

YKL-40 和 NF- κ B 在子宫内膜异位症中的表达及相关性研究

王秀玲 卢美松[△] 李翠萍 孙雪竹 常桂荣 吕冠军

(哈尔滨医科大学附属第一医院妇产科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的 通过检测人类软骨蛋白 39(YKL-40)和核转录因子 KappaB(NF- κ B)在子宫内膜异位症组织中的表达,探讨二者与子宫内膜异位症的关系及二者的相关性。方法 用免疫组化二步法检测 40 例子宫内膜异位症(EMS)患者的异位内膜和在位内膜及 40 例子宫肌瘤患者子宫内膜(对照组)YKL-40 和 NF- κ B 的表达,并对检测结果进行统计学分析。结果 YKL-40、NF- κ B 在子宫内膜异位症患者的异位和在位内膜及对照组内膜中的表达率分别为 67.5%、62.5%、35%及 88.5%、57.5%、32.5%,差异有统计学意义($P<0.01$)。在不同月经周期 YKL-40 表达无统计学意义,在位内膜和正常内膜 NF- κ B 的表达分泌期高于增殖期,差异有统计学意义($P<0.05$)。YKL-40 和 NF- κ B 在三种内膜中的表达具有正相关性,相关系数分别是 0.305、0.267 和 0.457 ($P<0.01$)。结论 YKL-40 和 NF- κ B 在 EMS 发生发展中起重要的作用。

关键词 子宫内膜异位症;人类软骨蛋白 39(YKL-40);NF- κ B;免疫组织化学

中图分类号 R711.71 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)23-4454-04

Expressions and Correlation of YKL-40 and Nuclear Factor- κ B in Endometriosis

WANG Xiu-ling, LU Mei-song[△], LI Cui-ping, SUN Xue-zhu, CHANG Gui-rong, LV Guan-jun

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expressions of Human cartilage glycoprotein-39 (YKL-40) and Nuclear factor- κ B in endometriosis, and to evaluate the relationship between the YKL-40 and NF- κ B expressions. **Methods:** Immunohistochemistry was used to examine the YKL-40 and NF- κ B protein expressions in eutopic ($n=40$) and ectopic ($n=40$) endometrium of Ems, as well as endometrium of hystromyoma ($n=40$). The results were analyzed statistically. **Results:** The positive rate of YKL-40 and NF- κ B expressions in ectopic, eutopic and normal endometrium respectively were 67.5%, 62.5%, 35% and 88.5%, 57.5%, 32.5% ($P<0.01$); NF- κ B expression was higher in secretory phase than that in proliferative phase in the eutopic and normal endometrium ($P<0.05$), but YKL-40 was not correlated with the phase of menstrual cycle; Furthermore, the expression of YKL-40 and NF- κ B protein was positively correlated in these three medometrial tissue ($rs=0.305, 0.247$ and $0.467, P<0.01$). **Conclusion:** The over expression of YKL-40 and NF- κ B may play an important role in the pathogenesis of endometriosis.

Key words: Endometriosis; Human cartilage glycoprotein-39(YKL-40); Nuclear factor- κ B; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R711.71 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)23-4454-04

前言

子宫内膜异位症(endometriosis EMS)是育龄期妇女常见的妇科疾病,虽为良性疾病,但在细胞增殖、凋亡、血管形成、侵袭性等方面与恶性肿瘤类似,近年来,其发病率逐渐升高,但发病机制至今仍不完全清楚。YKL-40 属于哺乳动物壳质酶样蛋白成员,在多种恶性肿瘤中高度分泌及表达,近年研究表明,它与多种妇科疾病关系密切,如卵巢癌^[1]、内膜癌^[2]、宫颈癌^[3]、腺肌症^[4]等,近年来受到了广泛关注,但目前有关 YKL-40 与 EMS 的研究仍较少。NF- κ B 是一种重要的基因转录调控因子,参与细胞因子、黏附分子、血管活性调节因子的调节,研究证实 YKL-40 的启动子区域含有 NF- κ B 的结合位点, NF- κ B 在诱

