论著

文章编号:1000-5404(2010)12-1278-04

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子、基质金属蛋白酶与血管内皮生长因子在子宫内膜异位症中的表达及意义

张 婧,唐良萓,周 敏,龙行涛 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科)

[摘要] **目的** 探讨细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer,EMMPRIN)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinases 2,MMP-2)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在子宫内膜异位症(endometriosis, EM)中的表达及意义。**方法** 应用免疫组化SABC三步法检测57例EM患者子宫内膜组织(57例异位内膜,51例在位内膜)和同期48例非EM患者的正常子宫内膜(对照组)中EMMPRIN、MMP-2、MMP-9及VEGF的表达情况,并对各蛋白表达水平进行相关性分析。**结果** EMMPRIN、MMP-2、MMP-9及VEGF在EM异位内膜表达[分别为(0.723±0.114)、(0.729±0.109)、(0.692±0.089)、(0.704±0.103)]均高于EM在位内膜组[分别为(0.396±0.097)、(0.365±0.023)、(0.349±0.030)、(0.370±0.129)]($P<0.05$);Pearson相关分析显示,在EM异位内膜中各蛋白表达呈显著正相关($P<0.05$)。在EM异位内膜组中EMMPRIN、MMP-2、MMP-9及VEGF表达Ⅲ~Ⅳ期[分别为(0.780±0.058)、(0.779±0.064)、(0.736±0.050)、(0.749±0.059)]高于Ⅰ~Ⅱ期[分别为(0.563±0.070)、(0.588±0.079)、(0.570±0.051)、(0.580±0.100)]($P<0.05$)。MMP-2在EM在位内膜组表达较对照组高($P<0.05$)。**结论** EMMPRIN、MMPs和VEGF在EM中高表达,EMMPRIN-MMPs-VEGF系统上调可能在EM异位内膜种植、侵袭中发挥重要作用。

[关键词] 子宫内膜异位症;抗原, CD147;基质金属蛋白酶类;血管内皮生长因子类
[中图法分类号] R711.71; R446.6; R34 [文献标志码] A

Expressions and significances of EMMPRIN, MMP-2, MMP-9 and VEGF in endometriosis

Zhang Jing, Tang Liangdan, Zhou Min, Long Xingtao (Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expressions and significances of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), the matrix metalloproteinases-2,-9 (MMP-2, -9), and the vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis (EM). **Methods** The expressions of the EMMPRIN, MMP-2, MMP-9 and VEGF were detected by SABC immunohistochemistry in 57 tissue samples of ectopic endometrium and 51 samples of eutopic endometrium obtained from 57 EM patients, and in 48 normal endometrium from patients with non-endometriosis. Correlation analysis was carried out on the expressions of these proteins and pathologic staging. **Results** The EMMPRIN, MMP-2, MMP-9 and VEGF in ectopic endometrium were expressed at significantly higher levels (0.723±0.114, 0.729±0.109, 0.692±0.089, 0.704±0.103, respectively) than those in eutopic endometrium group (0.396±0.097, 0.365±0.023, 0.349±0.030, 0.370±0.129, respectively, $P<0.05$). Pearson correlation analysis showed that positive correlation were found between the EMMPRIN, MMP-2, MMP-9 and VEGF in ectopic endometrium group ($P<0.05$). The expression levels of the EMMPRIN, MMP-2, MMP-9 and VEGF in the stages of Ⅲ to Ⅳ (0.780±0.058, 0.779±0.064, 0.736±0.050, 0.749±0.059, respectively) were significantly higher than those in Ⅰ to Ⅱ (0.563±0.070, 0.588±0.079, 0.570±0.051, 0.580±0.100, respectively) in ectopic endometrium group ($P<0.05$). The MMP-2 in eutopic endometrium group had significantly higher levels than the control group ($P<0.05$). **Conclusion** EMMPRIN, MMPs and VEGF are expressed highly in ectopic endometrium. The up-regulation of EMMPRIN-MMPs-VEGF system may play an important role in ectopic endometrium planting and invasion of EM.

