

NGF 及其受体 TrkA 在子宫腺肌病中的表达及与痛经的关系

马亦良 陈忠东[△] 白 军 杨红文 成明强

(南华大学附属第一医院 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:研究 NGF 及其受体 TrkA 在子宫腺肌病患者的异位内膜与在位内膜组织的表达情况及与痛经的关系。方法:采用免疫组化 MaxVision 法检测子宫腺肌病异位内膜(30 例)、在位内膜(30 例)、正常子宫内膜(19 例)标本中 NGF、TrkA 蛋白的表达,分析其表达差异及与痛经的关系。结果:①子宫腺肌病异位内膜组 NGF、TrkA 表达显著高于正常内膜组($P<0.01$),在位内膜组 NGF、TrkA 表达显著高于正常内膜组($P<0.01$),子宫腺肌病异位内膜组 NGF、TrkA 表达与在位内膜组无显著差异。②子宫腺肌病异位内膜组 NGF、TrkA 表达与痛经强度评分呈正相关(相关系数 $r=0.637$ $P=0.000$ $r=0.662$ $P=0.000$)。结论:NGF 及其受体 TrkA 在子宫腺肌病中高表达可能参与子宫腺肌病发病机制,而且可能与痛经有关。

关键词 神经生长因子 酪氨酸激酶受体 A 子宫腺肌病 痛经 免疫组化

中图分类号 R711 R711.71 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)06-1121-03

The expression of NGF and TrkA in patients with adenomyosis and its relationship with dysmenorrhea

MA Yi-liang, CHEN Zhong-dong[△], BAI Jun, YANG Hong-wen, CHENG Ming-qiang

(The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of NGF and TrkA in the ectopic and eutopic endometrium of women with adenomyosis and their relationships with dysmenorrhea. **Methods:** Immunohistochemistry was used to test the expression of NGF and TrkA in the ectopic endometrium of adenomyosis group (30 cases), the eutopic endometrium of adenomyosis group (30 cases), and the endometrium of normal group (19 cases), and to examine the correlations between their expression levels and the pain intensity. **Results:** ① The expression levels of NGF and TrkA in the ectopic and eutopic endometrium of adenomyosis group were higher than normal controls ($P<0.01$), No difference of NGF and TrkA expression levels was found between ectopic and eutopic endometrium of adenomyosis group. There were positive correlations between the expression levels of NGF and TrkA in ectopic endometrium of adenomyosis and the pain intensity ($r=0.637$ $P=0.000$ $r=0.662$ $P=0.000$). **Conclusion:** NGF and TrkA express highly in adenomyosis, and they may play an important role in the pathogenesis and the development of adenomyosis, and they may be correlated to the dysmenorrhea in adenomyosis.

Key words: nerve growth factor; tyrosinekinase A; adenomyosis; dysmenorrhea; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification: R711, R711.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1121-03

前言

子宫腺肌病(adenomyosis)是子宫内膜腺体及间质侵入子宫肌层的一种良性病变。以逐渐加剧的进行性痛经为主要临床表现,伴有经量增多和经期延长,痛经严重影响了女性的生活质量,但其机制尚未完全明确。有报道^[1]子宫腺肌病患者的痛经率高达 64.8%~77.8%。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一类在疼痛过程中起到关键调节作用的神经因子,主要通过低亲和力的 P75 神经营养因子受体(p75 neurotrophin receptor p75NTR)与高亲和力的酪氨酸激酶受体 A(tyrosinekinase A, TrkA)发挥生物学作用,其中高亲和力 NGF 受体 TrkA 被公认为 NGF 的功能性受体,当 NGF 与之结合后,胞外区构象变化导致受体的寡聚化活化,使胞内区的酪氨酸激酶活性增高,介导神经细胞分化信号的传导并参与疼痛发生、发展的各个环节。本研究应用免疫组化法检测 NGF 及其受体 TrkA 蛋白在子

宫腺肌病中的表达及与痛经的关系,为子宫腺肌病防治提供新思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

实验标本来源于 2009 年 3 月~2010 年 12 月间在南华大学附属第一医院妇产科因患子宫腺肌病行子宫切除标本(术后经病理检查证实)取其子宫在位内膜(30 例)及异位内膜(30 例)为研究组。对照组为同期因 CIN(-)行子宫切除的无痛经患者,手术标本术后经病理检查证实子宫内膜正常,取其子宫内膜(19 例)。所有患者术前 6 个月内均未使用过激素,且并不合并其它内分泌或免疫系统疾病,取得的组织切片先进行 HE 染色,筛选出镜下未见慢性炎改变及无合并子宫内膜息肉的组织。两组患者年龄、孕产次、月经天数对比无显著性差异($P>0.05$)。研究组术前按照视觉模拟评分法对患者痛经强度评分:无痛(0 分)2 例,轻度疼痛(1~6 分)13 例,重度疼痛(7~10 分)15 例。

