

趋化因子 CXCL12 在子宫腺肌病组织中的表达及意义

李娟 尹格平 陈铭 朱彤宇 温泽清

【摘要】 目的 探讨趋化因子 CXCL12 在子宫腺肌病发病中的作用。**方法** 选择 2010 年 2 月至 2011 年 2 月在济南军区总医院行全、次全子宫切除术或病灶切除术,经病理学确诊的 36 例子宫腺肌病患者术前、术中的取材标本为研究对象,并根据取材部位不同将其分为在位内膜组($n=36$)、异位病灶组($n=36$)和病灶周围组织组($n=36$)。选择同期住院手术治疗的 33 例子宫肌瘤患者术中取材标本为对照,按照取材部位不同,将其分别纳入对照内膜组($n=33$)和对照肌层组($n=33$)(本研究遵循的程序符合济南军区总医院人体试验委员会所制定的伦理学标准,得到该委员会批准,分组征得受试对象本人的知情同意,与之签署临床研究知情同意书)。子宫腺肌病患者和子宫肌瘤患者年龄等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。对各组 CXCL12 蛋白表达和 CXCL12 mRNA 的含量进行比较及相关性分析。**结果** ①异位病灶组 CXCL12 蛋白表达显著高于在位内膜组和对照内膜组,前者分别与后二者比较,差异有统计学意义($P<0.05$),在位内膜组 CXCL12 蛋白表达与对照内膜组比较,差异亦有统计学意义($P<0.05$)。②在位内膜组、病灶周围组织组和异位病灶组 CXCL12 mRNA 含量均高于对照内膜组,前三者分别与后者比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);异位病灶组 CXCL12 mRNA 含量分别与在位内膜组和病灶周围组织组比较,差异也有统计学意义($P<0.05$)。③Pearson 相关分析结果显示,在位内膜组 CXCL12 蛋白表达与异位病灶组具有相关关系($r=0.780, P=0.000$);在位内膜组 CXCL12 mRNA 含量与病灶周围组织组、异位病灶组均呈正相关关系($r=0.499$ 和 $0.461; P=0.002$ 和 0.005);病灶周围组织组 CXCL12 mRNA 含量与异位病灶组呈正相关关系($r=0.679, P=0.000$)。**结论** CXCL12 在子宫腺肌病发生、发展过程中起一定作用,其可能通过诱导内膜细胞异位发挥致病作用。

【关键词】 子宫内膜异位症; 趋化因子 CXCL12; 发病

Expression and Significance of Chemokine CXCL12 in Uterine Adenomyosis Li Juan, Yin Geping, Chen Ming, Zhu Tongyu, Wen Zeqing. Department of Obstetrics and Gynecology, Jinan Military General Hospital, Jinan 250031, Shandong Province, China. (Corresponding author: Li Juan, Email: ljwxy0012@sina.com)

【Abstract】 Objective To investigate the significance of chemokine CXCL12 in the pathogenesis of uterine adenomyosis. **Methods** From February 2010 to February 2011, a total of 36 women with uterine adenomyosis were included in the study, and their pathological samples were divided into ectopic lesions group($n=36$), surrounding tissues group($n=36$) and eutopic endometrium group($n=36$). Meanwhile pathological samples from other 33 uterine fibroids patients were included into control endometrium group($n=33$) and control myometrium group($n=33$). Expression of CXCL12 protein and CXCL12 mRNA content were detected. The study protocol was approved by the Ethical Review Board of Investigation in Human Being of Jinan Military General Hospital. Informed consent was obtained from each participants. **Results** ①CXCL12 protein expression in ectopic lesions group was significantly higher than that of eutopic endometrium group and control endometrium group($P<0.05$), and CXCL12 protein expression in eutopic endometrium group was significantly higher than that of control endometrium group($P<0.05$). ②There had significant differences in CXCL12 mRNA content between eutopic endometrium group, surrounding tissues group, ectopic lesions group and control endometrium group, respectively ($P<0.05$). Compared with eutopic endometrium group and surrounding tissues group, CXCL12 mRNA content of ectopic lesions group

