL mRNA 表达降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05); 与模型组比较, 中药



注: A 为正常组; B 为假手术组; C 为模型组; D 为中药组; E 为西药组

图 5 各组大鼠 HIF-1α、PHD2、VHL 蛋白含量表达电泳图

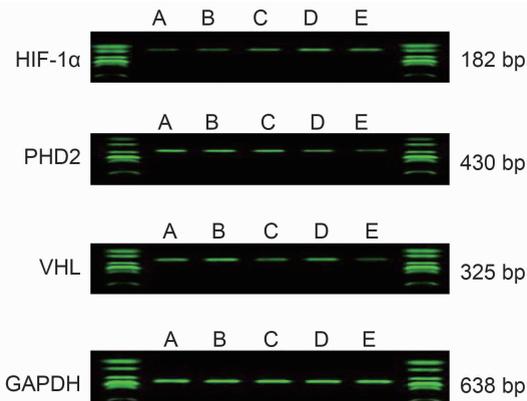
组及西药组 HIF-1α mRNA 表达降低, PHD2、VHL mRNA 表达升高 (P < 0.05)。中药组及西药组间比较, 差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表 4 各组大鼠 PHD2、VHL 和 HIF-1α mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	PHD2 mRNA	VHL mRNA	HIF-1α mRNA
正常	10	0.75 ± 0.024 *	0.78 ± 0.390 *	0.27 ± 0.170 *
假手术	10	0.72 ± 0.008 *	0.70 ± 0.002 *	0.31 ± 0.520 *
模型	10	0.43 ± 0.150	0.36 ± 0.100	0.65 ± 0.180
中药	9	0.53 ± 0.140 *	0.50 ± 0.160 *	0.49 ± 0.170 *
西药	10	0.56 ± 0.120 *	0.58 ± 0.760 *	0.42 ± 0.120 *

注:与模型组比较, *P < 0.05

7 HIF-1α 与 PHD2、VHL 表达相关性分析 经 Pearson 直线相关法检测, HIF-1α 与 PHD2 呈负相关 (r = -0.799, P = 0.00), HIF-1α 与 VHL 呈负相关 (r = -0.625, P = 0.003)。



注:A 为正常组;B 为假手术组;C 为模型组;D 为中药组;E 为西药组

图 6 各组 PHD2、VHL、HIF-1 α mRNA 表达电泳图

讨 论

EM 是临床常见病及多发病,虽是一种良性疾病,却具有盆腔内种植和易于复发转移等恶性肿瘤的生物学行为,且部分可能发生组织学改变,成为癌瘤^[7]。目前 EM 发病机制不明,有子宫内膜种植学说、在位内膜学说、体腔上皮化生学说、干细胞学说、遗传学说、免疫学说等多种学说。

子宫内膜发生异位时会出现局部缺血、缺氧等微环境的改变,诱导 HIF 过度表达,此被认为是 EM 播散、种植的原因之一^[8]。HIF 在多种恶性肿瘤及癌前病变中过度表达^[9,10],HIF-1 α 过度表达是多种肿瘤预后不良的指标^[11]。HIF-1 α 的表达受多种因素的调控,其中 PHD2、VHL 与其关系密切,成为许多疾病研究的热点及重点,但在 EM 的研究中相关报道少见。在常氧条件下,PHD2 活化,HIF 发生羟基化反应,羟基化的 HIF-1 α 可被肿瘤抑制基因产物(the von Hippel Lindau tumor suppressor, pVHL) - 泛素 E3 连接酶识别,在蛋白酶体内被降解;一旦长期缺氧,组织中蓄积增多的 HIF-1 α 会反射性地诱导 PHD2 表达,它们之间可形成一个负反馈调节环^[12]。VHL 是调节 HIF-1 α 亚基稳定性的关键分子,在常氧条件下,pVHL 与 HIF-1 α 亚基结合而使后者多聚遍在蛋白化从而被蛋白酶降解;而在缺氧条件下,pVHL 不能识别 HIF-1 α 亚基,而使后者与 HIF-1 β 亚基聚合调节下游靶基因而发挥生理作用^[13],本研究结果表明:在 EM 中 HIF-1 α 的表达升高,与前期研究一致^[1]。模型组中 PHD2、VHL 在 EM 的表达降低,可能在缺氧条件下,PHD2 不能被活化,不能从蛋白含量和转录活性两方面介导 HIF-1 α 的降解,使其活性反而增加。在缺氧