1.2 标本采集

所有的组织标本均在手术室,无菌状态下切取约 $1\text{cm} \times 1\text{cm} \times 1\text{cm}$ 大小用 10%甲醛固定,常规脱水及石蜡包埋,行

作者简介: 马亦良(1980-)男,硕士研究生,主要研究方向:子宫腺肌病 电话:15173440354

△通讯作者: 陈忠东 E-mail: mylszm@163.com

(收稿日期:2011-01-18 接受日期:2011-02-12)

4 μ m 连续切片,备 HE 染色病理确诊筛选及免疫组化染色。

1.3 主要试剂

兔抗人 NGF 多克隆抗体、兔抗人 TrkA 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),MaxVision 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)。

1.4 实验方法

免疫组化染色方法与步骤严格按 MaxVision 免疫组化试剂盒说明书进行。一抗 NGF 抗体工作浓度为 1:100,TrkA 抗体工作浓度为 1:200。以已知阳性子宫内膜细胞癌组织切片作阳性对照,以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照。

1.5 结果判定

采用 Image PlusPro6.0 图像处理分析系统随机选取每张免疫组化切片 3 个不重复的高倍视野($\times 400$),分析各切片中腺体细胞和间质细胞阳性的积分光密度(OD)和阳性面积,分别求出腺体细胞和间质细胞阳性平均光密度值(MOD,其值与阳性程度呈正比),取平均值,作为该切片腺体细胞和间质细胞的测量值,进行半定量分析。

1.6 统计学分析

用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学处理,检验所得数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间计量资料有独立样本 t 检验、多组计量资料间比较用 One-Way ANOVA 分析,多组间两两比较用 LSD 分析,相关性比较用 Pearson 相关分析。 $\alpha = 0.05$, $P < 0.01$,有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色检测 NGF 及 TrkA 表达

2.1.1 NGF 的表达 NGF 主要于子宫内膜腺体细胞的胞浆内表达,间质细胞胞浆中也有表达,阳性染色由弱到强,呈棕黄至黄褐色(图 1)。子宫腺肌病异位内膜细胞组 NGF 表达显著高于正常内膜组($P < 0.01$),在位内膜细胞组 NGF 表达显著高于正常内膜细胞组($P < 0.01$),子宫腺肌病异位内膜细胞组 NGF 表达与在位内膜细胞组无显著差异($P > 0.01$)(表 1)。

2.1.2 TrkA 的表达 TrkA 主要于子宫内膜腺体细胞的胞浆内表达,间质细胞胞浆中也有表达,阳性染色由弱到强,呈棕黄至黄褐色(图 1)。子宫腺肌病异位内膜细胞组 TrkA 表达显著高于正常内膜组($P < 0.01$),在位内膜细胞组 TrkA 表达显著高于正常内膜细胞组($P < 0.01$),子宫腺肌病异位内膜细胞组 TrkA 表达与在位内膜细胞组无显著差异($P > 0.01$)(表 1)。

2.2 NGF 及 TrkA 在子宫腺肌病中的表达与痛经的关系

NGF 在子宫腺肌病异位内膜组中呈高表达,随着痛经评分升高,NGF 在子宫腺肌病异位内膜中的表达呈逐渐增高趋势,Pearson 相关分析痛经评分与 NGF 表达 MOD 值两者存在显著正相关关系(相关系数 $r = 0.637$, $P = 0.000$);TrkA 在子宫腺肌病异位内膜组中呈高表达,随着痛经评分升高,TrkA 在子宫腺肌病在位内膜中的表达呈逐渐增高趋势,Pearson 相关分析痛经评分与 TrkA 表达 MOD 值两者存在显著正相关关系(相关系数 $r = 0.662$, $P = 0.000$),NGF 及 TrkA 在子宫腺肌病在位内膜组表达与痛经评分无明显相关关系(表 2)。

表 1 NGF 及 TrkA 在三种不同子宫内膜组织中的表达 MOD 值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression levels of NGF and TrkA in the different groups