DOI:10.3877/cma.j.issn.1673-5250.2014.03.013

基金项目: 国家卫生和计划生育委员会科研基金项目资助(7-3-001)

作者单位: 250031 山东, 济南军区总医院妇产科(李娟、尹格平、陈铭、朱彤宇); 山东大学附属省立医院妇产科(温泽清)

通信作者: 李娟, Email: ljwxy0012@sina.com

had remarkably increased ($P < 0.05$). ③ CXCL12 protein expression in eutopic endometrium group and ectopic lesions group had significant correlation ($r = 0.78, P < 0.05$). CXCL12 mRNA content in eutopic endometrium group had positive correlation with ectopic lesions group and surrounding tissues group ($r = 0.499, 0.461; P = 0.002, 0.005$). There had significant correlation between ectopic lesions group and surrounding tissues group ($r = 0.679, P = 0.000$). **Conclusions** CXCL12 may be play an important role in pathogenesis of uterine adenomyosis by inducing ectopic endometrial cells.

【Key words】 Endometriosis; Chemokine CXCL12; Pathogenesis

* Project No. 7-3-001, supported by the Science and Technical Project of National Health and Family Planning Commission of China

近年来,子宫腺肌病发病率逐年增高,其发病人群也呈年轻化趋势。该病可降低患者生育能力,严重影响其生活和工作,已成为复杂难治性疾病之一。子宫腺肌病的病因和发病机制目前尚存争议。该病虽是良性疾病,但其病理学演变过程却与恶性肿瘤相似,因此,与恶性肿瘤发生、发展有关的某些生物学因素也可能参与子宫腺肌病的发病过程。CXCL12属于趋化因子家族,又称基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor) 1,与恶性肿瘤的进展和预后密切相关^[1]。本研究通过对子宫腺肌病患者子宫内膜、异位病灶以及病灶周围组织组等部位CXCL12含量的检测,探讨CXCL12在腺肌病发病中的作用。现将研究结果报道如下。

1 资料和方法

1.1 研究对象

选择2010年2月至2011年2月在济南军区总医院妇产科行全、次全子宫切除术或病灶切除术并经病理学确诊且病例资料完整的36例子宫腺肌病患者的术前、术中取材标本为研究对象,按照标本取材部位不同,将其分为在位内膜组($n = 36$)、异位病灶组($n = 36$)和病灶周围组织组($n = 36$),取材对象年龄为27~53岁,平均为 (38.7 ± 6.2) 岁。选择同期于本院住院手术的33例子宫肌瘤患者术中取材标本为对照按照取材部位不同,将其分别纳入对照内膜组($n = 33$)和对照肌层组($n = 33$),取材对象年龄为32~53岁,平均为 (41.2 ± 5.2) 岁。纳入标准:取材对象无内、外科合并症及感染等并发症,术前6个月内无甾体类激素药物使用史,未绝经(本研究遵循的程序符合济南军区总医院人体试验委员会所制定的伦理学标准,得到该委员会批准,并征得受试对象本人的知情同意,与之签署临床研究知情同意书)。子宫腺肌病患者和子宫肌瘤患者年龄等一般情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 子宫腺肌病患者于术前行诊断性刮宫术留取在位内膜标本,于术中留取异位病灶组织

