

紧密连接蛋白 Claudin-4 在子宫内膜异位症组织中的表达*

鲁晓燕^a, 刘曼华^a, 赵 枰^b, 乔海凤^a, 刘颖蕾^a, 朱 燕^c

(南通市第一人民医院 a. 妇产科; b. 检验科; c. 病理科, 江苏南通 226001)

摘要:目的 探讨紧密连接蛋白 Claudin-4 在子宫内膜异位症(内异症)在位、异位内膜与正常内膜中的表达,及其在内异症发病中的作用。方法 采用 RT-PCR 的方法检测 35 例卵巢子宫内膜异位囊肿患者的在位、异位内膜组织中紧密连接蛋白 Claudin-4 mRNA 的表达,并与 30 例正常对照子宫内膜比较。结果 ① Claudin-4 mRNA 在在位、异位及对照组织中表达量分别为 12.38 ± 6.12 , 4.59 ± 1.35 和 13.05 ± 6.48 。异位内膜组织中 Claudin-4 mRNA 的表达量低于在位和对照子宫内膜组织,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在位与对照内膜组织比较, Claudin-4 mRNA 的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。②在异位内膜组织中,Ⅰ,Ⅱ期患者的 Claudin-4 mRNA 的表达量(6.74 ± 1.92)较Ⅲ,Ⅳ期患者(3.82 ± 1.01)明显升高,差异也有统计学意义($P < 0.01$)。③在位与对照内膜组织中,增生期 Claudin-4 mRNA 的表达量(14.01 ± 7.02)较分泌期(11.14 ± 5.48)明显升高,差异也有统计学意义($P < 0.05$);异位组内膜组织中,增生期与分泌期 Claudin-4 mRNA 的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 Claudin-4 在异位内膜中低表达可能与子宫内膜异位症的发生发展有关。

关键词:子宫内膜异位症;紧密连接蛋白-4

中图分类号:R711.74;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2016)04-062-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.04.016

Expressions of Claudin-4 mRNA in Endometriosis

LU Xiao-yan^a, LIU Man-hua^a, ZHAO Ping^b, QIAO Hai-feng^a, LIU Ying-lei^a, ZHU Yan^c

(a. Gynaecology and Obstetrics; b. Department of Clinical Laboratory; c. Department of Pathology, the First People's Hospital of Nantong, Jiangsu Nantong 226001, China)

Abstract: **Objective** To investigate mRNA expression of claudin-4 in the eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis and normal endometrium, and evaluate the role of claudin-4 in the pathogenesis of endometriosis. **Methods** The mRNA expression of claudin-4 in eutopic and ectopic endometrium of patients with endometriosis ($n=35$) and in normal endometrium from control group ($n=30$) were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** ① In eutopic and ectopic endometrium of women with endometriosis and control endometrium, the expression of claudin-4 mRNA was 12.38 ± 6.12 , 4.59 ± 1.35 and 13.05 ± 6.48 , respectively. Expression of claudin-4 mRNA was significantly lower in the ectopic endometriotic tissue than in the eutopic endometrium and the control endometrium ($P < 0.01$). No significant difference was found between eutopic endometrium from women with endometriosis and control endometrium ($P > 0.05$). ② Expression of claudin-4 mRNA levels of mild endometriosis were significantly higher than that of severe endometriosis in the ectopic endometriotic tissue (6.74 ± 1.92 vs 3.82 ± 1.01) ($P < 0.01$). ③ In eutopic and control endometrium, Expression of claudin-4 mRNA levels were significantly higher in the proliferative phase than that in the secretory phase (14.01 ± 7.02 vs 11.14 ± 5.48) ($P < 0.05$). In ectopic endometrium, no significant difference was found between proliferative phase and secretory phase ($P > 0.05$). **Conclusion** Down-regulated expression of claudin-4 could be involved in the development of endometriosis lesions.

Keywords: endometriosis; claudin-4.

