

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00544

• 研究快报 •

P2X7 受体在卵巢子宫内膜异位症异位内膜组织中的表达

严久琼¹, 王丽娅¹, 郑唯强², 马蓓^{3*}, 徐明娟^{1*}

- 1. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433
- 2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433
- 3. 第二军医大学基础部医学实验教学中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察嘌呤受体 P2X7 在正常子宫内膜和子宫内膜异位症(EMS)异位内膜组织中的表达,探讨其在 EMS 发生发展中的可能作用。**方法** 收集 2011 年 10 月至 2012 年 10 月本院手术治疗的育龄期 EMS 患者(54 例)卵巢异位内膜组织及子宫肌瘤全子宫切除术患者(40 例)正常子宫内膜组织的石蜡标本,采用免疫组化技术测定两组患者内膜组织中 P2X7 受体的表达情况。根据 EMS 患者术前血清 CA125 水平及术中采用修订的美国生育协会(rAFS)评分法评定的 EMS 分期的不同进行分组,比较各组 EMS 患者异位内膜 P2X7 表达强度的差异。**结果** (1)54 例 EMS 患者异位内膜组织中 P2X7 受体阳性表达 41 例(其中弱阳性 22 例,阳性 14 例,强阳性 5 例),阳性表达率为 75.9%,而 40 例子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织中 P2X7 受体阳性表达仅 3 例(均为弱阳性),阳性表达率为 7.5%,两组间 P2X7 受体阳性表达率及表达强度差异均有统计学意义($\chi^2=43.21$; $Z=-7.318$, $P<0.05$)。(2)术前血清 CA125 ≥ 50 U/mL、rAFS 法分期 III~IV 期的 EMS 患者异位内膜 P2X7 受体表达强度高于 CA125 <50 U/mL、rAFS 法分期 I~II 期者,差异均有统计学意义($Z=-2.642$, $P<0.05$; $Z=-3.815$, $P<0.001$)。**结论** P2X7 受体在 EMS 患者异位内膜组织中呈高表达,且术前血清 CA125 水平更高、病变更重者表达强度也更高,提示 P2X7 受体可能与 EMS 的发生发展相关。

[关键词] 子宫内膜异位症; P2X7; 嘌呤能受体; 炎症反应

[中图分类号] R 711.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)05-0544-05

Expression of P2X7 receptor in endometriosis tissues of patients with ovarian endometriosis

YAN Jiu-qiong¹, WANG Li-ya¹, ZHENG Wei-qiang², MA Bei^{3*}, XU Ming-juan^{1*}

- 1. Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
- 3. Center of Medical Experiment Teaching, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the different expressions of purinergic P2X7 receptor in normal endometrium and ectopic endometrium of patients with endometriosis (EMS), so as to discuss the possible role of P2X7 receptor in the development of EMS. **Methods** The tissue samples (ovarian endometriotic cysts) of EMS patients (EMS group, $n=54$) and normal endometrium tissues from uterine fibroid patients undergoing hysterectomy (control group, $n=40$) from Oct. 2011 to Oct. 2012 were retrieved in Changhai Hospital. The expression of P2X7 receptor was detected and compared by immunohistochemistry between the two groups. P2X7 receptor expressions were also compared between patients with different preoperative serum CA125 levels or EMS stage according to intraoperative evaluation by revised American Fertility Society (rAFS) staging. **Results** (1) The positive rate of P2X7 receptor was 75.9% (41/54, with 22 weakly positive, 14 positive and 5 strongly positive) in 54 EMS samples, which was significantly higher than that in normal endometrial tissues (7.5%, 3/40, all weakly positive)($\chi^2=43.21$, $P<0.05$). P2X7 receptor expression intensities were also significantly different between the two groups($Z=-7.318$, $P<0.05$). (2) P2X7 receptor expressions in EMS patients with serum CA125 ≥ 50 U/mL or of

[收稿日期] 2013-12-29 **[接受日期]** 2014-01-21

[基金项目] 第二军医大学长海医院“1255 计划”项目(CH125510105). Supported by “1255 Project” of Changhai Hospital of Second Military Medical University (CH125510105).