[**Key words**] endometriosis;antigens, CD147;matrix metalloproteinases;vascular endothelial growth factors

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772034) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2007BB5316).
Corresponding author: Tang Liangdan, Tel:86-23-89011092, E-mail:ldtang2002@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30772034);重庆市自然科学基金(CSTC2007BB5316)
[通信作者] 唐良萓,电话:(023)89011092,E-mail:ldtang2002@yahoo.com.cn

子宫内膜异位症(endometriosis,EM)是一种良性但具侵袭性的妇科疾病,多见于 25 ~45 岁的生育年龄妇女,且发病率逐年上升,在育龄期妇女中的发病率为 7% ~15%[1]。EM 主要临床表现为痛经、经量增多及不孕,且治疗后 2 年复发率约为 21.5%,5 年复发率为 40% ~50%[2]。EM 病因不明,发病机制尚不清楚,存在多种学说,目前为人们公认的是 Sampson 的种植学说,脱落的子宫内膜组织(腺上皮和间质)可随经血倒流,经输卵管进入腹腔,种植在卵巢和盆腹腔脏器[3]。子宫内膜在异位病灶种植需具有降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)及生成新生血管能力,才能在异位部位种植和生长[4,5]。因此,细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrixmetallo proteinase inducer, EMMPRIN)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)可能在 EM 发生、发展中有着重要作用。本研究通过免疫组化技术检测 EM 组织中 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 蛋白表达水平,分析四者之间相关性,探讨 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 在 EM 发生、发展中的作用及意义。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2008 年 5 月至 2009 年 4 月于重庆医科大学附属第一医院妇产科诊断为 EM 并行开腹或者腹腔镜手术治疗,术后病理报告为 EM 的患者共 57 例,其中卵巢 EM 44 例,盆腹壁子宫内膜异位症 13 例,年龄 24 ~46(33.9 ±4.9)岁,对照组为 48 例同期于本科就诊,因不孕、输卵管结扎及子宫肌瘤行手术治疗,术中未发现子宫内膜异位病灶且术后病理报告证实为非 EM 疾病患者的正常子宫内膜,年龄 32 ~47(41.1 ±4.0)岁。

所有患者术前 3 个月内均未接受激素治疗或 6 个月内无生产、哺乳史,无不规则阴道流血史,排除盆腔炎性疾病或恶性肿瘤的临床证据。

1.2 组织提取

收集 57 例 EM 患者的异位内膜组织,在位子宫内膜组织也取自同期 51 例 EM 患者,均作为 EM 组;48 例非 EM 患者的正常子宫内膜组织作为对照。

1.3 方法和判断标准

采用免疫组织化学染色 SABC 法。10% 中性缓冲甲醛固定组织标本,石蜡包埋,连续切 4 μm 厚组织块切片制片。脱蜡、水化后,3% H_2O_2 室温封闭;微波加热进行抗原修复,室温冷却。滴加正常山羊血清封闭液后滴加Ⅰ抗:兔抗人 EMMPRIN 多克隆抗体(Uscn Life Science & Technology Company)、兔抗人 MMP-2 及 MMP-9 多克隆抗体(Uscn Life Science & Technology Company)、鼠抗人 VEGF 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),1∶100 稀释,4 ℃过夜。滴加生物素化二抗后,滴加试剂 SABC(武汉博士德),DAB 显色,蒸馏水洗、苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检。

免疫组化结果用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件进行分析,每张切片选择 5 个视野进行分析,以平均光密度值(average optical density,AOD)作为 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 蛋白的表达强度。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析,组间比较用独立样本 t 检验。采用双变量 Pearson 相关分析法分析 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 之间的相关性。