子宫内膜异位症(endometriosis, EMT)是生育年龄妇女的常见病和多发病,近年来发病率在10%~15%^[1],并有明显的上升趋势,且难以根治。此病虽属良性疾病,但临床上却表现为种植、转移、侵袭性生长等恶性生物学行为,多播散到盆腔脏器,尤以卵巢最为常见。有“良性癌”和妇女盆腔“沙尘暴”之称^[2]。目前发病机制尚未完全阐明,但最为认可的是经典逆流学说^[3]。紧密连接是细胞

黏附形式的一种, Claudins 是构成紧密连接的主要骨架蛋白,最近的研究发现, Claudin 表达异常可导致上皮细胞和内皮细胞的结构破坏及功能受损,参与多种疾病的发生发展,研究主要集中在与恶性肿瘤发生、发展的相关性上^[4,5]。而内异症同样也表现为类似恶性肿瘤的生物学行为。因此,本研究采用 RT-PCR 技术对内异症患者的在位、异位内膜及正常妇女子宫内膜中的 Claudin-4 的表达进行

* 基金项目:2014 南通市社会事业科技创新与示范(重点病种的临床规范化诊疗)(HS2014074),南通市卫生局青年基金资助项目(WQ2014023)。

作者简介:鲁晓燕(1971—),女,医学硕士,主任医师,研究方向:妇科内分泌, Tel:13962938293, E-mail:zhaopinghonghong@163.com。

检测,旨在探讨 Claudin-4 在内异症发病中的作用,进而为内异症的临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择 2014 年 1 月~2015 年 12 月这两年间因卵巢子宫内膜异位囊肿在南通市第一人民医院行腹腔镜或开腹手术的患者共 35 例,平均年龄为 38 ± 5 岁。并根据美国 1996 年生育学会修订的内异症分期法(r-AFS)进行分期,其中 I~II 期 11 例,III~IV 期 24 例。手术过程中同时采集异位内膜及同期的在位内膜(分别通过活检及刮宫取得),增生期异位内膜及在位内膜 21 例,分泌期异位内膜及在位内膜 14 例。另选择同期因子宫肌瘤而行子宫全切除手术、子宫内膜正常的患者 30 例,平均年龄 40 ± 6 岁,其中增生期 19 例,分泌期 11 例。所有病例术前 3 个月均未接受性激素及抗内异症药物治疗。所有标本均在采集后 30 min 内进行处理。

1.2 方法 首先参照 TRIzol 试剂盒(一步法)说明书提取组织总 RNA。然后根据 Superscript II H-逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 并置 -70°C 冰箱保存。最后采用 RT-PCR 检测 Claudin-4 mRNA 的表达;以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照。反应体系($20\ \mu\text{l}$)包括:cDNA $2\ \mu\text{l}$,去离子水 $6.4\ \mu\text{l}$,上下游引物各 $0.8\ \mu\text{l}$ ($10\ \mu\text{mol/L}$),荧光染料-SYBR Green I $10\ \mu\text{l}$ 。PCR 反应条件: 95°C 初始变性 10 min,进入循环。 95°C 10 s, 57°C (Claudin-4) [或 55°C (GAPDH)] 退火 5 s, 72°C 延伸 10 s (Claudin-4) [或 15 s (GAPDH)],循环 40 次。绘制标准曲线并计算目的基因和内参照的拷贝数。Claudin-4 mRNA 表达量以 Claudin-4 与 GAPDH 拷贝数的比值表示。

1.3 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者子宫内膜 Claudin-4 mRNA 表达量比较 Claudin-4 mRNA 在在位、异位及对照组织中表达量分别为 12.38 ± 6.12 , 4.59 ± 1.35 和 13.05 ± 6.48 。异位内膜组织中 Claudin-4 mRNA 的表达量低于在位和对照组内膜组织,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在位与对照内膜组织比较, Claudin-4 mRNA 的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 不同期别内异症患者异位内膜组织中 Claudin-4 mRNA 表达量比较 I, II 期患者的 Claudin-4 mRNA 的表达量(6.74 ± 1.92)较 III, IV 期患

