

[文章编号] 1000-2200(2010)04-0343-04

· 基础医学 ·

血管内皮生长因子及其激酶插入区受体 在卵巢子宫内膜异位症中的表达及意义

翟敬芳¹, 丛林², 欧玉荣³

[摘要] **目的:** 探讨血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及其激酶插入区受体 (kinase insert domain receptor, KDR) 在卵巢子宫内膜异位症 (ovarian endometriosis, OEM) 在位内膜和卵巢异位内膜及其周围卵巢组织中的表达及在 OEM 发病机制中的作用。 **方法:** 应用免疫组织化学 S-P 法测定 VEGF 和 KDR 在 51 例 II ~ III 期 OEM 患者的 44 份卵巢子宫内膜异位囊肿及其邻近卵巢组织、20 份子宫内膜组织及 18 份非子宫内膜异位症 (非内异症) 患者增生期子宫内膜组织中的表达, 并对表达结果进行分析。 **结果:** VEGF 和 KDR 主要分布于子宫内膜及异位内膜的腺上皮细胞质中。VEGF 和 KDR 在卵巢异位上皮的阳性率分别为 63.6%、54.6%, 而在异位上皮邻近卵巢组织的阳性率分别为 6.8%、15.9%, VEGF 和 KDR 在异位内膜的阳性率均高于卵巢异位内膜邻近卵巢组织 ($P=0.0001$ 和 $P=0.0084$), 且两者在异位内膜的表达呈正相关关系 ($P=0.000$)。VEGF 和 KDR 在 OEM 子宫内膜中的阳性率分别为 80.0%、75.0%, 而在非内异症子宫内膜中的阳性率分别为 16.7%、27.8%, VEGF 和 KDR 在在位内膜中的阳性率同对照组子宫内膜阳性率的差异均有统计学意义 ($P<0.01$)。两者在 OEM 卵巢异位内膜和在位内膜上的阳性率相似, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。 **结论:** VEGF 与 KDR 在卵巢异位内膜中的阳性率明显高于邻近卵巢组织, 提示 VEGF 与受体 KDR 协同表达可能与 OEM 血管生成有密切关系。VEGF、KDR 在 OEM 在位内膜的阳性率高于非内异症组子宫内膜, 且两者在 OEM 卵巢异位内膜和在位内膜上的阳性率相似, 支持在位内膜决定论学说。

[关键词] 子宫内膜异位症; 血管内皮生长因子; 激酶插入区受体

[中国图书资料分类法分类号] R 711.71

[文献标识码] A

The significance of the expression of vascular endothelial growth factors and its receptor KDR in ovarian endometriosis

ZHAI Jing-fang¹, CONG Lin², OU Yu-rong³

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Suzhou Anhui 234000;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui 230022;

3. Department of Clinical Pathology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its kinase insert domain receptor (KDR) in eutopic endometrium and ovarian ectopic endometrium and its surrounding ovarian tissue patients with ovarian endometriosis (OEM), and to explore their roles in the mechanism of development of OEM. **Methods:** Using immunohistochemical S-P technique, the expressions of VEGF and KDR were examined and analyzed in the tissue of ovarian ectopic endometrium (44 specimens), ovarian tissue surrounding ectopic endometrium (44 specimens) and eutopic endometrium (20 specimens) from 51 women patients with OEM (stage II ~ III) compared with their expressions in the control proliferative eutopic endometrium without endometriosis (18 specimens). **Results:** VEGF and KDR expressions were mainly located in the cytoplasm of gland epidermis in eutopic and ectopic endometrium. The positive rates of VEGF and KDR proteins in ovarian ectopic endometrium were 63.6% and 54.6%, respectively, while the positive rates in ovarian tissue surrounding ectopic endometrium were only 6.8%, 15.9%, respectively. The positive rates of VEGF and KDR proteins in ovarian ectopic endometrium were both significantly higher than those in ovarian tissue surrounding ectopic endometrium ($P=0.0001$ and $P=0.0084$). And their synchronization expressions in ectopic endometrium were a positive correlation ($P=0.000$). The positive rates of VEGF and KDR proteins in eutopic endometrium with endometriosis were 80.0% and 75.0%, respectively, while the positive rates in eutopic endometrium without endometriosis were only 16.7% and 27.8%, respectively. The difference of VEGF and KDR in eutopic endometrium with endometriosis compared with that without endometriosis was significant ($P<0.01$). The expressions of them in ectopic and eutopic endometrium with endometriosis was similar and not statistical significant ($P>0.05$). **Conclusions:** The expressions of VEGF and KDR in ectopic endometrium tissue were both significantly higher than those in ovarian surrounding tissue. Therefore their synchronization expressions might be relative to angiogenesis in ovarian endometriosis. The expressions of VEGF and KDR in eutopic endometrium with endometriosis were significantly higher than those without endometriosis, and the expressions of them in ectopic and eutopic endometrium with endometriosis were similar, which supported the theory "determinant of uterine eutopic endometrium".

