

子宫内膜异位症患者在位和异位内膜组织中 人 β 防御素-2的表达

陈淑琴, 刘克玄, 牛 刚, 姚书忠, 周灿权*
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】检测人 β 防御素-2(hBD-2)在正常子宫内膜、子宫内膜异位症(内异症)患者的在位和异位内膜组织中的表达,探讨hBD-2在内异症发病中的作用。【方法】选择25例内异症患者的卵巢异位内膜组织(异位内膜组)和相应的在位子宫内膜(在位内膜组),以及25例非子宫内膜异位症的子宫肌瘤患者(对照组)的子宫内膜组织。采用实时荧光定量PCR(Real-Time PCR)和原位杂交技术检测各组内膜组织中hBD-2的基因表达,以及hBD-2在内异症不同临床分期的异位内膜和在位内膜组织中的表达差异。【结果】异位内膜组内膜组织中hBD-2的基因表达水平显著高于在位内膜组和对照组($P < 0.05$)。在位内膜组和对照组子宫内膜组织中hBD-2的基因表达水平,差异无统计学意义($P > 0.05$)。异位内膜组中,hBD-2临床分期表达为I期高于III期和IV期、II期高于III期和IV期,差异有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】异位内膜组织中hBD-2的高表达可能参与了内异症的发病。

关键词: 防御素; 子宫内膜异位症; 卵巢; 基因表达; 人

中图分类号: R711 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)06-0747-06

Expression of Human β Defensin-2 in Eutopic and Ectopic Endometrium of Women with Endometriosis

CHEN Shu-qin, LIU Ke-xuan, NIU Gang, YAO Shu-zhong, ZHOU Can-quan*

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression of human β defensin-2 (hBD-2) in the eutopic and ectopic endometrium of women with ovarian endometriosis and explore the role of hBD-2 in the pathogenesis of endometriosis. 【Methods】 Twenty-five women with ovarian endometriosis and 25 controls were studied. Expression of hBD-2 was investigated quantitatively using real-time PCR and in-situ hybridization. Expression of hBD-2 was compared in the eutopic and ectopic endometrium of different clinical stage. 【Results】 hBD-2 gene expression was significantly stronger in the ectopic endometrium group than that in the eutopic endometrium group and the control group ($P < 0.05$), but there were no significant difference between the control group and the eutopic endometrium group. In the ectopic endometrium group, hBD-2 expression in the first stage and second stage were obviously stronger than that in the third stage and forth stage ($P < 0.05$), respectively. 【Conclusion】 Up-regulated expression of hBD-2 might play a pathogenic role in the formation of endometriosis.

Key words: defensin; endometriosis; ovarian; gene expression; human

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(6): 747-752]

子宫内膜异位症(内异症)是一种生育年龄女性的常见良性慢性妇科疾病,是引起不孕不育的重要病因^[1],与人类自身免疫缺陷有着密切的

关系^[2]。人 β 防御素(human β defensin, hBD)是人类自身免疫系统中的一个重要组成部分,目前报道的共有6种,主要由于上皮细胞合成和分泌,在

收稿日期: 2009-03-15

基金项目: 广东省科技计划项目(2007B030502006)

作者简介: 陈淑琴, 博士, 主治医师, E-mail: chenshuqin1021@yahoo.com.cn; * 通信作者, 周灿权, 教授, 博士生导师, E-mail: zhoucquan@hotmail.com.

保护上皮细胞和黏膜免受感染起着屏障防御的作用^[3-4]。人 β 防御素2(human β defensin 2, hBD-2)是近来发现的第一个炎症及细胞因子可诱导其表达的人类防御素。研究表明,hBD-2在天然免疫和获得免疫中均起着重要的作用,存在于正常子宫内膜组织中,并且可能在维系正常生殖道的粘膜防御中起着重要的作用^[5-7]。目前,hBD-2在内异症患者的在位子宫内膜及异位内膜组织中表达及作用如何,国内外未见报道。本文拟检测 hBD-2 在非内异症患者子宫内膜组织以及内异症患者在位和异位内膜组织中的表达水平,探讨其可能的临床意义。

