维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0196－04

CON43 蛋白及 mRNA 在子宫内膜异位症中表达及意义

谯 建，姚珍薇，令狐华

(重庆医科大学临床学院妇产科，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨间隙连接蛋白 CON43mRNA 及蛋白在子宫内膜异位症中的表达及意义。方法：对 20 例子宫内膜异位症内膜用免疫组化法检测 CON43 蛋白的表达，用 RT－PCR 检测其 mRNA 表达，并与 21 例其他良性疾病子宫的内膜进行比较。结果：CON43 蛋白主要在内膜腺上皮细胞浆中表达，内异症组中 CON43 蛋白表达较对照组显著降低；且内异症组中 CON43mRNA 较对照组显著降低。结论：子宫内膜异位症中间隙连接蛋白 CON43 在 mRNA 水平和蛋白水平较对照组显著降低，可能是导致内膜上皮细胞间的物质和信号传递减低或缺失，内膜细胞在它处游走、粘附的重要原因。

【关键词】CON43；RT－PCR；子宫内膜异位症；间隙连接通讯

【中国图书分类法分类号】R71 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－10－28

Expression of connexin43 protein and mRNA in patients with endometriosis and its significance

QIAO Jian, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of connexin43 protein, mRNA and its significance in patients with endometriosis. *Methods*: Endometria were obtained from 20 cases with endometriosis through hysterectomy, and from 21 cases of the control group through hysterectomy and laparoscopic examination and other ways. Immunohistochemical staining with antibody against connexin 43 protein was performed by S－ABC method. But mRNA of connexin 43 was examined by RT－PCR. *Results*: Connexin43 protein was mainly expressed in the plasma of glandular epithelium of endometrium. There was a significant difference between the study group and the control group. The expression of connexin43 protein and mRNA in endometriosis group was much lower than in the control group. *Conclusion*: The gap junction induced by connexin43 protein between the glandular epithelium of endometrium is very important for the communication of substances and signals. The loss of gap junction communication caused by the reduction of connexin43 mRNA and protein in endometriosis might be responsible for the movement of endometrial cells to other places.

【Key words】Connexin43；RT－PCR；Endometriosis；Gap junction

子宫内膜异位症(内异症)是生育年龄妇女的一种常见症，其发病率有逐年增加的趋势。内异症的发病机制不清，虽为良性疾病，但它易于转移、种植，侵袭于盆腹腔脏器、腹膜等浆膜面，药物治疗后复发率高。这些特性和恶性肿瘤有相似之处。所不同的是内异症细胞维持着正常的增殖、生长，是可控的，而恶性肿瘤细胞出现不可控制的异常增殖。

CON43 为间隙连接蛋白家族(connexins)中的一种，其所介导的细胞间间隙连接通讯(gap junction intercellular communication GJIC)作为细胞间传递细胞信息的一个重要途径，在细胞分化，生长调控，以及细胞的粘附、运动等各方面都起着重要的作用。近年研究发现 GJIC 异常与恶性肿瘤的发生有关，而间隙连接蛋白是否参与子宫内膜异位症的发病目前国内尚未见报道，我们对此进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

2003 年 11 月～2004 年 7 月，收集重庆医科大学临床学院妇科子宫内膜异位症 20 例的子宫内膜作为病例组，年龄 39～51 岁，平均 44 岁，所有病例均经组织学证实；同期取其它良性疾病的子宫内膜作为对照组，共 21 例，年龄 27～50 岁，平均 39 岁。排除半年内使用过激素的病例。所有用作

作者介绍：谯 建(1973－)，女，主治医师，博士生，主要研究方向：妇科疾病的病因及诊治。

基金项目：本课题受重庆市教委科研基金资助(02－05)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

免疫组化检测的标本用 4% 多聚甲醛固定，用作 RT－PCR 检测 mRNA 的标本用 DEPC 水处理过的锡箔纸包好放入液氮罐中保存。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 免疫组化试剂和仪器

抗人 CON43 多克隆抗体，SABC 免疫组化试剂盒，DAB 显色试剂盒均为武汉博士德生物公司产品。

仪器 Olympus：BX40 电子显微镜，DHP－420 电热恒温孵箱。由重庆医科大学超声医学工程研究所重点实验室提供。

1.2.2 RT－PCR 试剂和仪器

总 RNA 提取试剂，逆转录酶 M－MLV，RT－PCR Kit，DNA marker 在 TaKaRa 生物有限公司购买，CON43 引物 1 序列：5'－GGACATGCACTTGAAGCAGA－3'，引物 2 序列：5,－CTTATCCCCTCCCTCTCCAC－3'，产物 984bp；内参 GAPDH 引物 1 序列：5'－CCATGGAGAAGGCTGGGG－3'，引物 2 序列：5'－CAAAGTTGTCATGGATGACC－3'，产物 208bp，由上海生工生物技术公司合成。

