

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.08.006

子宫内膜异位症中的异常表达基因分析*

王大伟, 杜 杰

河南省安阳市妇幼保健院检验科, 河南安阳 455000

摘 要:**目的** 分析子宫内膜异位症(EM)患者高通量测序数据,探索异位内膜组织中基因的异常表达情况。**方法** 从 GEO 在线数据库获取 EM 患者在位内膜与异位内膜组织高通量测序数据,建立条件分析差异表达基因(DEGs),运用 DAVID 对 DEGs 进行注释,使用 STRING 数据库进行 DEGs 编码蛋白间相互关系(PPI)分析,筛选出候选基因。35 例 EM 患者纳入研究,采集在位内膜组织(对照组)与异位内膜组织(试验组),利用荧光定量 PCR 技术验证候选基因。**结果** 满足条件的 DEGs 共计 826 个,其中高表达 161 个,低表达 665 个。通过 PPI 分析,13 个基因确定为用于后续验证的候选基因。经荧光定量 PCR 试验验证,试验组 VWF、BMP4、GATA4 基因表达量低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),试验组 HOXB7、WNT2 基因表达量高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** VWF、BMP4、GATA4、HOXB7、WNT2 基因可能直接参与 EM 的发生、发展,这些基因异常表达可能驱动子宫内膜表型改变。检测这些基因表达有望为揭示 EM 的发病机制提供科学依据。

关键词: 子宫内膜异位症; 差异表达基因; 荧光定量 PCR

中图法分类号:R711.71

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)08-1046-05

Analysis on aberrant expression genes in endometriosis*

WANG Dawei, DU Jie

Department of Clinical Laboratory, Anyang Municipal Maternal and Child
Healthcare Hospital, Anyang, Henan 455000, China

Abstract: Objective To investigate the gene abnormal expression in the ectopic endometrial tissue by analyzing the high-throughput sequencing data in the patients with endometriosis (EM). **Methods** The high-throughput sequencing data of eutopic endometrial and ectopic endometrial tissues in the EM patients were gained from NCBI GEO online databases. The conditions were established to analyze the differentially expressed genes(DEGs). DAVID was used to annotate DEGs. The analysis on the DEGs encoded protein-protein interaction(PPI) was performed by using the STRING database, and the candidate genes were screened out. A total of 35 patients with EM were included into the study. The eutopic endometrial tissue (control group) and the ectopic endometrial tissue (experiment group) were collected, fluorescent quantitative PCR was used to validate the candidate genes. **Results** A total of 826 DEGs meeting the condition were obtained, including 161 DEGs of high expression and 665 DEGs of low expression. 13 genes were determined as the candidate genes for subsequent validations. By the fluorescent quantitative PCR verification, the expressions of VWF, BMP4 and GATA4 genes in the experiment group were lower than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.01$); the expressions of HOXB7 and WNT2 genes in the experiment group were higher than those in the control group, and the differences were statistically significant($P<0.01$). **Conclusion** VWF, BMP4, GATA4, HOXB7 and WNT2 genes may be directly involved in the EM occurrence and development, and their aberrant expressions may drive the endometrial phenotypic changes. The detection of these genes is expected to provide the scientific basis for revealing the pathogenesis of EM.

Key words: endometriosis; differentially expressed genes; fluorescent quantitative PCR

患者子宫腔以外出现具有生长功能的子宫内膜组织称为子宫内膜异位症(EM),多数患者表现为盆

* 基金项目:河南省安阳市重点研发与推广专项(安科[2018]66号)。

作者简介:王大伟,男,主管技师,主要从事生物标志物方面的研究。

本文引用格式:王大伟,杜杰.子宫内膜异位症中的异常表达基因分析[J].检验医学与临床,2021,18(8):1046-1050.

