DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20181204.001
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20181204.1211.002.html

宫腔粘连组织中 TLR4/NF-κB 通路功能改变与细胞因子分泌、胶原代谢特征的相关性

靳灵鸽,李珊珊,郑 萍,赵 虹✉
(首都医科大学附属北京妇产医院妇科,北京 100026)

[摘要] **目的**:研究宫腔粘连(IUAs)组织中 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子 κB(NF-κB)通路功能改变与细胞因子分泌、胶原代谢特征的相关性。**方法**:选择在我院就诊的 IUAs 患者作为 IUAs 组,同期因不孕行宫腔镜检查且经病理证实子宫内膜正常的患者作为对照组。测定 IUAs 组粘连组织及对照组正常子宫内膜组织中 TLR4/NF-κB 通路分子、胶原代谢基因的表达水平及细胞因子、胶原代谢标志分子的含量。**结果**:IUAs 粘连组织中 TLR4、NF-κB、解整合素金属蛋白酶 15(ADAM15)、ADAM17、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、纤溶酶原激活剂抑制剂-1(PAI-1)的 mRNA 表达量以及转化生长因子-β1(TGF-β1)、Smad2/3、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、IGF-1 受体(IGF-1R)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、骨膜蛋白成骨细胞特异性因子 2(Postn)、I 型胶原(Col-I)、肌动蛋白-α(α-SMA)的含量明显高于对照组,尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)的 mRNA 表达量明显低于对照组;TLR4、NF-κB 的 mRNA 表达量与 TGF-β1、Smad2/3、IGF-1、IGF-1R、bFGF、Postn、Col-I、α-SMA、ADAM15、ADAM17、MMP9、PAI-1 呈正相关,与 uPA 呈负相关。**结论**:IUAs 组织 TLR4/NF-κB 通路的过度激活与细胞因子分泌及胶原代谢异常有关。

[关键词] 宫腔粘连;Toll 样受体 4;核因子 κB;细胞因子;胶原代谢
[中图分类号] R711 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2019)01-0033-04

Correlation of changes of TLR4/NF-κB pathway function in intrauterine adhesion tissue with characteristics of cytokine secretion and collagen metabolism

JIN Ling-ge, LI Shan-shan, ZHENG Ping, ZHAO Hong ✉

(*Department of Gynaecology, Beijing Gynecology& Obstetrics Hospital of Capital Medical University, Beijing* 100026, *China*)

[*Foundation Project*]:*This study was supported by Special Training Program for Middle-Aged and Young Discipline Backbones from Beijing Maternity Hospital Affiliated to Capital Medical University (Grant No. FCYY201521).*

[*Author*]:*JIN Ling-ge* (1982-), *Female*, *M.M.*, *Attending Physician*, *Tel*: 13466390759, *E-mail*: 13466390759@163.com.
[*Correspondence to*]: *ZHAO Hong*, *Tel*: 13693308360, *E-mail*: *bjzh*0815@*sina.com*.

Received: 2018-11-08 *Revised*: 2018-11-23 *JHMC*, 2019;25(01):33-36

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To study the correlation of the changes of Toll-like receptor 4 (TLR4) / nuclear factor κB (NF-κB) pathway function in intrauterine adhesion (IUAs) tissue with the characteristics of cytokine secretion and collagen metabolism. **Methods**: The patients with IUAs who were treated in our hospital between February 2015 and March 2018 were selected

[基金项目] 首都医科大学附属北京妇产医院中青年学科骨干培养专项(FCYY201521)
[作者简介] 靳灵鸽(1982-),女,硕士,主治医师,电话:13466390759,E-mail: 13466390759@163.com。
[通讯作者] 赵虹,电话:13693308360,E-mail: bjzh0815@sina.com。
[收稿日期] 2018-11-08 [修回日期] 2018-11-23 网络出版时间:2018-12-05 16:31:05