仪器：匀浆器，低温超速离心机，PCR 仪，BIO－RAD 凝胶成像及图象分析仪由重庆医科大学检验系分子生物学实验室提供。

1.3 SABC 免疫组化法

石蜡包埋所取组织，5μm 厚切片，切片脱蜡至水，PBS 洗 3 次，3% H_2O_2 灭活 10min，PBS 洗 3 次，在枸橼酸钠缓冲液中进行抗原热修复 10min，正常山羊血清 37℃ 封闭 20min，去掉血清，滴加 CON43 抗体(1∶80)4℃ 过夜，第二天从冰箱取出，PBS 洗 3 次后加入生物素化二抗，37℃ 20min，PBS 洗 3 次，加入辣根过氧化酶标记的链霉卵白素，37℃ 20min，PBS 洗 3 次，DAB 显色 10min，自来水冲洗，苏木素复染，脱水透明，封片。

1.4 RT－PCR

总 RNA 提取参照《分子克隆》第 3 版进行，逆转录采用说明书 M－MLV 逆转录酶标准体系，37℃ 反应 60min，99℃ 5min。PCR 扩增采用 50μl 反应体系，内含 cDNA3.0μl，10× buffer 5.0μl，25mmol/lMgCl₂ 5μl，10μmol/ldNTP 4.0μl，EX Tag DNA 聚合酶(5U/μl)0.25μl，1.0μl 引物 1，1.0μl 引物 2，DdH_2O33.25μl。

整个反应体系按下述条件进行循环：95℃ 25min，94℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 1min，进行 35 个循环，最后 72℃ 5min，同时做 GAPDH 内对照，以水作为阴性对照，扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳 30min(80V)，EB(0.5μg/ml)染色。在 BIO－RAD 图象分析仪上观察并扫描制片，记录结果。

1.5 免疫组化结果判定

在电子显微镜下观察计数，以细胞膜或细胞浆出现明显的棕黄色颗粒为阳性细胞，染色强度分度见表 1，用已知 CON43 阳性切片为阳性对照，PBS 代替一抗作阴性对照。

1.6 统计学处理

所有结果均经 χ^2 检验。$P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CON43 免疫组化定位

CON43 阳性染色主要出现于子宫内膜腺体，而间质较少主要定位于细胞浆，胞核阳性染色不明显(图 1、2)。



图 1 CON43 蛋白在对照组内膜腺体细胞表达呈强阳性表达

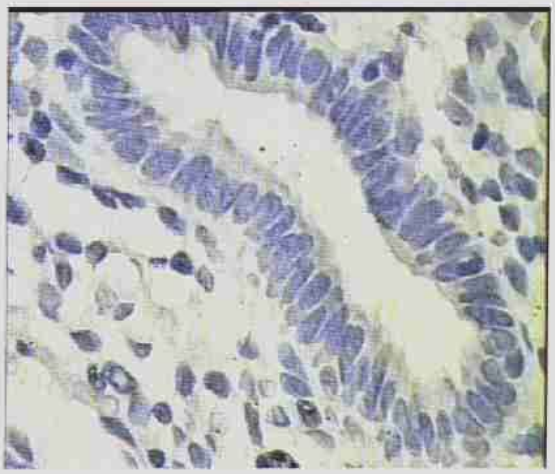


图 2 CON43 在内异症组内膜腺体呈阴性表达

2.2 CON43 蛋白在子宫内膜异位症在位内膜和对照组的表达情况

内异症组和对照组的 CON43 蛋白的表达差异有显著性意义。($P<0.001$)，见表 2。

表 1 免疫组化染色强度的分度标准

分度	阴性(－)	阳性(＋)	阳性(＋＋)	阳性(＋＋＋)
阳性细胞所占比列	<5%	6%～25%	26%～50%	>50%

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 CON43 蛋白在内异症组和对照组的表达

组别	例数(n)	CON43 的表达			
		-例(%)	+例(%)	++例(%)	+++例(%)
内异症组	20	10(50)	6(30)	3(15)	1(5)
对照组	21	0	5(23.8)	6(28.6)	10(47.6)