导 YKL-40 的过度表达中可能起着重要作用^[5]。本研究通过检测 YKL-40 及 NF- κ B 在 EMS 组织中的表达情况,分析两者在 EMS 在位内膜、异位内膜中表达的意义及相关性,探讨其在 EMS 发生、发展中的作用,为 EMS 发病机制的阐明提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 10 月-2011 年 9 月在哈尔滨医科大学附属第一医院妇科腔镜中心住院行手术治疗,并经病理诊断证实为 EMS 患者 40 例,取其在位内膜和异位内膜,年龄 23-42 岁,平均 32 ± 4.2 岁,其中增殖期 22 例,分泌期 18 例。同期单纯子宫肌腺症患者 20 例,术前通过刮宫取其子宫内膜标本为对照组,年龄 22-43 岁,平均 33 ± 4.7 岁,其中增生期 21 例,分泌期 19 例。三组患者术前均未使用激素类药物或使用过宫内节育器(IUD),月经均规律,无不规则阴道流血,无内外科疾病。

1.2 检测方法

作者简介 王秀玲(1983-)女,硕士研究生。电话:13796738434, Email:healthywangxiuling@163.com

△通讯作者 卢美松,女,硕士导师。

E-mail: lumeisong0417@163.com

(收稿日期 2011-12-19 接受日期 2012-01-12)

标本经 10%福尔马林固定，常规石蜡包埋 3μm 连续切片，用免疫组化二步法，YKL-40 抗体稀释浓度为 1:400，NF-κ B 抗体稀释浓度为 1:100，染色步骤严格按试剂盒要求进行，以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作空白对照，以乳腺癌为阳性对照，DAB 显色剂显色。鼠抗人 YKL-40 单克隆抗体购自北京博奥森生物公司，鼠抗人 NF-κ B 单克隆抗体、免疫组化二步法试剂盒和 DAB 显色剂均购自北京中杉公司。

1.3 结果判定

YKL-40 和 NF-κ B 阳性信号均呈棕黄色或棕褐色，YKL-40 蛋白主要表达在内膜上皮腺上皮细胞的胞浆，胞核无表达，NF-κ B 蛋白主要表达于子宫内膜腺上皮细胞的胞浆和胞核中，但以胞浆表达为主。按 FDA 推荐的染色强度分级：①阴性(-)：细胞无着色或阳性细胞数 <5%；②弱阳性(+)：细胞轻度着色呈淡黄色，阳性细胞数 5%-25%；③阳性(++)：细胞着色呈深黄色，阳性细胞数 25%-50%；④强阳性(+++)：细胞明显着色，呈棕黄色，阳性细胞数 >50%。结果判断在双盲下进行，每张切片由两名病理科医生分别计数。因样本数小，为统计方便，将阳性(++)表达与强阳性(+++)表达合并为高表达，弱阳性(+)表达与阴性(-)表达合并为低表达。

1.4 统计学处理

应用 SPSS16.0 统计软件对资料进行卡方检验和 spearman 相

关分析。

2 结果

2.1 YKL-40 在三组内膜中表达

各组的 YKL-40 蛋白主要表达在内膜腺上皮细胞的胞浆，胞核无表达。YKL-40 在三组内膜中的表达强弱顺序为异位内膜 > 在位内膜 > 正常内膜，阳性率分别为 67.5%、62.5%、35%，组间差异有统计学意义(P=0.007, P<0.01)，在不同月经周期中三组内膜表达差异均无统计学意义(P>0.05)。见表 1-2，图 1。

2.2 NF-κ B 在三组内膜中的表达

各组的 NF-κ B 蛋白主要表达于子宫内膜腺上皮细胞的胞浆和胞核中，但以胞浆表达为主。NF-κ B 在三组内膜中的表达强弱顺序为异位内膜 > 在位内膜 > 正常内膜，表达率分别为 88.5%、57.5%、32.5%，组间差异有统计学意义(P=0.000001，P<0.01)；在位内膜和正常内膜中，分泌期高于增殖期，差异有统计学意义(P=0.048, P<0.05)，异位内膜无周期性改变。见表 1-2，图 2。