[收稿日期] 2009-04-29

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第三附属医院 妇产科, 安徽 宿州 234000; 2. 安徽医科大学第一附属医院 妇产科, 安徽 合肥 230022; 3. 蚌埠医学院第一附属医院 病理科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 翟敬芳 (1973 -), 女, 硕士, 副主任医师。

[通讯作者] 丛林, 研究生导师, 主任医师。

[Key words] ovarian endometriosis; vascular endothelial growth factor; kinase insert domain receptor

卵巢子宫内膜异位症 (ovarian endometriosis, OEM) 的发病机制至今尚未完全阐明, 近年国内外研究^[1-2] 发现其是一种血管依赖性疾病, 血管生成是 OEM 发生、发展的重要环节, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是此过程中最为关键的细胞有丝分裂原和血管生长因子, 研究^[1] 表明, VEGF 促血管生成主要是通过与其受体 (kinase insert domain receptor, KDR) 结合, 刺激血管形成^[3], 以及增加血管通透性^[4], 为子宫内膜的种植、浸润和远处转移提供合适的物质基础。本实验采用免疫组织化学 S-P 法检测 OEM 患者在位子宫内膜、卵巢异位内膜组织及其邻近卵巢组织和非子宫内膜异位症 (非内异症) 子宫内膜组织中 VEGF 和 KDR 的表达, 以探讨两者在 OEM 血管生成机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料 选择 2003 年 8 月至 2007 年 10 月在蚌埠医学院第三附属医院经腹腔镜或剖腹探查并经病理确诊为 OEM 的 51 例患者, 均为 EMs II ~ III 期, 均符合 1985 年 R-AFS 标准^[5]。取得符合条件的手术标本 64 份 (OEM 卵巢异位内膜及其邻近有卵巢组织各 44 份, 在位增生期子宫内膜组织 20 份), 其中有 13 例同时获得在位子宫内膜和卵巢异位灶含异位腺体或异位腺上皮的标本; 同时选取同期行子宫切除并经病理证实的 18 例非内异症患者无病理改变的增生期子宫内膜作为对照组 (子宫颈原位癌 15 例、子宫脱垂 3 例)。患者术前检查均无内分泌疾病及其内、外科合并症, 月经周期 27 ~ 35 天, 手术前 6 个月无甾体激素治疗史, 无子宫内节育器, 并经手术及病理排除子宫肌瘤及性激素依赖性肿瘤; 子宫内膜期别的划分按照子宫内膜组织形态和 (或) 结合月经周期作出判断。

1.2 分组 将研究对象分为 A 组: OEM 卵巢异位内膜组织 44 份; B 组: OEM 卵巢异位内膜邻近卵巢组织 44 份; C 组: OEM 在位子宫内膜组织 20 份; D 组: 非内异症子宫内膜组织 18 份。

1.3 标本制作及制片 在开腹或腹腔镜手术时及术后, 分别取肉眼见有正常卵巢组织的巧克力囊壁、子宫底部子宫内膜, 用生理盐水漂洗, 后用 10% (体积分数) 甲醛固定, 24 h 内常规脱水、浸蜡、包埋, 3 ~ 4 μm 厚度连续切片, 在相邻切片上分别做常规 HE 和免疫组织化学染色及 PBS 阴性对照。

1.4 试剂与实验方法 兔抗人 VEGF 多克隆抗体

(工作浓度 1:50), 编号 BA0407; 兔抗人 KDR 多克隆抗体 (工作浓度 1:50), 编号 BA0486; 上述抗体及 PBS 均购自武汉博士德生物工程有限公司。免疫组织化学染色采用 S-P 法, 操作均按说明书进行。用 PBS 代替一抗作阴性对照, 用试剂盒中已知阳性切片作阳性对照。

