

子宫内膜异位症患者肝细胞生长因子及其受体 c-Met 的表达

宗利丽^{1,2}, 李亚里², 宋三泰¹, 江泽飞¹, 赵军² (¹军事医学科学院 307 医院肿瘤科, 北京 100850; ²解放军总医院妇产科, 北京 100853)

摘要:目的 研究肝细胞生长因子(HGF)及其受体 c-Met 在子宫内膜异位症发病机制中的作用。方法 采用 mRNA 原位杂交和免疫组织化学技术检测经腹腔镜手术及病理证实的 54 位子宫内膜异位症妇女(I/II 期患者 28 例, III/IV 期患者 26 例)在位和异位内膜组织及 24 例正常对照组妇女在位内膜 HGF、c-Met 的分子和蛋白表达。结果 子宫内膜异位症患者在位内膜 HGF、c-met 基因和蛋白阳性表达与异位内膜一致, 但阳性切片中, 异位内膜阳性细胞数及表达强度高于在位内膜。增生期和分泌期的内膜细胞 HGF/c-Met mRNA 和蛋白的表达相近, 无明显差异。对照组、I/II 期患者在位、异位内膜与 III/IV 期患者在位、异位内膜比较, HGF、c-met 基因和蛋白阳性表达频率依次上升, 组间差异显著($P<0.01$)。I/II 期、III/IV 期患者在位和异位内膜与对照组比较, HGF、c-met 基因和蛋白阳性表达频率有显著差异; I/II 期患者与 III/IV 期患者比较, HGF/c-Met 阳性表达频率和表达强度均无显著差异。III/IV 期患者 c-Met 强阳性表达频率与对照组比较, 有显著差异。结论 HGF、c-met 基因和蛋白表达与子宫内膜异位症发病机制相关, 在位内膜性质的改变可能是子宫内膜异位症发病机制的关键环节。

关键词: 子宫内膜异位症; 肝细胞生长因子; c-Met; 原位杂交; 免疫组织化学

中图分类号: R711.71 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)06-0619-04

Expression of hepatocyte growth factor and its receptor *c-met* gene in the endometrium of women with endometriosis

ZONG Li-li^{1,2}, LI Ya-li², SONG San-tai¹, JIANG Ze-Fei¹, ZHAO Jun²

¹Department of Oncology, 307 Hospital of Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; ²Department of Obstetrics and Gynecology, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Abstract: Objective To study the role of hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor (c-Met) in the pathogenesis of endometriosis. **Methods** *In situ* hybridization and immunohistochemistry method was used to examine HGF mRNA and protein expression in eutopic and ectopic endometrium obtained from 54 women in reproductive age with endometriosis confirmed by laparoscopy and histological examination (including 28 cases of stages I/II and 26 of stages III/IV) and from the endometrium of 24 healthy fertile women. **Results** In patients with endometriosis, the positivity rate of HGF/c-Met expression was similar in the eutopic and ectopic endometria, but the number of positive cells and expression intensity were much higher in ectopic endometrium. The positive expression rate varied little between the proliferative and secretory stages of the endometrium. Compare with the healthy controls, patients with endometriosis of stages I/II and III/IV had significantly elevated positivity rate of HGF and c-Met expressions in either eutopic and ectopic endometrium, but without significant difference between the two patient groups ($P<0.01$). The rate of strong c-Met protein expression was significantly higher in III/IV endometriosis than in the controls, without statistical difference between other groups. **Conclusion** The expressions of HGF and *c-met* gene are correlated with the pathogenesis of endometriosis, which is preceded by eventful changes in the biological behavior of the eutopic endometrium.