as the IUAs group, and the patients who underwent hysteroscopy due to infertility and were pathologically confirmed to have normal endometrium during the same period were selected as the control group. The expression levels of TLR4/NF-κB pathway molecules and collagen metabolism genes as well as the contents of cytokines and collagen metabolism markers in the adhesion tissues of IUAs group and the normal endometrial tissue of control group were measured. **Results**: TLR4, NF-κB, a disintegrin and metalloproteinase 15 (ADAM15), ADAM17, matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) mRNA expression as well as transforming growth factor-β1 (TGF-β1), Smad2/3, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), IGF-1 receptor (IGF-1R), basic fibroblast growth factor (bFGF), periostin/osteoblast-specific factor 2 (Postn), type I collagen (Col-I) and actin-α (α-SMA) contents in the adhesion tissues of IUAs group were significantly higher than those of control group while urokinase-type plasminogen activator (uPA) mRNA expression was significantly lower than that of control group ($P<0.05$); TLR4 and NF-κB mRNA expression were positively correlated with TGF-β1, Smad2/3, IGF-1, IGF-1R, bFGF, Postn, Col-I, α-SMA, ADAM15, ADAM17, MMP9 and PAI-1, and negatively correlated with uPA. **Conclusion**: The excessive activation of TLR4/NF-κB pathway in IUAs is associated with the cytokine secretion and collagen metabolism abnormalities.

[KEY WORDS] Intrauterine adhesion; Toll-like receptor 4; Nuclear factor κB; Cytokine; Collagen metabolism

宫腔粘连(intrauterine adhesions,IUAs)是引起女性不孕、流产、月经异常的常见病因,手术创伤、感染等因素引起的子宫内膜基底层损伤是疾病发生的诱因,在此基础上会出现子宫壁部分或完全被无血管的纤维结缔组织取代。IUAs 也被视作局部组织自我修复的方式,其组织学特征是局部粘连组织中胶原的异常重构,生物学特征是细胞因子分泌和胶原代谢的异常[1,2]。在临床实践中,虽然可以通过粘连松解术来治疗 IUAs,但手术操作本身会不同程度的引起子宫内膜基底层损伤并增加术后远期再次发生 IUAs 的风险。目前,临床上尚缺乏防治 IUAs 的有效手段,关于 IUAs 组织中细胞因子分泌和胶原代谢的调控机制也未明确。Toll 样受体 4(Toll like receptor 4)是细胞表面重要的模式识别受体,手术创伤、感染等因素能够使 TLR4 激活并通过下游核因子 κB(nuclear factor κB,NF-κB)来调节基因表达。已有研究报道,TLR4 和 NF-κB 在 IUAs 组织中表达增多[3,4],本研究在此基础上具体分析了 IUAs 组织中中 TLR4/NF-κB 通路功能的改变及其与细胞因子分泌、胶原代谢特征的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2015 年 2 月～2018 年 3 月期间在我院就诊并接受手术治疗的 IUAs 患者作为 IUAs 组共 52 例,年龄 29～40 岁,平均(33.32±4.51)岁,宫内妊娠次数(1.41±0.17)次;另取同期因不孕行宫腔镜检查且经病理证实子宫内膜正常的患者作为对照组,共 38 例,年龄 26～38 岁,平均(32.97±3.51)岁,宫内妊娠次数(1.36±0.19)次。两组间一般资料的比较无显著性差异($P>0.05$)。

1.2 纳入和排除标准:

本研究 IUAs 患者的纳入标准如下:(1)经宫腔镜检查符合 IUAs 的诊断;(2)首次诊断为 IUAs;(3)入组前 6 个月内未使用过任何激素类药物;(4)取得患者知情同意。排除标准如下:(1)合并生殖道和泌尿道急性感染的患者;(2)合并妇科恶性肿瘤、不典型增生的患者;(3)合并全身结缔组织疾病的患者以及心肝肾功能不全的患者。

1.3 研究方法

1.3.1 基因表达的测定 取 IUAs 组粘连组织及对照组正常子宫内膜组织,采用北京康为世纪公司的超纯 RNA 提取试剂盒及 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒完成组织中 RNA 的提取及反转录;用 UltraSYBR Mixture 试剂对反转录合成的 cDNA 进行 PCR 扩增,扩增所用引物为上海生工公司合成的特异性靶向 TLR4、NF-κB、解整合素金属蛋白酶 15(ADAM15)、ADAM17、基质金属蛋白酶 9(MMP9)、纤溶酶原激活剂抑制剂-1(PAI-1)、尿激酶纤溶酶原激活剂(uPA)的引物序列,根据 PCR 反应曲线计算基因的 mRNA 表达量。