条件下,VHL 基因发生突变,其功能受损,不能识别 HIF-1 α 的亚基,HIF-1 α 不能被降解。通过相关性研究证实 HIF-1 α 与 PHD2、VHL 呈负相关,进一步说明 EM 中存在乏氧状态。EM 中 HIF-1 α 表达升高,导致其转录活性增高,进一步促进侵袭、黏附、血管生成,从而参与 EM 的发生与发展。

本病患者病程较长,“久病及肾”,容易导致肾虚;患者多表现为腹部畏寒喜暖、甚至腰以下冰冷,当属虚寒。肾阳不足,虚寒内生,阳气不足血运迟滞,寒蕴冲任胞宫,恶血凝集,致使冲任气血失调,离经之血凝集而发生内异症,因此,笔者认为“瘀血阻滞冲任、胞宫”是 EM 的基本病机,肾阳虚血瘀是本病发生发展的病理基础^[14]。前期研究表明,补肾温阳化瘀方可有效改善 EM 患者的临床症状和体征,疗效确切,并具有调节生殖内分泌激素水平、降低 CA125 水平等作用^[15-18]。血清 CA125 是一种糖蛋白,用于 EM 疗效评价及预防复发^[9]。肾阳虚患者中常见 cAMP 含量相对降低,cGMP 含量相对升高,cAMP/cGMP 比值降低^[4]。本实验中模型组血清 CA125 的表达升高,cAMP 含量相对降低,cGMP 含量相对升高,符合肾阳虚证的特点。“自体移植法”是将子宫内膜移植到盆腔,形成“子宫内膜异位灶”,即中医所讲的“癥瘕”,当为血瘀。本实验建立的肾阳虚血瘀证 EM 大鼠模型,符合临床肾阳虚血瘀证和 EM 的特点,提示模型成功。补肾温阳化瘀方由肉桂、制附子、小茴香、延胡索、川芎、川楝子等组成,方中肉桂性热,归肾、脾、心、肝经,具有补火助阳、散寒止痛、温通经脉之功,制附子大辛、大热,归心肾脾经,具有回阳救逆、补火助阳、散寒止痛之功,小茴香味辛、性温,具有暖肝温肾、散寒止痛之功,延胡索味辛苦,性温,归心、肝、脾经,具有活血行气止痛之功,纵观全方,共奏补肾温阳、化瘀止痛之功。本研究结果提示,补肾温阳化瘀方可通过降低血清 cGMP 含量,提高 cAMP 水平,发挥其补肾温阳的作用。同时,补肾温阳化瘀方可降低模型大鼠子宫在位内膜及异位组织中 HIF-1 α 的表达,上调模型大鼠子宫在位内膜及异位组织中 PHD2、VHL 的表达,提示补肾温阳化瘀方可能通过降低 HIF-1 α 的表达改善 EM 的乏氧状态,降低 CA125 水平起到治疗 EM 的作用,与前期研究结果一致^[1]。而该方降低 HIF-1 α 表达的机制可能与上调 PHD2、VHL 表达有关。