2 结果

2.1 临床资料分析

EM 组患者临床症状表现为痛经 35 例(61.4%),其中有 9 例合并原发不孕,慢性盆腔痛 15 例(26.3%),性交痛 11 例(19.3%)。38 例(66.7%)患者行腹腔镜检查或腹腔镜手术治疗,19 例(33.3%)行经腹手术治疗。根据美国生育学会(The American Fertility Society,AFS)修正标准分期评分(The Revised AFS,1985):Ⅰ期和Ⅱ期 15 例(26.3%),Ⅲ期和Ⅳ期 42 例(73.7%)。EM 在位内膜组中 23 例(45.1%)为月经周期的增生期,28 例(54.9%)为分泌期。对照组中 23 例(47.9%)为月经周期的增生期,25 例(52.1%)为分泌期。经统计学分析,EM 在位内膜组与对照组内膜所处月经周期差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 在子宫内膜组织的表达

EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 在 EM 异位内膜、在位内膜和正常内膜中均有表达,EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 在 EM 异位内膜中表达均较在位内膜高,对照组中各蛋白因子表达均较 EM 异位内膜低($P<0.05$)。EM 在位内膜中 EMMPRIN 和 MMP-9 表达与对照组比较差异无显著性($P>0.05$),而 EM 在位内膜中 MMP-2 和 VEGF 表达均较对照组高($P<0.05$,表 1)。在 EM 异位内膜组中,EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 与 VEGF 蛋白表达强度Ⅲ ~Ⅳ期较Ⅰ ~Ⅱ期高($P<0.05$,表 2)。EMMPRIN、MMP-2 和 MMP-9 表达于腺上皮细胞和间质细胞(图 1 ~3),VEGF 表达于腺上皮细胞、间质细胞和血管内皮细胞(图 4)。

表 1 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 在各组中的表达

组别	n	EMMPRIN	MMP-2	MMP-9	VEGF
EM 异位内膜组	57	0.723 ±0.114[ab]	0.729 ±0.109[ab]	0.692 ±0.089[ab]	0.704 ±0.103[ab]
EM 在位内膜组	51	0.396 ±0.097	0.365 ±0.023[b]	0.349 ±0.030	0.370 ±0.129[b]
对照组	48	0.361 ±0.085	0.303 ±0.061	0.334 ±0.028	0.315 ±0.091

a:$P<0.05$,与 EM 在位内膜组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

表 2 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 在 EM Ⅰ ~Ⅱ期与Ⅲ ~Ⅳ期异位内膜中的表达

分期	n	EMMPRIN	MMP-2	MMP-9	VEGF
Ⅲ ~Ⅳ期	42	0.780 ±0.058[a]	0.779 ±0.064[a]	0.736 ±0.050[a]	0.749 ±0.059[a]
Ⅰ~Ⅱ期	15	0.563 ±0.070	0.588 ±0.079	0.570 ±0.051	0.580 ±0.100

a: $P<0.05$, 与Ⅰ ~Ⅱ期比较

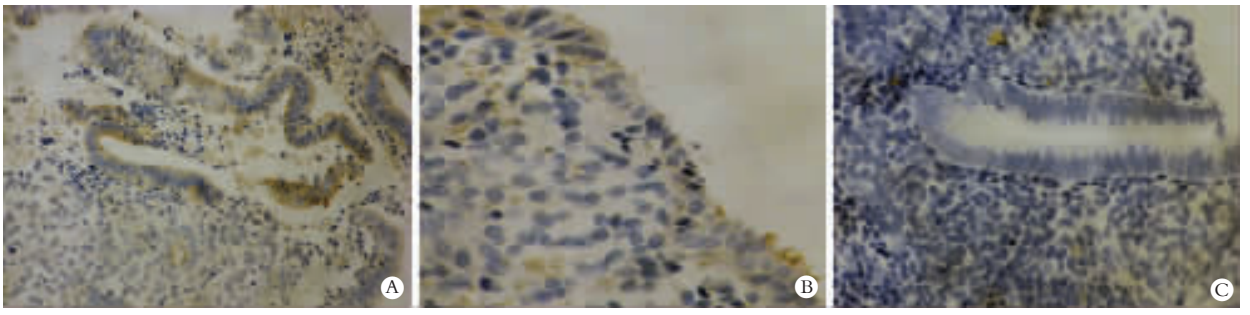


图1 EMMPRIN在EM异位内膜组(A)、在位内膜组(B)和对照组(C)组织中的表达 (SABC ×400)

