

## 论 著

(临床研究)

盆底器官脱垂患者阴道前壁 miR-29a/b 和转化生长因子  $\beta_1$  及胶原蛋白含量的变化

李周兰, 洪新如, 何春妮

**【摘要】 目的** 观察盆底器官脱垂(POP)患者阴道组织中微小 RNA-29a/b(miR-29a/b)、转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )及胶原蛋白含量的变化,探讨 POP 发病的可能机制。 **方法** 收集解放军联勤保障部队第九〇〇医院妇科 2016 年 1-12 月期间有良性适应证并行子宫切除术的Ⅲ、Ⅳ期 POP 患者(脱垂组)和非 POP 患者(对照组)各 20 例,术中取阴道前壁组织,RT-PCR 检测 miR-29a/b 的表达水平,免疫印迹方法检测Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白及 TGF- $\beta_1$  的含量。 **结果** 脱垂组 miR-29a/b 表达水平显著高于对照组(7.36:1,  $P=0.008$ );脱垂组Ⅲ型胶原蛋白含量显著低于对照组[(0.73±0.17) vs (1.11±0.27),  $P=0.000$ ];脱垂组Ⅰ型胶原蛋白含量与对照组比较差异无统计学意义[(0.78±0.79) vs (1.32±1.76),  $P=0.116$ ];脱垂组 TGF- $\beta_1$  显著高于对照组[(2.72±3.12) vs (1.73±2.33),  $P=0.020$ ]。 **结论** POP 患者 miR-29a/b 表达和 TGF- $\beta_1$  的含量增加、胶原蛋白减少,可能是盆底器官脱垂发生发展的机制之一。

**【关键词】** 盆底器官脱垂;微小 RNA-29a/b;胶原蛋白;转化生长因子- $\beta_1$

**【中图分类号】** R711.23 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2019)01-0049-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.01.011

Expression levels of miR-29a/b collagen and TGF- $\beta_1$  in vaginal tissues of patients with pelvic organ prolapseLI Zhou-lan<sup>1</sup>, HONG Xin-ru<sup>2</sup>, HE Chun-ni<sup>2</sup>

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, Fujian Medical University (the 900th Hospital), Fuzhou 350025, Fujian, China; 2.Department of Obstetrics and Gynecology, the 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression profile of microRNA-29, collagen and transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) in vaginal tissues of patients with pelvic organ prolapse (POP) and the controls. **Methods** Twenty patients with POP and 20 patients without POP were recruited in this study. Total mRNAs of miR-29a/b were detected by real-time RT-PCR and expression levels of collagen I, III and TGF- $\beta_1$  were quantified by Western blotting. **Results** The expression of miR-29a/b in POP group was significantly higher than that in non-POP group (7.36:1,  $P=0.008$ ). The expression of Collagen III was significantly lower in POP group than that in the control group (0.73±0.17 vs 1.11±0.27,  $P=0.00$ ). And the expression of Collagen I in POP group was lower than that in control group, but there was no significant difference between the two groups (0.78±0.79 vs 1.32±1.76,  $P=0.116$ ). The expression of TGF- $\beta_1$  in POP group was significantly higher than that in the control group (2.72±3.12 vs 1.73±2.33,  $P=0.020$ ). **Conclusion** The expression of miR-29a/b and TGF- $\beta_1$  in POP patients was increased, which resulted in the decrease of collagen protein in POP's pelvic floor tissue through a series of regulatory approaches. This may be one of the mechanisms of POP.

**【Key words】** pelvic organ prolapse; microRNA-29a/b; collagen; transforming growth factor beta 1

基金项目:福建省自然科学基金(2014J01428)

作者单位:350025 福州,福建医科大学福总临床医学院(第九〇〇医院)妇产科(李周兰);350025 福州,解放军联勤保障部队第九〇〇医院(原南京军区福州总医院)妇产科(洪新如、何春妮)

