

宫腔粘连子宫内膜中肿瘤坏死因子- α 基因的表达及意义*

苏站勤¹, 桂定清¹, 高雪梅^{2△}

1. 达州市中心医院 妇产科 (达州 635000); 2. 四川大学华西第二医院 妇产科 (成都 610041)

【摘要】 目的 探讨肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor, TNF- α) 基因在宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA) 患者子宫内膜中的表达水平及其与 IUA 发生机制的关系。**方法** 提取 40 例不同程度 IUA 患者子宫内膜组织和 30 例育龄妇女无宫腔粘连的正常子宫内膜组织的 RNA, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测 TNF- α mRNA 的表达情况, 结合内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 管家基因进行相对定量分析, 比较 IUA 子宫内膜和正常子宫内膜中 TNF- α mRNA 表达的差异。**结果** 实时荧光定量 PCR 检测不同程度 IUA 患者子宫内膜组织中 TNF- α mRNA 的表达高于正常无粘连的子宫内膜组织 ($P < 0.05$); 不同程度 IUA 的子宫内膜组织间 TNF- α mRNA 表达差异无统计学意义。**结论** TNF- α mRNA 的高表达可能在 IUA 的发病机制中起重要作用, 而在 IUA 的发展中 TNF- α 可能不是最重要的影响因素。

【关键词】 宫腔粘连 实时荧光定量 PCR 肿瘤坏死因子- α 基因表达

宫腔粘连 (intrauterine adhesions, IUA), 又称 Asherman 综合征, 是子宫内膜的一种损伤性病变, 其发病机制尚不明确, 目前认为主要与子宫内膜创伤、感染及子宫内膜细胞再生有关。组织的粘连多由物理损伤以及生物因素中细胞因子的异常表达共同作用导致, 各种细胞因子在粘连形成过程中所起的作用已成研究热点。肿瘤坏死因子- α (tumour necrosis factor- α , TNF- α) 是促炎症反应因子, 具有广泛的生物学效应, 均与创伤修复过程有密切关系, 但其作用机制尚不明^[1]。随着对 TNF- α 生物学活性研究的深入, TNF- α 与各种疾病的发生关系越来越密切, 在许多疾病的研究中都将其作为重要的检测指标^[1,2]。本研究采用实时荧光定量 PCR (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 法, 测定 TNF- α mRNA 在宫腔粘连患者子宫内膜中的表达水平与正常子宫内膜是否有差异, 以探讨 TNF- α mRNA 与 IUA 发生机制的关系。

1 材料与方法

1.1 样本收集与保存

本研究所用标本来源于 2012 年 4~7 月在四川大学华西第二医院妇科微创中心要求宫腔镜检查的患者。

其中粘连组 40 例, 年龄 24~40 岁, 因人工流产或自然流产、诊断性刮宫、宫内节育环取后发生月经量明显减少或闭经, 在宫腔镜下证实为不同程度 IUA 患者的子宫内膜; 采用美国生殖学会^[3] 1988 年 IUA 评分标准进行评分。根据 IUA 发生的范围: $< 1/3$ 为 1 分, $1/3 \sim 2/3$ 为 2 分, $> 2/3$ 为 4 分; 粘连类型: 薄膜样为 1 分, 薄膜与致密之间为 2 分, 致密粘连为 4 分; 月经情况: 正常为 0 分, 月经量减少为 2 分, 闭经为 4 分。最终评分以 IUA 发生范围、粘连类型、月经情况三者之和计算。其中 I 级 (轻度) 评分: 1~4 分; II 级 (中

度) 评分: 5~8 分; III 级 (重度) 评分: 9~12 分。本实验中轻度宫腔粘连者 11 例 (27.5%), 中度宫腔粘连者 19 例 (47.5%), 重度宫腔粘连者 10 例 (25.0%)。粘连组中人工流产 3 次及 3 次以上者 26 例 (65.0%), 3 次以下者 14 例 (35.0%)。正常组 30 例, 年龄 23~42 岁, 因不孕、体外受精 (IVF) 失败、阴道不规则出血宫腔镜下行诊断性刮宫的无粘连的子宫内膜。