1.5 结果判断 采用组织化学半定量评分法^[6], 将切片分别于低倍和高倍镜下观察, 阳性细胞为镜下组织细胞结构清晰, 细胞质内有棕黄色颗粒沉着, 且染色明显高于背景。全面观察每张切片, 随机选取 10 个具有代表意义的高倍视野 ($\times 400$), 每个视野计数 100 个细胞中的阳性细胞数, 取均数。评分: (1) 阳性细胞百分率: 无细胞显色或阳性细胞 $< 5\%$ 为 0 分; $5\% \sim 25\%$ 细胞显色为 1 分; $26\% \sim 50\%$ 细胞显色为 2 分; $> 51\%$ 细胞显色为 3 分; (2) 显色深浅: 不显色或显色不清为 0 分; 浅黄色为 1 分; 棕黄色为 2 分; 深褐色为 3 分。将上述两者评分相加除以 2 作为该切片的最终评分。将 0、0.5 ~ 1.0、1.5 ~ 2.0、2.5 ~ 3.0 分分别为阴性 (-)、弱阳性 (+)、阳性 (++)、强阳性 (+++), 结果判断在双盲下进行。

1.6 统计学方法 采用 χ^2 检验、四格表确切概率法、等级相关及 Kappa 一致性检验。

2 结果

2.1 VEGF 及 KDR 在细胞中表达 无论在 OEM 的在位内膜和异位内膜、还是非内异症患者的子宫内膜组织中, VEGF 和 KDR 均主要集中在均匀分布在腺上皮细胞质中, 其次在间质血管内皮细胞质中表达, 在间质细胞中散在分布, 而在异位内膜旁卵巢组织仅存在于间质血管内皮细胞的细胞质中 (见图 1 ~ 6), 但在不同组织的阳性率不同。

2.2 VEGF 及其受体 KDR 在 OEM 卵巢异位内膜与邻近卵巢组织上的表达 两者在异位内膜的阳性率均明显高于邻近卵巢组织 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.3 VEGF 及其受体 KDR 在 OEM 在位内膜同非内异症子宫内膜上的表达 两者在 OEM 在位内膜同非内异症子宫内膜上的阳性率差异均有统计学意义 ($P = 0.0001$ 和 $P = 0.0084$) (见表 2)。

2.4 VEGF 及其受体 KDR 在卵巢异位上皮和在位内膜上表达关系的比较 对 13 例同时获取在位和卵巢异位内膜患者 VEGF 及 KDR 在异位和在位内膜上的表达结果进行比较, VEGF 在 OEM 在位内膜同卵巢异位内膜上的表达无等级相关关系 ($P >$

0.05), KDR 在 OEM 在位内膜同卵巢异位内膜上的表达亦无等级相关关系 ($P > 0.05$) (见表 3)。

2.5 OEM 卵巢异位内膜组中 VEGF 及其受体 KDR

表达的关系 两者表达呈正相关关系 ($P = 0.000$) (见表 4)。

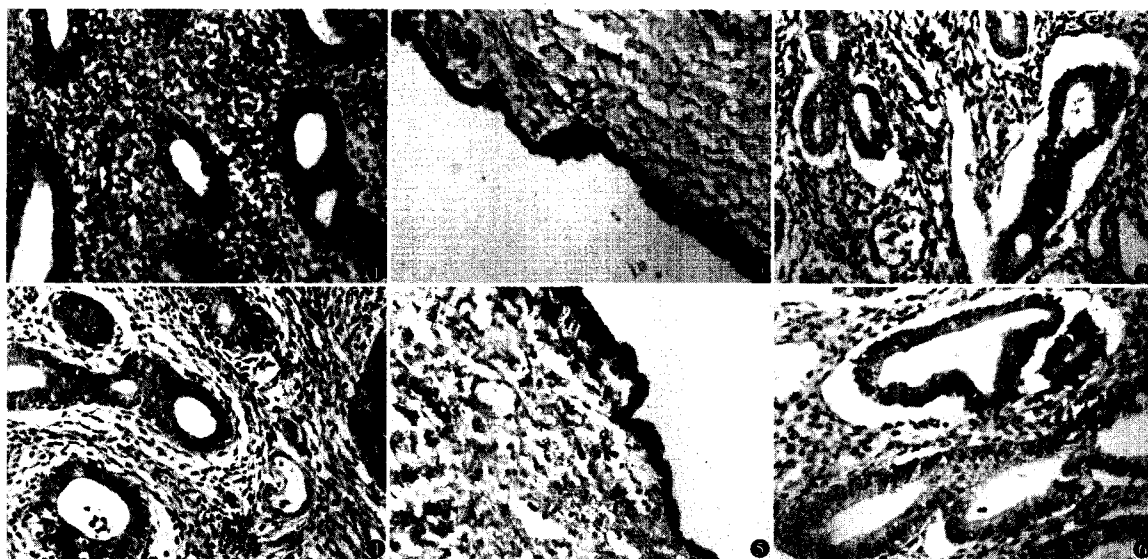


图 1 VEGF 在 OEM 在位子宫内膜的表达 图 2 VEGF 在 OEM 异位内膜及其邻近卵巢组织上的表达 图 3 VEGF 在非内异症子宫内膜上的表达 图 4 KDR 在 OEM 在位子宫内膜的表达 图 5 KDR 在 OEM 异位内膜及其邻近卵巢组织上的表达 图 6 KDR 在非内异症子宫内膜上的表达(图 1-6 均为 S-P 法染色)