通信作者:何春妮, E-mail: liao772002@163.com

0 引 言

女性盆底器官脱垂 (pelvic organ prolapse, POP) 是一个全球性的妇女健康问题,是降低老年妇女的生活质量和妇科手术最常见的原因之一,相对于其他盆底功能性障碍性疾病 POP 的病情更难以评估,其发生率约 3%~8%,约 20% 的女性在均可能接受一次尿失禁或者 POP 手术<sup>[1]</sup>。手术是目前 POP 最常用的治疗手段,但术后复发率高达 30%<sup>[2]</sup>。POP 发病率及术后复发率如此之高,亟待寻找更为有效的治疗方法。然而,由于 POP 的病理生理机制仍未完全阐明,POP 的非手术治疗发展缓慢,迄今尚无大的进展。

韧带和盆底筋膜是盆底支持组织的重要组成,胶原是它们的主要成分。许多学者认为,胶原代谢状态的改变可以影响盆底支持组织的强度和弹性,导致患者盆底结缔组织中的胶原含量减少,从而导致 POP 的发生<sup>[3]</sup>。转化生长因子- $\beta_1$  (transforming growth factor beta 1, TGF- $\beta_1$ ) 是胶原代谢重要的调节因子,可通过调节相关微小 RNA 影响盆底结缔组织细胞外基质的胶原代谢,参与 POP 发生、发展的过程。鉴于微小 RNA-29 (microRNA-29, miR-29) 参与许多纤维化疾病的调控,而 POP 存在与纤维化疾病近似的病理改变,推测其在 POP 的发生发展中起作用。本研究观察 POP 患者的阴道前壁组织中 miR-29 与 TGF- $\beta_1$  的表达,研究其在胶原蛋白代谢调控中的作用,为 POP 发生发展分子机制的阐明及其干预方法的研发提供依据。

1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集解放军联勤保障部队第九〇〇医院妇科 2016 年 1-12 月期间有良性适应证并行子宫切除术的Ⅲ、Ⅳ期 POP 患者 (脱垂组) 和非 POP 患者 (对照组) 各 20 例。POP 的分级经 POP-Q 定量检查明确。对照组为子宫肌瘤或附件良性包块接受子宫切除术的患者。2 组患者近 3 个月内均无服用激素类药物,排除慢性盆腔炎、子宫内膜异位症、先天性结缔组织病和恶性肿瘤等患者。2 组患者年龄等一般指标比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),见表 1。本研究经医院医学伦理委员会批准 (批准号:2014012),并获得患者知情同意。

表 1 盆底器官脱垂患者与对照组患者一般情况比较

组别	n	年龄 (岁)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	分娩次数 (次)	是否绝经 (是/否)
对照组	20	62.45±8.73	22.97±3.20	2.85±1.84	18/2
脱垂组	20	63.50±10.26	24.49±2.61	2.90±1.17	14/6

**1.2 组织提取** 在腹式全子宫切除和全盆底重建时,切取脱垂组和对照组患者阴道前壁 12 点近穹隆处约 1 cm×0.5 cm 大小的全层组织。新鲜标本放在冻存管中于-80℃贮存备用。

**1.3 阴道前壁组织的 microRNA-29a/b 检测** 采用实时荧光定量 PCR 检测法。按 Trizol 试剂盒的说明提取组织样本中的总 RNA,采用紫外分光光度法测定 RNA 浓度,根据 RNA 样品在波长 260/280 nm 的紫外吸收值的比值 (A260/A280) 判断 RNA 样品的纯度,比值在 1.8~2.0 视为 RNA 纯度优良。按照北京天根生物科技有限公司的荧光实时定量试剂盒说明书操作,取 4 μg 上述 RNA 进行逆转录。从 GeneBank 软件中检索 miR-29a/b 引物序列为 5'-CGGGCTAGCACCATTGAAAT-3',应用 DNAMAN 软件设计引物,引物由 Sangon Biotech 公司 (中国上海) 合成。按荧光定量 PCR 试剂盒配制反应体系,设置 PCR 热循环参数:94℃ 2 min,94℃ 20 s,60℃ 34 s 收集荧光信号,45 个循环,以 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法采用循环 (CT) 值行相对定量,反映 miR-29a/b 表达的相对变化。

