

·临床研究·

瘦素和 VEGF 的阳性细胞在卵巢子宫内膜异位症中的病理学研究

吴玲玲¹, 余妙真², 李琳², 王振花²

(1. 中山大学附属第三医院妇产科, 广东广州 510630; 2. 中山大学附属第二医院妇产科, 广东广州 510120)

摘要: 【目的】探讨瘦素和血管内皮生长因子(VEGF)在子宫内膜异位症(EMs)发病机制中的作用。【方法】应用免疫组织化学法检测瘦素和血管内皮生长因子在 28 例卵巢子宫内膜异位囊肿患者的异位内膜、在位子宫内膜及 20 例正常子宫内膜中的表达特点。【结果】腺上皮细胞中:瘦素和 VEGF 在异位内膜和在位内膜中的表达均高于正常子宫内膜($P < 0.05$),并且异位内膜中的表达高于在位内膜($P < 0.01$);间质细胞中:瘦素在异位内膜中的表达高于在位内膜、正常子宫内膜($P < 0.01$),VEGF 在异位内膜、在位内膜及正常子宫内膜中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);异位内膜、在位内膜中的瘦素与 VEGF 均呈正相关表达($P < 0.01$)。【结论】瘦素和血管内皮生长因子在卵巢子宫内膜异位症的发病机制中发挥作用,两者在异位内膜和在位内膜中的血管生成过程中密切相关。

关键词: 子宫内膜异位症; 瘦素; 血管内皮生长因子; 免疫组化

中图分类号: R711

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0674-04

Pathological Study about Positive Cell of Leptin and Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Endometriosis

WU Ling-Ling¹, YU Miao-Zhen², LI Lin², WANG Zhen-hua²

(1. The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To discuss the pathophysiological role of leptin and vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. 【Methods】Leptin and VEGF expression were detected in 28 ectopic endometrium, eutopic endometrium, and 20 endometrium of control group by immunohistochemical staining. 【Results】Ectopic and eutopic tissues showed statistically stronger leptin and VEGF expression compared with normal controls ($P < 0.05$) and ectopic tissues showed statistically stronger leptin and VEGF expression compared with eutopic tissues ($P < 0.01$) in glandular epithelium cells; Ectopic tissues showed statistically stronger leptin expression compared with eutopic tissues, normal controls in stroma cells ($P < 0.01$). However, we did not find difference about VEGF expression among ectopic tissues, eutopic tissues, or normal controls in stroma cells ($P > 0.05$). Leptin expression was positively correlated to VEGF expression in ectopic endometrium and eutopic endometrium ($P < 0.01$). 【Conclusions】Leptin and VEGF play an important role in the progression of endometriosis. There is close relationship between leptin, VEGF, and endometriotic angiogenesis.

Key word: endometriosis; leptin; vascular endothelial growth factor; immunohistochemical staining

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):674-677]

子宫内膜异位症(简称内异症, ovarian endometriosis, EMs)是一种妇科常见病,其发病机

制尚未明确。多数研究表明,逆流至腹腔的子宫内膜经历粘附、侵袭后,新生血管形成是进一步生长

收稿日期: 2007-07-05

基金项目: 广东省卫生厅名医工程基金(2004)

作者简介: 吴玲玲(1970-),女,安徽芜湖人,硕士,主治医师, E-mail:wll1990@schu.com

的必要条件。瘦素由脂肪细胞分泌,人体内瘦素浓度与体质量指数(BMI)呈正相关^[1]。Sierra等^[2]用瘦素处理人脐静脉血管内皮细胞将会引起浓度依赖性的细胞数量增加,表现为类似血管早期形态管状物的增加和新生血管的形成。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异地作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,具有促进微静脉,小静脉通透性增加,血管内皮细胞分裂、增殖,细胞质钙聚集以及诱导新生血管形成等作用。本研究通过检测瘦素和 VEGF 在 EMs 患者异位内膜与在位内膜中的表达,探讨瘦素和 VEGF 可能在 EMs 发病机制中发挥的作用。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

研究组:28份异位内膜和在位内膜均取自中山大学附属第二医院妇产科2004年12月~2006年4月期间住院手术、经病理确诊的卵巢子宫内膜异位囊肿并且见到完整的腺上皮及间质细胞的患者,且依据1985年美国生育学会(AFS)提出的“修正子宫内膜异位症分期法”(r-AFS)的评分标准均为Ⅰ~Ⅲ期患者,年龄23~48(S=35.5)岁,BMI(22.9±1.3) kg/m²,在位内膜增生期19例,分泌期9例。对照组:同期在该院因浆膜下或肌壁间子宫肌瘤行手术治疗的子宫内膜正常的20例非EM患者,年龄30~47(S=37.4)岁,BMI(S=23.3) kg/m²,其中增生期10例,分泌期10例。研究组与对照组患者均为月经规律,近3个月未用过激素类药物,且排除糖尿病、高血压、心脏病、肥胖、子宫内膜癌,子宫腺肌病及多囊卵巢综合症(PCOS)等疾病的生育年龄妇女,两组年龄与BMI差异无统计学意义。

