

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.007

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.007>

神经生长因子及其受体在盆腔器官脱垂患者阴道前壁组织中的表达及意义

李洁, 陈飞, 金玉茜, 李蕾, 胡琳, 占长玉, 廖莹莹, 张莹莹, 王鲁文

(郑州大学第三附属医院妇科盆底重建病区, 郑州 450052)

[摘要] 目的: 探讨神经生长因子(nerve growth factor, NGF)及其低亲和力p75神经生长素受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)和高亲和力酪氨酸激酶受体A(tyrosine kinase A, TrkA)在盆腔器官脱垂(pelvic organ prolapse, POP)患者阴道前壁组织中的表达及意义。方法: 选择30例因阴道前壁膨出行手术治疗的POP患者, 根据POP-Q分度法分为两组, 其中14例为POP-Q II度, 16例为POP-Q III~IV度; 同期选择15例非盆底功能障碍性疾病(pelvic floor dysfunction, PFD)患者为对照组。术中取患者阴道前壁相似部位组织, 采用RT-PCR和免疫组织化学染色检测NGF, p75NTR和TrkA的表达情况。结果: PCR结果显示对照组患者阴道前壁组织中NGF, p75NTR, TrkA的mRNA表达量分别为 1.01 ± 0.06 , 0.86 ± 0.05 , 0.95 ± 0.05 , POP-Q II度组中为 0.47 ± 0.07 , 0.79 ± 0.05 , 0.43 ± 0.04 , POP-Q III~IV度组中为 0.41 ± 0.03 , 0.53 ± 0.04 , 0.25 ± 0.19 , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。且POP组p75NTR/TrkA比值较对照组增大。免疫组织化学染色显示POP患者NGF, p75NTR, TrkA的表达水平均降低。结论: NGF及其受体p75NTR和TrkA在POP患者阴道前壁组织中表达减少以及两受体比例的变化, 可能与POP的发生、发展相关。

[关键词] 盆腔器官脱垂; 神经生长因子; p75NTR; TrkA

Expression and significance of nerve growth factor and its receptor in anterior vaginal wall of patients with pelvic organ prolapse

LI Jie, CHEN Fei, JIN Yuxi, LI Lei, HU Lin, ZHAN Changyu, LIAO Yingying, ZHANG Yingying, WANG Luwen

(Department of Pelvic Floor Reconstruction, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression and significance of nerve growth factor (NGF) and its receptors p75 neurotrophin receptor(p75NTR) and tyrosine kinase A (TrkA) in the anterior vaginal wall of patients with pelvic organ prolapse (POP). **Methods:** A total of 30 patients with anterior vaginal wall prolapse were selected and divided into two groups according to POP-Q grading method. Among them, 14 cases were POP-Q II degree

收稿日期 (Date of reception): 2019-11-19

通信作者 (Corresponding author): 王鲁文, Email: wangluwen631221@163.com

基金项目 (Foundation item): 河南省医学科技攻关计划普通项目 (201602125)。This work was supported by Medical Science and Technology Program General Project of Henan Province, China (201602125).

and 16 cases were POP-Q III-IV degree; 15 non pelvic floor dysfunction (PFD) patients were selected as a control group during the same period. Similar parts of the anterior vaginal wall were taken during the operation. The expressions of NGF, p75NTR and TrkA were detected by RT-PCR and immunohistochemical staining. **Results:** RT-PCR showed that the mRNA expression levels of NGF, p75NTR and TrkA in the anterior vaginal wall of the control group were 1.01 ± 0.06 , 0.86 ± 0.05 , 0.95 ± 0.05 , in the group of POP-Q II degree were 0.47 ± 0.07 , 0.79 ± 0.05 , 0.43 ± 0.04 in the group of POP-Q III-IV degree were 0.41 ± 0.03 , 0.53 ± 0.04 , 0.25 ± 0.19 , respectively and the difference was significant ($P < 0.05$). And the ratio of p75NTR/TrkA in the POP group was higher than that in the control group. Immunohistochemical staining showed that the expression levels of NGF, p75NTR and TrkA were decreased in POP patients. **Conclusion:** The decreased expression of NGF and its receptors p75NTR and TrkA in the anterior vaginal wall of POP patients and the change of the ratio of the two receptors may be related to the occurrence and development of POP.