2.3 YKL-40 和 NF-κ B 在 3 种内膜中表达的相关性

三组内膜中 YKL-40 和 NF-κ B 表达的相关系数分别是 r¹=0.305 (P<0.01)，r²=0.267(P<0.01)，r³=0.457(P<0.01)，说明两因子表达呈正相关。

表 1 YKL-40 和 NF-κ B 在 3 种不同内膜组织中的表达

Table 1 The expression of YKL-40 and NF-κ B in nomal,eutopic and ectpic endometrial tissues

Group	n	Expression of YKL-40		Rate of high expression	Expression of NF-κ B		Rate of high expression
		Low expression(n)	High expression(n)		Low expression(n)	High expression(n)	
Ectopic endometrial tissue	40	13	27	67.5%	5	35	88.5%
Eutopic endometrial tissue	40	15	25	62.5%	17	23	57.5%
Normal endometrial tissue	40	26	14	35%	27	13	32.5%

3 讨论

YKL-40 又名人类软骨蛋白-39(HCgp-39)是 Johansen 等在 1992 年研究发现的一种在体外人骨肉瘤细胞株 MG63 中大量分泌的蛋白^[6]，依据其氨基末端分别为酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、亮氨酸(L)及相对分子质量约为 40 000 而命名。YKL-40 编码基因位于 1 号染色体的 q31-q32 上，包含 10 个外显子和跨越了 18kb 的基因组 DNA，含有 383 个氨基酸^[7-8]。依据其氨基酸，YKL-40 属于糖类水解酶 18 家族，但由于它与哺乳动物壳质酶类似蛋白的氨基酸序列具有极高的同源性，而将其归类于壳质酶类似蛋白家族的一员。近年来研究认为其与恶性肿瘤联系密切，人类多种肿瘤细胞可以过表达和分泌 YKL-40，包括恶性胶质细胞瘤^[9]、胰腺癌、乳腺癌^[10]、卵巢癌、前列腺癌^[11]、肺癌^[12]、胃肠道癌^[13]、肾癌、骨髓肿瘤^[14]和脑肿瘤等，通过基因微阵列分析 YKL-40 在起源于这些肿瘤细胞株的不同上皮细胞和间

质细胞均显示出过表达^[15-16]。与 YKL-40 作用的相关受体尚未发现。但 Johansen Js 等通过对近几年 YKL-40 在肿瘤细胞的增生、分化、生长、侵袭和转移，血管炎症反应以及肿瘤周围细胞外基质的重塑起重要作用，其具有生长因子作用及抗凋亡蛋白作用^[15-16]。Kim 等于 2010 年首次研究发现 YKL-40 蛋白在子宫内膜异位症中高表达^[17]。本研究表明 YKL-40 蛋白在 EMS 异位内膜、在位内膜的阳性表达率分别为 67.5%、62.5%，显著高于对照组，与 KIM PJ 的研究结果一致，提示 YKL-40 蛋白在 EMS 在位内膜组织中的表达增强，抑制内膜上皮细胞凋亡及侵袭、转移的能力增强，这些凋亡率降低的、转移能力增强的上皮细胞经输卵管逆流至盆腔后，在盆腔内的生存时间延长，可促使内异症得以发生、发展，此结果支持 "在位内膜决定论" 的观点，即在位内膜某些生物学性质的改变是决定经血逆流或经血中的内膜碎片能否在 "异地" 黏附、侵袭、生长的关键，在位内膜的差异是发生内异症的决定因素^[18]，而 YKL-40 蛋白在

表 2 内膜增殖周期与 YKL-40 和 NF-κ B 表达的关系
Table 2 The expression of YKL-40 and NF-κ B in the endometrial tissues of different phase

