

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

王宁宁¹, 庄广伦¹, 黄建昭¹, 姚书忠¹, 周慕珩², 董 愉²
(中山大学 1. 附属第一医院妇产科, 2. 病理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨子宫内膜异位症血管内皮生长因子(VEGF)的表达,微血管生成及其与临床病理发生的关系。【方法】采用 S-P 免疫组化染色法检测 50 例卵巢子宫内膜异位症,21 例子宫肌瘤在位内膜和 10 例子官腺肌症在位内膜中 VEGF 的表达及微血管密度(MVD)。【结果】卵巢子宫内膜异位症的 VEGF 表达阳性率上皮为 13.69 ± 4.32 、间质为 9.24 ± 6.55 ; MVD(160 ± 53) /mm², 显著高于子宫肌瘤、子宫腺肌症的在位子宫内膜的 VEGF 阳性表达率与 MVD 值($P < 0.05$),且 VEGF 与 MVD 值呈正相关($P < 0.05$)。子宫内膜异位症组按 r-AFS 分期,15 例 I-II 期,35 例 III-IV 期,二组在 VEGF 的阳性表达率、MVD 无显著性差异($P > 0.05$),与临床分期不相关。【结论】异位内膜组织 VEGF 的过度表达可能参与异位内膜的血管生成过程,为抗血管生成治疗提供了理论依据。

关键词:子宫内膜异位症;血管内皮生长因子;微血管密度;免疫组化

中图分类号:R711.71

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)03-0264-04

Microvessel Density and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Endometriosis

WANG Ning-ning, ZHUANG Guang-lun, HUANG Jian-zhao, YAO Shu-zhong, ZHOU Mu-heng, DONG Yu
(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, 2. Department of Pathology, SUN Yat -sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis in endometriosis and its relationship with clinical pathogenesis. 【Methods】 S-P immunohistochemical method was used to detect VEGF expression and MVD in lesions in 50 cases of ovarian endometrioma, endometrium in 21 cases of myoma and 10 cases of adenomyosis. 【Results】 The positive rate of VEGF in ovarian endometrioma was 13.69 ± 4.32 in epithelium, 9.24 ± 6.55 in stroma. MVD ($160 \pm 53/\text{mm}^2$) was higher in endometrioma than in eutopic endometrium of myoma and adenomyosis. The difference was significant ($P < 0.05$). There was positive relation between MVD and VEGF positive rate. According to (r-AFS) stage, there were no significance in positive rate of VEGF and MVD between 15 cases of Stage I-II and 35 cases of Stage III-IV groups ($P > 0.05$). No correlation was found in clinical stage of endometriosis. 【Conclusion】 Overexpression VEGF of endometriotic tissue may participate in angiogenesis process. It could be a theoretical basis for the treatment of endometriosis by anti-angiogenesis.

Key words: endometriosis; vascular endothelial growth factor; microvessel density; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3):264-267]

子宫内膜异位症症状顽固、治疗后易复发, 恶变率 0.7% ~ 1.0%, 其发病机理至今仍不清

收稿日期:2003-11-27

作者简介:王宁宁(1970-),女,辽宁鞍山人,在职博士生,主治医师,妇产科生殖内分泌专业;庄广伦,教授,导师.E-mail: wangningning21cn@21cn.com

楚。已经证实,血管生成对于肿瘤的存在与生长非常重要。但子宫内膜异位症中,血管生成因素所起到的作用仍不清楚,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为重要的血管生长因子,与血管的形成密切相关。微血管密度(microvessel density, MVD)则反映血管生成的定量指标,以往认为与肿瘤预后相关。VEGF、MVD与子宫内膜异位症的关系却未见报道。本研究应用免疫组化的方法,检测50例卵巢子宫内膜异位症标本、10例子宫腺肌症和20例子宫肌瘤患者的在位内膜组织的VEGF与MVD的表达,研究其在病理与临床疾病程度的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集本院2002年7月至2003年8月在我院妇科进行腹腔镜手术的50例子宫内膜异位症患者,年龄34~51岁,平均年龄36岁。术前3个月未进行激素治疗,月经规律。按美国生育医学会修订分期(r-AFS)子宫内膜异位症I-II期15例,III-IV期子宫内膜位症35例;增殖期30例,分泌期20例。对照组年龄35岁至49岁,平均42岁,选无增殖型改变、无恶变倾向的切除子宫的患者,其中子宫腺肌症10例,子宫肌瘤21例(作为正常内膜对照),在位内膜增殖期16例,分泌期15例。

