

• 临床研究 •

邻苯二甲酸酯暴露与子宫内膜异位症疼痛关系的研究

福建医科大学附属医院 福建省妇幼保健院妇产科 (福州 350001) 衣欢 林丹玫¹ 郑祥钦 吴花敏
林蓉 庄炜民 杨丽婷

【摘要】目的 研究环境内分泌干扰物对子宫内膜异位症疼痛的影响,探讨相关发病机制。**方法** 采用气相色谱质谱联用技术质谱法检测子宫内膜异位症患者和正常对照者尿液中邻苯二甲酸酯 (PAEs) 9 种代谢物含量,量化分析子宫内膜异位症患者痛经情况,研究代谢物和痛经的相关性。通过合并痛经子宫内膜异位症患者基因芯片筛选疼痛相关通路和关键蛋白 (GSE23339)。**结果** 子宫内膜异位症患者尿液中邻苯二甲酸单-乙基己基酯 (MEHP)、邻苯二甲酸单甲酯 (MMP) 含量均明显高于正常对照 (5.67 ± 2.01) $\mu\text{g/L}$ vs (2.54 ± 0.85) $\mu\text{g/L}$ 和 (17.11 ± 8.37) $\mu\text{g/L}$ vs (6.67 ± 2.01) $\mu\text{g/L}$, 均 $P < 0.001$ 。MEHP 与患者痛经 VAS 评分呈正相关 ($r = 0.86$, $P < 0.001$)。基因测序分析表明子宫内膜异位症并发疼痛患者体内补体和凝固级联通路明显激活,重要调节蛋白有人补体成分 1S (C1S)、补体成分 7 (C7)、补体因子 H (CFH) 和蛋白 S1 (PROS1)。**结论** PAEs 与子宫内膜异位症发病有关,可能通过补体和凝固级联通路介导子宫内膜异位症相关疼痛。

【关键词】 子宫内膜异位症; 邻苯二甲酸酯; 疼痛; 补体; 凝固系统; 基因芯片

【中图分类号】 R711.71 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)03-0005-04

Study of association between exposure to phthalates and endometriosis-related pain YI Huan, LIN Danmei, ZHENG Xiangqin, WU Huamin, LIN Rong, ZHUANG Weimin, YANG Liting. Fujian Provincial Maternal and Children Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】Objective To study the effects of endocrine disruptors on endometriosis-related pain and explore the pathogenesis of endometriosis-related pain. **Methods** Nine metabolites of phthalic acid esters (PAEs) in urine of patients with endometriosis and normal controls were detected by mass spectrometry. The dysmenorrhea of endometriosis patients was quantitatively analyzed, and the correlation between metabolites and dysmenorrhea was studied. The pain-related pathways and key proteins were screened by gene microarray in endometriosis who complicated with dysmenorrhea (GSE23339). **Results** The concentration of MEHP and MMP in the urine of endometriosis were significantly higher than those of the normal control [$(5.67 \pm 2.01) \mu\text{g/L}$ vs $(2.54 \pm 0.85) \mu\text{g/L}$ and $(17.11 \pm 8.37) \mu\text{g/L}$ vs $(6.67 \pm 2.01) \mu\text{g/L}$, ($P < 0.001$, respectively)]. MEHP was positively correlated with VAS score of dysmenorrhea. Gene sequencing analysis showed that complement and coagulation cascades were activated in patients with endometriosis complicated with pain, and the important regulatory proteins were C1S, C7, CFH and PROS1. **Conclusion** PAEs are associated with the pathogenesis of endometriosis and may mediate endometriosis-related pain through complement and coagulation cascade pathways.

【Key words】 endometriosis; phthalates; pain; complement; coagulation system; gene chip

子宫内膜异位症为女性常见病,约 10%~15% 育龄女性患此病,且发病率逐年上升^[1-2]。子宫内膜异位症患者 80% 伴有盆腔痛症状,严重者感觉如同“长在体内的荆棘”,严重影响妇女生活质量^[3]。虽然临床诊治水平不断提高;但是仍然存在子宫内膜异位症患者长期疼痛难以纠正的问题。基因的异常表达和环境因素影响是许多疾病发病的根本原因,同样适用于子宫内膜异位症的病因研究^[4]。目前环境因素对子宫内膜异位症的影响研究不多,本

文从日常生活中密切接触、干扰性激素代谢的内分泌干扰物着手开展研究。邻苯二甲酸酯 (phthalic acid esters, PAEs) 俗称“塑化剂”,为普遍存在的环境内分泌干扰物,已有流行病学研究表明其与子宫内膜异位症密切相关^[5]。我们旨在通过 PAEs 和子宫内膜异位症疼痛关系及机制研究,以期提供子宫内膜异位症长期疼痛这一临床问题的基础研究支持。

