

## • 临床研究 •

## 基于“3A 学说”探讨逐瘀汤对子宫内膜异位症大鼠 VEGF 表达的影响

福建中医药大学附属人民医院(福州 350004) 张璇 章斌斌 陈仔颖

**【摘要】** 目的 基于“3A 学说”探讨逐瘀汤对子宫内膜异位症(EMS)大鼠 VEGF 的影响。方法 采用自体移植方法建立 EMS 模型,将建模成功的大鼠采用随机数字表法分为对照组、米非司酮组及逐瘀汤组,选取正常饲养 SD 大鼠作为假手术组,每组 20 只。采用 ELISA 法检测各组大鼠治疗前、治疗后血清 VEGF 水平;采用 Western blot 法检测各组腹腔移植组织 VEGF 蛋白表达情况;采用 RT-PCR 法检测各组腹腔移植组织 VEGF mRNA 表达情况。结果 1)治疗前与假手术组比较,其他 3 组大鼠血清中 VEGF 水平显著升高( $P < 0.05$ );治疗后,米非司酮组、逐瘀汤组大鼠血清中 VEGF 水平较对照组显著降低( $P < 0.05$ );米非司酮组与逐瘀汤组大鼠血清 VEGF 水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。2)治疗后米非司酮组与逐瘀汤组大鼠腹腔移植组织 VEGF 蛋白表达较对照组明显降低( $P < 0.05$ ),米非司酮组与逐瘀汤组表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。3)治疗后,与对照组相比,米非司酮组和逐瘀汤组大鼠异位内膜组织 VEGF mRNA 表达水平均明显降低( $P < 0.05$ ),米非司酮组与逐瘀汤组表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 逐瘀汤能降低 EMT 大鼠血清中 VEGF 水平,可以减轻异位内膜组织中 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达。

**【关键词】** 逐瘀汤;子宫内膜异位症大鼠;VEGF

**【中图分类号】** R711.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)01-0001-04

**Effect of Zhuyu decoction on the VEGF levels of rats with endometriosis based on the 3A theory** ZHANG Xu-an, ZHANG Binbin, CHEN Zaiying. The Affiliated People's Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China

**【Abstract】** **Objective** To explore the effect of Zhuyu decoction on the VEGF levels in rats with endometriosis based on the 3A theory. **Methods** By autologous transplantation, the EMS rats models were successfully established. These models were randomly divided into model control group, mifepristone group and Zhuyu decoction group through method of random number table. Normal feeding SD rats were selected as sham operation group. Each group included 20 rats. The serum levels of VEGF of each group were tested through ELISA before and after treatment. The levels of VEGF expression in endometriosis were detected by Western blot. And the level of VEGF expression in ectopic tissues were detected by Fluorescence quantitative PCR. **Results** ① Compared with the sham operation group, the serum levels of VEGF in other groups were significantly increased before treatment ( $P < 0.05$ ). After treatment, the serum levels of VEGF in the mifepristone group and the Zhuyu decoction group were significantly lower, compared with the model control group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the serum level of VEGF between the mifepristone group and the Zhuyu Decoction group ( $P > 0.05$ ). ② After treatment, the protein expression of VEGF in the abdominal graft tissue in the mifepristone group and the Zhuyu decoction group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and the protein expression of mifepristone group and Zhuyu decoction group was not significantly different ( $P > 0.05$ ). ③ After treatment, the serum level of VEGF gene expression in the mifepristone group and the Zhuyu decoction group was lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference in the serum level of VEGF gene expression between the mifepristone group and the Zhuyu decoction group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Zhuyu decoction can reduce the serum VEGF of rats with endometriosis, thus reduce the protein and mRNA expression of VEGF.

