

## 子宫内膜异位症患者SDF-1、CXCR-4水平的变化及临床意义

王飞鹏, 张晓英, 姜晓春

咸阳市中心医院妇科, 陕西 咸阳 712000

**【摘要】** 目的 探讨子宫内膜异位症患者基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)、趋化因子受体-4 (CXCR-4)水平的变化及其临床意义。方法 收集咸阳市中心医院2017年10月至2018年10月收治的40例子宫内膜异位症患者的在位内膜(在位组)及异位内膜(异位组)组织标本,另取40例子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织作为对照组,采用免疫组织化学和逆转录定量PCR (qRT-PCR)测定并比较各组患者的SDF-1、CXCR-4水平。结果 SDF-1、CXCR-4在各组患者的腺上皮细胞和间质细胞中均有分布,其中腺上皮细胞有明显着色;异位组患者的SDF-1、CXCR-4平均光密度值分别为 $0.194\pm 0.025$ 、 $0.169\pm 0.081$ ,明显高于在位组的 $0.140\pm 0.021$ 、 $0.121\pm 0.006$ 和对照组的 $1.026\pm 0.159$ 、 $1.007\pm 0.181$ ,且在位组SDF-1、CXCR-4平均光密度值明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );异位组患者的SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量分别为 $3.015\pm 0.613$ 、 $3.142\pm 0.281$ ,明显高于在位组的 $1.901\pm 0.319$ 、 $1.651\pm 0.219$ 和对照组的 $1.026\pm 0.159$ 、 $1.007\pm 0.181$ ,且在位组SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量明显高于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 子宫内膜异位内膜组织、在位内膜组织中SDF-1、CXCR-4的表达均上调,可能参与子宫内膜异位症的发生发展。

**【关键词】** 子宫内膜异位症;趋化因子受体-4;基质细胞衍生因子-1;相对表达量;临床意义

**【中图分类号】** R711.74 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)18-2379-04

**Changes of stromal cell derived factor-1 and chemokine receptor-4 levels in patients with endometriosis and their clinical significance.** WANG Fei-peng, ZHANG Xiao-ying, JIANG Xiao-chun. Department of Gynecology, the Central Hospital of Xianyang City, Xianyang 712000, Shaanxi, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the changes and clinical significance of stromal cell derived factor-1 (SDF-1) and chemokine receptor-4 (CXCR-4) levels in patients with endometriosis. **Methods** Forty specimens of eutopic endometrium (eutopic group) and ectopic endometrium (ectopic group) were collected from patients with endometriosis in the Central Hospital of Xianyang City from October 2017 to October 2018. Another 40 specimens of normal endometrium from patients with hysteromyoma were taken as control group. The levels of SDF-1 and CXCR-4 in each group were measured by immunohistochemistry and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** SDF-1 and CXCR-4 were distributed in glandular epithelial cells and stromal cells of all groups, and glandular epithelial cells were markedly stained. The average optical densities of SDF-1 and CXCR-4 in ectopic group were  $0.194\pm 0.025$  and  $0.169\pm 0.081$ , respectively, which were significantly higher than  $0.140\pm 0.021$  and  $0.121\pm 0.006$  in eutopic group and  $1.026\pm 0.159$  and  $1.007\pm 0.181$  in control group ( $P<0.05$ ), and the values were significantly higher in ectopic group than control group ( $P<0.05$ ). The relative expression levels of SDF-1 and CXCR-4 mRNA in ectopic group were  $3.015\pm 0.613$  and  $3.142\pm 0.281$ , respectively, which were significantly higher than  $1.901\pm 0.319$  and  $1.651\pm 0.219$  in eutopic group and  $1.026\pm 0.159$  and  $1.007\pm 0.181$  in control group ( $P<0.05$ ), and the levels were significantly higher in ectopic group than control group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression levels of SDF-1 and CXCR-4 in ectopic endometrium and eutopic endometrium were up-regulated, which may be involved in the occurrence and development of endometriosis.

