生殖系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000972

宫腔粘连患者子宫内膜组织中 uPA、PAI-1、TGF-β1 的表达及其相关性研究

孙聪聪，王 佳，明 雪，高燕洪，张应凤，陈怀梅
（重庆医科大学附属大学城医院妇产科，重庆 401331）

【摘 要】**目的**：探讨尿激酶型纤溶酶原激活剂（urokinase-type plasminogen activator，uPA）、纤溶酶原激活剂抑制因子-1（plasminogen activator inhibitor type 1，PAI-1）及转化生长因子 β1（transforming growth factor-beta 1，TGF-β1）在宫腔粘连（intrauterine adhesion，IUA）患者子宫内膜中的表达及与宫腔粘连发生的关系。**方法**：选取 2013 年 8 月至 2014 年 4 月于重庆医科大学附属大学城医院 40 例行宫腔粘连术的 IUA 患者的子宫内膜作为实验组（其中轻度粘连 17 例，中度粘连 13 例、重度粘连 10 例），以 45 例非 IUA 患者的子宫内膜作为对照组，采用蛋白免疫印记法和免疫组化法，比较两组子宫内膜组织中 uPA、PAI-1 及 TGF-β1 的表达情况。**结果**：随着粘连程度的加重，实验组子宫内膜中 uPA 的表达逐渐减少（$P<0.05$）；而 PAI-1 及 TGF-β1 的表达则明显高于对照组（$P<0.05$），且重度粘连组中的表达高于轻-中度粘连组（$P<0.05$）。**结论**：宫腔粘连患者子宫内膜组织中 uPA、PAI-1 及 TGF-β1 的变化可能会促进 IUA 的发生、发展，且其改变的幅度与宫腔粘连的程度密切相关。

【关键词】子宫内膜；宫腔粘连；尿激酶型纤溶酶原激活剂；纤溶酶原激活剂抑制因子-1；转化生长因子 β1
【中图分类号】R711.73 【文献标志码】A 【收稿日期】2014-12-25

Expressions of uPA,PAI-1,and TGF-β1 in the endometrium of patients with intrauterine adhesion and their correlation

Sun Congcong, Wang Jia, Ming Xue, Gao Yanghong, Zhang Yingfeng, Chen Huaimei
(*Department of Obstetrics and Gynecology, University-Town Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate and analysis the correlation of the protein expression of urokinase-type plasminogen activator(uPA), plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1), and transforming growth factor-beta 1(TGF-β1) in the endometrium of patients with intrauterine adhesion(IUA). ***Methods***: The protein expression of uPA, PAI-1and TGF-β1 were detected by Western blot and immunohistochemical(IH). ***Results***: The expression of uPA was decreased along with the increasing of the adhesion severity($P<0.005$). On the contrary, the expressions of PAI-1 and TGF-β1 were significantly higher in experimental group than in control group($P<0.005$). ***Conclusion***: The changes of uPA,PAI-1 and TGF-β1 may promote the occurrence and development of IUA, and the changing degree is closely related with the degree of intrauterine adhesion.

【Key words】endometrium; Intrauterine adhesion; urokinase-type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor type 1; transforming growth factor-beta 1

宫腔粘连（intrauterine adhesion，IUA）分为有症状的宫腔粘连和无症状的宫腔粘连，其中有症状的宫腔粘连又名 Asherman 综合征，临床工作中最常见的即为 Asherman 综合征，其是指子宫内膜基底层被任何因素（流产、病菌感染、机械损伤等）损伤后，致使宫腔部分或全部粘连，从而引起宫腔变窄或消失，临床上常表现为不孕不育、月经异常[1-3]。现宫腔粘连的具体发病机制尚不能完全明确，多数学者认为宫腔粘连的形成是由于子宫内膜基底层受损，内膜再生修复困难，在组织修复的过程中产生过多的细胞外基质，成纤维细胞不断增殖，最后形成瘢痕性粘连带[1-4]。本实验主要采用 Western blot 和免疫组化实验方法，研究 IUA 患者子宫内膜中尿激酶型纤溶酶原激活剂（urokinase-type plasminogen activator，uPA），纤溶酶原激活剂抑制因子-1（plasminogen ac-