两组样本均经病理学诊断为无病变的子宫内膜组织。收集样本液氮速冻后放入实验室-70℃冰箱保存。

本研究经过四川大学华西第二医院医学伦理委员会的批准, 且患者知情同意。

1.2 RT-PCR 引物

TNF- α 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 基因引物由上海生工生物工程有限公司合成。采用文献报道并再次经 Premier5.0 软件和 NCBI BLAST 检测证实所得引物序列如下^[4]: TNF- α sense 5'-GAGAAGATTCTGTTGGGCTGAT-3', antisense 5'-CCTTGTTCTTGTCTCTGTGGG-3'; 扩增产物长度 169 bp。GAPDH sense 5'-TTTCACAGTCACCCG CATCTT-3', antisense 5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTC A-3' 扩增产物长度 90 bp。

1.3 组织总 RNA 提取及测定、cDNA 合成

1.3.1 组织总 RNA 提取 采用 Trizol (美国 Ivitrogen) 一步法从冷冻组织中提取总 RNA, 行琼脂糖凝胶电泳检测, 用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度及纯度。

1.3.2 cDNA 的合成 逆转录合成 cDNA 按试剂盒 (大连宝生物公司) 说明书进行, 20 μ L 体系中含总 RNA 4 μ L, 先经 10 μ L 体系反应液去掉组织中的 DNA, 再加反转录合成引物 1 μ L, 5 倍的反应缓冲液 4 μ L, 反转录合成酶混合剂 1 μ L, 加入生物级纯水至 20 μ L 反应体系, 37℃ 15 min, 85℃ 5 s 进行逆转录, -20℃ 冰箱保存。通过扩增 GAPDH 管家基因检测样品逆转录的质量。

1.4 最佳 PCR 反应条件的测定

* 四川省科技厅国际合作项目 (No. 2011HH0007) 资助

△ 通讯作者, E-mail: gaoxue-m@163.com

引物溶解后使用普通 PCR 反应进行条件优化。采用温度梯度 PCR 扩增标本 cDNA,在 55~65 ℃ 选定最佳退火温度,循环 40 次。熔解曲线起始段平稳且仅有单一峰,熔解温度为 87 ℃;扩增曲线 Ct 值在 15~30 之间。再将 PCR 产物用 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察,出现最清晰的阳性片段且无非特异性条带时,所对应的退火温度为最佳温度。具体反应体系如下:2.5×Real Master Mix/20×SYBR solution 10 μL,上、下游引物(10 pmol)各 1 μL,样品模板 2 μL,加入生物级纯水至 20 μL。95 ℃ 2 min;95 ℃ 10 s、63 ℃ 30 s、68 ℃ 30 s,40 个循环;65 ℃ 5 s,4 ℃ 保存。各样本 mRNA 相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{实验组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{管家基因})_{对照组}$ 。

1.5 统计学方法

经正态性检验,数据呈正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示。经方差齐性检验,方差不齐,采用 Wilcoxon 秩和检验, $\alpha_{双侧} = 0.05$ 。

2 结果

2.1 临床一般情况

宫腔粘连组与正常无粘连组在年龄上差异无统计学意义,而在孕次及刮宫次数上差异有统计学意义($P < 0.05$),粘连组明显高于无粘连组;轻度 IUA 组、中度 IUA 组、重度

IUA 组在年龄、孕次、刮宫次数方面差异均无统计学意义。见表 1、表 2。

表 1 宫腔粘连组与正常对照组一般情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	孕次	刮宫次
宫腔粘连组	40	32.1±5.5	3.5±1.6	3.1±1.6
正常对照组	30	31.5±6.9	2.8±1.5	1.9±1.2
<i>P</i>		>0.05	<0.05	<0.05

表 2 不同程度宫腔粘连组一般情况比较($\bar{x} \pm s$)

