

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 06. 005

VEGF、TNF- α 、miR-18a 和 MCM7 在子宫肌瘤组织中的表达及临床意义^{*}

张冬红, 刘恩令

(河北省唐山市工人医院妇产科 063000)

摘要:目的 分析血管内皮生长因子(VEGF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、微小核糖核酸-18a(miR-18a)、微小染色体维持蛋白 7(MCM7)在子宫肌瘤组织中的表达及临床意义。**方法** 通过免疫组织化学法测定 43 例子宫肌瘤组织和正常子宫肌层组织中的 VEGF、TNF- α 、MCM7、孕激素受体(PR)及雌激素受体(ER)表达情况,通过原位杂交法测定 miR-18a 表达情况,并对结果进行比较分析。**结果** 子宫肌瘤组织 VEGF、TNF- α 、MCM7、PR、ER 阳性率均明显高于正常子宫肌层组织,miR-18a 阳性率明显低于正常子宫肌层组织($P < 0.05$);Spearman 相关分析结果显示,PR、ER 水平与 VEGF、TNF- α 、MCM7 均呈明显正相关,与 miR-18a 呈明显负相关;随着肿瘤大小增加以及肿瘤数目增多,VEGF、TNF- α 、MCM7 阳性率逐渐升高,而 miR-18a 阳性率逐渐降低。**结论** VEGF、TNF- α 、MCM7、miR-18a 异常表达可能在子宫肌瘤发生及发展中起到了重要作用。

关键词:血管内皮生长因子; 肿瘤坏死因子- α ; 微小核糖核酸-18a; 微小染色体维持蛋白 7; 子宫肌瘤
中图分类号:R711.7 文献标志码:A 文章编号:16772-9455(2018)06-0750-04

Expression and clinical significance of VEGF, TNF- α , miR-18a and MCM7 in uterine myoma tissues^{*}

ZHANG Donghong, LIU Enling

(Department of Gynecology and Obstetrics, Tangshan Municipal Worker's Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To analyze the expression and clinical significance of VEGF, TNF- α , miR-18a and MCM7 in uterine myoma tissues. **Methods** The expression of VEGF, TNF- α , MCM7, PR and ER in 43 cases of uterine myoma tissues and normal uterine myometrial tissues were detected by immunohistochemistry, the expression of miR-18a was detected by situ hybridization method. The expression results were compared and analyzed. **Results** The positive rates of VEGF, TNF- α , MCM7, PR and ER in uterine myoma tissues were significantly higher than those in normal uterine myometrial tissues, the miR-18a positive rates was significantly lower than that in normal uterine myometrial tissues ($P < 0.05$); the Spearman correlation analysis results showed that the levels of PR and ER had significantly positive correlation with the levels of VEGF, TNF- α and MCM7, and had significant negative correlation with the miR-18a level; the positive rates of VEGF, TNF- α and MCM7 were gradually elevated with the tumor enlargement and tumor number increase, while the miR-18a positive rate was gradually decreased. **Conclusion** VEGF, TNF- α , MCM7 and miR-18a abnormal expression may play an important role in the occurrence and development of uterine myoma.

Key words: vascular endothelial growth factor; tumor necrosis factor- α ; microRNA-18a; minichromosome maintenance protein 7; uterine myoma

子宫肌瘤为女性生殖系统常见的一种良性肿瘤,可导致患者出现疼痛、盆腔压迫症状以及子宫异常出血等,对患者生育能力造成一定影响,且部分患者如不及时治疗可能会发生恶性病变^[1]。了解子宫肌瘤发病原因及机制有助于更好地治疗本病,不过目前尚未完全清楚子宫肌瘤的发病机制。微小染色体维持蛋白(MCM)已被证实为机体的一种 DNA 复制管制复合物, MCM7 为 MCM 家族重要成员,在多种疾病

中呈高表达^[2]。微小核糖核酸(miRNA)为广泛存在于真核生物细胞中非编码单链性的小分子 RNA,在激素依赖性疾病、肿瘤以及自身免疫性疾病发生和发展中起到了重要作用^[3]。血管内皮生长因子(VEGF)是促血管生成因子的一种,在子宫肌瘤患者中其血清水平明显升高^[4]。同时,子宫肌瘤与炎症有密切关系,炎症细胞浸润可能在子宫肌瘤发病中起到了重要促进作用^[5]。本研究分析了 VEGF、肿瘤坏死因子- α