表 1 44 份 OEM 患者卵巢异位内膜与邻近卵巢组织 VEGF 和 KDR 的表达比较(n)

A 组 VEGF 表达	B 组 VEGF 表达			A 组 KDR 表达	B 组 KDR 表达		
	阳性	阴性	合计		阳性	阴性	合计
阳性	2	26	28	阳性	5	19	24
阴性	1	15	16	阴性	2	18	20
合计	3	41	44	合计	7	37	44
χ^2	21.33			12.19			
P	<0.01			<0.01			

表 2 C 组和 D 组 VEGF 和 KDR 的表达比较[n; 阳性率(%)]

分组	n	VEGF 阳性	P	KDR 阳性	P
C 组	20	16(80.0)		15(75.0)	
D 组	18	3(16.7)	0.000 1	5(27.8)	0.008 4
合计	38	19(50.0)		20(52.6)	

表 3 VEGF 和 KDR 在卵巢异位上皮和在位子宫内膜上的表达比较

编号	VEGF 表达		KDR 表达	
	卵巢异位上皮	在位子宫内膜	卵巢异位上皮	在位子宫内膜
1	++	+++	+	+++
2	+	+	++	+
3	++	-	+++	-
4	++	++	+	++
5	-	-	-	-
6	+	+	+++	+
7	++	+	++	+
8	-	++	-	++
9	+++	-	++	-
10	++	+	+++	+
11	-	+	-	+
12	+	-	+	-
13	+	+	+	+
r_s	-0.05		-0.223	
P	>0.05		>0.05	

表 4 44 例 OEM 卵巢异位内膜中 VEGF 及其受体 KDR 表达的关系

VEGF 表达	KDR 表达				合计	Kappa 指数	P
	-	+	++	+++			
-	15	1	0	0	16	0.360	0.000
+	0	7	4	2	13		
++	0	7	2	2	11		
+++	0	0	4	0	4		
合计	15	15	10	4	44		

3 讨论

3.1 OEM 中 VEGF 及其受体 KDR 的表达 本文研究结果表明, VEGF 主要定位于在位及异位腺上皮细胞质中, 这与朱慧莉等^[7]研究结果一致。VEGF 在卵巢异位内膜上的阳性率明显高于邻近卵巢组织 ($P < 0.01$), 且在 OEM 在位内膜较非内异症子宫内膜中的阳性率明显升高 ($P < 0.01$), 与 Tan 等^[8-9]研究

VEGF 在 DEM 在位内膜中与异位内膜中高表达结果相似。上述结果证实, VEGF 可能参与 OEM 在位内膜和异位内膜血管形成过程的调控, VEGF 在位内膜的高表达说明 DEM 在位内膜易于种植, VEGF 在卵巢异位内膜的高表达有利于异位的子宫内膜黏附种植以及卵巢异位病灶的形成。VEGF 促血管内皮细胞分裂和增生是通过特异的受体介导起作用的^[10]。本实验同时显示受体 KDR 与 VEGF 在 OEM 中组织定位表达相一致, 与王含必等^[11]研究 KDR 在 DEM 中定位结果相一致, 但我们的实验结果 KDR 在 DEM 在位内膜的阳性率较非 DEM 子宫内膜高 ($P < 0.01$), 此点与王含必等应用免疫组织化学、RT-PCR 等方法研究 KDR 在 DEM 中的表达结果不一致, 可能是我们的在位内膜实验标本量少所致, 有待进一步实验。

