

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.11.006

文章编号: 1005-8982 (2019) 11-0031-05

临床研究·论著

## Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 在子宫腺肌病组织中的表达及意义\*

李灿宇<sup>1</sup>, 刘欢欢<sup>1</sup>, 党秋红<sup>2</sup>, 申爱荣<sup>1</sup>, 封全灵<sup>1</sup>

(郑州大学第三附属医院 1. 妇科, 2. 病理科, 河南 郑州 450052)

**摘要:** **目的** 探讨半乳糖凝集素 3 (Galectin-3)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 在子宫腺肌病在位内膜、异位内膜组织中的表达和意义。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western blotting 分别检测 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 在 20 例子宫腺肌病在位内膜组织和 20 例正常对照内膜组织中 mRNA 和蛋白的相对表达。免疫组织化学法分别检测 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 在 40 例子宫腺肌病在位内膜、异位内膜组织和 40 例正常对照内膜组织中蛋白的表达, 分析其在异位内膜组织中高表达的相关性。**结果** 与正常对照内膜比较, Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 在子宫腺肌病在位内膜组织中 mRNA 相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 蛋白相对表达量也升高 ( $P < 0.05$ )。与正常对照内膜比较, Galectin-3 和 VEGF 在子宫腺肌病内膜中高表达 ( $P < 0.05$ )。Galectin-3 和 MMP-9 ( $r = 0.493$ ,  $P = 0.001$ )、Galectin-3 和 VEGF ( $r = 0.616$ ,  $P = 0.000$ )、MMP-9 和 VEGF ( $r = 0.441$ ,  $P = 0.004$ ) 高表达之间均呈正相关。**结论** Galectin-3、VEGF 和 MMP-9 在子宫腺肌病内膜组织中表达升高且呈正相关, 可能共同参与子宫腺肌病的发生和异位侵袭。

**关键词:** 子宫疾病; 半乳糖凝集素 3; 基质金属蛋白酶 9; 血管内皮生长因子类

**中图分类号:** R711.71

**文献标识码:** A

## Clinical significance of expression of galectin-3, MMP-9 and VEGF in adenomyosis\*

Can-yu Li<sup>1</sup>, Huan-huan Liu<sup>1</sup>, Qiu-hong Dang<sup>2</sup>, Ai-rong Shen<sup>1</sup>, Quan-ling Feng<sup>1</sup>

(1. Department of Gynecology, 2. Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052 China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and clinical significance of galectin-3, MMP-9 and VEGF in endometrial tissues of adenomyosis. **Methods** Relative expression of galectin-3, MMP-9 and VEGF in eutopic endometrial tissues of 20 cases of adenomyosis and 20 normal controls were detected by RT-PCR and Western blot. Immunohistochemical staining was performed to detect expression of galectin-3, MMP-9 and VEGF in eutopic endometrium and ectopic endometrium of 40 cases of adenomyosis as well as 40 cases of normal endometrium. The correlation of galectin-3, MMP-9 and VEGF in ectopic endometrium was analyzed. **Results** Levels of galectin-3, MMP-9 and VEGF demonstrated by RT-PCR and Western blot were increased significantly in eutopic endometrium compared with those in normal endometrium ( $P < 0.05$ ). Compared with normal controls, expression of galectin-3 and VEGF detected by immunohistochemistry in adenomyosis endometrium are significantly higher ( $P < 0.05$ ). Positive correlation of increased expression between galectin-3 and MMP-9 ( $r = 0.493$ ,  $P = 0.000$ ), galectin-3 and VEGF ( $r = 0.616$ ,  $P = 0.000$ ), MMP-9 and VEGF ( $r = 0.441$ ,  $P = 0.004$ ) were identified. **Conclusions** Galectin-3, MMP-9 and VEGF increase in endometrial tissues of adenomyosis, which may be involved in development and progression of

收稿日期: 2018-12-07

\* 基金项目: 河南省科技攻关项目 (No: 182102310142); 河南省省直医疗机构服务能力提升工程专科建设项目 (No: 豫卫医 [2017]66 号)

adenomyosis.