腔疼痛,部分患者伴膀胱或胃肠道症状并可致不孕;发生 EM 的患者约占育龄期妇女的 10%~15%,且发病率呈现上升趋势;高达 40%~50% 的 EM 患者发生不孕,约 30% 的不孕症患者合并 EM^[1]。EM 病因复杂且多种致病因素共存,研究表明 EM 是一种与出血性疾病、炎症因子、内分泌、遗传因素、铁代谢、免疫性疾病等相关,并且具有激素依赖性的疾病^[2]。临床上使用孕酮、避孕药、雄激素、促性腺激素释放激素受体激动剂等药物治疗可缓解症状;有研究表明,对 EM 合并不孕患者实施腹腔镜手术治疗的术后妊娠率比传统开腹手术更高^[3-4]。中医学研究表明,通过中医药物调理改善卵巢功能和自身免疫可提高子宫内膜容受性^[5]。

近年来,高通量测序技术广泛应用于临床复杂病症病因分析,这对探索 EM 致病因素提供了有力支撑。本文以生物信息分析为工具,利用荧光定量 PCR 验证患者异位内膜组织基因异常表达,为揭示 EM 内膜组织发育异常的遗传学机制提供数据支撑。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2019 年 4 月至 2020 年 1 月收治的 35 例 EM 患者为研究对象,年龄 22~35 岁,中位年龄 29.2 岁。排除接受全身或局部治疗的患者。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 高通量测序数据处理 高通量测序数据从 National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库获取,测序数据的系列号为 GSE86534。该数据集中共包含 4 例 EM 患者,分别采集患者的异位内膜、在位内膜、损伤邻近组织,抽提出完整的 RNA,按照 Agilent 标准操作规程对 RNA 进行片段化、端部修复、连接和 PCR 扩增建库,文库使用 Agilent-067406 Human CBC lncRNA + mRNA microarray V4.0 进行测序。

1.2.2 差异表达基因 (DEGs) 的筛选 建立筛选条件: $-\log_{10} P > -\log_{10} 0.05$; $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$ 。 $\log_2 \text{Fold Change} > 1$ 为高表达基因, $\log_2 \text{Fold Change} < -1$ 为低表达基因。

1.2.3 基因富集分析 利用 DAVID 在线软件分析差异表达基因富集情况。DAVID 用于基因生物功能 gene ontology (GO) 和信号通路 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) 表达分析。通过 DAVID 软件计算各富集组的 P 值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分别采集 35 例纳入对象在位内膜新鲜组织 (对照组) 与异位内膜新鲜组织 (试验组) 40 mg 放入无 RNA 酶离心管中,加入 4 ℃

预冷生理盐水 5 mL, 4 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液。使用 4 ℃ 预冷磷酸盐缓冲液洗涤, 4 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液。加入 1.5 mL Trizol 试剂, 按照 Trizol 酚氯仿经典 RNA 抽提法提取总 RNA。RNA 浓度经 NanoDrop 2000 检测, A_{260}/A_{280} 大于 1.90 方可用于后续试验。用 TOYOBO 试剂盒进行反转录试验, PCR 管中加 1.0 μL Random Primer, 加 3.0 μg 提取的 mRNA, 用 RNase Free H_2O 补齐至 20.0 μL , 反转录产物 -80 ℃ 保存。使用 Roche combas z480 进行荧光定量 PCR 试验, 扩增引物由上海生工公司合成。反应体积为 25.0 μL , ACTB 为内参基因, 每个基因做 3 个复孔, 反应程序: 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 64 ℃ 15 s, 72 ℃ 30 s, 40 循环; 37 ℃ 1 min。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行扩增数据分析。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 7.00 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较应用配对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序数据中不同组织的差异表达基因 对原始数据进行归一化处理, 并对试验组与对照组之间的基因表达进行 t 检验分析, 共计 826 个差异表达基因满足筛选条件 ($-\log_{10} P > -\log_{10} 0.05$ 且 $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1$), 其中低表达基因 665 个, 高表达基因 161 个, 见图 1。