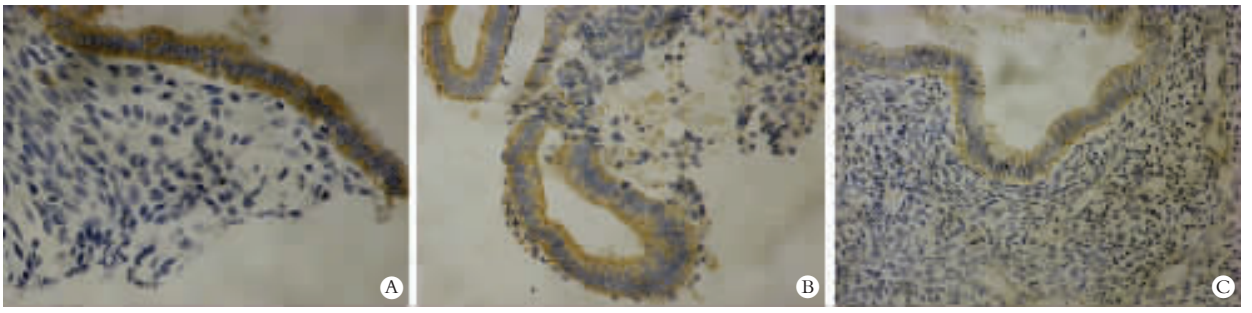


图2 MMP-2在EM异位内膜组(A)、在位内膜组(B)和对照组(C)组织中的表达 (SABC ×400)

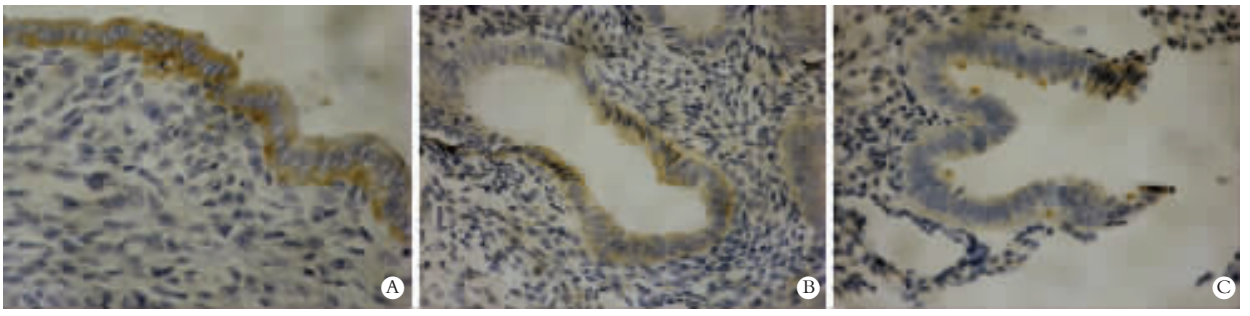


图3 MMP-9在EM异位内膜组(A)、在位内膜组(B)和对照组(C)组织中的表达 (SABC ×400)

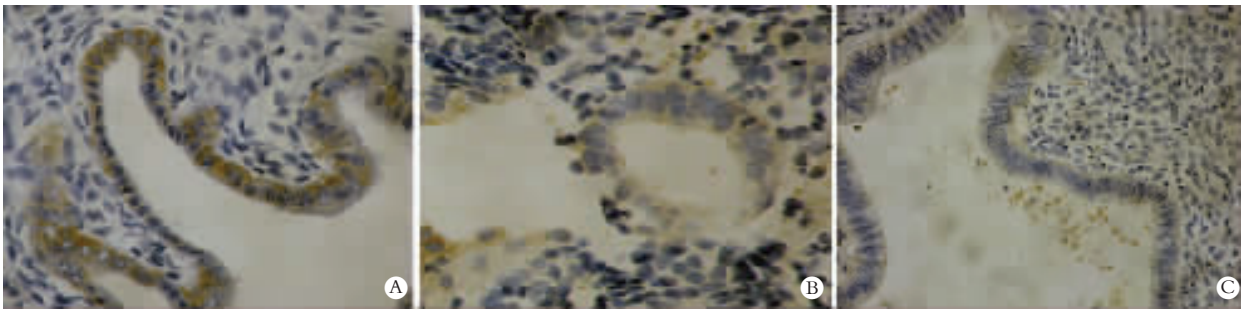


图4 VEGF在EM异位内膜组(A)、在位内膜组(B)和对照组(C)组织中的表达 (SABC ×400)

