

端粒/端粒酶在盆腔脱垂器官韧带组织中的表达研究

刘东涌, 柏义, 龙玲

重庆市铜梁区人民医院 重庆

【摘要】目的 研究端粒/端粒酶在盆底结缔组织中的表达, 探讨端粒/端粒酶在基因水平参与盆腔器官脱垂 (POP) 的发生机制。**方法** 随机选取 35-75 岁的患者入组 40 例, 实验组为因子宫脱垂行子宫切除术的患者; 对照组为因良性疾病行全子宫切除的患者。对手术标本的子宫骶韧带、圆韧带组织通过 Masson 染色、IHC 等实验方法检测其中组织细胞的端粒酶、I 型胶原 (COLL I)、III 型胶原 (COLL III) 等指标的表达情况。**结果** 实验组与对照组 COLL I、COLL III 的表达有统计学差异, 但两组间 TERT 表达无统计学差异。**结论** 盆腔器官脱垂患者的子宫韧带中组织 COLL I、COLL III 表达显著下降, 但端粒/端粒酶在盆腔脏器脱垂形成中的影响需进一步的实验验证。

【关键词】 盆腔器官脱垂; I 型胶原; III 型胶原; 端粒; 端粒酶

【收稿日期】 2023 年 11 月 10 日 **【出刊日期】** 2023 年 12 月 29 日 **【DOI】** 10.12208/j.ijcr.20230373

Expression of telomere/telomerase in ligament tissue of pelvic prolapse organs

Dongyong Liu, Yi Bai, Ling Long

The People's Hospital of Tongliang District, Chongqing

【Abstract】Objective To investigate the expression of telomere/telomerase in pelvic connective tissue and explore the mechanism of telomere/telomerase involvement in the occurrence of pelvic organ prolapse (POP) at the gene level. **Methods** 40 patients aged 35 to 75 were randomly selected. The experimental group consisted of patients who underwent hysterectomy due to uterine prolapse; The control group consisted of patients who underwent total hysterectomy due to benign uterine diseases. The expression of telomerase, COLI, COLIII and other indicators in the tissue cells of the uterine sacral ligament and round ligament tissues of surgical specimens was detected using experimental methods such as Masson staining and IHC. **Results** There was a statistical difference in the expression of COLL I and COLL III between the two groups, but there was no significant difference in TERT expression. **Conclusion** The expression of COLL I and COLL III in the uterine ligaments of patients with pelvic organ prolapse has decreased significantly, but the effect of telomeres in the formation of pelvic organ prolapse needs to be further experimentally verified.

【Keywords】 Pelvic organ prolapse; COLL I; COLL III; Telomere; TERT

盆腔器官脱垂是指盆腔器官 (膀胱、肠或子宫) 疝入阴道, 导致排尿、排便、肠道和性功能障碍, 对妇女的生活质量产生严重影响^[1]。盆腔器官脱垂的发生是多种因素导致的, 包括妊娠、分娩、激素、肥胖、年龄、手术和遗传因素等。盆底疾病影响近 1/3 的绝经前妇女和近 1/2 的绝经后妇女。除了伴随疾病的躯体症状, 它还会对患者产生情绪影响, 包括孤立、焦虑和抑郁, 导致社会心理压力。因此需要对 POP 的病因及治疗作进一步研究^[2]。研究证实, 端粒/端粒酶的活性增加、端

粒延长, 导致细胞永生化和促进肿瘤的发生, 部分慢性疾病、退化性疾病如高血压、心血管疾病、腰椎间盘突出症等疾病的发生发展也有端粒功能的改变。POP 作为一个与衰老相关的疾病, 端粒/端粒酶的功能改变也有可能参与了盆腔器官脱垂的形成及发展。本研究拟通过 Masson 染色、免疫组化蛋白印迹技术对盆腔器官脱垂患者子宫韧带组织中的 COLL I、COLL III 表达及端粒酶活性进行检测, 旨在进一步验证端粒/端粒酶在 POP 发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 40-80 岁的妇科患者入组 37 例, 分为两个大组, 实验组为因子宫脱垂行子宫手术的患者; 对照组为其他疾病行子宫除的患者。对照组: 年龄为 46~61 岁, 平均年龄: 57.55 岁; 实验组: 年龄区间 44~76 岁, 平均年龄为 51.25 岁。