Key words: endometriosis; hepatocyte growth factor, c-Met; *in situ* hybridization; immunohistochemistry

子宫内膜异位症(内异症)是生育期妇女的常见病,发病率达 10%~15%,且有逐渐上升的趋势^[1]。子宫内膜生理与病理情况下的功能调控与细胞生长因子作用密切相关,如肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)不仅参与月经周期中子宫内膜的增生、血管生成、脱落与凋亡的调控,而且与病理情况

下子宫内膜细胞迁移、增生、种植与血管新生密切相关^[2,3]。关于 HGF/c-Met 在内异症发病机制中作用的研究,国外近几年才引起重视,国内尚未见报道。本研究采用 mRNA 原位杂交和免疫组织化学技术检测内异症患者在位与异位内膜组织 HGF 及其受体 c-Met 的分子和蛋白表达,旨在系统研究 HGF 及其受体在内异症发病机制中的作用。

收稿日期:2004-04-22

基金项目:国家自然科学基金重点课题(3983035)

Supported by National Natural Science Foundation of China(3983035)

作者简介:宗利丽(1967-),女,1989年毕业于第一军医大学医疗系,在读博士研究生,副主任医师、副教授, E-mail:zonglili67@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 研究对象

2000年2月~2003年3月在解放军总医院行腹

腹腔镜及病理证实为内异症患者 54 例,按 1985 年美国生育协会制定的内异症分期标准分期,其中 I/II 期内异症患者 28 例、III/IV 期内异症患者 26 例。对照组为因卵巢良性肿瘤行腹腔镜手术的妇女 24 例。所有妇女年龄 24~44 岁,月经规律。

1.2 方法

1.2.1 取材 术中取正常位置的在位子宫内膜和盆腔转移的异位子宫内膜,剪成 1.5 cm×1.5 cm 大小,立即固定、包埋、切片,常规作 HE 染色。

1.2.2 HGF/*c-met* mRNA 原位杂交 经地高辛标记的 HGF/*c-Met* 特异性寡核苷酸探针由武汉博士德生物有限公司提供。针对人 HGF 靶基因的寡核苷酸 mRNA 序列:5'-TGCA G CATGT CCTCC TGCAT CTCCT CCTGC-3'; 针对人 *c-met* 靶基因的寡核苷酸 mRNA 序列:5'-CTTGG TGCAG AGGAG CAATG GGGAG TGTA A-3'。已水化的切片用 3% H_2O_2 / 甲醇灭活内源性过氧化物酶 10 min,DEPC 水漂洗 5 min。滴加 3% 柠檬酸新鲜配制的胃蛋白酶,消化 20 min。0.01 mol PBS 3×5 min。加预杂交液 40℃预杂交 2 h,杂交液中探针浓度 1.5 μg/ml,滴加在切片上杂交,42℃过夜;2×SSC、0.2×SSC 各 3×5 min,滴加封闭液 20 min;兔抗地高辛 37℃、60 min;0.01 mol PBS 漂洗后加生物素化羊抗兔 IgG 37℃、20 min;0.01 mol PBS 2×5 min;滴加 SBAC 37℃、20 min。5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐/硝基四氮唑蓝(BCIP/NBT)显色,阳性结果为胞质或胞膜呈紫蓝色。

1.2.3 HGF/*c-Met* 免疫组织化学 免疫组织化学染色试剂盒和兔抗人 *c-Met* 多克隆抗体、抗人 HGF 单克

隆抗体由北京中山生物技术有限公司提供。兔抗人 *c-Met* 多克隆抗体浓度 1:100 稀释,抗人 HGF 单克隆抗体浓度 10 μg/ml,DAB 显色。阳性结果为胞质或胞膜呈棕黄色。

1.2.4 实验对照 选择人肝组织切片作为组织阳性对照,不加探针或抗体作为空白阴性对照。

1.2.5 结果判定 原位杂交结果判定:原位杂交的阳性信号为蓝色,呈细颗粒状。信号越强,颜色越深。阴性对照无阳性信号检出。原位杂交的阳性等级按以下方法计算:阳性细胞数 <10%、<30%、<70%和 >70% 分别计 1、2、3 和 4 分;杂交信号强度分为弱、中、强,分别计 1、2、3 分。免疫组化结果判定:阳性效应产物为棕黄色颗粒,蛋白分布于细胞质、细胞膜、细胞核,每张切片随机选取 5 个高倍视野。根据染色强度对阳性结果进行评定,即阴性、黄色染色为阳性、棕黄色染色为强阳性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件分析,HGF、*c-Met* 分别作单因素方差分析,多重比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 原位杂交技术检测内异症患者在位与异位内膜 HGF/*c-met* mRNA 的表达