* 基金项目:河北省卫生和计划生育委员会课题(20160850)。

作者简介:张冬红,女,主治医师,主要从事妇科肿瘤研究。

(TNF-α)、微小核糖核酸-18a(miR-18a)和 MCM7 在子宫肌瘤组织中的表达及临床意义,旨在为子宫肌瘤防治提供新的线索与依据。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2015 年 1 月至 2017 年 6 月收治的 43 例行子宫肌瘤切除术患者的手术切除标本作为子宫肌瘤组织,距子宫肌瘤至少 1 cm 处取子宫肌层组织作为正常子宫肌层组织。患者入选标准:(1)均行子宫肌瘤切除术;(2)均经病理学诊断为子宫肌瘤;(3)年龄在 50 岁以上;(4)绝经至少 1 年。排除标准:(1)入组前 3 个月使用过激素类药物者;(2)伴有恶性肿瘤者;(3)合并甲状腺疾病、糖尿病者;(4)合并子宫其他器质性病变者;(5)合并免疫系统疾病、感染性疾病者。43 例患者年龄 52~78 岁,平均(67.32±5.29)岁;肌瘤直径 3~14 cm,平均(7.89±2.06)cm;肌瘤数目 1~5 个,平均(1.83±0.45)个;肌瘤分型:浆膜下肌瘤 11 例,肌壁间肌瘤 23 例,混合型肌瘤 9 例。

1.2 主要试剂 VEGF、TNF-α、MCM7 抗体均购自英国 Abcam 公司,Has-miR-18a miRCURY LNA Detection probe 以及地高辛标记 LNA miR-18a 均购自丹麦 Exiqon 公司,抗原修复液、二氨基联苯胺酶底物显色试剂盒、SP 免疫组织化学染色试剂盒、Tris-HCl 缓冲盐溶液、二氨基联苯胺、磷酸盐缓冲液均购自大连宝生物公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及处理 以子宫肌瘤中心和肌瘤边缘连线的中间处选取直径 2~10 cm 的子宫肌瘤组织,距子宫肌瘤至少 1 cm 处取子宫肌层组织,大小为 1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm;标本采集完成之后,立即放置于 10%中性甲醛溶液中内固定 12~24 h,采取石蜡包埋法并连续切片,切片厚度为 3~4 μm。

1.3.2 miR-18a 表达测定 通过原位杂交法测定 miR-18a 表达情况,将石蜡包埋组织石蜡并水化,取柠檬酸盐抗原进行修复,温度为 49.5℃,取杂交缓冲液

进行预杂交,时间为 2 h,然后加入地高辛标记的 miRCURY probes 过夜。加入辣根过氧化物酶标记的抗地高辛抗体,水平为 1:200,孵育过夜,温度为 4℃。取 Tris-HCl 缓冲盐溶液进行冲洗,在暗室中加入染色溶液,然后孵育 24 h。达到预期亮度后将载玻片转移至终止液终止反应,进行苏木复染。

1.3.3 VEGF、TNF-α、MCM7、孕激素受体(PR)、雌激素受体(ER)测定 取二甲苯将石蜡包埋、切片、脱蜡至去离子化,取乙二醇四乙酸修复缓冲液进行修复,然后打孔剂洗涤,采用 3%过氧化氢进行室温孵育,时间为 10 min,取磷酸盐缓冲液洗涤,再分别滴加一抗,孵育过夜,温度为 4℃。再次取磷酸盐缓冲液进行洗涤,滴加二抗,孵育 30 min,温度 37℃。磷酸盐缓冲液洗涤后采用二氨基联苯胺进行显色,然后冲洗,取苏木素进行复染,采用洗洁精、梯度乙醇及中性树胶分别进行洗片、脱水及封片。

1.3.4 表达结果评价 按照阳性细胞的比例进行结果判定,不染色或者阳性细胞比例在 5%以下为阴性(-);阳性细胞比例在 10%~25%为弱阳性(+);阳性细胞比例在>25%~50%为中等阳性(++);阳性细胞比例在>50%,且染色分布呈弥散表现为强阳性(+++).