Keywords pelvic organ prolapse; nerve growth factor; p75NTR; TrkA

盆底器官脱垂(pelvic organ prolapse, POP)是由于盆底肌肉和筋膜组织薄弱等多因素造成的盆腔器官下降, 引发器官位置及功能异常, 包括子宫脱垂、阴道前壁膨出、阴道后壁膨出等为主的一组妇科疾病。全国范围的流行病学调查^[1]提示: 绝经后妇女POP的发病率约为50%。目前其发病机制尚不明确, 临床上尚无十分有效的预防措施。近年来, 盆底神经损伤学说成为研究的热点和难点。发生盆底神经损伤后, 盆底支持组织会在电生理活动、组织学及化学分泌等方面发生巨大变化, 进而影响其正常功能, 导致盆底功能障碍。研究^[2]表明POP的发生与盆底支持结构的失神经支配密切相关。神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种多效性的肽类激素, 通过与靶细胞表面的高亲和力酪氨酸激酶受体A(tyrosine kinase A, TrkA)和低亲和力p75神经生长因子受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)结合来调控细胞的存活、生长、分化、凋亡等生理活动, 对机体正常生理状态和病理发展有重要的影响。其中TrkA一般介导正性信号, 如促进神经细胞生长; 而p75NTR既可促进神经细胞存活, 也可诱导神经细胞凋亡, 但以后者为主^[3]。二者具有各自独立的信号通路, 但当其共表达时, 又彼此互相影响。其信号转导是一个复杂的网络系统, 可产生不同的生物学效应^[4]。本研究从神经纤维较为丰富的阴道前壁取材, 检测NGF, p75NTR, TrkA的表达情况, 探讨其与POP的关系, 为其预防和治疗提供新的思路。

1 对象与方法

1.1 对象

选取郑州大学第三附属医院2019年1月至10月

收治的30例合并阴道前壁膨出行阴道前壁修补或前盆底重建术的POP患者, 根据POP-Q评分分为两组, 其中POP-Q II度组14例, POP-Q III-IV度组16例; 同期行子宫全切术的同年龄段非癌性、非盆底功能障碍性疾病(pelvic floor dysfunction, PFD)患者15例为对照组。各组患者均已绝经(绝经年限 ≥ 2 年), 近3个月内无全身应用激素类药物, 无神经、呼吸系统疾病、结缔组织病、功能性卵巢肿瘤等。

经郑州大学第三附属医院伦理委员会批准(2019医伦审第15号), 术前患者签署知情同意书, 术中取相似部位阴道前壁全层组织, 约 $1.0 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$, 等分2份, 一份标记后即置液氮中, 后转存至 -80°C 冰箱备用。另一份置10%甲醛溶液中固定、脱水、包埋保存。

1.2 RT-PCR

添加液氮将组织研磨细碎, 每100 mg组织中加入TRIzol 1 mL(日本Takara公司), 提取总RNA。检测提取RNA的浓度, 验证RNA提取成功。根据RNA浓度配制溶液, 经反转录合成cDNA。PCR的反应条件为 95°C , 15 s变性; 60°C , 15 s退火; 72°C , 45 s延伸。NGF, p75NTR, TrkA和GAPDH的引物序列如表1所示。记录阈值周期(Cts), 计算相对定量(Ct法)比较基因表达。

1.3 免疫组织化学

组织用10%甲醛溶液固定、常规石蜡包埋。连续切片4~6张, 片厚 $3 \mu\text{m}$ 。置 37°C 烘干后进行免疫组织化学染色。医用微波抗原修复, 分别滴加抗体NGF(博士德生物工程有限公司)、抗体p75NTR(北京博奥森生物技术有限公司)、抗体

TrkA(武汉三鹰生物技术有限公司), 室温孵育 2 h, PBS缓冲液冲洗后, 再滴加二抗、DAB显色, 步骤按说明书进行。对个别步骤及反应时间加以调整。结果测定: 运用Image J软件在低倍镜($\times 100$)下测定免疫组织化学染色结果的阳性百分比。

