

# 盆腔器官脱垂患者子宫骶韧带线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失及其生物学意义<sup>\*</sup>

王晶雪 王晓庆 陆 叶<sup>\*\*</sup>

(北京大学第一医院妇产科, 北京 100034)

**【摘要】 目的** 通过研究线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在盆腔器官脱垂 (pelvic organ prolapse, POP) 患者子宫骶韧带中的变化, 初步探讨 POP 可能的发生机制。 **方法** 取 2016 年 9 月 ~ 2017 年 4 月我科因 POP II ~ IV 期切除子宫 26 例为研究组, 同期因良性病变切除子宫的非 POP 患者 21 例为对照组, 取子宫骶韧带组织, 提取其中的线粒体 DNA, 应用荧光定量 PCR 方法检测线粒体 DNA 和 DNA<sup>4977</sup> 缺失的相对含量, 应用琼脂糖凝胶电泳方法对 PCR 产物进行比对分析。 **结果** ①研究组子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失明显高于对照组, 差异有统计学意义 ( $Z = -2.086, P = 0.037$ ); 而 2 组总线粒体 DNA 含量无明显差异 ( $P = 0.447$ )。②研究组线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄、孕次、产次、BMI、初产年龄、绝经年龄均无明显相关性 ( $P > 0.05$ ); 对照组患者线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄有明显相关性, 随着年龄的增加, 线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失增多 ( $r = 0.465, P = 0.034$ ), 而与孕次、产次、BMI、初产年龄、绝经年龄无明显相关性 ( $P > 0.05$ )。 **结论** 子宫骶韧带线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在 POP 患者中显著增加, 可能是导致 POP 的原因之一。

**【关键词】** 盆腔器官脱垂; 子宫骶韧带; 线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失

文献标识: A 文章编号: 1009 - 6604 (2019) 03 - 0256 - 05

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2019.03.016

**Mitochondrial DNA<sup>4977</sup> Deletion in Uterosacral Ligaments in Patients With Pelvic Organ Prolapse and Its Biological Significance** Wang Jingxue, Wang Xiaoping, Lu Ye. Department of Obstetrics and Gynecology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

Corresponding author: Lu Ye, E-mail: songqinlu@sina.com

**【Abstract】 Objective** To explore the pathogenic mechanism of pelvic organ prolapse (POP) through the study of mitochondrial DNA<sup>4977</sup> (mtDNA<sup>4977</sup>) deletion in uterosacral ligaments (UL). **Methods** Twenty-six patients with POP stage II - IV and 21 control patients with benign gynecological disease who underwent hysterectomy at our hospital between September 2016 and April 2017 were included. The mitochondrial DNA (mtDNA) was isolated from UL tissues and the relative quantitative level of mitochondrial DNA and DNA<sup>4977</sup> deletion was assessed by fluorescent quantitative PCR and agarose gel electrophoresis between two groups to explore its biological significance. **Results** The mtDNA<sup>4977</sup> deletion rate in UL was significantly higher in the POP group as compared to the control group ( $Z = -2.086, P = 0.037$ ); while no significant difference was found in the total amount of mtDNA ( $P = 0.447$ ). In addition, no obvious correlations between mtDNA<sup>4977</sup> deletion and age, pregnancy times, delivery times, BMI, primiparity age, and menopause age were observed in the POP group ( $P > 0.05$ ). In the control group, the mtDNA<sup>4977</sup> deletion was positively correlated with age ( $r = 0.465, P = 0.034$ ), mtDNA<sup>4977</sup> deletion increased with age, while no significant correlations with pregnancy times, delivery times, BMI, primiparity age and menopause age were found ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The mtDNA<sup>4977</sup> deletion is significantly increased in POP patients, which might be one of the causes of POP.

**【Key Words】** Pelvic organ prolapse; Uterosacral ligament; Mitochondrial DNA<sup>4977</sup> deletion

盆腔器官脱垂 (pelvic organ prolapse, POP) 是中老年女性常见疾病, 其发病机制尚不明确, 目前已有研究仅从盆底支持结构的胶原蛋白的含量、胶原亚

型的比例变化等方面探讨 POP 的发生机制, 而对子宫骶韧带细胞基因方面的研究较少<sup>[1,2]</sup>。线粒体是真核细胞中重要的细胞器之一, 不仅是细胞能量提

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (81401185)