1.2 试剂和方法

鼠抗人VEGF单克隆抗体(MAB-0243-1),兔抗人FV III因子相关抗原多克隆抗体(RAB-0700-3),超敏广谱S-P试剂盒均购自福州迈新生物工程公司。标本经中性福尔马林固定,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片4 μm,备5张连续切片,其中1张HE染色,确定诊断,余者进行免疫组化染色。脱蜡,水化后,S-P法按试剂盒进行操作,后经苏木素复染、封片、观察。

1.3 结果判定

VEGF阳性染色为表达于细胞浆内的棕色颗粒。血管第8因子在血管内皮细胞胞浆标记呈棕褐色颗粒。采用德国ZEISS Axiotron研究型显微镜(物镜20倍)经JVC ky-F30B 3-CCD彩色图像摄录输入仪,经德国KONTRON IBAS2.5全自动图像分析系统进行分析。VEGF需进行研究部位的染色强度及面积的定量分析,用平均辉度反映阳性强度,总阳性面积及阳性面积百分率反映阳性分布范围,测

量3个随机病灶部位分别计算出阳性单位,取其平均值,算出相应腺体或间质的阳性单位,具体计算方法参照参考文献[1]。MVD需先经低倍镜(物镜10倍)选取病灶的血管密度最高处,再在物镜20倍观察在内膜细胞间质中染成棕褐色的单个细胞或一圈内皮细胞进行计算机计数。微血管定义为≤8个红细胞。只要与周围小血管、平滑肌或其他间质成分有明显界限视为一个血管,出现分支,在结构上不完全独立,视为一条血管,单个着色内皮细胞或内皮细胞簇视为独立微血管计数。计数3个视野的最高数目的微血管,取平均数。

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.1软件进行分析,计量资料的均数比较采用t检验,相关分析采用双变量相关分析,检验水准α取0.05。

2 结果

2.1 Factor VIII与VEGF在子宫内膜异位病灶的阳性表达

Factor VIII在病灶中主要表现在间质血管内皮细胞胞浆呈棕黄色颗粒状着色;VEGF蛋白阳性表达在异位组织腺上皮细胞与个别间质细胞胞浆呈棕黄色颗粒状着色(图1,2)。

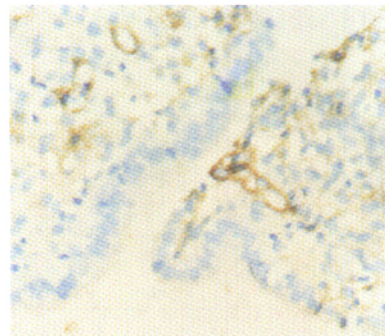


图1 卵巢子宫内膜异位症组织Factor VIII阳性表达
Fig.1 Factor VIII positive expression in ovarian endometriosis lesion

Brown can be seen in endothelial cell of lesion stroma cell(SP stained, HE restain, ×400)

2.2 子宫内膜异位病灶MVD与临床病理关系

在子宫肌瘤在位内膜MVD为(128±43)/mm²,而子宫腺肌症在位内膜MVD(172±61)/mm²,子宫内膜异位病灶MVD(160±53)/mm²,均明显高于子宫肌瘤在位内膜MVD(P<0.05)。子宫腺肌症的在位内膜与子宫内膜异位症病灶MVD

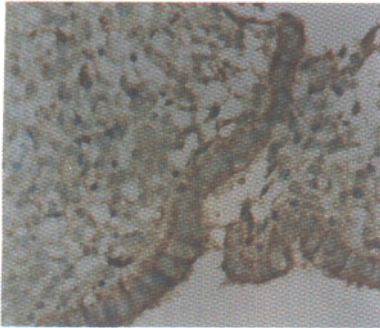


图 2 卵巢子宫内膜异位症组织 VEGF 蛋白阳性表达
Fig.2 VEGF positive expression in ovarian endometriosis tissue

Buffy stained in epithelium and stroma cell of ectopic lesion(SP stain, HE restain, ×400)