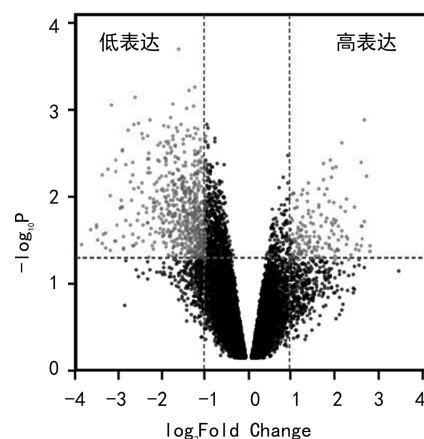


图 1 符合筛选条件的基因倍数与 P 值负对数分布图

2.2 差异表达基因功能分布情况 DAVID 软件分析差异表达基因富集最多的 5 个生物过程见表 1。DAVID 软件分析差异表达基因富集最多的 5 个信号通路见表 2。

2.3 候选基因的筛选情况 差异表达基因导入 STRING 数据库分析。在蛋白间相互作用 (PPI) 关系网中, 13 个基因编码蛋白所处节点置信度大于 0.950: HOXB7、MEIS2、HOXA5、PBX3、HOXC4、HOXC6、BMP4、GATA4、WNT2、WNT2B、FZD4、FZD7、GLI2。13 个基因被筛选为候选基因, 用于进一步验证。见表 3。

表 1 GSE86534 中差异表达基因富集的生物过程情况			
生物过程	ID	P	基因列表
信号转导	GO:0007165	0.025	GNA14, CLDN4, CLDN3, PPARG, PLPPR4, RASSF9, SHF, SHE, VIPR2, GDNF, IL17RD, WISP2, ARHGAP6, ANK2, MICAL1, MX1, GNL1, AKT3, TYRO3, MAGI2, PDPN, PDE10A, INHA, OPTN, ARHGAP25, TNFAIP6, PRR5-ARHGAP8, CHL1, KIR3DL1, KIR2DL4, ING2, ERBB3, RHPN2, PPP1R12B, SPOCK1, KIT, SFN, SMOC2, ANKDD1A, HLA-DOB, CDC42EP3, NR1H4, CREBL2, GABRP, DTNA, AMHR2, MRC1, IL2RB, TNFSF4, HPCAL4, KIR2DS2, ITPR1, SH3BP5, LVRN, RASSF3, TENM4, RPS6KA6, LYVE1, PDE7B, CHN2, FCGR2B, ANTXR1, VLDLR
			CTNNAL1, NRP2, NUAKE1, EDIL3, CD47, KIAA1462, CGREF1, WISP2, S1PR1, CNTNAP2, COL12A1, FEZ1, TYRO3, MPDZ, SIGLEC11, NECTIN3, CTNNA3, OMD, NCAM1, TNFAIP6, PGM5, HAS1, SUSDS, CNTN1, ANOS1, VCAN, EMP2, CHL1, TNC, ITGA11, CDH3, DSCAML1, COL28A1, SPOCK1, VCAM1, ITGAX, SORBS2, CD22, THBS1, THBS4, MAG, TNXB, LPP, PPFIBP1, NID2, COL16A1, PRPH2, VWF, LAMA1, LYVE1, CASS4, CDON, FBLN7, ITGAD, MYH10
多细胞生物发育	GO:0007275	0.011	HLF, TSHZ1, ELF3, MRAS, HOXA11, PAQR8, EHF, EDIL3, HOXC6, WNT2, LBH, SHISA2, PBXIP1, HOXA5, HOXC4, LEFTY2, HOXA9, PDGFD, BST2, ZMYM3, BST1, DLL1, COLEC11, FRZB, GRHL1, FZD4, WNT2B, FMN2, HOXB2, HOXB7, MEOX2, RBM19, VCAN, DMBT1
转录	GO:0006366	0.024	SUPT3H, HLF, LCORL, ELF3, ELK1, NFIX, EHF, GLI2, FOXO4, GLI3, TCF21, MEIS2, MYOCD, GATA6, HOXA5, GATA4, OVOL1, KDM5A, NFATC1, IKZF3, SMAD2, KLF15, GRHL1, HMGA1, PLSCR1, ATF3, CSRN3, MEOX2, FOXC1, TFAP2C, PBX3, NR5A1
转录调控	GO:0045893	0.040	SUPT3H, HNF1B, ING2, FOXA2, ELF3, HOXA11, PPARG, FHL2, ELK1, RORB, EHF, GLI2, GLI3, LBH, MYOCD, GATA6, MDFIC, GATA4, KDM5A, INSR, CREBL2, NFATC1, BMP4, ESRRG, SMAD2, HMGA1, FZD4, FZD7, MYCN, MYRF, FOXC1