\*\* 通讯作者, E-mail: songqinlu@sina.com

供和储存的场所,还在细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。人线粒体 DNA<sup>4977</sup> (mitochondrial DNA<sup>4977</sup>, mtDNA<sup>4977</sup>)会随着年龄的增大而逐渐缺失,与机体老化相关<sup>[4]</sup>,但这些研究仅局限在心脑血管系统等<sup>[5,6]</sup>,而线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在盆底组织支持结构中的研究较少。由于 POP 也是公认的与老化相关的疾病,因此,本研究通过线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在盆腔器官脱垂患者子宫骶韧带中的变化,初步探讨 POP 发生的相关因素。

1 材料与方法

1.1 研究对象

表 1 2 组临床特征参数比较

组别	年龄(岁)	BMI	产次	难产史 n(%)	孕次	初产年龄(岁)	绝经年龄(岁)
研究组(n=26)	61.8±10.3	24.8±3.2 (n=25)	1.8±0.8	6(23.1)	2.7±1.6	25.8±3.2 (n=17)	49.4±5.4
对照组(n=21)	58.1±5.4	24.8±3.2	1.7±1.0 (n=20)	4(19.0)	2.9±1.2 (n=20)	26.1±3.8 (n=14)	51.1±3.5
t(χ <sup>2</sup> )值	t=1.490	t=0.067	t=0.448	χ <sup>2</sup> =0.113	t=-0.284	t=-0.254	t=-1.200
P 值	0.143	0.947	0.656	0.737	0.778	0.801	0.236

注:难产史研究组包括产钳或胎吸助产 5 例(其中 2 例巨大儿),巨大儿 1 例;对照组产钳助产 3 例(其中 1 例巨大儿),巨大儿 1 例

1.2 主要试剂

GENMED 动物硬组织线粒体 DNA 萃取试剂盒购于美国 Genmed Scientifics 公司;TransStart Top Green qPCR Super Mix 试剂盒、DNA 分子量 Marker、Loading buffer、Gel-red 核酸染料均购于北京全式金生物技术有限公司;特异性引物合成购于北京天一辉远生物公司;琼脂糖购于美国 Gibco 公司,并配成 2% 琼脂糖凝胶;TAE 缓冲液购于北京雷根生物技术有限公司,并配置成 1:50 TAE 液;溴酚蓝购于美国 VWR。

1.3 主要仪器

超低温冰箱(美国 Thermo Scientific ULT1386 - 3V), PCR 仪(德国 Eppendorf), Real Time PCR System 7500(美国 Applied Biosystems),凝胶成像分析系统 4000MM PRO(美国柯达),NanoDrop 2000(美国 Thermo)。

1.4 标本收集及处理

手术均由同一术者完成。术前根据 POP-Q 评分法由术者评定有无脱垂以及脱垂程度<sup>[7]</sup>,并签署知情同意书。切除子宫后,术者从子宫标本上取子宫骶韧带与宫颈连接处外 0.5 cm 处的子宫骶韧带组织约 0.5 cm 大小,立即投入液氮保存,再转入 -80 ℃ 超低温冰箱保存至提取 DNA 时。

1.5 子宫骶韧带线粒体 DNA 萃取

按照 GENMED 动物硬组织线粒体 DNA 萃取试剂盒操作方法,提取子宫骶韧带线粒体 DNA。用

本研究经北京大学第一医院伦理委员会审批通过[2016(1173)]。选取 2016 年 9 月~2017 年 4 月我科因 POP II~IV 期(II 期 5 例、III 期 16 例、IV 期 5 例)行子宫切除术的患者 26 例为研究组,同一时期因良性非 POP 疾病行子宫切除术的 21 例患者(其中子宫腺肌症 1 例、子宫肌瘤 11 例、子宫内膜异常增生 4 例、宫颈病变 4 例、绝经后双侧卵巢囊肿 1 例)为对照组。近 3 个月内无尿道感染、阴道手术史,未服用雌激素类药物。2 组年龄、体重指数(BMI)、产次(均为阴道分娩)、难产史、孕次、初产年龄、绝经年龄等方面均无显著差异(表 1)。

NanoDrop 2000 测定样品线粒体 DNA 纯度和浓度(OD260/OD280 值 1.2~1.9, DNA 浓度 > 10 ng/μl 为合格样品)。

1.6 线粒体 DNA 含量和线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失检测

参照 Genbank 序列,根据引物设计原则设计引物序列,由北京天一辉远生物公司合成目的基因和内参基因特异性引物,见表 2。

取 1 μl 线粒体 DNA,根据实时荧光定量 PCR 试剂盒使用说明,在荧光定量 PCR 仪进行目的基因(线粒体 DNA 含量、线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失)和内参基因(GAPDH)的扩增。每个孔重复 3 次进行荧光实时定量 PCR。用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 计算目标基因对内参基因的相对表达量。将 PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳照胶。