Group	n	NGF	TrkA
Ectopic endometrium group	30	0.2712 \pm 0.0579 [▲]	0.2916 \pm 0.0513 [▲]
Eutopic endometrium group	30	0.2875 \pm 0.0689 [▲]	0.2901 \pm 0.0696 [▲]
Control group	19	0.2058 \pm 0.0449	0.2092 \pm 0.0472

Note :[▲] $P < 0.01$ vs control group

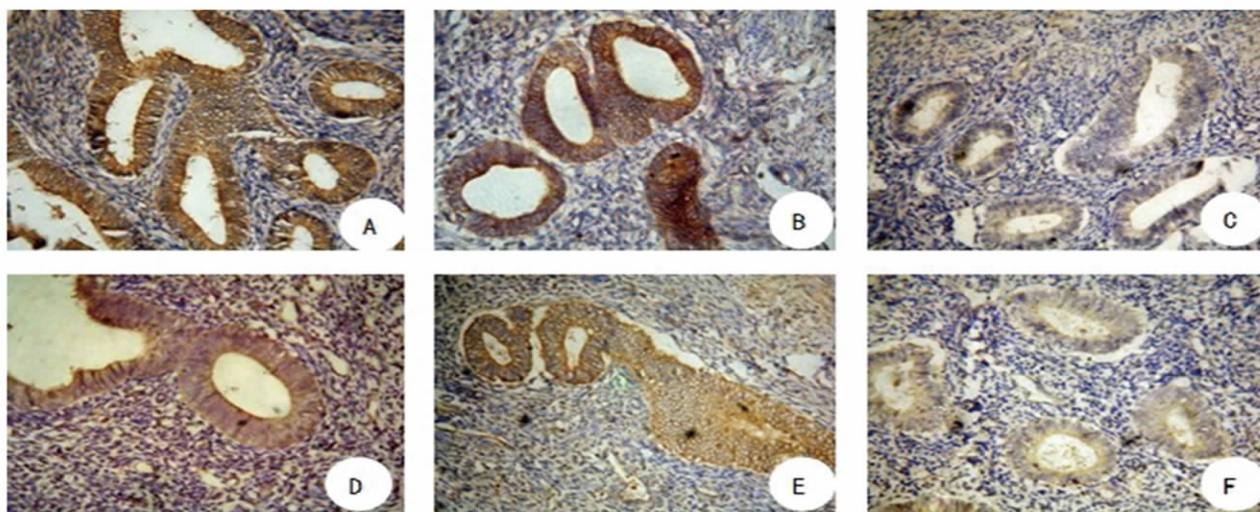


图 1 免疫组化检测 NGF 及 TrkA 蛋白表达(400 \times)

Fig. 1 Immunohistochemical stains for the protein expression of NGF and TrkA(400 \times)

(A) NGF in ectopic endometrium (B) NGF in eutopic endometrium (C) NGF in Control
(D) TrkA in ectopic endometrium (E) TrkA in eutopic endometrium (F) TrkA in Control

表 2 NGF 及 TrkA 在免疫组化表达强度与腺肌病患者痛经强度评分的相关性

Table 2 The relationship between expression levels of NGF and TrkA in adenomyosis and the pain intensity

Group	r	p
NGF in Ectopic endometrium group	0.637	0.000
TrkA in Ectopic endometrium group	0.662	0.000
NGF in Eutopic endometrium group	0.487	0.110
TrkA in Eutopic endometrium group	0.280	0.134