及病灶周围组织标本。子宫肌瘤患者于术中留取子宫内膜和正常肌层标本。标本采集后,迅速移入 -80°C 冰箱储存,待测。

1.2.2 检测方法 CXCL12蛋白表达免疫组织化学检测采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(streptavidin peroxidase conjugated method)进行,该方法采用1:200 CXCL12工作液。其结果判断标准:以细胞质内出现棕色或棕黄色颗粒为阳性细胞,随机选取5个具有代表性的高倍镜视野($\times 400$),计数阳性细胞占视野总细胞的百分数。根据免疫组织化学评分(immunohistochemical scores, IHS) = $a \times b$ 计算最终结果。上述公式中, a 代表阳性细胞百分数,当无阳性细胞时, $a = 0$; 阳性细胞 $\leq 10\%$ 时, $a = 1$; 阳性细胞为 $11\% \sim 50\%$ 时, $a = 2$; 阳性细胞为 $51\% \sim 80\%$ 时, $a = 3$; 阳性细胞 $\geq 80\%$ 时, $a = 4$ 。 b 代表阳性细胞染色强度,当染色强度呈阴性时, $b = 0$; 呈弱阳性时, $b = 1$; 呈中度阳性时, $b = 2$; 呈强阳性时, $b = 3$ 。CXCL12 mRNA含量测定采用实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)。PCR反应采用Line gene Real-Time PCR仪(杭州博日公司),操作步骤严格按照说明书进行,以GAPDH作为内参照。CXCL12上游引物序列:5'-GAGCCAACGTCAAGCA TCTCAA-3',下游引物序列:5'-TTTAGCTTCGGGT CAATGCACA-3'; GAPDH上游引物序列:5'-GCAC CGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物序列:5'-TGG TGAAGACGCCAGTGGGA-3'。

1.3 统计学分析方法

本研究数据采用SPSS 16.0统计学软件包进行处理,呈正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,计数资料组间比较采用最小显著差法(least-significant difference, LSD),相关性分析采用Person等级相关分析法。以 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异位病灶组、在位内膜组和对照内膜组CXCL12蛋白表达比较

异位病灶组、在位内膜组和对照内膜组CXCL12

蛋白表达(图 1~3)比较,如表 1 所示。

表 1 3 组 CXCL12 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of CXCL12 protein expression among three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CXCL12	t	P
异位病灶组	36	9.78±2.02	11.576 ^a	0.000 ^a
在位内膜组	36	4.33±2.12	13.968 ^b	0.000 ^b
对照内膜组	33	3.06±1.82	2.647 ^c	0.009 ^c

注:^a:异位病灶组 vs. 在位内膜组;^b:异位病灶组 vs. 对照内膜组;^c:在位内膜组织 vs. 对照内膜组

表 2 5 组 CXCL12 mRNA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of CXCL12 mRNA content among five groups($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ΔCt	t	P
异位病灶组	36	1.26±0.76	-2.784 ^a	0.006 ^a
病灶周围组织组	36	1.82±1.15	-2.442 ^b	0.016 ^b
在位内膜组	36	1.85±1.30	-4.990 ^c	0.000 ^c
对照内膜组	33	2.40±0.77	-2.602 ^d	0.011 ^d
对照肌层组	33	2.34±0.46	-2.552 ^e	0.012 ^e

注:^a:异位病灶组 vs. 病灶周围组织组;^b:异位病灶组 vs. 在位内膜组;^c:异位病灶组 vs. 对照内膜组;^d:在位内膜组 vs. 对照内膜组;^e:病灶周围组织组 vs. 对照肌层组

2.3 Pearson 相关性分析结果

Pearson 相关分析结果显示,在位内膜组 CXCL12 蛋白表达与异位病灶组呈正相关关系($r=0.780, P=0.000$);在位内膜组 CXCL12 mRNA 含量与病灶周围组织组、异位病灶组均呈正相关关系($r=0.499, 0.461; P=0.002, 0.005$);病灶周围组织组 CXCL12 mRNA 含量与异位病灶组呈正相关关系($r=0.679, P=0.000$)。

3 讨论

子宫腺肌病发病原因的诸多相关学说中,子宫内膜受损学说接受度较高。该学说系子宫内膜受到损伤后,内膜细胞通过破损处侵入子宫肌层并在该异位继续生长增殖,形成子宫腺肌病灶。研究显示,子宫腺肌病患者的妊娠次数、分娩次数、流产次数及宫内节育器使用率均显著高于非子宫腺肌病患者,而诊断性刮宫术、人工终止妊娠术等宫腔操作引起的医源性创伤及剖宫产术、子宫肌瘤挖除术等手术损伤均是该病的危险因素^[2]。但是,内膜细胞穿过子宫内膜破损处进入子宫肌层并在该部位(异位)继续生长繁殖的病理生理机制,目前尚未明确。