**【Key words】** Endometriosis; CXCR-4; SDF-1; Relative expression; Clinical significance

子宫内膜异位症是妇科常见良性疾病,近年来发病率明显增加,对育龄妇女的生殖健康造成了不良影响,易于复发,是妇科难治之症,关于本病的确切发生机制目前尚未明晰<sup>[1-2]</sup>。子宫内膜异位症存在潜在的恶变,其具有与恶性肿瘤类似的侵袭和转移特征,为此可能在发病机制上和恶性肿瘤有相似的地方。基质细胞衍生因子-1 (SDF-1)和趋化因子受体-4 (CXCR-4)结合后形成的SDF-1/CXCR4在多种肿瘤的发生、发展及转移中扮演着重要作用<sup>[3-4]</sup>。为此本研究观察子宫内膜异位症患者SDF-1、CXCR-4水平的表达,进一步探讨各指标在促进疾病发生发展中的作用,现

将结果报道如下:

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集咸阳市中心医院2017年10月至2018年10月收治的40例子宫内膜异位症患者(增生期内膜28例,分泌期内膜12例)的在位内膜(在位组)及异位内膜(异位组)组织标本。纳入标准:经腹腔镜或术后病理检查证实为子宫内膜异位症;月经周期正常。排除标准:排除其他妇科及内外科合并症者;术前3个月内应用激素类药物者。另取40例子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织作为对照组,取材部位与在位内膜取材部位尽量保持一致。本研究经医院伦

理委员会批准,患者均签署知情同意书。

## 1.2 方法

1.2.1 一般试剂 山羊抗人 SDF-1、CXCR-4 试剂盒均由北京博奥森生物技术有限公司提供。DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。LEICA AM135 型切片机购自德国徕卡公司。SDF-1、CXCR4 及内参  $\beta$ -actin 引物均由上海博亚生物技术有限公司提供。逆转录试剂盒与 RNA 提取试剂由天津生化科技北京有限公司提供。

1.2.2 实验方法 获取标本后分为两份,一份经 10% 甲醛固定,用于免疫组化法测定;另一份置于液氮罐冻存,用于逆转录定量 PCR (q RT-PCR) 测定。免疫组织化学法:常规石蜡包埋,切片后脱蜡,接着配制 PBS 浸泡 5 min。热抗原修复,3% 过氧化氢室温孵育,在含有煮沸的柠檬酸修复液中进行抗原修复后,滴加山羊血清工作液封闭,孵育 30 min。滴加一抗 (SDF-1、CXCR-4 工作浓度为 1:100),置于 4℃ 冰箱过夜。次日加入相应的二抗,置于 37℃ 保温箱 15 min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,置于 37℃ 保温箱 15 min。加 DAB 显色剂,苏木精复染、脱

水透明和封片。每一个环节均用 PBS 缓冲液冲洗,每次 5 min。按常规行免疫组化染色,操作具体步骤依据试剂盒说明书进行。应用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 对 SDF-1、CXCR-4 免疫组化切片进行图像扫描和分析。结果判定:每张切片随机观察 5 个 400× 视野,然后得到阳性颗粒的强度均值 (OD),分别取平均值进行比较。q RT-PCR:引物序列见表 1。取标本加入 TRIzol,充分匀浆提取总 RNA,测定总 RNA 的浓度和纯度,逆转录。PCR 扩增 SDF-1、CXCR-4,并扩增  $\beta$ -actin。以 cDNA 为模板,反应总体积 50  $\mu$ L,加入 10× PCR 反应缓冲液以及相应的特异引物。反应条件:94℃ 预变性 2 min,1 个循环;随后 94℃ 变性 20 s,35 个循环;SDF-1、CXCR4、内参  $\beta$ -actin 分别 55℃ 退火 30 s,20 s,35 个循环;68℃ 延伸 1 min,共 35 个循环。灌制 1.5% 琼脂糖凝胶,取 10  $\mu$ L PCR 产物进行电泳鉴定,电压为 5 V/cm。在紫外分光光度计下观察清晰的特异扩增条带,应用凝胶扫描成像系统对 PCR 产物条带进行分析。计算方法:待测样品相对值 =  $2^{-(\Delta C_t \beta\text{-actin} - \Delta C_t \text{待测样品})} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$ ,  $\Delta C_t = C_{t \text{阴性对照}} - C_{t \text{待测样品}} - C_{t \beta\text{-actin}}$