1.3.2 蛋白含量的测定 取 IUAs 组粘连组织及对照组正常子宫内膜组织,采用上海碧云天公司的蛋白裂解液提取组织中的蛋白后,采用上海酶联公司的酶联免疫吸附试剂盒测定骨膜蛋白即成骨细胞特异性因子 2(Postn)、I 型胶原(Col-I)、平滑肌肌动蛋白-α(α-SMA)、转化生长因子-β1(TGF-β1)、Smad2/3、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、IGF-1 受体(IGF-1R)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的含量。

1.4 统计学处理

所有数据采用 SPSS11.5 统计学软件对数据进行分析处理,计量资料进行 t 检验、对相关性进行 Pearson 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4/NF-κB 通路的比较

IUAs 宫腔粘连组织中 TLR4、NF-κB 的 mRNA 表达量分别为(1.76±0.25)、(1.55±0.24);对照组正常子宫内膜组

织中 TLR4、NF-κB 的 mRNA 表达量分别为(1.04±0.17)、(1.01±0.18)。与对照组比较,IUAs 宫腔粘连组织中 TLR4、NF-κB 的 mRNA 表达量明显增加,两组间差异有显著性意义($P<0.05$)。

2.2 粘连相关细胞因子的比较

与对照组比较,IUAs 组宫腔粘连组织中 TGF-β1、Smad2/3、IGF-1、IGF-1R、bFGF 的水平明显升高,差异有显著性意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 两组间细胞因子的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of cytokines between two groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF-β1 (ng/mL)	Smad2/3 (pg/mL)	IGF-1 (ng/mL)	IGF-1R (ng/mL)	bFGF (pg/mL)
IUAs 组	52	7.59±0.95	176.29±23.51	4.29±0.72	2.03±0.42	214.57±32.94
对照组	38	4.28±0.61	113.42±14.95	2.77±0.41	1.31±0.18	142.31±17.69
t		18.815	14.887	12.021	10.183	12.622
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 胶原标志分子含量的比较

与对照组比较,IUAs 组宫腔粘连组织中 Postn、Col-I、α-SMA 的含量明显增加,两组间差异有显著性意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组间 Postn、Col-I、α-SMA 的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of Postn, Col-I and α-SMA between two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Postn (pg/mL)	Col-I (ng/mL)	α-SMA (pg/mL)
IUAs 组	52	154.48±21.39	3.41±0.58	429.69±63.92
对照组	38	89.52±11.38	2.28±0.41	274.87±42.37
t		17.026	10.572	13.356
P		<0.01	<0.01	<0.01

2.4 胶原代谢基因表达量的比较

与对照组比较,IUAs 组宫腔粘连组织中 ADAM15、ADAM17、MMP9、PAI-1 的 mRNA 表达量明显增加,uPA 的 mRNA 表达量明显减少。两组间差异有显著性意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两组间 ADAM15、ADAM17、MMP9、uPA、PAI-1 的比较($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Comparison of ADAM15, ADAM17, MMP9, uPA and PAI-1 between two groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ADAM15	ADAM17	MMP9	uPA	PAI-1
IUAs 组	52	1.76±0.28	1.62±0.25	1.71±0.31	0.76±0.09	1.79±0.29
对照组	38	1.04±0.18	1.01±0.19	0.97±0.16	1.03±0.16	1.03±0.20
t		13.882	12.978	13.960	10.523	12.622
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.5 相关性分析

Pearson 检验显示:IUAs 组宫腔粘连组织中 TLR4、NF-κB 的 mRNA 表达量与 TGF-β1、Smad2/3、IGF-1、IGF-1R、bFGF、Postn、Col-I、α-SMA、ADAM15、ADAM17、MMP9、PAI-1 呈正相关,与 uPA 呈负相关。见表 4。

表 4 TLR4、NF-κB 与细胞因子、胶原代谢的相关性

Table 4 Correlation of TLR4 and NF-κB with cytokines and collagen metabolism

参数	TLR4		NF-κB	
	相关系数 r	P	相关系数 r	P
TGF-β1	0.351	<0.05	0.319	<0.05
Smad2/3	0.228	<0.05	0.447	<0.05
IGF-1	0.418	<0.05	0.352	<0.05
IGF-1R	0.504	<0.05	0.294	<0.05
bFGF	0.275	<0.05	0.413	<0.05
Postn	0.385	<0.05	0.356	<0.05
α-SMA	0.548	<0.05	0.452	<0.05
ADAM15	0.376	<0.05	0.284	<0.05
ADAM17	0.441	<0.05	0.332	<0.05
MMP9	0.592	<0.05	0.409	<0.05
uPA	-0.284	<0.05	−0.523	<0.05
PAI-1	0.349	<0.05	0.359	<0.05

