

宫颈锥形切除术后宫颈组织中 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达及其意义研究*

殷新明,朱小兰,温 坚,朱 莉,谈微微,刘颂平

(江苏大学第四附属医院暨镇江市妇幼保健院妇科,江苏镇江 212001)

[摘要] **目的** 探讨宫颈锥形切除术后宫颈分泌物及宫颈组织中炎症因子的动态变化及其意义。**方法** 选取 2013—2015 年在该院就诊的行宫颈锥形切除术患者,术后定期采集宫颈创面分泌物及周围组织,定量检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、高迁移率族蛋白 1(HMGB1)的表达,以术前作为对照组,进行统计分析。观察宫颈锥形切除术后行全子宫切除的标本中炎症细胞的浸润及表达。**结果** 宫颈组织及分泌物中 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达在宫颈锥形切除术后逐渐升高,术后 1~2 周达到高峰,与术前比较差异有统计学意义($P < 0.05$),之后逐渐下降。在宫颈锥形切除术后 1 周行全子宫切除的标本病理显示,炎症细胞浸润及炎症反应最严重;其 TNF- α 、IL-6 及 HMGB1 表达较术后 4 周明显升高。**结论** 宫颈锥形切除术后 1~2 周时宫颈创面炎症最为严重,应避免在此阶段行全子宫切除。

[关键词] 子宫颈锥形切除术;子宫切除术;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素 6;高迁移率族蛋白类;术后感染

[中图分类号] R711.74

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)11-1472-04

The expression and significance of TNF- α , IL-6, HMGB1 in the cervix uteri after the prior cervical conization*

Yin Xinming, Zhu Xiaolan, Wen Jian, Zhu Li, Tan Weiwei, Liu Songping

(Department of Gynecology, Zhenjiang Maternal and Child Health Hospital, the Fourth Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the dynamic changes and its significance of inflammatory factors in cervical secretions and prior cervical tissues after cervical conical resection. **Methods** Women who received prior cervical conization during December 2013 and December 2015 in this hospital were selected, then the cervical tissue and secretion were collected regular interval after the conization. The expression of tumor necrosis factor- α (TNF), interleukin-6(IL-6) and high mobility group protein 1 (HMGB1) were quantitative detected and analyzed. The expression and infiltration of inflammatory cell were detected by HE and immunohistochemical staining. **Results** The expression of TNF- α , IL-6 and HMGB1 in cervical tissues and secretions increased gradually after priorcervical conization, which reached the peak at 1 to 2 weeks after priorcervical conization, and then gradually decreased, the differences were statistically significant when compared with the preoperative control group ($P < 0.05$). The inflammatory cell infiltration and the inflammatory response were most severe at 1st week after the conization. The expression of TNF- α , IL-6 and HMGB1 was at 1st week after the conization were significantly higher than that of the 4thweek group. **Conclusion** The cervical inflammatory were most severe after the prior cervical conization about 1-2weeks, and the hysterectomy should be avoided at this stage.

[Key words] prior cervical conization; hysterectomy; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-6; high mobility group proteins; postoperative infection

在宫颈上皮内瘤变Ⅲ级和子宫颈浸润癌 I_{a1} 期患者的处理过程中,宫颈锥形切除术是其诊断和治疗的重要环节。接受宫颈锥形切除术的部分患者中后续需行全子宫切除术。本文连续检测宫颈锥形切除术后宫颈组织及分泌物中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、高迁移率族蛋白 1(high-mobility group box 1 protein, HMGB1)表达的消长情况,为宫颈锥形切除术后行全子宫切除的手术时机及安全性提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013—2015 年在本院就诊的行宫颈锥形切除术患者 36 例。分为 A 组(术前), B 组(术后 48 h), C 组(术后 1 周), D 组(术后 2 周), E 组(术后 3 周), F 组(术后 4 周), G 组(术后 6 周)。本研究通过本院伦理委员会审批,患者