Group	n	Expression of YKL-40		Rate of high expression	Expression of NF-κ B		Rate of high expression
		Low expression(n)	High expression(n)		Low expression(n)	High expression(n)	
Proliferative phase							
Ectopic endometrial tissue	22	7	15	68.2%	3	19	86.4%
Eutopic endometrial tissue	22	8	14	63.6%	10	12	54.5%
Normal endometrial tissue	21	14	17	33.3%	16	5	23.8%
Seurefory phase							
Ectopic endometrial tissue	18	6	12	66.7%	2	16	88.9%
Eutopic endometrial tissue	18	7	11	66.1%	7	11	61.1%
Normal endometrial tissue	19	12	7	36.8%	11	8	42.1%

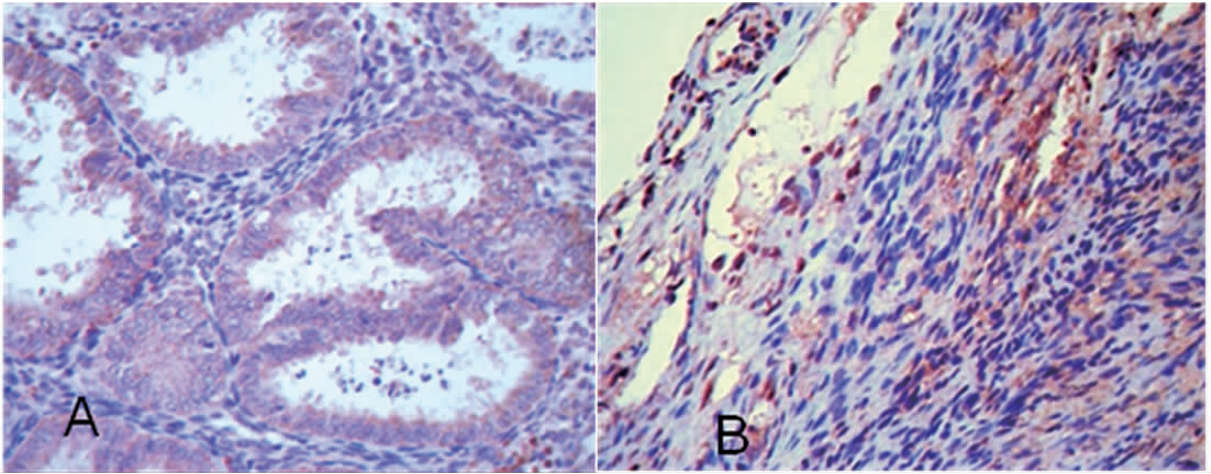


图 1 YKL-40 在在位内膜(A)和异位内膜(B)中的阳性表达(400×)
Fig.1 The expression of YKL-40 in eutopic(A) and ectopic(B) (400×)