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 进行数据处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Spearman 相关分析法分析 PR、ER 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7、miR-18a 的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同子宫组织各指标阳性表达结果比较 子宫肌瘤组织 VEGF、TNF-α、MCM7、PR、ER 阳性率分别为 74.42%、62.79%、67.44%、79.07%和 72.09%,均明显高于正常子宫肌层组织($P<0.05$);miR-18a 阳性率为 30.23%,明显低于正常子宫肌层组织($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同子宫组织各指标阳性表达结果比较[n(%)]

项目	n	VEGF		TNF-α		MCM7		miR-18a		PR		ER	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
子宫肌瘤组织	43	32(74.42)	11(25.58)	27(62.79)	16(37.21)	29(67.44)	14(32.56)	13(30.23)	30(69.77)	34(79.07)	9(20.93)	31(72.09)	12(27.91)
正常子宫肌层组织	43	17(39.53)	25(60.47)	11(25.58)	32(74.42)	7(16.28)	36(83.72)	36(83.72)	7(16.28)	18(41.86)	25(58.14)	16(37.21)	29(62.79)
χ^2		10.673		12.070		23.124		25.093		12.452		10.556	
P		0.001		0.000		0.000		0.000		0.000		0.001	

2.2 PR 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7、miR-18a 在子宫肌瘤组织中的相关性 Spearman 相关分析结果显示,PR 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7 均呈正相关($P<0.05$),与 miR-18a 呈负相关($P<0.05$)。见表 2。

2.3 ER 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7、miR-18a 在子宫肌瘤组织中的相关性 Spearman 相关分析结果显示,ER 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7 均呈正相关($P<0.05$),与 miR-18a 呈负相关($P<0.05$)。见表 3。

表 2 PR 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7、miR-18a 在子宫肌瘤组织中的相关性(n)

项目	n	VEGF		TNF-α		MCM7		miR-18a	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
PR 阳性	34	29	5	21	13	22	12	11	23
PR 阴性	9	3	6	6	3	7	2	2	7
r		0.682		0.304		0.354		-0.492	
P		0.002		0.031		0.021		0.014	

表 3 ER 水平与 VEGF、TNF-α、MCM7、miR-18a 在子宫肌瘤组织中的相关性(n)

项目	n	VEGF		TNF-α		MCM7		miR-18a	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
ER 阳性	31	25	6	19	12	20	11	10	21
ER 阴性	12	7	5	8	4	9	3	3	9
r		0.564		0.287		0.314		-0.471	
P		0.009		0.038		0.029		0.016	

2.4 不同病例特征间 VEGF、TNF-α、MCM7、PR、ER 阳性率比较 肌瘤直径>8 cm、肌瘤数目>3 个的 VEGF、TNF-α、MCM7 阳性率明显高于肌瘤直径≤8 cm、肌瘤数目≤3 个的阳性率;肌瘤直径>8 cm、肌瘤数目>3 个的 miR-18a 阳性率明显低于肌瘤直径≤8 cm、肌瘤数目≤3 个的阳性率,差异均有统计学意义(P<0.05);不同年龄、肌瘤分型的 VEGF、TNF-α、MCM7、PR、ER 阳性率比较,差异均无统计学意义(P>0.05)。见表 4。

表 4 不同病例特征间 VEGF、TNF-α、MCM7、PR、ER 阳性率比较[n(%)]

指标	n	VEGF	TNF-α	MCM7	miR-18a
年龄					
≤60 岁	24	17(70.83)	15(62.50)	16(66.67)	8(33.33)
>60 岁	19	15(78.95)	12(63.16)	13(68.42)	5(26.32)
肌瘤直径					
≤8 cm	32	21(65.63)	17(53.13)	19(59.38)	13(40.63)
>8 cm	11	11(100.00) ^a	10(90.91) ^a	10(90.91) ^a	0(0.00) ^a
肌瘤数目					
≤3 个	27	17(62.96)	13(48.15)	15(55.56)	12(44.44)
>3 个	16	15(93.75) ^a	14(87.50) ^a	14(87.50) ^a	1(6.25) ^a
肌瘤分型					
浆膜下肌瘤	11	8(72.73)	6(54.55)	6(54.55)	4(36.36)
肌壁间肌瘤	23	17(73.91)	15(65.22)	16(69.57)	8(34.78)
混合型肌瘤	9	7(77.78)	6(66.67)	7(77.78)	1(11.11)

注:组内指标比较,^aP<0.05

3 讨 论

子宫肌瘤发生及发展是多因素共同作用的结果,病因尚未完全明确。目前临床相关研究显示,该病属于甾体激素依赖性疾病,与细胞因子、基因、遗传、细胞信号传导途径异常,以及细胞增殖和凋亡等多种因素相关^[6-7]。文献[8]报道,孕激素可以促进子宫肌瘤

生长。孕激素和雌激素分别通过 PR、ER 发挥作用,由于 PR、ER 与孕激素和雌激素亲和力较高,能够选择性保留高水平的孕激素和雌激素,进而增强了生物学作用。本研究结果显示,子宫肌瘤组织 PR、ER 阳性率分别为 79.07%和 72.09%,明显高于正常子宫肌层组织,这与临床研究结果一致^[9],提示在子宫肌瘤的发展当中 PR、ER 发挥了重要作用。