[作者简介] 严久琼, 硕士生. E-mail: yanjiuqiong@163.com

* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-81870979, E-mail: mmbb@gmail.com; Tel: 021-31162044, E-mail: 13636373419@163.com

III-IV stage (rAFS) were significantly stronger than those with serum CA125 < 50 U/mL ($Z = -2.642, P < 0.05$) or of I-II stage ($Z = -3.815, P < 0.001$). **Conclusion** P2X7 receptor is highly expressed in the ectopic endometrium tissue, and the expression is associated with the pre-operation serum CA125 level and severity of disease, suggesting that P2X7 receptor may be involved in the development of endometriosis.

[Key words] endometriosis; P2X7; purinergic receptors; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 544-548]

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)是妇科常见良性疾病之一,以进行性加重的痛经、盆腔疼痛、月经失调及不孕等为主要特征,在女性人群中的发病率为10%左右,在疼痛和(或)不孕妇女中发生率达35%~50%^[1-2]。EMS虽然是一种良性疾病,但却有增生、侵袭、复发等类似肿瘤的恶性行为,且EMS患者较一般人群有更高的卵巢癌、乳腺癌等肿瘤发病风险^[2-3],严重影响女性的生存质量。EMS发病机制尚未完全明确,经典的Sampson学说(经血逆流种植)仍占主导,而免疫系统功能尤其如免疫细胞(T、B淋巴细胞)、自然杀伤细胞以及转录因子NF- κ B等所起的作用近年来也日益受到关注^[4-7]。

P2X7受体是配体门控的离子通道受体,属于嘌呤类受体的一种亚型,即细胞外腺苷酸激活的P2受体,其生物学功能包括参与细胞信号转导、细胞因子的分泌,介导细胞的存活与生长等^[8-9]。近年来研究表明P2X7受体参与乳腺癌、肠上皮细胞癌、子宫内膜癌等疾病中细胞的增殖及凋亡,与疾病的发生、发展有密切关系^[10-13]。

本研究收集2011年10月至2012年10月在本院手术治疗的EMS患者异位内膜及子宫肌瘤全子宫切除术患者正常子宫内膜组织的石蜡标本,采用免疫组化技术测定54例EMS患者异位内膜组织及40例子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织中P2X7受体的表达情况,以初步探讨P2X7受体在EMS发病中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 一般资料 选取长海医院2011年10月至2012年10月期间收治的经腹腔镜或剖腹探查术后病理确认的54例EMS患者(均为卵巢异位)作为研究对象,同期入院的子宫肌瘤全子宫切除、子宫内膜病理学诊断正常的40例患者为对照。所有患者均为育龄期女性。入选病例均符合:(1)手术时间均为月经干净3~7d,子宫内膜呈增生期改变。(2)手术

前3个月内未使用过激素类药物;(3)无自身免疫性疾病、代谢性疾病或恶性肿瘤;(4)排除生殖器官发育不良、急性炎症患者。

1.2 EMS分期 术中根据1985年修订的美国生育协会(rAFS)评分法对EMS进行分期,按病变累及部位、数目、大小、深度及粘连程度评分,分为4期:I期(微小)1~5分,II期(轻度)6~15分,III期(中度)16~40分,IV期(重度)>40分。

1.3 主要试剂 P2X7抗体(SC-25689)购自美国Santa Cruz公司,使用稀释比例1:200。二抗GTVisionIII抗鼠/兔通用型免疫组化试剂盒及DBA显色剂(K5007)购自丹麦Dako公司。

1.4 免疫组织化学检测 将石蜡切片置于烘箱中62℃烤1~2h;常规脱蜡、水化;并且用pH6.0的0.01mol/L柠檬酸钠抗原修复液修复;加3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶,室温孵育;血清封闭后孵育一抗、二抗,DAB显色3~5min;苏木精复染45s,流水冲洗5min;盐酸乙醇分化1s,流水冲洗15min;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片;镜下观察,细胞核呈蓝色,阳性产物呈棕黄色或黄色。

1.5 结果判定 阳性显色为棕黄色颗粒。根据切片中阳性细胞百分比和着色强度进行半定量分级评分。评分标准参见文献[14]并稍作修改:阳性细胞的百分比 $\leq 10\%$ 为0分,11%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $\geq 76\%$ 为4分。着色强度:0分为不着色;1分浅黄色;2分黄色;3分棕褐色。取上述两项分值的乘积作为总积分:0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为阳性(++),9~12分为强阳性(+++)