3 讨论

神经生长因子(NGF)是目前研究最为透彻的,具有神经元营养和促轴突生长双重生物学功能的一种神经细胞生长调节因子,它由神经元支配的靶细胞产生后,经轴浆逆向转运到神经元胞体,起到维持交感神经和感觉神经细胞生存,决定轴突生长方向,促进周围神经再生等作用,而 NGF 本身又是一种疼痛介质,能诱导与调控中枢疼痛传导有关的 P 物质(SP)、降钙素基因相关肽(CGRP)和神经紧张肽(NF)的表达^[2]。另外,NGF 能增加感觉神经元的数量,选择性营养参与调节痛觉的小感觉神经纤维及交感神经结神经元^[3]。TrkA 是其高亲和力受体,二者通过结合进一步激活细胞内信号转导通路,实现神经营养信号的传递。有研究发现,NGF 及 TrkA 不仅分布于神经系统,而且也广泛地存在于非神经组织如上皮、间叶及淋巴造血组织,并对神经、非神经组织均具有调节作用。Mechsner 等^[4]发现腹膜内异位灶除 NGF 表达明显升高外,神经营养因子-3 及生长相关蛋白 43 也表达增强,从而认为内异症细胞有神经营养的作用。Anaf 等^[5]报道了卵巢、腹膜、阴道直肠隔部位的异位子宫内膜腺体及间质细胞在增殖期和分泌期均有 NGF 表达,尤其是在阴道直肠隔表达较强,并认为这种表达与内异症的痛觉过敏有关,同时此研究发现在浸润、环绕或邻近内异灶的神经中 TrkA 有强表达,因此病灶的 NGF 和周围神经纤维的受体相互作用,从而发挥对神经生长的诱导作用。Tokushige 等^[6]的研究表明在激素治疗子宫内膜异位症之后不但子宫内膜及基层的神经纤维密度明显降低,Zhang 等^[7]的研究表明腺肌病患者在位内膜功能层神经植入密度异常增高,且疼痛组大于无痛组。内异症的研究中也发现患者阴道直肠隔深部浸润结节^[8,9]、腹膜异位结节^[10,11]、结肠浸润结节^[12]及在位子宫内膜^[13-15]均出现神经分布增多或分布距离增近,这种神经分布的改变与疼痛的出现及程度相关。本研究检测 NGF 及 TrkA 在子宫腺肌病在位、异位内膜上均有高表达,且在在位、异位内膜表达显著高于正常内膜具有统计学意义,而在在位内膜与异位内膜相比差异无统计学意义,推测 NGF 及 TrkA 可能与子宫腺肌病的发病密切相关,与“在位内膜决定论”相符。NGF 及 TrkA 在子宫腺肌病的异位内膜组表达水平与痛经程度成正相关,说明 NGF 及 TrkA 可能参与了子宫腺肌病痛经的产生机制,这为子宫腺肌病的治疗提供了新的思路。

参考文献(References)

[1] Berkley KJ, Rapkin AJ, Papka RE. The pains of endometriosis[J]. Science, 2005,308(5728):1587-9

[2] Halvorson KG, Kubota K, Sevcik MA, et al. A blocking antibody to nerve growth factor attenuates skeletal pain induced by prostate tumor cells growing in bone[J]. Cancer Res, 2005,65(20):9426-35

[3] Nicol GD, Vasko MR. Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks?[J]. Mol Interv, 2007,7(1):26-41

[4] Mechner S, Schwarz J, Thode J, et al. Growth-associated protein 43-positive sensory nerve fibers accompanied by immature vessels are located in or near peritoneal endometriotic lesions [J]. Fertil Steril, 2007,88(3):581-7

[5] Anaf V, Simon P, El NI, et al. Hyperalgesia, nerve infiltration and nerve growth factor expression in deep adenomyotic nodules, peritoneal and ovarian endometriosis [J]. Hum Reprod, 2002,17 (7): 1895-900

[6] Tokushige N, Markham R, Russell P, et al. Effects of hormonal treatment on nerve fibers in endometrium and myometrium in women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 2008,90(5):1589-98

[7] Zhang X, Lu B, Huang X, et al. Innervation of endometrium and myometrium in women with painful adenomyosis and uterine fibroids[J]. Fertil Steril, 2010,94(2):730-7

[8] Wang G, Tokushige N, Russell P, et al. Hyperinnervation in intestinal deep infiltrating endometriosis [J]. J Minim Invasive Gynecol, 2009,16(6):713-9

[9] Coosemans A, Moerman P, Vergote I, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) overexpression in neurons in deep endometriosis: a pilot study [J]. Fertil Steril, 2009,91(4 Suppl):1441-4

[10] Tokushige N, Markham R, Russell P, et al. Nerve fibres in peritoneal endometriosis[J]. Hum Reprod, 2006,21(11):3001-7

[11] Hou Z, Sun L, Gao L, et al. Cytokine array analysis of peritoneal fluid between women with endometriosis of different stages and those without endometriosis[J]. Biomarkers, 2009,14(8):604-18

[12] Fraser IS. Mysteries of endometriosis pain: Chien-Tien Hsu Memorial Lecture 2009[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2010,36(1):1-10

[13] Howard FM. Endometriosis and mechanisms of pelvic pain[J]. J Minim Invasive Gynecol, 2009,16(5):540-50

[14] Zhang G, Dmitrieva N, Liu Y, et al. Endometriosis as a neurovascular condition: estrous variations in innervation, vascularization, and growth factor content of ectopic endometrial cysts in the rat [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008,294(1):R162-71

[15] Sammour A, Pirwany I, Usulutun A, et al. Correlations between extent and spread of adenomyosis and clinical symptoms [J]. Gynecol Obstet Invest, 2002,54(4):213-6