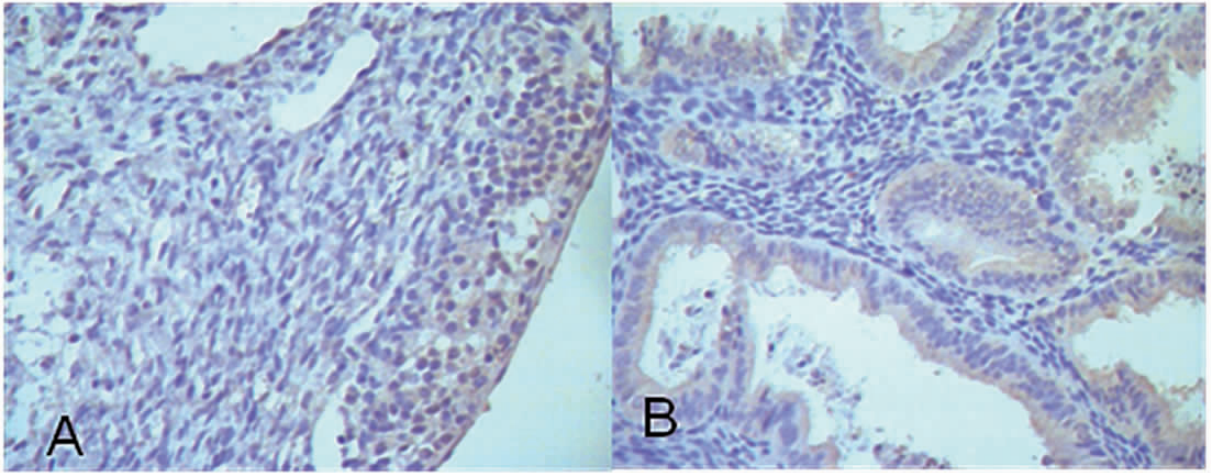


图 2 NF-κ B 在异位内膜(A)和在位内膜(B)中的阳性表达(400×)
Fig.2 The expression of NF-κ B ectopic(c) and eutopic(D)(400×)

异位灶组织中的表达亦升高,可使异位灶内膜细胞抗凋亡能力明显增强,促进了其周围血管发生和组织重塑,破坏了细胞增殖和凋亡的平衡,使异位后的内膜具有更强的侵袭及种植能力,有利于其在盆腔内继续种植、存活,又可促使 EMS 的发生、发展。本研究结果还显示不同月经周期期间 YKL-40 的表达未发现差别。本结果表明,YKL-40 蛋白表达的高低与月经周期关系不大,可能是因为本研究中患者例数偏少导致结果无差异,具体原因有待于进一步研究。

NF- κ B 是近年来发现的细胞内重要转录调控因子。其广泛存在于细胞中,具有多种调节作用,作为信号传导途径中的枢纽,参与炎症、免疫、肿瘤的发生和发展、细胞凋亡的调节以及胚胎的发育等多种生理、病理过程的基因调控,是一种关键性的核转录因子。近年来研究表明 NF- κ B 在在位内膜和异位内膜中高表达,与内异症的发病机制关系密切^[19-21]。本研究显示 NF- κ B 主要表达于腺上皮细胞浆中,EMS 异位内膜、在位内膜组织中阳性率分别 88.5%、57.5%,高于对照组;分泌期高于增生期,而且在位内膜组分泌期的表达高于对照组的分泌期。提示异位内膜细胞中 NF- κ B 的激活与 EMS 的发病有关,且在分泌期 NF- κ B 更易激活,对疾病的发生发展及演进有重要作用。

