

• 临床研究 •

多囊卵巢综合征患者子宫内膜胰岛素受体基因甲基化及 DNA 甲基转移酶表达水平研究

赵 嵩

(湖北省十堰市妇幼保健院检验科 442000)

摘要:目的 分析多囊卵巢综合征(PCOS)患者子宫内膜胰岛素受体(INSR)基因甲基化及 DNA 甲基转移酶(DNMT)表达水平。方法 随机选择本院 2014 年 5 月至 2016 年 6 月收治的 PCOS 患者 80 例,根据是否合并胰岛素抵抗(IR),分为 IR 组及非胰岛素抵抗(NIR)组,比较两组患者体质量指数(BMI)、腰臀比(WHR)、空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、HOMA 稳态模型指数(HOMA 指数)、性激素水平,以及子宫内膜组织 INSR 基因甲基化水平和 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 表达水平。结果 IR 组 BMI、WHR、FBG、FINS、HOMA 指数均明显高于 NIR 组($P < 0.05$)。两组均未检出 INSR 基因完全甲基化患者,但 IR 组部分甲基化检出率高于 NIR 组($P > 0.05$)。DNMT1、DNMT3a H-score 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但 IR 组 DNMT3b H-score 评分明显高于 NIR 组($P < 0.05$)。结论 PCOS 患者子宫内膜 INSR 基因部分甲基化检出率较高,PCOS 发病可能与 DNA 表观遗传学调控有关,合并 IR 的 PCOS 患者子宫内膜 DNMT3b 表达水平较高,说明 PCOS 属于表观遗传学疾病,且合并 IR 的 PCOS 患者是子宫内膜癌的高发人群。

关键词:多囊卵巢综合征; 胰岛素受体; DNA 甲基化; DNA 甲基转移酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1541-03

多囊卵巢综合征(PCOS)育龄期妇女常见病,是以高雄激素症、胰高血糖素症为主的内分泌紊乱性疾病,育龄期妇女发病率为 5%~10%,在无排卵性不孕患者中发病率为 30%~60%^[1]。PCOS 患者临床表现为不同程度的月经异常、多毛、卵巢多囊性改变等,其致病因素非常复杂,与遗传、环境、内分泌等多方面因素有关。胰岛素受体(INSR)是胰岛素发挥作用的重要受体,在卵巢等生殖器官也有一定的表达^[2-3]。胰岛素与表达于卵巢的 INSR 结合后,可通过刺激卵巢间质细胞分泌雄激素,抑制卵泡凋亡,减少闭锁,进而促进卵泡形成。DNA 甲基化是基因表观遗传学修饰的重要方式。PCOS 患者 INSR 基因可能存在 DNA 甲基化等表观遗传学修饰改变^[4]。2 型糖尿病和子宫内膜癌是 PCOS 常见远期并发症,PCOS 患者子宫内膜癌发病风险是健康女性的 4 倍^[5]。DNA 甲基化介导的表观遗传学改变可调控发育,以及肿瘤等其他疾病的发生,而 DNA 甲基转移酶(DNMT)是 DNA 甲基化的关键酶。本研究分析了 PCOS 患者子宫内膜 INSR 基因甲基化及 DNMT 的关系。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择本院 2014 年 5 月至 2016 年 6 月收治的 PCOS 患者 80 例,所有患者均符合鹿特丹诊断标准,均无甲状腺及肾上腺疾病,纳入本研究前 3 个月均无激素类药物治疗史。根据中国糖尿病协会制定的胰岛素抵抗(IR)诊断标准,将 80 例患者分为 IR 组与非胰岛素抵抗(NIR)组,每组 40 例。

1.2 方法

1.2.1 基础资料与激素水平检测 收集患者基础资料,包括身高、体质量、腰围、臀围,计算体质量指数(BMI)与腰臀比(WHR),BMI ≥ 25.0 kg/m² 判为肥胖,WHR ≥ 0.85 判为中心型肥胖。在月经第 2~5 天采集患者晨起空腹静脉血,常规方法分离血清标本进行睾酮(T)、黄体生成素(LH)、卵泡刺激素(FSH)、雌二醇(E2)、催乳素(PRL)、空腹胰岛素(FINS)和空腹血糖(FBG),计算 HOMA 稳态模型指数(HOMA 指数)。