1.6 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件分析,两组间计量资料的比较采用 t 检验,P2X7受体阳性表达率和表达强度的比较分别采用 χ^2 检验和Mann-Whitney U 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 入组患者一般资料分析 所有患者均为育龄

期女性,EMS组患者54例,平均年龄(34.1±1.4)岁,子宫肌瘤对照组患者40例,平均年龄(34.9±2.4)岁,两组年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。EMS组平均足月产次数(0.639±0.099)低于对照组(1.375±0.155)次,差异有统计学意义($P<0.01$),但两组流产次数[(0.556±0.171) vs (0.875±0.239)]差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 P2X7受体在异位子宫内膜组织和正常子宫内膜组织中的表达 54例EMS异位内膜组织中P2X7受体阳性表达者共41例,阳性表达率为

75.9%,其中弱阳性22例(40.7%),阳性14例(25.9%),强阳性5例(9.3%);40例子子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织中P2X7阳性表达者3例(均为弱阳性),阳性表达率为7.5%。两组阳性率差异有统计学意义($\chi^2=43.21, P<0.05$)。EMS组P2X7表达阳性强度多在(+)~(++),高于对照组,两组阳性强度比较差异有统计学意义($Z=-7.318, P<0.05$,表1)。阳性细胞着色淡黄色至棕褐色不等,呈弥漫性或灶性分布(图1A),而对照组着色细胞少且颜色多为淡黄色,或为阴性表达(图1B)。

表1 P2X7受体在EMS异位内膜和正常子宫内膜组织中的表达

Tab 1 Expression of P2X7 receptor in EMS ectopic endometrial and normal endometrial tissues

Group	N	Expression level <i>n</i>				Z value	P value
		-	+	++	+++		
EMS	54	13	22	14	5	-7.318	<0.05
Control	40	37	3	0	0		

EMS: Endometriosis

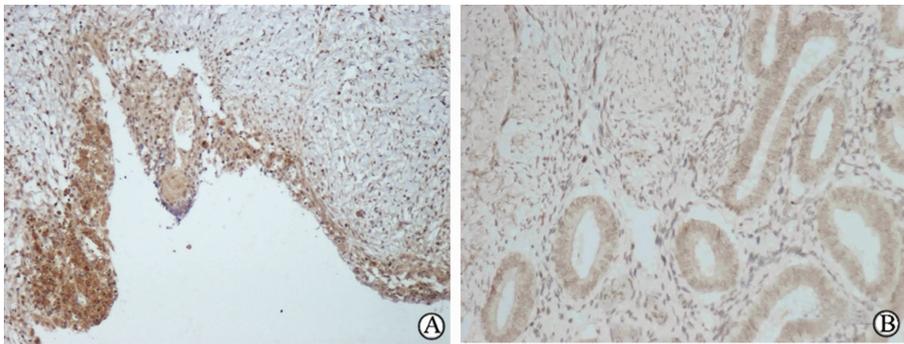


图1 免疫组化染色检测嘌呤受体P2X7在EMS异位内膜(A)及正常子宫内膜(B)中的表达

Fig 1 Expression of purinergic P2X7 receptor in EMS ectopic (A) and normal (B) endometrial tissues as detected by immunohistochemical staining

EMS: Endometriosis. Original magnification: ×100

2.3 CA125水平不同的EMS患者P2X7的表达差异 以术前血清CA125≥50 U/mL为界将EMS患者分为两组,血清CA125<50 U/mL组(18例)与血清CA125≥50 U/mL组(36例)比较,P2X7受体表达强度差异有统计学意义($Z=-3.815, P<0.001$,表2)。

2.4 不同EMS分期患者P2X7的表达差异 EMS患者rAFS分期I~II期者17例,III~IV期者37例。I~II期组与III~IV期组比较,EMS异位内膜中P2X7的表达强度差异有统计学意义($Z=-2.642, P<0.05$,表2)。