**Keywords:** uterine diseases; Galectin-3; MMP-9; VEGF

子宫腺肌病是严重危害妇女健康的一种疾病,发病机制尚不明确<sup>[1]</sup>,血管生成可能是子宫腺肌病发生的重要因素<sup>[2]</sup>。半乳糖凝集素 3 (Galectin-3) 与多种疾病的发生、发展关系密切,是潜在的诊断标志物和治疗靶点<sup>[3]</sup>。Galectin-3 在调节血管生成中也发挥重要作用<sup>[4]</sup>,但其在子宫腺肌病发生中的作用尚不清楚。本研究检测 Galectin-3、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在子宫腺肌病在位内膜和异位内膜组织中的表达,分析 3 者在异位内膜组织中高表达的相关性,以期探讨子宫腺肌病新的治疗策略提供参考,现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2014 年 1 月—2015 年 12 月郑州大学第三附属医院行手术治疗并经病理证实的子宫腺肌病患者 40 例作为子宫腺肌病组,年龄 34 ~ 54 岁,分别取其在位内膜组织和异位内膜组织用于研究,其中分泌期内膜 25 例,增殖期内膜 15 例。选取同期子宫肌瘤患者 40 例作为正常对照组,排除子宫腺肌病和子宫内膜异位症患者,取其正常子宫内膜组织用于研究,其中分泌期内膜 22 例,增殖期内膜 18 例。从上述患者中分别选取 20 例子宫腺肌病在位内膜和正常对照子宫内膜组织用于逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 和 Western blotting 检测,新鲜组织标本采集后液氮冷冻保存,所用组织标本经 10% 中性甲醛固定后石蜡包埋保存。研究经本院医学伦理委员会同意,所有标本采集征得患者同意并签署知情同意书。

### 1.2 序列与试剂

Galectin-3 引物序列参考文献 [5],其他引物同参考文献 [6] (Galectin-3, 正向引物:5'-GAATGATGTTGCCTTCCAG-3', 反向引物:5'-CACTGGTGAGGTCTATGTCA C-3'; MMP-9, 正向引物:5'-TTGACAGCGACAAGAAGTGG-3', 反向引物:5'-TCAGGGCGAGGACCATAGA-3'; VEGF, 正向引物:5'-CCCACCCACATACATAGAT T-3', 反向引物:5'-CTCCCAACTCAAGTCCACA-3')。Trizol 试剂、Taq Master Mix (CW0682M)、兔抗人

GAPDH 多克隆抗体 (CW0101M) 购自北京康为世纪生物科技有限公司,逆转录试剂盒 (K1622) 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司,羊抗人 MMP-9 多克隆抗体 (SC-6840)、鼠抗人 Galectin-3 单克隆抗体 (TA804697)、鼠抗人 VEGF 单克隆抗体 (TA803263)、兔抗人单克隆抗体 MMP-9 (ZA-0562) 和兔抗人多克隆抗体 VEGF (ZA-0509) 购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

### 1.3 RT-PCR 检测

Trizol 法提取总 RNA,紫外分光光度计分析纯度,A260/A280 为 1.8 ~ 2.0。选择 GAPDH 为内参,在 MMLV RTase 作用下以随机引物进行逆转录。反应体系共 50  $\mu$ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 90 s,94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,57 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,重复 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min,最后 4 $^{\circ}$ C 终止反应。RT-PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳。以目的基因与内参的平均吸光度比值来计算目的基因 mRNA 的表达水平。

### 1.4 Western blotting 检测

取组织各 0.2 g 于液氮中砸碎,研磨成粉末状后转移至离心管中,加入蛋白裂解液充分裂解细胞,置于冰上 20 min,经超声处理后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液并用 Bradford 法定量。用 10% SDS-PAGE 电泳分离,转至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶封闭后用 TBST 缓冲液洗净,分别加入一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。之后回收一抗,TBST 洗净后加入辣根过氧化物酶 (HRP) 二抗,1 h 后洗膜,增强型化学发光试剂 (ECL) 底物显影。以 Image-Pro Plus 6.0 扫描计算吸光度值,以目标蛋白与 GAPDH 蛋白的比值来表示目的蛋白的相对表达水平。