内异症患者在位与异位内膜细胞均表达 HGF/*c-met* mRNA,间质细胞的细胞质、细胞膜均有强表达,上皮细胞主要是细胞膜表达。增生期或分泌期的内膜细胞表达 HGF/*c-met* mRNA 的强度相近,无明显差异(图 1、2)。

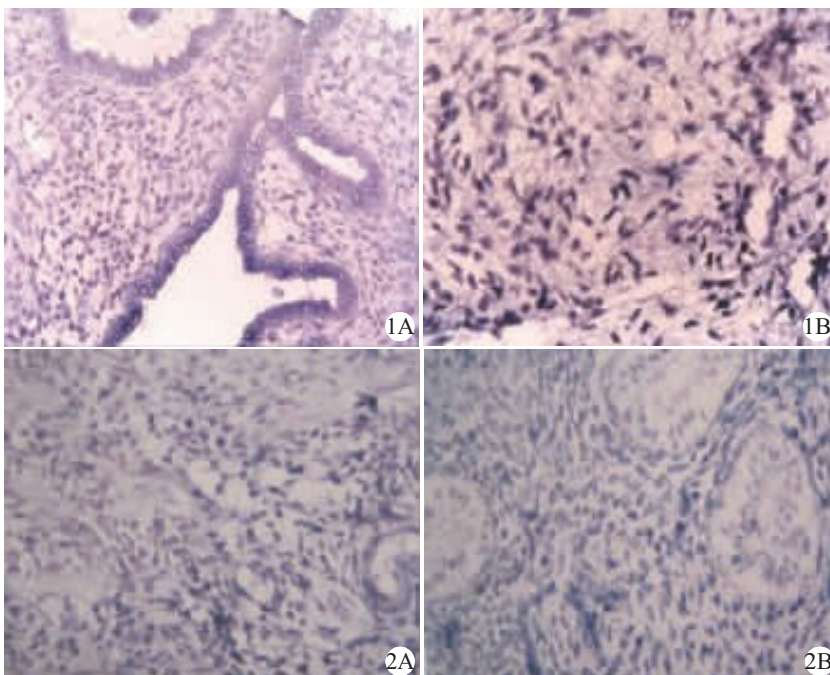


图 1 子宫内膜异位症患者在位与异位内膜 HGF mRNA 原位杂交(BCIP/NBT 显色,原放大倍数:×200)

Fig.1 *In situ* hybridization of HGF mRNA in eutopic (A) and ectopic (B) endometrium of women with endometriosis (BCIP/NBT staining, original magnification: ×200)

图 2 子宫内膜异位症患者在位与异位内膜 *c-met* mRNA 原位杂交(BCIP/NBT 显色,原放大倍数:×200)

Fig.2 *In situ* hybridization of *c-met* mRNA in eutopic (A) and ectopic (B) endometrium of women with endometriosis (BCIP/NBT staining, original magnification: ×200)

对照组妇女在位内膜、I / II 期内异症患者及 III / IV 期内异症患者比较, HGF 和 *c-met* 基因阳性表达率依次上升, 组间差异显著 ($P < 0.01$)。I / II 期和 III / IV 期内异症患者在位和异位内膜与对照组比较,

HGF/*c-met* 基因阳性表达率差异显著 ($P < 0.01$); 内异症患者在位与异位内膜比较、I / II 期患者与 III / IV 期患者比较, HGF/*c-met* 基因阳性表达率及强阳性表达频率无显著差异 (表 1)。

表 1 子宫内膜异位症患者在位与异位内膜及正常在位内膜 HGF/*c-met* mRNA 的阳性表达

Fig.1 HGF/*c-met* mRNA expression in the endometrium of women with and without endometriosis

Group	n	HGF			<i>c-met</i>		
		Negative(-)	Positive(+)	SP(++)	Negative(-)	Positive(+)	SP(++)
Control	24	13	11	0	12	12	0
Endometriosis I / II stage							
Eutopic	28	7*	19	2	6*	21	1
Eutopic	27	6*	18	3	6*	18	3
Endometriosis III / IV stage							
Eutopic	26	4*	19	3	3*	19	4
Eutopic	23	2*	15	6	3*	14	6

