

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.013

文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0071-05

## 高强度聚焦超声联合竹红菌素软膏对外阴上皮非瘤样病变组织中 P16、CD34 的影响\*

张宪军<sup>1</sup>, 陈志红<sup>1</sup>, 李明<sup>2</sup>, 李桂芬<sup>1</sup>, 宋永祯<sup>1</sup>

(河北省衡水市人民医院 1. 妇科, 2. 内科, 河北 衡水 053000)

**摘要:** **目的** 探讨聚焦超声联合竹红菌素软膏治疗对外阴上皮非瘤样病变组织 P16、CD34 的影响。**方法** 选取 2010 年 12 月-2015 年 12 月在衡水市人民医院进行治疗的 80 例外阴上皮非瘤样病变 (NNED) 患者为研究对象。其中, 2013 年 12 月以前入院的 40 例患者作为对照组, 选择与其状况相似的 2013 年 12 月以后入院的 40 例患者作为观察组。对照组患者接受聚焦超声治疗, 观察组患者接受聚焦超声联合竹红菌素治疗。比较两组患者治疗前后病变组织 P16、CD34 水平。**结果** 治疗后两组患者外阴瘙痒评分、皮肤弹性评分和外阴白色病变面积均变小 ( $P < 0.05$ ), 观察组患者外阴瘙痒评分、皮肤弹性评分和外阴白色病变面积小于对照组 (均  $P < 0.05$ )。治疗后两组患者外阴组织 P16 蛋白水平均上升 ( $P < 0.05$ ), 但观察组患者治疗后 P16 水平较对照组更高 ( $P < 0.05$ ), CD34 蛋白水平下降 ( $P < 0.05$ ), 但观察组患者治疗后 CD34 蛋白水平更低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 聚焦超声联合竹红菌素软膏治疗 NNED 疗效好, 能增加病变组织中 P16 蛋白含量, 降低 CD34 蛋白含量, 提示 NNED 的发生发展可能与细胞周期失调和微循环障碍有关。

**关键词:** 聚焦超声; 竹红菌素软膏; 外阴上皮内非瘤样病变

**中图分类号:** R758.4

**文献标识码:** A

## Therapeutic efficacy of focused ultrasound combined with Hypocrellins in patients with non-neoplastic intraepithelial lesions of vulva\*

Xian-jun Zhang<sup>1</sup>, Zhi-hong Chen<sup>1</sup>, Ming Li<sup>2</sup>, Gui-fang Li<sup>1</sup>, Yong-zhen Song<sup>1</sup>

(1. Department of Gynecology, 2. Internal Medicine, People's Hospital of Hengshui City, Hengshui, Hebei 053000, China)

**Abstract: Objective** To explore therapeutic effect of focused ultrasound combined with Hypocrellins in patients with non-neoplastic intraepithelial lesions of vulva. **Methods** Totally 80 cases of non-epithelial tumor like lesions of epithelium were admitted in our hospital from December 2010 to December 2015. All patients received focused ultrasound treatment as standard treatment. Patients in observation group received additional treatment of Hypocrellins. Levels of P16 and CD34 in tissues were measured. **Results** Treatments induced decreased levels of scores of vulvar pruritus, skin elasticity score and area of white lesions of vulva in the two groups; additional treatment of Hypocrellins in observation group induced more significant improvement when compared with control group ( $P < 0.05$ ). All patients experienced increased levels of P16 protein and decreased levels of CD34 protein compared with those prior to any treatments. Still, treatment with Hypocrellins induced dramatical increase of P16 and decrease of CD34 compared with control group. **Conclusions** Focused ultrasound combined with Hypocrellins

收稿日期: 2018-04-25

\* 基金项目: 河北省衡水市科技计划项目 (No: 15003)

exerts promising therapeutic effect in treatment of NNED through manipulating cell cycle and microcirculation.