趋化因子是能使细胞发生趋化运动的小分子细胞因子,因其在炎症反应中能调控白细胞定向移动而命名。趋化运动是指细胞由低浓度向高浓度刺激物方向的定向运动。目前已发现的趋化因子约为 50 余种^[3],按照其末端氨基酸分子不同,将其分为 CC、CXC、CX3C 和 C 趋化因子 4 类^[4]。趋化因子 CXCL12 属于

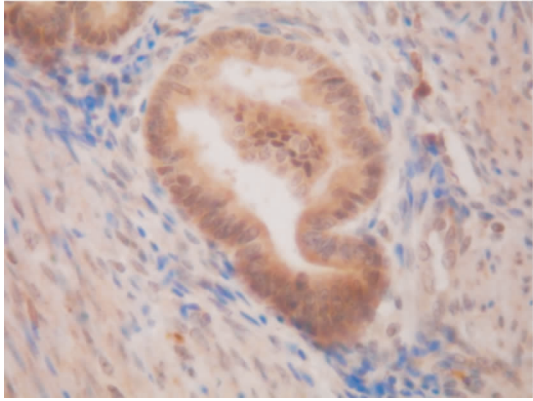


图 1 CXCL12 蛋白在异位病灶中的表达(HE, ×400)
Figure 1 Expression of CXCL12 protein in ectopic lesion(HE, ×400)

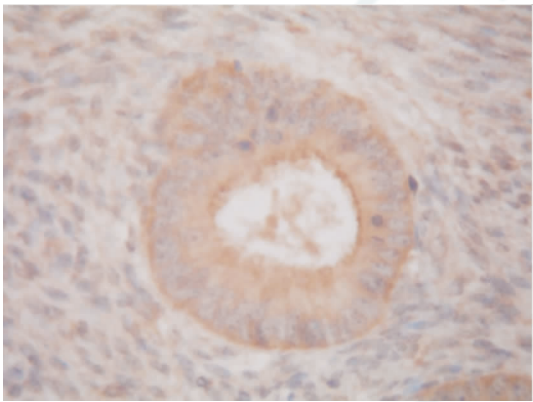


图 2 CXCL12 蛋白在位病灶中的表达(HE, ×400)
Figure 2 Expression of CXCL12 protein in eutopic endometrium(HE, ×400)

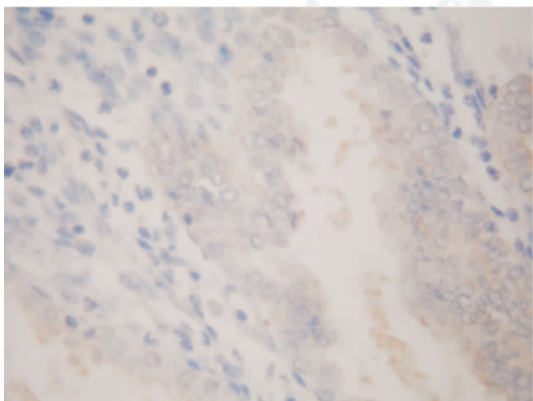


图 3 CXCL12 蛋白在对照内膜病灶中的表达(HE, ×400)
Figure 3 Expression of CXCL12 protein in control endometrium(HE, ×400)

2.2 5 组 CXCL12 mRNA 含量比较

5 组 CXCL12 mRNA 含量比较,如表 2 所示。

CXC类趋化因子,在体内由基质细胞持续分泌并呈稳定表达,通过与其特异性受体CXCR4结合,在促进肿瘤血管形成和细胞转移等方面发挥重要作用^[1]。

Laird等^[5]对正常育龄期妇女子宫内膜检测结果显示,CXCL12在子宫内膜组织中的表达并未随月经周期变化。本研究对子宫腺肌病患者在位内膜、异位病灶、病灶周围组织组以及子宫肌瘤患者相应组织中CXCL12蛋白表达和mRNA含量进行检测,旨在发现CXCL12在子宫腺肌病发病中的作用。本研究结果显示,在位内膜组CXCL12蛋白表达显著高于对照内膜组,二者比较,差异有统计学意义($t=2.647, P<0.05$),而异位病灶组CXCL12 mRNA含量与病灶周围组织组和在位内膜组比较,差异也均有统计学意义($t=-2.784, -4.990; P<0.05$),上述结果提示CXCL12可能参与子宫腺肌病的发病过程。