表 2 线粒体 DNA 和线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失引物序列

名称	序列
线粒体 DNA <sup>4977</sup> 缺失	上游 5' - CCTTACACTATTCTCATCACC - 3'
	下游 5' - TGTGCTCTTTGGAGTAGAAACC - 3'
线粒体 DNA	上游: 5' - TGGCTCCTTTAACCTCTCCA - 3'
	下游: 5' - AAGGATTATGGATCGCGTTG - 3'
GAPDH	上游: 5' - GAAGGTGAAGCTCGGAGTC - 3'
	下游: 5' - GAAGATGCTGATGGGATTTC - 3'

1.7 统计学分析

所有数据采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用独立样本 t 检验;非正态分布计量资料用 M(P25, P75) 表示,采用

Mann-Whitney  $U$  检验。计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。相关性分析采用 Pearson 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 研究组(脱垂组)和对照组(非脱垂组)患者子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失和线粒体 DNA 总含量比较

荧光定量 PCR 显示研究组子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失明显高于对照组,差异有统计学意义( $P = 0.037$ )。而 2 组子宫骶韧带组织线粒体 DNA 总含量无显著差异( $P = 0.447$ ),琼脂糖凝胶电泳证实荧光定量 PCR 产物确为线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失(图 1、表 3)。

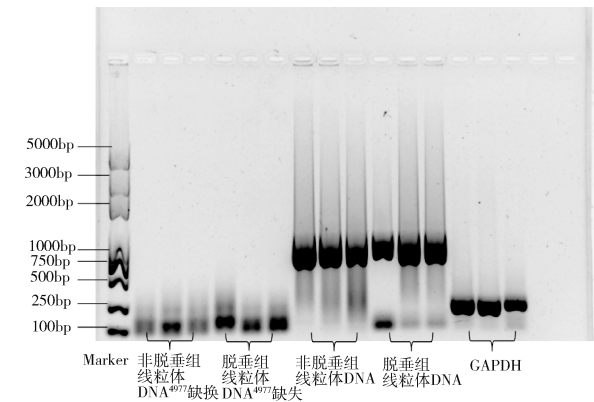


图 1 脱垂组和非脱垂组 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 POP-Q 分期与子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失的关系

将对照组定义为 POP-Q 分期的 0 期,比较所有患者 POP-Q 分期与子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup>

表 3 2 组子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失和线粒体 DNA 相对含量比较(荧光定量 PCR 法)

组别	线粒体 DNA <sup>4977</sup> 缺失	线粒体 DNA
研究组( $n = 26$ )	1.758(0.823,2.477)	0.817(0.513,1.550)
对照组( $n = 21$ )	0.611(0.296,1.954)	1.063(0.599,1.613)
$Z$ 值	-2.086	-0.760
$P$ 值	0.037	0.447

缺失的关系。虽然各期患者子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失无统计学差异,但随着 POP 分期的升高,子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失有增加的趋势( $P = 0.171$ )(表 4)。

2.3 研究组和对照组患者子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失的相关性分析

研究组(脱垂组)患者子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄、BMI、孕次、产次、初产年龄、绝经年龄均无明显相关性( $P > 0.05$ )(表 5 和图 2)。对照组(非脱垂组)线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄有明显相关性,随着年龄的增加,线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失增多( $r = 0.465, P = 0.034$ ),而与 BMI、孕次、产次、初产年龄、绝经年龄无明显相关性( $P > 0.05$ )(表 5 和图 3)。

表 4 不同 POP 分期患者子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失的相对含量(荧光定量 PCR 法)

POP-Q 分期	线粒体 DNA <sup>4977</sup> 缺失
0 期( $n = 21$ )	0.611(0.296,1.954)
Ⅱ 期( $n = 5$ )	0.817(0.516,2.513)
Ⅲ 期( $n = 16$ )	1.654(0.829,2.657)
Ⅳ 期( $n = 5$ )	1.984(1.536,5.218)
$r$ 值	0.203
$P$ 值	0.171

表 5 研究组和对照组患者线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失的相关性分析

组别		年龄	BMI	孕次	产次	初产年龄	绝经年龄
研究组	<i>r</i> 值	0.034	0.303	-0.107	-0.036	0.269	0.232
	<i>P</i> 值	0.868	0.141	0.604	0.861	0.297	0.255
对照组	<i>r</i> 值	0.465	-0.061	0.324	0.281	0.319	0.025
	<i>P</i> 值	0.034	0.794	0.164	0.230	0.267	0.914