1.2 方 法

1.2.1 标本获取 在手术时取卵巢子宫内膜异位囊肿的囊壁组织、在位内膜组织及正常子宫内膜组织(未行全子宫切除术患者,征得知情同意下,术中用取内膜器取得子宫内膜),均以甲醛固定、石蜡包埋,并经病理检查证实。

1.2.2 免疫组织化学检测 本研究采用SABC(strept avidin-biofin complex)法免疫组织化学测定,瘦素多克隆抗体、VEGF多克隆抗体均购自Santa Cruz公司。二抗试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。实验步骤参照试剂盒说明书进行。用

已知的阳性乳腺癌切片作阳性对照,PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.3 结果判定 采用双盲法进行评分,每张切片随机观察10个有代表意义的高倍视野,每个视野计数100个细胞中的阳性细胞数,取平均数作为结果。判定标准:阳性为细胞内出现黄色颗粒。表达阴性和阳性根据细胞染色强度和染色细胞所占面积,即两者积分之和来判断。染色强度分为:不染色为0,轻度染色为1,中度染色为2,强度染色为3。染色面积分为:无细胞染色为0;<25%细胞染色为1;25%~50%细胞染色为2;>50%细胞染色为3。若积分之和为0,则表达阴性(-);积分之和为1~2则表达弱阳性(+);积分之和为3~4,则表达阳性(++);积分之和为5~6,则表达强阳性(+++)。

1.2.4 统计学处理 数据分析采用SPSS 11.0统计软件包进行:计量资料行t检验;计数资料采用秩和检验;瘦素和VEGF表达之间的相关性行Spearman相关性分析。取P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 瘦素在异位内膜、在位内膜中的表达

腺上皮细胞中:异位内膜、在位内膜中的表达均高于正常内膜(P<0.01);异位内膜中表达高于在位内膜(P<0.01)。间质细胞中:异位内膜中表达高于在位内膜(P<0.01)、正常内膜(P<0.01);在位内膜与正常内膜之间的表达差异无统计学意义(P

表1 瘦素在异位内膜、在位内膜及对照组中的表达情况
Table 1 Leptin expression in ectopic tissues, eutopic tissues, and normal controls

Group	n	Glandular epithelium cells				Stroma cells			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Ectopic endometrium	28	0	1	9	18 ¹⁾²⁾	2	9	11	6 ¹⁾²⁾
Eutopic endometrium	28	0	9	15	4 ¹⁾	6	16	5	1 ³⁾
Follicular phase	19	0	7	10	2 ⁴⁾	4	10	4	1 ⁴⁾
Luteal phase	9	0	2	5	2	2	6	1	0
Normal endometrium	20	0	14	6	0	7	10	3	0
Follicular phase	10	0	8	2	0 ⁴⁾	5	4	1	0 ⁴⁾
Luteal phase	10	0	6	4	0	2	6	2	0

1) compared with normal controls, P<0.01; 2) compared with ectopic tissues group, P<0.01; 3) compared with normal controls, P>0.05; 4) compared with luteal phase group, P>0.05.

>0.05)。瘦素在 3 组表达情况见表 1, 部分表达见图 1。

2.2 VEGF 在异位内膜和在位内膜中的表达

腺上皮细胞中: 异位内膜、在位内膜中的表达均高于正常内膜 ($P < 0.01$ 、 < 0.05); 异位内膜中表

达高于在位内膜 ($P < 0.01$)。间质细胞中: 异位内膜、在位内膜、正常内膜进行两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。VEGF 在 3 组表达情况见表 2, 部分表达见图 2。

