

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.029

◇临床医学◇

自噬相关蛋白 LC3 和 E-钙黏蛋白、波形蛋白 在子宫内膜异位症中的表达

代小燕, 邸石, 靖芳

作者单位: 武汉市第三医院妇产科, 湖北 武汉 430061

通信作者: 邸石, 男, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为妇科肿瘤, E-mail: ds1962@sina.com

基金项目: 武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WX18D22)

摘要:目的 研究自噬相关蛋白(LC3)和E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)在子宫内膜异位症病人中的表达情况,探讨其与子宫内膜异位症发生发展的相关性。方法 选取2018年1—11月在武汉市第三医院行全子宫切除术的子宫内膜异位症41例,留取41例病人的异位子宫内膜(异位内膜组)及在位子宫内膜(在位内膜组),另外留取同期的38例因子宫肌瘤行全子宫或次全子宫切除术病人的正常子宫内膜(正常内膜组),采用免疫组化SP法检测留取标本中LC3、E-cadherin、Vimentin表达。结果 异位内膜组中LC3的阳性表达率(78.049%)明显高于正常内膜组(21.053%)和在位内膜组(31.707%)($P < 0.05$),LC3的阳性表达率在正常内膜组和在位内膜组中差异无统计学意义($P > 0.05$),异位内膜组和在位内膜组中E-cadherin阳性表达率(19.512%、39.024%)均低于正常内膜组(73.684%)($P < 0.05$);异位内膜组和在位内膜组中Vimentin阳性表达率(73.171%、53.659%)均高于正常内膜组(18.421%)($P < 0.05$)。异位内膜组LC3与E-cadherin、Vimentin表达有相关性($P < 0.05$);在位内膜组LC3与E-cadherin、Vimentin表达无相关性($P > 0.05$);E-cadherin与Vimentin在异位内膜组和在位内膜组中表达呈负相关($P < 0.05$);正常子宫内膜中三者无相关性($P > 0.05$)。结论 在异位子宫内膜组织中,自噬表达水平上调伴有EMT现象的发生,推测自噬可能参与EMT发生,导致异位病灶的形成发展。

关键词:子宫内膜异位症; 自噬相关蛋白LC3; E-钙黏蛋白; 波形蛋白

Expression and correlation of autophagy-related proteins LC3, E-cadherin and vimentin in endometriosis

DAI Xiaoyan, DI Shi, JING Fang

Author Affiliation: Department of Obstetrics and Gynecology, Wuhan Third Hospital, Wuhan, Hubei 430061, China

Abstract: Objective To study the expression of LC3 and E-cadherin and Vimentin in patients with endometriosis, and to explore their correlation with the occurrence and development of endometriosis. **Methods** The expression of LC3, E-cadherin and Vimentin in 41 patients with ovarian endometriosis who underwent total hysterectomy and 38 patients with factor uterine leiomyoma who underwent total or subtotal hysterectomy were detected by immunohistochemical SP method. **Results** The positive expression rate of LC3 in ectopic endometrium group (78.049%) was significantly higher than that in normal endometrium group (21.053%) and eutopic endometrium group (31.707%) ($P < 0.05$). There was no significant difference in the positive expression rate of LC3 between normal endometrium group and eutopic endometrium group ($P > 0.05$). The positive expression rate of E-cadherin in ectopic endometrium group and eutopic endometrium group was lower than that in control group (19.512%, 39.024% vs. 73.684%) ($P < 0.05$). It was higher than that of the control group ($P < 0.05$). The correlation between LC3 expression and E-cadherin and Vimentin expression in ectopic endometrium group was statistically significant ($P < 0.05$); There was no significant correlation between the expression of LC3 and E-cadherin and Vimentin in the eutopic endometrium group ($P > 0.05$). The expression of E-cadherin and Vimentin was negatively correlated in the ectopic endometrium group and the eutopic endometrium group ($P < 0.05$); There was no significant correlation between the three in normal endometrium ($P > 0.05$). **Conclusion** In ectopic endometrium, the up-regulation of autophagy expression is associated with the occurrence of EMT. It is speculated that autophagy may be involved in the occurrence of EMT and lead to the formation and development of ectopic lesions.