**1.4 TGF- $\beta_1$  及 I、Ⅲ型胶原蛋白的表达检测** 采用 Western blot 蛋白印迹分析。按照中国索莱宝公司生产的全蛋白提取试剂盒说明抽提蛋白,并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定所抽提的蛋白的浓度,定量后进行 SDS-PAGE 电泳,上样量为 20 μL,电泳后转至 PVDF 膜上,分别与一抗 (兔抗 GAPDH 抗体、小鼠抗 TGF- $\beta_1$  抗体、兔抗 I 型胶原抗体、兔抗Ⅲ型胶原抗体,稀释比例均为 1:5000) 4℃ 孵育过夜,TTBS 洗脱 3 次,再与二抗 (羊抗兔 IgG-HRP,稀释比例 1:5000),室温孵育 45 min,TTBS 洗脱 3 次后与基板电化学免疫印迹 (ECL) 试剂反应 5 min,将胶片进行扫描,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 作为内参,用凝胶图象处理系统 (Gel-Pro-Analyzer 软件) 分析目标条带的光密度值,并比较每个条带的结果。以目的蛋白条带密度值/β-actin 条带密度值来纠正上样量的偏差,再用两者密度值的比值的

高低来表示样本的目的蛋白表达量的多少。

**1.5 统计学分析** 采用 SPSS 20.0 软件 (SPSS, IBM, 美国) 进行统计分析。正态分布的连续变量用平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。分类变量的比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 微小 RNA-29a/b 表达的比较** 脱垂组 miR-29a/b 表达水平显著高于对照组, 脱垂组相对表达量为对照组的 7.36 倍, 差异有统计学意义 ( $P = 0.008$ )。

**2.2 I、III 型胶原蛋白及 TGF- $\beta_1$  含量的比较** III 型胶原表达脱垂组低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P=0.000$ ); I 型胶原蛋白表达脱垂组低于对照组, 但差异无统计学意义 ( $P=0.116$ ); TGF- $\beta_1$  表达脱垂组显著高于对照组, 差异有统计学意义 ( $P = 0.020$ ), 见表 2, 图 1。

表 2 脱垂组与对照组 I、III 型胶原蛋白及 TGF- $\beta_1$  表达的比较 [ $\bar{x}\pm s$ , 解析度 (DPI)]

指标	对照组 ( $n=20$ )	脱垂组 ( $n=20$ )	$t$ 值	$P$ 值
TGF- $\beta_1$	$1.73\pm 2.33$	$2.72\pm 3.12$	2.816	0.020
I 型胶原蛋白	$1.32\pm 1.76$	$0.78\pm 0.79$	1.737	0.116
III 型胶原蛋白	$1.11\pm 0.27$	$0.73\pm 0.17$	6.912	0.000