表 2 GSE86534 中差异表达基因富集的信号通路情况			
信号通路	ID	P	基因列表
细胞黏附分子通路	hsa04514	2.40×10^{-6}	MAG, CLDN7, CLDN4, CLDN3, NFASC, CD22, NECTIN3, NLGN3, CLDN11, CDH3, PDCD1LG2, NCAM1, VCAM1, SIGLEC1, CLDN1, CNTN1, CNTNAP2, VCAN, JAM2, HLA-DOB
蛋白聚糖与肿瘤通路	hsa05205	0.005 19	FGFR1, CAV2, CAV1, ERBB3, MRAS, PPP1R12B, ELK1, FZD4, ITPR1, FZD7, WNT2B, WNT2, HPSE2, ANK2, GAB1, THBS1, AKT3
黏着斑通路	hsa04510	0.006 84	COL4A4, CAV2, CAV1, MYL5, TNXB, TNC, PDGFC, PPP1R12B, ITGA11, ELK1, VWF, LAMA1, PDGFD, THBS1, MYLK, AKT3, THBS4
人类 T 细胞白血病病毒 I 感染通路	hsa05166	0.041 2	E2F2, IL2RB, MRAS, ELK1, SMAD2, PTTG2, FZD4, FZD7, WNT2B, WNT2, VCAM1, ATF3, SLC2A1, JAK3, HLA-DOB, AKT3, NFATC1
Ras 通路	hsa04014	0.032 0	FGFR1, PLD1, MRAS, GRIN2A, ELK1, KIT, FOXO4, GAB1, RAPGEF5, GNG2, PDGFC, PDGFD, GNG4, INSR, AKT3, PLA2G5