1.2.2 DNA 甲基化检测 在患者停经或不规则出血后超过 10 d,并且已经排除无妊娠后,采用 5 号刮匙刮取子宫前壁和后壁内膜组织。组织标本分成 2 份,分别用于组织学染色检查

和 DNA 甲基化检测。用于组织学染色检查的组织标本以 10% 甲醛溶液 4 ℃ 固定 24 h,常规包埋和切片,采用苏木精-伊红(HE)染色法进行染色,最后进行显微镜观察。采用德国 Qiagen 公司 DNA 提取试剂盒(mini DNA extraction kit)提取组织标本 DNA,亚硫酸氢钠(美国 Sigma 公司)修饰后,采用 Wizard clean-up system 试剂盒(Promega 公司)回收 DNA。修饰后 DNA 溶液总体积为 50 μ L。采用 Methylation Primer 2.0 软件设计甲基化引物 MSP、USP,由北京索奥生物有限公司合成,对修饰后 DNA 进行扩增,反应条件为 93 ℃ 3 min,93 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 42 s 循环 40 次,72 ℃ 10 min。取 8 μ L 扩增产物,采用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,紫外灯下观察扩增条带并拍照。

1.2.3 免疫组化检测 标本收集方法同上。切片常规脱蜡,抗原修复后,采用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,每次 1.5 min;于过氧化氢阻断液中孵育 10 min,PBS 冲洗 2 次,每次 2.5 min;滴加 Ultra B Block 封闭液,室温孵育 5 min,PBS 冲洗 2 次,每次 2.5 min;加入抗体工作液,37 ℃ 孵育 1~2 h,PBS 冲洗 2 次,每次 2.5 min;加入 DNMT1、DNMT3a、DNMT3b 一抗增强液,室温孵育 20 min,PBS 冲洗 2 次,每次 2.5 min;滴加辣根过氧化物酶聚合物(HRP Polymer),室温孵育 30 min,PBS 冲洗 2 次,每次 2.5 min;滴加 1~2 滴双花扁豆凝集素脉冲色原(DBA Pluse Chromogen),室温孵育 3~15 min,自来水冲洗后复染;以不同浓度梯度的乙醇溶液浸泡 5 s,采用二甲苯进行透明处理,中性树胶封片后显微镜下观察。

1.2.4 评定标准 甲基化评定标准^[6-7]:只出现甲基化引物扩增产物,判为 INSR 基因启动子完全甲基化;只出现非甲基化引物扩增产物,判为非甲基化;若二者均存在,判为部分甲基化。免疫组化半定量评定标准:(1)不着色判为 0 分,淡棕黄色判为 1 分,深棕黄色判为 3 分,两者之间判为 2 分。(2)阳性细胞百分率小于或等于 5% 判为 0 分,6%~20% 判为 1 分,21%~50% 判为 2 分, $\geq 51\%$ 判为 3 分。(3)每张切片随机选择 5 个高倍视野,采用 H-score 法进行评分。H-score=着色评分结果+阳性细胞百分率评分结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件进行数据处理和统计

学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例数和百分率表示,数据比较采取卡方检验。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组相关指标比较 IR 组与 NIR 组患者年龄、激素水平比较差异无统计学意义无统计学意义($P > 0.05$),BMI、WHR、

FBG、FINS、HOMR 指数差异明显具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

2.3 IR 组与 NIR 组 DNMT H-score 评分比较 DNMT1、DNMT3a H-score 评分组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),DNMT3b H-score 评分组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 1 IR 组与 NIR 组相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	WHR	FSH(IU/L)	LH(IU/L)
IR 组	40	28.6±2.9	25.82±3.58	0.88±0.05	7.49±2.14	13.94±7.49
NIR 组	40	28.9±3.1	22.34±3.07	0.81±0.03	7.52±2.23	15.24±8.11
<i>t</i>	—	0.447	4.666	7.592	0.061	0.744
<i>P</i>	—	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

续表 1 IR 组与 NIR 组相关指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	E2(pg/mL)	T(ng/mL)	FBG(mmol/L)	FINS(pmol/mL)	HOMR 指数
IR 组	40	51.37±16.34	0.81±0.28	5.34±1.12	120.34±56.78	4.32±2.24
NIR 组	40	59.34±25.46	0.85±0.32	4.86±0.46	51.36±16.32	1.84±0.58
<i>t</i>	—	1.666	0.595	2.507	7.385	6.778
<i>P</i>	—	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:—表示无数据。

2.2 IR 组与 NIR 组 INSR 甲基化比较 两组均未检出完全甲基化患者,部分甲基化、非甲基化检出率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 IR 组与 NIR 组 INSR 甲基化比较[*n*(%)]

组别	<i>n</i>	完全甲基化	部分甲基化	非甲基化
IR 组	40	0	27(67.5)	13(32.5)
NIR 组	40	0	24(60.0)	16(40.0)
χ^2	—	—	0.486	0.419
<i>P</i>	—	—	>0.05	>0.05

注:—表示无数据。

表 3 IR 组与 NIR 组 POCS 患者 DNMT H-score 评分比较(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	DNMT1	DNMT3a	DNMT3b
IR 组	40	2.846±1.232	1.648±1.423	4.385±1.124
NIR 组	40	2.431±1.348	1.589±1.358	2.315±1.047
<i>t</i>	—	1.437	0.189	8.522
<i>P</i>	—	>0.05	>0.05	<0.05