* $P < 0.05$ vs control group. HGF: Hepatocyte growth factor; SP: Strongly positive

2.2 免疫组化技术检测内异症患者在位与异位内膜 HGF/c-Met 蛋白的表达

内异症患者在位内膜主要为间质细胞表达 HGF/c-Met 蛋白, 异位内膜上皮和间质细胞均表达

HGF/c-Met 蛋白, 无明显差异。同一患者在位与异位内膜 HGF/c-Met 蛋白阳性表达是一致的, 但异位内膜表达强度和阳性表达的细胞数明显多于在位内膜 (图 3、4)。

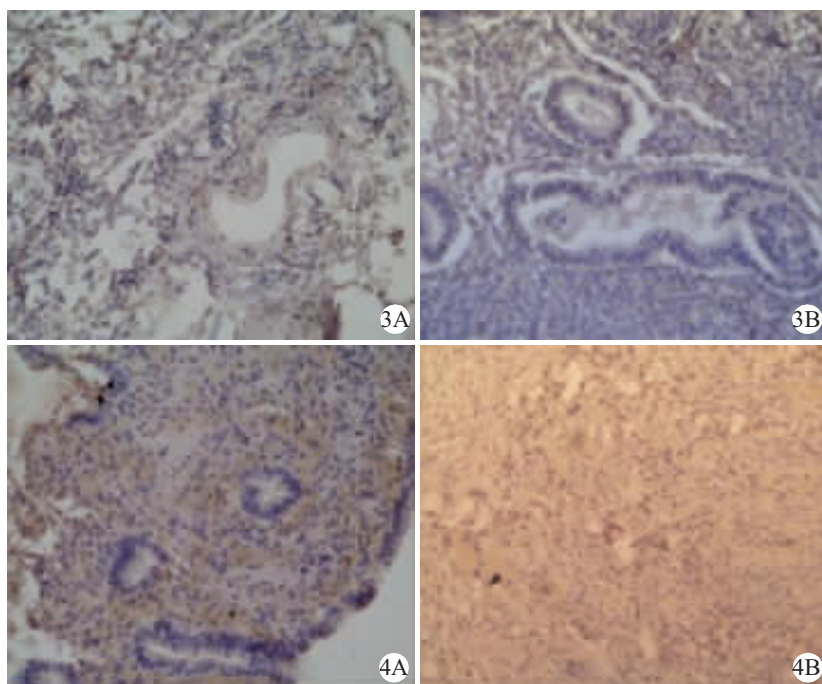


图 3 子宫内膜异位症患者在位与异位内膜 HGF 蛋白免疫组化 (DAB 显色, 原放大倍数: $\times 200$)

Fig.3 Immunohistochemistry staining of HGF in eutopic (A) and ectopic (B) endometrium of women with endometriosis (DAB staining, original magnification: $\times 200$)

图 4 子宫内膜异位症患者在位与异位内膜 c-Met 蛋白免疫组化 (DAB 显色, 原放大倍数: $\times 200$)

Fig.4 Immunohistochemistry staining of c-Met in eutopic (A) and ectopic (B) endometrium of women with endometriosis (DAB staining, original magnification: $\times 200$)

对照组妇女在位内膜与 I / II 期和 III / IV 期内异症患者比较, HGF 和 c-Met 蛋白阳性表达率也是依次上升, 组间差异显著 ($P < 0.01$)。内异症患者在位与异位内膜组与对照组比较, HGF/c-Met 阳性表达率均有显著差异。内异症患者在位和异位内膜比较、I / II 期患者与 III / IV 期患者比较, HGF/c-Met 阳性表达率和表达强度均无显著差异; III / IV 期内异症患者强阳性表达频率与对照组比较有显著差异 (表 2)。

3 讨论

内异症患者子宫内膜细胞的异位种植、侵袭和血管新生等类似恶性肿瘤的生物学行为, 是其发生、发展的重要机制之一^[3]。HGF 是与细胞增生、运动、迁移、血管新生密切相关的细胞因子。在此之前, 我们应用酶联免疫吸附反应技术检测了 126 位妇女 (其中 72 位为子宫内膜异位症患者, 54 为正常对照) 血清及腹水中 HGF 浓度, 发现内异症患者血清和腹水中的