本课题组将在临床上进一步观察 HIF-1 α 、PHD2、VHL 的表达,进一步明确 EM 的发病机制,并观察补肾温阳化瘀方对 EM 患者的治疗作用。

参 考 文 献

- [1] 陈景伟,杜惠兰,杨剑. VEGF、HIF-1 α 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(1): 92-93.
- [2] 李福祥,全燕,夏前明. 低氧诱导因子及其低氧调节机制[J]. 中国临床康复, 2004, 8(30): 6744.
- [3] 张彩彩,朱依纯. 低氧诱导因子-1 功能调节及其机制[J]. 生理通讯, 2008, 27(2): 43-46.
- [4] 张子怡,陈宝军,张庆,等. 肾虚动物模型的造模方法与评价指标[J]. 福建中医药, 2014, (45)2:61-63.
- [5] 徐丁洁,成秀梅,杜惠兰. 妇科虚寒证大鼠模型的创建[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(11): 1519-1521.
- [6] 杨耀芳,王钦茂,方学明,等. 建立大鼠子宫内膜异位症模型的评价方法[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(5): 469-470.
- [7] Thomas EJ, Campbell IG. Evidence that endometriosis behaves in a malignant manner[J]. Gynecol Obstet Invest, 2000, 50(Suppl 1): 2-10.
- [8] 张翠荣,张敬伟,王淑侠,等. FHIT 和 HIF-1 α 在子宫内膜异位症中的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(19): 2987-2989.
- [9] Yuan CX, Gu S, Zhang SH, et al. Hypoxia increases the expression of heparitinase and the invasiveness through the hypoxia inducible factor-1alpha dependent pathway in human ovarian cancer cell line SKOV3[J]. Acta Acad Med Sin, 2008, 30(6): 711-716.
- [10] Yu ZT, Zhao HF, Shang XB. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and vessel endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and clinico-pathological significance thereof[J]. Chin Med J, 2008, 88(35): 2465-2469.
- [11] Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression[J]. Mol Cell Biol, 2001, 21(12): 3995-4004.
- [12] 朱诚程,周家德. 脯氨酸羟化酶在妇科肿瘤中的研究进展[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(10): 831-832.
- [13] Min JH, Yang H, Ivan M, et al. Structure of an HIF-1alpha-pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling[J]. Science, 2002, 296(5574): 1886-1889.
- [14] 夏新华,沈明勤,张蕾. 补肾活血中药对子宫内膜异位症大鼠生殖功能干预研究[J]. 江苏中医药, 2011, 43(8): 86-87.
- [15] 陈景伟,杜惠兰,杨健,等. 补肾温阳化瘀方治疗子宫内膜异位症临床研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(25): 3053-3054.
- [16] 边文会,杜惠兰,陈惠娟,等. 补肾温阳化瘀方对子宫内膜异位症患者痛经影响的临床研究[J]. 临床医药实践, 2008, 1(6): 370-373.
- [17] 刘京芳,陈景伟,杜惠兰. 补肾温阳化瘀方治疗子宫内膜异位症 30 例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 332-334.
- [18] 陈景伟,杜惠兰,杨健,等. 补肾温阳化瘀方对子宫内膜异位症血管生成的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(9): 1715-1717.

(收稿:2015-01-29 修回:2015-07-10)

中西结合医学家张亭栋教授荣获求是杰出科学家奖

中国科学技术大学举行的“求是杰出科学家奖”颁奖大会上,原哈尔滨医科大学附属第一医院中医科教研室主任、原中国中西医结合学会副会长、《中国中西医结合杂志》编委张亭栋教授因在使用砷霜(三氧化二砷)治疗白血病上所做出的奠基性贡献,获得了香港求是科技基金颁发的100万元奖金。张亭栋教授最早于1979年在与合作者发表的论文中提出三氧化二砷是抑制白血病的有效成分,其对急性早幼粒细胞白血病患者尤好。

据求是基金会介绍,“求是杰出科学家奖”是该基金会最重要的奖项。除1994年设奖当年曾一次性为10人颁出奖项外,此后多年空缺。至今,仅有24位中国科学家荣膺此奖项。

摘录自《中国中医药报》2015年9月21日第2版