

Toll 样受体 2 在子宫内膜异位症病人异位和正常内膜组织中的表达及意义

顾烨

(昆山市中医医院妇科,江苏 昆山 215300)

摘要:目的 探讨 Toll 样受体 2 (TLR2) 在子宫内膜异位症 (EMs) 病人异位和正常内膜组织中的表达和意义。**方法** 选取 2014 年 2 月—2016 年 2 月在昆山市中医医院妇科经病理证实为子宫内膜异位症病人的异位内膜 39 例 (EMs 异位内膜组) 以及在位内膜 32 例 (EMs 在位内膜组),再选取 30 例未患有子宫内膜异位的女性在位内膜组织 30 例 (正常对照组)。采用 RT-PCR 法检测 TLR2 在 EMs 异位内膜、EMs 在位内膜以及正常内膜组织中 mRNA 的表达情况。采用 Western blot 法检测 TLR2 在各组中蛋白的表达情况。**结果** EMs 异位内膜组、EMs 在位内膜组、正常对照组中 TLR2 mRNA 和蛋白表达有显著性差异 ($P < 0.05$),EMs 异位内膜组和 EMs 在位内膜组 TLR2 mRNA 和蛋白表达显著高于正常对照组,EMs 异位内膜组中的 TLR2 mRNA 和蛋白表达显著高于 EMs 在位内膜组。**结论** TLR2 mRNA 和蛋白的高表达,说明 TLR2 在 EMs 的发病和发展过程中可能起着重要作用。

关键词:Toll 样受体 2;子宫内膜异位症

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.08.028

Expression and significance of TLR2 in ectopic and normal endometrium from patients with endometriosis

GU Ye

(Department of Gynecology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Kunshan, Jiangsu 215300, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and significance of TLR2 in ectopic and normal endometrium from patients with endometriosis. **Methods** A total of 39 cases of ectopic endometrium (EMs ectopic endometrium group) and 32 cases of endometrium (EMs eutopic endometrium group) from endometriosis patients confirmed by pathology in traditional chinese medicine hospital of kunshan between February 2014 and February 2016, and 30 cases of endometrial tissue without endometriosis (normal control group) were selected. The mRNA expression of TLR2 in ectopic endometrium, eutopic endometrium and normal endometrium was detected by RT-PCR. Western blot was used to detect the expression of TLR2 protein in each group. **Results** There was significant difference in the mRNA and protein expression of TLR2 between EMs ectopic endometrium group, EMs eutopic endometrium group and normal control group ($P < 0.05$). The expression of mRNA and protein in EMs ectopic and eutopic endometrium group was significantly higher than that in normal control group, and the expression in EMs ectopic endometrium group was significantly higher than the eutopic endometrium group. **Conclusion** The high expression of TLR2 indicates that TLR2 may play an important role in the pathogenesis and development of endometriosis.

Key words: Toll-like receptor 2; Endometriosis

子宫内膜异位症 (EMs) 是指具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔及肌层以外的其他部位的异质性疾病^[1]。EMs 的临床症状主要表现为痛经、不孕以及月经量异常等^[2]。组织学为良性,但却有增生、浸润、转移等恶性特点^[3],是育龄妇女的常见病,发病率为 5% ~ 15%,在不孕症病人中发病率为 40% ~ 50%^[4]。目前 EMs 发病机制尚未完全阐明,普遍认为是多机制、多因素共同作用所致的疾病^[5]。近几年 EMs 的发病与免疫功能的改变越来越受到关注,而 Toll 样受体 (TLR) 就是一类固

有免疫受体,被证实其免疫调节失衡与多种疾病的发病有关^[6]。目前在人类细胞中已发现 11 个家族成员 (TLR1 ~ TLR11)^[7]。TLR2 是家族中 TLRs 最具有代表性受体之一,且主要表达于上生殖道,如子宫内膜和输卵管^[8]。有文献报道,EMs 能对 TLRs 的配体刺激发生反应,促进白细胞介素-8 (IL-8) 分泌。IL-8 在异位子宫内膜的生长中发挥重要作用^[9]。本文通过研究 TLR2 在 EMs 病人异位和在位内膜组织中的表达,以探讨 TLR2 在 EMs 中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年2月—2016年2月在昆山市中医医院妇科行开腹手术或腹腔镜手术并经病理证实为EMs病人39例,年龄(32.7 ± 7.2)岁,取异位内膜39例为EMs异位内膜组,并选取EMs病人的在位内膜32例为EMs在位内膜组。另选取同时期由于纵隔子宫畸形,行宫腔镜手术的病人30例,年龄(35.2 ± 6.4)岁,取其正常子宫内膜为正常对照组。各组病人在年龄、月经周期、体质量方面均差异无统计学意义($P > 0.05$)。以上所有病人均经昆山市中医医院医学伦理委员会同意,病人均签署知情同意书,术前6个月未服用激素类药物,手术前月经规律,且排除可疑恶性肿瘤、子宫腺肌症、子宫肌瘤及急性感染病人。