1.2 病理资料

近子宫端的骶韧带或圆韧带, 长度 1cm。

1.3 实验方法

收集两组患者近子宫端骶韧带或圆韧带组织约 1cm 长, 通过 Masson 染色证实为韧带组织, IHC 实验方法检测其中组织中端粒酶、COLI、COLIII 等指标的表达情况。

1.3.1 实验试剂

如表 1 所示。

表 1 实验试剂表

试剂名称	厂家
Masson 三色染色试剂盒	珠海贝索
CollogenI 一抗	proteintech
CollogenIII 一抗	proteintech
TERT 一抗	ABclonal
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)	碧云天
EDTA 抗原修复液	中杉金桥
过氧化物酶封闭液	中杉金桥
Bouin's 固定液	南京森贝伽
DAB 染色试剂盒	中杉金桥
抗体稀释液	中杉金桥

1.3.2 Masson 定性观察盆底韧带结缔组织中胶原纤维的分布情况, 实验步骤

将烘好的片子放入不同试剂中进行脱蜡水化, 具体为: 脱蜡: 把载玻片置于二甲苯 I、II 中各 20 分钟; 水化: 将片子取出依次放入 100% I、100% II、95%、75% 酒精中各 5 分钟, 流水冲洗 3 分钟; 脱蜡水化后, 在 Weigert 铁苏木素 A、B 液等比例混合液中染色 8 分钟, 流水冲洗 1 分钟; 1% 酒精盐酸分化 10 秒, 流水冲洗 3 分钟; 丽春红酸性品红染色 5 分钟, 流水冲洗 1 分钟; 滴加磷钼酸溶液处理 4 分钟, 倾去载玻片上磷钼酸溶液, 不用水洗, 再用苯胺蓝复染 4 分钟, 同样倾去玻片上染液, 直接用 1% 冰醋酸水溶液冲洗玻片至无蓝色脱出; 然后进行梯度脱水: 将载玻片依次放入 75%、95% I、95% II、100% I、100% II 酒精中各 1 分钟; 透明: 二甲苯 I、II 中各 1 分钟, 后用中性树脂与盖玻片进行封片即完成制片。

1.3.3 ICH 免疫组化半定量检测盆底韧带组织中 COLI、COLII 及 TERT 的表达, 实验步骤

按照 1.2.2 中方法将烘好的片子脱蜡水化后对组织

进行抗原修复。将切片放进配制好的 EDTA 抗原修复液中, 在微波炉里低火保温 20min。然后自然冷却, 1×PBS 洗 5 min×3 次。用免疫组化笔将组织圈起来, 用 5% 牛奶封闭液在干燥箱放置 30min, 1×PBS 洗 5 min×3 次。使用过氧化物酶封闭液在室温下阻断 10min, 1×PBS 洗 5 min×3 次。一抗 37℃ 孵育 1.5 h, 1×PBS 洗 5 min×3 次; 二抗 37℃ 孵育 30 min, 1×PBS 洗 5 min×3 次。将配制好的 DAB 染液滴加至载玻片组织上, 染色 3-5 min 后, 放入 PBS 中终止染色。载玻片放入苏木素染缸中染色 1 min 后放入流水中终止染色, 缓水冲洗载 3 min, 进行脱水、透明、封片。75%、85%、95%、100%、100% 梯度乙醇各 1 min 脱水, 然后置于二甲苯中透明 1 min, 回到 100% 乙醇涮一下, 除掉二甲苯, 用吹风机完全吹干载玻片, 滴加 1 滴中性树脂, 放置盖玻片并封片。

1.4 统计学方法

实验图片染色程度应用图像处理软件 Image J 进行分析; 实验数据采用 GraphPad Software 公司的款数据处理与图形软件 GraphPad Prism (9.2.0, 2021 版)

进行 T 检验分析, P 值 < 0.05 显示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Masson 染色检测韧带组织中胶原纤维的含量表达

Masson 染色结果显示, 对照组和实验组均有大量胶原纤维, 无明显差异, 如图 1, 2。

2.2 ICH 检测韧带组织中 COLI、COLIII、TERT 蛋

白的表达

免疫组化检测显示, 实验组与对照组相比, ColIII 和 Coll III 表达量明显下低, 统计显示有显著差异 ($p < 0.05$) ;