3.2 OEM 中 VEGF 促血管生成的可能机制 本次实验证实 VEGF 及其受体 KDR 组织定位结果相似, 提示 VEGF 可能通过自分泌和旁分泌机制作用于 KDR 受体, 刺激异位内膜腺上皮细胞的增殖及血管内皮细胞的增生、移位和血管形成。另外, 从 VEGF 与 KDR 在表达上的相关性结果看, KDR 的表达与 VEGF 表达有同步升高的关系, 说明 VEGF 和 KDR 的同步表达可能与 OEM 血管生成有密切关系: VEGF 是通过其受体发挥生物学效应的, 也可以解释目前公认的 VEGF 对内皮细胞的增殖、分化作用是由 KDR 介导的^[12]。另外, 有研究^[13]表明, VEGF 可上调 KDR 的表达, 我们发现 VEGF 和受体 KDR 在异位内膜的表达呈正相关关系, 上述 VEGF 和 KDR 在相同部位的高表达一方面提示 VEGF 促血管生成作用可能通过受体 KDR 来实现, 同时可能还有上调 KDR 的作用; 另一方面, VEGF 和受体 KDR 在 DEM 在位内膜中的定位结果与 Möller 等^[14]的检测 VEGF 及其受体在正常子宫内膜表达结论相吻合, 提示 VEGF 的作用可能不仅局限于调控血管形成, 还可能作用于子宫内膜的腺细胞和间质细胞。异位内膜上的上述两因子的相关表达同样提示异位内膜 VEGF 的作用也可能存在上述调控机制, 可能通过调控局部血管形成及作用于异位内膜的腺细胞和间质细胞而诱发 DEM。

目前, 学者们普遍接受的子宫内膜异位症发病理论是 Sampson (20 世纪 20 年代) 提出的经血逆流种植学说, 但不能解释 85% ~ 90% 妇女有经血逆流而只有 10% ~ 15% 罹患 DEM, 郎景和于 1994 年以此首次提出“在位内膜决定论”。Print 等^[15]将 DEM 子宫内膜进行培养并提取上清液检测 VEGF-A, 证明体外培养的人子宫内膜能够分泌含有包括 VEGF-A 在内的可溶性物质促进血管形成, 说明子宫内膜

具有特殊的生物学特征。本次实验结果显示, VEGF 和 KDR 在 OEM 组在位内膜的阳性率高于非 DEM 组子宫内膜, 且两者在 13 例 OEM 卵巢异位病灶上的表达阳性与在位内膜相似, 从血管形成的分子机制上说明卵巢异位病变极有可能源自异位种植的子宫内膜, 以上结果均支持在位内膜决定论学说。

(感谢安徽医科大学公共卫生学院潘发明教授对本文统计学方面给予的帮助。)

[参 考 文 献]

- [1] Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, *et al.* The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions [J]. *Reproduction*, 2006, 132(3):501-509.
- [2] 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.
- [3] Nisolle M, Casanas-Roux F, Marbaix E, *et al.* Transplantation of cultured explants of human endometrium into nude mice [J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(3):572-577.
- [4] Zygmunt M, Herr F, Münstedt K, *et al.* Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003, 110 (Suppl):S10-S18.
- [5] 曹泽毅. 中华妇产科学 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003:1492-1493.
- [6] 蒋红清, 李亚里, 陈浩, 等. 血管内皮生长因子 C 和受体 3 在子宫内膜异位症的表达及意义 [J]. *军医进修学院学报*, 2007, 28(2):99-101.
- [7] 朱慧莉, 黄薇. VEGF 在子宫内膜异位症发病机制中的作用 [J]. *现代妇产科进展*, 2006, 15(9):678-680, 插 1.
- [8] Tan XJ, Lang JH, Liu DY, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 mRNA in patients with endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(1):148-153.
- [9] Donnez J, Smoes P, Gillerot S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis [J]. *J Human Reprod*, 1998, 13(6):1686-1690.
- [10] Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor [J]. *J Mol Med*, 1999, 77(7):527-543.
- [11] 王含必, 郎景和, 冷金花, 等. 血管内皮细胞生长因子受体在子宫内膜异位症中表达的研究 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(22):1555-1559.
- [12] Witte L, Hicklin DJ, Zhu Z, *et al.* Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk1/KDR) as anti-angiogenic therapeutic strategy [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 1998, 17(2):155-161.
- [13] Takekoshia K, Isobea K, Yashirob T, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in human pheochromocytomas [J]. *Life Sci*, 2004, 74(7):863-871.
- [14] Möller B, Rasmussen C, Lindblom B, *et al.* Expression of the angiogenic growth factors VEGF, FGF-2, EGF and their receptors in normal human endometrium during the menstrual cycle [J]. *Mole Hum Reprod*, 2001, 7(1):65-72.
- [15] Print C, Valtal R, Evans A, *et al.* Soluble factors from human endometrium promote angiogenesis and regulate the endothelial cell transcriptome [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(10):2356-2366.