1.4 统计学处理

运用SPSS 21.0软件进行分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用两独立样本 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 NGF, p75NTR, TrkA和GAPDH的引物序列
Table 1 Primer sequences of NGF, p75NTR, TrkA and GAPDH

目的基因	引物序列
NGF	正向: 5'-AGGAGCAAGCGGTCATC-3' 反向: 5'-CTGTGGCGGTGGTCTTAT-3'
p75NTR	正向: 5'-GCACCTCCAGAACAAGACC-3' 反向: 5'-CACAACCACAGCAGCCA-3'
TrkA	正向: 5'-TTCACCTACGGCAAGCAGC-3' 反向: 5'-CCTGCGTGATGCAGTCGAT-3'
GAPDH	正向: 5'-AGAACGGGAAGCTTGTTCATC-3' 反向: 5'-CATCGCCCCACTTGATTTG-3'

表2 研究对象的一般情况

Table 2 General information of research objects

组别	<i>n</i>	年龄/岁	产次	BMI/(kg·m ⁻²)	绝经时间/年
对照组	15	62.00 $\pm$ 7.42	2.40 $\pm$ 0.74	24.21 $\pm$ 1.61	10.53 $\pm$ 6.58
POP-Q II度	14	61.79 $\pm$ 4.85	2.29 $\pm$ 0.83	24.13 $\pm$ 1.07	9.50 $\pm$ 4.40
POP-Q III~IV度	16	62.25 $\pm$ 5.53	2.69 $\pm$ 1.40	24.51 $\pm$ 1.37	11.06 $\pm$ 5.64

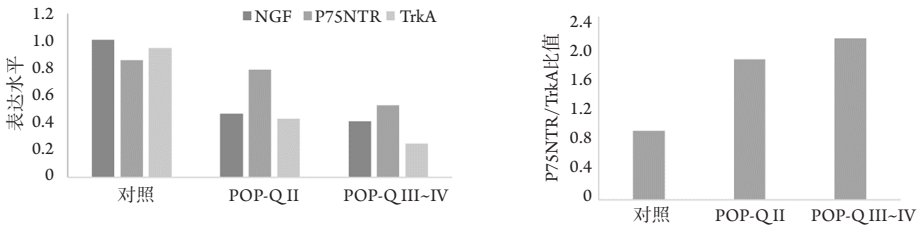


图1 PCR法检测NGF, p75NTR, TrkA在各组阴道前壁组织中mRNA的表达量

Figure 1 mRNA expression of NGF, p75NTR, and TrkA in vaginal wall connective tissue of each group detected by PCR

2 结果

2.1 患者一般资料

3组年龄、产次、BMI、绝经时间各方面比较差异均无统计学意义($P>0.05$, 表2)。

2.2 RT-PCR 结果比较

对照组NGF, p75NTR, TrkA mRNA表达量分别为 1.01 ± 0.06 , 0.86 ± 0.05 , 0.95 ± 0.05 , POP-Q II度组分别为 0.47 ± 0.07 , 0.79 ± 0.05 , 0.43 ± 0.04 , POP-Q III~IV度组分别为 0.41 ± 0.03 , 0.53 ± 0.04 , 0.25 ± 0.19 , 差异有统计学意义($P<0.05$), 即NGF及其受体在POP患者阴道前壁组织中的mRNA表达量均显著少于对照组。对照组p75NTR/TrkA比值为0.91, POP-Q II度组为1.84, POP-Q III~IV度组为2.12, p75NTR/TrkA比值较对照组增大(图1)。

2.3 免疫组织化学染色

NGF, p75NTR, TrkA在对照组和POP组患者阴道前壁组织中均有表达, 其中NGF染色呈红棕色, p75NTR、TrkA呈棕褐色。与对照组相比, POP组患者NGF, p75NTR, TrkA三者表达水平均降低($P<0.05$)。对照组中, p75NTR阳性表达较TrkA表达低, POP组中p75NTR阳性表达较TrkA表达高。各组NGF, p75NTR, TrkA阳性表达情况见表3, 图2。

表3 各组NGF, p75NTR和TrkA免疫组织化学染色阳性百分比(%)