**Keywords:** focused ultrasound; Hypocrellins; non-neoplastic intraepithelial lesions of vulva

女性外阴处皮肤出现异常色素沉淀或黏膜组织变性被称为外阴上皮内非瘤样病变 (non neoplastic intraepithelial lesions of vulva, NNED)<sup>[1]</sup>。目前,对 NNED 的发病机制尚无明确的认知,可能与患者局部微循环缺陷、细胞周期异常有关<sup>[2]</sup>。高强度聚焦超声 (high intensity focused ultrasound, HIFU) 是近年来发展起来的一种新型无创 NNED 治疗手段,具有操作简单,对机体几乎无创伤,疗效显著等特点<sup>[3-4]</sup>。竹红菌素软膏是一种涂抹于外阴处皮肤的外用药物,具有抑菌作用<sup>[5]</sup>。临床研究认为,两者联合运用对 NNED 的治疗具有显著效果。目前,普遍认为 NNED 的发生与细胞周期失调和微循环障碍有关。P16 蛋白是参与抑癌基因调控和细胞周期调控的关键蛋白,CD34 是高特异性血管内皮标志物<sup>[6-7]</sup>。这两种蛋白在 NNED 的发生、发展中起到重要作用。本研究对比 HIFU 单独治疗和联合治疗对患者病变组织中 P16 和 CD34 蛋白表达水平的影响。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2010 年 12 月-2015 年 12 月在该院进行治疗的 80 例 NNED 患者为研究对象。其中,2013 年 12 月以前入院的 40 例患者作为对照组,选择 2013 年 12 月以后入院与其状况相似的 40 例患者作为观察组。对照组:年龄 18~59 岁,平均 (43.6±4.1) 岁;平均病程 (4.3±0.6) 年;硬化性苔藓型 (lichen sclerosis, LSV) 6 例、鳞状上皮细胞增生型 (squamous hyperplasia, SHV) 30 例、合并型 (lichen sclerosis combined with squamous hyperplasia, LSCSH) 4 例。观察组:年龄 20~62 岁,平均 (44.9±3.2) 岁;平均病程 (4.1±0.8) 年;LSV 型 4 例、SHV 型 33 例、LSCSH 型 3 例。

经检验,两组患者年龄、病程、病理分型等差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。本研究获得医院医学伦理委员会的批准,所有患者均对研究内容知情同意并签署知情同意书。

纳入标准:①所有入选患者均接受过其他治疗,但出现复发;②年龄 <65 周岁, >18 周岁;③患者治疗依从性好;④自愿参与本研究。排除标准:①病变组

织进行病理学检查显示为外阴癌和不典型增生者;②经期患者;③阴道急性炎患者;④存在心脏病、糖尿病、甲亢和恶性肿瘤患者;⑤对治疗所用药物过敏者。

### 1.2 研究方法

所有患者均接受 HIFU 治疗。采用 CAF 型聚焦超声治疗仪 (购自重庆海扶技术有限公司) 进行治疗。患者首先取截石位,功率 3.7 W,频率 9.5 MHz,治疗范围为病变区及其外 0.5 cm,速度为 3~5 mm/s。探头对准目标治疗区域紧贴病变皮肤进行连续的直线扫描,控制扫描速率为 2~3 mm/s,可根据患者自身病变区域大小和严重程度灵活调整治疗时间,治疗时间最少 15 min,最长不得超过 50 min。每 3 次治疗为 1 个疗程,每次治疗之间间隔 2 周,所有患者均接受 2 个疗程的治疗。

在此基础上,观察组患者还接受竹红菌素软膏治疗。观察组患者进行 HIFU 治疗时,将 5 g 竹红菌素软膏与超声专用传导介质耦合剂混合,并涂抹到目标治疗区域,而后进行超声治疗。

### 1.3 观察指标

疗效评价:参考武爱芳等<sup>[8]</sup>建立的“外阴瘙痒评分法”“四度皮肤弹性评估法”“外阴白色病变面积积分法”,对治疗前和治疗 2 个疗程结束后 6 个月患者外阴患处皮肤进行评价,以数字得分来表示患处皮肤状态,得分越低分别表示患处皮肤瘙痒程度低、皮肤富有弹性和病变面积小。