### 1.5 免疫组织化学法检测

所有组织标本经石蜡包埋,3  $\mu$ m 连续切片,用苏木精-伊红 (haematoxylin endeosin, HE) 染色法观察病理变化,用 Envision 免疫组织化学二步法检测蛋白表达情况。实验步骤参照试剂盒说明书进行操作,阳性对照切片由试剂公司提供,染色结果为阳性。阴性对照用 PBS 缓冲液代替一抗,染色结果为阴性。

### 1.6 免疫组织化学结果判定

每张切片选 10 个高倍视野 (400 倍),根据染色

范围及染色强度来计算评分。按阳性细胞所占百分比评分：无阳性细胞者为 0 分，1% ~ 25% 为 1 分，26% ~ 50% 为 2 分，51% ~ 75% 为 3 分，76% ~ 100% 为 4 分；按染色强度进行评分：其中棕褐色为 3 分，棕黄色为 2 分，淡黄色为 1 分，无着色为 0 分。将阳性细胞所占百分比与染色强度评分相乘，所得乘积为总分。若总评分 ≤ 6 分者为低表达，总评分 > 6 分者为高表达。

### 1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，比较采用 *t* 检验，计数资料以例 (%) 表示，比较采用  $\chi^2$  检验，进一步的两两比较采用  $\chi^2$  分割法，相关性分析采用 Pearson 相关性检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义， $\chi^2$  分割法两两比较时，*P* < 0.0167 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF mRNA 的相对表达

分别检测 20 例正常对照子宫内膜组织和 20 例子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF mRNA 的相对表达 (见表 1 和图 1)，子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF mRNA 的表达与正常对照组比较，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF mRNA 的表达均升高。

### 2.2 子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白的相对表达

分别检测 20 例正常对照子宫内膜组织和 20 例子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白的相对表达 (见图 1 和表 2)，子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白表

表 1 子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF mRNA 的相对表达 (*n* = 20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	Galectin-3	MMP-9	VEGF
正常对照组	0.350 ± 0.091	0.281 ± 0.089	0.288 ± 0.086
子宫腺肌病组	0.506 ± 0.120	0.415 ± 0.144	0.403 ± 0.093
<i>t</i> 值	4.601	3.549	4.055
<i>P</i> 值	0.000	0.001	0.000

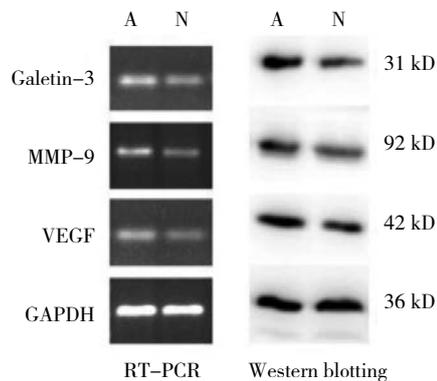
达与正常对照组比较，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达均升高。

### 2.3 子宫腺肌病在位、异位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白的高表达

分别检测 40 例正常对照子宫内膜组织和 40 例子宫腺肌病在位、异位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达 (见图 2)。与正常对照子宫内膜组织比较，子宫腺肌病异位内膜组织中 Galectin-3 和 VEGF 蛋白高表达，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)；3 组 MMP-9 蛋白高表达比较，差异无统计学意义 (*P* > 0.05) (见表 3)。

### 2.4 子宫腺肌病异位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白高表达的相关性

Pearson 相关性分析结果显示，Galectin-3 和 MMP-9 高表达呈正相关 (*r* = 0.493, *P* = 0.001)，Galectin-3 和 VEGF 高表达呈正相关 (*r* = 0.616, *P* = 0.000)，MMP-9 和 VEGF 高表达呈正相关 (*r* = 0.441, *P* = 0.004)。