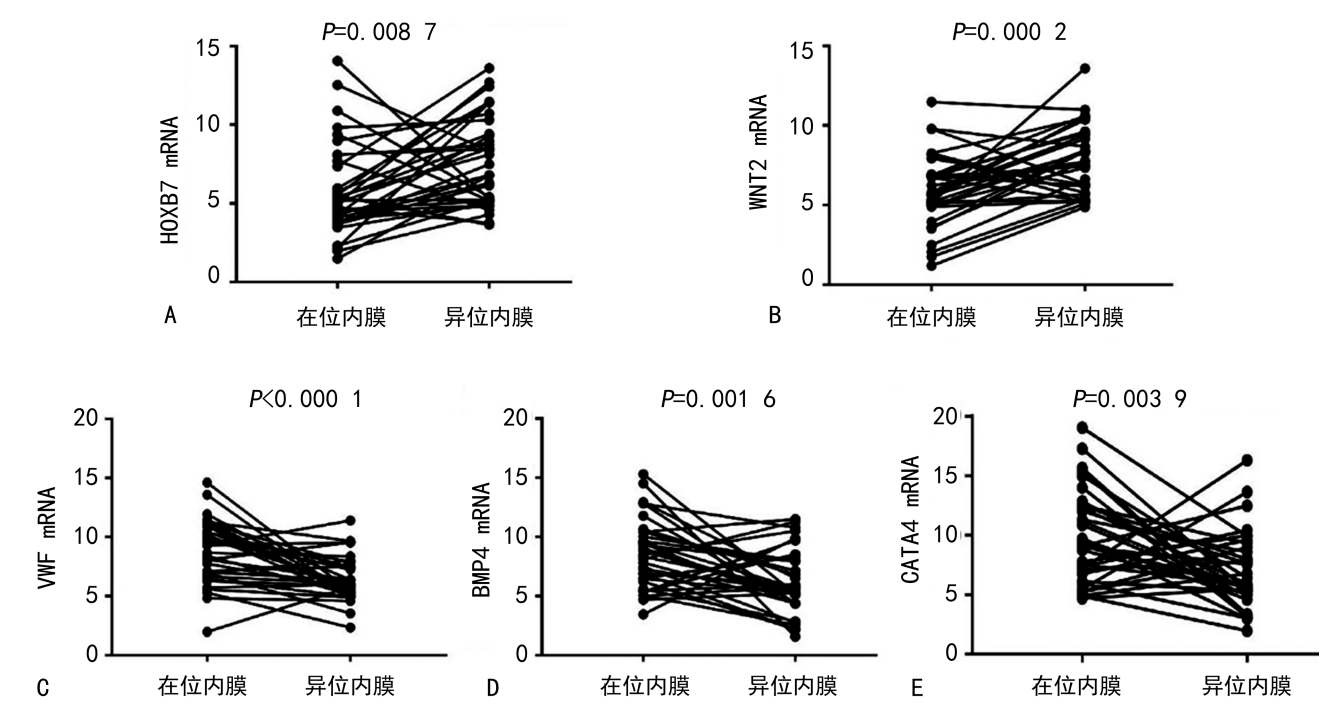
表 3 GSE86534 中差异表达基因编码蛋白 PPI 分析					
蛋白 1	蛋白 2	置信度	蛋白 1	蛋白 2	置信度
CD47	THBS1	0.992	HOXC6	HOXB7	0.968
FZD4	WNT2	0.986	HOXB7	HOXA5	0.968
GATA4	BMP4	0.984	HOXC4	HOXB7	0.967
VWF	THBS1	0.978	HOXC6	HOXA5	0.967
HOXC4	HOXC6	0.978	MEIS2	PBX3	0.965
NCAM1	GDNF	0.978	GLI2	CDON	0.965

续表 3 GSE86534 中差异表达基因编码蛋白 PPI 分析					
蛋白 1	蛋白 2	置信度	蛋白 1	蛋白 2	置信度
FZD4	WNT2B	0.977	VCAM1	THBS1	0.964
WNT2B	FZD7	0.973	WNT2B	WNT2	0.928
HOXC4	HOXA5	0.972	FZD4	FZD7	0.908
FZD7	WNT2	0.971	PBX3	HOXA5	0.907

2.4 实时荧光定量 PCR 验证候选基因结果 经验

证,纳入对象中在位内膜组织与异位内膜组织共计 2 个基因(HOXB7、WNT2)表达量在试验组高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2A、B;3 个基

因(VWF、BMP4、GATA4)表达量在试验组低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2C、D、E。



注:A 为 HOXB7 表达情况;B 为 WNT2 表达情况;C 为 VWF 表达情况;D 为 BMP4 表达情况;E 为 GATA4 表达情况。

图 2 荧光定量 PCR 验证候选基因表达

3 讨 论

EM 发病机制尚未完全明了,可能与内分泌、遗传因素、氧化应激、免疫因素、盆腹腔的各种酶及酶抑制剂、胚胎发育及着床等有关^[6-9]。内异症病灶多见于腹膜和盆腔脏器,少见盆腔外,以剖宫产切口处最常见,该病可致育龄期妇女不孕,且具有恶性肿瘤特征,患者在生理上与心理上承受双重负担,严重影响患者生活质量^[10]。