**【Key words】** Zhuyu decoction; endometriosis; VEGF

随着女性晚婚晚育、腹腔镜微创技术发展,确诊的子宫内膜异位症(EMS)明显升高,不完全统计发病率高达 20%~40%<sup>[1]</sup>。EMS 属于良性病变,但临床表现有种植、转移等恶性行为,被称为妇科

的“良性癌”。发病机制目前临床种植学说占主导地位,该学说中经血逆流传播途径被临床广泛认可。我国妇科郎景和院士补充提出“3A 学说”,即异位的内膜组织能够存活,需要经过内膜异位黏

附、侵袭、新生血管形成才可形成 EMS。异位的内膜组织新生血管建立是形成 EMS 的基础条件,因此有研究显示,EMS 是一种血管生成依赖性疾病,血管生成因子是其病变中的一个重要因素<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子(VEGF)能促进血管再生、血管内皮细胞存活和增殖,协调血管生成,同时也可反映血管生成的活性<sup>[3]</sup>,在新血管生成和重建过程发挥非常关键的作用,为异位的内膜能够存活、种植成功、形成病灶提供必要条件。因此,VEGF 的抑制剂成为目前医疗界治疗 EMS 新药物研究的方向。

传统医学没有 EMS 记录,但是中药在 EMS 临床治疗上有丰富的经验,故全国中医药高等教育“十三五”教材中,第一次编撰 EMS 的中医辨证。目前 EMS 的治疗以手术+药物治疗为金标准,手术可能损伤卵巢功能,术后抑制卵巢功能的常用药物可能导致卵巢功能下降,而中医药的治疗副作用较小,并且可以调节已经下降的卵巢功能,有明确的临床效果,但具体机理不详。本研究选择检测 EMS 大鼠 VEGF 血清、异位内膜蛋白及基因表达,探讨逐瘀汤对 EMS 大鼠 VEGF 的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料:** 1) 动物: 雌性大鼠 80 只,体质量(300±50) g,实验动物生产许可证号: SCXK(浙)2019-0002,实验过程遵循实验动物伦理学规范。2) 药物: 逐瘀汤由蒲黄、五灵脂、当归、桃仁、元胡、川芎、马鞭草、炙甘草等药物组成(我院中药房提供),煎煮液浓缩至 150 mL 左右,相当于生药 0.5 g/mL; 米非司酮(华润紫竹药业有限公司,批号: 191202); 苯甲酸雌二醇注射液[上海全宇生物科技(驻马店)动物药业有限公司,(2015)兽药生产证字 16323 号,批号: 190504]; 水合氯醛(福州文莱生物科技有限公司,批号: 20200105); 庆大霉素(三明三药兽药有限公司,批号: 181104)。3) 主要试剂及仪器: ①ELISA 检测: ELISA 试剂盒(博士德生物科技有限公司生产,批号: 2541667817); SC-3614 台式低速冷冻离心机(福州朗峰医疗器械有限公司)。②Western blot 检测: a 试剂: Bio-rad 公司的 10% Criterion™ Tris-HCl Gel (12+2 well, 45 μL) 及 Precision Plus Protein Dual Xtra Standard; 电泳液、转膜液、封闭液、β-Actin 抗体 Ab6276。b 仪器: Thermo Fisher 公司的超低温冰箱, HFU586, 台式冷冻离心机, Primo R; Bio-rad 公司的基础电

泳仪电源, 小型垂直电泳槽, 小型转印槽; 美国(WEALTEC)公司的凝胶成像系统。③PCR 检测: a 试剂: Qiagen 公司 RNeasy® Mini Kit 及 Thermo Scientific 公司的 Revertaid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 及 Applied Biosystems 公司的 SYBR® PrEmix Ex Taq™。b 仪器: Bio-rad 公司的基础电泳仪电源, PCR 仪; Thermo Scientific 公司的超微量分光光度计, 台式冷冻离心机。