者(3.82 ± 1.01)明显升高,差异也有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 月经周期不同阶段子宫内膜 Claudin-4 mRNA 表达量比较 在位与对照内膜组织中,增生期 Claudin-4 mRNA 的表达量(14.01 ± 7.02)较分泌期(11.14 ± 5.48)明显升高,差异也有统计学意义($P < 0.05$);异位组内膜组织中,增生期与分泌期 Claudin-4 mRNA 的表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论 紧密连接是细胞间连接复合体最顶端的结构,其栅栏功能和屏障功能是维持细胞极性、组织稳态所必需的。Claudin 蛋白、闭锁蛋白与连接黏附分子这三类主要的膜蛋白组成了细胞间的紧密连接, Claudin 是紧密连接的主要结构及功能成分,相邻细胞的 Claudin 通过同质或异质连接,封闭细胞间隙,形成与外界隔离的封闭带;此外,还可以沿着上皮细胞侧面和基底细胞质膜分布,参与黏附连接,发挥细胞与基底膜分子间的相互作用。Claudin 蛋白家族属于一个多基因家族,相对分子质量为 $17 \sim 27\text{kD}$,最早于 1998 年被 Furuse 等^[6]发现,并于 1999 年由 Swisshelm 等首先克隆出人类 Claudin-1 基因,到目前为止,至少有 20 多个 Claudin 蛋白家族成员被发现, Claudin-4 是 Claudin 蛋白家族的主要成员之一,由 209 个氨基酸残基组成,虽然目前对 Claudin-4 的认识仍然处于起步阶段,其与细胞内、外其它物质之间的相互作用关系、调节机制等仍未完全明了^[7]。但由于 Claudin-4 在紧密连接功能中扮演着重要的角色,使得其在癌细胞的营养和生长因子的供应及转移过程中发挥了潜在的作用,已成为肿瘤方面研究的热点,并显示出一定的临床应用价值。近来的研究显示在一些癌症中, Claudin-4 的表达上调或者下调与肿瘤发生发展有关。本研究结果显示, Claudin-4 在在位内膜中的表达与正常子宫内膜一致,紧密连接未出现明显异常。而异位内膜中 Claudin-4 表达是显著降低的,提示异位的子宫内膜可能由于 Claudin-4 表达降低,使紧密连接的组装元件缺乏,不能形成完整的紧密连接结构,使得异位的内膜随卵巢内分泌变化而周期性出血,形成单个或多个囊肿,囊肿纤维化进一步破坏了内层的上皮结构。并在子宫内膜的脱落和脱落内膜的腹腔种植中起重要作用。晚期子宫内膜异位症(III, IV)患者异位内膜组织中 Claudin-4 mRNA 表达量较早期子宫内膜异位症(I, II)患者明显降低,可能由于随着疾病的进展,紧密连接结构受损严重,维持细胞间紧密连接、黏附连接的相互作用也随之减弱,表现为异位内膜细胞具有更强的侵袭力和转移力,并说明

Claudin-4 的表达水平与紧密连接的结构密切相关。本研究结果还显示,无论是正常对照内膜组织还是子宫内膜异位症在位内膜组织,增生期子宫内膜的 Claudin-4 mRNA 表达量均显著高于分泌期,提示子宫正常内膜 Claudin-4 mRNA 的表达可能依赖于孕激素调节,同时也表明这种正常生理分化导致的 Claudin-4 mRNA 降低可能与已经研究的某些肿瘤细胞恶性分化表现为 Claudin-4 表达低下的现象是相似的^[8,9]。

综上所述,通过对紧密连接蛋白 Claudin-4 在内异症患者位、异位子宫内膜组织中表达情况的研究,我们发现异位子宫内膜组织中 Claudin-4 的低表达可能参与了内异症的发病。

参考文献:

- [1] 谢志贤,刘倩.血清 CA199 检测对子宫内膜异位症的诊治意义[J].现代检验医学杂志,2006,21(1):60-62.
Xie ZX, Liu Qian. To study the significance in endometriosis diagnosis by determination of serum CA199 [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2006, 21(1): 60-62.
- [2] 王爽,张晓玲. Ang-2, VEGF 在卵巢子宫内膜异位症中表达及相关性研究[J].实用妇产科杂志,2010,26(8):594-597.
Wang S, Zhang XL. Expression of angiopoietin-2, vascular endothelial growth factor and their correlation in patients with ovarian endometriosis [J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2010, 26(8): 594-597.
- [3] 孙京花,陈旭,苏显都,等.白细胞介素-10 基因多态性与子宫内膜异位症易感性关系的 Meta 分析[J].现代检验医学杂志,2014,29(5):89-92.
Sun JH, Chen X, Su XD, et al. Meta-analysis on interleukin-10 polymorphisms and endometriosis susceptibility [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(5): 89-92.
- [4] Nagase S, Doyama R, Yagi K, et al. Recent advances in Claudin-targeting technology [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(5): 708-714.
- [5] Ding L, Lu Z, Lu Q. The claudin family of proteins in human malignancy: a clinical perspective [J]. Cancer Manag Res, 2013, 5(8): 367-375.
- [6] Furuse M, Fujita K, Hiragi T, et al. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin [J]. J Cell Biol, 1998, 141(7): 1539-1550.
- [7] 向若兰,苏运超,裴晓庆,等.紧密连接蛋白 Claudin-4 的研究进展[J].生理科学进展,2012,43(4):310-314.
Xiang RL, Su YC, Pei XQ, et al. The research progress of tight junction proteins claudin 4 [J]. Progress in Physiological Sciences, 2012, 43(4): 310-314.
- [8] Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours [J]. Histopathology, 2005, 46(5): 551-560.
- [9] Lee KW, Lee NK, Kim JH, et al. Twist1 causes the transcriptional repression of claudin-4 with prognostic significance in esophageal cancer [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(3): 454-460.

收稿日期:2016-04-21

修回日期:2016-05-21

(上接 61 页)

- [7] Saboktakin L, Bilan N, Nikniaz A, et al. Study on serum Leptin level of children with asthma [J]. Life Science Journal, 2012, 9(4): 1415-1419.
- [8] De Rosa V, Procaccini C, Call G, et al. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation [J]. Immunity, 2007, 26(2): 241-255.
- [9] Sood A, Ford ES, Camargo CA Jr. Association between leptin and asthma in adults [J]. Thorax, 2006, 61(4): 300-305.
- [10] Gurkan F, Atamer Y, Ece A, et al. Serum leptin levels in asthmatic children treated with an inhaled corticosteroid [J]. Annals Allergy Asthma Immunol, 2004, 93(3): 277-280.
- [11] Mai XM, Bottcher MF, Leijon I. Leptin and asthma in overweight children at 12 years of age [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2004, 15(6): 523-530.
- [12] Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance [J]. Cell, 2008, 133(5): 775-787.
- [13] 胡斯明,罗雅玲,赖文岩,等.调节性 T 细胞/Th17 在支气管哮喘小鼠气道炎症过程中的变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(19): 2881-2884.
Hu SM, Luo YL, Lai WY, et al. Evolvement of Treg/Th17 imbalance in the process of airway inflammation in a mice asthmatic model [J]. China Journal of Modern Medicine, 2009, 19(19): 2881-2884.
- [14] Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, et al. Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4 + CD25 + regulatory T cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 5150-5155.
- [15] 赵秋剑,王登峰.支气管哮喘患者变应原检测及免疫分子研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6): 96-98.
Zhao QJ, Wang DF. Study on allergen detection and immune molecules in the patients with bronchial asthma [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(6): 96-98.
- [16] Taffin C, Favier B, Baudhuin J, et al. Human endothelial cells generate Th17 and regulatory T cells under inflammatory conditions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(7): 2891-2896.

收稿日期:2016-01-09

修回日期:2016-03-03