

• 论 著 •

关于子宫内膜异位症患者内膜中 TLR4、MyD88、NF- κ B 表达的临床研究高原, 杨文[△]

(江苏省连云港市第一人民医院 222000)

摘要:目的 通过观察子宫内膜异位症(EMs)患者内膜中 TLR4、MyD88、NF- κ B 的表达,探究发生该疾病的可能机制。方法 选取 120 例 EMs 患者,其中 I、II 期 33 例,III、IV 期 87 例;取异位内膜 120 例,在位内膜 89 例,取同期行宫腔镜手术患者正常内膜组织 100 例为正常对照组。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 TLR4、MyD88、NF- κ B 的表达情况。结果 异位内膜组、在位内膜组 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白表达水平均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),异位内膜组高于在位内膜组($P < 0.05$)。不同分期 EMs 患者内膜组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 TLR4、MyD88、NF- κ B 通路可能是 EMs 发病的重要机制。

关键词:子宫内膜异位症; TLR4; MyD88; NF- κ B

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.18.023 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)18-2716-02

Study on the expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B in the endometrial of patients with endometriosisGAO Yuan, YANG Wen[△]

(Obstetrics and Gynecology, Department of the First People's Hospital of Lianyungang, Jiangsu 222000, China)

Abstract: **Objective** To study the expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B in the endometrium of patients with endometriosis (Endometriosis, EMs), and explore the possible mechanism of the disease. **Methods** 120 cases of patients with endometriosis, including stage I and II were 33, stage III and IV were 87, 120 cases of ectopic endometrium, eutopic endometrium of 89 cases from the same patients underwent hysteroscopic surgery in 100 cases of normal endometrium as normal control group. The expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B were determined by Western blot (Western blot). **Results** The expression levels of TLR4, MyD88 and NF- κ B in ectopic endometrium group were higher than those in control group, the difference were statistically significant ($P < 0.05$), and ectopic endometrium group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). There were no significant difference in the expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B in endometrial tissues of patients with different stages of EMs ($P > 0.05$). **Conclusion** TLR4, MyD88, NF- κ B pathway may be an important mechanism for the pathogenesis of endometriosis.

Key words: endometriosis; TLR4; MyD88; NF- κ B

子宫内膜异位症(EMs)简称内异症,指具有生物活性的子宫内膜组织出现在子宫腔以外的其他部位^[1-2]。组织病理学上虽为良性病变,但却具有增生、浸润、转移及复发等恶性特征,是育龄妇女常见疾病之一,发病率高达 10%~15%,严重影响女性生育功能^[3-4]。该疾病的发病机制目前尚不清楚,近年来关于免疫功能的改变与 EMs 发病之间的关系的研究越来越多。Toll 样受体 4(TLR4)是一种固有免疫受体,参与固有免疫环节,其免疫调节失衡与多种疾病的发生紧密相关^[5-6]。髓样分化因子 88(MyD88)是 TLR4 信号通路中的重要转导蛋白,其依赖的信号通路及调控的基因产物在固有免疫和适应性免疫中均发挥着关键作用^[7-8]。TLR4 受体被激活后能够通过信号传导激活 NF- κ B, NF- κ B 可以调节多种炎性介质和细胞因子的表达,起到抗炎免疫调节的作用^[9-12]。本研究通过观察 EMs 患者内膜中 TLR4、MyD88、NF- κ B 的表达,探讨 EMs 发生的机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组:选取 120 例 EMs 患者的内膜组织,均为 2015 年 4 月至 2016 年 8 月于本院妇科进行手术治疗的妇女,术后标本均得到病理学证实。其中 I、II 期 33 例,III、IV 期 87 例。取异位内膜组织共 120 例,在位内膜组织共 89 例。对照组:纳入 100 例同期输卵管粘连、宫外孕等手术,术后病检排除,且无严重内科并发症、无肿瘤及遗传病史患者的内膜组织标本。入选患者在年龄、体质量、月经周期上差异均无统计

学意义($P > 0.05$),并均签署知情同意书。

1.2 主要试剂 兔抗人 MyD88、TLR4、NF- κ B、GAPDH 多克隆抗体由北京博奥森生物公司提供。Western blot 试剂盒由碧云天生物技术有限公司提供。成像系统及小型垂直电泳槽均由美国 BIO-RAD 伯乐公司提供。