1 材料与方 法

1.1 研究对象及分组

选择2007年2月至2008年4月在中山大学附属第一医院妇科住院的内异症患者25例(内异症组),患者月经规律,无其他内分泌、免疫、代谢性疾病、骨质疏松症及严重的内科疾患等,无长期或术前3个月内激素用药史。该组患者平均年龄35.8($S = 5.6$)岁,均为腹腔镜下行卵巢内膜异位囊肿剥离术的患者,并经腹腔镜检查和术后病理检查确诊为卵巢内膜异位囊肿,按照1985年美国生育学会修订的内异症分期法进行分期,均为I~IV期。术中同时取卵巢异位内膜组织(异位内膜组,25例)及相应患者的子宫内膜组织(在位内膜组,25例)。另同期选择25例因子宫肌瘤行腹腔镜下子宫切除术患者,子宫切除后马上取其子宫内膜(非内异症组,即对照组),术中明确无内异症,且肉眼检查和病理检查均排除盆腔炎性病变、子宫腺肌症等病变。该组患者平均年龄37.5($S = 6.8$)岁。两组患者的年龄比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.627, P = 0.568$)。两组手术均在增殖期和分泌期进行,其中对照组增殖期14例,分泌期11例;内异症组增殖期15例,分泌期10例,两组各期患者所占的比例比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 1.574, P = 0.347$)。两组患者的在位子宫内膜均经病理检查,排除子宫内膜增殖症、子宫内膜炎性病变等。

1.2 取材方法

在位内膜组是在卵巢内膜异位囊肿剥离术前,刮除宫腔的内膜组织;异位内膜组是在卵巢内

膜异位囊肿剥离术后收集囊壁组织。对照组是于子宫切除后,刮除子宫腔的子宫内膜组织。每例患者的组织均分为3块,每块5 mm \times 5 mm \times 5 mm大小,其中2块放入1.5 mL的Eppendorf管,立即放入液氮罐中保存,待检测hBD-2基因表达水平,另1块置入40 g/L中性多聚甲醛固定,用于原位杂交检测和病理学检查。

1.3 检测方法

1.3.1 实时荧光定量PCR方法 液氮冷冻保存的内膜组织提取总mRNA,采用实时荧光定量PCR方法检测hBD-2的mRNA表达。实验步骤按照RNA提取试剂Trizol(美国Invitrogen公司产品)说明书进行。逆转录合成cDNA使用的逆转录酶MMLV、RNA酶抑制剂为美国Promega公司产品,逆转录仪为ABI 9700PCR仪(美国ABI公司),操作方法参照说明书。PCR引物采用Primer express 2.0软件设计,ABI 3900台式高通量DNA合成仪(美国ABI公司)合成,选择 β 肌动蛋白(β -actin)为内参照基因,目的基因(hBD-2)和内参照基因引物均由上海生工合成。hBD-2序列为:上游引物:5'-TGGTGGTATAGGCGATCCTGTT-3',下游引物:5'-GGAGACCACAGGTGCCAATT-3',探针:5'-TGGTGGTATAGGCGATCCTGTT-3'; β -actin序列为:上游引物:5'-GCATGGGTCAGAAGGATTCCT-3',下游引物:5'-TCGTCCCAGTTGCTGACGAT-3',探针:5'-CCTCACCTGAAGTACCCCATCGAGC-3'。将得到的所有模板cDNA各取样5 μ L,依次加入缓冲液10 μ L(缓冲液的成分为2 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、50 mmol/L KCl)、10 mmol/L三磷酸脱氧核苷(dNTPs)1 μ L、10 pmol/ μ L上游引物F 1 μ L、10 pmol/ μ L下游引物R 1 μ L、3 U/ μ L耐热DNA聚合酶(Taq酶)1 μ L,加入二乙基焦磷酸胺-30 μ L H₂O(双蒸水),总体积50 μ L,进行PCR反应。荧光定量仪采用ABI 7500全自动荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。扩增条件:93 $^{\circ}$ C预变性3 min;93 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共30循环。反应完成后,由电脑自动分析并计算结果,绘制标准曲线定量并计算目的基因和内参照的拷贝数,mRNA表达量以目的基因和内参照拷贝数的比值表示。

1.3.2 原位杂交方法 原位杂交实验按照试剂盒的使用说明书进行。hBD-2原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,浓缩型DAB

试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。针对hBD2靶基因的探针序列为:5'-TTCTCGTTCC TCTTCATATTCCTGATGCCTCTTCC-3'和5'-GCCA TATGTCATCCAGTCTTTTGGCCCTAGAAGGTA-3'。所有器皿、玻片、缓冲液、双蒸水均予灭活RNA酶处理。不加探针为空白对照,以排除非特异性染色。以hBD-2 mRNA的细胞胞浆着色呈棕黄色为阳性结果。资料分析处理:在400倍镜下任意选取20个阳性细胞,采用TJTY2300型全自动图像分析仪测定细胞内杂交产物的吸光度,取其平均值($\bar{x} \pm s, A$)为该标本测量结果,用以反映hBD-2 mRNA的表达水平。