研究表明 KRAS、HOXA10、VEGFA、c-Jun、HLA-DQA1、ZEB1、GSTT1 等基因与 EM 密切相关^[11]。表观遗传变化调控基因表达,EM 异位组织中芳香化酶基因的 CpG 岛序列低甲基化和(或)反式作用因子上调芳香化酶基因的表达,EM 异位组织 E-cadherin 基因及 HOXA10 表达降低也与 EM 有关;环境因素可能会影响表观遗传基因导致 EM 的发生^[7]。由于 EM 患者免疫功能处于降低状态,内膜碎片返流入盆腹腔未能被正常清除,在雌激素、酶和酶抑制剂、细胞因子等共同作用下形成异位病灶,产生临床症状。与此同时,异位内膜释放的细胞因子能够改变植入点的免疫微环境,为异位内膜增殖提供了良好的物质基础^[12]。逆行的经血细胞破裂产生过多的铁离子和血红素,铁超载可增强活性氧簇的释放,促进氧化应激反应,诱导异位内膜细胞黏附与生长^[13]。

基于不同的致病机制,学者开发了多种有助于改善 EM 患者病痛的治疗方法。通过改善患者内分泌、使用抗氧化剂、免疫调节等多种途径缩减病灶、缓解症状。中医治疗与手术治疗亦能取得显著的治疗效果。治疗的总体目标为减轻及控制疼痛、治疗及促进生育、减缩及去除病灶、预防及减少复发。

本研究发现,EM 患者的异位内膜与在位内膜的基因表达谱具有明显差异,建立筛选条件可筛选出 826 个差异表达基因。筛选出的差异表达基因主要富集于信号转导、细胞黏附、转录、转录调控与多细胞生物发育等重要生物过程中;涉及的细胞信号通路主要有细胞黏附分子通路、黏着斑通路、Ras 通路、蛋白聚糖与肿瘤通路、人类 T 细胞白血病病毒 I 感染通路等。以上生物过程和信号通路在细胞行为中具有重要作用。筛选候选基因后,通过荧光定量 PCR 试验证实多个基因异常表达,HOXB7 和 WNT2 在异位内膜中的表达升高,VWF、BMP4 和 GATA4 在异位内膜中的表达降低。

以往研究曾报道 HOXA10 在 EM 患者异位内膜的表达与疾病进展相关,且与 EM 的疾病进展程度相关^[14]。HOXB7 与 HOXA10 同属于 HOX 家族成员,本文证实 HOXB7 在异位组织中表达升高,提示 HOX 家族可能在 EM 患者异位内膜演变过程中具有

重要作用。WNT 信号通路能够调控基质细胞与上皮细胞交互促进肿瘤转移等,本文发现 WNT2 在异位组织中高表达,提示 WNT2 可能通过操控下游基因表达促进 EM 的发生、发展,这与以往报道一致^[15]。转录因子 GATA4 与发育密切相关,通过调控下游基因影响心脏、肝脏等器官发育,影响、调控体细胞行为改变,包括癌变^[16]。

检测多个相关基因有望为解释 EM 的发生、发展提供数据支撑。本研究首次发现 HOXB7 基因与 EM 的疾病进展程度相关。由于研究样本量较少并且未建立动物模型,基因表达差异的调控机制尚未得到进一步解释,更大样本量、动物模型、细胞模型的建立将有助于进一步研究基因转录调控的机制。

参考文献

[1] 林巧,丁少杰,竺天虹,等.凝血和炎症因子在中重度卵巢子宫内膜异位症发病中的作用及临床诊断的意义[J].中华妇产科杂志,2018,53(3):167-171.

[2] 中国医师协会妇产科医师分会子宫内膜异位症专业委员会,中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组.子宫内膜异位症长期管理中国专家共识[J].中华妇产科杂志,2018,53(12):836-841.

[3] 赵赫,张军.手术前评估子宫内膜异位症严重程度的研究进展[J].中华妇产科杂志,2018,53(10):721-724.

[4] 方婧,徐修云,王慧焱,等.143 例宫腹腔镜联合检查在不孕症诊疗中的价值[J].检验医学与临床,2016,13(11):1523-1524.

[5] 喻蓉,曹毅.宫腹腔镜诊治宫腔粘连的临床效果研究[J].检验医学与临床,2014,11(16):2242-2243.