A: 子宫腺肌病在位内膜组织；N: 正常对照子宫内膜组织；(*n* = 10, 等量混合后加样)

图 1 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF mRNA 和蛋白的相对表达情况

表 2 子宫腺肌病在位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白的相对表达 (*n* = 20,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	Galectin-3	MMP-9	VEGF
正常对照组	0.376 ± 0.121	0.347 ± 0.112	0.359 ± 0.113
子宫腺肌病组	0.522 ± 0.151	0.435 ± 0.151	0.476 ± 0.127
<i>t</i> 值	3.381	-2.076	3.058
<i>P</i> 值	0.002	0.045	0.004

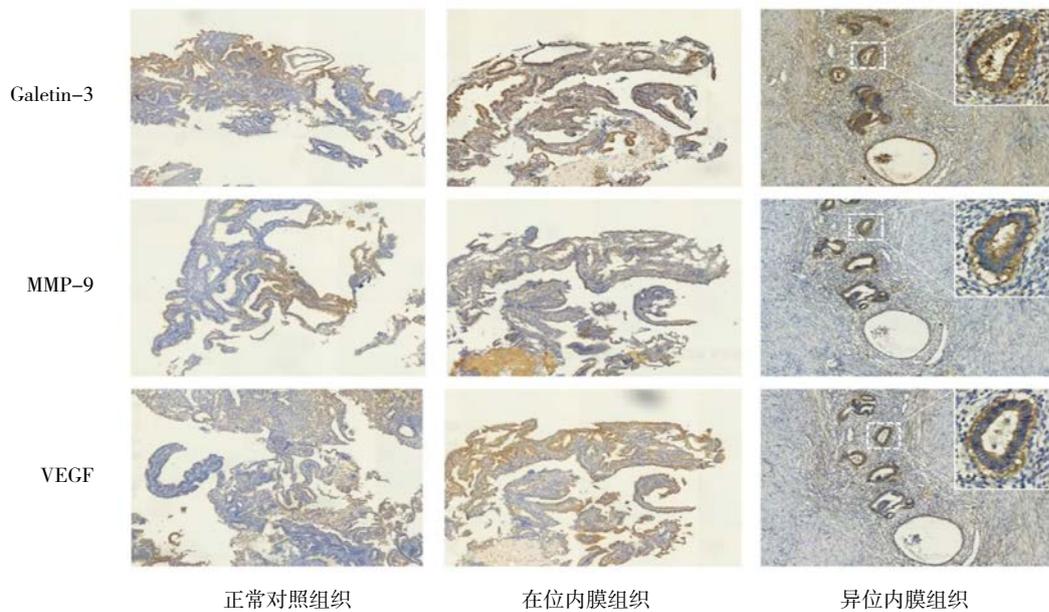


图 2 正常对照子宫内、子宫腺肌病在位和异位内膜组织中 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白的表达  
(Envision 二步法  $\times 100$ )

表 3 Galectin-3、MMP-9 和 VEGF 蛋白在子宫腺肌病在位、异位内膜和正常对照内膜组织中表达情况 [n=40, 例 (%)]

组别	Galectin-3		MMP-9		VEGF	
	高表达	低表达	高表达	低表达	高表达	低表达
正常对照组织	11 (27.5)	29 (72.5)	7 (17.5)	33 (82.5)	8 (20.0)	32 (80.0)
在位内膜组织	19 (47.5)	21 (52.5)	13 (32.5)	27 (67.5)	16 (40.0)	24 (60.0)
异位内膜组织	22 (55.0) <sup>†</sup>	18 (45.0) <sup>†</sup>	15 (37.5)	25 (62.5)	18 (45.0) <sup>†</sup>	22 (55.0) <sup>†</sup>
$\chi^2$ 值	6.584	-	4.195	-	6.154	-
P 值	0.037	-	0.123	-	0.046	-