作者介绍：孙聪聪，Email：346595835@qq.com，
研究方向：妇科内镜及生殖内分泌。
通信作者：王 佳，Email：752203031@qq.com。
基金项目：重庆市医学科研计划资助项目（编号：2012-2-152、20141014）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1618.090.html（2016-05-13）

tivator inhibitor type 1，PAI-1）及转化生长因子-β1（transforming growth factor-beta 1，TGF-β1）蛋白表达的情况，进一步探讨 IUA 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2013 年 8 月至 2014 年 4 月在我院行宫腔镜下宫腔粘连分离术的 40 例患者的子宫内膜组织为实验组（其中轻度粘连 17 例、中度粘连 13 例、重度粘连 10 例），选择在我院行宫腔镜下子宫内膜息肉电切术的 45 例患者的子宫内膜组织为对照组。其中实验组患者的年龄为（23.60 ± 4.61）岁；对照组患者的年龄为（28.67 ± 5.60）岁，2 组年龄差异有统计学意义（t=-5.107，P=0.000）。所有患者的选择均按照夏恩兰等著《宫腔镜学及图谱》中宫腔粘连诊断标准[5]及欧洲妇科内镜协会的分类标准来进行[6]。

1.2 检测方法

1.2.1 Western blot 检测蛋白表达　取适量实验组及对照组患者的子宫内膜组织，用裂解液裂解组织后，在 4 ℃离心机上离心去除沉淀，取上清液加入 96 孔板内用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度，10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转移孔径为 0.45 mm 的 PVDF 膜上，5%的脱脂奶粉在摇床上封闭 1 h，按 1∶1 000 加武汉三鹰公司兔抗人 uPA、PAI-1、TGF-β1 一抗孵育，4 ℃冰箱过夜，用 TBST 在摇床上洗 3 次，1∶5 000 加入辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗，37 ℃恒温箱孵育 1 h，TBST 洗 3 次，用 ECL 荧光检测试剂盒显色，以 GAPDH 作为内参，在 Quantity One 图像分析系统进行吸光度扫描和分析。

1.2.2 免疫组化检测蛋白表达　2 组标本以 10%甲醛固定，石蜡包埋、切片，采用免疫组化 SP 染色。按北京中杉金桥生物技术有限公司试剂盒说明书操作，用 PBS 液替代一抗作阴性对照，在显微镜下观察阳性对照充分显色后立即终止反应，胞质呈棕黄色者即为 uPA、PAI-1、TGF-β1 阳性细胞。采用德国 OLYMPUS 图像采集系统采集图像，运用 Image Pro Plus 图像分析软件（Version 6.0，Media Cybernetics）行图像积分光密度（integrated optical density，IOD）测量分析，每张图片随机选择 10 个高倍镜视野（400×），分别测定阳性 IOD 值，以阳性区平均积分光密度值为测定值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件，所得数据均以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，对照组、轻度粘连组、中度粘连组及重度粘连组组间采用单因素方差分析，若有统计学意义，则使用 Dunnett-t 检验进行组间两两比较。检验水准 α=0.05。

2 结　果

2.1 Western blot 实验结果

实验结果 2 组 Western blot 结果如下（详见图 1 及表1），与对照组相比，各实验组 uPA 蛋白表达均明显降低（P=0.000），且随着粘连程度的加重，实验组 uPA 蛋白表达逐渐降低（P=0.000）；而各实验组 PAI-1、TGF-β1 蛋白表达均较对照组显著增加（P=0.000），二者在重度粘连组的表达明显高于中度粘连组（P 值分别为 0.000、0.004），且在中度粘连组明显的表达高于轻度粘连组（P=0.000），提示 IUA 患者宫腔粘连越重，uPA 的表达越低，而 PAI-1 及 TGF-β1 表达越高。

表 1　不同组中子宫内膜组织 uPA、PAI-1、TGF-β1 蛋白经 Western blot 的相对表达量

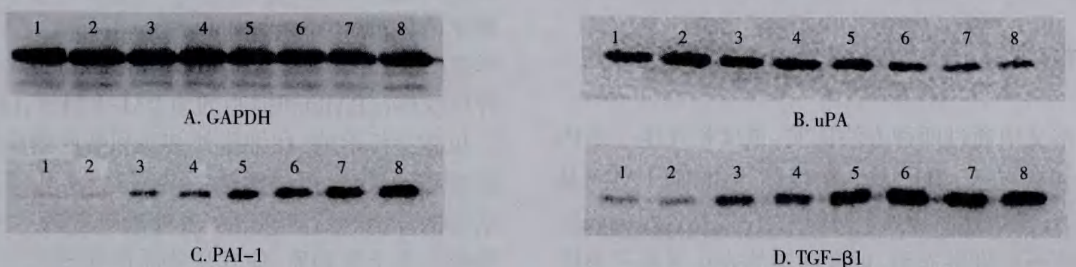
Tab.1　Relative expression of uPA，PAI-1 and TGF-β1 by Western blot