表 1 SDF-1、CXCR-4 和  $\beta$ -actin 目的基因 PCR 引物

目的基因	上游引物	下游引物
SDF-1	5'-CCATGAACGCCAAG-GTCGTGGTC-3'	5'-AGGGCATGGATGAATA-TA-3'
CXCR-4	5'-AGGTGGTCTATGTTG-GCGTCTGGAT-3'	5'-AGGATGGGGATGATT-GTGGTCTTGA-3'
内参对照物 $\beta$ -actin	5'-AAGAGAGGCATCCT-CACCCT-3'	5'-GGAAGGAAGGCTGGAAG-3'

1.3 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 22.0 统计软件分析,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组患者的 SDF-1、CXCR-4 表达水平比较 SDF-1、CXCR-4 在异位组、在位组和对照组的腺

上皮细胞和间质细胞中都有分布,其中腺上皮细胞有明显着色,见图 1 和图 2。SDF-1、CXCR-4 平均光密度值在各组间比较差异均具有显著统计学意义 ( $P < 0.01$ ),异位组 SDF-1、CXCR-4 的表达水平明显高于在位组和对照组,且在位组 SDF-1、CXCR-4 的表达水平明显高于对照组,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

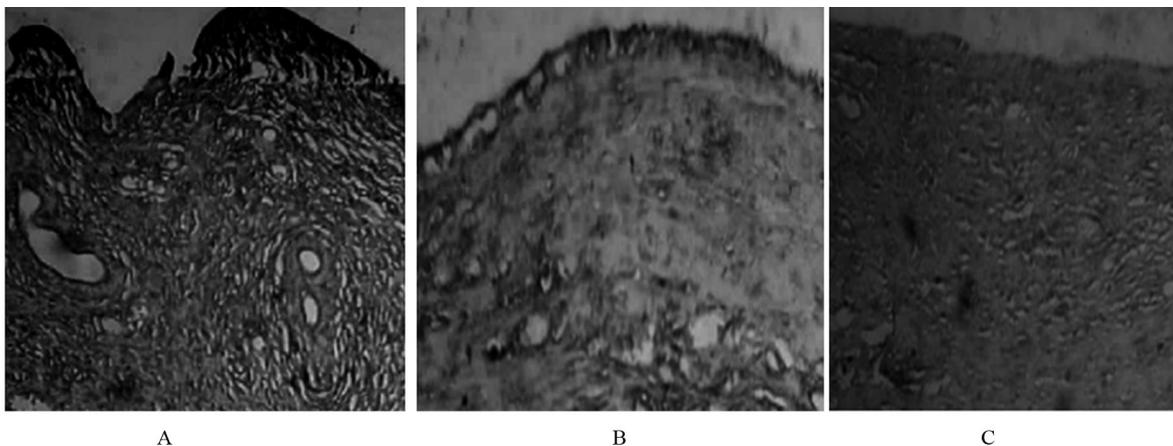


图 1 各组标本 SDF-1 的免疫组织化学染色 (10×40)