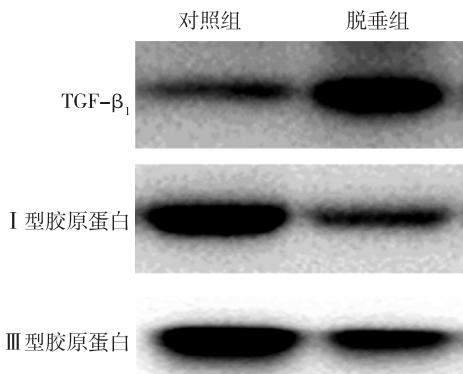


图 1 Western blot 法检测 2 组间 I、III 型胶原蛋白及 TGF- $\beta_1$  表达

## 3 讨 论

**3.1 胶原蛋白与 POP** 盆底结缔组织中的胶原蛋白主要由成纤维细胞合成、分泌, 其含量多少是决定结缔组织韧性和强弱的重要因素。盆底结缔组织中的胶原主要为 I、III 型胶原, 其中 I 型胶原直

径较粗, 抗张能力强, 起支持作用, 与韧性有关; III 型胶原直径较细, 柔韧性强, 与弹性有关。POP 的发生与盆底支持组织中结缔组织结构和功能 (弹性、韧性) 的改变密切相关。Goepel 等<sup>[4]</sup> 研究显示在尿道周围支持组织中, POP 合并尿失禁患者比单纯 POP 患者 I、III 型胶原蛋白含量减少更明显。Cenizo 等<sup>[3]</sup> 研究指出, 压力性尿失禁妇女的膀胱阴道韧带、圆韧带及腹部皮肤的胶原含量与正常妇女相比明显下降 Lin 等<sup>[5]</sup> 的研究结果显示, POP 患者阴道前壁组织的 III 型胶原含量明显降低。Zeng 等<sup>[6]</sup> 研究 POP 患者阴道壁和骶韧带发现: I、III 型胶原较对照组显著减少。可能由于取材部位, 研究对象的选择以及研究方法的不同结论不完全一致。Ewies 等<sup>[7]</sup> 认为, POP 的发生与 III 型胶原含量增高直接相关, 而与 I 型胶原的含量多少无关; 还有一些学者对 POP 患者各型胶原的比例状态进行了研究, Moalli 等<sup>[8]</sup> 发现, POP 患者的 I 型胶原含量显著减少, 而且 I/(III+V) 型的比值下降, 从而使其弹力受损, 容易导致阴道前壁的脱垂的发生。本研究与大多研究结果相似, 即胶原蛋白含量的改变, 尤其是 III 型胶原含量降低在 POP 的发生中起着重要作用, 但其改变的确切机制尚不清楚, 本研究不仅检测 POP 患者胶原蛋白的含量变化, 而且进一步研究调节胶原蛋白的相关因子的表达变化, 为其具体的分子机制的阐明提供理论依据。

**3.2 TGF- $\beta_1$ 、miR-29a/b 与胶原蛋白** TGF- $\beta_1$  是 TGF- $\beta$  家族最重要成员之一, 是一种多功能蛋白, 能增加胶原蛋白为主的蛋白质的合成, 在组织器官纤维化的过程中起重要作用。TGF- $\beta_1$  在细胞外基质的重塑中有修复、协调等作用, 还可作为抑制其他细胞因子的调节器<sup>[9]</sup>。目前 TGF- $\beta_1$  在 POP 发病中的研究较少, 而结果不一致。Meijerink 等<sup>[10]</sup> 对 POP 患者阴道前壁组织的研究显示 TGF- $\beta_1$  表达与 POP 程度正相关, 但 Qi 等<sup>[11]</sup> 的研究显示 POP 患者宫颈筋膜组织中 TGF- $\beta_1$  的含量与 POP 的发展呈负相关, Liu 等<sup>[12]</sup> 的研究发现 POP 患者子宫骶韧带中胶原蛋白的降解代谢和分解代谢的增加是 POP 的病理特征, TGF- $\beta_1$  的表达明显降低, 且 TGF- $\beta_1$  的表达与 POP 的严重程度成负相关。由此可见, TGF- $\beta_1$  通过胶原改变导致 POP 发生的作用机制有待进一步阐明。Meijerink 等<sup>[10]</sup> 的研究结果提示脱垂组的 TGF- $\beta_1$  水平高于对照组, 与我们的结果基本一致,



初步推测 TGF- $\beta_1$  可能参与胶原蛋白的代谢,致 POP 发生发展,为下一步研究提供理论依据。

miRNA-29 家族由 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c 等组成,与纤维化疾病中几种细胞外基质蛋白(主要为胶原蛋白等)的调控密切相关,在心肌梗死后纤维化<sup>[13]</sup>、肺纤维化<sup>[14]</sup>和全身性硬化症<sup>[15]</sup>中起抗纤维化作用。Villarreal 等<sup>[16]</sup>研究了 miR-29 家族在基础条件或 TGF- $\beta_1$  刺激条件下在小梁网中调节细胞外基质蛋白合成中的作用,结果显示在基础或 TGF- $\beta_1$  刺激条件下,miR-29 家族作为多种细胞外基质蛋白(尤其是胶原蛋白)合成的关键因子,且对胶原蛋白的合成起抑制作用。在纤维化疾病中发现 miR-29 不仅可以直接抑制多种细胞外基质蛋白,尤其是胶原蛋白,还可以通过抑制 TGF- $\beta_1$ /Smad 等信号通路相关蛋白的表达来调节细胞外基质蛋白的表达。Van Rooij 等<sup>[13]</sup>利用 miR-29 寡核苷酸体内沉默 miR-29 后,I、III 型胶原蛋白和原纤维蛋白水平明显增高,体外转染 miR-29 类似物后则明显抑制心脏纤维母细胞中的 mRNA 水平;其进一步证实 TGF- $\beta_1$  刺激心脏纤维母细胞后 miR-29 表达明显下降,提示在心肌纤维化过程中 TGF- $\beta_1$  可能通过调节 miR-29 的表达来调节胶原蛋白含量。目前国内外 POP 患者相关的 miR-29 表达谱分析的研究极少。本研究对 POP 患者盆底组织的胶原蛋白、TGF- $\beta_1$  及 miR-29a/b 的表达变化进行初步研究,说明其在盆底组织中的存在,推测 miR-29a/b、TGF- $\beta_1$  互相作用影响盆组织胶原蛋白的含量,在 POP 的发生发展中起促进作用。