Key words: Endometriosis; Autophagy-related protein LC3; E-cadherin; Vimentin

子宫内膜异位症(内异症)是不孕症和慢性盆腔疼痛的常见原因,其特征是子宫内膜腺体和间质

的子宫腔外生长,近年来发病率呈明显上升趋势。内异症虽是良性疾病,但具有类似恶性肿瘤广泛种

植及侵袭生长能力的生物学行为。黏附-侵袭-血管生成是子宫内膜异位症异位种植发生病变的基本病理生理过程^[1]。已有研究表明,自噬广泛参与肿瘤的侵袭转移过程,并对上皮间质转化(EMT)的发生进行调控^[2]。本研究旨在探讨自噬相关蛋白LC3以及和EMT相关的E-钙黏附蛋白(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin)在子宫内膜异位症病人异位及在子宫内膜组织中的表达情况,探讨其与子宫内膜异位症发生、发展的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2018年1—11月在武汉市第三医院妇科行腹腔镜或开腹手术治疗的41例卵巢子宫内膜异位症合并有子宫腺肌病,因病变广泛、痛经症状进行性重,保守治疗无效且无生育要求而行全子宫切除术病人,术中留取在位子宫内膜及异位子宫内膜,分为在位内膜组和异位内膜组,平均年龄(39 ± 3.5)岁;选取同期38例因子宫肌瘤行全子宫切除术病人为对照组,术中留取正常子宫内膜,为正常内膜组,平均年龄(41 ± 2.3)岁。各组病人在年龄上差异无统计学意义($P > 0.05$)。选取病人均有规律的月经周期,术前至少6个月未服用任何激素类药物,无其他内分泌及内外科合并症。在增殖期收集子宫内膜标本,临床诊断均以术后病理结果为准。该实验在标本采集前均告知并签署知情同意书,本研究的伦理批准来自湖北省武汉市第三医院伦理委员会(武三医伦KY2018-013)。

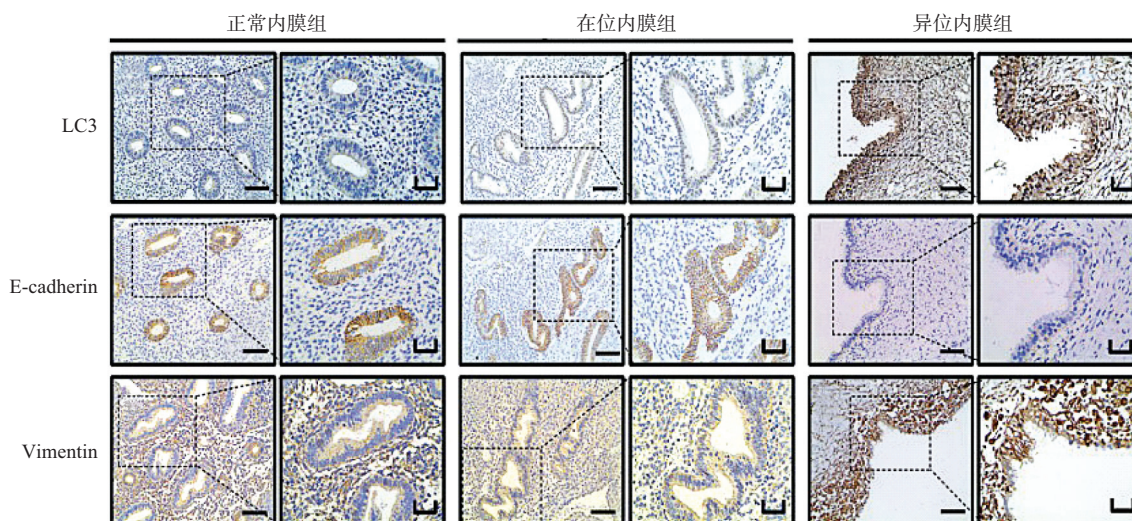
1.2 子宫内膜组织中LC3B、E-cadherin和Vimentin表达检测 将新鲜手术标本在10%甲醛中固定24 h,然后包埋在石蜡块中。将甲醛固定和石蜡包埋的子宫内膜组织切成5 μm ,并安装在经乙醇清洁

