

Urocortin 在子宫内膜异位症患者组织及血清中的表达水平及临床意义

马莉¹, 田金², 陈江新^{1*}

(1.湖北省武汉市第八医院,430010;2.郑州人民医院妇产科)

摘要: 子宫内膜异位症具有侵袭、复发等恶性行为特征,且存在激素依赖性,Urocortin(UCN)属于促肾上腺皮质激素释放激素,参与血管生成、炎症反应、凋亡及免疫活动调节等,本研究通过免疫组织化学(IHC)、酶联免疫吸附试验(ELISA)实验,探究56例内异症患者组织及血清中UCN表达水平与内异症临床因素之间的关系,结果显示内异症患者在位内膜及异位病灶中UCN的表达强度显著高于正常子宫内膜组织,且与患者疾病分期、病灶大小相关。内异症患者血清UCN水平(54.40 ± 9.12 pg/mL)显著高于正常对照组(21.30 ± 4.72 pg/mL)。提示UCN的表达水平与内异症发生发展密切相关,可能成为内异症早期诊断及预后评估的潜在标志物。

关键词: 子宫内膜异位症; Urocortin; IHC; ELISA

中图分类号:R711.3 文献标识码:A

The clinical significance of urocortin expression in endometriosis

MA Li, TIAN Jin, CHEN Jiangxin

(The Eighth Hospital in Wuhan, Hubei Province, Wuhan 430010, Hubei, China)

Abstract: Endometriosis has the characteristics of malignant behavior, such as invasion and recurrence, and there is hormone dependence. Urocortin (UCN) belongs to the corticotropin releasing hormone, involved in angiogenesis, inflammation, apoptosis and immune regulation. This study is to explore the relationship between the expression of UCN in the serum levels of 56 cases of endometriosis patients and clinical factors of endometriosis by immunohistochemistry (IHC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the intensity of UCN in eutopic endometrium and ectopic lesion of endometriosis was significantly higher than that of normal endometrium tissue. It was also significantly correlated with staging and lesion size. The serum UCN level (54.40 ± 9.12 pg/mL) was significantly higher in the endometriosis group than that in the control group (21.30 ± 4.72 pg/mL). It is suggested that the expression level of UCN was closely related to the development endometriosis. Thus, maybe UCN could be a potential marker for diagnosis and predicting prognosis in patients with endometriosis.

Key words: endometriosis; urocortin; immunohistochemistry; ELISA

子宫内膜异位症(以下简称内异症)指具有生长功能的子宫内膜出现在子宫腔以外的部位,是一种激素依赖性疾病,以炎症和血管生成为主要特征,以不孕及疼痛为主要症状。内异症虽然是一种良性疾病,但其因具有侵袭、复发等恶性行为特征,且有一定的恶变倾向,又被称为“不死的癌症”,严重影响育龄女性的身心健康^[1]。内异症的发病机制至今尚未完全明了,缺乏特异性血清标志物,导致其早期诊断和预后评估存在很大的困难^[2]。近

年来,有研究表明,内异症患者在位子宫内膜中存在神经内分泌细胞,其所分泌的多种细胞因子可能在子宫内膜异位症的发病中发挥作用^[3]。其中,Urocortin(UCN)是1995年从大鼠中脑中克隆出的一种含40个氨基酸的多肽,属于促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone, CRH)家族的成员,与CRH有45%的氨基酸同源性,UCN在物种之间有严格的保守性,人源性与鼠源性UCN的氨基酸序列同源性高达95%。UCN通过与CRH受体1和2(CRH-R1, CRH-R2)结合发挥作用,可参与血管生成、炎症反应、凋亡及免疫活动调节等^[4-5]。因此,猜想UCN可能与内异症的发生发展密切相