及家属均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 分泌物:均用一次性宫颈采样刷刷取宫颈(术前)或宫颈创面(术后)两圈,将刷子放入装有 1 mL Trizol 的小管中,涮 20 次,如阴道内有液体取材前用棉球拭去。组织标本:手术前活检钳钳取手术野外周围组织,手术后取创面外周围组织 2 块,放入装有 1 mL Trizol 的小管,置于-20℃冰箱保存。

1.2.2 实验方法 (1)分泌物及组织总 RNA 的提取。(2)逆转录反应。(3)标准质粒的构建,采用普通 PCR 扩增 TNF- α 、IL-6、HMGB1 和 β -actin 基因,引物序列见表 1。(4)于术前、术后 48 h 及术后 1、2、3、4、6 周分别取患者宫颈分泌物及宫颈组织,荧光实时定量 PCR 法检测分泌物及组织中 TNF- α 、IL-6、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81402165,81672913);江苏省自然科学基金项目(BK20141288);江苏省镇江市科技支撑计划-社会发展基金资助项目(SH2013088)。 作者简介:殷新明(1973—),副主任医师,硕士,主要从事妇科肿瘤、普通妇科临床工作。

HMGB1 表达。(5)宫颈锥形切除术前行全子宫切除,HE 染色下观察炎性细胞的浸润情况;免疫组织化学比较宫颈锥形切除术 1 周、4 周行全子宫切除 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达。

表 1 各引物序列表

引物名称	引物序列	退火温度 ($^{\circ}$ C)	扩增片段 长度(bp)
h β -actin-F	CACGAAACTACCTTCAACTCC	56	265
h β -actin-R	CATACTCTGCTTGCTGATC		
H-TNF- α F	CCGAGTGACAAGCCTGTAGC	57	493
H-TNF- α R	AGGAGGTTGACCTTGCTCTG		
H-IL-6-F	TACATCTCGACGGCATCTC	61	252
H-IL-6-R	AGCTCTGGCTTGTTCTCAC		
H-HMGB1-F	GAGGTGGAAGACCATGTCTG	59	294
H-HMGB1-R	TCATAAGGCTGCTTGTCATC		
H-IL33-F	ACT CCT CCG AAC ACA GAGC	61	282
H-IL33-R	GTT GGC ATG CAA CCA GAAG		