宫腔粘连组	<i>n</i>	年龄(岁)	孕次	刮宫次
轻度	11	34.8±6.1	3.8±1.3	3.0±1.4
中度	19	31.2±5.1	3.9±1.8	3.4±1.8
重度	10	30.8±4.7	3.1±1.9	2.7±1.8
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05

2.2 实时荧光定量 PCR 特异性的验证结果

不同样本的定量 PCR 产物 *TNF-α*、*GAPDH* 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳呈单一条带,无杂带产生,见图 1。*TNF-α* 基因均具有特异性,熔解峰单一,产物无非特异性扩增或引物二聚体扩增曲线,*TNF-α* 基因的熔解曲线和扩增曲线见图 2、图 3。

2.3 子宫内膜中 *TNF-α* mRNA 的相对含量

结果见表 3、表 4。宫腔粘连组与正常无粘连组子宫内膜中 *TNF-α* mRNA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),

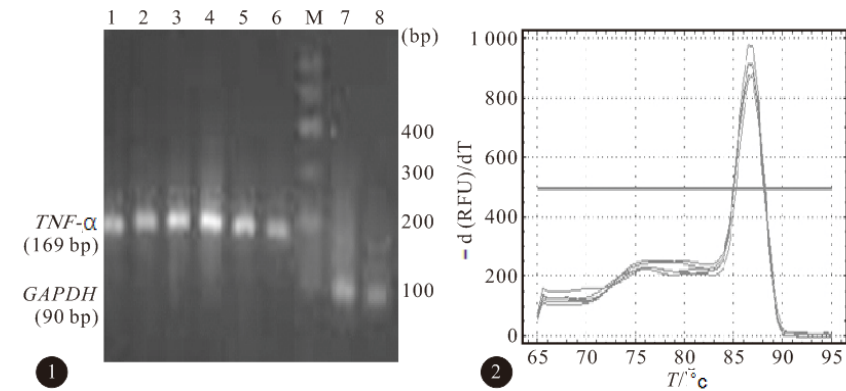


图 1 荧光定量 PCR 产物电泳图(1-6: *TNF-α*; M: Marker; 7,8: *GAPDH*)

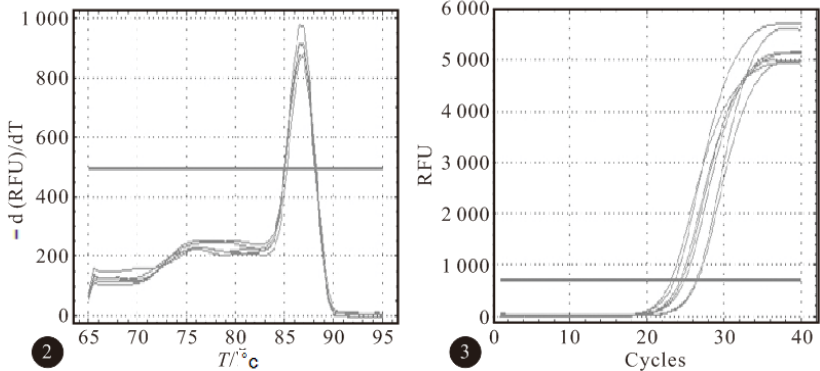


图 2 目的基因 *TNF-α* 熔解曲线,熔解温度 87 ℃

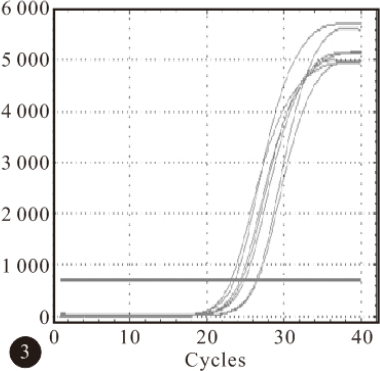


图 3

表 3 宫腔粘连组与正常对照组 *TNF-α* mRNA 的比较($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

组别	<i>n</i>	<i>TNF-α</i> mRNA
宫腔粘连组	40	3.13±1.65
正常对照组	30	1.12±0.85
<i>P</i>		<0.05