未发现与 r-ASRM 相关。

2.3 子宫内位膜异位症与子宫腺肌症在位内膜的 VEGF 表达与 MVD 关系

异位病灶的 MVD 与腺体的 VEGF 阳性单位表达呈明显正相关, $r=0.246, P=0.043$; 与间质的 VEGF 阳性单位表达呈正相关, $r=0.219, P=0.046$ 。同样, 在子宫腺肌症的在位内膜同样存在 MVD 与 VEGF 阳性单位表达的正相关, MVD 与腺体 VEGF 阳性单位的 $r=0.963, P=0.463$; MVD 与间质 VEGF 阳性单位的 $r=0.800, P=0.017$, 说明在子宫内膜异位性疾病不仅存在血管增生与 VEGF 表达增多, 且二者呈正相关。

3 讨论

目前经血返流与种植学说作为子宫内膜异位症发病机理为人们所普遍接受, 在位内膜通过迁移为何能在异位部位生长, 造成病灶的顽固存在与复发, 是我们所进行研究的目。我们通过检测在位内膜与异位内膜的 MVD 的变化, 发现子宫内膜异位病灶区与子宫腺肌症在位内膜的 MVD 明显增高, 提示病灶的形成和维持与血供密切相关, 考虑在子宫内膜异位症的病灶本身亦存在分泌促进血管生成因子。VEGF 是由两个亚基以二硫键相连的二聚体糖蛋白, 相对分子量在 $(34 \sim 46) \times 10^3$, 它通过与血管内皮细胞特异性受体 Flt-1, Flk-1/KDR 结合, 作为内皮细胞特异性有丝分裂原, 起到促内皮增生与血管形成的作用^[2,3]。在正常人的子宫内膜中, VEGF 主要分布在腺上皮及周围散在的间质细胞中, 并且随着卵巢激素的调节呈现周期性变化^[4], 这一点在本实验中得到证实。另外, 我们通过观察与计算异位病灶 VEGF 阳性单位, 证实 VEGF 在异位病灶主要集中在腺上皮细胞内, 少部分散布于间质细胞中, 具有统计学意义, 这一结果与 Donnez 等^[5,6]的结果相同。我们比较子宫内膜异位症病灶与子宫腺肌症在位内膜, 发现 MVD 与 VEGF 同时升高, 存在正相关关系, 并且不随月经周期变化, 不仅提示异位与在位内膜组织存在源性可能, 同时异位病灶的血管生成与 VEGF 的调节可能在不依赖卵巢激素以外的因素^[7,8]。我们推测, 由于返流经血的 VEGF 含量持续增高, 通过刺激血管内皮的增殖、迁移, 诱导血管形成增多, 为异位内膜提供丰富的血供, 为病灶的存在与继续生长提供基础。

值相近 ($P=0.310$), 说明二者的源性可能。在位内膜的分泌期 MVD 为 $(136 \pm 47) / \text{mm}^2$ 而增殖期为 $(143 \pm 41) / \text{mm}^2$ ($P=0.330$); 异位内膜分泌期 MVD 为 $(164 \pm 85) / \text{mm}^2$ 而增殖期为 $(156 \pm 75) / \text{mm}^2$ ($P=0.410$); 其中 I-II 期的内膜异位症病灶 MVD 为 $(161 \pm 87) / \text{mm}^2$, III-IV 期病灶 MVD 为 $(160 \pm 72) / \text{mm}^2$ ($P=0.490$), 无显著差异, 虽然血管的生成在子宫内膜异位症的各个期别均有存在, 但未发现与 r-ASRM 相关。

2.3 子宫内膜异位症 VEGF 表达与临床病理关系

VEGF 在子宫内膜异位症病灶与在位内膜之间的阳性单位比较详见表 1。

表 1 VEGF 在子宫内膜异位症病灶与在位内膜之间的阳性单位比较

Table 1 Comparison of VEGF positive unit between eutopic endometrium and endometriosis (unit/ μm^2)

	Endometrios- iosis	Eutopic endometrium of adenomyosis	Endometrium of myoma
Epithelium	13.7 ± 4.3 ^{1),2)}	9.6 ± 7.2 ¹⁾	9.5 ± 2.4 ²⁾
Stroma	9.3 ± 6.6 ¹⁾	7.3 ± 4.6 ¹⁾	6.9 ± 3.3