基金项目:福建省自然科学基金项目 (2016J01429)

¹ 通信作者,福建省福州市妇幼保健院 (福州 350005),Email: 1013730089@qq.com

1 资料与方法

1.1 一般资料: 选取 2016 年 1—12 月我院收治的 15 例子宫内膜异位症合并痛经者作为病例组, 年龄 28~42 岁, 平均年龄 (33.5 ± 3.4) 岁; 纳入 15 例正常女性作为对照组, 年龄 29~41 岁, 平均年龄 (32.5 ± 2.7) 岁。病例组纳入标准: 经临床症状、病史、病理检查等证实卵巢型子宫内膜异位症患者。排除标准: 合并子宫肌瘤等妇科疾病, 伴有心、肝、肾等重要器官严重性疾病。研究方案获伦理委员会批准, 研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法:

1.2.1 尿液 PAEs 代谢物检测: 一次性收集研究对象晨尿, 3 000 rpm 常温离心 10 min, 取上清分装于 5 mL 离心管中放置 -20 °C 冰箱保存。批量室温解冻, 采用气相色谱质谱联用技术检测从 5 种 PEAs 代谢所得的 9 种 PAEs 代谢物分别为邻苯二甲酸单甲酯 (mono-n-methyl phthalate, MMP)、邻苯二甲酸单 (3-羧基丙基) 酯 [mono- (3-carboxypropyl) phthalate, MCPP]、邻苯二甲酸单乙酯 (mono-ethyl phthalate, MEP)、邻苯二甲酸-单-乙基己基酯 (mono-ethylhexyl phthalate, MEHP)、邻苯二甲酸单异丁酯 [mono-isobutyl phthalate, MiBP]、邻苯二甲酸单丁酯 (mono-butyl phthalate, MBP)、邻苯二甲酸单 (2-乙基-5-羧基) 酯 [mono- (2-ethyl-5-carboxypentyl) phthalate, MECPP]、邻苯二甲酸-单 (2-乙基-5-羟基己基) 酯 [mono- (2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate, MEHHP]、邻苯二甲酸-单 (2-乙基-5-酮基己基) 酯 [mono- (2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate, MEOHP]^[6]。每个代谢物检测数据用尿比重进行矫正, 即: $\text{Ln}(\text{代谢物含量}/\text{尿比重})$ 。每个代谢物检测阈值设定为 $0.5 \mu\text{g/L}$, 所测水平低于阈值时, 统计分析时以阈值的一半取代。

1.2.2 观察指标: 痛经程度, 使用视觉模拟评分法 (visual analogue scale/score, VAS) 评估^[7]。

1.2.3 疼痛通路筛选: 从 GEO 数据库下载子宫内膜异位症 mRNA 表达谱数据库 (GSE23339), 其中子宫内膜异位症合并痛经者 10 例, 正常对照 9 例。R 软件制作火山图分析 TOP 50 差异表达基因, 采用 STRING 工具中 KEGG 分析与疼痛相关的作用通路。

1.3 统计学分析: 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料不符合正态分布者, 采用四分位法

表示, 使用 Mann-Whitney U 检验和秩和检验进行组间比较; 计量资料符合正态分布者, 采用均数 ± 标准差表示, 使用 t 检验进行组间比较。计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。各代谢物与 VAS 相关性评分采用 Pearson 进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿液 PAEs 代谢物检测: 子宫内膜异位症患者尿液中 PAEs 代谢产物 MEHP、MMP 含量显著高于正常女性, 而 MCPP、MEP、MiBP、MBP、MECPP、MEHHP 和 MEOHP 含量差异无统计学意义 (表 1)。

表 1 尿液中邻苯二甲酸酯类代谢产物含量测定 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

| PAEs 代谢产物 | Ln (代谢物含量/尿比重) | | P 值 |
|-----------|------------------|------------------|----------|
| | 病例组 | 对照组 | |
| MEHP | 5.67 ± 2.01 | 2.54 ± 0.85 | <0.001 |
| MECPP | 8.46 ± 0.60 | 8.27 ± 0.61 | 0.50 |
| MEHHP | 4.57 ± 0.23 | 4.83 ± 0.13 | 0.11 |
| MEOHP | 5.93 ± 0.39 | 6.27 ± 0.28 | 0.12 |
| MMP | 17.11 ± 8.37 | 6.67 ± 2.01 | <0.001 |
| MCPP | 1.38 ± 0.13 | 1.16 ± 0.13 | 0.093 |
| MEP | 13.27 ± 7.53 | 14.41 ± 8.08 | 0.27 |
| MiBP | 32.57 ± 8.57 | 30.40 ± 9.36 | 0.57 |
| MBP | 41.39 ± 9.54 | 39.46 ± 7.95 | 0.084 |