1.4 统计学方法

应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,对于连续型变量,当满足正态分布时采用均数和标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述,组间比较采用 t 检验,相关分析采用Pearson相关;不满足正态分布时采用中位数(下四分位数,上四分位数)进行描述,组间比较则采用秩和检验,相关分析采用Spearman相关。计数资料的比较采用 χ^2 检验。hBD-2的临床分期表达首先是做多组比较,若多组(即各临床分期间)的差异有统计学意义,则进一步进行两两比较;若无统计学意义,则不进行两两比较。

2 结果

2.1 hBD-2 mRNA和 β -actin的标准曲线绘制

Real-time PCR中hBD-2 mRNA和 β -actin的标准扩增曲线图、标准曲线直线回归图和样本扩增曲线图绘制见图1。

2.2 各组内膜组织中hBD-2 mRNA的表达

将各组组织中hBD-2的mRNA表达水平进行比较,异位内膜组明显高于在位内膜组和对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。在位内膜组和对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

将对照组和在位内膜组增殖期和分泌期子宫内膜组织中hBD-2的mRNA表达水平分别进行组内比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);同时分别进行组间比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

2.3 各组内膜组织中hBD-2原位杂交的结果

原位杂交结果显示,hBD-2不仅存在于细胞

表1 各组内膜组织中hBD-2 mRNA表达量的比较
Table 1 Expression of hBD-2 in the endometrium of all groups median(lower quartile ~ upper quartile)

Groups	Cases	hBD-2
Control group	25	0.0034(0.0025 ~ 0.0424) ¹⁾
Proliferative phase	14	0.0025(0.0012 ~ 0.0356) ¹⁾
Secretory phase	11	0.0035(0.0009 ~ 0.0415) ¹⁾
Eutopic endometrium group	25	0.0343(0.0025 ~ 2.0326) ¹⁾
Proliferative phase	15	0.0289(0.0010 ~ 1.5687) ¹⁾
Secretory phase	10	0.0567(0.0025 ~ 2.4582) ¹⁾
Ectopic endometrium group	25	0.3684(0.0109 ~ 18.4807)

1) Compared with ectopic endometrium group, $P < 0.05$.

浆内,在细胞膜及细胞间隙也可见其阳性染色。主要表达于内膜组织的上皮细胞胞质中,其次部分腺细胞和浸润炎性细胞的胞质也有少量表达,呈现明显棕黄色颗粒状着色(图2)。异位内膜组、在位内膜组和对照组的内膜组织中均出现不同程度的表达,其阳性区的平均吸光度A值分别为:1.87 ± 0.10、0.58 ± 0.08和0.42 ± 0.05。将各组组织中hBD-2的吸光度进行比较,异位内膜组明显高于在位内膜组和对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。而在位内膜组和对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 在位和异位内膜组织中hBD-2 mRNA的临床分期表达

所有的内异症患者,按照1985年美国生育学会(AFS)提出的“修正子宫内膜异位症分期法”进行分期,均为I~IV期。其中I期4例,II期5例,III期11例,IV期5例。

将各期别的异位内膜组织中hBD-2的mRNA表达水平进行比较,发现I期和II期分别明显高于III期和IV期,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。但在I期与II期、III期与IV期之间分别两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明随着临床期别的增高,异位内膜中hBD-2的mRNA表达水平并未随之增高,I期和II期明显高于III期和IV期(表2)。

将各期别的异位内膜组织中hBD-2的mRNA表达水平进行多组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明在位子宫内膜组织中hBD-2的mRNA表达水平并不随着临床期别的变化而改变(表2)。