注:—表示无数据。

2.4 IR 组与 NIR 组组织学检查结果 IR 组检出子宫内膜增生 5 例、子宫内膜增生伴息肉形成 4 例、增殖期子宫内膜 31 例;NIR 组检出子宫内膜增生 4 例、子宫内膜增生伴息肉形成 3 例、增殖期子宫内膜 33 例。各种类型组织学检查结果检出率组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

POCS 由遗传及环境因素共同作用所致,环境因素如何影响遗传物质而诱发 POCS 的作用机制尚不明确。DNA 表观遗传学修饰是环境与遗传因素相互作用的中介,也是环境因素诱发 POCS 的可能机制之一。环境因素通过对 DNA 的表观遗传学修饰作用,影响基因表达,最为常见的修饰类型为 DNA

甲基化。DNA 甲基化是指在 DNMT 作用下,将甲基转移到胞嘧啶环第 5 位碳原子上,形成甲基化胞嘧啶的过程^[8]。DNA 甲基化与多种良性疾病及癌症密切相关。本研究根据是否合并 IR 将 POCS 患者分为 IR 组和 NIR 组,研究结果显示,IR 组 BMI、WHR、FBG、FINS、HOMR 指数均明显高于 NIR 组($P < 0.05$);两组均未检出 INSR 基因完全甲基化患者,IR 组、NIR 组 INSR 基因部分甲基化检出率分别为 67.5%、60.0%,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。由此可见,POCS 患者无论是否合并 IR,均有可能发生 INSR 基因甲基化,提示 POCS 发病机制与 INSR 基因表观遗传学调控密切相关,与类似研究结果相近^[9]。

DNMT 在 DNA 甲基化过程中具有重要作用,已发现的具有活性的 DNMT 包括 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b。DNMT1 的作用是在细胞分裂过程中维持 DNA 新生链的甲基化状态,并维持其他类型 DNMT 的功能^[10]。DNMT3a、DNMT3b 主要作用是催化 DNA 甲基化新生位点,具有在配子形成和植入后的胚胎中建立新的甲基化模式的作用^[11]。DNA 异常甲基化是肿瘤的发病机制之一,其中 DNMT3b 起到了非常重要的作用^[12]。本研究结果显示,IR 组和 NIR 组 DNMT1、DNMT3a H-score 评分比较差异无统计学意义($P > 0.05$),而 IR 组 DNMT3b H-score 评分明显高于 NIR 组($P < 0.05$)。此外,IR 组和 NIR 组子宫内膜组织学检查结果比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此,合并 IR 的 POCS 患者存在子宫内膜表观遗传学改变,并且是子宫内膜癌的高发人群。

综上所述,POCS 患者子宫内膜 INSR 基因部分甲基化检出率较高,POCS 发病可能与 DNA 表观遗传学调控有关,合并 IR 的 POCS 患者子宫内膜 DNMT3b 表达水平较高,说明 POCS 属于表观遗传学疾病,且合并 IR 的 POCS 患者是子宫内膜癌的高发人群。

参考文献

[1] Sang Q, Li X, Wang HJ, et al. Quantitative methylation level of the EPHX1 promoter in peripheral blood DNA is

associated with polycystic ovary syndrome [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88013.

[2] 田春花, 胡蓉, 罗艳, 等. 抗苗勒氏管激素在不同卵巢储备功能患者中的表达及相关性研究[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(9): 809-811.

[3] 郝栋栋, 钟兴明, 韦相才. AMHR、INSR 及其基因甲基化与 PCOS 相关病变关系研究进展[J]. 临床医学, 2014, 34(1): 114-116.

[4] 孙秀红, 韦相才, 苗竹林, 等. 两种方法建立多囊卵巢综合征大鼠模型的实验研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2011, 19(5): 276-279.

[5] 钟兴明, 孙秀红, 韦相才, 等. PCOS 大鼠卵巢 AMH 表达与 IR 的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(3): 307-311.

[6] 胡卫红, 陈琳, 同军, 等. PPAR γ mRNA 在卵巢颗粒细胞的表达调节及与多囊卵巢综合征的相关性[J]. 北京大学学报: 医学版, 2013, 45(6): 859-863.

[7] 吴月莲, 聂宜珍, 莫伟英, 等. 多囊卵巢综合征与子宫内膜 INSR 蛋白表达的关系研究[J]. 广西医学, 2012, 34(2):

175-177.

[8] 罗国群, 邓伟芬, 柳倩茹, 等. PCOS 患者子宫内膜病变和 INSR 表达的临床研究[J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(1): 32-35.