Muller等^[6]对乳腺癌细胞系的研究发现,100 nmol/L的CXCL12在20 s内就可使乳腺癌细胞内的丝状肌动蛋白含量增加2.2倍。另有研究显示,重组人CXCL12作用后的人卵巢癌细胞CAOV3可出现明显伪足,其长度甚至可达到细胞最大径线的2~3倍^[7]。上述研究结果提示CXCL12可以使细胞内骨架蛋白重新分布,诱导细胞发生运动、迁移。因此,子宫腺肌病患者在位内膜组织和异位病灶等病变部位中高表达的CXCL12,可能会通过诱导子宫内膜细胞发生“阿米巴”样运动,促使其通过内膜破损处进入子宫肌层。CXCL12还可直接或间接刺激血管新生,在局部微血管生成在的发病过程中具有非常重要的意义^[8-10]。这说明,CXCL12在诱导内膜细胞侵入子宫肌层同时,还刺激局部微血管生成,为异位内膜细胞的生长提供营养。

Phillips等^[11]通过对非小细胞性肺癌组织中CXCL12含量的检测发现肿瘤细胞可能沿CXCL12浓度梯度发生器官特异性转移。本研究结果显示,CXCL12 mRNA含量在子宫腺肌病在位内膜组、病灶周围组织组和异位病灶组中呈递增趋势,且在位内膜组CXCL12 mRNA含量与病灶周围组织组、异位病灶组均呈正相关关系($r=0.449, 0.461; P<0.05$),病灶周围组织组CXCL12 mRNA含量与异位病灶组呈正相关关系($r=0.679, P<0.000$)。而该趋势是否与异位的内膜细胞向远处扩散有关,尚需要进一步研究证实。

此外,本研究还发现,病灶周围组织组CXCL12

mRNA含量虽然显著低于异位病灶组,但却明显高于对照肌层组,前者与后二者比较,差异均有统计学意义($t=-2.784, -2.552; P<0.05$)。上述结果提示,病灶周围看似正常的组织中仍存在与子宫腺肌病发生有关的致病因子,成为术后病变复发的危险因素。同时也提示,子宫腺肌病患者经保守性手术后应辅以药物治疗,这对抑制病变周围组织中残存的致病因子、防止病变复发具有重要意义。

综上所述,趋化因子CXCL12参与了子宫腺肌病的发病过程,可能通过诱导内膜细胞发生异位致病,但其具体发生机制,仍有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Yu L, Cecil J, Peng SB, *et al*. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor[J]. *Gene*, 2006, 374(7):174-179.
- 2 白红, 赵丽嫣. 子宫腺肌病病因与发病机制研究进展[J]. *中国妇产科临床*, 2003, 4(6):61-64.
- 3 Laing KJ, Secombes CJ. Chemokines[J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28(5):443.
- 4 Lortat-Jacob H. The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate[J]. *Cur Opin Struct Biol*, 2009, 19(5):543-548.
- 5 Laird SM, Widdowson R, El-Sheikhi M, *et al*. Expression of CXCL12 and CXCR4 in human endometrium; effects of CXCL12 on MMP production by human endometrial cells[J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(5):1144-1152.
- 6 Muller A, Homey B, Soto H, *et al*. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2001, 410(6824):50-56.
- 7 李芳, 朱怀仕. 卵巢癌趋化因子受表达及意义[J]. *济宁医学院学报*, 2003, 26(3):1-3.
- 8 Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, *et al*. Stromal cell-derived factor-1 promotes cell Migration and tumor growth of colorectal metastasis[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(10):862-870.
- 9 Guleng B, Tateishi K, Ohta M, *et al*. Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates *in vivo* tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13):5864-5871.
- 10 韩燕华, 周应芳, 郑淑蓉. 子宫腺肌病患者子宫各部位血管形态的研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2002, 18(10):605-607.
- 11 Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, *et al*. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12):1676.

(收稿日期:2013-12-03 修回日期:2014-03-15)