VEGF 属于糖基化多肽分泌因子的一种,由 2 个相同亚基以二硫键交联结合的形式组成。VEGF 能够促进内皮细胞进行有丝分裂,增加机体血管的通透性,促进血管生成,在多种良恶性肿瘤新血管生成、血管重塑等过程中起到了重要作用^[10]。本研究结果显示,在子宫肌瘤组织中 VEGF 阳性率为 74.42%,明显高于正常子宫肌层组织的 39.53%,这与高英芳等^[11]的研究结果一致。本研究亦发现,在子宫肌瘤组织中 VEGF 表达水平与 PR、ER 表达呈正相关。孕激素与雌激素可以通过 VEGF 受体对多种和细胞增殖有关的基因表达进行调节,在子宫肌瘤新生血管以及内皮增生局部因子当中,VEGF 的表达较强,而且 VEGF 提高了血管的通透性,这为多种细胞迁移提供了有利的纤维网络,进而促进了肌瘤的发展^[12]。

TNF-α 属于促炎因子的一种,能够促进 T 细胞产生多种炎症因子,进而诱发炎症反应。吞噬细胞在活化之后可以分泌大量的 TNF-α,从而加剧了局部平滑肌组织的损伤,进而形成了炎症病理损伤。同时,TNF-α 还能够通过对 VEGF 表达进行调节,从而间接发挥促进血管形成的作用^[13]。唐恩燕等^[5]的研究指出,在子宫肌瘤组织中 TNF-α 表达量明显高于正常子宫肌层组织,这可能与炎症产物对单核吞噬细胞进行刺激,进而导致 TNF-α 分泌量增加,以及子宫肌瘤细胞自身分泌 TNF-α 等有关。本研究结果与以上研究一致,子宫肌瘤组织中 TNF-α 阳性率为 62.79%,明显高于子宫肌层组织的 25.58%,同时 TNF-α 表达水平与 PR、ER 亦呈显著正相关。

miRNA 被包裹在凋亡小体、微小体或者外泌体之中,它们与血浆中小分子物质在化学修饰作用下形成囊泡及蛋白复合体,而膜性结构可避免 miRNA 在机体内被降解,形成的复合物进入机体后被转运至受体细胞,然后通过内吞、膜融合、受体结合等方式发挥生物学效应^[14]。近年来,随着临床基因组学研究逐步深入,人们对于 miRNA 与肌瘤的关系有了全新的认识,越来越多的学者发现,子宫肌瘤与 miRNA 有着密切关系,多种 miRNA 如 miR-21、miR-197、miR-29b 以及 let-7 等在子宫肌瘤组织中出现明显的异常表达现象,它们通过作用于不同的靶基因,进而在子宫肌瘤发生及发展中发挥重要作用^[15]。ER 包括两种亚型,分别为 ERα 和 ERβ。在廖治等^[16]的研究中指出,miR-18a 表达降低,而 ERα 表达升高,二者呈负相关,并指出 miR-18a 的靶基因可能为 ERα。本研究结果

显示,子宫肌瘤组织中 miR-18a 阳性率为 30.23%,明显低于子宫肌层组织的 83.72%,且与 PR、ER 表达均呈明显负相关。其表达失调可能促进了子宫肌瘤细胞增殖,进而促进了子宫肌瘤进展。

肿瘤与细胞周期之间有着密切关系,细胞周期和 DNA 复制调控有关。MCM 为一组与细胞增殖和 DNA 复制有关的蛋白家族,在基因组、染色体重构及 DNA 复制中起到了重要作用。在细胞中 MCM 蛋白表达量呈现周期性的表现,当处于 G1/S 转换时 MCM 蛋白表达量达到峰值,而当细胞 G0 期或者分化期时,MCM 蛋白表达量明显降低,甚至不表达。因此,MCM 蛋白可以作为细胞增生状态评估的一个重要特异性标志物^[17]。MCM7 是 MCM 家族重要成员,在确保 DNA 复制起始过程稳定中起重要作用,能够保证在一个周期之中 DNA 复制仅有 1 次,因此 MCM7 表达水平提高说明细胞增生、增殖明显进展^[18]。本研究中,子宫肌瘤组织 MCM7 阳性率为 67.44%,明显高于的瘤旁组织的 16.28%,而且与 PR、ER 高表达相关。进一步分析发现,在子宫肌瘤组织中,肌瘤直径>8 cm、肌瘤数目>3 个的 VEGF、TNF- α 、MCM7 阳性率明显高于肌瘤直径 $\leq$ 8 cm、肌瘤数目 $\leq$ 3 个的阳性率,而 miR-18a 阳性率明显低于肌瘤直径 $\leq$ 8 cm、肌瘤数目 $\leq$ 3 个的阳性率,可见不同肌瘤大小、数目之间 VEGF、TNF- α 、MCM7、miR-18a 阳性率存在明显差异。随着肿瘤大小增加,以及肿瘤数目增多,VEGF、TNF- α 、MCM7 阳性率逐渐升高,而 miR-18a 阳性率逐渐降低,提示 VEGF、TNF- α 、MCM7 高表达及 miR-18a 低表达与子宫肌瘤发生及发展可能存在密切关系。