[9] 林芸, 邢福祺, 欧志英, 等. PCOS 患者胰岛素抵抗与 INSR 基因甲基化状态的关系[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(5): 867-870.

[10] 王碧君, 郭艺红, 王笑, 等. PPAR γ 激动剂对多囊卵巢综合征患者颗粒细胞中细胞色素 P450 芳香化酶调控机制的研究[J]. 生殖与避孕, 2015, 35(6): 359-365.

[11] Louwers YV, Stolk L, Uitterlinden AG. Cross-Ethnic Meta-Analysis of genetic variants for polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(12): 2006-2012.

[12] 王瑞娟, 徐建红. 基因组 DNA 甲基化及组蛋白甲基化[J]. 遗传, 2014, 36(3): 191-199.

(收稿日期: 2016-12-25 修回日期: 2017-02-23)

• 临床研究 •

围产期孕妇 B 族链球菌感染与耐药性分析

张 华

(首都医科大学大兴教学医院检验科, 北京 102600)

摘要:目的 分析围产期孕妇 B 族链球菌(GBS)感染状况及耐药性。方法 2014 年 1 月至 2016 年 1 月于本院接受检查的围产期孕妇 447 例, 采集生殖道分泌物标本, 采用培养法进行 GBS 检测, 同时进行药敏实验。结果 447 例围产期孕妇中, 检出 GBS 感染者 141 例, 占 31.5%, 其中小于 30 岁者 95 例(占 28.2%), 大于或等于 30 岁者 46 例(占 41.8%), 前者 GBS 感染检出率低于后者($P < 0.05$)。药敏实验结果显示, GBS 对万古霉素、利奈唑胺、氨苄西林、替加环素、头孢曲松敏感率较高, 其次为呋喃妥因、左氧氟沙星、克林霉素、红霉素, 对四环素的敏感率最低。39 株红霉素耐药、克林霉素敏感或中介 GBS 菌株 D-抑菌圈实验阳性率为 23.1%。结论 围产期孕妇 GBS 感染率较高, 且年龄大者更易感染, 应选用敏感率较高的抗菌药物进行 GBS 感染预防及治疗。

关键词: 围产期; 孕妇; B 族链球菌; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)11-1543-03

B 族链球菌(GBS)是一类 β 溶血、需氧、革兰阳性链球菌, 通常寄居于阴道、直肠等处。妊娠女性 GBS 携带率为 10%~30%, 因此 GBS 也是妊娠女性生殖道感染的主要病原菌^[1]。GBS 感染孕妇如未得到及时有效的治疗干预, 则有 1%~2% 的新生儿可发生 GBS 感染, 诱发肺炎、脑膜炎等疾病^[2]。此外, GBS 感染可引起早产、胎盘早剥等不良妊娠结局。因此, 本研究分析了孕妇围产期 GBS 感染情况, 旨在为有效防治 GBS 感染提供一定的依据。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1 月至 2016 年 1 月于本院产科接受检查的围产期孕妇 447 例, 年龄 23~41 岁, 平均(29.1 \pm 2.4)岁; 孕周 34~37 周, 平均(35.2 \pm 1.3)周; 小于 30 岁 337 例, 大于或等于 30 岁 110 例。所有孕妇在纳入本研究前 2 周内未接受抗菌药物治疗。排除合并严重内科系统疾病者。所有孕妇均知晓本研究内容, 并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与处理 由产科医生采集孕妇阴道分泌物标本。拭去孕妇外阴分泌物, 将无菌棉拭子置入阴道内约 1/3

处, 旋转 1 周, 采集分泌物标本。标本采集后 30 min 内送检。

1.2.2 细菌培养 将无菌棉拭子标本接种至哥伦比亚血琼脂平板, 35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱内培养 18~24 h 后, 观察菌落形态特点, 挑选可疑菌落, 接种至血平板, 相同方法进行分纯培养。挑选单个菌落, 进行涂片、革兰染色镜检及鉴定等。菌种鉴定采用法国生物梅里埃公司 VITEK2 型全自动细菌分析系统。

1.2.3 药敏实验 采用万古霉素、替加环素、氨苄西林、利奈唑胺、头孢曲松、左氧氟沙星、克林霉素、呋喃妥因、红霉素及四环素药敏纸片(英国 OXOID 公司)进行药敏实验。质控菌株包括大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎链球菌 ATCC49619。药敏实验及结果判断标准参照美国临床和实验室标准化协会制定的 M100-S22 文件。对于红霉素耐药、克林霉素敏感或中介 GBS 菌株, 采用纸片扩散法进行 D-抑菌圈实验。将菌株接种至 5% 绵羊血 Mueller-Hinton 琼脂培养基, 按间距 12 mm 粘贴 15 μ g 红霉素纸片和 2 μ g 克林霉素纸片, 35 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱内培养 20~24 h 后观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.5 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以例数和百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检