表 3 CON43 蛋白在不同月经周期中的表达

分期	内异症组 CON43 的表达				对照组 CON43 的表达			
	-例(%)	+例(%)	++例(%)	+++例(%)	-例(%)	+例(%)	++例(%)	+++例(%)
增生期	7(35)	3(15)	2(10)	1(5)	0	2(9.5)	2(9.5)	8(38.2)
分泌期	3(15)	3(15)	1(5)	0	0	3(14.3)	4(19)	2(9.5)

2.3 CON43 蛋白在月经周期中的表达情况

月经周期中的增生期和分泌期,内异症组和对照组的 CON43 蛋白表达差异无显著性意义(两组 $P>0.05$)。见表 3。

2.4 RT-PCR

半定量 RT-PCR 检测结果以琼脂糖电泳条带的亮度来判断,CON43mRNA 表达高低结果如图 3 显示。从图 3 中可以看出内异症组(1、2、3、7、8)cDNA 扩增产物电泳条带亮度较对照组(4、5、9、10)明显减低。

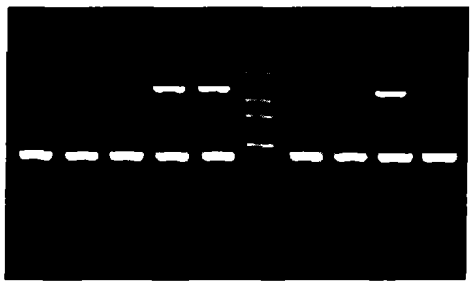


图 3 CON43 mRNA 在内异症组和对照组表达情况

3 讨 论

在多种细胞之间都依靠细胞间的连接而相互粘附在一起,其中间隙连接(gap junction)是很重要的一种连接,它构成细胞间的通道。这个通道允许离子、小分子物质如氨基酸、核苷酸;第二信使 cAMP,Ca^{2+},IP_3(三磷酸肌醇)等自由的通过,传递着细胞间信息,调控细胞的生长、分化,维持细胞的内稳态和形态[1,2]。CON43 蛋白是间隙连接蛋白家族中的一员,它在心肌、子宫平滑肌、乳腺、孵巢、神经元等中有表达。

在许多恶性肿瘤中,发现 CON43 蛋白和 mRNA 的表达受到抑制[3~5],CON43 蛋白介导的 GJIC 功能随之降低。研究发现肿瘤细胞的 GJIC 功能降低与肿瘤的转移能力呈负相关。GJIC 功能减弱,引起肿瘤细胞间失去相邻正常细胞的调控信息,肿瘤细胞间的接触抑制和密度依赖性生长作用丧失,肿瘤细胞大量增殖,组织间的张力增大,容易引起肿瘤细胞脱落,向其它组织粘附、侵袭。

子宫内膜异位症作为具有侵袭性的良性疾病,其病理特征为:子宫内膜出现在子宫腔以外,异位的内膜在卵巢、子宫直肠陷凹、盆腹腔腹膜表面种植,发生周期性增殖,出血,引起局部类炎症反应,出现盆腔疼痛、不孕等临床症状。有大约 0.7%~1%的病例出现恶变[6]。以前提出的几种学说还不能完全解释内异症的病因,其异位种植、侵袭等生物学行为与恶性肿瘤有很多相似之处。因此我们试图证实间隙连接通讯是否也在内异症致病中起一定作用。

研究发现内异症中 CON43 蛋白和 mRNA 的表达较对照组均显著降低,在内异症组中多例在位内膜 CON43 蛋白和 mRNA 呈阴性表达。内异症的间隙连接通讯的这种变化与恶性肿瘤相同。我们推测间隙连接蛋白在内异症致病机制可能与恶性肿瘤不同。研究发现致癌过程分为 3 个阶段即:①引发阶段(initiation),自发的或致癌剂诱导的基因损伤使细胞向恶性转化,此阶段是不可逆的;②促癌变阶段(promotion),前肿瘤细胞与周围正常细胞间 GJIC 受到抑制,因此前肿瘤细胞缺乏正常细胞对其调控,此阶段是可逆的,促癌剂或抑癌剂均可抑制或恢复 GJIC 功能;③增殖阶段,是不可逆的,且 GJIC 功能消失,肿瘤细胞发生不受控制的增殖。而内异症的内膜细胞仅仅是细胞间的通讯障碍,这种通讯障碍可能由于连接蛋白的异常磷酸化引起,并没有发生原癌基因的激活或基因突变、损伤。因此内异症细胞的生长是可控的。内异症细胞的异位种植可能是由于内膜腺上皮细胞间 GJIC 功能随着