3 讨论

宫腔粘连是指各种因素导致子宫内膜基底层损伤后,宫腔肌壁和(或)宫颈管的相互粘连^[5]。宫腔粘连和盆腹腔粘连一样,其发生与众多细胞因子有关。随着辅助生殖技术的发展,许多生育问题得到一定程度的解决,但仍有众多原因导致种植失败,近 2/3 的种植失败由于子宫内膜因素所致,而宫腔粘连又是内膜因素中最主要、最难解决的一个因素^[6]。目前多数研究采用免疫组化半定量的方法在细胞因子水平开展,深入基因水平的研究甚少。

本研究临床资料统计结果显示:宫腔粘连组与正常无粘连组在年龄上差异无统计学意义,而在孕次及刮宫次数上差异有统计学意义,粘连组均高于无粘连组。该结果表明:育龄期妇女,刮宫是发生宫腔粘连的高危因素之一,减少刮宫

表 4 不同程度宫腔粘连组 *TNF-α* mRNA 的比较($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

宫腔粘连组	<i>n</i>	<i>TNF-α</i> mRNA
轻度	11	3.37±1.61
中度	19	3.29±1.64
重度	10	2.63±1.69
<i>P</i>		>0.05

宫腔粘连组子宫内膜中 *TNF-α* mRNA 的相对含量明显高于正常无粘连组子宫内膜;但不同粘连程度组间 *TNF-α* mRNA 的表达差异无统计学意义。

次数能从根本上减少宫腔粘连的发生。而轻度、中度、重度宫腔粘连组在年龄、孕次、刮宫次数方面差异均无统计学意义。此项结果表明, 刮宫次数可能与宫腔粘连的严重程度无明显关系, 这可能与宫腔粘连的临床分类标准、手术操作者的熟练程度、患者的个体差异及本研究样本量有关, 就此问题有待进一步深入探讨。

本研究结果显示: $TNF-\alpha$ mRNA 在宫腔粘连患者子宫内膜组织和正常无粘连子宫内膜组织中的表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。在宫腔粘连患者子宫内膜中, $TNF-\alpha$ mRNA 的含量明显高于无粘连的子宫内膜组织, 这与韩义娜等^[7] 采用免疫组织化学染色方法检测 $TNF-\alpha$ 在宫腔粘连患者子宫内膜组织中高表达的结果一致, 与 Kurukahvecioglu 等^[8] 研究的 $TNF-\alpha$ 在腹腔粘连组织中高表达的结果一致。韩义娜等^[7] 研究还认为: 重度宫腔粘连子宫内膜组织中 $TNF-\alpha$ 的表达高于中度粘连组及正常组。而本实验采用实时荧光定量 PCR 法研究结果显示: $TNF-\alpha$ mRNA 的含量在轻度、中度、重度宫腔粘连患者中表达差异无统计学意义, $TNF-\alpha$ mRNA 与宫腔粘连的严重程度可能无明显关系。我们推测认为: $TNF-\alpha$ 可能影响宫腔粘连的形成, 在宫腔粘连的发生起始阶段发挥重要作用, 但在宫腔粘连的病情发展中可能不是最重要的影响因素。但也可能与实验方法、样本量较小、宫腔粘连的分级标准不同及子宫内膜周期有关, 也可能与不同部位子宫内膜 TNF 表达的变化有关。因为存在伦理学的问题, 本实验未对不同部位子宫内膜加以取材研究。本研究中, 粘连组有 12 例 (30%) 闭经患者且无病理学诊断, 难以辨别子宫内膜是增生期还是分泌期, 因此本研究未对子宫内膜的周期加以研究。究竟什么因素影响宫腔粘连的发展, $TNF-\alpha$ 与粘连子宫内膜的周期是否相关, 与不同部位的子宫内膜是否有关? 将来有望在动物实验中进一步深入研究。

