

围,结合经脉循行,辩证当属足太阳、少阳两经合病,且枕下多为足太阳、少阳经筋结聚交汇之所,故本病亦属太少两经合病之经筋病。《灵枢·经筋》载:“经筋病…治在燔针劫刺,以知为数,以痛为腧…”,即本病宜采用火针治疗并可选取局部阿是穴为主,故本研究采用贺氏火针点刺治疗,旨在籍针刺与火灼之力,温通局部经气,散寒止痛,以求“通而不痛”。本法直取病所,针专而力锐,故疗效卓著。

现代医学认为,枕神经痛的发生与枕神经的解剖特点有关,其中枕大神经源自 C1~C2,枕小神经源自 C2~C3,枕大与枕小神经离开骨性结构后均需穿行相当长的路程才能到达各自所支配的皮肤区。所以其在颈枕部肌肉、肌腱及血管间穿行行程中,任一个邻近结构发生病变均可刺激枕神经而诱发疼痛^[9]。一般认为枕神经穿过头半棘肌时最易受损,且于受凉、落枕时易于诱发。近来有研究提出枕神经痛与其悬浮网结构异常有关。即在某些特殊情况下,如肌筋膜炎、受凉外感或疲倦劳累时,容易导致该网失衡,腔内局部压和剪力增大,导致枕神经痛发作^[8]。火针疗法是利用特制的针具在火焰上加热到很高的温度后迅速刺入颈枕部最痛点的治疗方法,随着针刺后局部充血或红、热、痛等温热刺激反应,可达改善局部组织血供及代谢的作用。同时这种针刺后人为造成的相当于临床上的 I 度~浅 II 度烧伤,又可诱发机体自身的应激反应,促使组胺样物质的释放,增进白细胞的渗出及提高其吞噬功能,从而帮助炎

症的消退,进而达到消除枕神经痛刺激源的作用,使疼痛得以缓解^[5,10]。

综上所述,本研究结果显示以痛为输火针点刺枕神经痛具有显著疗效,且无明显不良反应,故该疗法疗效优于药物治疗,值得进一步研究推广。

参考文献

- 王纪佐. 国际头痛学会的头痛第二版简介和临床应用 [J]. 中国医刊, 2006, 41(12): 11~14.
- 史玉泉, 周孝达, 汪无级, 等. 实用神经病学 [M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1994: 1022.
- 王维治, 万琪, 刘恩重, 等. 神经病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1087.
- 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准 [M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 22~23.
- 洪永波, 姚卫海. 火针傍针刺治疗枕神经痛 33 例临床疗效观察 [J]. 北京中医药, 2012, 31(2): 123~124.
- 王迪, 边颖, 李婧婧, 等. 拉莫三嗪与卡马西平治疗三叉神经痛的疗效对比 [J]. 西南国防医药, 2013, 23(3): 270~271.
- 方药中, 邓铁涛, 李克光, 等. 实用中医内科学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 578~579.
- 杨友松, 袁光固, 陈春晖, 等. 枕神经痛发病的相关因素及其机制分析 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(20): 3951~3952.
- Abele H, pieper KS, Herrmann M. Morphological investigation of connective tissue structure in the region of the nervus occipitals major [J]. Funct Neurol, 1999, 14(3): 167~170.
- 张晓霞, 吴之煌, 董明霞, 等. 火针疗法治病机理初探 [J]. 北京中医, 2007, 26(9): 576~578.

(收稿日期: 2013-11-28)

(修回日期: 2013-12-05)

宫腔粘连 microRNA 差异表达谱分析

柳 鑫 段 华

摘要 目的 进行重度宫腔粘连组织的 microRNA (miRNA) 芯片分析, 寻找与正常子宫组织相比差异表达的 miRNA, 为明确 miRNA 与宫腔粘连发生、发展关系及临床寻找宫腔粘连的靶基因治疗提供依据。**方法** 应用 microarray 芯片技术检测重度宫腔粘连患者粘连组织和子宫肌瘤患者正常子宫组织中的 miRNA 表达差异, 实时定量 PCR (qRT-PCR) 验证从 microarray 芯片中筛选出来的明显差异表达的部分 miRNA。**结果** microarray 芯片技术结果显示, 与正常组比较, 宫腔粘连组织中筛选出 26 个差异 miRNA, 其中 17 种 miRNA 表达显著上调, 9 种 miRNA 表达显著下调。**结论** 宫腔粘连组织和正常子宫组织中 miRNAs 表达谱有差异, 这种差异为宫腔粘连形成的分子机制研究提供基础。

