

· 临床 ·

## 补肾活血方调节在位内膜蛋白质表达 治疗子宫内膜异位症不孕机制研究

徐珉<sup>1</sup>, 田滢舟<sup>1</sup>, 何田田<sup>2</sup>, 邓雪梅<sup>1</sup>, 黄黛苑<sup>1</sup>, 陈梅芬<sup>1</sup>, 黄健玲<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学第二临床医学院妇科, 广州 510120; 2. 广东省妇幼保健院中医科, 广州 510010)

**[摘要]** **目的:**比较观察子宫内膜异位症(endometriosis, Ems)相关不孕患者与正常育龄期妇女在位子宫内膜的蛋白质表达差异及中药补肾活血方对其调节作用。**方法:**提取正常育龄期妇女、Ems不孕患者服用补肾活血方治疗3个月前后的分泌中期子宫内膜各4例,利用差速离心和密度梯度离心方法来提取纯化内膜蛋白质,采用荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)标记、分离蛋白质,Decyder差异分析软件进行分析、识别差异表达蛋白质,并应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF)得到相应差异蛋白的肽质量指纹图谱,然后搜索数据库鉴定部分差异蛋白质点。**结果:**分析得到35个差异蛋白质点,质谱鉴定出28种差异蛋白。**结论:**分析预测Ems不孕发生的5种可能机制,涉及10种蛋白;补肾活血方作用于26种蛋白从4种可能机制修复Ems不孕患者在位内膜缺陷。

**[关键词]** 补肾活血方; 子宫内膜异位症; 不孕; 在位内膜; 蛋白质组学

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0306-05

**[doi]** 10.11653/syfyj2013190306

## Mechanism of Regulating Ectopic Endometrium Protein Expression by Bushen Huoxue Recipe in Treatment of Endometriosis Associated Infertility

XU Min<sup>1</sup>, TIAN Ying-zhou<sup>1</sup>, HE Tian-tian<sup>2</sup>, DENG Xue-mei<sup>1</sup>,  
HUANG Dai-yuan<sup>1</sup>, CHEN Mei-fen<sup>1</sup>, HUANG Jian-ling<sup>1\*</sup>

(1. Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Tradition Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China; 2. Chinese Medicine Department of Maternal and Children Health Care Centers of Guangdong Province, Guangzhou 510010, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare the uterus protein expression differences between endometriosis (Ems) correlation infertile patients and normal women of reproductive age, and study the mechanism of Bushen Huoxue recipe (BSHXR). **Method:** Four cases of Ems infertility patients with kidney deficiency and blood stasis syndrome diagnosed by laparoscopic surgery were observed. Ectopic endometria were collected during the laparoscopic surgery as Ems group. BSHXR was given to Ems patients after the surgery, lasting for three months, the ectopic endometria were collected after the treatment course as BSHXR group. Besides, four healthy women's endometria were collected three months after drug-induced abortion as normal control group. All the endometrial samples were pathologically diagnosed as secretory phase endometrium. Differential centrifugation and density gradient centrifugation method were applied to extract purified endometrial proteins. Difference gel electrophoresis (DIGE) technology were used to get the expression patterns of ectopic endometria differential proteome. Decyder difference 2-D analysis software were used to analysis. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry

**[收稿日期]** 20130314(004)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2008B030301217)

**[通讯作者]** \*黄健玲,主任医师,教授,博士生导师,从事中医药对女性生殖器官炎症及不孕症的调治研究, Tel:13609020839, E-mail: huangjianling2006@163.com

(MALDI-TOF/TOF) were used to identify among these differential protein spots. **Result:** Through establishing the differential proteome technology platform of ectopic endometrial proteins among 3 groups. 35 different express proteins were found by differential software analysis, 28 different proteins were identified by using mass spectrometry identification. **Conclusion:** Five possible mechanisms of Ems-associated infertility were predicted involving 10 different express proteins. BSHXR can regulate 26 different express proteins by 4 possible mechanisms to treat ectopic endometria of patients with Ems-associated infertility.