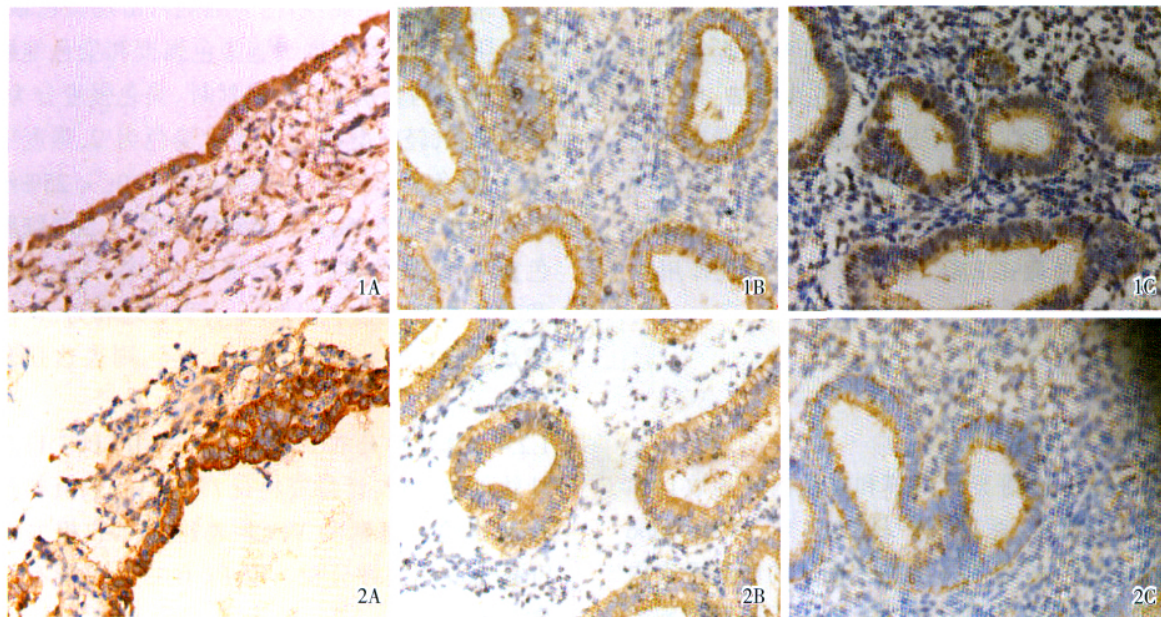


图 1 瘦素在异位内膜、在位内膜及对照组中的表达

图 2 VEGF 在异位内膜、在位内膜及对照组中的表达

Fig.1 Leptin expression in ectopic tissues, eutopic tissues, and normal controls (SP $\times 400$)

A: strong positive in glandular epithelium cells and stroma cells of ectopic endometrium; B: positive in glandular epithelium cells and weakly positive in stroma cells of eutopic endometrium; C: weakly positive in glandular epithelium cells and negative in stroma cells of normal endometrium

Fig.2 VEGF expression in ectopic tissues, eutopic tissues, and normal controls (SP $\times 400$)

A: strong positive in glandular epithelium cells and weakly positive in stroma cells of ectopic endometrium; B: positive in glandular epithelium cells and negative in stroma cells of eutopic endometrium; C: weakly positive in glandular epithelium cells and stroma cells of normal endometrium

2.3 瘦素、VEGF 在异位内膜、在位内膜中表达的相关性

异位内膜中的瘦素与 VEGF 表达: 在腺上皮细胞中的相关系数 $r_1=0.846$; 间质细胞中的相关系数 $r_2=0.844$ (P 均 < 0.001)。在位内膜中的瘦素与 VEGF 表达: 在腺上皮细胞中的相关系数 $r_3=0.918$; 间质细胞中的相关系数 $r_4=0.890$ (P 均 < 0.001)。

3 讨论

在内异症的病因学研究中, 大多数学者支持 Sampson 学说, 即子宫内膜种植学说。但不能解释: 约 90% 妇女月经来潮时有经血逆流至腹腔, 却只有 10% 发生内异症^[3]。因此有学者^[4]提出“在位内膜

表 2 VEGF 在异位内膜、在位内膜及对照组中的表达情况

Table 2 VEGF expression in ectopic tissues, eutopic tissues, and normal controls

Group	n	Glandular epithelium cells				Stroma cells			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
Ectopic endometrium	28	0	5	8	15 ¹⁾³⁾	6	13	7	2 ⁴⁾⁵⁾
Eutopic endometrium	28	0	8	17	3 ²⁾	8	15	5	0 ⁶⁾
Follicular phase	19	0	7	11	1 ⁶⁾	4	11	4	0 ⁶⁾
Luteal phase	9	0	1	6	2	4	4	1	0
Normal endometrium	20	0	13	6	1	8	10	2	0
Follicular phase	10	0	8	2	0 ⁶⁾	5	5	0	0 ⁶⁾
Luteal phase	10	0	5	4	1	3	5	2	0