1.3 方法 取子宫内膜组织 0.05 g,加 250 μ L 裂解液裂解组织,裂解后 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液,BCA 法进行蛋白浓度测定,确定上样蛋白量。100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 使蛋白变性,待冷却后上样到电泳槽中跑电泳,待电泳停止后进行湿转,湿转后洗去湿转液封闭 1 h,洗去封闭液敷一抗,时间为 8 h,将膜洗 3 次,每次 10 min,洗膜结束后敷二抗,时间为 1 h,洗涤 3 次后加入显色剂进行显色,计算相关蛋白表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS21.0 处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较方差齐采用 LSD 法,方差不齐采用 Dunnett's T3 法,两组之间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组织蛋白表达 研究结果表明,MyD88、TLR4、NF- κ B 的蛋白表达与对照组比较,在位内膜组及异位内膜组差异均有统计学意义($P < 0.05$),其表达均高于正常组;与在位内膜组比较,其表达均高于在位内膜组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.2 EMs 患者不同分期蛋白表达 研究结果表明,MyD88、

TLR4、NF-κB 在Ⅲ、Ⅳ期与Ⅰ、Ⅱ期的蛋白表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 1 不同组织 MyD88、TLR4、NF-κB 蛋白表达				
组别	<i>n</i>	MyD88/GAPDH	TLR4/GAPDH	NF-κB/GAPDH
对照组	100	0.52	0.64	0.76
在位内膜组	89	0.85*	0.75*	0.99*
异位内膜组	120	1.03* [#]	0.93* [#]	1.12* [#]
<i>F</i>		1.92	1.21	1.34
<i>P</i>		0.01	0.00	0.01

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与在位内膜组比较,[#] $P<0.05$

表 2 EMs 患者不同分期 MyD88、TLR4、NF-κB 蛋白表达				
分期	<i>n</i>	MyD88/GAPDH	TLR4/GAPDH	NF-κB/GAPDH
Ⅰ、Ⅱ期	33	0.97	0.83	0.93
Ⅲ、Ⅳ期	87	0.95	0.81	0.92
<i>t</i>		0.75	0.87	1.20
<i>P</i>		0.34	0.21	0.33

3 讨 论

EMs 是一种常见的妇科疾病,主要以盆腔疼痛、痛经及不孕为主要临床表现,给广大患者带来巨大的痛苦,目前关于 EMs 的发病机制尚不十分清楚。遗传因素、免疫炎症因素、激素的作用等都是其发生、发展的可能因素^[13-14]。子宫内膜异位症患者常伴有免疫功能异常及复杂的炎症反应,目前关于免疫炎症因素的相关研究越来越多。TLRs 是一类免疫受体分子,可以引发炎症反应和诱导机体获得免疫反应。该分子属于模式识别受体,对病原的分子模式可进行识别、结合,从而引发一系列信号转导,导致炎性介质的释放,在启动和调节天然免疫及诱导获得性免疫中起到重要作用^[15-17]。TLR4 是 TLRs 中关键的一个分子。TLR4 分依赖 MyD88 通路、非依赖 MyD88 通路两条通路。其中依赖 MyD88 的信号通路:TLR4→MyD88→NF-κB 最终激活 NF-κB,引起多种炎症因子转录,参与机体防御反应^[18-21]。

本研究表明,EMs 患者 MyD88、TLR4、NF-κB 蛋白表达高于对照组,且异位内膜组高于在位内膜组。本研究对 EMs 患者不同分期 MyD88、TLR4、NF-κB 表达情况进行了观察,研究结果表明 EMs 患者Ⅰ、Ⅱ期与Ⅲ、Ⅳ期之间相关蛋白均没有显著性差异。由此得出结论 MyD88、TLR4、NF-κB 蛋白高表达可能在内膜异位症的发病过程中发挥重要作用,TLR4→MyD88→NF-κB 通路可能是该病发生的重要通路之一。

目前,关于 TLR4 与 EMs 的研究正在逐步增多,但仍处于初级阶段,进一步探索信号通路介导的 EMs 的发生过程,明确 TLR4 在该过程中的具体作用以及 TLR4 基因多态性与 EMs 之间的关系,都将成为今后研究的热点,为 EMs 的防治指明方向。

参考文献

[1] 赵爱香. 子宫内膜异位症的诊治进展[J]. 中国伤残医学, 2013,35(11):463-464.