注:A,异位内膜中 SDF-1 表达情况;B,在位内膜中 SDF-1 表达情况;C,正常内膜中 SDF-1 表达情况。

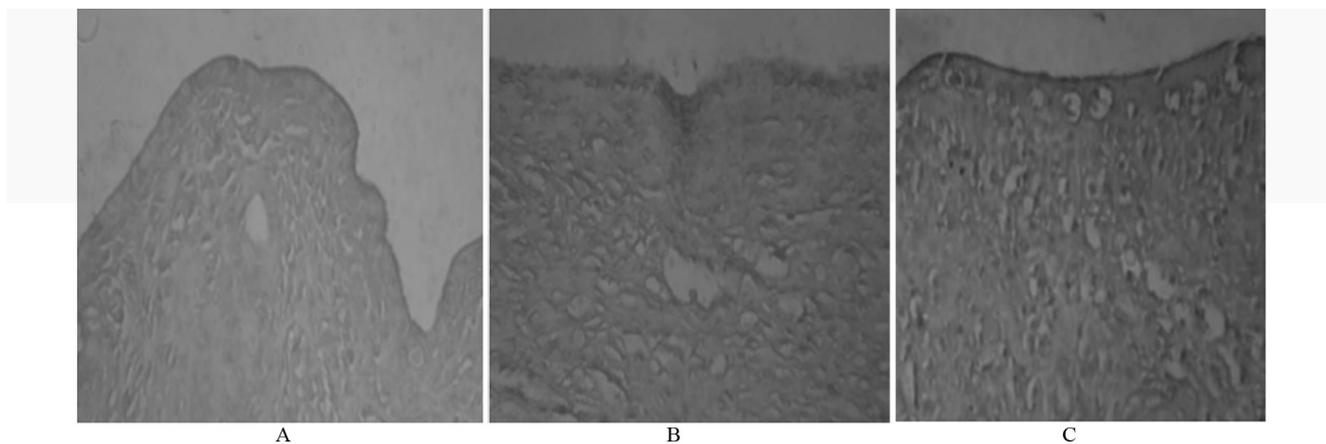


图2 各组标本CXCR-4的免疫组织化学染色(10×40)

注:A,异位内膜中CXCR-4表达情况;B,在位内膜中CXCR-4表达情况;C,正常内膜中CXCR-4表达情况。

表2 各组患者的SDF-1、CXCR-4表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	SDF-1	CXCR-4
异位组	40	0.194±0.025 <sup>b</sup>	0.169±0.081 <sup>b</sup>
在位组	40	0.140±0.021 <sup>ab</sup>	0.121±0.006 <sup>ab</sup>
对照组	40	0.039±0.08 <sup>a</sup>	0.047±0.005 <sup>a</sup>
F值		99.496	68.451
P值		<0.01	<0.01

注:与异位组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

**2.2 各组患者的SDF-1、CXCR-4 mRNA表达水平比较** 三组患者的SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量比较差异均有显著统计学意义( $P<0.01$ ),异位组患者的SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量明显高于在位组和对照组,且在位组SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量明显高于对照组,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),见表3。

表3 各组患者的SDF-1、CXCR-4 mRNA表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数	SDF-1 mRNA	CXCR-4 mRNA
异位组	40	3.015±0.613 <sup>b</sup>	3.142±0.281 <sup>b</sup>
在位组	40	1.901±0.319 <sup>ab</sup>	1.651±0.219 <sup>ab</sup>
对照组	30	1.026±0.159 <sup>a</sup>	1.007±0.181 <sup>a</sup>
F值		192.258	785.143
P值		<0.01	<0.01

注:与异位组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与对照组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

趋化因子是细胞因子超家族中的一员,能够趋化细胞定向移动,是一种由70~90个氨基酸组成的蛋白质。SDF-1又称作趋化因子CXCL12,属于CXC趋化因子亚家族。SDF-1是小分子的细胞因子,可以使多种细胞发生趋化运动<sup>[5]</sup>。SDF-1也称B细胞刺激因子,主要是因为其前B细胞的增殖分化过程中扮演着重要的角色。该细胞因子有很多亚型,例如 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 等,其中SDF-1 $\alpha$ 在多种组织(包括胸腺、骨髓、脾脏、心、肺、肝、肾)都有表达<sup>[6]</sup>。CXCR-4是由352个氨基酸组成的G蛋白偶联受体,具有7次跨膜结构,在多种细胞表面都有广泛表达,例如树突状细胞、单核/巨噬细胞、

前B细胞、胸腺细胞、外周血淋巴细胞等<sup>[7]</sup>。CXCR-4和SDF-1相对特殊,CXCR-4是SDF-1唯一受体,而绝大多数趋化因子受体可以有多个配体。CXCR4和SDF-1二者特异性结合后参与选择性白细胞的迁徙,在免疫系统、中枢神经系统的发育中扮演着重要的角色,与HIV-1病毒侵染、炎症反应、造血功能、胚胎发育及肿瘤细胞的迁移、增生等有着密切的联系<sup>[8]</sup>。国外研究发现,CXCR4受体在肿瘤的原发灶及转移灶的表达水平较高,SDF-1在转移灶局部的表达水平较高<sup>[9-10]</sup>。有关SDF-1/CXCR4信号轴研究近年来取得了新的进展。有学者研究表明,SDF-1与CXCR4两者的结合激活了G蛋白,进一步提高肿瘤细胞中基质金属蛋白酶(MMPs)等水平,增强了肿瘤抗凋亡作用,调节肿瘤细胞的侵袭<sup>[11]</sup>。抑制SDF-1/CXCR4信号轴为今后寻求恶性肿瘤治疗的新靶点提供参考。国外学者报道了子宫内膜癌中SDF-1/CXCR4的变化,发现月经周期各时相的子宫内膜均有CXCR-4的表达,而且其水平和患者月经周期有密切关系,在分泌的中期CXCR-4的表达较为显著<sup>[12]</sup>。