组织 P16 蛋白和 CD34 蛋白水平检测:采集所有患者治疗前病变处皮肤组织,2 个疗程治疗结束后 6 个月随访时,采集患者相同位置处皮肤组织。同时,治疗前还需要采集所有患者病灶附近健康皮肤组织样本,作为空白组。采集得到的皮肤组织中加入蛋白裂解液提取蛋白并进行 Western blot 检测。采用 Image J 软件对所得蛋白条带的灰度值进行分析,设置空白组目的蛋白的含量为 100,计算对照组和观察组目的蛋白的含量相对值。

观察治疗过程中两组患者出现不良反应的情况。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,比较做差值的独立样本  $t$  检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 疗效评价指标比较

患者疗效评价指标比较见表 1。治疗前两组患者 3 项得分经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 两组患者治疗前后 3 项指标得分经  $t$  检验, 差异有统计学意义, 治疗后 3 项得分均低于治疗前 ( $P < 0.05$ ), 但组间比较显示, 观察组患者治疗后 3 项指标得分与对照组患者之间的差异有统计学意义, 观察组患者治疗后 3 项指标得分低于对照组患者 ( $P < 0.05$ )。

表 1 NNED 患者疗效评价指标比较 ( $n=40, \bar{x} \pm s$ )

组别	外阴瘙痒评分				四度皮肤弹性评分				外阴白色病变面积 /cm <sup>2</sup>			
	治疗前	治疗后	$t$ 值	$P$ 值	治疗前	治疗后	$t$ 值	$P$ 值	治疗前	治疗后	$t$ 值	$P$ 值
观察组	2.54 ± 0.22	0.56 ± 0.11	50.912	0.000	2.01 ± 0.54	0.32 ± 0.07	19.629	0.000	12.49 ± 3.57	2.59 ± 0.25	17.496	0.000
对照组	2.55 ± 0.25	1.02 ± 0.23	28.485	0.00	2.07 ± 0.36	0.91 ± 0.05	20.185	0.000	12.35 ± 3.32	5.68 ± 1.02	12.146	0.000
$t$ 值	0.190	11.411			0.585	43.378			0.182	18.609		
$P$ 值	0.850	0.000			0.561	0.000			0.856	0.000		

表 2 病变组织 P16 和 CD34 蛋白表达比较 ( $n=40, \bar{x} \pm s$ )

组别	P16 蛋白				CD34 蛋白			
	治疗前	治疗后	$t$ 值	$P$ 值	治疗前	治疗后	$t$ 值	$P$ 值
观察组	63.29 ± 2.94	86.30 ± 2.40	38.345	0.000	158.39 ± 8.94	119.32 ± 6.04	22.903	0.000
对照组	63.17 ± 2.69	76.49 ± 3.85	17.937	0.000	158.05 ± 8.43	132.10 ± 8.32	13.857	0.000
$t$ 值	0.190	13.676			0.175	7.862		
$P$ 值	0.849	0.000			0.862	0.000		

### 2.3 治疗相关不良反应

在治疗过程中, 两组患者均分别出现 1 例 (1/40, 2.5%) 外阴皮肤浅表性破溃及水泡, 经对症治疗后均痊愈, 其余患者均未出现不良反应。

## 3 讨论

NNED 是一种慢性顽固性病变, 患者外阴真皮层出现局部微循环障碍, 真皮层毛细血管闭塞, 胶原蛋白生成受阻, 造成真皮内细胞出现不同程度的退行性病变, 进而导致黑色素细胞消失, 细胞变性, 皮肤褪色变白等种种临床症状<sup>[9]</sup>。NNED 不仅给患者身心带来巨大负担, 且研究表明, NNED 是外阴癌出现的高

### 2.2 病变组织 P16 和 CD34 蛋白水平比较

治疗前两组患者两种蛋白表达经  $t$  检验差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 两组患者治疗前后两种蛋白表达经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 治疗后两组患者 P16 蛋白水平高于治疗前, 而 CD34 蛋白水平低于治疗前 ( $P < 0.05$ )。但组间比较显示, 观察组患者治疗后两种蛋白表达与对照组患者之间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 观察组患者治疗后 P16 蛋白表达高于对照组患者, 而 CD34 蛋白表达低于对照组患者。见表 2。