在纤维化疾病中,miR-29 是一个抗纤维化治疗的潜在靶点,而 POP 与纤维化疾病有相似的病理生理过程,miR-29a/b 与 TGF- $\beta_1$  是如何相互作用来影响 III 型胶原蛋白的含量?后续的研究可以通过建立 POP 的动物模型,上调或下调 miR-29a/b 的表达,来研究其在 POP 的发展过程中通过 TGF- $\beta_1$  调节胶原的机制,可能为 POP 的预防和治疗有重要的意义。

#### [参考文献]

- [1] Dieter AA, Wilkins MF, Wu JM. Epidemiological Trends and Future Care Needs for Pelvic Floor Disorders[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015, 27(5): 380-384.
- [2] Kerkhof MH, Hendriks L, Brölmann HA. Changes in connective tissue in patients with pelvic organ prolapse--a review of the current literature[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2009, 20(4): 461-474.
- [3] Cenizo V, André V, Reymermier C, et al. LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene Expression[J]. *Exp Dermatol*, 2006, 15(8): 574-581.
- [4] Goepel C, Hefler L, Methfessel HD, et al. Periurethral connective tissue status of Postmenopausal women with genital prolapse with and without stress[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003, 82(7): 659-664.
- [5] Lin SY, Tee YT, Ng SC, et al. Changes in the extracellular matrix in the anterior vagina of women with or without prolapse[J]. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct*, 2007, 18(1): 43-48.
- [6] Zeng C, Liu J, Wang H, et al. Correlation Between Autophagy and Collagen Deposition in Patients With Pelvic Organ Prolapse[J]. *Female Pelvic Med Reconstr Surg*, 2018, 24(3): 213-221.
- [7] Ewies AA, Al-Azzawi F, Thompson J. Changes in extracellular matrix proteins in the cardinal ligaments of post-menopausal women with or without prolapse: a computerized immunohistomorphometric analysis[J]. *Hum Reprod*, 2003, 18(10): 2189-2195.
- [8] Moalli PA, Talarico LC, Sung VW, et al. Impact of menopause on collagen subtypes in the arcus tendineous fascia pelvis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(3): 620-627.
- [9] Ayers NB, Sun C, Chen SY. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in systemic sclerosis[J]. *J Biomed Res*, 2017. doi: 10.7555/JBR.31.20170034. [Epub ahead of print]
- [10] Meijerink AM, van Rijssel RH, van der Linden PJQ. Tissue composition of the vaginal wall in women with pelvic organ prolapse[J]. *Gynecol Obstet Invest*, 2013, 75(1): 21-27.
- [11] Qi XY, Hong L, Guo FQ, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 and connective tissue growth factor in women with pelvic organ prolapse[J]. *Saudi Med J*, 2011, 32(5): 474-478.
- [12] Liu C, Wang Y, Li BS, et al. Role of transforming growth factor  $\beta$ -1 in the pathogenesis of pelvic organ prolapse: A potential therapeutic target[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(2): 347-356.
- [13] Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(35): 13027-13032.
- [14] Cushing L, Kuang PP, Qian J, et al. miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(2): 287-294.
- [15] Maurer B, Stanczyk J, Jungel A, et al. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(6): 1733-1743.
- [16] Villarreal G Jr, Oh DJ, Kang MH, et al. Coordinated regulation of extracellular matrix synthesis by the microRNA-29 family in the trabecular meshwork[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(6): 3391-3397.

(收稿日期:2018-04-17; 修回日期:2018-12-10)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)