关键词 宫腔粘连 miRNA 差异表达

基金项目: 北京市医院管理局临床医学发展基金资助项目 (ZY201406)

作者单位: 100069 首都医科大学附属北京佑安医院妇幼中心 (柳鑫); 100006 首都医科大学附属北京妇产医院微创中心 (段华)

通讯作者: 段华, 电子信箱: duanhuasci@163.com

[中图分类号] R71

[文献标识码] A

Analysis of MicroRNA Species in Intrauterine Adhesion. Liu Xin, Duan Hua. Department of Obstetrics and Gynecology, Youan Hospital of Beijing, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract Objective To analysis the miRNAs profile differentially expressed in human intrauterine adhesion (IUA) tissue and normal uterus tissue. **Methods** We analyzed the role of differentially expressed miRNA and target genes in the pathogenesis of IUA. Then the target genes were subjected to gene ontology and pathway analysis. The target miRNA was verified by polymerase chain reaction method. **Results** A total of 26 miRNA species were differentially expressed in IUA tissue versus normal uterine tissue. Of these, 17 miRNA was highly expressed and 9 miRNA was lightly minimally expressed in IUA tissue. The further analysis indicated the expression level of miRNA was consistent with the results of gene chip. **Conclusion** Some miRNAs expressed differently between IUA patients and normal women, suggesting that they may be involved in the pathogenesis of IUA.

Key words Intrauterine adhesion; miRNA; Differently expression

子宫腔粘连性疾病(intrauterine adhesion, IUA)在我国发生率高居世界首位,并且呈逐年增长趋势,由于长期缺乏切实有效的治疗方案,该病不仅严重威胁患者的生育功能和生活质量,也给家庭和谐和社会稳定带来极大影响。目前宫腔粘连的发病机制不清,是妇科领域急待解决的问题。miRNA是近年来发现的长度约22个核苷酸的内源性短链RNA,是一种新型的基因表达调控因子,负向调控靶基因(mRNA)表达,是近几年生命科学领域的研究热点。研究证实,miRNA调节靶基因在调节瘢痕修复过程的各个环节包括炎症、血管生成、成纤维细胞功能、凋亡、胶原沉积及细胞外基质的表达及功能各方面均起到重要作用^[1,2]。

本研究进行了重度宫腔粘连组织的miRNA芯片分析,寻找与正常子宫组织相比差异表达的miRNA,为明确miRNA与宫腔粘连发生、发展关系提供基础研究。

材料与方法

1. 研究对象:宫腔粘连组织(粘连组)选自2012年4~8月在北京妇产医院微创中心因重度宫腔粘连而行宫腔镜下宫腔粘连分离手术的患者13例,年龄30~40岁。诊断标准:宫腔镜检查证实的重度宫腔粘连。入组条件:术前未行激素治疗,月经周期处于增生早期。对照组取正常子宫组织13例,选自同时期在北京妇产医院微创中心因子宫肌瘤而行子宫全切手术治疗的患者,年龄40~45岁。入组标准:育龄期女性,未行激素治疗,月经周期处于增生早期;排除条件:合并子宫内膜病变、其他严重内、外科合并症。

2. 标本采集:实验组标本来自重度宫腔粘连患者,于术中切除粘连组织,剪去周围有损伤部分组织,分为两块,一块约5mm³大小包于锡纸中并放入液氮罐中保存,一块送病理。对照组来自因子宫肌瘤而行子宫全切手术治疗的患者。行子宫全切术后留取正常子宫组织,包括内膜及部分子宫浅肌层组织,大小约5mm³于液氮罐中保存。

3. 药品和试剂:RNA抽提试剂盒:QIAGEN RNeasy Mini Kit(货号:217004);德国QIAGEN公司;QIAGEN RNase-free DNaseI(货号:79254);德国QIAGEN公司;Ambion® WT Expression Kit试剂盒:美国Ambion Affymetrix公司;片段化和标记试剂盒(GeneChip2 WT Terminal Labeling Kit and Controls Kit 30次);美国Affymetrix公司;Affymetrix试剂(GeneChip2 Hybridization, Wash, and Stain Kit);美国Affymetrix公司;micro RNA检测试剂盒:miRcute miRNA first-strand cDNA synthesis kit和miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒:美国Affymetrix公司。