Table 3 Positive percentage of NGF, p75NTR and TrkA immunohistochemistry staining in each group (%)

组别	n	NGF	p75NTR	TrkA
对照组	15	7.12 ± 0.54	6.29 ± 0.57	6.53 ± 0.37
POP-Q II度	14	4.93 ± 0.55	5.17 ± 0.46	4.50 ± 0.54
POP-Q III~IV度	16	2.82 ± 0.32	4.17 ± 0.41	2.15 ± 0.48

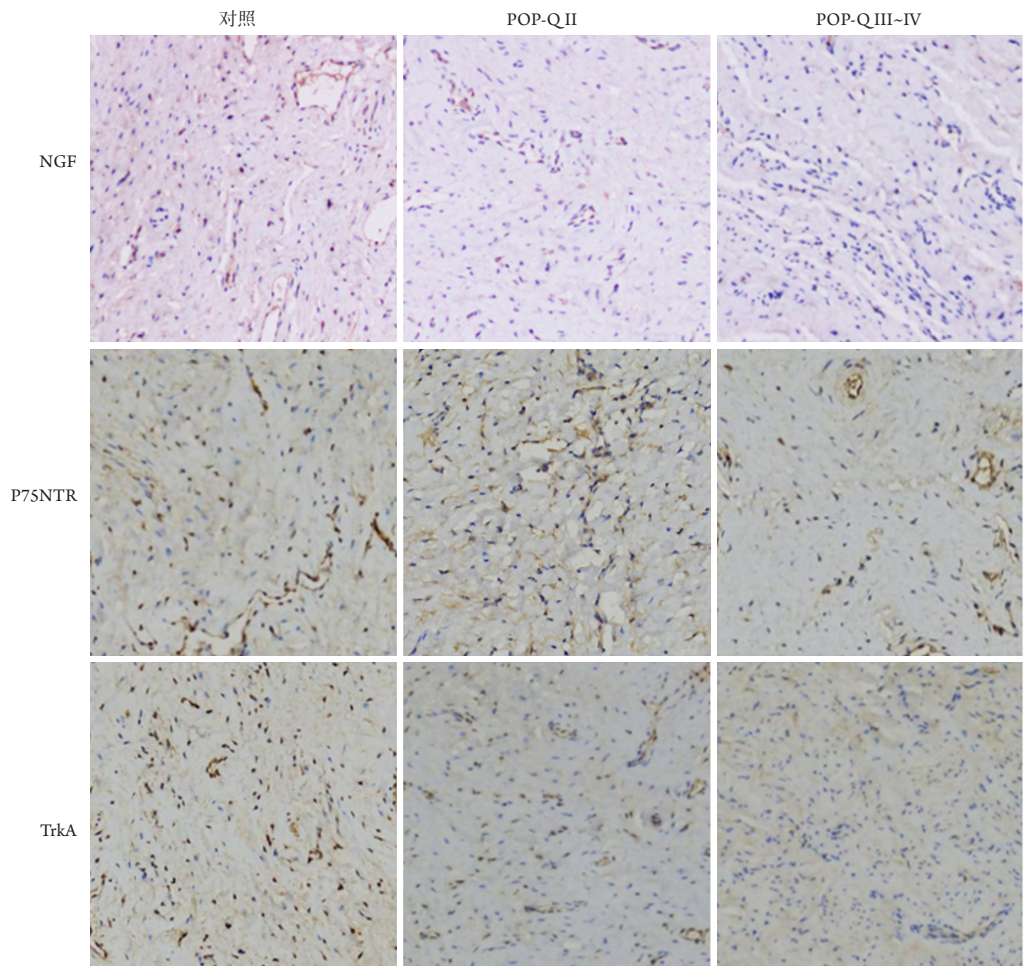


图2 NGF, p75NTR, TrkA表达情况(IHC, × 100)

Figure 2 Expression of NGF, p75NTR and TrkA (IHC, × 100)

3 讨论

盆底提供支持力量的组织主要包括肌肉和胶原结缔组织, 其间分布着丰富的神经纤维, 主要由交感神经、副交感神经和躯体神经支配, 其中躯体神经的感觉神经和运动神经经阴部神经支配盆底组织, 尤其是盆底肌肉^[5-6]。随着对盆底功能障碍性疾病发病高危因素的深入了解, 盆底支持结构的神经损伤机制成为了PFD病因学研究新的切