的载玻片上。经过脱蜡、脱苯、水化后采用SP法检测LC3、E-cadherin和Vimentin表达,SP免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司,步骤参照试剂盒说明书。每张切片随机取20个高倍镜($\times 200$)视野,每个视野计数100个细胞,统计阳性细胞数,无细胞着色为(-),阳性细胞数百分比 $< 25\%$ (+), $26\% \sim 50\%$ (++), $51\% \sim 75\%$ (+++), $> 76\%$ (++++),+~++++均记为阳性表达,计算阳性表达率。分析子宫内膜组织中LC3、E-cadherin和Vimentin表达的相关性。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件。计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验。相关性分析采用Spearman秩相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

运用免疫组织化学染色检测LC3、E-cadherin和Vimentin的表达,代表性的染色实例见图1。LC3定位在腺上皮细胞和基质细胞的细胞质内;E-cadherin定位于两种细胞的细胞膜和细胞质;Vimentin定位于基质细胞的细胞质。异位子宫内膜组中LC3的阳性表达率显著高于正常子宫内膜组和在位子宫内膜组($P < 0.05$),LC3的阳性表达率在正常子宫内膜组和异位子宫内膜组中差异无统计学意义($P > 0.05$);异位子宫内膜组和在位子宫内膜组中E-cadherin阳性表达率均低于正常内膜组($P < 0.05$);异位子宫内膜组和在位子宫内膜组中Vimentin阳性表达率均高于正常内膜组($P < 0.05$)。异位内膜组中自噬相关蛋白LC3与E-cadherin表达呈负相关($r = -0.627$, $P < 0.05$),LC3和Vimentin($r = 0.537$, $P < 0.05$)表达呈正相关,E-cadherin与Vimentin($r =$



注:LC3、E-cadherin和Vimentin定位于子宫肌瘤的正常子宫内膜、子宫内膜异位症(在位子宫内膜及异位子宫内膜)的代表性免疫组化,照片分别以200倍(左图)和400倍(右图)的放大率拍摄

图1 子宫内膜异位症41例和子宫肌瘤38例代表性的染色实例(免疫组织化学染色)

-0.615, $P < 0.05$) 表达呈负相关。各组 LC3、E-cadherin 和 Vimentin 阳性表达率比较见表 1。

表 1 子宫内异症 41 例和子宫肌瘤 38 例各组 LC3B、E-cadherin 和 Vimentin 表达比较/例(%)

组别	例数	LC3	E-cadherin	Vimentin
正常内膜组	38	8(21.053)	28(73.684)	7(18.421)
在位内膜组	41	13(31.707)	16(39.024)*P2	22(53.659)*P4
异位内膜组	41	32(78.049)*P1	8(19.512)*P3	30(73.171)*P5

注:与正常内膜组比较,* $P < 0.05$ ($P_1 = 0.027$, $P_2 = 0.038$, $P_3 = 0.044$, $P_4 = 0.032$, $P_5 = 0.026$)

3 讨论

子宫内异症是育龄女性的常见病及难治病,严重影响女性健康和生活质量。Sampson 的经血逆流学说是内异症经典理论,但不能解释 90% 的经血逆流发生率,而只有 10%~15% 女性发生内异症的现象。子宫腔外子宫内膜组织的迁移,侵袭和血管生成是子宫内膜异位症进展的关键步骤^[3]。子宫内膜异位症是一种多因素疾病,其发病机制一直是妇科基础与临床研究的热点,迄今为止,内异症发病机制仍不明确。

自噬是一种高度保守的细胞行为,是细胞应对营养缺乏、缺氧、感染等恶劣环境因素的生存机制之一,其可通过降解胞质内受损细胞器,产生氨基酸与游离脂肪酸以供蛋白质和能量的合成,其通过维持肿瘤细胞在代谢应激环境下存活来促进转移进程^[4]。已有研究表明,自噬广泛参与肿瘤的侵袭转移过程,并对 EMT 的发生进行调控^[5]。自噬能够激活 EMT 促进肝癌细胞的侵袭:TGF- β 1 作为 EMT 发生最重要的诱导因子,能够激活自噬;而自噬激活可使肝癌细胞的 TGF- β 1 表达水平显著上升,进一步使肝癌发生 EMT 与获得侵袭转移表型,从而形成正反馈的循环效应^[6]。已知 LC3(酵母 Atg8 的哺乳动物同源物)存在于自噬体上,并且 LC3 I-II 的转化是监测该过程的广泛使用的标志物^[7],因此 LC3 的表达强度与自噬活性密切相关。近年来,科学家们发现自噬与子宫内膜异位症的发生、发展存在密切联系,有研究表明,自噬在卵巢子宫内膜异位症中被上调,并且可能有助于子宫内膜异位细胞的存活和异位部位的病变维持^[8]。然而,关于子宫内膜异位症中自噬的表达水平存在争议性结果,Choi 及其同事报道,异位内膜中的自噬水平降低,同时 p70S6K 磷酸化的激活(mTOR 激活的特征)^[9]。