## 1.2 造模及干预方法:

**1.2.1 动物模型制备:** 选用自体移植法建立 EMS 大鼠模型<sup>[4]</sup>。统一发情周期: 肌肉注射苯甲酸雌二醇(0.1 mg/kg) 0.1 mL 3 d, 使用 10% 水合氯醛麻醉, 按 300 mg/kg 约 5 mL 腹腔注射麻醉, 麻醉成功后, 切除 5 mm×5 mm 的子宫内膜, 选腹腔内血管丰富处人工种植, 术毕。术后, 统一注射庆大霉素(0.4 万 U/只) 5 d 预防感染。注射苯甲酸雌二醇(0.1 mL) 促进异位内膜生长。手术后 3 周将大鼠麻醉, 开腹查看造模实验情况, 根据文献确定造模是否成功, 成功条件: 测量大鼠体内的 EMS 包块的体积(≥8 mm<sup>3</sup>), 或者看到明显的透明的泡囊状 EMS 包块, 且泡囊边可见新生血管成长<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 分组与用药方法:** 1) 分组: 选取建模成功的 SD 大鼠 60 只, 采用随机方法分为对照组、米非司酮组及逐瘀汤组各 20 只; 假手术组 20 只, 采取腹部开关手术, 不进行移植内膜手术, 作为对照。2) 用药方法: 假手术组、对照组给予生理盐水 10 mL/(kg·d) 约 3 mL 灌胃; 米非司酮组给予 0.1 mg/mL 的米非司酮药液约 3 mL 灌胃; 逐瘀汤组给予配好的汤剂 3 mL 灌胃。持续给药 28 d 后, 处死大鼠、腹主动脉取血。实验过程中对照组及假手术组各有死亡大鼠 1 只; 逐瘀汤组和米非司酮组各死亡大鼠 3 只。死亡原因: 手术时感染死亡 2 只, 灌药过程中窒息死亡 6 只。

**1.2.3 取材:** 治疗前取大鼠尾血-80℃保存。治疗后处死大鼠, 取腹主动脉血, 取腹壁异位灶送检, 对照组取正常子宫内膜送检。

**1.3 检测指标:** 1) ELISA 法检测各组大鼠治疗前后血清 VEGF 值。2) Western blot 检测内异位灶组织 VEGF 蛋白表达水平。3) 荧光定量 PCR 检测异位灶组织 VEGF mRNA 表达水平。

**1.4 统计学方法:** 采用 SPSS 20.0 软件分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 动物一般情况：**4 组大鼠体质量、毛色、进食、饮水均无明显变化，造模成功的 3 组大鼠相对烦躁、易怒、攻击性强，符合血瘀证表现。经治疗后米非司酮组和逐瘀汤组大鼠血瘀表现烦躁、易怒等有所缓解。

### 2.2 VEGF 检测情况：

**2.2.1 血清 VEGF 水平：**治疗前与假手术组比较，其他 3 组大鼠 VEGF 在血清中的水平显著升高 ( $P < 0.05$ )；治疗后，米非司酮组、逐瘀汤组大鼠 VEGF 血清水平较对照组降低 ( $P < 0.05$ )；米非司酮组与逐瘀汤组大鼠 VEGF 血清水平比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组治疗前后血清 VEGF 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	VEGF
假手术组 (19 只)	
治疗前	188.41 ± 17.08
治疗后	180.66 ± 14.19
对照组 (19 只)	
治疗前	312.51 ± 15.81 *
治疗后	326.38 ± 13.09
米非司酮组 (17 只)	
治疗前	311.14 ± 13.09 *
治疗后	224.88 ± 23.86 $\Delta$
逐瘀汤组 (17 只)	
治疗前	313.69 ± 11.13 *
治疗后	232.00 ± 13.55 $\Delta$

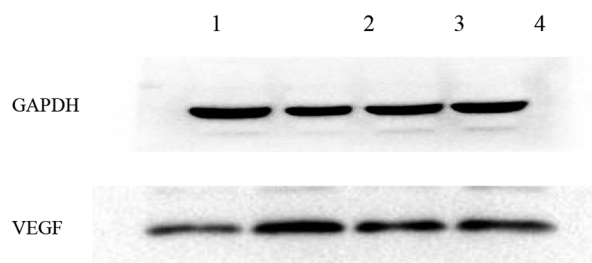
注：与假手术组治疗前比较，\*  $P < 0.05$ ；与对照组治疗后比较， $\Delta P < 0.05$ 。

**2.2.2 组织 VEGF 蛋白表达：**治疗后米非司酮组与逐瘀汤组大鼠腹腔移植组织 VEGF 蛋白表达较对照组降低 ( $P < 0.05$ )，米非司酮组与逐瘀汤组 VEGF 蛋白表达变化不明显 ( $P > 0.05$ )，见图 1。分析 VEGF 蛋白表达，以目的条带光密度比值作为衡量参数分析，计算光密度值/内参 GAPDH 条带的光密度值。结果见表 2。