TERT 蛋白的表达量在实验组与对照组之间无统计学差异 ($p > 0.05$) , 但实验组 TERT 表达平均值略低, 如图 3-图 8。

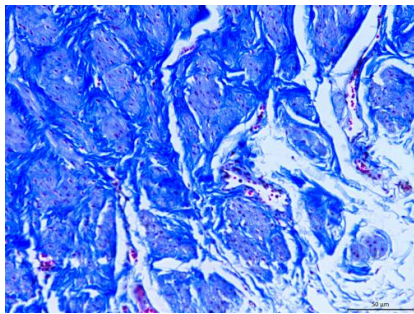


图 1 对照组

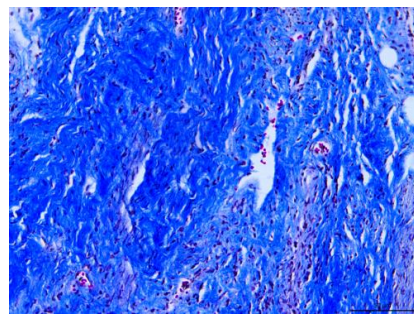


图 2 实验组

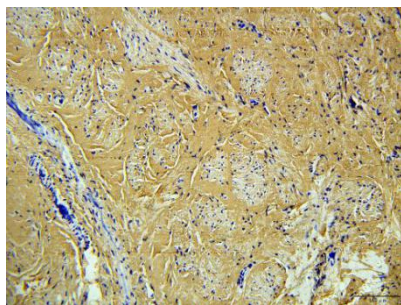


图 3 对照组 COLI

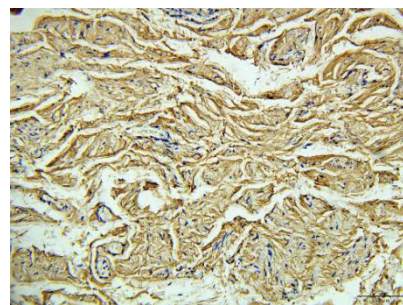


图 4 实验组 COLI

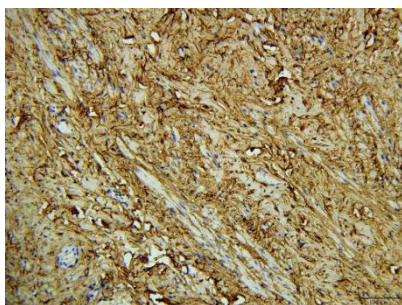


图 5 对照组 COLIII

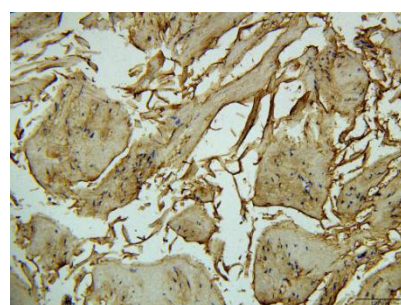


图 6 实验组 COLIII

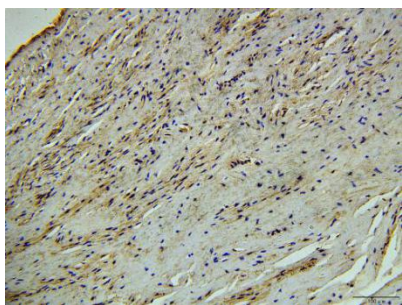


图 7 对照组 TERT

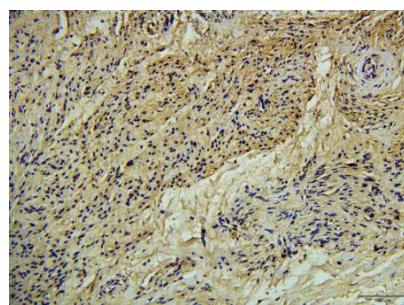


图 8 实验组 TERT

3 讨论

端粒及端粒酶在肿瘤发生、发展中的作用已经被众多实验研究所证实, 而端粒在衰老性疾病及慢性疾病中的作用也已经被很多研究发现所证实, 如高血压、心血管疾病、圆锥角膜、腰间盘退行病变等。端粒/端粒酶的相关研究一直是多年来科学研究的前沿热点, 其发展变化关系到肿瘤、生殖、退行性病变等一系列生理及病理变化^[3]。