关,其在子宫内膜异位症中的研究鲜有报道。本文分别收集子宫内膜异位症患者在位内膜、异位病灶组织和非内异症患者正常子宫内膜组织,子宫内膜异位症患者的血清及健康体检者的血清,分别采用免疫组织化学技术(Immunohistochemistry, IHC)及酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)对内膜组织和血清中的 UCN 表达水平进行研究,旨在探究其在内异症中的表达情况并探讨其潜在临床意义,从而为内异症的诊断、治疗及预后评估提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 在本院伦理委员会批准及患者知情同意的情况下,收集本院妇科 2012 年 1 月~2016 年 11 月接受手术患者的子宫内膜组织。实验组:选取经病理证实的内异症患者 56 例,根据 1997 年美国生育学会提出的“修正子宫内膜异位症分期法”其中 I/II 期 10 例,III 期/IV 期 46 例,获取患者的在位子宫内膜及内异症病灶。对照组:因子宫肌瘤行子宫切除术,盆腔结构正常、无内膜病变的患者 50 例,获取患者正常子宫内膜。上述病例均无免疫疾病、急性炎症及其它雌激素依赖性疾疾病,术前 3 个月内未经激素替代治疗。实验组平均年龄为 41.40 ± 3.57 岁,对照组平均年龄为 44.10 ± 2.42 岁,差异无统计学意义($P=0.063$)。实验组与对照组病例均在术中收集标本,将标本固定于 4%多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸缓冲液中。另外,于术前留取上述 56 例内异症患者血样用于后续研究。留取体检中心健康患者的血清样本 56 例作为对照组。

1.2 主要试剂及仪器 兔抗人 UCN 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;羊抗兔/小鼠酶标二抗试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司;人 UCN ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司;石蜡组织包埋机购自美国 Leica 公司;石蜡切片机购自美国 Leica 公司;电磁炉购自中国九阳公司;电热恒温干燥箱购自上海捷成实验仪器有限公司;光学生物显微镜及成像系统购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫组织化学染色法(SP) 子宫内膜及内异症病灶组织于 20 倍体积的 4%多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸缓冲液($pH=7.4$)中室温固定至少 24 h,后续进行常规脱水及石蜡包埋处理,4 μm 连续切片,用免疫组织化学 SP 法检测 UCN 蛋白的表达水

平。具体操作步骤简述如下:二甲苯脱蜡 3 次,每次 10 min,0.3%过氧化氢-甲醇溶液室温避光封闭内源性过氧化物酶 10 min,梯度乙醇水化,蒸馏水及 PBS 冲洗 5 min,各 3 次,采用 pH 6.0 柠檬酸缓冲液高温高压修复法修复抗原 2.5 min,自来水冲洗冷却 20 min 后 PBS 冲洗 3 次;山羊血清室温封闭 20 min,滴加 1:100 倍稀释的兔抗人 UCN 一抗,阴性对照组用一抗稀释液替代,室温下孵育 1~2 h(视温度而定),PBS 冲洗 3 次;滴加羊抗兔/小鼠酶标二抗,室温孵育 1 h 后,PBS 冲洗 3 次,应用 DAB 溶液显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,镜检并采集图像。

1.3.2 酶联免疫吸附试验法(ELISA) 收集内异症患者术前及体检者清晨空腹外周静脉血 2 mL 至真空促凝采血管中,3 000 rpm 离心 15 min,取上层血清分装并保存于-80 $^{\circ}C$ 冰箱中备用。血清 UCN 水平检测采用酶联免疫吸附试验法(ELISA),操作严格按照试剂公司提供的说明书进行。实验步骤简述如下:①标准品倍比稀释及加样;②血清样品稀释 5 倍后加样;③37 $^{\circ}C$ 孵育 30 min;④洗涤 5 次,拍干;⑤加入酶标试剂,每孔 50 μL ,37 $^{\circ}C$ 孵育 30 min;⑥同④;⑦显色:每孔加入显色剂 A 50 μL ,再加入显色剂 B 50 μL ,轻轻混匀,37 $^{\circ}C$ 避光显色 15 min;⑧终止:每孔加入终止液 50 μL ;⑨酶标仪检测 OD450。