[**Key words**] Bushen Huoxue recipe; endometriosis; infertility; ectopic endometria; proteomics

子宫内膜异位症(endometriosis, Ems)是育龄妇女的多发病、常见病,发病率呈明显上升趋势,约占育龄妇女的7%~50%<sup>[1]</sup>, Ems患者并发不孕高达40%~60%<sup>[2]</sup>。其发病机制尚不明确,亦缺乏有效的诊断、治疗方法。许多临床及实验研究显示,中医补肾活血法能有效提高 Ems 患者的受孕率,但其确切作用机制及作用靶点仍未有定论。蛋白质组学研究技术作为生命科学研究的前沿技术,具有敏感、准确、高通量、快速的优点,为 Ems 的研究提供了强有力的工具。本研究利用蛋白质组学技术筛选 Ems 不孕患者在位内膜与正常育龄期女性子宫内膜及 Ems 不孕患者使用补肾活血方干预前后在位内膜中差异表达的蛋白质,深入探讨 Ems 不孕的发病机制及中药补肾活血方治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 Ems 诊断标准** 参考《子宫内膜异位症的诊断与治疗规范》<sup>[3]</sup>,以腹腔镜下见到内异症病灶作为诊断金标准。

**1.2 中医辨证标准** 参照文献辨证标准<sup>[4]</sup>:①禀赋虚弱,兼有房劳及手术创伤史;②经行或经后腹痛、腰骶酸痛,引及腰胯及下肢;③经行不畅,量或多或少,色暗,有血块;④不孕,即使怀孕易于流产;⑤舌黯滞,或有瘀点、瘀斑,苔薄白,脉沉细而涩。

**1.3 纳入及排除标准** 纳入标准:年龄20~35岁;符合不孕症诊断,经腹腔镜检查确诊子宫内膜异位症诊断;符合中医辨证肾虚血瘀诊断标准;月经规律,既往3个月基础体温双向,静脉血性激素水平在正常范围内,盆腔B超排除子宫肌瘤;配偶查精液检查结果符合WHO正常精液标准;3个月内未服用性激素类药物;血常规、血脂及其他生化指标均在正常范围内,心电图常规检查正常,排除肝、肾、内分泌和心血管疾病;输卵管造影证实双侧输卵管均通畅;志愿受试者,签署知情同意书。排除标准:已证实存在除外 Ems 的其他不孕因素的不孕患者。

**1.4 一般资料** 8例均为广东省中医院妇科门诊和住院患者,正常组子宫内膜组织来自4名因药流

术后3个月复查而就诊于本院妇科门诊的患者,年龄(29.30±5.20)岁;Ems不孕组子宫内膜组织来自4名因原发性不孕于本院行腹腔镜手术,术后病理确诊于 Ems 患者,同时可排除其他导致不孕相关因素,年龄(29.50±5.18)岁,术前于分泌中期取子宫内膜;中药干预组子宫内膜来自于 Ems 不孕组患者服用补肾活血方中药3个月后复查;内膜取自B超测排卵后第10天抽血查人β-绒毛膜促性腺激素(β-HCG)阴性排除妊娠后。所有内膜组织均经过病理科医师诊断为分泌期子宫内膜。3组一般资料比较差异无统计学意义。