注: † 与正常对照组织比较,  $P < 0.0167$

### 3 讨论

子宫腺肌病是指子宫内膜腺体和间质细胞在子宫肌层呈弥漫或局限性生长, 引起月经过多、痛经、不孕不育等表现, 严重影响患者身心健康, 但仍缺乏有效的临床治疗策略<sup>[7]</sup>。子宫腺肌病的病因和发病机制尚不十分清楚, 可能具有较为独特的分子病理学特征<sup>[8]</sup>, 炎症因子、增殖-凋亡失衡、血管生成等可能参与子宫腺肌病的发生<sup>[9]</sup>, 因此, 了解其发病机制对寻找有效治疗策略有重要意义。

Galectin-3 是半乳糖凝集素家族中唯一的嵌合型成员, 在人体组织中广泛表达, 参与细胞的增殖、分化及凋亡过程, 以及参与炎症反应调节等多种生物学行为<sup>[10-11]</sup>。Galectin-3 表达与子宫内膜性疾病如子宫内膜异位症<sup>[12]</sup>、子宫内膜癌<sup>[13]</sup> 发生密切相关。有研

究表明 Galectin-3 在血管生成中也发挥重要作用, 可调节肿瘤<sup>[14]</sup>、角膜等<sup>[14]</sup> 多种组织新生血管生成。本研究结果显示, Galectin-3 在子宫腺肌病在位内膜组织中 mRNA 和蛋白表达均高于正常对照子宫内膜组织, 而异位内膜组织中 Galectin-3 高表达率更高, 提示 Galectin-3 可能参与子宫腺肌病的发生, 尤其是内膜异位的发生。

VEGF 作为最强的血管生成因子, 其高水平表达与子宫腺肌病发生关系密切, 其高表达的致病机制尚不清楚<sup>[15]</sup>, 雌激素可通过诱导 VEGF 高表达及血管生成促进子宫腺肌病的发生<sup>[16]</sup>。MMP-9 是一种重要的基质金属蛋白酶, 其高表达与子宫腺肌病的发生密切相关<sup>[17]</sup>, 多种信号通路可通过调节 MMP-9 参与子宫腺肌病的发生<sup>[18]</sup>。MMP-9 和 VEGF 还在内皮细胞抗

凋亡中发挥重要作用, 是子宫腺肌病发生过程中的关键因子<sup>[16]</sup>, 下调 MMP-9 的表达降低腺体细胞的侵袭能力<sup>[19]</sup>。本研究结果显示, MMP-9 和 VEGF 在子宫腺肌病在位内膜组织中 mRNA 和蛋白表达均高于正常对照子宫内膜组织, 两者均在异位内膜组织中高表达且呈正相关, 进一步说明两者可能共同参与子宫腺肌病的发生、发展, 可能有助于腺体细胞的异位侵袭。

研究表明, Galectin-3 在促进细胞增殖和血管生成中发挥重要作用, Galectin-3 基因敲除可通过减少 VEGF 的分泌从而使肿瘤细胞血管生成障碍<sup>[20]</sup>。Galectin-3 也是 MMP-9 重要的转录调节因子, 可调节 MMP-9 的表达、中断细胞间接触促进上皮细胞运动, 如发生侵袭和转移。本研究结果中 Galectin-3 和 VEGF、MMP-9 在异位内膜中的高表达均呈正相关, 提示 3 者可能在子宫腺肌症发生、发展尤其是异位侵袭中共同发挥作用, 其具体分子调节机制还需要进一步深入研究。

综上所述, Galectin-3、VEGF 和 MMP-9 在子宫腺肌病内膜组织中表达升高, 3 者在异位内膜组织中均呈高表达且呈正相关, 提示 3 者高表达可能共同参与子宫腺肌病的发生和异位侵袭, 为继续探讨子宫腺肌病的发生机制和新的治疗策略提供参考。