3 讨论

哺乳动物P2X受体包括P2X1~P2X7,其中P2X7受体具有独特的双功能性,其生物学功能包括参与细胞信号转导、细胞因子的分泌、介导细胞的存活与生长等^[15]。人P2X7受体由595个氨基酸组成,在细胞膜上可以形成3个或更多同源亚基组成的多聚体,是两次跨膜的蛋白,N端及C端均在胞内^[16]。P2X7受体被ATP激活后可形成非选择性阳离子通道,允许钾离子、钠离子、钙离子等阳离子跨膜流动;且对二价阳离子表现出相对强的选择

性,在低价阳离子环境及 ATP 持续刺激下,激活的 P2X7 受体能形成大的膜水孔,允许大分子物质通过^[17]。研究表明,P2X7 受体在多种炎性病理状态

下表达上调,细胞外 ATP 激活巨噬细胞等炎性细胞 P2X7 受体后促进 IL-1、IL-18、TNF- α 等炎性因子的表达与释放,参与炎性反应和免疫反应^[18-19]。

表 2 子宫内位异位症中 P2X7 在不同临床因素下的表达差异

Tab 2 Expression of P2X7 receptor in endometriosis tissues with different clinical factors

Item	N	Expression level <i>n</i>				Z value	P value
		—	+	++	+++		
CA125 value	<50 U/mL	9	5	4	0	-3.815	<0.001
	\geq 50 U/mL	4	17	10	5		
rAFS staging	I-II	17	15	1	1	-2.642	<0.05
	III-IV	37	2	12	15		

rAFS staging: Revised American Fertility Society staging of endometriosis

EMS 的发病机制中经典的“经血逆流种植”学说占主导,但近年研究表明免疫因素、炎症因素在 EMS 的发病机制中发挥重要作用,EMS 患者细胞免疫功能减弱同时腹腔巨噬细胞活性增强,所分泌的炎性因子可促进异位内膜细胞的种植、生长^[4-5]。Berbic 等^[5]的研究表明,EMS 患者异位病灶白细胞富集,分泌细胞因子、血管生成因子等活性物质,进而促进腹腔异位内膜病灶的形成。核因子 NF- κ B 在 EMS 的形成和发展中可能起关键作用,它可以通过调控基因转录来促进异位内膜细胞增殖、黏附并抑制细胞凋亡^[7]。有研究显示 P2X7 受体参与转录因子 NF- κ B 的活化机制,NF- κ B 活化后使 I κ B 被蛋白水解酶降解,NF- κ B 释放进入细胞核后与 DNA 结合位点结合,调节未成熟炎症细胞因子和黏附分子等表达^[20]。P2X7 受体是否通过炎症反应参与 EMS 的形成尚未见报道。

本研究发现 P2X7 受体在异位子宫内位内膜组织中阳性表达率为 75.9%,表达强度多为弱阳性和阳性,而对照组正常子宫内位阳性率仅 7.5%,且阳性强度表现为弱阳性,两组阳性表达率和表达强度差异均有统计学意义($P < 0.01$),提示 P2X7 受体与子宫内位异位症的发生发展有关。

CA125 是一种糖蛋白,普遍存在于体腔上皮化生组织的细胞膜表面,鉴于血清 CA125 水平与 EMS 临床分期存在正相关关系^[21],对 EMS 的诊断与疗效观察有重要参考价值,且我国 EMS 患者血清 CA125 水平平均为 50~80 kU/L^[22],本研究以血清 CA125 值 \geq 50 U/mL 为界将 EMS 患者分为两组,

发现 CA125 \geq 50 U/mL 组 P2X7 受体阳性表达高于血清 CA125 <50 U/mL 组。同时还发现,P2X7 在中、重型 EMS(III~IV 期)患者中阳性表达强度较微、轻型(I~II 期)更加明显。结果进一步提示 P2X7 受体与 EMS 的发生发展可能有密切联系。

需要指出的是,EMS 患者多因“进行性加重的痛经”或“不孕”就诊,以 25~45 岁处于生育年龄的妇女多见。由于正常子宫内位标本获取的受限,本研究选取子宫肌瘤患者正常子宫内位作为对照,其一般资料与 EMS 组在足月产次数上存在差异,EMS 组足月产次数少于对照组,这由 EMS 疾病特点所决定。