## 3 讨论

由于 POP 的发病机制并不清楚,临床尚无满意的预测和根治方法。随着年龄的增加,POP 的发生率逐渐增高。Swift 等<sup>[8]</sup>观察到,年龄每增加 10 岁,POP 发生的风险增加 10%。这只是从现象上证实了 POP 与年龄和衰老具有相关性。我们的研究着手于线粒体 DNA 及线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失,从基因的

角度探讨 POP 发生的相关因素,为预测 POP 和对 POP 的治疗提供可能的线索。

线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失是线粒体 DNA 突变的一种常见且重要的类型<sup>[9]</sup>。该缺失位于线粒体 DNA 序列的 8470nt 与 13 447nt 之间,被认为是产生缺失的热点区域。线粒体 DNA<sup>4977</sup> 片段包括 ATPase8、ATPase6、COIII、ND3、ND4、ND5 等编码的基因。这些基因的缺失,会引起呼吸链故障和三磷酸腺苷

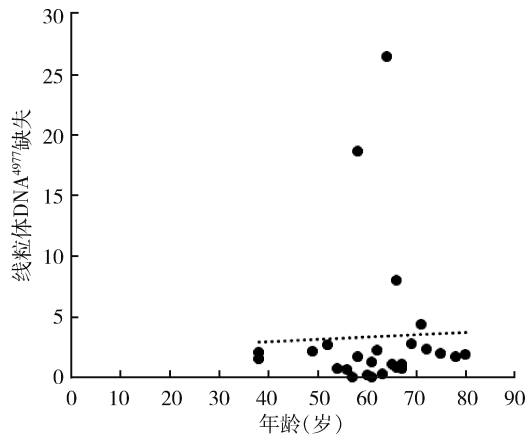


图2 研究组(脱垂组)患者子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄的相关性

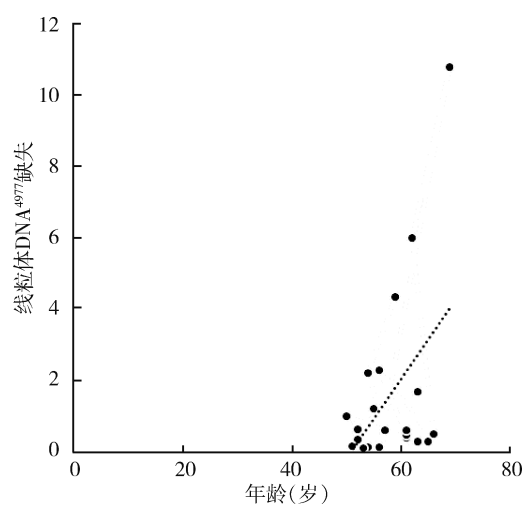


图3 对照组(非脱垂组)患者子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄的相关性

(ATP)生成减少,干扰有氧代谢,并产生大量氧化应激,进而导致细胞和组织出现功能障碍。目前多项研究表明,线粒体 DNA 突变与衰老、氧化应激有关<sup>[10]</sup>。

3.1 POP 患者子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失增多

本研究中,与相匹配的对照组相比,研究组(POP 组)患者子宫骶韧带组织线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失增多,且差异有统计学意义,推测骶韧带中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失导致骶韧带中能量供给降低,以致骶韧带功能下降,从而导致 POP 的发生。本研究中,随着盆腔器官脱垂的 POP-Q 分期的增加,子宫骶韧带组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失逐渐增多,但无统计学差异,可能是由于样本量较少。与 Sun 等<sup>[11]</sup>的报道一致。但是本研究中,子宫骶韧带组织线粒体 DNA 总拷贝数在研究组和对照组并没有明显差异,与 Sun 等<sup>[11]</sup>的报道有差异,与本研究样本量较少有关,需

要进一步扩大样本量研究。

3.2 线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄

本研究结果显示,对照组患者子宫骶韧带中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄呈正相关,年龄越大,线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失越多,与张幼芳<sup>[12]</sup>报道一致,该研究显示,在人类骨骼肌中,不同年龄组(0~9,10~19,20~29,30~39,40~49,50~59,60~69,70~79,80~89,90~99)中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失比例分别为 0%、0%、0.003%、0.011%、0.015%、0.033%、0.038%、0.062%、0.069% 和 0.091%。但本研究中研究组(脱垂组)患者线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄却无明显相关性,而在非脱垂患者中,线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与年龄呈正相关,提示 POP 患者可能在相对年龄比较小时,已经存在较多线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失,可能是导致 POP 发生的原因。本研究中虽然研究组和对照组年龄在统计学上无差异,但研究组年龄均值较对照组毕竟大了 3 岁多,是否由于年龄不均衡扩大了组间差异?我们认为,线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失虽然随着年龄增加而增加,但其增加的趋势是非常缓慢的,张幼芳<sup>[12]</sup>的研究提示线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在 50~59 岁组为 0.033%,60~69 岁组为 0.038%,此区间大约 10 岁仅增加 0.005%,但本研究中,研究组平均 61 岁,对照组平均 58 岁,2 组仅相差 3 岁左右,且 2 组间线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失的差异非常大,故我们考虑并没有因为 2 组间很小的年龄差异而导致假阳性结果。