组别	uPA	PAI-1	TGF-β1
对照组	0.500 ± 0.100	0.048 ± 0.015	0.139 ± 0.022
轻度粘连组	0.411 ± 0.017	0.267 ± 0.039	0.393 ± 0.027
中度粘连组	0.320 ± 0.058[a]	0.592 ± 0.040[a]	0.570 ± 0.106[a]
重度粘连组	0.193 ± 0.040[b]	0.933 ± 0.125[b]	0.736 ± 0.087[bb]
F 值	74.138	1 035.070	916.620
P 值	0.000	0.000	0.000

注：a，轻度粘连与中度粘连组比；b：中度粘连组与重度粘连组比；单个符号为 P=0.000，双符号为 P<0.01

2.2 免疫组化结果

免疫组化病理图片见图 2。根据 2 组 uPA、PAI-1、TGF-β1 免疫组化 IOD 值，行统计学分析，得出结果（见表 2）：重度粘连患者子宫内膜 uPA 表达明显低于轻-中度患者（P=0.000），表明 IUA 患者宫腔粘连程度愈重，子宫内膜组织中 uPA 表达愈少；各实验组 PAI-1 蛋白表达较对照组明显增加



1、2：正常组；3、4：轻度粘连；5、6：中度粘连；7、8：重度粘连

图 1　检测不同组中子宫内膜组织 uPA、PAI-1、TGF-β1 蛋白表达量

Fig.1　Expression of uPA，PAI－1 and TGF-β1 by Western blot

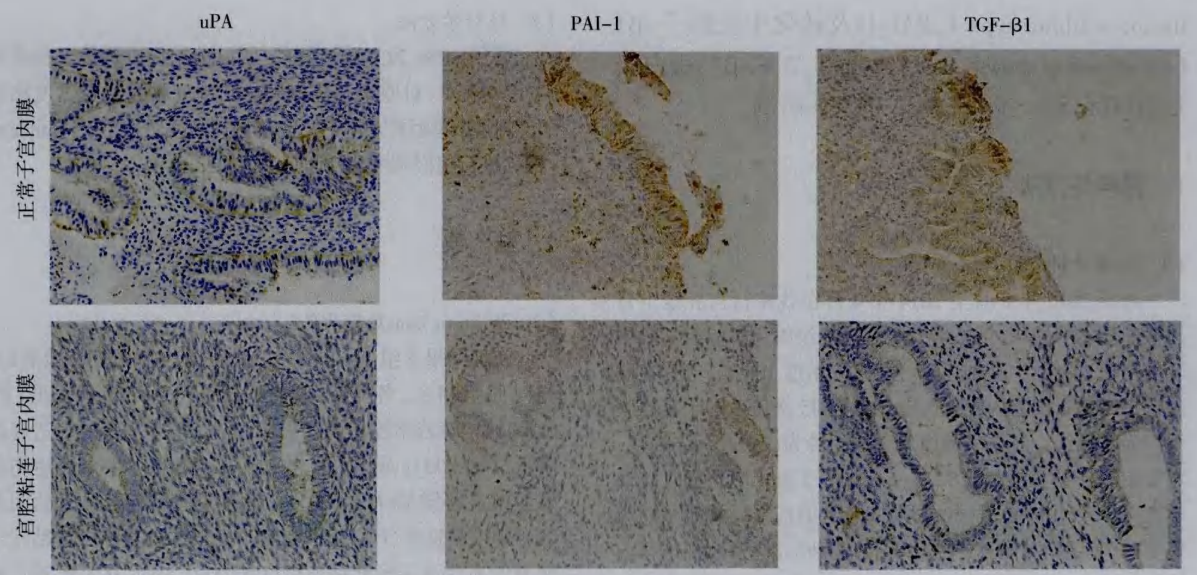


图 2　uPA、PAI-1、TGF-β1 蛋白表达的免疫组化病理图片结果（SP 法，400×）

Fig.2　Pathological results of protein expressions of uPA, PAI - 1 and TGF - β1 (SP 法, 400×)