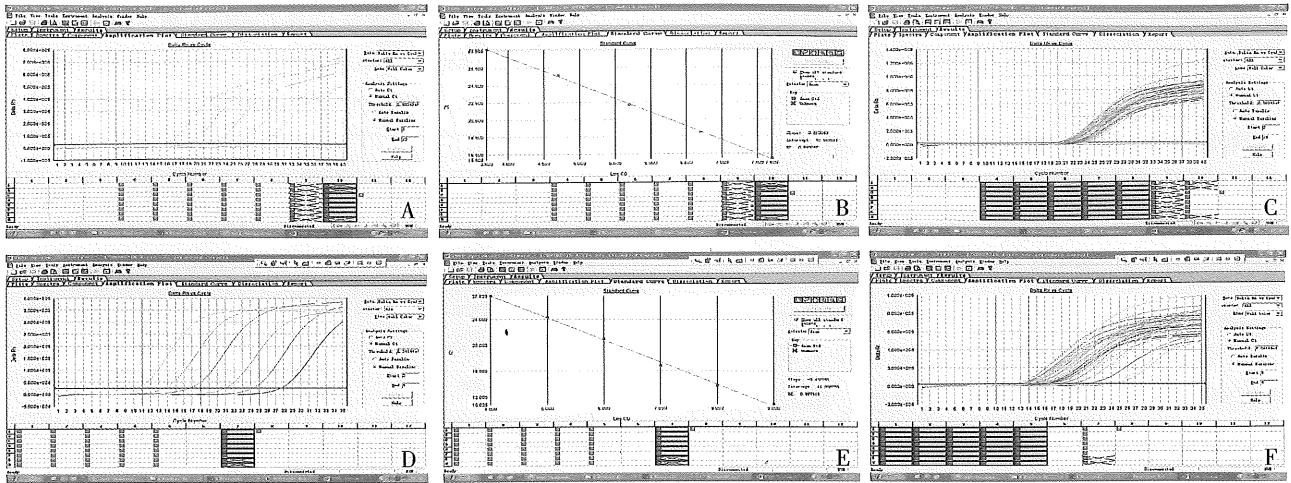


图 1 hBD-2 mRNA 和 β -actin 的标准曲线图

Fig.1 Standard curve of hBD-2 mRNA and β -actin

A: standard amplification curve of hBD-2; B: linear regression of standard amplification of hBD-2; C: sample amplification curve of hBD-2; D: standard amplification curve of β -actin; E: linear regression of standard amplification of β -actin; F: sample amplification curve of β -actin

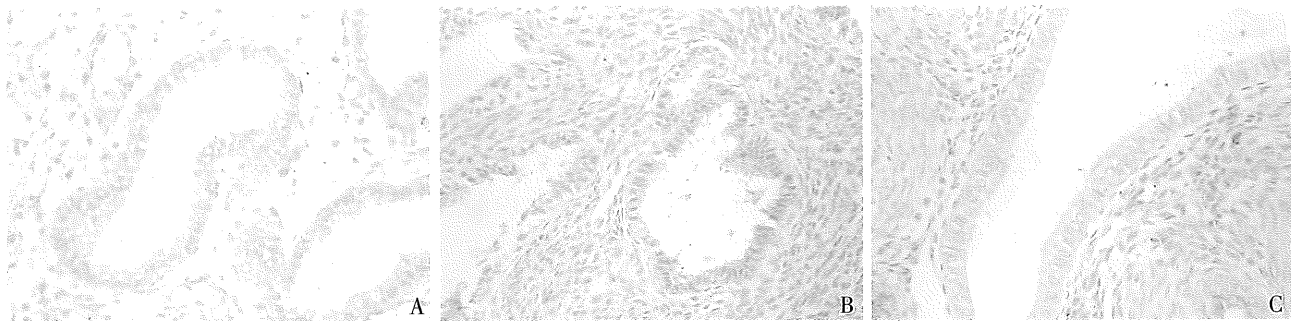


图 2 三组患者内膜组织中的 HBD-2 的表达情况

Fig.2 The expressions of hBD-2 in ectopic endometrium of three groups

Brown particle can be seen in cytoplasm of endothelial cell. In situ hybridization $\times 400$

A: Control group; B: eutopic endometrium group; C: ectopic endometrium group

表 2 EMS 不同临床分期的在位和异位内膜组织中 hBD-2 的 mRNA 表达水平

Table 2 Expression of hBD-2 in the eutopic and ectopic endometrium of different clinical stage

median(lower quartile ~ upper quartile)

Groups	Cases	Ectopic endometrium group	Eutopic endometrium group
Stage I	4	5.879(0.138~16.775) ^{1,2)}	0.025(0.003~0.170)
Stage II	5	11.600(0.150~23.200) ^{1,2)}	0.167(0.062~26.458)
Stage III	11	0.312(0.044~1.048)	0.020(0.005~0.091)
Stage IV	5	0.158(0.018~1.621)	0.014(0.003~1.046)