危因素, 因此, 及时有效的治疗 NNED 十分必要。传统治疗 NNED 的方法包括药物、物理和手术治疗, 但一直没有疗效稳定确切的标准治疗方式。多数 NNED 患者经过治疗依然出现病情反复或者疾病复发, 导致患者病程长, 增加患者心理和经济负担<sup>[10]</sup>。

超声波组织穿透能力强、携带能高、局部定位性强, 是临床上用于治疗 NNED 的标准手段, 因此, 在本研究对照组患者接受常规聚焦超声治疗。竹红菌素可以在光照下被激活, 具有抑菌可促循环作用, 已有报道显示将两者合用可有效提高 NNED 的治疗效果, 本研究结果显示, 进行聚焦超声治疗的患者, 1 个疗程后病变处皮肤组织外观和瘙痒情况都得以极大的改

善。这与 HIFU 的治疗机制有很大关系, HIFU 有很强的组织穿透性, 通过将声波能量聚集在较小的皮肤面积上形成高能量声波, 通过超声波的热效应来破坏病变组织, 从而发挥治疗作用<sup>[11]</sup>。HIFU 可以通过破坏病变组织内部变性的毛细血管和神经末梢来促进正常组织细胞和毛细血管的生成, 促进皮肤组织的修复和再生, 从而改善皮肤瘙痒和色素改变的临床症状<sup>[12]</sup>。与单独接受 HIFU 的患者比较, 接受联合治疗的患者 1 个疗程后临床症状改善更加明显, 这是由于竹红菌素不仅具有较强的抑菌作用, 还可以刺激局部皮肤的新陈代谢, 增加微循环, 从而有效加快皮肤再生和组织修复<sup>[13]</sup>。竹红菌素的光化学机制主要含有 I、II 型光动力学过程, 两种机制中光敏剂受光激发后产生活性氧 (ROS), 在有氧参与下, 产生生物活性氧物质, 如单重态氧、超氧阴离子、羟基自由基和过氧化氢等。活性氧能氧化细胞中的生物大分子, 如蛋白、脂肪酸及蛋白间的桥连结构, 破坏生物分子的结构和功能, 改变生物膜渗透性和流动性, 激活或抑制膜上的酶蛋白和受体, 最终引起细胞的凋亡与坏死, 从而起到杀菌抑菌的作用。

NNED 虽然是一种发生在外阴的良性病变, 但也有一定的恶变概率, 目前认为, NNED 与细胞周期失调和微循环障碍有关。因此, 笔者还对 P16 和 CD34 蛋白进行研究。P16 蛋白是调节细胞分裂周期的关键蛋白, 在控制细胞增殖的过程中发挥十分重要的生理功能。研究认为<sup>[14]</sup>, P16 对维持细胞中抑癌基因 Rb 的活性状态十分必要, 通过与 Cyclin 依赖性激酶结合抑制原癌基因的活性, 保证细胞增殖有序可控的进行。钟丽君等<sup>[15]</sup>的研究表明, 在病变组织中 P16 蛋白的表达高于健康组织和病变旁组织, 提示, P16 蛋白在组织中的表达可能与 NNED 患者预后有关。在本研究中测量病变皮肤组织治疗前 P16 蛋白水平可以发现, 两组患者经过治疗后 P16 蛋白水平均有所上升, 提示再生的健康皮肤组织中 P16 蛋白含量也高于病变组织。CD34 蛋白被认为是一种具有较高特异性的血管内皮细胞标志物, 它在未成熟的血管内皮细胞中大量表达, 通过对 CD34 蛋白的检测, 可以反映组织内部新血管生成情况<sup>[16]</sup>。在病变的皮肤组织中, CD34 蛋白表达增加, 提示局部组织血管的过度增生可能与 NNED 发病相关。这也与之前的研究相符, 杨静等<sup>[17]</sup>的研究认

为在硬化性苔藓型病变的组织当中, CD34 表达增加。经过治疗后的新生皮肤组织中, CD34 蛋白表达趋于正常, 也说明血管增生在 NNED 发病中可能起到关键作用。观察组患者治疗后 P16 蛋白水平更高而 CD34 蛋白水平更低可能与观察组患者病变出新生组织再生速度更快有关, 竹红菌素对局部皮肤组织再生起到促进作用。