3 讨论

宫腔粘连是子宫内膜损伤后异常修复、纤维化形成的结果,与其他器官纤维化疾病有着共同的病理学基础---细胞外基质过度沉积,组织重构,疤痕形成,局部粘连组织中细胞因子及胶原代谢均存在明显异常,但具体的发病机制仍未明确。TLR4 是 TLR 家族的重要成员,识别病原相关分子模式后能够使细胞内的 NF-κB 与其抑制分子 IκB 解离,解离后的 NF-κB 能够进入细胞核并发挥调节基因表达的作用。宫腔感染以及手术创伤是发生 IUAs 最常见的病因,两种病因均能引起宫腔内细胞因子改变并激活 TLR4/NF-κB 通路。根据国内李艳娟及杜艳芳的研究,IUAs 组织中 TLR4 及 NF-κB 均呈高表达的趋势[3,4]。本研究对 IUAs 组织中 TLR4/NF-κB 通路的分析发现:IUAs 患者宫腔粘连组织中 TLR4、NF-κB 的 mRNA 表达量明显高于对照组。这一结果与上述研究一致,表明 TLR4/NF-κB 通路的过度激活与宫腔粘连的发生有关,NF-κB 进入细胞核后可能通过调节细胞因子、胶原代谢分子的表达来参与 IUAs 的发生。

宫腔粘连组织中存在丰富的成纤维细胞以及异常代谢的胶原,多种细胞因子与成纤维细胞的增殖以及胶原的代谢存在密切关系。TGF-β1 同时参与成纤维细胞增殖及胶原代谢的调控,通过下游 Smad2/3 进行信号转导后一方面能够刺激成纤维细胞的增殖[5,6]、另一方面能够促进胶原的合成[7];IGF-I 和 bFGF 具有强大的促生长活性,能够通过促进成纤维细胞的生长来诱导组织粘连[8]。本研究对 IUAs 粘连组织中细胞因子水平的分析发现:IUAs 患者粘连组织中 TGF-β1、Smad2/3、IGF-1、IGF-1R、bFGF 的分泌量明显高于对照组。这一结果表明多种参与成纤维细胞增殖、胶原合成调控的细胞因子大量分泌与 IUAs 的发生有关。进一步分析

TLR4/NF-κB 通路与细胞因子的关系可知：IUAs 患者粘连组织中的 TLR4、NF-κB 与 TGF-β1、Smad2/3、IGF-1、IGF-1R、bFGF 均呈正相关关系。由此提示 TLR4/NF-κB 通路的激活可能能够促进多种细胞因子的分泌，进而通过细胞因子的生物学功能来促进成纤维细胞增殖、胶原沉积并参与 IUAs 的发生。

IUAs 粘连组织中胶原沉积的异常同时涉及合成和水解环节的改变，再加上成纤维细胞不断增殖与沉积胶原之间的相互作用，能够逐步形成组织间的粘连。Postn、Col-I、α-SMA 是细胞外基质的重要组成部分，作为纤维化指标，常用于判断纤维化疾病的发生及发展。Postn 是一种组织完整和成熟必不可少的细胞外基质蛋白，在胶原丰富的纤维结缔组织中表达，拥有弹联蛋白结构域，能够与 Col-I、α-SMA 相互结合并促进纤维细胞向肌成纤维细胞转化、增加胶原纤维的堆积。本研究对 IUAs 组织中胶原代谢分子的分析发现：IUAs 患者粘连组织中 Postn、Col-I、α-SMA 的含量明显高于对照组。这一结果表明 IUAs 组织中存在明显的胶原代谢异常。进一步分析 TLR4/NF-κB 通路与胶原代谢的关系可知：IUAs 患者粘连组织中的 TLR4、NF-κB 与 Postn、Col-I、α-SMA 均呈正相关关系。由此提示 TLR4/NF-κB 通路的激活可能能够影响胶原代谢并参与 IUAs 的发生。