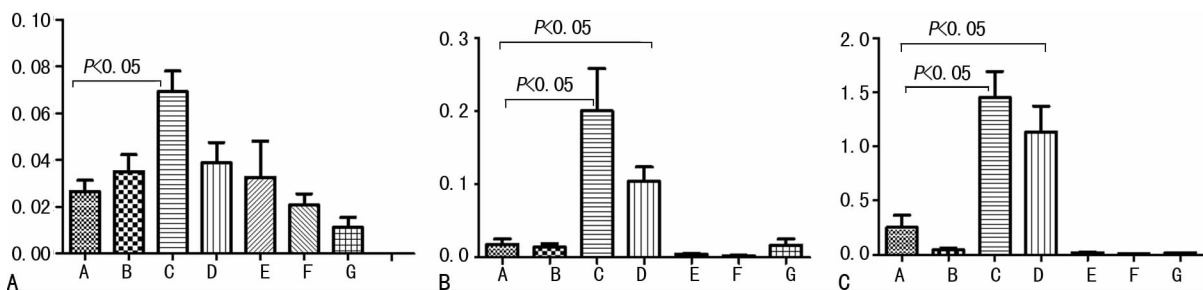
1.3 统计学处理 采用 Graphpad Prism 5 软件对数据进行统

计分析并制图,两组间计量资料比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

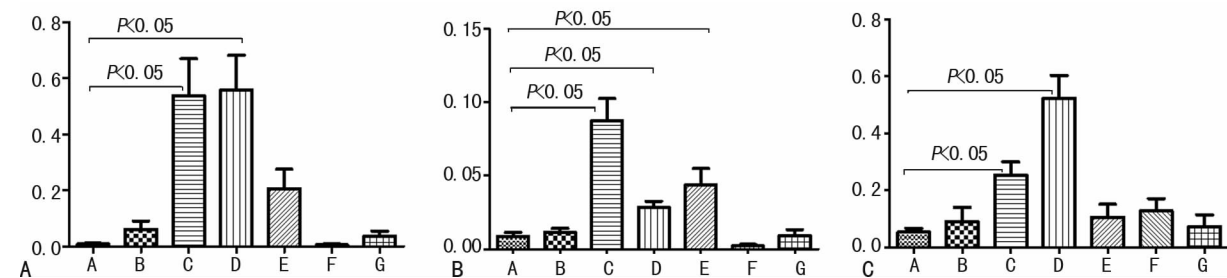
2.1 宫颈分泌物中 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达比较 术后 TNF- α 表达逐渐升高,术后 1 周最高,之后逐渐降低;A 组与 C 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与其余各组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。IL-6、HMGB1 表达术后 1 周最高,A 组与 C 组、D 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),与其余各组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

2.2 宫颈组织中 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达比较 TNF- α 表达在术后逐渐升高,术后 1 周最高;A 组与 C 组、D 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),与其余各组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。IL-6 表达在术后逐渐升高,术后 1 周最高;A 组与 C 组、D 组、E 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),与其余各组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。HMGB1 表达术后 2 周最高,A 组与 C 组、D 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),与其余各组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。



A: TNF- α ; B: IL-6; C: HMGB1。

图 1 宫颈分泌物中 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达



A: TNF- α ; B: IL-6; C: HMGB1。

图 2 宫颈组织中 TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达

2.3 病理标本 CIN III 级发生于移行带(鳞柱交界);CIN III 级异型的鳞状上皮累及全层,肿瘤细胞缺乏分化,异型显著,核浆比高及全层核分裂象可见,见图 3。炎症反应轻微,间质内血管扩张,上皮组织全部切除,见图 4A;炎症反应显著,大量中性粒细胞、淋巴、浆细胞浸润,表面见较多炎性渗出,上皮组织完全切除(高倍),见图 4B;炎症细胞数量减少,表面少许炎性渗出,间质轻度水肿,见图 4C;炎症细胞进一步减少,间质纤维化,见图 4D;鳞状上皮恢复,伴少许炎性细胞浸润,见图 4E;炎症细胞稀少,部分区域为修复性鳞状上皮覆盖,见图 4F;间质内见散在炎症细胞,出现成熟性修复性鳞状上皮,见图 4G。

2.4 宫颈锥形切除术后 1 周、4 周行全子宫切除标本中 TNF-

α 、IL-6、HMGB1 的表达 宫颈锥形切除术后 1 周行全子宫切除术标本中三者的表达均高于术后 4 周。见图 5。

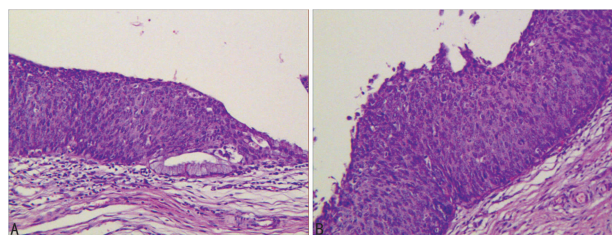
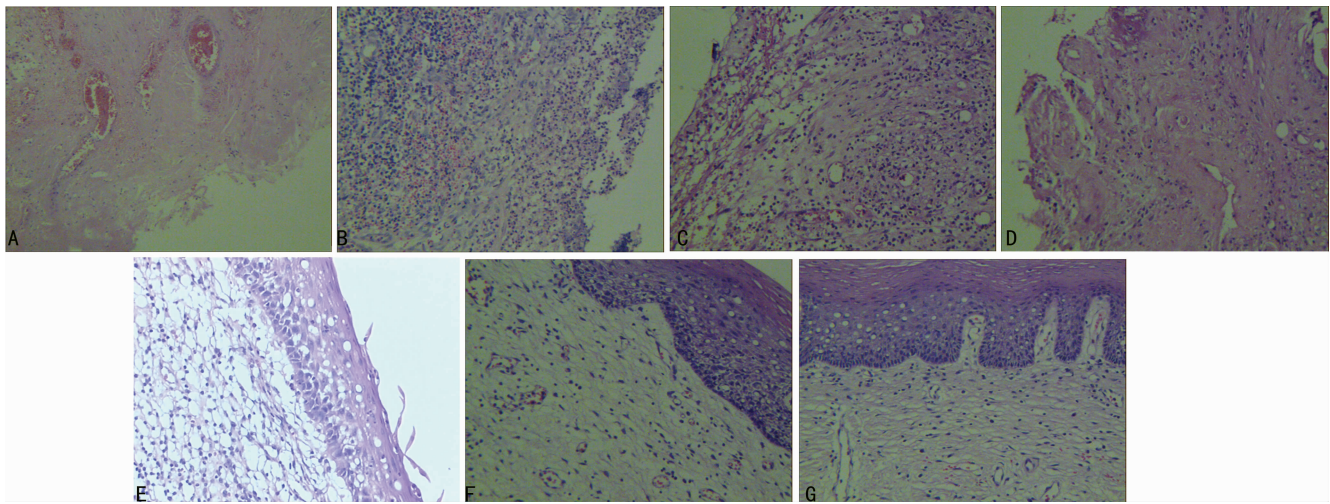