综上所述, 聚焦超声联合竹红菌素软膏治疗 NNED 疗效显著, 增加病变组织中 P16 蛋白含量, 降低 CD34 蛋白含量, 值得临床推广。

#### 参 考 文 献:

- [1] LI B, ZHANG Q, OUYANG L, et al. Aberrant staining patterns of E-cadherin and  $\beta$ -catenin: a potential diagnostic value for distinguishing vulvar intraepithelial neoplasia from non-neoplastic vulvar lesions[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(7): 1362-1366.
- [2] ZHANG C, ARENTZ G, WINDERBAUM L, et al. MALDI mass spectrometry imaging reveals decreased CK5 levels in vulvar squamous cell carcinomas compared to the precursor lesion differentiated vulvar intraepithelial neoplasia[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1088.
- [3] WALLBILLICH J J, RHODES H E, MILBOURNE A M, et al. Vulvar intraepithelial neoplasia (VIN2/3): comparing clinical outcomes and evaluating risk factors for recurrence[J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 127(2): 312-315.
- [4] 罗东林, 张蓉晖, 郭晓静, 等. 高强度聚焦超声联合青黛软膏外涂治疗外阴白色病变疗效观察 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2016, 25(14): 1531-1533.
- [5] 邹萌, 孙玉秀, 程萌, 等. 竹红菌素加光疗治疗外阴上皮内非瘤样病变的临床疗效观察 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(17): 2850-2851.
- [6] 贾吴琳, 丁玲, 任志英, 等. 叶酸与 p16 蛋白在宫颈癌变中的作用及其相互效应 [J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(12): 1647-1652.
- [7] 赵巍. 子宫内膜癌患者癌组织中 PCNA 和 CD34 蛋白表达的实验研究 [J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(12): 1906-1907.
- [8] 武爱芳, 尹格平, 提松梅, 等. 联合疗法治疗女性外阴上皮内非瘤样病变临床观察 [J]. *解放军医药杂志*, 2012, 24(3): 17-20.
- [9] KIM J M, LEE H J, KIM S H, et al. Efficacy of 5% imiquimod cream on vulvar intraepithelial neoplasia in Korea: Pilot study[J]. *Ann Dermatol*, 2015, 27(1): 66-70.
- [10] MADELEINE M M, JOHNSON L G, DOODY D R, et al. Natural antibodies to human papillomavirus 16 and recurrence of vulvar high-grade intraepithelial neoplasia (VIN3) [J]. *J Low Genit Tract Dis*, 2016, 20(3): 257-260.
- [11] 郭清, 丁珍珍, 徐锋, 等. 高强度聚焦超声在妇科疾病中的应用 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2016, 8(10): 28-31.

- [12] 王娟, 李升华. 高强度聚焦超声联合中药治疗外阴白色病变的临床疗效观察 [J]. 中国计划生育学杂志, 2014, 22(12): 834-836.
- [13] 葛静. 竹红菌素软膏治疗外阴白斑病的临床价值分析 [J]. 医学信息, 2014, 27(30): 77-77.
- [14] AL-KHALAF H H, MOHIDEEN P, NALLAR S C, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a physically interacts with transcription factor sp1 and cyclin-dependent kinase 4 to transactivate microRNA-141 and microRNA-146b-5p spontaneously and in response to ultraviolet light-induced DNA damage[J]. J Biol Chem, 2013, 288(49): 35511-35525.
- [15] 钟丽君. PCNA、CDK4 及 p16INK4a 在外阴上皮内非瘤样病变中的表达及意义 [D]. 泸州: 泸州医学院, 2013.
- [16] STZEPOURGINSKI I, NIGRO G, JACOB J M, et al. CD34<sup>+</sup> mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, 114(4): E506-E513.
- [17] 杨静, 武昕, 李威, 等. VEGF 及 CD34 在外阴皮肤黏膜上皮内非瘤样病变及外阴上皮内瘤变中的表达 [J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(2): 179-180.

(王荣兵 编辑)