综上所述,在子宫肌瘤组织中 VEGF、TNF- α 、MCM7 均呈高表达,miR-18a 呈低表达,其异常表达与子宫肌瘤发生及发展密切相关。VEGF、TNF- α 、MCM7、miR-18a 异常表达可以筛检子宫肌瘤的高危人群。不过本研究的样本量偏少,应扩大样本量进一步证实。

参考文献

[1] FROELING V,MECKELBURG K,SCHREITER N F,et al. Outcome of uterine artery embolization versus MR-guided high-intensity focused ultrasound treatment for uterine fibroids: long-term results[J]. Eur J Radiol, 2013, 82(12):2265-2269.

[2] 蔡明霞,邓再兴. 子宫颈鳞状细胞癌中 Aurora-A、MCM7 和 HPV16 E7 的表达及病理学分析[J]. 中国医药导报, 2016,13(4):20-24.

[3] 刘冰,张智晓,刘钢. 微小 RNA 作为感染性疾病标志物的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(4): 391-

394.

[4] 杨会娟,程玲. 子宫肌瘤患者血清 Ang-2 和 VEGF 水平变化及其意义[J]. 中国妇幼保健, 2016,31(10):2049-2051.

[5] 唐恩燕,徐克,唐少华. MMP-2 以及 TNF- α 在子宫肌瘤中的意义[J]. 中国妇幼保健, 2014,29(32):5305-5307.

[6] GAO M, GUO K M, WEI Y M, et al. Aspirin inhibits the proliferation of human uterine leiomyoma cells by down-regulation of K-Ras-p110 α interaction [J]. Oncol Rep, 2017,38(4):2507-2517.

[7] 封全灵,张倩,刘弘扬,等. 子宫肌瘤发病孕激素相关危险因素病例对照研究[J]. 中国妇幼保健, 2016,31(2):241-243.

[8] HOEKSTRA A V, SEFTON E C, BERRY E, et al. Progestins activate the AKT pathway in leiomyoma cells and promote survival[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(5):1768-1714.

[9] 马荣,高丽娜. IGF-I、ER 及 PR 在绝经后子宫肌瘤中的表达及其临床意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2016,23(8): 903-905.

[10] 冯静,陈小兵,赵明耀. 合并肝转移的结直肠癌组织中 VEGF 和 Survivin 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2010,45(2):207-209.

[11] 高英芳,李利,王建平,等. Ang-2、VEGF 在子宫肌瘤组织中的表达及相互作用[J]. 医学临床研究 2008, 25(12): 2216-2219.

[12] DI TOMMASO S, MASSARI S, MALVASI A, et al. Gene expression analysis reveals an angiogenic profile in uterine leiomyoma pseudocapsule[J]. Mol Hum Reprod, 2013,19(6):380-387.

[13] WOLAN S M, MALKOWSKI A, ROMANOWICZ L, et al. Does vascular endothelial growth factor participate in uterine myoma growth stimulation[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012,164(1):93-97.

[14] VICKERS K C, REMALEY A T. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication [J]. Curr Opin Lipidol, 2012,23(2):91-97.

[15] MARSH E E, LIN Z, YIN P, et al. Differential expression of microRNA species in human uterine leiomyoma versus normal myometrium[J]. Fertil Steril, 2008, 89(6):1771-1776.

[16] 廖治,肖洪涛. MicroRNA-18a 及雌激素受体 α 在子宫肌瘤中的表达[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(21): 2128-2130.

[17] 张丽莉,刘晓丽. 微小染色体维持蛋白 7 在子宫内膜癌中的表达[J]. 中国妇幼健康研究, 2010,21(6):758-760.

[18] CHUANG T D, LUO X, PANDA H, et al. miR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8[J]. Mol Endocrinol, 2012,26(6):1028-1042.