3.3 检测 POP 患者子宫骶韧带组织中线粒体 DNA 和线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失的临床意义

研究表明外周血或组织中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失有可能会成为某些疾病的生物标记,可以用于相关疾病的检测。比如 Lee 等<sup>[13]</sup>观察到外周血线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失与心房颤动和重构相关,提示检测外周血线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失可能成为心律失常的生物标记物。本研究中,骶韧带线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在 POP 患者中明显升高,提示线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失有可能会成为 POP 的生物标记物。对于有 POP 高危因素者,检测组织中线粒体 DNA 和线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失情况,或许可以用于临床上预测 POP 的发生,及早进行有效干预,改善 POP 的预后。

综上所述,骶韧带线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失在 POP 患者中显著增加且在 POP 患者中早发生,可能是导致 POP 的原因之一。由于本研究的样本量小,还需要进一步扩大样本量进行更深入的研究。在今后的研究中,我们还会同时测量患者血液中线粒体 DNA<sup>4977</sup> 缺失含量,进一步了解其生物学意义。

参考文献

1 Bodner-Adler B,Bodner K,Kimberger O,et al. The role of tenascin-X in the uterosacral ligaments of postmenopausal women with pelvic organ prolapse: an immunohistochemical study. *Int Urogynecol J*, 2018 Dec 10. [ Epub ahead of print ]

2 Dos Santos RGM,Pepicelli FCA,Batista NC, et al. Collagen XVIII and LOXL-4 polymorphisms in women with and without advanced pelvic organ prolapse. *Int Urogynecol J*,2018,29(6) :893 – 898.

3 Roy M,Reddy PH,Iijima M, et al. Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol*,2015,33:111 – 118.

4 Wang Y, Li Y, He C, et al. Mitochondrial regulation of cardiac aging. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018 Dec 26. pii: S0925 – 4439( 18 )30494 – 0.

5 Lee JS,Ko YG,Shin KJ, et al. Mitochondrial DNA 4977bp deletion mutation in peripheral blood reflects atrial remodeling in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Yonsei Med J*, 2015, 56 ( 1 ) : 53 – 61.

6 Vecoli C, Borghini A, Pulignani S, et al. Prognostic value of mitochondrial DNA<sup>4977</sup> deletion and mitochondrial DNA copy number in patients with stable coronary artery disease. *Atherosclerosis*,2018, 276:91 – 97.

7 陆叶. 盆腔脏器脱垂国际量化分期法及应注意的问题. *中国医*

刊,2014,49(4) :4 – 5.

8 Swift S,Woodman P,O’ Boyle A,et al. Pelvic Organ Support Study ( POSST ) : the distribution, clinical definition, and epidemiologic condition of pelvic organ support defects. *Am J Obstet Gynecol*, 2005,192( 3 ) :795 – 806.

9 Quan C,Cho MK,Perry D, et al. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. *J Biomed Sci*,2015,22( 1 ) :62.

10 Balaban RS,Nemoto S,Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*,2005,120( 4 ) :483 – 495.

11 Sun MJ,Cheng WL,Wei YH,et al. Low copy number and high 4977 deletion of mitochondrial DNA in uterosacral ligaments are associated with pelvic organ prolapse progression. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunt*,2009,20( 7 ) :867 – 872.

12 张幼芳. 人骨骼肌线粒体 DNA4977 片段缺失与年龄的相关性调查. *法医学杂志*,2007,23( 6 ) :438 – 440.

13 Lee JS,Ko YG,Shin KJ, et al. Mitochondrial DNA 4977bp deletion mutation in peripheral blood reflects atrial remodeling in patients with non-valvular atrial fibrillation. *Yonsei Med J*, 2015, 56 ( 1 ) : 53 – 61.

( 收稿日期:2019 – 01 – 20 )

( 修回日期:2019 – 02 – 11 )

( 责任编辑:王惠群 )