子宫内膜异位症在育龄妇女中的发生率为10%~13%,本病虽是常见的妇科良性疾病,但也是导致妇女不孕的重要因素之一,相关数据显示在不孕患者中子宫内膜异位症的发生率高达80%,而且有60%的子宫内膜异位症患者伴有慢性盆腔痛,严重影响患者生殖健康和生命质量<sup>[13-14]</sup>。本病发病机制较为复杂,到目前未完全明确,多数学者支持逆流学说及免疫活性细胞功能的影响等<sup>[15-16]</sup>。国外学者研究认为,子宫内膜异位症患者的子宫内膜和正常育龄妇女存在本质上的差异,异位种植引起子宫内膜异位症的发生,子宫内膜细胞凋亡在子宫内膜异位症的生理及病理过程起到重要作用<sup>[17-18]</sup>。子宫在位内膜的部分因子表达可以对异位灶的分子表达进行预测。趋化因子及其受体与多种自身免疫性疾病有密切相关,在子宫内膜异位症患者的在位子宫内膜及异位灶,正常妇女子宫

内膜也能检测到一些趋化因子受体<sup>[19]</sup>。为此,本研究以正常子宫内膜为对照,通过免疫组化技术和PCR技术分析CXCR-4和SDF-1在本病发生发展中的作用。研究结果显示在子宫内膜异位症患者异位内膜及在位内膜组织,正常子宫内膜组织均有SDF-1、CXCR-4的表达。统计学分析,异位组SDF-1、CXCR-4的表达水平明显高于在位组和对照组,差异具有统计学意义,且在位组SDF-1、CXCR-4的表达水平明显高于对照组,比较差异具有统计学意义;异位组SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量明显高于在位组和对照组,比较差异具有统计学意义,且在位组SDF-1、CXCR-4 mRNA的相对表达量明显高于对照组,差异具有统计学意义。提示SDF-1、CXCR-4的高水平促进子宫内膜异位症的发生与发展,究其原因可能和SDF-1、CXCR-4高表达可能通过多种细胞间信号通道的激活而使得子宫内膜异位症病程不断进展。也有报道子宫内膜癌CXCR-4与分化程度有密切关系,分化程度越高,其表达水平越高。国内学者认为,在位和异位子宫内膜局部雌激素水平上升会促进SDF-1/CXCR-4的表达<sup>[20]</sup>。而且在SDF-1可以与趋化因子包括IL-8、MCP-1在雌激素的介导下,促进子宫内膜的黏附、侵袭以及血管生成。但SDF-1、CXCR-4促进异位子宫内膜的黏附、侵袭以及血管生成的机制未完全阐明,尚有待进一步探究。

综上所述,异位内膜组织、在位内膜组织中SDF-1、CXCR-4的表达均上调,可能参与子宫内膜异位症的发生发展。相信随着对SDF-1/CXCR4信号轴与子宫内膜异位症关系更进一步的研究,特别是SDF-1、CXCR-4介导的细胞内信号转导机制方面,会深入了解子宫内膜异位症的发病机制,为治疗子宫内膜异位症提供可行依据。