$TNF-\alpha$ 在炎症反应中起重要作用, 与其他前炎症细胞因子一起启动炎症级联反应, 不仅启动早期炎症反应, 而且维持炎症过程。 $TNF-\alpha$ 能诱导成纤维细胞及血管内皮细胞产生巨噬细胞集落刺激因子, 激活其他细胞因子, 参与炎症反应全过程^[9]。众多研究表明, 慢性炎症性疾病时 $TNF-\alpha$ 在体内高表达, 导致组织炎症损伤, 在炎症免疫性疾病中发挥重要的病理作用。因此, 本研究认为, 宫内感染所引发的炎症反应可导致宫腔粘连的发生, 抑制 $TNF-\alpha$ 的大量产生可能对预防粘连有一定效果。有研究认为, 低浓度的 $TNF-\alpha$ 可以刺激成纤维细胞增生; 高浓度时, 则抑制成纤维细胞的增生; 其原因可能与不同浓度的 $TNF-\alpha$ 作用于成纤维细胞介导不同的信号传导途径有关^[9,10]。 $TNF-\alpha$ 对组织具有双重生物学效应已得到学者的共识: 低浓度的 $TNF-\alpha$ 对维护

机体的生理平衡具有重要意义, 是机体防御病原微生物的重要因素; 若浓度过高, 则可引起机体免疫平衡的破坏, 导致机体机能失调, 从而发生病理性损伤。

由于实时荧光定量 PCR 只是检测稳定状态下的 mRNA 水平, 不能说明更多信息; mRNA 水平的精确定量只能告诉研究者转录水平或 mRNA 稳定性而不能反映细胞合成蛋白质的水平, 因为许多调节是发生在转录后阶段, 对蛋白质活性及靶基因可能存在的变异不提供任何信息^[11]; 因此, 对宫腔粘连的发生机制可进一步在蛋白表达水平深入探讨。

参 考 文 献

- 1 Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2009; 9(5): 361-371.
- 2 Yu D, Wong YM, Cheong Y, *et al.* Asherman syndrome—one century later. *Fertil Steril*, 2008; 89(4): 759-779.
- 3 Garry R, Hart R, Kathigas KA, *et al.* A re-appraisal of the morphological changes within the endometrium during menstruation: a hysteroscopic, histological and scanning electron microscopic study. *Hum Reprod*, 2009; 24(6): 1393-1401.
- 4 蒋立坚, 陈小华, 吴新中等. 实时荧光定量 PCR 法测定成纤维细胞瘤中肿瘤坏死因子- α 基因的表达. *中华口腔医学研究杂志*: 电子版, 2009; 3(2): 159-164.
- 5 陈芳, 段华, 张颖等. 不同水平雌激素在宫腔粘连形成中的作用及相关机制. *中华妇产科杂志*, 2010; 45(12): 917-920.
- 6 李敏, 王嵩明. 宫腔粘连的研究进展. *中国妇幼保健*, 2011; 8(26): 1267-1270.
- 7 韩义娜, 任琛琛, 申爱荣等. VEGF 在宫腔粘连患者子宫内膜中的表达及与 IL-18、 $TNF-\alpha$ 的关系. *中国妇幼保健*, 2011; 26(29): 4497-4499.
- 8 Kurukahvecioglu O, Koksall H, Gulbahar O, *et al.* Infliximab “ $TNF-\alpha$ antagonist” decreases intraabdominal adhesions. *Saudi Med J*, 2007; 28(12): 1830-1835.
- 9 Goldberg MT, Han YP, Yan C, *et al.* $TNF-\alpha$ suppresses α -smooth muscle actin expression in human dermal fibroblasts: an implication for abnormal wound healing. *J Invest Dermatol*, 2007; 127(11): 2645-2655.
- 10 袁瑞红, 刘流, 赵德萍等. $TNF-\alpha$ 对瘢痕成纤维细胞影响的研究. *广东医学*, 2010; 31(5): 607-609.
- 11 陈英剑, 胡成进. 荧光实时逆转录 PCR 定量研究进展. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004; 25(4): 348-351.

(2014-11-21 收稿, 2015-03-13 修回)

编辑 余琳