1) Compared with stage III, $P < 0.05$; 2) Compared with stage IV, $P < 0.05$

3 讨论

内异症近年来的发病率仍然呈逐年上升的趋

势。在生育年龄妇女中,内异症常以卵巢受累较多,由于卵巢子宫内膜异位病灶反复出血而形成卵巢子宫内膜异位囊肿,严重影响青、中年妇女的生殖健康和生活质量^[8-9]。

3.1 人 β 防御素2在女性生殖道中的防御作用

人类自身免疫系统能有效地抵御各种损伤性因素的入侵。其中,自然抗菌肽是自身免疫系统的主要成分,是机体抵御外界因素干扰的重要分子学基础。抗菌肽的一个主要亚组是防御素家族,它是一族具有广谱抗微生物和细胞毒活性的多肽,是天然免疫的重要介质,属于内源性抗生素肽家族。人 β 防御素(human β defensin, hBD)是防御素家族中的一种,由皮肤、黏膜、气道等上皮细胞产生,分布在宿主机体与环境的界面位置,构成机体抵御外界损伤性因素(如细菌、炎性细胞因子等)侵袭的第一道化学屏障。hBD-2是Harder^[10]在1997年首先发现的一个含41个氨基酸残基的阳离子短肽,由64个氨基酸前体蛋白在分泌过程中经蛋白水解切去N端23个氨基酸的先导肽而产生,其分子量为4.3 kU。hBD-2广泛表达于各种黏膜细胞和上皮组织,不仅抗菌活性强,而且具有可诱导表达的特性。但hBD-2在自然条件下表达水平极低或不表达,需要经微生物、前炎症细胞因子IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等刺激因素的诱导才能表达并上调,已经有文献报道^[5-6]hBD-2存在于正常的女性生殖道的组织中,包括子宫内膜组织。这些发现均提示hBD-2在维持正常生殖道的粘膜防御系统及内环境稳定、宿主天然抗感染机制中起着重要的作用。King在体外培养的子宫内膜上皮细胞中也检测到hBD-2的表达,本研究结果也进一步证实hBD-2mRNA在正常子宫内膜组织中存在着表达,与上述国外文献的报道相一致^[5-6]。

3.2 hBD-2在内异症中的作用

我们除了证实在正常子宫内膜组织中存在hBD-2的基因表达外,还发现在内异症患者的在位内膜和异位内膜组织中均能检测到hBD-2的基因表达。而且,其在异位内膜组织中的基因表达水平明显高于在位内膜组织和对照组子宫内膜组织中的水平,即内异症患者异位病灶中hBD-2的基因表达水平高于内异症和非内异症患者在位子宫内膜组织中的表达水平。另外本研究结果显示,内异症患者异位组织中的hBD-2的基因表达水平在临床I期与II期明显高于III期和IV,这表明随着临床分期的增高,异位内膜中hBD-2的基因表达并未随之增强,在微轻型的内异症(I期与II期)异位内膜组织中hBD-2的基因表达水平明显高于中重型(III期和IV期)。这也提示,内异症的最佳治

疗时机在疾病发生的早期,人体正常免疫防御系统的功能未完全破坏,能协同药物治疗产生更好的结局,复发率也会相应降低。这和文献中报道的中重型内异症治疗复发率明显高于微轻型的临床观察经验是相一致的^[11]。至于hBD-2通过何种途径参与了内异症的发病机制,还需要进一步的体内和体外实验去探索和证实。

近年来有学者提出,内异症的发病是以在位内膜的不同生物学特性甚至基因差异为基础的。已经有研究表明,内异症与非内异症患者的在位内膜存在组织结构、细胞特性、基因表达等多方面的差异^[12]。但是,也有迹象有关细胞连接复合体组成成分的研究发现,整合素 α 2 β 1、 α 3 β 1、 α 6、 β 3和claudin-4等在内异症患者的在位内膜和正常的子宫内膜组织中的表达量无明显差异^[13-14]。对于这种矛盾现象的解释暂不明确。本研究对机体的自然抗菌肽hBD-2进行研究,同样发现hBD-2在内异症和非内异症患者在位内膜组织中的基因表达量和分布无显著差异。而且结果还显示,非内异症子宫内膜组织中hBD-2的基因表达在增殖期和分泌期无明显差异,这与国外文献报道的hBD-2在正常子宫内膜的月经周期中基因表达的特点相一致^[15]。重要的是我们发现,内异症患者的在位子宫内膜组织中hBD-2的基因表达也和正常子宫内膜一样,遵循上述月经周期中的表达特点。