1.2 主要试剂及仪器 主要试剂:Trizol A + 总RNA提取试剂、RT试剂盒、PCR试剂盒、Maker均购于天根生化科技有限公司。羊抗兔二抗、兔抗GAPDH内参抗体由苏州百奇生物公司提供。兔抗TLR2抗体由武汉博士德生物公司提供。其它试剂均为国产分析纯。主要仪器:PCR仪(德国Hamburg公司),Mini-Protein3电泳槽(Bio-Rad公司),Trans-Blot转印系统(Bio-Rad公司),电泳仪(Bio-Rad公司)。引物序列详见表1。

表1 TLR2及GAPDH的引物

引物名称	序列	产物长度/bp
TLR2	上游引物 5'-GCCTCTCCAAGGAAGAATCC-3'	144
	下游引物 5'-TCCTGTTGTTGACAGGTCA-3'	
GAPDH	上游引物 5'-CATTGACCTCAACTACATG-3'	146
	下游引物 5'-TCTCCATGGTGAAGAC-3'	

1.3 试验方法

1.3.1 RT-PCR法检测TLR2的mRNA的表达 取适量组织,根据Trizol法进行总RNA提取,利用分光光度计对RNA并进行质量鉴定,所需RNA纯度OD260/OD280需在1.8~2.1之间。按RT-PCR试剂盒说明书步骤进行反转录,得到的cDNA。建立PCR反应体系,变性95℃预变性30s,55℃退火30s,72℃延伸60s,10℃冷却5min,共计循环35次。将PCR产物进行电泳,电泳后使用图像分析系统进行分析处理。以GAPDH为内参,检测TLR2 mRNA的表达量。

1.3.2 Western blot法检测TLR2蛋白表达情况 取出内膜组织使用4℃预冷PBS液进行冲洗。进行组织研磨,各管均加入100 μL Western细胞裂解

液,裂解30 min。 $12\ 000\ r \cdot \min^{-1}$,4℃离心10 min,收集上清。Bradford法测定各管蛋白含量。取适量蛋白,加入缓冲液,100℃加热3~5 min。将其放入电泳槽中,进行电泳。预染maker显示的分子量范围切下分离胶,浸入转膜缓冲液中待转膜用。采用蛋白转移(全湿法)进行转膜,将膜浸入加一抗稀释液,4℃过夜。回收一抗,用TBST缓冲液漂洗,3~5次,每次5 min。向膜的正面滴加二抗稀释液,室温2 h。取出滤膜,TBST溶液漂洗3~5次,每次5 min。将洗好的PVDF膜转移带暗盒的透明薄膜上。条带灰度值用凝胶成像系统扫描后,采用IPP6.0进行灰度分析。

1.4 统计学方法 使用SPSS17.0软件数据进行统计学分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,三组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

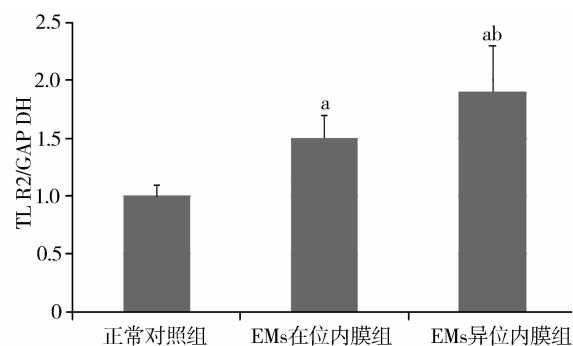
2.1 三组间TLR2 mRNA的表达比较 扩增产物琼脂糖电泳图显示,RT-PCR得到长度分别为144和146 bp的产物,扩增产物均为单一条带,扩增产物大小与TLR2和GAPDH引物设计扩增的片段大小一致,清晰无杂带。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对比三组间TLR2 mRNA的表达情况。EMs异位内膜组、EMs在位内膜组及正常对照组中TLR2 mRNA表达有显著差异。组间两两比较显示,EMs异位内膜组TLR2 mRNA表现为高表达,显著高于EMs在位内膜组及正常对照组($P < 0.05$)。EMs在位内膜组的TLR2 mRNA表达高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 TLR2 mRNA在不同组子宫内膜的表达

组别	例数	TLR2 mRNA
正常对照组	30	1
EMs在位内膜组	32	1.65 ± 0.03^a
EMs异位内膜组	39	2.87 ± 0.06^{ab}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与EMs在位内膜组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.2 三组间TLR2蛋白的表达比较 EMs异位内膜组、EMs在位内膜组及正常对照组中TLR2蛋白表达有显著差异。EMs异位内膜组、EMs在位内膜组中的TLR2蛋白呈高表达,均显著高于正常对照组。EMs异位内膜组的TLR2蛋白表达显著高于EMs在位内膜组(图1)。



注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与EMs在位内膜组比较,^b $P < 0.05$ 。