图 3 标本病理($\times 200$)



A: 术后 48 h; B: 术后 1 周; C: 术后 2 周; D: 术后 3 周; E: 术后 4 周; F: 术后 5 周; G: 术后 6 周。

图 4 各组 HE 染色 ($\times 200$)

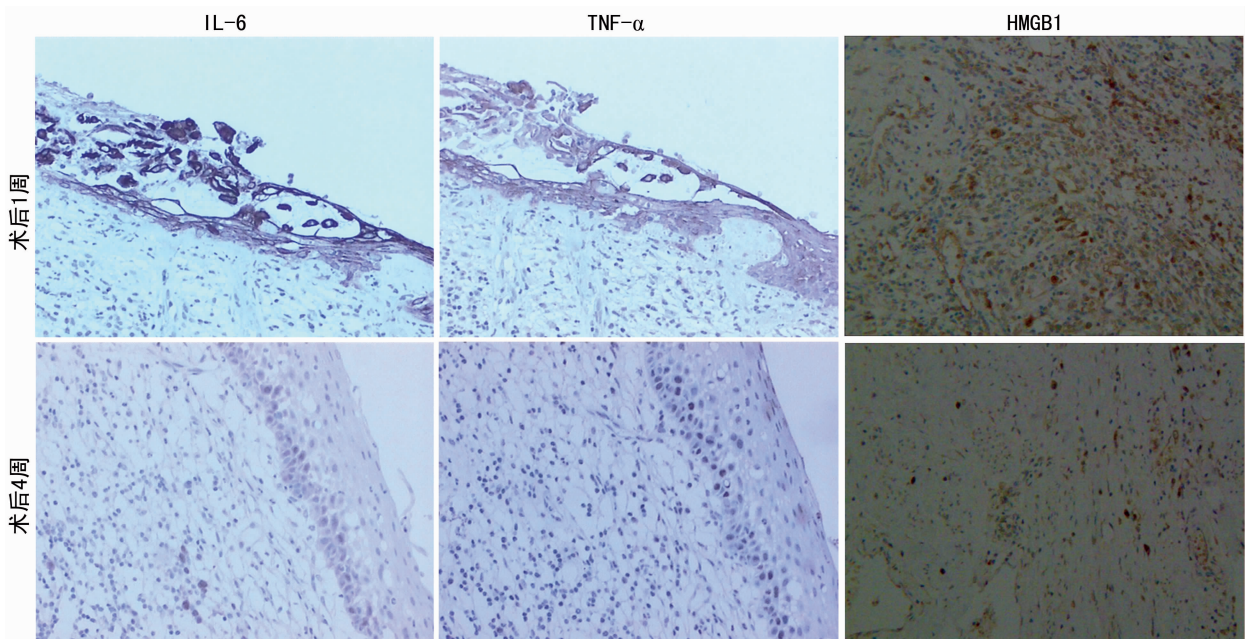


图 5 术后 1 周、4 周行全子宫切除 IL-6、TNF- α 、HMGB1 免疫组织化学 ($\times 200$)