表 2　不同组中子宫内膜组织 uPA、PAI-1、TGF-β1 经免疫组化染色的相对表达量

Tab.2　Relative expression of uPA, PAI - 1 and TGF - β 1 by immunohistochemistry

组别	uPA	PAI-1	TGF-β1
对照组	33 606.000 ± 9 467.655	29 300.000 ± 8 163.171	24 994.000 ± 6 894.668
轻度粘连组	94 285.333 ± 12 925.138	84 916.333 ± 23 779.905	61 533.667 ± 3 015.243
中度粘连组	73 596.333 ± 17 677.036[a]	103 503.667 ± 29 977.833[aa]	83 330.333 ± 28 105.484[aa]
重度粘连组	42 354.667 ± 7 780.703[b]	127 229.333 ± 17 960.359[bb]	99 552.667 ± 34 712.194[bb]
F 值	172.884	118.686	134.318
P 值	0.000	0.000	0.000

注：a，轻度粘连与中度粘连组比；b：中度粘连组与重度粘连组比；单个符号为 P=0.000，双符号为 $P<0.01$

（P=0.000），中度粘连组的表达高于轻度粘连组，但差异不显著，而重度粘连组的表达明显高于中度粘连组（P=0.013），各实验组 TGF-β1 蛋白表达较对照组显著增加（P=0.000），中度粘连组的表达高于轻度粘连组（P=0.039），而重度粘连组的表达高于中度粘连组不明显。表明 IUA 患者子宫内膜组织中 PAI-1 及 TGF-β1 表达升高，且宫腔粘连程度越重，子宫内膜组织中 PAI-1 及 TGF-β1 表达越高而 uPA 表达越低。

3　讨　论

本文中通过两种方法证实：重度粘连组子宫内膜中 uPA 的表达低于轻-中度粘连组；而 PAI-l 及 TGF-β1 的表达明显高于对照组，中度粘连组的表达明显高于轻度粘连组，重度粘连的表达又高于中度粘连组，提示 IUA 患者病情越重，患者子宫内膜组织中 uPA 的表达降低，而 PAI-1 及 TGF-β1 表达越高。

已有研究显示，IUA 的发病多是由于各种损伤因素引起子宫内膜基底层受损、子宫基层裸露，受损组织在修复过程中结缔组织异常增生，细胞外基质（extracellular matrix，ECM）生成增多而降解减少所致纤维化[1,7]。ECM 的降解是一个十分复杂的过程，其中纤溶酶原激活物/纤溶酶系统是调节 ECM 代谢的关键，纤溶酶原激活物分为 uPA 及组织型纤溶酶原激活剂（tissue plasminogen activator，tPA），均属丝氨酸蛋白酶类[11]，其中 uPA 系统是由 uPA 及其特异性受体（uPAR）和抑制剂即 PAI-1 组成，uPA 系统不仅激活纤溶酶，在细胞外基质和基底膜降解中起重要作用，uPA 可以激活纤溶酶原，使其成为具有活性的纤溶酶后能够溶解多种基质蛋白，同时也能降解基质金属酶原，使其从酶原形式转变为活化形式[9-12]；PAI-1 是纤溶酶原激活物快速、特异的生理性抑制剂，PAI-1 与 uPA 结合可负向调节 uPA 参与的生理病理条件下的组织修复过程[13]。众多研究中

表明纤溶酶可直接降解 ECM 或激活 MMPs 参与 ECM 降解，研究显示，伴有肾脏疾病的患者，病变肾组织中 uPA 表达下调，PAI-1表达上调，最终引起器官纤维化。焦丹等[14]研究中发现在 uPA 及 uPAR 高表达情况下，对细胞外基质的降解明显增强；而在 uPA 基因缺失型小鼠其肝纤维化程度较野生型小鼠肝纤维化程度严重[15]。在子宫内膜组织，我们的研究观察到，在宫腔粘连患者 uPA 的表达升高，但升高程度与宫腔粘连程度成反比，由此提示其对宫腔粘连的形成具有抑制作用，而 PAI-1 的表达则与 uPA 相反，提示其对宫腔粘连的形成具有促进作用。TGF-β 是纤维瘢痕形成的主要内源性生长因子，TGF-β 有 3 个亚型（TGF-β1、TGF-β2 和 TGF-β3），其中以 TGF-β1 活性最强，其持续高浓度和过度表达会促进 ECM 沉积，抑制上皮细胞生长，可能是纤维瘢痕形成的主要原因[16-17]；其中有研究已证实重度 IUA 患者子宫内膜腺上皮细胞中TGF-β1 的表达明显增高，认为 TGF-β1 的过度表达可能导致IUA 的形成[18]。本实验研究也观察到：TGF-β1 在 IUA 患者子宫内膜组织中表达强度较对照组高（P=0.000），且粘连程度越重其表达越高，由此提示，随着 TGF-β1 的表达增高，细胞外基质的降解越少，粘连越重。毕凌云等[19]研究中发现，TGF-β1mRNA 和蛋白表达量分别与 PAI-1mRNA 和蛋白表达量呈正相关，PAI-1 表达增加迟于 TGF-β1，说明 TGF-β1 可能对 PAI-1 的表达有调控作用。故而我们推测，由于 PAl-l、TGF-β1 的过度表达使细胞外基质的生成增多，同时抑制上皮细胞生长，uPA的低表达使细胞外基质的降解减少，打破了细胞外基质合成与降解平衡，使细胞外基质在受损后的子宫内膜中呈进行性聚集，抑制正常内膜生长，最终导致粘连发生。