图1 三组子宫内膜的TLR2蛋白表达情况

3 讨论

EMs与女性不孕、不育密切相关,特别是近年来其发病率逐年上升,严重影响病人的生殖健康和生活质量^[10]。EMs的发病机制仍不明确,目前普遍被接受的是经血逆流学说^[11],但大量研究证实,免疫器官、子宫内膜及异位内膜细胞释放免疫、炎症因子在异位内膜的种植、生长及侵袭中起着很重要的作用^[12]。

TLRs是近年来固有免疫研究的一个重大进展,存在于子宫内膜组织中,维系着促炎和抗炎之间的微妙平衡,与固有免疫和适应性免疫存在密切的联系。TLRs表达与子宫内膜免疫密切相关,及其信号通路的接头分子异常表达参与子宫内膜炎性病变。有报道证实,患衣原体肺炎小鼠的存活依赖TLR2的激活,如将小鼠TLR2基因敲除,其细胞因子和趋化因子分泌受损,中性粒细胞随之减少,病死率大大升高^[13]。此现象进一步说明了TLR2与免疫和炎症的密切关系。主要是通过TLR2激活巨噬细胞的信号途径,终止炎症反应,最终最大程度清除病原体 and 避免机体组织损害^[14]。有研究认为EMs是一种炎症相关性疾病,腹腔局部微环境炎症与EMs的发病与发展密切相关^[15]。

本实验采用RT-PCR和Western blot技术,从mRNA和蛋白水平比较了TLR2在EMs病人异位内膜、EMs病人在位内膜和非EMs病人正常内膜组织的表达。实验证明,TLR2在EMs病人异位内膜组织和在位内膜组织中均呈现高表达,在正常对照组中呈低表达,且异位内膜组织表达高于在位内膜组织。有报道^[16]指出,当子宫内膜组织TLRs的配体刺激发生反应,会促进IL-8分泌。IL-8作为白细胞的趋化细胞因子,在EMs的发病过程中起着重要的作用。本研究初步证实了TLR2的表达与EMs之间的关系,但TLR2与EMs发病机制的内在关系还需

要通过后续实验进行进一步的研究。

参考文献

- [1] DE ZIEGLER D, BORGHESE B, CHAPRON C. Endometriosis and infertility: pathophysiology and management [J]. Lancet, 2010, 376 (9742): 730-738.
- [2] GARAI J, MOLNAR V, VARGA T, et al. Endometriosis: harmful survival of an ectopic tissue [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2006, 11: 595-619.
- [3] ULUKUS M, ULUKUS EC, TAVMERGEN GOKER EN, et al. Expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein 1 in women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2009, 91 (3): 687-693.
- [4] BULUN SE. Endometriosis [J]. N Engl J Med, 2009, 360 (3): 268-279.
- [5] 章君华. Toll样受体与子宫内膜及子宫内膜异位症 [J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38 (4): 267-270.
- [6] 杨春丽, 李洁, 申爱荣. TLR4和AP-1在子宫内膜异位症患者位内膜及异位内膜中的表达及意义 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30 (33): 5892-5894.
- [7] MIGGIN SM, O'NEILL LA. New insights into the regulation of TLR signaling [J]. J Leukoc Biol, 2006, 80 (2): 220-226.
- [8] WANG X, ATHAYDE N, TRUDINGER B. Placental vascular disease and toll-like receptor 4 gene expression [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192 (3): 961-966.
- [9] ABOUSSAHOUD W, AFLATOONIAN R, BRUCE C, et al. Expression and function of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cell lines [J]. J Reprod Immunol, 2010, 84 (1): 41-51.
- [10] 章君华, 徐键. 子宫内膜异位症患者在位和异位内膜组织中TLR4的表达及意义 [J]. 浙江医学, 2011, 33 (12): 1760-1762, 1765.
- [11] BULLETTI C, DEZIEGLER D, STEFANETTI M, et al. Endometriosis: absence of recurrence in patients after endometrial ablation [J]. Hum Reprod, 2001, 16 (12): 2676-2679.
- [12] BONDZA PK, MAHEUX R, AKOUM A. Insights into endometriosis-associated endometrial dysfunctions: a review [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2009, 1: 415-428.
- [13] RODRIGUEZ N, WANTIA N, FEND F, et al. Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with Chlamydia pneumoniae [J]. Eur J Immunol, 2006, 36 (5): 1145-1155.
- [14] NETEA MG, VAN DER MEER JW, KULLBERG BJ. Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense [J]. Trends Microbiol, 2004, 12 (11): 484-488.
- [15] CAKMAK H, GUZELOGLU-KAYISLI O, KAYISLI UA, et al. Immune-endocrine interactions in endometriosis [J]. Front Biosci (Elite Ed), 2009, 1: 429-443.
- [16] AFLATOONIAN R, TUCKERMAN E, ELLIOTT SL, et al. Menstrual cycle-dependent changes of Toll-like receptors in endometrium [J]. Hum Reprod, 2007, 22 (2): 586-593.

(收稿日期: 2016-07-13, 修回日期: 2016-09-08)