#### 参 考 文 献:

- [1] ALEKSANDROVYCH V, BASTA P, GIL K. Current facts constituting an understanding of the nature of adenomyosis[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 28(6): 1-8.
- [2] 贾晨阳, 段华, 汪沙. 血管形成相关因子在子宫腺肌病发病中作用的研究进展 [J]. *中国计划生育和妇产科*, 2016, 8(8): 17-21.
- [3] DONG R, ZHANG M, HU Q, et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 599-614.
- [4] DOS SANTOS S N, SHELDON H, PEREIRA J X, et al. Galectin-3 acts as an angiogenic switch to induce tumor angiogenesis via Jagged-1/Notch activation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49484-49501.
- [5] 雷彩霞, 张炜, 孙晓炜, 等. Galectin-3 表达抑制对子宫内膜上皮细胞生长周期和黏附性的影响 [J]. *复旦学报 (医学版)*, 2007, 34(2): 169-175.
- [6] 马艳鸽, 申爱荣, 李灿宇, 等. siRNA 靶向沉默 COX-2 基因对子宫内膜异位症在位, 异位子宫内膜间质细胞 VEGF 和 MMP-9 表达, COX-2 活性及细胞凋亡的影响 [J]. *中华妇产科杂志*, 2015, 50(10): 770-776.
- [7] DUEHOLM M. Uterine adenomyosis and infertility, review of reproductive outcome after in vitro fertilization and surgery[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2017, 96(6): 715-726.
- [8] BENAGIANO G, BROSENS I, HABIBA M. Structural and molecular features of the endomyometrium in endometriosis and adenomyosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2014, 20(3): 386-402.
- [9] VANNUCCINI S, TOSTI C, CARMONA F, et al. Pathogenesis of adenomyosis: an update on molecular mechanisms[J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 35(5): 592-601.
- [10] 仲琳, 梁平平, 龚磊, 等. 半乳糖凝集素 3 对内皮细胞生长、迁移及炎症反应的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(6): 1065-1072.
- [11] DÍAZ-ALVAREZ L, ORTEGA E. The many roles of Galectin-3, a multifaceted molecule, in innate immune responses against pathogens[J]. *Mediators Inflamm*, 2017(2017): 9247574.
- [12] 石亚楠, 黄河玲, 郭瑞峰, 等. Galectin-3 和  $\beta$ -catenin 在子宫内膜异位症中的表达及二者的相关性 [J]. *天津医药*, 2015, 43(8): 876-879.
- [13] AL-MAGHRABI J, ABDELRAHMAN A S, GHABRAH T, et al. Immunohistochemical expression of galectin-3 is significantly associated with grade, stage and differentiation of endometrial carcinomas[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(4): 348-352.
- [14] CHEN W S, CAO Z, LEFFLER H, et al. Galectin-3 Inhibition by a small-molecule inhibitor reduces both pathological corneal neovascularization and fibrosis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(1): 9-20.
- [15] ORAZOV M R, NOSENKO E N, RADZINSKY V E, et al. Proangiogenic features in chronic pelvic pain caused by adenomyosis[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2016, 32(Suppl 2): 7-10.
- [16] HUANG T S, CHEN Y J, CHOU T Y, et al. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(7): 1358-1371.
- [17] WANG H S, TSAI C L, CHANG P Y, et al. Positive associations between upregulated levels of stress-induced phosphoprotein 1 and matrix metalloproteinase-9 in endometriosis/adenomyosis[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190573.
- [18] YI K W, KIM S H, IHM H J, et al. Increased expression of p21-activated kinase 4 in adenomyosis and its regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in endometrial cells[J]. *Fertil Steril*, 2015, 103(4): 1089-1097.
- [19] CHEN N, DU B, ZHOU H, et al. Abnormal expression of Nrf2 may play an important role in the pathogenesis and development of adenomyosis[J]. *PLoS One*, 2017, 12(8): e0182773.
- [20] MACHADO C M, ANDRADE L N, TEIXEIRA V R, et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGF- $\beta_1$ -induced macrophages[J]. *Cancer Med*, 2014, 3(2): 201-214.

(张西倩 编辑)