3 讨论

细胞因子是多种细胞所分泌的,能调节细胞生长分化、调节免疫功能、参与炎症发生和创伤愈合等小分子多肽的统称。TNF- α 、IL-6、HMGB1 等促炎细胞因子在生物损伤和炎症反应的发生、发展的病理过程中扮演重要的角色^[1]。TNF- α 由单核巨噬细胞产生,有免疫调节、参与发热和炎症发生的功能,参与全身炎症反应并在调控炎症反应急性期中起着重要的作用^[2]。TNF- α 等炎症因子在脓毒血症早期迅速升高并达到峰值,并且 TNF- α 升高程度与患者病情严重程度有关^[3]。Zhao 等^[4]认为 TNF- α 在生殖道感染中发挥着重要作用。Su 等^[5]认为 IL-6 是多功能炎性细胞因子,是炎性介质网络的关键成分,在炎症反应中起重要作用,IL-6 可作为细菌性感染早期的标志物且优于降钙素原。杨龙等^[6]对颅内感染患者进行动态监测,认为 IL-6 与颅内感染的发生及患者预后密切相关,可作为判断患者病情及预后的指标。陈凯^[7]认为严重烧伤患者的血浆 TNF- α 、IL-6 水平与烧伤程度呈正相关,其活性持续维持在高水平可能与患者发生脓毒血症及多系统器官功能衰竭

(MODS)密切相关。张力等^[8]通过对口腔颌面部手术后感染进行分析,发现术后感染患者的血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 等水平明显升高。HMGB1 是含量丰富的非组蛋白核蛋白,释放到胞外作为致炎细胞因子是在对内毒素血症和脓毒症的研究中发现的。奉有才等^[9]研究认为,在炎症作用下细胞核内 HMGB1 通过包膜释放到细胞外,激活机体的免疫反应和炎症反应,引起单核巨噬细胞释放促炎因子,并促进 HMGB1 的释放,从而引起炎症放大和加重。临床研究显示,脓毒血症患者的血清中 HMGB1 水平明显高于健康人, HMGB1 蛋白质在炎症后期或脓毒症中发挥重要的作用^[10]。陈晓林等^[11]认为 HMGB1 在脓毒症大鼠小肠组织中的表达升高,并与大鼠脓毒症的严重性相关。

关于宫颈锥形切除术后何时可以行后续的全子宫切除目前尚无定论。韩秀琴等^[12]认为宫颈锥形切除后,盆腔通常有炎性反应和充血,创面渗液较多,常出现发热。Li 等^[13]在研究中发现,宫颈锥形切除术后 48 h 至术后 6 周行全子宫切除并发病明显高于术后 48 h 内及术后 6 周后行子宫切除者和无宫

颈锥形切除的子宫切除患者。谭先杰等^[14]对宫颈锥形切除术后 48 h 至术后 6 周和术后 6 周后再次行子宫切除患者的术后体温等因素进行比较,认为宫颈锥形切除后再次手术一般应在术后 6 周后。但有学者认为^[15],不论宫颈锥形切除与随后子宫切除术或子宫根治术的时间间隔如何,术后的临床情况均无显著性差异,可以在患者状态良好的任何时间行子宫切除术,并非一定在宫颈锥形切除术后 48 h 内或 6 周以后。笔者在临床工作中发现,宫颈锥形切除后 1~2 周行子宫切除的患者手术并发症及术后感染均高于其他时间段患者,并出现严重的尿路感染、肠道感染和阴道残端感染出血,而宫颈锥形切除术后 4 周为患者进行子宫切除术,临床并发症及术后感染明显减少,未出现明显肠道、泌尿道感染及阴道残端出血^[16]。