EMT 是指在某些特殊的生理或病理条件下,上皮细胞在形态学上发生向间质细胞表型的转变并

获得迁移能力的过程^[10]。上皮细胞标志物如 E-Cadherin 表达下调或缺失是 EMT 的最重要的标志性变化,也是上皮肿瘤细胞侵袭的前提条件^[11]。间质表型标志物 Vimentin 是间质细胞中最主要的中间纤维,其表达升高是导致 E-Cadherin 表达缺失的原因之一,同时会干扰 E-Cadherin 介导的细胞黏附作用。基于 EMT 的发生发展与内异症异位种植和转移的生物学特征相契合,近年来 EMT 与内异症发病的关系引起学者们的广泛关注^[12]。EMT 失衡可能是导致子宫内膜异位性疾病发生的机制之一,有研究证实在异位内膜中 EMT 的发生在促进内异症异位子宫内膜细胞的侵袭和转移中扮演重要角色^[13]。

本研究通过免疫组化 SP 法检测 LC3 和 EMT 相关蛋白 E-cadherin、Vimentin 在正常子宫内膜、在位子宫内膜及异位子宫内膜中的表达情况,并做相关性分析。本研究结果显示,以正常子宫内膜作为对照,子宫内膜异位症病人异位子宫内膜组中 LC3 的阳性表达率显著高于正常子宫内膜组和子宫内膜异位症病人在位子宫内膜组($P < 0.05$),且异位内膜组中 E-cadherin 表达阳性率明显低于正常子宫内膜中 E-cadherin 表达阳性率($P < 0.05$),异位内膜上皮细胞中 Vimentin 的表达阳性率明显高于正常内膜上皮细胞中 Vimentin 的表达阳性率($P < 0.05$),在异位内膜组中,三者表达具有相关性。总之,在异位子宫内膜组织中,自噬表达水平上调伴有 EMT 现象的发生。我们推测,自噬表达上调可能促进异位子宫内膜组织上皮细胞 EMT 的形成,从而促进异位子宫内膜的黏附、侵袭和转移,最终导致异位病灶的发生、发展,抑制自噬可能作为预防和治疗子宫内膜异位症的新靶点,但其确切的机制有待深入探讨。

参考文献

- [1] ZHANG JJ, XU ZM, ZHANG CM, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits nuclear factor- κ B pathway activation, and regulates adhesion, migration, invasion and apoptosis of endometriotic stromal cells [J]. Molecular Human Reproduction, 2011, 17(3): 175-181.
- [2] GUGNONI M, SANCISI V, MANZOTTI G, et al. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer [J]. Cell Death & Disease, 2016, 7(12): e2520. DOI: 10.1038/cd-dis.2016.415.
- [3] MOGGIO A, PITTATORE G, CASSONI P, et al. Sorafenib inhibits growth, migration, and angiogenic potential of ectopic endometrial mesenchymal stem cells derived from patients with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2012, 98(6): 1521-1530. e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.003.
- [4] PYO JO, YOO SM, JUNG YK. The interplay between autophagy