1.3.3 结果判断 综合切片中阳性细胞占观察细胞百分比和阳性细胞着色强度两项指标半定量进行判定。根据显色程度判断阳性强度,无着色计为 0 分,淡黄色计为 1 分,棕黄色计为 2 分,棕褐色计为 3 分。根据阳性细胞所占观察细胞的百分比分为:阳性细胞数 10%为 1 分,10%~50%为 2 分,50%为 3 分,将两者分数相乘,0 分计为阴性(-),1~3 分计为弱阳性(+),4~6 分计为阳性(++),7~9 分计为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料采用均数 \pm 标准差表示,组间差异比较采用独立样本 t 检验进行分析,分类资料样本率比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UCN 在子宫内膜异位症中的表达及其与内异症临床因素之间的关系 UCN 在实验组和对照组子宫内膜及异位病灶组织中均有表达,主要定位于细胞质中,呈淡黄色至棕褐色。内异症在位内膜

及异位病灶分别与正常子宫内膜相比,UCN 的表达显著增强($P<0.001$)。而 UCN 在内异症在位内膜和异位病灶中的表达无明显差异($P=0.374$)。详见图 1、表 1。将 UCN 表达水平与内异症临床因素之间的关系进行分析,统计结果表明 UCN 的表达水平在内异症在位内膜和异位病灶中,随着内异症分期

的进展逐渐升高($P<0.001$)。同时,UCN 在内异症在位内膜和异位病灶中的表达水平随卵巢子宫内膜异位症囊肿直径的增加而升高($P<0.001$)。然而,内异症中 UCN 的阳性程度与患者 BMI 指数、是否痛经、所处月经周期等情况无关($P>0.05$)。详见表 2、表 3。

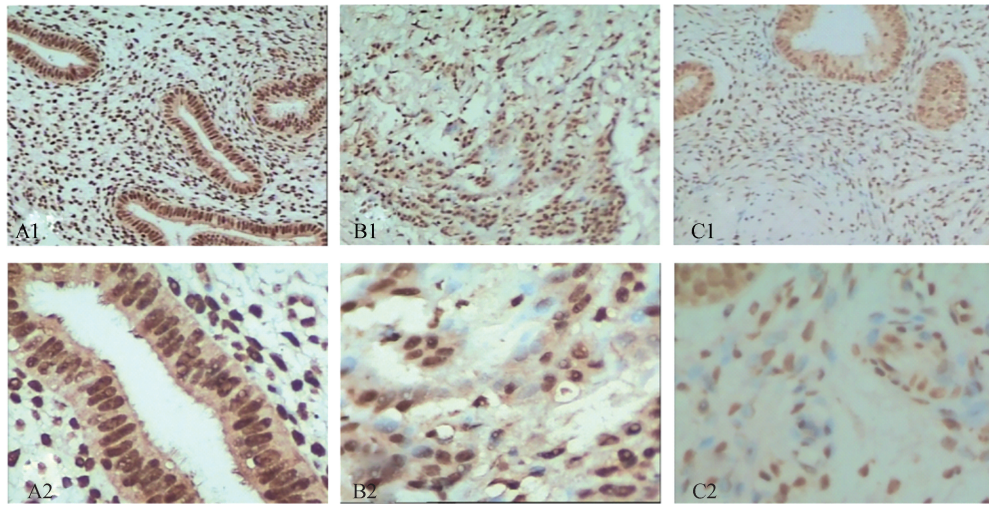


图 1 UCN 在子宫内膜异位症中的表达

A1、在位内膜(100×); B1、异位病灶(100×); C1、正常内膜(100×);
A2、在位内膜(400×); B2、异位病灶(400×); C2、正常内膜(400×)

表 1 子宫内膜异位症中 UCN 的表达水平(例,%)

组别	n	+++	++	+
内异症组				
在位内膜	56	46(82.1)	10(17.9)	0(0.0)
异位病灶	56	44(78.6)	10(17.9)	2(3.6)
正常对照组	50	5(10.0)	19(38.0)	26(52.0)

表 2 内异症在位内膜中 UCN 的表达水平
与临床因素之间的关系(例,%)