#### 参考文献

- [1] 黄俊花,刘明星,陈晓红,等.不同临床病理类型子宫内膜异位症合并不孕患者生育力的研究[J].中国微创外科杂志,2017,17(7):594-598.
- [2] 刘洪雪,李健,罗平.宫-腹腔镜联合治疗子宫内膜异位症合并不孕患者术后妊娠的影响因素分析[J].实用妇产科杂志,2017,33(2):68-71.
- [3] 叶明宝,田俊强,常宏,等.SDF-1/CXCR4在膀胱癌组织中的表达及其与负性共刺激分子PD-L1、细胞凋亡和侵袭性的相关性研究[J].海南医学院学报,2017,23(6):736-738.
- [4] 蔡骏.SDF-1及其受体CXCR4对结肠癌肝转移潜能的影响研究[J].中国现代普通外科进展,2017,20(1):10-12.
- [5] 赵海宁,谢莹莺,马德寿,等.青海地区汉族、藏族、回族乳腺癌患者中CXCL12和CXCR4的表达及意义[J].现代中西医结合杂志,2019,28(3):263-266.
- [6] 郭清,吕英璞,张玮璨,等.子宫癌组织中CXCL12-CXCR4生物轴及MMP2-TIMP2的表达及意义[J].河北医药,2016,38(5):656-658.
- [7] 娄英,梁文倩.宫颈癌患者HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、MVD、CXCL12/CXCR4的表达及其预后研究[J].中国妇幼保健,2016,31(20):4135-4138.
- [8] 周俊,叶丽,林凡莉,等.CXCL12、CXCR4、MVD在多发性骨髓瘤骨髓微龕中表达及意义[J].重庆医学,2018,47(13):35-38.
- [9] HECKMANN D, MAIER P, LAUFS S, et al. CXCR4 expression and treatment with SDF-1 $\alpha$  or plerixafor modulate proliferation and chemosensitivity of colon cancer cells 1 [J]. Transl Oncol, 2013, 6(2): 124-132.
- [10] BENEDICTO A, ROMAYOR I, ARTETA B. CXCR4 receptor blockade reduces the contribution of tumor and stromal cells to the metastatic growth in the liver [J]. Oncology Rep, 2018, 39(4): 2022-2030.
- [11] 廖梢,王任华,程兰,等.肺癌组织中SDF-1和CXCR4蛋白表达及对肺癌细胞生物学特性的影响[J].肿瘤药学,2017,7(2):179-182.
- [12] Sirohi VK, Popli P, Sankhwar P, et al. Curcumin exhibits anti-tumor effect and attenuates cellular migration, via, Slit-2 mediated down-regulation of SDF-1 and CXCR4 in endometrial adenocarcinoma cells [J]. J Nutr Biochem, 2017, 44(11): 60-70.
- [13] HEARD ME, MELNYK SB, SIMMEN FA, et al. High-fat diet promotion of endometriosis in an immunocompetent mouse model is associated with altered peripheral and ectopic lesion redox and inflammatory status [J]. Endocrinology, 2016, 157(7): 2780-2782.
- [14] 许思娟,倪亚莉.不孕妇女的子宫内膜异位症诊断问题[J].实用妇产科杂志,2012,28(8):611-613.
- [15] 张统.子宫内膜异位症内膜组织中树突状细胞的变化及其与蛋白酶表达、免疫应答的相关性[J].海南医学院学报,2018,24(20):36-39.
- [16] ZHAO RH. Strategies for activating blood circulation-regulating gan (Liver)-tonifying shen (Kidney) sequential therapy of endometriosis-Associated infertility [J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(4): 243-245.
- [17] FALCONE T, LEBOVIC DI. Clinical management of endometriosis [J]. Obstet Gynecol, 2017, 35(1): 3-4.
- [18] TAYLOR HS, GIUDICE LC, LESSEY BA, et al. Treatment of endometriosis-associated pain with Elagolix, an oral GnRH antagonist [J]. N Engl J Med, 2017, 377(1): 28-40.
- [19] 张敏,宋殿荣,曹保利,等.复方莪术散对大鼠子宫内膜异位症基质细胞衍生因子-1及其受体表达的影响[J].中国中西医结合外科杂志,2016,22(1):38-41.
- [20] 廉红梅,刘义,吕立群.17 $\beta$ -雌二醇对子宫内膜异位症患者在位内膜间质细胞趋化因子SDF-1/CXCR4 mRNA及蛋白表达的影响[J].中国妇幼保健,2010,25(33):4914-4917.

(收稿日期:2019-04-25)