入点和热点。已有的POP神经电生理学和病理生理学研究^[7]证实POP不仅存在盆底神经损伤和肽类神经递质异常, 盆底肌肉在普遍存在失神经支配现象, 且文献[8-11]显示盆底神经损伤的高危因素主要有妊娠和阴道分娩、年龄、便秘等生活习惯、先天畸形等, 揭示了盆底神经损伤机制是POP发生发展中的重要环节。刘冬霞等^[12]对POP组和对照组患者的阴道前壁组织行免疫组织化学染色和蛋白质印迹法分析发现: 与对照组相比, POP组

患者NF表达水平显著降低, NCAM-180表达水平升高。邵世清等^[13]选取POP轻、重度患者及对照组阴道前壁和子宫骶、主韧带组织, 采用免疫组织化学染色检测发现: POP组VIP, NPY蛋白的表达, 高于对照组, POP重度组高于轻度组。以上均表明POP的发生、发展与盆底神经损伤相关。

NGF是神经营养因子家族成员之一, 其在神经损伤修复、促进细胞生长、分化等过程中具有极重要作用, 其功能的发挥离不开与其受体的结合, 根据NGF表面糖蛋白与凝集素结合能力的不同, 其受体可被分为高亲和力受体TrkA和低亲和力受体p75NTR。TrkA是由原癌基因Trk编码的一种酪氨酸激酶受体, 与NGF结合后所介导的信号通路主要有MAPK通路、PLC- γ 通路、PI3K/PKB通路, 其主要介导正性信号, 如促进神经细胞生长、维持神经细胞的存活等。p75NTR是肿瘤坏死因子受体I(TNFR1)家族成员之一, 与NGF结合介导的信号转导通路主要有NF- κ B通路、JNK-p53-Bax凋亡通路、神经酰胺通路, 既可促进神经细胞存活, 也可诱导神经细胞凋亡, 但以后者为主。p75NTR与TrkA具有各自独立的信号通路, 但当二者共表达时, 又彼此互相影响, 其信号转导是一个复杂的网络系统, 既能转导凋亡信号又能转导生长信号, 不同的配体, 有无协同受体参与, 拮抗受体与其含量及活性的比例关系变化, 均能产生不同的生物学效应^[14-15]。

本实验检测POP患者阴道前壁组织中NGF及其受体的表达情况, 得出不同程度POP患者阴道组织中NGF, p75NTR和TrkA的表达量均低于对照组, 可能是与POP患者阴道前壁内的神经纤维及相关神经肽低于对照组相关。此外, 通过RT-PCR的结果可以清楚看出: 对照组患者的阴道前壁组织中TrkA的表达多于p75NTR的表达, 而在POP组中p75NTR的表达要多于TrkA的表达, 且p75NTR/TrkA比值与脱垂程度呈正相关, 可能说明在POP患者阴道前壁中, 促进神经细胞生长和维持神经细胞存活的通路被抑制, 而介导神经细胞凋亡的通路被增强。

POP患者盆底组织中存在神经生长因子及其受体的表达改变, 这些改变也可能通过影响盆底支持组织微环境的神经调节功能, 参与盆底功能障碍疾病的发生、发展。NGF及其受体与盆底神经的存活和凋亡可能有密切关联, 并可能参与了POP的发生、发展, 为POP盆底神经损伤机制提供了新的证据, 也为盆底障碍性疾病的预防、治疗和研究提供了新的思路和依据。然而NGF及其受体介