4. 方法:(1)芯片技术检测:于液氮中取出宫腔粘连患者粘连组织与正常育龄子宫肌瘤患者正常子宫内膜组织及浅肌层组织各3例,用于microarray芯片技术检测。microarray芯片技术检测由上海其明信息技术有限公司完成,在芯片结果中根据P值筛选出显著差异表达的miRNA。(2)组织中RNA的提取:取出样品解冻标本,按照Trizol一步法提取总RNA,利用定容RNA的RNase-free Water作为空白对照,每个样品吸取1μl,用分光光度计测定RNA溶液在260nm和280nm下的吸光度值,检测RNA的浓度和纯度。按以下公式计算total RNA的浓度:Total RNA浓度(μg/ml)=OD260×稀释倍数×40μg/ml以OD260/280值来检测RNA的纯度,OD260/280值1.9~2.1时,可认为RNA的纯度较好,备实验用。(3)Realtime PCR验证:进一步扩大各组样本量各10例,选取部分感兴趣miRNA采用real-time PCR方法进行验证,引物序列如下(U6为内参):miR 543:5'-AAACATTCCGGTG-CACTTCTT-3';miR 135a-3p:5'-TATAGGGATTGGAGCGTGGCG-3';miR 513a-5p:5'-TTCACAGGGAGGTGTCAT-3';所有样品均重复3次,同一样品的3次测定结果取平均值,与该样品内参Ct值的差值即为ΔCt,2^{-ΔΔCt}表示该样品表达的相对量。

结 果

1. 病理结果:HE染色表明,纤维肉芽组织伴钙化。正常子宫内膜结构消失,子宫内膜功能层及基底层消失,可见纤维组织增生,胶原沉积及毛细血管增生,详见图1。

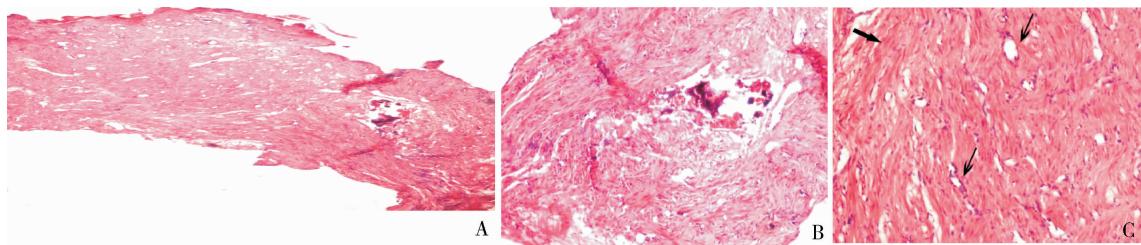


图 1 宫腔粘连组织(HE 染色)

A. 纤维性肉芽组织伴钙化($\times 40$)；B. 钙化部位($\times 100$)；C. 纤维肉芽组织(纤维组织增生, 胶原沉积, 毛细血管增生, $\times 200$)

2. RNA 质量: 临床组织标本提取总的 RNA 为 $3.765 \sim 31.620 \mu\text{g}$, OD $260/280$ 比值为 $1.87 \sim 2.1$ 。琼脂糖凝胶电泳可见条带清晰。

3. miRNA 的筛选: 应用 6 张 Affymetrix miRNA 芯片, 分析两个样品组中的 6 个样品, 比较 3 例 IUA 组织与 3 例对照组正常子宫组织的 miRNA 表达情况, 其中, 筛选出 26 个差异 miRNA(表 1)。