本研究发现,显微镜下宫颈锥形切除术后 1 周行全子宫切除宫颈组织炎症因子浸润, TNF- α 、IL-6、HMGB1 的表达水平明显高于术后 4 周。荧光实时定量 PCR 法动态定期检测发现,宫颈锥形切除术后 1~2 周宫颈分泌物及组织中 TNF- α 、IL-6 和 HMGB1 的表达水平达到高峰,之后逐渐降至术前水平。表明宫颈锥形切除术后 1~2 周时宫颈创面的炎症在宫颈创面恢复过程中最为严重,如果此时行后续的子宫切除势必出现术中出血多、手术时间延长,手术并发症及术后感染率高。因此,笔者建议避免在宫颈锥形切除术后 1~2 周行子宫切除,这样能规避因手术时机选择不当而增加的手术风险、手术并发症及术后感染。本研究还显示,宫颈分泌物与宫颈组织中炎症细胞消长类似,由于宫颈分泌物取材方便可行,因而通过分泌物中炎症因子的监测选择宫颈锥形切除术后子宫全切除术最佳手术时间具备可行性。

参考文献

- [1] Wilson MR, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signalins in mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(4):L599-607.
- [2] Łukaszewski T, Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, et al. The evaluation of the predictive value of TNF-alpha concentration in maternal serum in the prediction of neonatal and maternal infection[J]. *Ginekol Pol*, 2015, 86(1):26-32.
- [3] 苏明华,冯璇璘,邓磊,等. 脓毒血症患者抗炎和促炎指标动态变化在临床病情评估中的意义[J]. *重庆医学*, 2015, 44(4):467-469.
- [4] Zhao X, Zhu D, Ye J, et al. The potential protective role of the combination of IL-22 and TNF- α against genital tract Chlamydia trachomatis infection[J]. *Cytokine*, 2015, 73(1):66-73.
- [5] Su L, Huang ZT, Wang MF, et al. Interleukin-6 as an early diagnostic marker for bacterial sepsis in patients with liver cirrhosis[J]. *J Critical Care*, 2015, 30(4):732-738.
- [6] 杨龙,张玉林,金福强. IL-6、IL-10、PLA2 在颅内感染中的水平变化及与预后的关系[J]. *重庆医学*, 2015, 44(33):4655-4657.
- [7] 陈凯. 严重烧伤脓毒症患者血清 TNF- α 、IL-6、IL-10、PLA2 的变化及器官功能损害状况分析[J]. *重庆医学*, 2014, 43(8):937-940.
- [8] 张力,唐君玲,兰玉燕,等. 口腔颌面部鳞癌手术患者感染病原菌分布与机体对炎症反应的调节作用研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 30(4):898-899.
- [9] 奉有才,邓耀良,陶芝伟,等. 高迁移率族蛋白 B1 对磷酸钙诱导巨噬细胞释放炎症因子的协同作用[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(33):5317-5322.
- [10] Momonaka H, Hasegawa S, Matsushige T, et al. High mobility group box 1 in patients with 2009 pandemic H1N1 influenza-associated encephalopathy [J]. *Brain Dev*, 2014, 36(6):484-488.
- [11] 陈晓林,李建英,王小众,等. 脓毒症大鼠肠道损伤中高迁移率族蛋白 B1 的变化及丙酮酸乙酯的保护作用[J]. *中国急救医学*, 2015, 35(6):481-485.
- [12] 韩秀琴,袁慧欣,李亚里,等. 宫颈锥切术后全子宫切除临床探讨[J]. *武警医学*, 2011(8):664-666.
- [13] Li H, Jang JY, Li H, et al. The influence of interval between conization and laparoscopic radical hysterectomy on the morbidity of patients with cervical cancer[J]. *Euro J Gynaecol Oncol*, 2012, 33(6):601-604.
- [14] 谭先杰,吴鸣,张涛,等. 宫颈锥形切除术后全子宫切除 95 例临床分析[J]. *现代妇产科进展*, 2008, 17(5):366-369.
- [15] Young TK. The influence of time intervals between loop electrosurgical excision and subsequent hysterectomy on the morbidity of patients with cervical neoplasia[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(2):500-503.
- [16] 殷新明,刘颂平,温坚. 腹腔镜下全子宫切除 226 例并发症分析[J]. *中国妇幼保健*, 2015, 30(7):1135-1138.

(收稿日期:2016-11-11 修回日期:2016-12-27)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。