**1.5 治疗方法** 补肾活血方(由菟丝子20g,桑寄生20g,川断15g,丹参20g,红花10g,桃仁10g,赤芍15g组成),由医院煎药室统一煎制,真空包装,每次100mL,每日1剂,疗程为3个月。

**1.6 实验方法** 每组均取4个不同的样本内膜组织进行混合,每个样本取0.05g内膜组织,共0.2g,加入500μL裂解液,冰上超声破碎,离心30min,取上清液。用2-D Clean-up Kit试剂盒除去盐、脂肪、多糖等干扰双向电泳的物质。用Ettan™ 2-D Quant Kit试剂盒测定样本中蛋白浓度。使用Cydye染料进行蛋白标记。标记好的样品蛋白上样到pH3~11的24cm非线性IPG胶条,置入Ettan™ IPGPhor进行第一向电泳,在第二向电泳SDS-PAGE前,对IPG胶条依次用二硫苏糖醇SDS平衡液(含DTT 10g·L<sup>-1</sup>)、碘乙酰胺SDS平衡液(含碘乙酰胺25g·L<sup>-1</sup>)进行平衡。用Ettan™ DALT Six电泳仪进行第二向电泳。整个双向电泳过程都需要避光。上述用CyDye染色的凝胶为分析胶。用Typhoon Imager 9400成像仪对电泳后胶板图像扫描,DeCyder V6.5软件处理后其图像分别为蓝色、绿色及红色。所有Cy2图像设为内标图像,蛋白质点数最多的胶设为参考胶,其余的胶与之相匹配,匹配的点进入下一步分析。用DeCyder V6.5分析软件通过胶内差异分析(DIA)以及胶间差异分析(BVA),最后寻找到平均体积差异>1.5倍的蛋白点(表达

差异上调 1.5 倍或下调 1.5 倍)。制备胶用考马斯亮蓝 G-250 染料染色。然后用 Image Scanner 对胶图进行扫描,得到制备胶的胶图。用 DeCyder V6.5 分析软件先进行胶内差异分析 (differential in-gel analysis, DIA),再进行胶间差异分析 (biological variation analysis, BVA),通过软件统计学分析找到感兴趣的差异蛋白点,然后对分析到的差异点在制备胶上匹配到相应的点,最后利用 Ettan™ Spot picker 自动工作站进行挖胶,挖到的胶粒取出置 500  $\mu\text{L}$  的 EP 管中 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。最后将样品靶输入 ABI 4800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪中,获取肽质量指纹图谱 (peptide mass fingerprinting, PMF)。

**1.7 数据处理** 使用 Mascot 软件对质谱的 PMF 进行数据库检索比对,采用 MS 和 MS-MS 联合模式搜索数据库 NCBIInr,种属数据库人类数据库。取蛋白评分为 100% 的鉴定结果为高度可信, < 100%, 而蛋白评分较高度可信的偏离不太大的为中度可信,较高度可信的评分太远的认为基本不可信。取高度可信的结果做进一步的生物信息学分析。a. NCBIInr 数据库:蛋白质序列比对数据库,通过 Mascot 软件检索: <http://www.protein.sdu.dk/gpmaw/GPMaw/Databases/NCBIInr/ncbinr.html>; b. ExPASy (Expert protein analysis system):蛋白组学服务器,为蛋白质的综合数据库: <http://www.expasy.org/>; c. NCBI 的蛋白数据库: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; d. String:蛋白质相互作用数据库 <http://string.embl.de/>; i. Interpro:蛋白质结构域和模体数据库: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; g. SMART (Simple modular Architecture research tool) 蛋白质结构域和模体数据库 <http://smart.embl-heidelberg.de/>。

## 2 结果

**2.1 分析胶扫描图像** 经过双向差异凝胶电泳,在所有 pH 3 ~ 11 的梯度胶条上均得到了清晰的蛋白质表达谱,经 DeCyder 软件处理,不同染料标记的样本呈现不同颜色的图谱,3 个图像重叠后能得到的 Overlay 的图像,见图 1。