表 1 宫腔粘连组织中差异表达的 miRNA

miRNA	P	误判率	均值的倍数	基因上调/下调
hsa - miR - 504	0.001	0.062	0.20	下调
hsa - miR - 1247	0.002	0.062	0.20	下调
hsa - miR - 299 - 5p	0.014	0.114	0.21	下调
hsa - miR - 543	0.020	0.116	0.21	下调
hsa - miR - 4286	0.013	0.114	0.23	下调
hsa - miR - 574 - 3p	0.016	0.116	0.33	下调
hsa - miR - 197	0.043	0.163	0.35	下调
hsa - miR - 92b	0.013	0.114	0.44	下调
hsa - miR - 195	0.048	0.171	0.46	下调
hsa - miR - 4685 - 5p	0.018	0.116	2.2	上调
hsa - miR - 720	0.040	0.163	2.22	上调
hsa - miR - 4655	0.022	0.116	2.24	上调
hsa - miR - 4507	0.027	0.127	2.31	上调
hsa - miR - 4728	0.031	0.135	2.34	上调
hsa - miR - 149	0.014	0.114	2.39	上调
hsa - miR - 4667 - 5p	0.042	0.163	2.5	上调
hsa - miR - 4646 - 5p	0.011	0.114	2.88	上调
hsa - miR - 1972	0.020	0.116	3.02	上调
hsa - miR - 642b	0.008	0.104	3.19	上调
hsa - miR - 3064 - 5p	0.026	0.127	3.21	上调
hsa - miR - 135a	0.003	0.062	3.53	上调
hsa - miR - 1291	0.028	0.128	3.64	上调
hsa - miR - 472	0.005	0.087	3.89	上调
hsa - miR - 513a - 5p	0.006	0.089	3.95	上调
hsa - miR - 575	0.002	0.062	4.55	上调
hsa - miR - 3175	0.021	0.116	4.72	上调

4. real - time 荧光定量 PCR 验证分析: 笔者扩大各组样本各 10 例, 选取 miR - 543、miR - 135a - 3p、

miR - 513a - 5p 应用 RT - PCR 法进行验证, 粘连组与对照组相比结果表明, 重度宫腔粘连组: miR - 135a - 3p (2.8 ± 0.12 倍, 上调), miR - 513a - 5p (31.9 ± 5.62 倍, 上调), miR - 543 (0.11 ± 0.003 倍, 下调)。这些数据结果表明, RT - PCR 的结果与基因芯片结果表达趋势一致, 粘连组与正常子宫组织相比, $P < 0.05$, 见图 2。

讨 论

miRNA 是一类长约 22 个核苷酸的非编码的单链 RNA 分子。尽管是小序列的核苷酸, 它们在翻译后水平的基因表达调节起着重要作用。直到 2012 年 8 月, 在 miR 数据库中已识别 193 个物种 25141 条成熟 miRNA 序列, 其中包括 1600 条人类 miRNA 序列^[3]。这些 miRNA 调控几乎所有生理过程。miRNA 的生物合成过程被严格的调控, 使得不同有机体、组织、细胞在不同发育阶段有不同的 miRNA 表达方式及特点。近年来研究发现 miRNA 与瘢痕修复的发生密切相关, miRNA 作为“变压器”可以调控负责瘢痕修复“电流”的开关。miRNA 可以同时调节多种基因的表达, 参与瘢痕修复的演进, 是瘢痕修复发生、发展过程中的重要分子。

在本研究中, 笔者应用 miRNA 芯片技术表明相对于正常子宫组织宫腔粘连组织中有不同的 miRNA 与 mRNA 表达谱。到目前为止, 笔者所发现的 26 个目标 miRNA 在宫腔粘连发生、发展中所起的作用还是未知的。但其中一些 miRNA 在某些细胞生理活动中起到重要作用。许多研究表明 miR - 195 促进细胞分裂与凋亡, 抑制细胞增生^[4]。Joglekar 等^[5]在具有再生功能的胰腺细胞中使用反义特异 miR - 195 - 抑制剂。发现在胰腺发育过程中, miR - 195 可以减少这种具有激素释放功能的细胞的数量。Ichimi 等发现在 miR - 195 转染体中, 细胞有显著的减少而宫腔粘连的形成过程包括细胞增生^[6]。本项研究表明, miRNA - 195 在宫腔粘连组织中的表达是下调