2.2 尿液 PAEs 代谢物与 VAS 疼痛评分相关性: 比对尿液 PAEs 代谢物与临床 VAS 疼痛程度相关性, 结果发现 MEHP 含量与痛经呈正相关 ($r = 0.86$, $P < 0.001$)。

2.3 疼痛相关通路研究: 为了探索疼痛相关通路, 我们通过 R 软件分析 GEO 数据库, 筛选 GSE23339 芯片 TOP 50 个在子宫内膜异位症高表达的基因, 图 1 为差异基因火山图 ($P < 0.05$, $|\text{LogFC}| > 1$)。京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析仅筛选出一个通路——补体和凝固级联反应 ($P = 0.0066$)。筛选出疼痛相关蛋白有人补体成分 1S (C1S)、补体成分 7 (C7)、补体因子 H (CFH) 和蛋白 S1 (PROS1), 见表 2。进一步通过实时定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 研究发现子宫内膜异位症患者 C7 表达与 MEHP 表达存在正相关性 ($r = 0.83$, $P < 0.001$)。

表 2 疼痛相关蛋白在子宫内膜异位症和正常组织差异表达分析

| 基因名称 | 差异倍数 (子宫内膜异位症 vs 正常对照) | P 值 (子宫内膜异位症 vs 正常对照) |
|-------|------------------------------|-----------------------------|
| C1S | 3 285.624 | 0.000 79 |
| C7 | 6 792.067 | 0.000 068 |
| CFH | 2 391.055 | 0.000 036 |
| PROS1 | 2 807.162 | 0.000 7 |

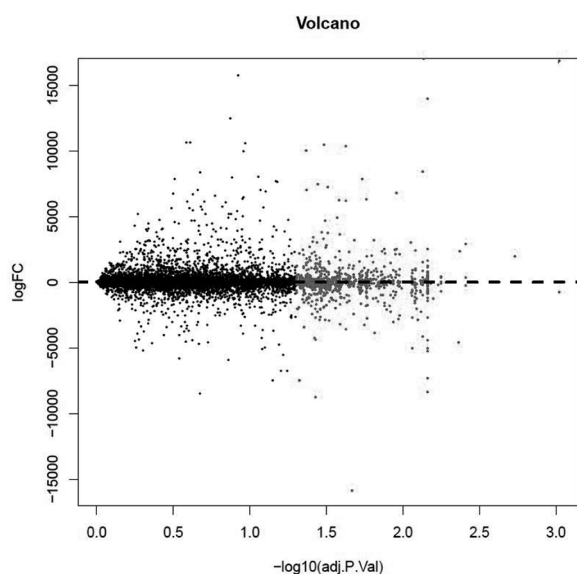


图 1 子宫内膜异位症和正常组织差异基因火山图分析

3 讨论

子宫内膜异位症发病机制不明确,子宫内膜异位症临床表现复杂,往往合并顽固性长期疼痛,疼痛问题普遍认为是临床上的难治之证。本文研究发现,子宫内膜异位症患者尿液 MEHP、MEP 含量明显高于正常人群,提示 PAEs 高摄入者增加子宫内膜异位症发病率。在疼痛研究方面,我们发现 MEHP 与患者疼痛呈明显正相关,基因测序分析表明合并疼痛的子宫内膜异位症患者体内补体和凝固级联通路明显激活,筛选出该通路明显差异蛋白 C1S、C7、CFH 和 PROS1。本研究揭示了 PAEs 与子宫内膜异位症疼痛的相关性,初步筛选疼痛相关通路,为子宫内膜异位症疼痛的诊治提供新的思路和研究方向。

子宫内膜异位症患者主流学说包括 Sampson 1921 年提出经血逆流种植学说,还有体腔上皮化生学说、胚胎残留学说、在位内膜决定论等,值得注意的是遗传因素、免疫因素、炎症因素、内分泌因素及环境因素等均证实与子宫内膜异位症相关^[5]。

PAEs 普遍存在于自然界,我国人群暴露水平为 23~159 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,其中以邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)为主^[8]。PAEs 影响卵巢颗粒细胞合成分泌雌激素、孕激素,具有生殖毒性和致癌性^[9]。Sadia 等研究发现,子宫内膜异位症患者血清 DEHP 含量为 $(65.29 \pm 21.69) \text{ ng/mL}$,而正常对照人群中未检测出 DEHP^[10]。目前我们尚未查阅到 PAEs 与子宫内膜异位症疼痛的相关性报道,通过疼痛 VAS 评分,我们发现 DEHP 代谢产物 MEHP 含量与疼痛呈正相关,有助于补充子宫内膜异位症长期疼痛的病因学认识。