临床因素	n	+++	++	+	χ^2	P
分期						
I/II 期	10	4(40.0)	6(60.0)	0(0.0)	14.740	<0.001
III-IV 期	46	42(91.3)	4(8.7)	0(0.0)		
病灶直径						
<3.0 cm	12	6(50.0)	6(50.0)	0(0.0)	10.757	<0.001
>3.0 cm	44	40(90.9)	4(9.1)	0(0.0)		
BMI 指数						
<18.5	2	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	2.191	>0.05
18.5~24.9	42	36(85.7)	6(14.3)	0(0.0)		
25.0~28.0	8	6(75.0)	2(25.0)	0(0.0)		
>28.0	4	3(75.0)	1(25.0)	0(0.0)		
痛经						
有	31	25(80.6)	6(19.4)	0(0.0)	0.106	>0.05
无	25	21(84.0)	4(16.0)	0(0.0)		
月经周期						
增殖期	36	29(80.6)	7(19.4)	0(0.0)	0.173	>0.05
分泌期	20	17(85.0)	3(15.0)	0(0.0)		

表 3 内异症异位病灶中 UCN 的表达水平与
临床因素之间的关系(例,%)

临床因素	n	+++	++	+	χ^2	P
分期						
I/II 期	10	2(20.0)	6(60.0)	2(20.0)	26.623	<0.001
III~IV 期	46	42(91.3)	4(8.7)	0(0.0)		
病灶直径						
<3.0 cm	12	3(25.0)	7(58.3)	2(16.7)	26.924	<0.001
>3.0 cm	44	41(93.2)	3(6.8)	0(0.0)		
BMI 指数						
<18.5	2	1(50.0)	1(50.0)	0(0.0)	10.691	>0.05
18.5~24.9	42	35(83.3)	7(16.7)	0(0.0)		
25.0~28.0	8	6(75.0)	1(12.5)	1(12.5)		
>28.0	4	2(50.0)	1(25.0)	1(25.0)		
痛经						
有	31	26(83.9)	4(12.9)	1(3.2)	1.404	>0.05
无	25	18(72.0)	6(24.0)	1(4.0)		
月经周期						
增殖期	36	30(83.3)	5(13.9)	1(2.8)	1.358	>0.05
分泌期	20	14(70.0)	5(25.0)	1(5.0)		

2.2 UCN 在内异症患者血清中的表达

内异症患者血清 UCN 水平(54.40 ± 9.12 pg/mL)显著高于正常对照组(21.30 ± 4.72 pg/mL) ($t = 10.196, P < 0.001$)。

3 讨 论

内异症是育龄期女性的常见病,目前诊治难点在于早期诊断困难且易复发。内异症是一种多病因疾病,其发病机制目前尚无定论。目前,最为广泛接受的是 Sampson^[6]提出的经血逆流学说,即脱落的子宫内膜随经血逆流进入盆腔,粘附和侵袭入腹膜间皮层,进而形成新生血管,最终导致子宫内膜组织的异位形成。但经血逆流的发生率高达 70%~90%,仅有约 10%~15%的女性患有子宫内膜异位症^[7],究其原因,有国内学者提出了“在位内膜决定论”^[8-9],与正常子宫内膜相比,内异症患者的在位内膜在血管生成、侵袭、转移以及凋亡等方面存在诸多基因差异和蛋白表达异常。近年来,有研究表明,内异症患者在位子宫内膜中存在神经内分泌细胞,其所分泌的多种细胞因子可能在子宫内膜异位症的发病中发挥重要作用^[3]。其中,UCN 可参与血管生成、炎症反应、凋亡及免疫活动调节等^[10]。因此,本文通过将 56 例内异症在位内膜、异位病灶及内异症患者血清中 UCN 的表达情况与正常对照组进行对比,结果表明内异症在位内膜及异位病灶组织中,UCN 的表达显著增高。进而将其表达水平与多种临床因素相分析表明,UCN 的表达与内异症的分期和病灶大小高度相关,随着疾病的进展,UCN 的表达逐渐增强。