1) Compare with endometrium of myoma, t-test, $P < 0.05$; 2) Compare with stroma, t-test, $P < 0.05$

子宫肌瘤在位内膜腺体分泌期 VEGF 是 10.3 ± 2.1 , 而增殖期 8.1 ± 2.3 $P=0.025$, 而在异位子宫内膜还是子宫腺肌病的在位内膜在分泌与增殖期的 VEGF 阳性单位均未发现随着月经周期的变化差异, $P > 0.05$ 。VEGF 阳性单位在位子宫内膜异位病灶无论腺体或间质的增殖与分泌期均

无论检测 VEGF 阳性单位还是 MVD, 均未发现其与临床 r-ASRM 分期相关, 说明存在异位病变范围与病灶活性不相一致的现象, 我们推测病灶活性可能与血管增生、巨噬细胞的富集相关, 而病变范围则与疼痛症状的发生相关, 所以我们仍可通过观察 VEGF 的含量多少与 MVD 来评价病灶的活性与治疗的效果。随着对异位病灶血管生成分子水平的研究深入, 使抗血管生成治疗子宫内膜异位症成为一种可能^[9]。

参考文献:

- [1] 申 洪. 免疫组织化学染色定量方法研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1): 89-91.
- [2] Rosenstein J M, Mani N, Silverman W F, et al. Patterns of brain angiogenesis after vascular endothelial growth factor administration in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(12): 7086-91.
- [3] Tan X J, Lang J H, Liu D Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis[J]. Fertil Steril, 2002, 78(1): 148-53.
- [4] Shifren J L, Tseng J F, Zaloudek C J, et al. Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(8): 3112-8.
- [5] Donnez J, Smoes P, Gillerot S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis[J]. Hum Reprod, 1998, 13(6): 1686-90.
- [6] Khan K N, Masuzaki H, Fujishita A, et al. Immunoexpression of hepatocyte growth factor and c-Met receptor in the eutopic endometrium predicts the activity of ectopic endometrium[J]. Fertil Steril, 2003, 79(1): 173-81.
- [7] Sharkey A M, Day K, McPherson A, et al. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(1): 402-9.
- [8] Kressin P, Wolber E M, Wodrich H, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA in eutopic and ectopic endometrium [J]. Fertil Steril, 2001, 76(6): 1220-4.
- [9] Hull M L, Charnock-Jones D S, Chan C L, et al. Antiangiogenic agents are effective inhibitors of endometriosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(6): 2889-99.

(编辑 张恩健)

· 简 讯 ·

口腔颌面肿瘤综合治疗研修班通知

经国家卫生部继续教育委员会批准, 由中山大学颌面外科中心主办的国家级继续医学教育项目——口腔颌面肿瘤综合治疗研修班(编号 2004082024), 将于 2004 年 9 月 13 日至 9 月 15 日在广州举行。本班采用多媒体系统教学, 由国内外相关知名专家授课, 学员可获 I 类继教学分 10 分。

主要授课内容有口腔颌面部肿瘤临床研究新进展及新观念; 复发性口腔癌挽救性手术; 颌骨肉瘤手术治疗; 成釉细胞瘤颞下窝颅底复发手术治疗; 口腔颌面部肿瘤切除后缺损显微外科功能性重建; 口腔颌面部脉管畸形基础研究与治疗进展; 内窥镜手术治疗前颅底肿瘤, 口腔颌面部恶性肿瘤放射治疗及其并发症防治; 口腔颌面恶性肿瘤化学治疗与免疫治疗; 核素在口腔颌面肿瘤诊治中应用; 癌性疼痛控制; 口腔颌面肿瘤病人心理治疗与晚期癌病人临终关怀; 手术演示——颅底肿瘤切除术。

有意参加者, 请在 2004 年 9 月 10 日前登录网页 (<http://omfsurg.net>) 查询, 下载报名表和网上报名 (E-mail: drchen@vip.163.com)。项目负责人陈伟良, 联系人张幼伦, 张丽娜。电话: 020-81332689 传真: 020-81332833。地址: 广州市沿江西路 107 号中山大学附属第二医院, 邮编: 510120。

中山大学颌面外科中心
中山大学附属第二医院继教科