通过生物信息学分析,我们发现子宫内膜异位症疼痛与补体和凝固级联通路密切相关。研究发现腹膜中异常升高的补体成分参与异位内膜定植和局部炎症反应^[11]。补体固有成分 C1S 经活化后能够调节机体包括腹腔防御功能和免疫功能,而 C7 蛋白作为膜攻击复合体成分(membrane attack complex, MAC)在子宫内膜异位症呈现显著高表达,研究还通过免疫组化证实补体成分 CFH 在子宫内膜异位症组织中的高表达,揭示补体在子宫内膜异位症发生发展中的重要作用^[12]。此外,盆腔粘连可导致子宫内膜异位症顽固疼痛,凝血和纤溶障碍是导致盆腔粘连的重要原因。PROS1 蛋白与 C4b 结合蛋白形成复合体,是 VitK 依赖性抗凝血蛋白酶辅助因子。PROS1 异常表达可导致凝血和纤溶功能障碍,可能介导盆腔粘连而导致顽固性疼痛。文献报道 PAEs 导致一系列氧化应激和免疫相关因子如补体的异常表达^[13];尿液中高 PAEs 与晚期妊娠血液高凝状态有关。这些报道揭示 PAEs 与补体和凝固级联通路的相关性,从而提示 PAEs 可能通过该通路介导盆腔疼痛^[14]。

本研究从环境内分泌干扰物角度研究子宫内膜异位症疼痛的病因和机制,发现 DEHP 代谢产物 MEHP 与子宫内膜异位症疼痛的相关性,同时从补体和凝固因子异常表达通路揭示可能的机制。但是未来仍需要增加样本量,并进行深入的机制相关研究实验。

参考文献

- [1] 中国医师协会妇产科医师分会子宫内膜异位症专业委员会,中华医学会妇产科学分会子宫内膜异位症协作组. 子宫内膜异位症长期管理中国专家共识 [J]. 中华妇产科杂志, 2018, 53 (12): 836-841.
- [2] Ahn S H, Monsanto S P, Miller C, et al. Pathophysiology and Immune Dysfunction in Endometriosis [J]. Biomed Res Int,

- 2015 (7): 795-976.
- [3] 徐冰. 子宫内膜异位症疼痛长期药物治疗 [J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31 (9): 648-650.
- [4] Ballester M, Dehan P, Beliard A, et al. Role of genetic and environmental factors in the development of endometriosis [J]. Rev Med Liege, 2012, 67 (5-6): 374-380.
- [5] Smarr M M, Kannan K, Buck L G. Endocrine disrupting chemicals and endometriosis [J]. Fertil Steril, 2016, 106 (4): 959-966.
- [6] Yi H, Gu H, Zhou T, et al. A pilot study on association between phthalate exposure and missed miscarriage [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20 (9): 1894-1902.
- [7] Heller G Z, Man U G, Uerra M, et al. How to analyze the Visual Analogue Scale: Myths, truths and clinical relevance [J]. Scand J Pain, 2016, 13 (7): 67-75.
- [8] 高海涛, 李瑞仙, 邸倩南, 等. 我国人群邻苯二甲酸酯类的暴露水平及风险 [J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29 (6): 471-475.
- [9] Li R, Yu C, Gao R, et al. Effects of DEHP on endometrial receptivity and embryo implantation in pregnant mice [J]. J Hazard Mater, 2012, 241-242 (9): 231-240.
- [10] Nazir S, Usman Z, Imran M, et al. Women Diagnosed with Endometriosis Show High Serum Levels of Diethyl Hexyl Phthalate [J]. J Hum Reprod Sci, 2018, 11 (2): 131-136.
- [11] Sikora J, Wroblewska-Czech A, Smycz-Kubanska M, et al. The role of complement components C1q, MBL and C1 inhibitor in pathogenesis of endometriosis [J]. Arch Gynecol Obstet, 2018, 297 (6): 1495-1501.
- [12] Suryawanshi S, Huang X, Elishaev E, et al. Complement pathway is frequently altered in endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer [J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 (23): 6163-6174.
- [13] Xu H, Shao X, Zhang Z, et al. Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2013, 93 (10): 39-44.
- [14] Jiang M, Li Y, Zhang B, et al. Urinary concentrations of phthalate metabolites associated with changes in clinical hemostatic and hematologic parameters in pregnant women [J]. Environ Int, 2018, 120 (8): 34-42.