目前 P2X7 受体与 EMS 的关联性研究较少,我们前期研究证实乳腺癌组织 P2X7 受体与雌激素受体表达有正相关性^[23]。而 EMS 被称为“激素依赖性疾病”,目前除根治性手术外,临床上无论是药物治疗或保守性手术均有较高的复发率。EMS 异位内膜组织中 P2X7 受体与雌激素受体表达是否有相关性,尚需进一步研究证实。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Holoch K J, Lessey B A. Endometriosis and infertility [J]. Clin Obstet Gynecol, 2010, 53: 429-438.
- [2] Giudice L C, Kao L C. Endometriosis [J]. Lancet, 2004, 364: 1789-1799.

- [3] Mandai M, Yamaguchi K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Ovarian cancer in endometriosis; molecular biology, pathology, and clinical management[J]. *Int J Clin Oncol*, 2009, 14: 383-391.
- [4] Osuga Y, Koga K, Hirota Y, Hirata T, Yoshino O, Taketani Y. Lymphocytes in endometriosis[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2011, 65: 1-10.
- [5] Berbic M, Fraser I S. Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis[J]. *J Reprod Immunol*, 2011, 88: 149-155.
- [6] Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Role of natural killer cell activity in the pathogenesis of endometriosis[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18: 200-208.
- [7] González-Ramos R, Van Langendonck A, Defrère S, Lousse J C, Colette S, Devoto L, et al. Involvement of the nuclear factor- κ B pathway in the pathogenesis of endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2010, 94: 1985-1994.
- [8] Jarvis M F, Khakh B S. ATP-gated P2X cation-channels[J]. *Neuropharmacology*, 2009, 56: 208-215.
- [9] Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O A, Verkhratsky A. P2X receptors and synaptic plasticity [J]. *Neuroscience*, 2009, 158: 137-148.
- [10] Jubb A M, Miller K D, Rugo H S, Harris A L, Chen D, Reimann J D. Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17: 372-381.
- [11] Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung K K, de Campos N E, de Oliveira Souza C, Ojcius D M, et al. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells; effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288: G1024-G1035.
- [12] Wang Q, Wang L, Feng Y H, Li X, Zeng R, Gorodeski G I. P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287: C1349-C1358.
- [13] Li X, Zhou L, Feng Y H, Abdul-Karim F W, Gorodeski G I. The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15: 1906-1913.
- [14] Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer[J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 4693-4696.
- [15] Khakh B S, North R A. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease[J]. *Nature*, 2006, 442: 527-532.
- [16] Smart M L, Gu B, Panchal R G, Wiley J, Cromer B, Williams D A, et al. P2X7 receptor cell surface expression and cytolitic pore formation are regulated by a distal C-terminal region[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 8853-8860.
- [17] Wang L, Feng Y H, Gorodeski G I. Epidermal growth factor facilitates epinephrine inhibition of P2X7-receptor-mediated pore formation and apoptosis; a novel signaling network[J]. *Endocrinology*, 2005, 146: 164-174.
- [18] Lenertz L Y, Wang Z, Guadarrama A G, Hill LM, Gavala M L, Bertics P J. Mutation of putative N-linked glycosylation sites on the human nucleotide receptor P2X(7) reveals a key residue important for receptor function[J]. *Biochemistry*, 2010, 49: 4611-4619.
- [19] Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli R M, Curti A, Idzko M, et al. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release[J]. *J Immunol*, 2006, 176: 3877-3883.
- [20] Grol M W, Panupinthu N, Korcok J, Sims S M, Dixon S J. Expression, signaling, and function of P2X7 receptors in bone[J]. *Purinergic signalling*, 2009, 5: 205-221.
- [21] Kraśnicki D. [Serum and peritoneal fluid CA-125 concentration in women with endometriosis][J]. *Ginekol Pol*, 2001, 72(12A): 1365.
- [22] 郎景和. 子宫内膜异位症的研究与设想[J]. *中华妇产科杂志*, 2003, 38: 478-480.
- [23] Li H, Wang L, Qu H, Yu L H, Burnstock G, Ni X, et al. P2Y2 receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 338: 28-37.