从本实验结果中可以看出,YKL-40、NF- κ B 在正常子宫内膜中均有少量表达,在在位内膜和异位内膜中高表达,且呈正相关,从而我们推测:在正常子宫内膜细胞,NF- κ B 含量少,可能是未达到异常激活的水平;而在位及异位子宫内膜细胞,由于细胞内 NF- κ B 表达可能已达到或超过异常激活的水平,故 YKL-40 表达过高,而 YKL-40 表达异常又刺激 NF- κ B 进一步活化,从而出现正反馈调节。由此可见,在 EMS 中 NF- κ B 可能在诱导 YKL-40 的表达中起着重要的作用,从而使逆流的内膜易于种植、生长。关于 YKL-40 在 EMS 中所起的具体作用及 NF- κ B 在诱导 YKL-40 表达的具体信号传导通路和机制,需要进一步研究,将有助于揭开内异症的发病机制,从而可以发现更有效的治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Gronlund B, Hogdall EV, Johansen JS, et al. Pretreatment prediction of chemoresistance in second-line chemotherapy of ovarian carcinoma: value of serological tumor marker determination (tetranectin, YKL-40, CASA, CA125)[J]. *Int J Biol Markers*, 2006,21(2):141-148
- [2] Peng C, Peng J, Jiang L, et al. YKL-40 protein levels and clinical outcome of human endometrial cancer[J]. *J Int Med Res*, 2010,38(4):1448-1457
- [3] Mitsuhashi A, Matsui H, Usui H, et al. Serum YKL-40 as a marker for cervical adenocarcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2009,20(1):71-77
- [4] 尹绪爱,肖大树. YKL-40 在子宫腺肌病在位内膜及异位内膜中的表达及临床意义[J]. *安徽医学*, 2010,31(10):1159-1161
Yin Xu-ai, Xiao Da-shu. Expression and clinical significance of YKL-40 on eutopic and ectopic endometrium in adenomyosis [J]. *Anhui Medical Journal*, 2010,31(10):1159-1161
- [5] Bhat KP, Pellski CE, Zhang YJ, et al. Selective repression of YKL-40 by NF- κ B in glioma cell lines involves recruitment of histone deacetylase-1 and-2[J]. *FEBS letters*, 2008,582(21-22):3193-3200
- [6] Johansen JS, Williamson MK, Rice JS, et al. Identification of proteins secreted by human osteoblastic cells in culture. *J Bone Miner Res*, 1992,7:501-512
- [7] Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, et al. Serum YKL-40, A New Prognostic Biomarker in Cancer Patients? [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006,15(2):194-202
- [8] Rehli M, Niller HH, Ammon C, et al. Transcriptional regulation of CHI3L1, a marker gene for late stages of macrophage differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2003,(278):44058-44067
- [9] Hormigo A, Gu B, Karimi S, et al. YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas[J]. *Clin Cancer Res*, 2006,12(9):5698-5704
- [10] Johansen JS, Christensen IJ, Riisbro R, et al. High serum YKL-40 levels in patients with primary breast cancer is related to short recurrence free survival[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003,80(1):15-21
- [11] Johansen JS, Brasso K, Iversen P, et al. Change of biochemical markers of bone turnover and YKL-40 following hormonal treatment for metastatic prostate cancer are related to survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(11):3244-3249
- [12] Johansen JS, Drivsholm L, Price PA, et al. High serum YKL-40 level in patients with small cell lung cancer is related to early death[J]. *Lung Cancer*, 2004,46(3):333-340
- [13] Johansen JS, Bojesen SE, Mylin AK, et al. Elevated plasma YKL-40 predicts increased risk of gastrointestinal cancer and decreased survival after any cancer diagnosis in the general population[J]. *J Clin Oncology*, 2009(27):572-578
- [14] Mylin AK, Rasmussen T, Johansen JS, et al. Serum YKL-40 concentrations in newly diagnosed multiple myeloma patients and YKL-40 expression in malignant plasma cells [J]. *Eur J Haematol*, 2006,77(5):416-424
- [15] Johansen JS, Jensen BV, Roslind A, et al. Serum YKL-40, a new prognostic biomarker in cancer patients?[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(2):194-202
- [16] Ringsholt M, Johansen JS, Price PA, et al. YKL-40 protein expression in normal adult human tissues-an immunohistochemical study[J]. *J Mol Histol*, 2007,38(1):33-43
- [17] Kim PJ, Hong DG, Park JY, et al. Immunohistochemical expression of YKL-40 in peritoneal endometriosis[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2010,26(1):58-62
- [18] 郎景和. 子宫内位异位症的研究与设想 [J]. *中华妇产科杂志*, 2003,38(8):33-35
Lang Jing-he. The research and assumption of endometriosis[J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2003,38(8):33-35
- [19] Sun XH. Research of the role about NF- κ B in pathogenesis of endometriosis[J]. *J Med Res*, 2009,38(9):93-96
- [20] Zhang JJ, Xu ZM, Chang H, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates nuclear factor- κ B activation, cyclo-Oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic epithelial cells[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2011,72(3):163-168
- [21] Liad RS, Fleming SD, Murphy CR, et al. Immunohistochemical study of the ubiquitin-nuclear factor-K B pathway in the endometrium of the baboon (*Papio anubis*) with and without endometriosis[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2010,22(7):1118-1130