目前,内异症的无创性诊断多依赖于临床表现及影像学,这使得一部分无症状或早期内异症受到了忽视,进而影响了相关的治疗。CA125 是目前广泛应用于临床的一种卵巢肿瘤的血清学标志物,但是其特异性不够高,在卵巢癌、子宫内膜异位症、子宫腺肌症、腹膜炎及盆腔炎中均有升高的可能^[11-15]。可见,血清 CA125 并不是一种十分可靠的内异症分子标志物。因此,寻找一种更佳有效的内异症特异性血清标志物显得尤为重要^[16-17]。UCN 作为一种分泌性的细胞因子,可在血清中检出,与血管生成、炎症反应、凋亡及免疫活动调节等生理及病理过程相关。因而血清 UCN 可能成为一种潜在的内异症血清标志物。本研究检测了 56 例内异症患者和 56 例正常体检者的血清 UCN 水平。结果表明,内异症患者的血 UCN 水平为(54.40±9.12 pg/mL),显著高于正常对照组(21.30±4.72 pg/mL),差异具有统计学意义($t=10.196, P<0.001$)。因此,血清 UCN 有可能成为一种极具潜力的内异症标志物。

综上所述,UCN 的异常表达与内异症的发生和发展密切相关,UCN 可能成为内异症治疗的新靶点。另外,对 UCN 的深入研究有助于进一步了解内

异症的生物学特性,同时为内异症的早期诊断、预后估计及疗效评估提供一个新的分子标志物。

参考文献:

- [1] GIUDICE LC. Clinical practice endometriosis [J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2389-98.
- [2] HUMMELSHOJ L. Endometriosis: an old problem without a current solution [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96(6): 779-82.
- [3] WANG G, TOKUSHIGE N, RUSSELL P, et al. Neuroendocrine cells in eutopic endometrium of women with endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2010, 25(2): 387-91.
- [4] JOAN VAUGHAN, CYNTHIA DONALDSON, JACKSON BITTEN-COURT, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor [J]. *Nature*, 1995, 378(6554): 287-92.
- [5] FLORIO P, REIS F M, TORRES P B, et al. Plasma urocortin levels in the diagnosis of ovarian endometriosis [J]. *Obstet Gynecol*, 2007, 110(3): 594-600.
- [6] SAMPSON J A. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation [J]. *Am J Pathol*, 1927, 3(2): 93-110.
- [7] The epidemiology of endometriosis. The epidemiology of endometriosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 30(1): 1-19.
- [8] 郎景和. 子宫内膜异位症发病的在位内膜决定论 [C]. 第八次全国妇产科学学术会议论文汇编, 2004(11-1): 81-2.
- [9] 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): 3-4.
- [10] NOVEMBRI R, CARRARELLI P, TOTI P, et al. Urocortin 2 and urocortin 3 in endometriosis: evidence for a possible role in inflammatory response [J]. *Mol Hum Reprod*, 2011, 17(9): 587-93.
- [11] SONG MJ, LEE SH, CHOI MR, et al. Diagnostic value of CA125 as a predictor of recurrence in advanced ovarian cancer [J]. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2013, 34(2): 148-51.
- [12] HIRSCH M, DUFFY JM, DEGUARA CS, et al. Diagnostic accuracy of cancer antigen 125 (CA125) for endometriosis in symptomatic women: a multi-center study [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2017, 210(5): 102-7.
- [13] KIL K, CHUNG JE, PAK HJ, et al. Usefulness of CA125 in the differential diagnosis of uterine adenomyosis and myoma [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2015, 185(16): 131-5.
- [14] PANORCHAN K, DAVENPORT A. Diagnostic and prognostic role of peritoneal CA125 in peritoneal dialysis patients presenting with acute peritonitis [J]. *BMC Nephrol*, 2014, 12(15): 149.
- [15] MOORE RG, MILLER MC, STEINHOFF MM, et al. Serum HE4 levels are less frequently elevated than CA125 in women with benign gynecologic disorders [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 206(4): 351-8.
- [16] KOCBEK V, VOUK K, BERSINGER NA, et al. Panels of cytokines and other secretory proteins as potential biomarkers of ovarian endometriosis [J]. *J Mol Diagn*, 2015, 17(3): 325-34.
- [17] KOCBEK V, VOUK K, MUELLER MD, et al. Elevated glycodelin-A concentrations in serum and peritoneal fluid of women with ovarian endometriosis [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29(5): 455-9.

(本文编辑:蒋湘莲)