**2.2 DeCyder 2D 软件分析找到的差异点** 使用 DeCyder 2D 软件分析,在每块胶图上可以发现数以千计的蛋白质点。经过胶内差异分析和生物学差异分析,最终找到 35 个差异蛋白点。具体位置见图 2。

**2.3 蛋白质的质谱鉴定** 使用 ABI4800 MALDI-TOF/TOF 质谱仪对 35 个差异蛋白点进行鉴定,质谱获取酶解肽质量指纹图谱 (PMF)。得到的 PMF

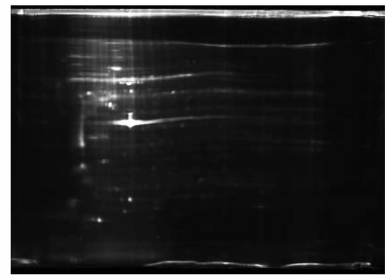


图 1 3 个荧光通道图谱叠加后图谱

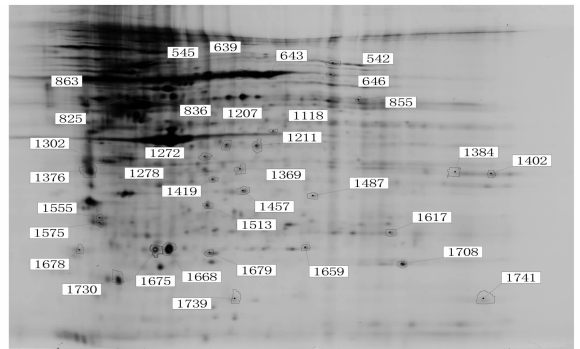


图 2 经 DeCyder 2D 软件分析后找到的 35 个差异点的分布情况

采用 MS 和 MS/MS 联合模式搜索数据库 NCBIInr 进行比对,种属数据库为人类数据库。软件对搜索结果按匹配片段数和覆盖率进行评分排列,结果成功鉴定出 28 个差异蛋白质,超过 90% 差异点鉴定出来的蛋白评分均在 100%。图 3 所展示的是 DJ-1 蛋白 (DJ-1 protien, PARK7) 的一级质谱肽质量指纹图谱。

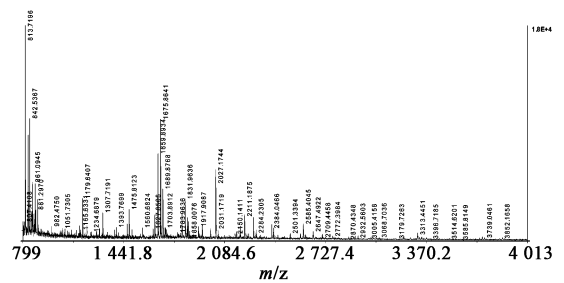


图 3 DJ-1 蛋白的肽指纹

**2.4 蛋白质结构域与模体及其功能分类** 将质谱鉴定的 28 个差异蛋白通过 Swiss-Prot 链接到 InterPro 和 SMART 数据库对结构域和模体进行分析比较,综合文献,把这些差异蛋白功能主要归纳为以下 5 类:参与形成细胞骨架;参与能量代谢;参与氧化还原状态的调节;参与细胞增殖、细胞凋亡;参与细胞信号转导。

## 3 讨论

Ems 与不孕症之间的关系已经得到证实,对其

相关机制研究虽然已进行到了分子水平,但尚无一种可以全面解释 Ems 不孕发生的确切原因和起关键作用的因素。有学者<sup>[5]</sup>提出了 Ems 发病中的“在位内膜决定论”,即 Ems 患者和非 Ems 妇女的在位内膜细胞的黏附、侵袭和血管形成能力均有明显差异,Ems 患者存在在位内膜缺陷,其强侵袭能力等生物学特质使其易于发生 Ems。近年来对 Ems 在位内膜的分子生物学研究<sup>[6]</sup>及 Ems 动物模型的建立<sup>[7]</sup>,均发现 Ems 在位内膜有多种免疫因子的上调或下调,从循证医学的角度验证了“在位内膜决定论”。