- and aging[J].Diabetes Metab J, 2013, 37(5):333-339.
- [5] GUGNONI M, SANCISI V, MANZOTTI G, et al. Autophagy and epithelial-mesenchymal transition: an intricate interplay in cancer [J].Cell Death & Disease, 2016, 7(12):e2520. DOI: 10.1038/cd-dis.2016.415.
- [6] LI J, YANG B, ZHOU Q, et al. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial-mesenchymal transition [J].Carcinogenesis, 2013, 34(6):1343-1351.
- [7] MIRACCOC, CEVENINI G, FRANCHI A, et al. Beclin 1 and LC3 autophagy gene expression in cutaneous melanocytic lesions [J]. Hum Pathol, 2010, 41(4):503-512.
- [8] ALLAVENA G, CARRARELLI P, DEL BELLO B, et al. Autophagy is upregulated in ovarian endometriosis: a possible interplay with p53 and heme oxygenase-1 [J].Fertil Steril, 2015, 103(5):1244-1251.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.007.
- [9] CHOI J, JO M, LEE E, et al. Differential induction of autophagy by mTOR is associated with abnormal apoptosis in ovarian endometriotic cysts [J].Mol Hum Reprod, 2014, 20(4):309-317.
- [10] PASQUIER J, ABU-KAoud N, AL THANI H, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition in a Clinical Perspective [J]. J Oncol. 2015;2015:792182. DOI:10.1155/2015/792182.
- [11] NAKAGAWA H, HIKIBA Y, HIRATA Y, et al. Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis [J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(3):1090-1095.
- [12] ZHANG Q, DUAN J, LIU X, et al. Platelets drive smooth muscle metaplasia and fibrogenesis in endometriosis through epithelial-mesenchymal transition and fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation [J].Reprod Biomed Online, 2017, 34(2):124-136.
- [13] ZHANG L, XIONG W, XIONG Y, et al. Intracellular Wnt/Beta-Catenin Signaling Underlying 17beta-Estradiol-Induced Matrix Metalloproteinase 9 Expression in Human Endometriosis [J].Biology of Reproduction, 2016, 94(3):70.

(收稿日期:2019-02-28,修回日期:2019-04-05)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.09.030

◇临床医学◇

早期肺康复训练在慢性阻塞性肺疾病急性加重期应用无创机械通气下快速康复护理中的应用

芮祖琴

作者单位:安徽省皖南康复医院、芜湖市第五人民医院重症医学科,安徽 芜湖 241005

摘要:目的 探讨早期肺康复训练在慢性阻塞性肺疾病(COPD)病人急性加重期应用无创正压通气下快速康复护理中的应用效果及护理方法。**方法** 选取2016年2月至2017年12月芜湖市第五人民医院收治入院的COPD急性加重期应用无创机械通气(NPPV)病人60例,采用随机数字表法分为观察组(早期肺康复训练组)30例和对照组(常规护理组)30例,分别统计两组肺功能指标改善情况、NPPV时间、氧合指数测定、COPD病人自我评估测试(CAT)评分和病人焦虑、抑郁评分变化。**结果** 观察组肺功能指标[肺活量(VC),最大通气量(MVV)和第1秒用力呼气容积(FEV1)]分别为 $67.16\% \pm 7.07\%$ 、 $60.55\% \pm 9.71\%$ 、 $89.11\% \pm 10.59\%$,对照组分别为 $63.63\% \pm 6.16\%$ 、 $55.14\% \pm 9.54\%$ 、 $83.59\% \pm 10.34\%$,观察组较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$);观察组NPPV时间为 (6.2 ± 2.7) d、氧合指数为 (380.65 ± 19.17) 、CAT评分为 (8.82 ± 2.82) 分,对照组分别为 (8.1 ± 3.3) d、 (369.14 ± 18.61) 、 (12.02 ± 2.78) 分,观察组NPPV时间较对照组下降,氧合指数较对照组升高,CAT评分较对照组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);观察组焦虑、抑郁状态评分较对照组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 早期肺康复训练可改善COPD无创机械通气病人肺功能指标、提高病人氧合指数,降低无创机械通气时间,促进健康相关生活质量改善,减轻焦虑抑郁,且操作易行并最经济。

关键词:肺疾病,慢性阻塞性; 正压呼吸; 康复护理; 康复

Effect of early PR training on patients with COPD under NPPV

RUI Zuqing

Author Affiliation: Department of ICU, Anhui Wannan Rehabilitation Hospital, The No.5 People's Hospital of Wuhu, Wuhu, Anhui 241005, China

Abstract: Objective To explore nursing effect and nursing methods of early pulmonary rehabilitation (PR) training for the patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in acute aggravating period for fast recovery with on-invasive positive pressure ventilation (NPPV). **Methods** Sixty cases of acute exacerbation of COPD with non-invasive mechanical ventilation in The No.5 People's Hospital of Wuhu from February 2016 to December 2017 were selected and randomly assigned into the Test