表 2 治疗后 VEGF 蛋白及 mRNA 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	VEGF 蛋白	VEGF mRNA
假手术组 (19 只)	0.60 ± 0.04	1.00 ± 0.02
对照组 (19 只)	1.06 ± 0.11 *	1.31 ± 0.06 *
米非司酮组 (17 只)	0.81 ± 0.04 * $\Delta$	1.23 ± 0.05 * $\Delta$
逐瘀汤组 (17 只)	0.79 ± 0.05 * $\Delta$	1.21 ± 0.05 * $\Delta$

注：与假手术组比较，\*  $P < 0.05$ ；与对照组比较， $\Delta P < 0.05$ 。



注：1 假手术组；2 对照组；3 米非司酮组；4 逐瘀汤组。

图 1 组织 VEGF 蛋白 Western blot 表达图谱

**2.2.3 组织 VEGF mRNA 表达：**治疗后米非司酮组与逐瘀汤组 EMS 大鼠腹腔移植组织中的 VEGF mRNA 表达水平较对照组明显降低 ( $P < 0.05$ )，米非司酮组与逐瘀汤组 VEGF mRNA 表达差异不明显 ( $P > 0.05$ )。以相应的内参电泳条带作为参照，计算 VEGF mRNA 与内参条带之间积分光密度的比值。见表 2。

## 3 讨论

EMS 是一种在绝经前临床无法完全治愈的疾病。《古方汇精》中曾记载<sup>[5]</sup>：“逆经痛，患此难以受孕”，明确提出逆经痛，与现代认知一致；但是 EMS 发生发展机制仍不完全明确。Sampson 于 1927 年提出的“经血逆流”仍然是最被认可的理论，但这种理论并不能解释 EMS 发病的整个过程，因为经血逆流几乎是一个非常普遍的事件，在育龄期女性每个月基本都有反流，经血通过输卵管进入盆腔，而 EMS 的患病率仅为 20% 左右。研究表明，“经血逆流”可能只是疾病发生发展的基础，不能全面解释 EMS 的临床表现及频繁复发，特别是医源性剖腹产疤痕处的内异症的直接植入。我国郎景和院士<sup>[1]</sup>提出了“在位内膜决定论”，指出在 EMS 的形成过程中必然经历黏附、侵袭和新生血管形成，即“3A 模式”，黏附是入侵的第一步，侵袭至深层是第二步，新生血管形成是第三步，此三步是 EMS 发病的必要条件<sup>[6]</sup>。“3A”学说可以清晰地阐明内异症早期的火焰状病变、中期的紫蓝色结节以及后期白色病变的病理表现。因为 VEGF 是血管新生中最重要的因子，可以促进血管生成过程<sup>[7]</sup>，所以 VEGF 的相关抑制药物成为研究热门。

《血证论》记载：离经之血皆为瘀，凡血证总以去瘀为要<sup>[8]</sup>。根据 EMS 的病理特征：异位内膜异常周期性出血皆属于离经之血，故中医治则为活血化瘀。现代的实验研究已经从细胞角度及炎症通路角度证实活血化瘀类药物具有明确的抗炎作用，

可以促进局部瘀血、炎性瘢痕的吸收,能够明确改善 EMS 患者的盆腔环境<sup>[9]</sup>。本研究中的逐瘀汤是福建省名中医王惠珍教授在长期临床实践中的经验方,由蒲黄、五灵脂、当归、桃仁、元胡、川芎、马鞭草、炙甘草等药物组成,方中以失笑散(蒲黄、五灵脂)为君,化瘀止血,散瘀止痛,直接针对内异症导致的离经之血;当归、川芎、桃仁为臣,破血行瘀,行气止痛,配合君药,加强对内异症离经之血的化和散;马鞭草、元胡为佐,取其清热解毒,行气利水消肿,促进内异症局部炎症的消散;炙甘草调和诸药为使,该方组方精简,活血化瘀,理气止痛的功效不减,临床可以酌情加减。我们团队前期研究中,已证实逐瘀汤治疗 EMS 有明显的临床效果,能提高合并不孕的 EMS 患者的妊娠率,而且对 EMS 患者血清的 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  炎症因子水平有明显的抑制作用<sup>[10-12]</sup>。