中医学认为 Ems 不孕的发病机制多为肾虚冲任失调、血瘀阻滞胞中,本病以肾虚为本,血瘀为标,故补肾活血法是其治疗的原则,临床上多采用菟丝子、桑寄生、川断、丹参、赤芍、桃仁等中药治疗。目前对中药补肾活血法治疗 Ems 不孕的作用机制尚不明确。多项临床及动物实验研究<sup>[8-12]</sup>中发现补肾活血中药能调节 Ems 患者或 Ems 模型内分泌功能,改变盆腔局部血液流变性、改善微循环;并能通过调节血管内皮生长因子(VEGF),TNF- $\alpha$  及转化生长因子(TGF- $\beta$ )的表达,增强子宫内膜的容受性,以提高 Ems 不孕患者的妊娠率。笔者推测补肾活血法可调整 Ems 不孕患者免疫及内分泌功能,并影响在位内膜的某些蛋白质的表达,改善生殖机能,提高受孕率。

本研究首先建立了荧光差异凝胶电泳(difference gel electrophoresis, DIGE)技术平台,其主要特点是三色荧光染料使得实验具有很好的可信性和重复性,其高灵敏度,可以检测低丰度的蛋白质。相应的分析软件能自动进行图像处理与分析,消除了人为因素的干扰以增加实验的准确性与重复性<sup>[13-15]</sup>。利用该平台进行正常妇女与 Ems 不孕患者及其中药补肾活血方治疗前后在位子宫内膜差异蛋白质组的分离及分析,鉴定出 28 种差异蛋白,其中 23 种蛋白质在功能方面相互关联,28 种差异蛋白中 10 种提示可能 Ems 不孕发生相关,预测中药治疗的蛋白质作用靶点 26 种。通过对差异蛋白质进行了生物信息学分析,Ems 不孕的可能机制主要分为以下 5 方面:①调控细胞内信号传导通路;②改变细胞骨架组成,增加细胞侵袭能力;③调节子宫内膜分泌蛋白;④降低内膜细胞凋亡敏感性,促进细胞过度增殖;⑤参与自由基生成和清除平衡的酶表达异常,促进炎症反应复合物的形成。中药补肾活血方修复在位内膜缺陷的可能作用靶点涉及以上 4 种

机制的相关蛋白:①调控细胞内信号传导通路:膜连蛋白(annexin I),蛋白激酶抑制蛋白 1 $\gamma$ (YWHAG),蛋白激酶抑制蛋白 1 $\alpha/\beta$ (YWHAB);②调节细胞骨架,减少细胞侵袭能力:胞质肌动蛋白 2(ACTG1),波形蛋白(VIM), $\beta$ -肌动蛋白样蛋白 2(ACTBL2);③调节细胞过度增殖机制:抗增殖蛋白(PHB),蛋白激酶抑制蛋白 1 $\gamma$ (YWHAG),蛋白激酶抑制蛋白 1 $\alpha/\beta$ (YWHAB),核内不均一核糖核蛋白 C1/C2(HNRNPC);④调节自由基生成和清除平衡的酶表达异常,减少炎症反应复合物的形成:膜连蛋白(annexin I),超氧化物歧化酶(SOD2),DJ-1 蛋白(PARK7)。

综上所述,本研究通过 DIGE 蛋白分离和质谱鉴定及后续的生物信息学分析,初步建立了一套基于荧光差异凝胶电泳-质谱鉴定-生物信息学分析的差异蛋白质组学分析方法,并获得了一些有关 Ems 不孕患者在位子宫内膜及其经中药补肾活血方治疗前后在位子宫内膜差异蛋白的框架性认识。下一步需要进行生物学功能的实验,来验证本方法的可信度,并针对这里面所涉及到的生物学问题设计相应的功能实验进行深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 程泾.实用中西医结合不孕不育治疗学[M].北京:中国中医药出版社,2000:530.
- [2] 张惜阴.实用妇产科学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2004:746.
- [3] 中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组.子宫内膜异位症的诊断与治疗规范[J].中华妇产科杂志,2007,42(9):645.
- [4] 罗元恺.实用中医妇科学[M].上海:上海科学技术出版社,1996:282.
- [5] 郎景和.子宫内膜异位症研究的新里程[J].中华妇产科杂志,2005,40(1):3.
- [6] Zhang L H, Liu H Y. Differential proteomic analysis of endometriosis [J]. Chemical Research in Chinese University, 2010, 26(1):70.
- [7] 宗利丽,李亚里.子宫内膜异位症猕猴动物模型的建立[J].第一军医大学学报,2003,23(10):1006.
- [8] 张玉蓉,徐莉.补肾活血法对子宫内膜异位症不孕患者 EMAB、CA125 的影响[J].中国医药学报,2004,19(5):319.
- [9] 司徒仪,徐莉.补肾活血法对子宫内膜异位症不孕患者外周血 TNF、SOD 影响[J].上海中医药杂志,2006,40(3):36.