2.3 EMMPRIN、MMP-2、MMP-9与VEGF在EM异位内膜中表达的相关性分析

EM异位内膜中EMMPRIN与MMP-2、MMP-9之间表达均呈正相关(r值分别为0.799和0.826,$P<0.05$),EMMPRIN与VEGF之间表达呈正相关($r=0.696$,$P<0.05$)。VEGF与MMP-2、MMP-9之间表达均呈正相关(r值分别为0.702和0.674,$P<0.05$)。

3 讨论

EMMPRIN是免疫球蛋白超家族中的一员,是一种跨膜糖蛋白,编码基因位于人19号染色体19p1313。该蛋白广泛表达于各种上皮细胞,具有多效性,参与体内多种生理过程并具有多种不同的生理功能[6]。EMMPRIN在上皮来源的肿瘤细胞中呈高表达,通过刺激成纤维细胞,诱导其表达并分泌MMPs,促进卵巢癌、肝癌和胃癌等肿瘤的浸润和转移[7-9]。MMPs是一组Zn^{2+}依赖性蛋白水解酶,在人体内分布广泛,可参与稳定内环境,如骨的再建、伤口愈合和免疫调节等;在病理过程中,MMPs参与了肿瘤浸润转移复发、慢性炎症、组织纤维化等。MMPs迄今至少发现25种MMPs,主要功能是降解ECM中胶原,弹力蛋白,

纤维连接蛋白,层粘连蛋白等多种成分,MMP-2,MMP-9 同属明胶酶类,能够降解各组织器官中基底膜的主要成分Ⅳ型胶原[4]。本研究表明,EMMPRIN、MMP-2 和 MMP-9 在 EM 异位内膜中表达较正常内膜组高,且三者在 EM 异位内膜中表达呈显著正相关,与文献[10,11]报道相似,提示异位内膜组织中上调的 EMMPRIN 诱导上皮细胞及成纤维细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9,降解 ECM,促进异位内膜种植在盆腹腔种植。在 EM 在位内膜组中 MMP-2 的表达较正常内膜组高,而 EMMPRIN 和 MMP-9 的表达较正常内膜组高,但差异无统计学意义,提示 EM 在位子宫内膜与非 EM 患者的正常子宫内膜可能在结构和/或功能上存在差别,促进 EM 发生,但 EMMPRIN、MMPs 的存在不是诱发 EM 疾病的因素。进一步研究发现,EMMPRIN、MMP-2 和 MMP-9 在 EM 异位子宫内膜组织Ⅲ~Ⅳ期中的表达均较 EM Ⅰ~Ⅱ期高,提示 EMMPRIN 和 MMPs 高表达可促进 EM 异位病灶侵袭、扩大,在 EM 发展过程中可能起重要作用。

VEGF 是最关键的促血管形成因子,具有促进血管内皮细胞增殖、迁移,增加微血管通透性,促进血管形成的生物学特性,在人体各个组织有不同程度的表达,具有维护血管内膜完整性和修复内皮损伤等生理功能[5]。本研究结果显示,VEGF 在 EM 异位内膜中的表达较 EM 在位内膜和正常内膜高,在 EM 在位内膜中表达较正常内膜高,且 VEGF 在 EM 异位子宫内膜组织Ⅲ~Ⅳ期中的表达均较 EM Ⅰ~Ⅱ期高,与文献[10,12,13]报道相似,提示 EM 在位内膜与正常内膜比较,具有较强的血管生成能力,这有助于脱落的子宫内膜逆行进入盆腹腔黏附后产生新生血管,为其在异位组织生长提供血供。且异位内膜在盆腹腔侵袭,建立微血管网与 VEGF 高表达水平相关。