总之,通过对自然抗菌肽hBD-2在内异症在位和异位内膜组织中的表达进行研究,发现异位子宫内膜组织中的hBD-2的高表达可能参与了内异症的发病。

参考文献:

- [1] 陈小琴,李予,王文军. 体外受精-胚胎移植治疗子宫内膜异位症性不孕的临床分析[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2007, 28(S1): 254-256.
- [2] Bischoff FZ, Simpson JL. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis [J]. Hum Reprod Update, 2000, 6(1): 37-44.
- [3] Ross DJ, Cole AM, Yoshioka D, et al. Increased bronchoalveolar lavage human beta defensin type 2 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation [J]. Transplantation, 2004, 78(8): 1222-1224.
- [4] Ohara T, Morishita T, Suzuki H, et al. Pathophysiological role of human beta defensins 2 in

- gastric mucosa [J]. *Int J Mol Med*, 2004, 124(6): 1023-1027.
- [5] King AE, Fleming DC, Critchley HO, et al. Regulation of natural antibiotic expression by inflammatory mediators and mimics of infection in human endometrial epithelial cells [J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8(4): 341-349.
- [6] Pioli PA, Weaver LK, Schaefer TM, et al. Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2 [J]. *J Immunol*, 2006, 176(11): 6647-6655.
- [7] 冯艳, 潘小玲, 黄宁, 等. 人 β -防御素基因在女性生殖道及妇女妊娠相关组织中的表达 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2003, 34(2): 217-219.
- [8] 郎景和. 子宫内膜异位症的基础与临床研究 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 1.
- [9] 谢洪哲, 郭煦. 子宫内膜异位症 [J]. *新医学*, 2008, 39(1): 4-6, 3.
- [10] Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. 2A peptide antibiotic from skin [J]. *Nature*, 1997, 387(8): 861-865.
- [11] 吴玲玲, 余妙真, 李琳, 等. 瘦素和 VEGF 的阳性细胞在卵巢子宫内膜异位症中的病理学研究 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2007, 29(6): 684-687.
- [12] Sharp-Timms KL. Endometrial anomalies in women with endometriosis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 943(9): 131-147.
- [13] Regidor PA, Vogel C, Regidor M, et al. Expression pattern of integrin adhesion molecules in endometriosis and human endometrium [J]. *Hum Reprod Update*, 1998, 4(5): 710-718.
- [14] 潘晓玉, 汶占平, 王波. 紧密连接蛋白 claudin-4 在子宫内膜异位症患者原位与异位内膜组织中的表达 [J]. *中华妇产科杂志*, 2008, 43(4): 418-421.
- [15] Fleming DC, King AE, Williams AR, et al. Hormonal contraception can suppress natural antimicrobial gene transcription in human endometrium [J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(4): 856-863.

(编辑 张恩健)

(上接第 746 页 from page 746)

- troponin I as the markers of rhabdomyolysis in chronic hemodialysis patients [J]. *Georgian Med News*, 2006, 132(12): 68-71.
- [9] Collinson PO, Gaze DC, Morris F, et al. Comparison of biomarker strategies for rapid rule out of myocardial infarction in the emergency department using ACC/ESC diagnostic criteria [J]. *Ann Clin Biochem*, 2006, 43(4): 273-280.
- [10] Rajappa M, Sharma A. Biomarkers of cardiac injury: an update [J]. *Angiology*, 2005, 56(6): 677-691.
- [11] Löwbeer C, Gustafsson SA, Seeberger A, et al. Serum cardiac troponin T in patients hospitalized with heart failure is associated with left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2004, 64(7): 667-676.
- [12] Jung HH, Ma KR, Han H. Elevated concentrations of cardiac troponins are associated with severe coronary artery calcification in asymptomatic haemodialysis patients [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(12): 3117-3123.
- [13] Apak I, Iltumur K, Tamam Y, et al. Serum cardiac troponin T levels as an indicator of myocardial injury in ischemic and hemorrhagic stroke patients [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2005, 205(2): 93-101.
- [14] Jaffery Z, Nowak R, Khoury N, et al. Myoglobin and troponin I elevation predict 5-year mortality in patients with undifferentiated chest pain in the emergency department [J]. *Am Heart J*, 2008, 156(5): 939-945.

(编辑 徐杰)