1) compared with normal controls, $P < 0.01$; 2) compared with normal controls, $P < 0.05$; 3) compared with eutopic tissues group, $P < 0.01$; 4) compared with eutopic tissues group, $P > 0.05$; 5) compared with normal controls, $P > 0.05$; 6) compared with luteal phase group, $P > 0.05$

决定论”,即在位内膜作为异位种植的物质主体,在EMs的发生中起着决定性作用,这是对 Sampson 学说的修正和完善。

本实验采用免疫组化的方法研究了瘦素在28例卵巢内异症患者异位内膜、在位内膜的表达,发现瘦素在异位内膜腺上皮细胞、间质细胞的表达均高于对照组内膜,与Wu等^[5]的研究结果相似,提示异位内膜中的瘦素的高表达可能与异位病灶的生长、发展有关;在位内膜腺上皮细胞的表达高于对照组内膜,与Wu等结果不同,但是该学者只是对4例在位内膜进行了测定,样本量较少。因此我们认为瘦素在在位内膜与正常内膜之间表达的差异,提示前者在发生经血逆流后,容易发生异位种植,从而发生内异症。本研究显示,异位内膜腺上皮细胞、间质细胞中瘦素的表达高于在位内膜,我们考虑一方面源于腹腔微环境的影响,目前的资料表明,内异症患者腹腔液中巨噬细胞的数量和活性增加,分泌肿瘤坏死因子(TNF-)等细胞因子升高,并有研究^[9]证明TNF- 可促进瘦素的分泌;另一方面瘦素在异位内膜间质细胞中的表达增高与瘦素自身的特性有关,即瘦素可以激发异位内膜间质细胞瘦素 mRNA 的表达,其上调作用呈剂量依赖性,且瘦素的这种正反馈作用仅见于异位子宫内膜,对在位内膜间质细胞不发生此作用^[9],因此形成恶性循环,进一步促进了异位内膜中瘦素的表达,从而促进了内异症的进一步发展。

本研究中:VEGF在异位内膜腺上皮细胞中表达高于对照组,差异有统计学意义,与王宁宁^[7]、徐红^[8]等的研究结果类似,提示异位内膜中VEGF的过度表达,可能使其具有很强的血管生成能力,异位内膜得以在异位存活并进一步的侵袭、发展,使病灶不断地扩大;在位内膜腺上皮细胞表达VEGF高于对照组,与徐红等^[8]的报道一致,从在位内膜VEGF的促血管生成层面上佐证了“在位内膜决定论”的观点;但是我们的研究表明异位内膜腺上皮细胞VEGF的表达高于在位内膜,这一结果与徐红等^[8]不同,分析可能与腹腔微环境的影响有关,主要是腹腔液中巨噬细胞的作用,一方面巨噬细胞自身产生VEGF^[9],另一方面其分泌的一些细胞因子如TNF- 等,从而通过自分泌或旁分泌机制实现对VEGF的上调。

瘦素-受体信号转导主要通过酪氨酸激酶信号转导与转录(JAK-STAT)途径。VEGF作为一种

血管生长因子,须与其受体结合后通过酪氨酸激酶传导通路而发挥作用。Suganami等^[10]在一项瘦素对于局部缺血诱导的视网膜神经血管化的刺激研究中认为:其促进作用可能是通过上调视网膜内皮细胞的VEGF,并且VEGF mRNA升高至少部分是通过激活STAT3途径来实现。Kitade等^[11]通过大鼠试验表明:瘦素的促血管生成作用及与VEGF的协同作用在非酒精性肝硬化发展为肝纤维化及肝癌的过程中发挥重要作用,并且瘦素通过促进VEGF生成发挥血管生成作用。另有学者认为:瘦素通过上调VEGF的分泌,在乳腺癌的发病中发挥重要作用,并且抑制瘦素分泌可能成为治疗乳腺癌的研究方向^[12]。可见,在一些疾病中,瘦素的促血管生成作用通过上调VEGF而实现^[13]。本研究结果:异位内膜、在位内膜中瘦素与VEGF的表达均具有正相关性。VEGF被认为是最重要的血管形成因子,因此推论瘦素、VEGF在在位内膜、异位内膜的血管形成方面可能有密切联系,在卵巢内异症的发生发展中,瘦素有可能通过促进VEGF分泌而发挥促血管生成作用。