蛋白酶是直接参与胶原代谢调控的分子[9]。ADAM15、ADAM17 是两种兼具解整合素活性的金属蛋白酶，一方面通过其解整合素的活性能够促进血小板聚集、抑制纤维蛋白原水解并增强组织粘连的强度，另一方面通过其蛋白酶活性能够促进细胞外基质中的胶原水解并在此基础上发生异常沉积、形成组织粘连[10,11]；MMP9 是具有强大水解活性的胶原水解酶，在水解细胞外基质的胶原后促进其异常沉积，进而诱导了组织粘连的发生[12,13]；uPA 和 PAI-1 则是一对功能相反的分子，前者促进纤维蛋白水解并阻碍组织粘连的形成，后者抑制纤维蛋白水解并促进组织粘连的形成[14]。本研究对 IUAs 组织中胶原代谢分子的分析发现：IUAs 组宫腔粘连组织中 ADAM15、ADAM17、MMP9、PAI-1 的 mRNA 表达量明显增加且与 TLR4、NF-κB 呈正相关，uPA 的 mRNA 表达量明显减少且与 TLR4、NF-κB 呈负相关。这一结果提示 TLR4/NF-κB 通路的激活能够影响蛋白酶的活力，促进胶原异常的水解、沉积并发生 IUAs。

综上所述，IUAs 组织 TLR4/NF-κB 通路的过度激活与细胞因子分泌及胶原代谢异常有关；激活的 TLR4/NF-κB 通路一方面能够增加多种参与成纤维细胞增殖、胶原合成调控的细胞因子的分泌，另一方面调节蛋白酶的表达并促进胶原异常的水解、沉积。

参考文献

1 Salazar CA, Isaacson K, Morris S. A comprehensive review of Asherman's syndrome: causes, symptoms and treatment options [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2017, 29(4):249-256.

2 Takai IU, Kwayabura AS, Ugwa EA, et al. A 10-year review of the clinical presentation and treatment outcome of asherman's syndrome at a center with limited resources [J]. Ann Med Health Sci Res, 2015, 5(6): 442-446.

3 李艳娟，徐大宝. Toll 样受体 4 在宫腔粘连患者子宫内膜中的表达[J].现代妇产科进展，2012，21(5)：373-375.

4 杜艳芳，孙燕. ER、PR 和 NF-κB 在宫腔粘连子宫内膜组织中的表达及意义[J].广西医科大学学报，2016，33(4)：580-583.

5 Salma U, Xue M, Ali Sheikh MS, et al. Role of transforming growth factor-β1 and smads signaling pathway in intrauterine adhesion [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 4158287.

6 Shi LB, Zhou F, Zhu HY, et al. Transforming growth factor beta1 from endometriomas promotes fibrosis in surrounding ovarian tissues via Smad2/3 signaling [J]. Biol Reprod, 2017, 97(6):873-882.

7 郭罗培，隋龙. TGF-β 在宫腔粘连纤维化中的研究进展[J].现代妇产科进展，2018，27(5)：394-396.

8 曾薇薇，姚吉龙，李军. 胰岛素样生长因子-1 和转化生长因子-β1 在宫腔粘连患者子宫内膜表达的研究[J]. 广西医学，2015，4：470-472.

9 Chen Q, Zhang A, Yu F, et al. Label-free proteomics uncovers energy metabolism and focal adhesion regulations responsive for endometrium receptivity [J]. J Proteome Res, 2015, 14(4):1831-1842.

10 刘丹，哈春芳，刘满梅，等. 宫腔粘连组织中解离素-金属蛋白酶 15、17 的表达[J]. 宁夏医科大学学报，2016，38(1)：30-33.

11 Liu D, Ha C, Zhang X, et al. Molecular implication of ADAM-15 and -17 in intrauterine adhesions [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2013, 170(1): 264-269.

12 徐洁，刘艳，郭遂群. 雌激素受体及基质金属蛋白酶-9 在宫腔粘连组织中的表达及意义[J]. 广东医学，2015，36(8)：1222-1224.

13 尚雪，孙广范，关燕鸣，等. 宫腔粘连分离术对宫腔粘连患者子宫内膜基质金属蛋白酶-9 表达的影响[J]. 中国实用医药，2018，13(14)：83-84.

14 孙聪聪，王佳，明雪，等. 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[J]. 重庆医科大学学报，2016，41(7)：690-693.