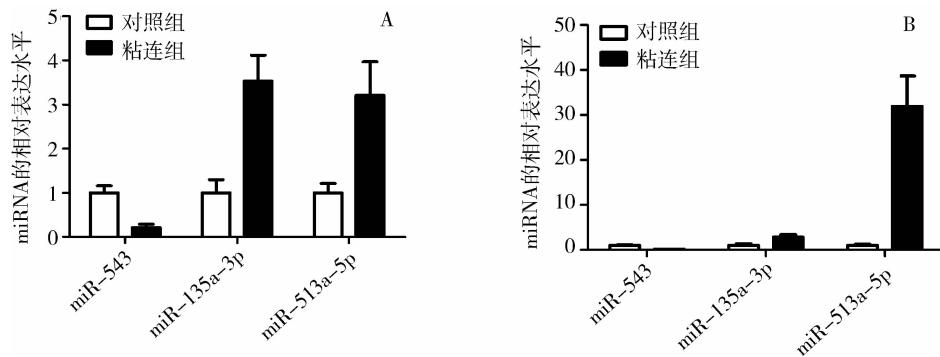


图 2 宫腔粘连组织与正常子宫组织中 miRNA 表达水平

A. miRNA 芯片 ; B. real - time PCR

的,是正常子宫组织表达量的 0.46 ($P = 0.048$)。肝星形细胞是肝硬化发生中起到释放基质作用的细胞,有研究表明在肝硬化的肝星形细胞中 miRNA92b 是低表达的^[7]。在本项研究中发现,在宫腔粘连组织中 miRNA92b 的表达是下调的,是正常子宫组织表达量的 0.44 ($P = 0.0013$)。

研究表明,miRNA 可以调节转化生长因子 (TGF - β) 的表达,在肌腱损伤的动物模型中,局部应用 TGF - β 拮抗剂可以达到预防肌腱粘连形成的治疗效果^[8]。而最近的一项研究表明,胶原蛋白 1 是 miR - 29b 的靶基因,在皮肤成纤维细胞中的体外实验证实,增加 miR - 29b 的表达可引起胶原蛋白 1 的两种亚型的表达显著下降,而 miR - 29b 沉没可以在 mRNA 及蛋白水平增加胶原蛋白 1 的表达。此项研究表明 miR - 29b 可作用于靶基因减少皮肤瘢痕的形成^[9],为 miRNA 调控靶基因治疗疾病提供可能的机会。

本项研究存在一定的局限性,首先样本量少,研究结果还需基于大样本的研究的支持。其次,本项研究只是初步的分析,还需进行大量系统的研究来验证 miRNA 与靶基因在宫腔粘连形成中的作用机制。最后,对照组不是来自宫腔粘连患者本身配对的标本。对照组的异质性可能影响组织中基因的表达,但对照组来自子宫肌瘤患者正常子宫内膜及子宫肌层部分,且宫腔粘连组织的来源是正常子宫组织,所以也可以突出粘连标本的差异性。

由此得出结论,miRNA 表达谱芯片与 mRNA 芯片及靶基因预测结果相结合,筛选出 16 个在宫腔粘

连组和对照组间差异表达的 miRNA,其中 12 个 miRNA 表达上调,4 个 miRNA 表达下调。宫腔粘连发生发展中存在 miRNA 调控靶基因的分子机制,为宫腔粘连发生发展分子机制的研究提供了新视野。

参考文献

- 1 Luckshman B, Kim M, Jagdeep N. miRNA epigenetics a new avenue for wound healing research [J]. Biodrugs, 2011,25 (1) : 27 - 41
- 2 Zina JR, Thomas N, Wight BB. miRNAs regulate expression and function of extracellular matrix molecules [J]. Matrix Biol, 2013,32 (2) : 74 - 85
- 3 Kozomara A, Griffiths - Jones S. miRBase: integrating miRNA annotation and deep - sequencing data [J]. Nucleic Acids Res, 2011,39 (Database issue) : D152 - D157
- 4 He JF, Luo YM, Wan XH, Biogenesis of miRNA - 195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis [J]. J Biochem Molecular Oxicology, 2011,25 (6) : 404 - 408
- 5 Joglekar MV, Parekh VS, Mehta S, et al. miRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post - transcriptional regulation of neurogenin3 [J]. Dev Biol, 2007,311 (2) : 603 - 612
- 6 Ichimi T, Enokida H, Okuno Y, et al. Identification of novel miRNA targets based on miRNA signatures in bladder cancer [J]. Int J Cancer 2009,125 (2) : 345 - 352
- 7 Guo CJ, Pan Q, Cheng T, et al. Changes in miRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways [J]. FEBS J. 2009, 276:5163 - 5176
- 8 Brown JJ, Bayat A. Genetic susceptibility to raised dermal scarring [J]. Br J Dermatol, 2009, 161 (1) : 8 - 18
- 9 Cheng J, Wang YL, Wang DM, Identification of collagen 1 as a post - transcriptional target of miR - 29b in skin fibroblasts: therapeutic implication for scar reduction [J]. Am J Med Sci, 2013,346 (2) : 98 - 103

(收稿日期:2014 - 03 - 25)

(修回日期:2014 - 05 - 20)