目前,已有研究[10,14]证实 MMPs、VEGF 之间相互作用在肿瘤、EM 的发生、发展中有重要作用,对 EMMPRIN-MMPs-VEGF 的研究多在肿瘤中进行[15,16]。本研究发现,EMMPRIN 与 VEGF,MMP-2、MMP-9 与 VEGF 在 EM 异位内膜中表达均呈正相关,提示高表达的 EMMPRIN 可刺激周围间质细胞直接产生 VEGF 形成新生血管,或通过 MMP-2、MMP-9 降解血管基底膜和合成释放调节血管生长的因子,促进 VEGF 的产生,而 VEGF 能促进内皮细胞增殖,提高血管的通透性,促进 MMP-2,MMP-9 降解 ECM,因此,在 EMMPRIN、MMPs 和 VEGF 相互影响,共同参与的作用下,脱落的子宫内膜通过黏附、侵袭和血管形成过程,可在异位种植、生长,并引起病变和症状。

综上所述,本研究结果显示 EMMPRIN-MMPs-VEGF 系统,即 EMMPRIN 的表达上调,可刺激异位内膜和周围间质组织分泌 MMPs 和 VEGF 增加,在 EM 的发生、发展和侵袭中发挥重要作用,并提出新的 EMMPRIN 促血管生成机制。而 EMMPRIN、MMPs 和 VEGF 之间的作用机制与临床症状的关系还需进一步研究。

参考文献:

[1] Starczewski A, Brodowska A, Brodowski J. Pharmacotherapy for pelvic endometriosis in women[J]. Pol Merkur Lekarski, 2009, 26(153): 231-233.
[2] Guo S W. Recurrence of endometriosis and its control[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(4): 441-461.
[3] Sampson J A. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity[J]. Am J Obstet Gynecol, 1927, 14: 422-469.
[4] Ra H J, Parks W C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity[J]. Matrix Biol, 2007, 26(8): 587-596.
[5] Taylor R N, Yu J, Torres P B, *et al*. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis[J]. Reprod Sci, 2009, 16(2): 140-146.
[6] Iacono K T, Brown A L, Greene M I, *et al*. CD147 Immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology[J]. Exp Mol Pathol, 2007, 83(3): 283-295.
[7] Jin J S, Yao C W, Loh S H, *et al*. Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in ovary tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters[J]. Int J Gynecol Pathol, 2006, 25(2): 140-146.
[8] Xu J, Xu H Y, Zhang Q, *et al*. HAb18G/CD147 functions in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(6): 605-614.
[9] 王玲玲, 姚根有, 张布衣, 等. 胃癌中 CD147 和上皮型钙黏蛋白的表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(7): 515-519.
[10] Di-Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli G A, *et al*. Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium[J]. Fertil Steril, 2009, 91(6): 2315-2323.
[11] Smedts A M, Lele S M, Modesitt S C, *et al*. Expression of an extracellular matrix metalloproteinase inducer (basigin) in the human ovary and ovarian endometriosis[J]. Fertil Steril, 2006, 86(3): 535-542.
[12] 史淑红, 李佃贵, 马秀菊. 子宫内膜异位症患者腹腔液中血管内皮生长因子及其可溶性受体的测定[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 976-978.
[13] 陈景伟, 杜惠兰, 杨剑. VEGF、HIF-1α 在子宫内膜异位症中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(1): 92-93.
[14] Jobim F C, Schwartsmann G, Xavier N L, *et al*. Expression of MMP-9 and VEGF in breast cancer: correlation with other prognostic indicators[J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2008, 30(6): 287-293.
[15] Tang Y, Nakada MT, Kesavan P, *et al*. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3193-3199.
[16] Zheng H C, Takahashi H, Murai Y, *et al*. Upregulated EMMPRIN/CD147 might contribute to growth and angiogenesis of gastric carcinoma: a good marker for local invasion and prognosis[J]. Br J Cancer, 2006, 95(10): 1371-1378.

(**收稿**:2009-12-24;**修回**:2010-02-02)
(编辑 王小宴)