[6] 王丹丹,杨清.微小 RNA 与环状 RNA 在子宫内膜异位

症发生发展中的作用[J].中国实用妇科与产科杂志,2020,36(4):370-373.

[7] 吴夏迪,曲娟,崔毓桂,等.表观遗传学和环境因素与子宫内膜异位症[J].国际生殖健康计划生育杂志,2015,34(1):75-79.

[8] TAYLOR H S,GIUDICE L C,LESSEY B A,et al. Treatment of endometriosis-associated pain with elagolix, an oral GnRH antagonist[J]. N Engl J Med,2017,377(1):28-40.

[9] ZONDERVAN K T,BECKER C M,MISSMER S A. Endometriosis[J]. N Engl J Med,2020,382(13):1244-1256.

[10] HART R J. Physiological aspects of female fertility: role of the environment, modern lifestyle, and genetics [J]. Physiol Rev,2016,96(3):873-909.

[11] ANGLESIO M S,PAPADOPOULOS N,AYHAN A,et al. Cancer-associated mutations in endometriosis without cancer[J]. N Engl J Med,2017,376(19):1835-1848.

[12] 张群芳,刘芸,陈国勇,等.子宫内膜异位症对冻融胚胎移植的影响[J].检验医学与临床,2019,16(12):1640-1642.

[13] 和儒林,刘玉环.活性氧簇、氧化应激与子宫内膜异位症的关系研究进展[J].中华妇产科杂志,2019,54(3):206-209.

[14] 王梅梅. CA125、HOXA10 及 HOX 位点 lncRNA(HOXA11-AS)在早期子宫内膜异位症相关不孕患者中的预测价值及机制初探[D]. 济南:山东大学,2018.

[15] 吴柯,薛莱,韩萍,和厚朴酚对人结肠癌细胞及 Wnt 信号通路的影响及调控作用[J].检验医学与临床,2019,16(12):1643-1645.

[16] 王梓贺,贺继刚,谢巧丽,等.过表达 GATA-4 的小鼠骨髓间充质干细胞改善小鼠心肌梗死后的心功能[J].基础医学与临床,2019,39(9):1229-1233.

(收稿日期:2020-04-14 修回日期:2021-01-06)

(上接第 1045 页)

[14] 马静波,鲁衍强,马少杰,等.洛阳市汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性研究[J].中国优生与遗传杂志,2015,23(8):32-33.

[15] 郭晓玲,鲁衍强,杨兴坤,等.广东省佛山市汉族女性 MTHFR、MTRR 基因型及等位基因频率分布与其他地区汉族女性的比较[J].中国妇幼保健,2015,30(34):5955-5958.

[16] 方绮雯,刘振球,王俊,等.上海地区孕妇 MTHFR C677T 基因多态性与血浆同型半胱氨酸水平的关联性分析[J].中华疾病控制杂志,2017,21(7):702-705.

[17] 从玉英,鲁衍强,芮欣忆,等.淄博市汉族女性亚甲基四氢叶酸还原酶和甲硫氨酸合成酶还原酶基因多态性分布研究[J].现代妇产科进展,2012,21(10):779-781.

[18] 卢光荣,鲁衍强,马少杰,等.新乡市汉族孕龄女性 MTH-

FR 与 MTRR 基因多态性研究[J].河南医学研究,2014,23(7):7-10.

[19] 庞静,鲁衍强,付敏,等.沈阳市汉族与满族女性 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶、甲硫氨酸合成酶还原酶基因的单核苷酸多态性分布特征[J].中国妇幼保健,2019,34(5):1092-1095.

[20] 钱碧霞,程鹏龙,鲁衍强,等.丽水地区汉族女性 MTHFR 与 MTRR 基因多态性分析[J].中国优生与遗传杂志,2019,27(2):136-138.

[21] 郭晓玲,鲁衍强,杨兴坤,等.佛山市汉族人群叶酸代谢通路关键酶基因 MTHFR C677T 多态性分布特征调查[J].实用预防医学,2019,26(3):290-292.

(收稿日期:2020-06-23 修回日期:2021-01-22)