维普资讯 http://www.cqvip.com

CON43mRNA 的表达降低，进而蛋白表达的降低而降低或缺失，上皮细胞间的物质和信号传递因此而减弱或消失，细胞失去彼此间调控和粘附、从而侵袭于它处。

此外，本研究发现 CON43 蛋白主要表达于子宫内膜腺上皮细胞浆中，在基质细胞几乎无表达。Risek，Grummer[7,8]等发现 CON43 仅在小鼠内膜的基质细胞中表达，而另外两种间隙连接蛋白 CON32 和 CON26 在小鼠内膜腺上皮表达。

Jahn[9]等研究发现在增生早期 CON43 蛋白有弱的表达，在增生晚期 CON43 表达增加，排卵后在分泌早期表达受抑，而在分泌晚期则完全消失，指出间隙连接蛋白的表达受激素调控。本研究发现在月经周期中，对照组 CON43 在增生期中强表达较多，分泌期强表达减少，其趋势和上述研究结果一致；而在内异症组中增生期、分泌期强表达均少，我们推测雌、孕激素对内异症在位内膜间隙连接的调节作用和正常内膜有差异。

参 考 文 献

[1] Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel[J]. Cell, 1996; 84: 381 - 388.

[2] Yamasaki H, Naus CC. Role of connexin genes in growth control[J]. Carcinogenesis, 1996; 17: 1199 - 1213.

[3] Lee SW, Tomasetto C, Paul D, et al. Transcriptional down - regulation of gap - junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines[J]. J Cell Biol, 1992; 118: 1213 - 1221.

[4] Hanna EA, Umhauer S, Roshong SL, et al. Gap junctional intercellular communication and connexin43 in human ovarian surface epithelial cells and ovarian carcinomas in vivo and in vitro[J]. Carcinogenesis, 1999; 20: 1369 - 1373.

[5] Umhauer S, Ruch RJ, Fanning J. Gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in ovarian carcinoma[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000; 182: 999 - 1000.

[6] Stern RC, Dash R, Bentley RC, et al. Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types[J]. Int J Gynecol Pathol, 2001; 20(2): 133 - 139.

[7] Risek B, Klier EG., Phillips A., et al. Gap junction regulation in the uterus and ovaries of immature rats by estrogen and progesterone[J]. J Cell Sci, 1995; 108: 1017 - 1032.

[8] Grummer R, Chwalisz K, Mulholland J, et al. Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones[J]. Biol Reprod, 1994; 51: 1109 - 1116.

[9] Jahn E, Classen - linke I, Kusche M, et al. Expression of gap junction connexins in the human endometrium throughout the menstrual cycle[J]. Hum Reprod, 1995; 10: 2666 - 2670.

(上接第 195 页)

[6] Kim NH, Kim KB, Kim SG, et al. Plasma and urinary vascular endothelial growth factor and diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus[J]. J. Diabet Med, 2004; 21(6): 545 - 551.

[7] Linderholm B K, Andersson J S, on Schoultz E, et al. Prognostic and predictive value of receptor tyrosine kinase(c - erbB - 2, VEGFR2), VEGF and phosphorylated p38 MAP kinase(MAPK) follwing adjuant endocrine therapy[J]. J. Breast Cancer Res Treat, 2003; 82(S1): p S121.

[8] Oak M, Chataigneau M. Red wine polyphenolic compounds inhibit vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells by preventing the activation of the p38 mitogen - activated protein kinase pathway[J]. J. Arterioscerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2003; 23(6): 1001 - 1007.

[9] Neve, Jean. Selenium as a 'nutraceutical': how to conciliate physiological and supra - nutritional effects for an essential trace element[J]. J. Clin Nutr and Meta Care, 2002; 5(6): pp659 - 663.

[10] Sheng XQ, Huang KX, Xu HB. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus [J]. J. Biol Trace Elem Res, 2004; 99(1 - 3): 241 - 254.

[11] 张玉洪，肖 谦. 单核苷酸多态性在研究糖尿病微血管病变易感基因中的应用[J]. 重庆医科大学学报，2004; 29(1): 18 - 20.

[12] 倪银星. 硒与糖尿病[J]. 重庆医科大学学报，2002; 27(3): 366 - 368.