表 2 子宫内膜异位症患者原位与异位内膜及正常原位内膜 HGF/c-Met 蛋白阳性表达

Fig.2 HGF/c-Met protein expression in the endometrium of women with and without endometriosis

Group	n	HGF			c-Met		
		Negative(-)	Positive(+)	SP(++)	Negative(-)	Positive(+)	SP(++)
Control	24	14	9	1	13	11	0
Endometriosis I / II stage							
Eutopic	28	8*	19	1	6	19*	3
Eutopic	27	7*	19	2	5	20*	3
Endometriosis III / IV stage							
Eutopic	26	4*	16	6	3	16*	7*
Eutopic	23	3*	16	7	2	16*	8

* $P < 0.05$ vs control group

HGF浓度显著高于正常对照组妇女,并与疾病严重程度相关,与月经周期无关,提示HGF与内异症的发生和发展相关^[4]。为进一步深入系统地研究HGF在内异症发病机制中的作用,本项研究从分子和蛋白水平检测了内异症患者原位与异位内膜HGF及其受体c-Met的表达,结果显示:内异症患者在原位与异位内膜组织HGF和c-met基因及蛋白表达均高于正常妇女,并随疾病严重程度增加而升高;患者在位内膜与异位内膜HGF和c-met基因及蛋白表达是一致的。提示HGF参与内异症的发病机制,而且在位内膜的性质改变可能是疾病发生的关键。异位内膜来源于在位内膜,具有异常在位内膜的性质,使其易在盆腔种植、生长。本研究结果支持了现在普遍认同内异症发病机制的主导学说:经血逆流致病学说。协和医科院郎景和教授最近也提出“在位内膜决定论”,认为内异症和非内异症在位内膜的基因或其表达的差异可能是内异症的遗传基础,是经血逆流和经血内膜碎片发生粘附、侵袭和生长的决定因素,是内异症治疗的生物学依据。子宫内膜细胞必须以粘附、侵袭和血管形成之“三部曲”或“AAA模式”完成在异位的“三生”(生根、生长和生病)过程。

HGF复杂的生物学作用是通过跨膜的酪氨酸激酶表面受体完成的。HGF信号传导受体为c-Met受体酪氨酸激酶,HGF/SF-MET信号传导参与肿瘤细胞

的侵袭性生长和血管生成。HGF及其受体c-Met在各种肿瘤(包括乳腺癌,膀胱等)中是上调的,HGF可增强该基因的表达,促进细胞的侵袭^[5]。本研究发现内异症患者在原位与异位内膜组织c-met基因和蛋白表达均显著高于正常妇女子宫内膜,c-Met蛋白表达与疾病严重程度显著相关,这一方面进一步证实细胞转移种植是内异症发病的重要机制,另一方面也从肿瘤以外的疾病阐述了HGF及其受体系统对调节细胞的生长和转移起重要作用。

参考文献:

- [1] Giudice LC, Tazuke SI, Swiersz L. Status of current research on endometriosis[J]. J Reprod Med, 1998, 43 (Suppl): 252-62.
- [2] Osuga Y, Tsutsumi O, Okagaki R, et al. Hepatocyte growth factor concentrations are elevated in peritoneal fluid of women with endometriosis[J]. Hum Reprod, 1999, 14(6): 1611-3.
- [3] Starzinski-Powitz A, Zeitvogel A, Schreiner A, et al. In search of pathogenic mechanisms in endometriosis: the challenge for molecular cell biology[J]. Curr Mol Med, 2001, 1(6): 655-64.
- [4] 宗利丽, 李亚里, 哈小琴. 子宫内膜异位症患者腹水与血清中肝细胞生长因子的检测[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(8): 757-60. Zong LL, Li YL, Ha XQ. Determination of HGF concentration in serum and peritoneal fluid in women with endometriosis[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(8): 757-60.
- [5] Kuhnen C, Muehlberger T, Honsel M, et al. Impact of c-Met expression on angiogenesis in soft tissue sarcomas: correlation to microvessel-density[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2003, 129(7): 415-22.