# 麻黄附子细辛汤治疗肾病综合征 风水相搏证疗效观察

常克, 陈佳\*, 王海俊, 向红

(成都中医药大学临床医学院儿科, 成都 610072)

**[摘要]** 目的:探讨麻黄附子细辛汤对肾病综合征风水相搏证的临床疗效。方法:将80例患者随机分成观察组和对照组,观察组在一般治疗、对症治疗、糖皮质激素治疗的基础上同时给予麻黄附子细辛汤,对照组则只给予一般治疗、对症治疗和糖皮质激素治疗。比较两组患儿治疗前后的症状积分和尿蛋白水平。结果:治疗2周后,观察组的尿蛋白水平积分显著下降(治疗前 $2.60 \pm 1.818$ ,治疗后 $0.44 \pm 0.837$ )分,临床症状明显缓解,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),治疗组复发次数明显少于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:麻黄附子细辛汤治疗肾病综合征风水相搏证临床疗效显著。

**[关键词]** 麻黄附子细辛汤;原发性肾病综合征;风水相搏证

**[中图分类号]** R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0310-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013190310

## Efficacy of Mahuang Fuzi Xixin Tang on Nephritic Syndrome

CHANG Ke, CHEN Jia\*, WANG Hai-jun, XIANG Hong

(Clinical Medical College of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610072, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the clinical efficacy of Mahuang Fuzi Xixin tang on nephritic syndrome. **Method:** A total of 80 cases with nephritic syndrome were randomly assigned into control group and treatment group. Cases in control group were treated with predison. On the basis of the therapeutic scheme of the

**[收稿日期]** 20130209(001)

**[基金项目]** 四川省科技厅科技支撑项目(2010JY0108)

**[第一作者]** 常克,教授,主任医师,博士生导师,从事中医儿科原发性及难治性肾病研究, Tel: 18980880189, E-mail: changke777@163.com

**[通讯作者]** \* 陈佳,博士,从事中医儿科原发性及难治性肾病研究, Tel:13880570873, E-mail: chenjiaameng@yahoo.com.cn

[10] 刘润侠,刘艳巧. 补肾活血方对子宫内位症不孕患者子宫内位的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2005,12(6):14.

[11] 司徒仪,樊荫萍. 莪棱胶囊对大鼠实验性子宫内位症作用机理探讨[J]. 中医杂志, 2000,41(4):237.

[12] 刘艳巧,刘润侠. 补肾活血方对大鼠子宫内位症血管生长因子等影响的研究[J]. 湖南中医学院学报, 2004,24(1):16.

[13] Hobbs J S, Simonian M H, Betgovargez E, et al. Tool for proteomics: an automated approach to protein fractionation[J]. Modern Drugs Discovery, 2004,5:62.

[14] Alban A, David S O, Bjorkesten L, et al. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis

incorporating a pooled internal standard[J]. Proteomics, 2003,3(1):36.

[15] Lee I N, Chen C H, Sheu J C, et al. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. J Proteome Res, 2005,4(6):2062

[16] Harade T, Kaponis A, Ivabe T, et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis [J]. Hum Reprod Update, 2004,10(1):29.

[17] 康苏娅,顾丽萍. 核内不均一核糖核蛋白 A2/B1 在子宫内位症组织中的表达[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2007,27(5):499.

[责任编辑 邹晓翠]