本研究选用在 EMS 发病中占有重要地位的 VEGF,比较各组大鼠血清中 VEGF 水平,以及 VEGF 的蛋白和 mRNA 的表达水平,结果显示:建模成功的 EMS 大鼠 VEGF 血清中的水平较假手术组明显升高,EMS 大鼠腹腔移植组织 VEGF 的蛋白表达和 mRNA 的表达水平较假手术组均升高,证实 EMS 与 VEGF 有密切的关系,是血管生成依赖性疾病。经过研究药物治疗后逐瘀汤组和米非司酮组血清 VEGF 的水平明显下降,而两组之间无明显差异,EMS 大鼠腹腔移植组织 VEGF 蛋白表达和 mRNA 的表达水平较对照组均有下降,差异有统计学意义,这证实逐瘀汤、米非司酮均可降低 EMS 大鼠的血清 VEGF 水平,降低内异症病灶中 VEGF 的蛋白表达,下调内异症病灶中 VEGF mRNA 的表达。多渠道证实逐瘀汤对 EMS 大鼠的 VEGF 有明确的影响。逐瘀汤组与米非司酮组比较,两组大鼠血清中 VEGF 水平差异无统计学意义,VEGF 的蛋白表达及 mRNA 无明显差异。2018 年 EMS 中国专家共识认为:由于 EMS 的高复发率,建议使用药物长期管理,避免重复手术操作<sup>[13]</sup>,作为临床治疗的金标准,手术与药物联合疗法,经治疗后对卵巢功能的抑制及损伤,是临床必须面对的问题。

本研究证实,逐瘀汤可以降低大鼠血清 VEGF,减少内异症病灶中 VEGF 的蛋白及 mRNA 表达,表明逐瘀汤可能是通过降低 EMS 大鼠的 VEGF 抑制异位内膜的血管形成,从根本上抑

制 EMS 的发生以及复发。通过实验证实逐瘀汤对 EMS 有确切的治疗作用,本团队多次的研究证实逐瘀汤对 EMS 的治疗,可能是通过多渠道抑制血管再生,抑制炎症因子,促进盆腔环境恢复,且对卵巢功能影响较小。希望在以后的临床中推广应用中药治疗 EMS。

## 参考文献

- [1] 郎景和,冷金花,周应芳,等. 子宫内异位症 [J]. 现代妇产科进展, 2006, 15 (3): 161-172.
- [2] Rashidi B H, Sarhangi N, Aminimoghaddam S, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) Gene polymorphisms and expression with the risk of endometriosis: a case-control study [J]. Mol Biol Rep, 2019, 46 (3): 3445-3450.
- [3] Mohamed M L, El Behery M M, Mansour S A. Comparative study between VEGF-A and CA-125 in diagnosis and follow-up of advanced endometriosis after conservative laparoscopic surgery [J]. Arch Gynecol Obstet, 2013, 287 (1): 77-82.
- [4] Zheng P, Mei J, Leng J, et al. Evaluation of the brain functional activities in rats various location-endometriosis pain model [J]. Ann Transl Med, 2019, 7 (23): 767.
- [5] 爱虚老人. 《古方汇精》 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2016: 118-191.
- [6] 郎景和. 子宫内异位症的基础与临床研究 (第 1 卷) [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 11-13.
- [7] Vigano P, D'apres la communication de. Perspectives on endometriosis: new physio-pathologic approaches and treatments [J]. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2003, 32 (8): S28-S31.
- [8] 唐宗海. 《血证论》 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 33-35.
- [9] Liang R, Zhao Q, Jian G, et al. Tanshinone IIA Attenuates Contrast-Induced Nephropathy via Nrf2 Activation in Rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46 (6): 2616-2623.
- [10] 张璇,王小红,林妍,等. 逐瘀汤对血瘀型子宫内异位症性不孕的疗效观察 [J]. 福建医药杂志, 2017, 39 (5): 101-103.
- [11] 陈捷,张璇,陈丽笙,等. 腹腔镜配合自拟逐瘀汤治疗血瘀型子宫内异位症的临床观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33 (2): 29-31.
- [12] 张璇,庄良武,陈蓉艳,等. 逐瘀汤对子宫内异位症大鼠白介素 6、白介素 8、肿瘤坏死因子  $\alpha$  的影响 [J]. 成都中医药大学学报, 2021, 44 (2): 49-52.
- [13] 中国医师协会妇产科医师分会子宫内异位症专业委员会 中华医学会妇产科学分会子宫内异位症协作组. 子宫内异位症长期管理中国专家共识 2018 [J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53 (12): 836-838.