综上所述，子宫内膜组织中 uPA 表达的降低和 PAI-1、TGF-β1 的表达升高可能在 IUA 的发病中起重要作用，纤溶失衡可能是发展过程中的重要环节。在以后的研究中将建立 IUA 的动物模型，通过抑制或阻断 uPA、PAl-l、TGF-β1 的相关作用以阐明三者在宫腔粘连形成中的作用。

参 考 文 献

[1] Yu D, Wong YM, Cheong Y, et al. Asherman syndrome--one century later[J]. Fertil Steril, 2008, 89(4): 759-779.

[2] Deans R, Abbott J. Review of intrauterine adhesions[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2010, 17(5): 555-569.

[3] Lin XN, Zhou F, Wei ML, et al. Randomized, controlled trial comparing the efficacy of intrauterine balloon and intrauterine contraceptive device in the prevention of adhesion reformation after hysteroscopic adhesiolysis[J]. Fertil Steril, 2015, 104(1): 235-240.

[4] Berman JM. Intrauterine adhesions[J]. Semin Reprod Med, 2008, 26(4): 349-355.

[5] 夏恩兰. 宫腔镜学及图谱[M]. 2 版. 郑州：河南科学技术出版社，2009：169.

[6] Malhotra N, Bahadur A, Kalaivani M, et al. Changes in endometrial receptivity in women with Asherman's syndrome undergoing hysteroscopic adhesiolysis[J]. Arch Gynecol Obstet, 2012, 286(2): 525-530.

[7] Tao Z, Duan H. Expression of adhesion-related cytokines in the uterine fluid after transcervical resection of adhesion[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2012, 47(10): 734-737.

[8] 沈倩雯，金冶宁. UPA 系统在肿瘤患者中的检测意义及研究进展[J]. 现代肿瘤医学，2008，16(12)：2207-2209.

[9] Rabbani SA, Mazar AP. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2001, 10(2): 393-415, x.

[10] Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, et al. Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(s): D26-D32.

[11] Kim TH, Mars WM, Stolz DB, et al. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat[J]. Hepatology, 1997, 26(4): 896-904.

[12] Ling C, Zou T, Hsiao Y, et al. Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 349(3): 906-912.

[13] Tashiro Y, Nishida C, Sato-kusubata K, et al. Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice[J]. Blood, 2012, 119(26): 6382-6393.

[14] 焦 丹，甘雨良，张 莉，等. uPA、uPAR 和 nm23-H1 在子宫内膜癌和子宫内膜病变中的表达及研究[J]. 中国妇幼保健，2011，26(19)：3003-3005.

[15] 王晓东，张 燕，王玉柱，等. uPA 基因缺失型小鼠与野生型小鼠肝纤维化模型的比较研究[J]. 实验动物与比较医学，2011，31(4)：231-235.

[16] Marques FZ, Pringle KG, Conquest A, et al. Molecular characterization of renin-angiotensin system components in human intrauterine tissues and fetal membranes from vaginal delivery and cesarean section [J]. Placenta, 2011, 32(3): 214-221.

[17] Pardali E, Ten DP. TGFbeta signaling and cardiovascular diseases [J]. Int J Biol Sci, 2012, 8(2): 195-213.

[18] 刘琳琳，刘玉环，蒋东桥，等. CTGF 和 TGF-β_1 的表达与宫腔粘连形成的相关性[J]. 山东医药，2012(12)：17-19.

[19] 毕凌云，易著文. 肾小管间质纤维化大鼠肾脏转化生长因子-β1 和纤溶酶原激活物抑制剂-1 的定量分析[J]. 实用儿科临床杂志，2008，23(8)：609-612.

（责任编辑：冉明会）