[2] 王肖,尤昭玲. 浅析尤昭玲教授对子宫内膜异位症的认识及中医治疗特色[J]. 中华中医药杂志, 2014,29(8):2457-2460.

[3] 石一复. 医源性子宫内膜异位症的防治[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016,12(3):209-212.

[4] 程慕溪,韩倩娟,李晶. 卵巢子宫内膜异位症相关发病因素的调查与分析[J]. 北京中医药, 2010,29(11):817-820.

[5] Yang X, Haghiac M, Glazebrook P, et al. Saturated fatty acids enhance TLR4 immune pathways in human trophoblasts[J]. Human Reproduction, 2015,30(9):2152-2159.

[6] Fonken LK, Haim A, Nelson RJ. Dim light at night increases immune function in Nile grass rats, a diurnal rodent. [J]. Chronobiology International, 2012,29(1):26-34.

[7] Alsina L, Israelsson E, Altman MC, et al. A narrow repertoire of transcriptional modules responsive to pyogenic bacteria is impaired in patients carrying loss-of-function mutations in MYD88 or IRAK4 [J]. Nature Immunol, 2014,15(12):1134-1142.

[8] Barberá ED. Activation mechanisms of the innate immune system structure-function studies of interactions between death domains of MyD88 and IRAK proteins[J]. Washington U. S. Govt. Print. Off, 2012,75(3):719-734.

[9] Wang DJ, Ratnam NM, Byrd JC, et al. NF-κB functions in tumor initiation by suppressing the surveillance of both innate and adaptive immune cells[J]. Cell Reports, 2014,9(1):90-103.

[10] Zuo L, Shi L, Yan F. The reciprocal interaction of sympathetic nervous system and cAMP-PKA-NF-κB pathway in immune suppression after experimental stroke[J]. Neuroscience Letters, 2016,627(12):205-210.

[11] 陈秋梅,郭华,黄艳萍,等. CD44v6 与 MMP-7 在子宫内膜异位症 r-AFs 分期中表达的相关性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2013,12(2):85-87.

[12] 马艳鸽. siRNA 靶向沉默 COX-2 对子宫内膜异位症在位、异位子宫内膜间质细胞 VEGF、MMP-9 表达及细胞凋亡的影响[D]. 郑州:郑州大学, 2015.

[13] 陆玉超,李琰,王娜,等. VEGF 基因多态性与子宫内膜异位症遗传易感性的 Meta 分析[J]. 中国妇幼健康研究, 2013,24(1):37-40.

[14] 秦庆双,高美华. 子宫内膜异位症与免疫不孕的相关性研究[J]. 山东医学高等专科学校学报, 2016,38(1):59-61.

[15] 章君华. TLR3 和 caspase-3 在子宫内膜异位症患者在位和异位内膜中的表达及意义[D]. 浙江:浙江大学, 2010.

[16] 章君华,徐键. Toll 样受体与子宫内膜及子宫内膜异位症[J]. 国际妇产科学杂志, 2011,38(4):267-270.

[17] 章君华,徐键. 子宫内膜异位症患者在位和异位内膜组织中 TLR4 的表达及意义[J]. 浙江预防医学, 2012,33(1):1760-1762.

[18] 李洁,申爱荣,杨春丽,等. 子宫内膜异位症患者内膜组织中 TLR4 及 MyD88 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2013,48(2):214-217.

[19] 杨春丽,李洁,申爱荣. TLR4 和 AP-1 在子宫内膜异位症患者在位内膜及异位内膜中的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2015,30(33):5892-5894.

[20] 夏伟兰,张广亮,李娟. NF-κB 和 PTEN 在子宫内膜异位症中的表达及其意义[J]. 实用医学杂志, 2013,29(12):1939-1940.

[21] 张喜,吴瑞瑾,林俊. 核转录因子 κB 与子宫内膜异位症发病机制[J]. 国际妇产科学杂志, 2008,35(4):265-268.