本实验提示异位内膜、在位内膜中瘦素、VEGF的表达增高可能与卵巢内异症的发病有关,并且瘦素、VEGF在卵巢内异症中的作用可能具有内在的联系。但有关内异症中瘦素、VEGF的具体作用机制则有待于更进一步的研究,而对于瘦素与VEGF的深入研究有助于为内异症的治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] KENNEDY A, GETTYS T W, WATSON P, et al. The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity, and energy expenditure [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(4):1293-1300.
- [2] SIERRA -HONIGMANN M R, NATH A K, MURAKAMI C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor [J]. *Science*, 1998, 281(5383):1683-1686.
- [3] HOMPES P G, MIJATOVIC V. Endometriosis: the way forward [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2007, 23(1):5-12.
- [4] 郎景和. 子宫内膜异位症的研究与设想 [J]. *中华妇产科杂志*, 2003, 38(8): 478- 480.
- [5] WU M H, CHUANG P C, CHEN H M, et al. Increased leptin expression in endometriosis cells is associated

- [4] ZABRECKY J R, LAM T, MCKENZIE S J, et al. The extracellular domain of p185/c-erbB-2 is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3 [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(3):1716-1720.
- [5] FORNIER M, RISIO M, VAN POZNAK C, et al. HER2 testing and correlation with efficacy of trastuzumab therapy [J]. *Oncology (Huntingt)*, 2002, 16(10):1340-1352.
- [6] ISOLA J J, HOLLI K, OKSA H, et al. Elevated erbB-2 oncoprotein levels in preoperative and follow-up serum samples define an aggressive disease course in patients with breast cancer [J]. *Cancer*, 1994, 73(3): 652-658.
- [7] COOK G B, NEAMAN I E, GOLDBLATT J L, et al. Clinical utility of serum HER-2/neu testing on the Bayer Immuno 1 automated system in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2001,21(2B):1465-1470.
- [8] WATANABE N, MIYAMOTO M, TOKUDA Y, et al. Serum c-erbB-2 in breast cancer patients [J]. *Acta Oncol*, 1994, 33(8):901-904.
- [9] QUARANTA M, DANIELE A, COVIELLO M, et al. C-erbB-2 protein level in tissue and sera of breast cancer patients: a possibly useful clinical correlation [J]. *Tumori*, 2006, 92(4):311-317.
- [10] MOLINA R, JO J, FILELLA X, et al. C-erbB-2 CEA and Ca 15.3 serum levels in the early diagnosis recurrence of breast cancer patients [J]. *Anticancer Res*, 1999, 19(4A):2551-2555.
- [11] FORNIER1 M N, SEIDMAN1 A D, SCHWARTZ2 M K, et al. Serum HER2 extracellular domain in metastatic breast cancer patients treated with weekly trastuzumab and paclitaxel: association with HER2 status by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization and with response rate [J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(2):234-239.
- [12] SATO N, SANO M, TABELI T, et al. Combination docetaxel and trastuzumab treatment for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer: a multicenter, phase-study. [J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(2):166-171.
- [13] KOESTLER W J, SCHWAB B, SINGER C F, et al. Monitoring of serum Her-2/neu predicts response and progression-free survival to trastuzumab-based treatment in patients with metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(5):1618-1624.
- [14] HER-2 (c-erbB-2) test update: present status and problems [J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(3):236-248.

(编辑 张恩健)

(上接第 677 页 from page 677)

- with endometrial stromal cell proliferation and leptin gene up-regulation [J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(5): 456-464.
- [6] MANTZOROS C S, MOSCHOS S, AVRAMOPOULOS I, et al. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- α system in humans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(10):3408-3413.
- [7] 王宁宁, 庄广伦, 黄建昭, 等. 卵巢子宫内膜异位症微血管密度及血管内皮生长因子表达 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(3):264-267.
- [8] 徐红, 曲军英, 钟山, 等. 血管内皮生长因子在子宫内膜异位症中作用 [J]. *广西医科大学学报*, 2005, 22(3):339-341.
- [9] MCLAREN J, PRENTICE A, CHARNOCK-JONES D S, et al. Vascular endothelial growth factors is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids [J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(2):482-489.
- [10] SUGANAMI E, TAKAGI H, OHASHI H, et al. Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2004, 53(9):2443-2448.
- [11] KITADE M, YOSHIJI H, KOJIMA H, et al. Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats [J]. *Hepatology*, 2006, 44(4):983-991.
- [12] GONZALEZ R R, CHERFILS S, ESCOBAR M, et al. Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2) [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(36): 26320-26328.
- [13] 程宝春, 万经海, 冯春国, 等. OPN 和 VEGF 在脑胶质瘤中的表达及其与预后的关系 [J]. *中华神经医学杂志*, 2006, 5(1): 22-26.

(编辑 徐杰)