导的一系列复杂的信号通路, 因实验中样本量的限制等, 还需更深入的研究, 才能进一步阐明其在盆底障碍性疾病中的具体机制。

参考文献

1. 戴毓欣, 张国瑞, 朱兰. 盆底神经损伤机制在盆腔器官脱垂发病中的作用[J]. 国际妇产科学杂志, 2016, 43(6): 703-707.
DAI Yuxin, ZHANG Guorui, ZHU Lan. Neural injury theory in the pathogenesis of pelvic organ prolapse[J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2016, 43(6): 703-707.
2. Kaplan PB, Usta U, Inal H A, et al. Neuromuscular morphometry of the uterine ligaments and vaginal wall in women with pelvic organ prolapse[J]. 2011, 30(1): 126-132.
3. 彭凤玲, 莫中成, 郑翔, 等. 神经生长因子及其受体相关信号传导通路的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(31): 6190-6193.
PENG Fengling, MO Zhongcheng, ZHENG Xiang, et al. Research progress of nerve growth factor and its receptor signal transduction[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2015, 15(31): 6190-6193.
4. 钟湘平, 廖勇仕. TrkA、p75NTR在神经系统中的研究进展[J]. 社区医学杂志, 2013, 11(19): 14-17.
ZHONG Xiangping, LIAO Yongshi. Research progress of TrkA and p75NTR in nervous system[J]. Journal of Community Medicine, 2013, 11(19): 14-17.
5. Thor KB, Groat WCD. Neural control of the female urethral and anal rhabdosphincters and pelvic floor muscles[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012, 187(6): 2155-2156.
6. Vetusch A, D'Alfonso A, Sferra R, et al. Changes in muscularis propria of anterior vaginal wall in women with pelvic organ prolapse[J]. Eur J Histochem, 2016, 60(1): 2604.
7. Zhu L, Lang JH, Chen J, et al. Morphologic study on levator ani muscle in patients with pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2005, 16(5): 401-404.
8. Memon HU, Handa VL. Vaginal childbirth and pelvic floor disorders[J]. Womens Health (Lond), 2013, 9(3): 265-277.
9. Mannella P, Giannini A, Russo E, et al. Personalizing pelvic floorreconstructive surgery in aging women[J]. Maturitas, 2015, 82(1): 109-115.
10. Spence-Jones C, Kamm MA, Henry MM, et al. Bowel dysfunction: a pathogenic factor in uterovaginal prolapse and urinary stress incontinence[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1994, 101(2): 147-152.
11. Henn EW, Juul L, van Rensburg K. Pelvic organ prolapse in the neonate: report of two cases and review of the literature[J]. Int Urogynecol J,

- 2015, 26(4): 613-615.
12. 刘冬霞, 王鲁文, 高桂香, 等. NF、NCAM-180在盆腔器官脱垂患者阴道前壁组织中的表达及其意义[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(2): 261-264.
- LIU Dongxia, WANG Luwen, GAO Guixiang, et al. Expression and significance of NF and NCAM-180 in anterior vaginal wall of patients with pelvic organ prolapse[J]. The Journal of Practical Medicine, 2016, 32(2): 261-264.
13. 邵世清, 韦业平, 邓丽, 等. 盆腔器官脱垂患者阴道壁和子宫骶、主韧带组织中神经纤维特点和VIP、NPY蛋白的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2015(2): 252-255.
- SHAO Shiqing, WEI Yeping, DENG Li, et al. Expressions of VIP and NPY in vaginal wall and uterosacral and cardinal ligaments of pelvic organ prolapse patients[J]. Journal of Zhengzhou University: medical Science, 2015(2): 252-255.
14. Aloe L. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor[J]. Arch Ital Biol, 2011, 149(2): 175-181.
15. Davis-López de Carrizosa MA, Morado-Díaz CJ, Morcuende S, et al. Nerve growth factor regulates the firing patterns and synaptic composition of motoneurons[J]. J Neurosci, 2010, 30(24): 8308-8319.

本文引用: 李洁, 陈飞, 金玉茜, 李蕾, 胡琳, 占长玉, 廖莹莹, 张莹莹, 王鲁文. 神经生长因子及其受体在盆腔器官脱垂患者阴道前壁组织中的表达及意义[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(10): 2545-2550. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.007

Cite this article as: LI Jie, CHEN Fei, JIN Yuxi, LI Lei, HU Lin, ZHAN Changyu, LIAO Yingying, ZHANG Yingying, WANG Luwen. Expression and significance of nerve growth factor and its receptor in anterior vaginal wall of patients with pelvic organ prolapse[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(10): 2545-2550. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.007