POP 是一种多因素疾病, 严重影响女性的生活质量。目前的研究认为 POP 的发生与盆底组织结构变化有关。I型和III型胶原纤维对器官有支撑作用, 而这种支撑需要细胞外基质各成分含量和比例的平衡, 无论何种原因引起的失衡均会降低组织的机械强度, 使 POP 易于发生。比如有研究证实, 盆底功能障碍患者盆底支持组织中胶原蛋白含量减少并不是因为合成减少, 而是由于胶原蛋白降解增多, 这与转换生长因子- β (TGF- β) 对 MMPs 和 TIMPs 的调节作用有关^[4]。本研究结果也显示, 子宫脱垂患者标本组织中的 COL1 和 COL3 的表达显著减少, 证实胶原纤维含量的变化与 POP 的发生发展密切相关。

端粒/端粒酶复合体的活性代表着细胞增值活力, 直接影响细胞增值分化。在肿瘤细胞组织内, 端粒酶活性会较正常细胞活性高, TERT 蛋白含量升高, 细胞无限分裂最终形成肿瘤。而在某些慢性病症和衰老性病症中, 端粒酶活性降低会伴随端粒长度减小, 影响组织衰老, 如慢性肝脏病症、高血压疾病、椎间盘推行病变等。研究表明, 增加外源性 TERT 基因能够增加端粒酶活性, 延长端粒长度, 阻止/恢复椎间盘细胞退变的过程。

POP 以盆底纤维和肌肉退行病变及功能障碍为主要表现, 已证实盆腔结缔组织细胞有异常凋亡的现象, 相关胶原合成减少, 韧带组织中 P16、PGE2/COX2 标志物升高, 这也证实 POP 有较强衰老特征^[5]。这些标志物已经被证实与端粒酶有着多种通路的联系, 因此有理由推测端粒/端粒酶也可能参与盆腔器官脱垂的发生及发展。

本研究中两组间 ICH 检测 TERT 表达, 数据平均值提示 POP 组 TERT 蛋白表达降低, 但统计学结果未见明显差异。分析两组间数据及实验过程, 可能与实验

标本数量较少、年龄分布不均、以及实验标本取材于圆韧带和骶韧带两种组织造成偏移有关^[6-7]。

POP 作为一种临床上和衰老明显相关的疾病, 我们有理由推测其发生发展与端粒/端粒酶的变化可能相关, 本研究也首次提出端粒/端粒酶可能参与 POP 发生、发展, 有可能通过调控成纤维细胞细胞外基质的分泌, 如胶原蛋白的产量及比例在 POP 发生中起作用。为验证这一结论, 后续研究需要加大样本量, 剔除年龄、标本类型等偏移因素, 或进行分层分析, 明确端粒/端粒酶与 POP 的关系, 为 POP 在基因治疗技术方面提供新的理论依据。

参考文献

- [1] 洪莹,李蕾,刘冬霞等.ERK1/2、MEK1/2 在盆腔器官脱垂患者子宫骶韧带组织中的表达[J].郑州大学学报(医学版),2023,58(05):651-656.
- [2] 王翻,平毅.TGFBR2、TGF- β 1 及 CTGF 在盆腔器官脱垂患者子宫韧带组织中的表达及意义[J].山西医科大学学报,2023,54(08):1154-1160.
- [3] 高星宇. 端粒相关基因 TINF2 介导线粒体功能通过 NF- κ B 信号通路调控间充质干细胞衰老及成骨分化[D].吉林大学,2023: 26-28.
- [4] 赵梦坡,八晓敏,罗胜军等.端粒酶逆转录酶在建立永生细胞中的应用[J].动物医学进展,2023,44(05):102-107.
- [5] 侯睿,樊少磊.盆腔器官脱垂患者子宫主韧带组织中炎症因子、氧化损伤标志物水平的研究[J].中国妇产科临床杂志,2021,22(03):270-272.
- [6] M B K ,C J S . Advances in understanding telomerase assembly. [J]. Biochemical Society transactions, 2023, 51 (6): 2093-2101.
- [7] Jia Y ,Cheng H L ,Qing J Z , et al. The effect of metformin on senescence of T lymphocytes [J]. Immunity & Ageing, 2023, 20 (1): 73-73.

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS