

# VEGF 基因多态性与薄型子宫内膜关系探究

晋晓娟\*, 周建姿, 及晨颖

基金项目:衡水市科技局计划项目(项目编号:2023014064Z)

作者单位:053000 河北 衡水,衡水市第四人民医院妇科

作者简介:晋晓娟,毕业于河北医科大学,本科,主治医师,主要研究方向为妇科

\* 通信作者, E-mail: j5zv1ekt@163. com

**【摘要】目的** 研究血管内皮生长因子(VEGF)基因启动子区-2578C/A、-1154G/A、-460C/T、+936C/T多态性位点与薄型子宫内膜的关系。**方法** 选取2023年1~12月于衡水市第四人民医院妇科门诊就诊或住院的100例薄型子宫内膜患者为研究组,同期体检的100例健康成年女性为对照组。检测两组血清VEGF水平、子宫内膜VEGF阳性率,并经PCR-RFLP法测定启动子区-2578C/A、-1154G/A、-460C/T和+936C/T多态性位点基因型频率,比较各位点不同基因型血清VEGF水平、子宫内膜VEGF阳性率。经STRING数据库构建蛋白相互作用(PPI)网络图,明确VEGF基因与薄型子宫内膜易感基因之间的交互作用。**结果** 与对照组比较,研究组血清VEGF水平、子宫内膜VEGF阳性率显著降低( $P < 0.05$ )。两组VEGF基因启动子区-2578C/A、-1154G/A、-460C/T和+936C/T位点基因型频率分布符合Hardy-Weinberg遗传平衡( $P > 0.05$ )。两组VEGF基因启动子区-2578C/A位点、-1154G/A位点基因型、等位基因C、A、显性遗传模型、隐性遗传模型比较无差异( $P > 0.05$ )。两组VEGF基因启动子区-460C/T位点TC基因型频率比较无统计学差异( $P > 0.05$ );研究组VEGF基因启动子区-460C/T位点TT基因型频率、等位基因T频率、显性遗传模型TT基因型、隐性遗传模型TC+TT基因型频率均高于对照组( $P < 0.05$ ),T基因型可增加薄型子宫内膜风险。研究组VEGF基因启动子区+936C/T位点TT基因型频率、TC基因型频率、等位基因T频率、显性遗传模型TT基因型、隐性遗传模型TC+TT基因型频率均高于对照组( $P < 0.05$ ),T基因型可增加薄型子宫内膜风险。VEGF基因启动子区位点-2578C/A、-1154G/A不同基因型血清VEGF水平、子宫内膜VEGF阳性率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );VEGF基因启动子区位点-460C/T、+936C/T位点携带T等位基因的基因型血清VEGF水平、子宫内膜VEGF阳性率显著降低( $P < 0.05$ )。经STRING数据库行VEGF基因的PPI网络分析表明,在薄型子宫内膜中VEGF基因与多个易感基因表达有交互作用。**结论** VEGF基因启动子区-2578C/A、-1154G/A多态性位点与薄型子宫内膜无关,-460T>C、+936C>T位点多态性与薄型子宫内膜发生相关,该位点突变可增加薄型子宫内膜易感性。

**【关键词】** 薄型子宫内膜;血管内皮生长因子;基因多态性;易感性

**【中图分类号】** R 711.74

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1674-4020(2024)11-077-08

doi:10.3969/j.issn.1674-4020.2024.11.21

## Relationship between VEGF gene polymorphism and thin endometrium

Jin Xiaojuan\*, Zhou Jianzi, Ji Chenying

Department of Gynecology, the Fourth People's Hospital of Hengshui, Hengshui Hebei 053000, P. R. China

\* Corresponding author, E-mail: j5zv1ekt@163. com

**【Abstract】Objective** To investigate the relationship between the -2578C/A, -1154G/A, -460C/T, and +936C/T polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter region and thin endometrium. **Methods** Selected 100 patients with thin endometrium who visited or were hospitalized in the Fourth People's Hospital of Hengshui Gynecology Department from January to December 2023 as the study group, and 100 healthy adult women who underwent physical examinations during the same period as the control group. Detected the serum VEGF levels and endometrial VEGF positivity rates of two groups, and determined the genotype frequencies of promoter regions -2578C/A, -1154G/A, -460C/T, and +936C/T polymorphism sites using PCR-RFLP method. Compared the serum VEGF levels and endometrial VEGF positivity rates of different genotypes at each point. Constructed a protein interaction (PPI) network diagram using the STRING database to clarify the interaction between VEGF genes and susceptible genes in thin endometrium. **Results** Compared with the control group, the serum VEGF level and endometrial VEGF positivity rate in

the study group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The genotype frequency distribution of the -2578C/A, -1154G/A, -460C/T, and +936C/T loci in the promoter regions of two groups of VEGF genes conformed to the Hardy-Weinberg genetic balance ( $P > 0.05$ ). There were no significant difference in genotype, allele C, A, dominant genetic model, and recessive genetic model between two groups of VEGF gene promoter regions at -2578C/A and -1154G/A loci ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference of TC genotype frequencies at the promoter region of VEGF gene -460C/T between the two groups ( $P > 0.05$ ). The TT genotype frequency, allele T frequency, dominant genetic model TT genotype frequency, and recessive genetic model TC + TT genotype frequency at the -460C/T locus of the VEGF gene promoter region in the research group were all higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), T genotype can increase the risk of thin endometrium. The TT genotype frequency, TC genotype frequency, allele T frequency, dominant genetic model TT genotype frequency, and recessive genetic model TC + TT genotype frequency of the VEGF gene promoter region + 936C/T locus in the research group were all higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ), T genotype can increase the risk of thin endometrium. There was no significant difference in serum VEGF levels and endometrial VEGF positivity rates among different genotypes of VEGF gene promoter loci -2578C/A and -1154G/A ( $P > 0.05$ ); the serum VEGF levels and endometrial VEGF positivity rate of genotypes carrying T alleles at the -460C/T and +936C/T promoter regions of the VEGF gene were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). The PPI network analysis of VEGF genes in the STRING database showed that VEGF genes interact with the expression of multiple susceptible genes in thin endometrium. **Conclusion** The polymorphism loci of -2578C/A and -1154G/A in the promoter region of VEGF gene were not associated with thin endometrium, while the polymorphism loci of -460T > C and +936C < T were associated with thin endometrium, and mutations in this loci could increase susceptibility to thin endometrium.

**【Key words】**thin endometrium; vascular endothelial growth factor; gene polymorphism; susceptibility

在卵巢激素的影响下子宫内膜发生周期性脱落、修复、增生,临床认为这与月经周期、妊娠状态有关。研究发现,当子宫内膜损伤后再生困难从而形成薄型子宫内膜,薄型子宫内膜的发生不仅是降低自然妊娠的主要原因,也是导致临床助孕失败的重要因素<sup>[1-2]</sup>。目前临床对薄型子宫内膜的研究发现,生长因子在子宫内膜增殖中具有重要的调节作用,血管内皮生长因子(VEGF)参与促血管生成,在子宫内膜中,VEGF协同促进子宫内膜快速发育<sup>[3]</sup>。现阶段越来越多的研究者致力于研究基因多态性与薄型子宫内膜的关系,发现人类 VEGF 基因具有至少 30 个单核苷酸多态性位点,且已经证实包括 -2578C/A、-1154G/A、-460C/T 和 +936C/T 等在内的启动子区多态性位点与子宫内膜病变密切相关<sup>[4-5]</sup>。但 VEGF 基因多态性与薄型子宫内膜的关系鲜有报道,鉴于此,本研究从分子生物学角度探索 VEGF 与薄型子宫内膜的关系,为深入研究薄型子宫内膜发病机理及针对 VEGF 的抗薄型子宫内膜治疗奠定理论基础。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

选取 2023 年 1 ~ 12 月衡水市第四人民医院妇科门诊及住院的薄型子宫内膜患者 100 例为研究组,年龄 22 ~ 38 岁,平均  $(30.12 \pm 2.87)$  岁,选择同期我院体检健康成年女性 100 例为对照组,年龄 22 ~ 37 岁,平均  $(30.00 \pm 2.56)$  岁。两组均知情并签署知情同意书。薄型子宫内膜诊断标准:① 在月经第 15 ~ 25 天(月经周期 24 ~ 35 天)宫腔镜检查显示子宫内膜菲薄光滑,宫腔无粘连,双侧输卵管开口清晰可见;② 在自然周期中,经阴道超声监测排卵显示最大卵泡径线  $\geq 18$  mm、子宫内膜厚度  $< 7$  mm;③ 性激素水平正常。纳入标准:(1) 研究组:① 符合诊

断标准,有生育要求,规律性生活;② 育龄期女性。(2) 对照组:① 有正常的月经周期和至少 1 次成功的怀孕史;② 无任何内分泌紊乱疾病、糖尿病家族史;③ 各项体检结果正常。排除标准:① 子宫肌瘤、子宫内膜异位症、复发性流产、多囊卵巢综合征;② 早发性卵巢功能不全、卵巢囊肿;③ 内分泌腺功能异常;④ 子宫解剖结构异常;⑤ 精神或认知异常;⑥ 无沟通能力。

### 1.2 研究方法

1.2.1 VEGF 表达检测 ① 血清 VEGF 水平检测:抽取所有研究对象入组后次日清晨空腹静脉血 3 mL, 3 000 r/min 离心 10 min 获得血清, -80℃ 保存备用。使用 ELISA 法检测 VEGF,取所制备的血清复温,设置样品孔、标准品孔、对照组孔,将 100  $\mu$ L 标准品溶液、样品、蒸馏水加入酶标板的样品孔、标准品孔、空白对照组孔内,样品孔、标准品孔分别加入酶标液 50  $\mu$ L 封板,恒温环境下孵育 120 min,清洗反应板,加 VEGF 抗体工作液、显色剂 A、显色剂 B 各 50  $\mu$ L,室温下反应 10 min,加 50  $\mu$ L 终止液,在波长为 450 nm 处测定获得的吸光度值(OD 值),绘制标准曲线,获得血清 VEGF 水平。② 子宫内膜 VEGF 表达检测:于月经干净后 5 ~ 7 d 取两组子宫内膜组织,使用生理盐水冲洗后置于 -80℃ 冰箱中,使用免疫组化法检测子宫内膜组织 VEGF 表达,取子宫内膜组织,切片、脱蜡、抗原修复后,加 1:300 稀释的抗 VEGF 抗体,在 4℃ 下孵育过夜,磷酸缓冲液清洗后加入二抗,DAB 显色,苏木精染色后脱水封片,在显微镜下观察着色颗粒,若为棕色定义为强阳性、黄色定义为炎性、淡黄色定义为弱阳性、未着色定义为阴性。

1.2.2 VEGF 基因多态性检测 采集两组研究对象空腹肘静脉血 5 mL,使用乙二胺四乙酸抗凝后 -20℃ 下保存,静脉血提取 DNA 后使用紫外分光光度法测定浓

度,使用 PCR-RFLP 法测定启动子区 - 2578C/A、- 1154G/A、- 460C/T 和 + 936C/T 多态性位点基因型频率,引物序列由生工生物工程(上海)有限公司合成。扩增体系:6.25  $\mu$ L 2  $\times$  Reaction Mix,5.125  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,0.25  $\mu$ L 上下游引物(+ 936C/T 目的片段引物 0.2  $\mu$ L,内参引物 0.05  $\mu$ L),0.125  $\mu$ L TaqDNA 聚合酶,0.5  $\mu$ L 模板 DNA。扩增条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 4min;变性 95 $^{\circ}$ C 30

s,退火 30 s、延伸 72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。分别使用 Bgl II、MnI I、Bsh1236 I、Hsp92 II 限制性内切酶对 VEGF 基因的 - 2578C/A、- 1154G/A、- 460C/T、+ 936C/T 位点的 PCR 扩增产物进行酶切。将适量的 Bgl II、MnI I、Bsh1236 I、Hsp92 II 酶及其酶切 buffer 加入 PCR 扩增后的反应体系中,浴箱过夜后琼脂糖电泳,在凝胶成像仪上照相并进行基因分型。

表 1 VEGF 基因态性位点基因引物、退火温度、扩增片段长度、内切酶

多态性位点	引物序列	退火温度( $^{\circ}$ C)	扩增片段长度	限制性内切酶
- 2578C/A	上游引物:5-GGATGGGGCTGACTAGGTAAGC-3 下游引物:5-AGCCCCCTTTCTTAAGGTTC-3	56	324 bp	Bgl II
- 1154G/A	上游引物:5-TCCTGTCTGGGCTGTCCCAATC-3 下游引物:5-GGCCCTACAGGCAAGGATG-3	61	206 bp	MnI I
- 460C/T	上游引物:5-TGTCCTGGGCTGCCCTGCC-3 下游引物:5-TACGAAGAGGAGACTTGTGGGC-3	62	175 bp	Bsh1236 I
+ 936C/T	上游引物:5-AGTGAAGGTTGGCAGCAT-3 下游引物:5-CGGGTGTGTCTACHGGAG-3	55	198 bp	Hsp92 II

1.2.3 蛋白相互作用(PPI)网络分析 为明确 VEGF 与全基因组关联分析(GWAS)研究识别的薄型子宫内膜高风险基因之间是否存在联系,使用相互作用基因/蛋白的检索工具 STRING 数据库进行 PPI 分析来构建蛋白质之间交互作用网络图。选择综合评分大于 0.4 (STRING 数据库中的默认阈值)的基因间相互作用来构建 PPI 网络。

1.3 统计学方法

采用 Haploview 软件分别对 VEGF 基因启动子区 - 2578C/A、- 1154G/A、- 460C/T 和 + 936C/T 多态性位点的基因型分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。采用 SPSS 18.0 统计分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  描述,组间比较采用独立样本  $t$  检验,计数资料使用例(%)表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以非条件 Logistic 回归法计算表示相对风险度的比值比(OR)及 95% CI, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

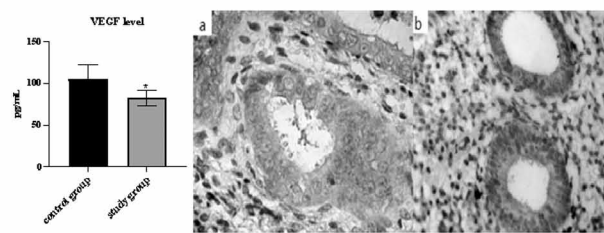
2 结果

2.1 两组血清、子宫内膜 VEGF 表达比较

研究组血清 VEGF 水平、子宫内膜 VEGF 阳性率低于对照组( $P < 0.05$ )。见表 2、图 1。

表 2 两组血清、子宫内膜 VEGF 表达比较[ $\bar{x} \pm s$ ,例(%)]

组别	例数	血清 VEGF(pg/mL)	子宫内膜 VEGF 阳性率(%)
对照组	100	105.45 $\pm$ 16.67	98(98.00)
研究组	100	82.31 $\pm$ 8.92	55(55.00)
$t$ 值		12.240	51.425
$P$ 值		<0.001	<0.001



注:a 为对照组;b 为研究组

图 1 两组血清 VEGF 水平以及子宫内膜 VEGF 表达比较

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示,两组 VEGF 基因启动子区 - 2578C/A、- 1154G/A、- 460C/T 和 + 936C/T 位点基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡( $P > 0.05$ ),具有群体代表性。见下页表 3。

2.3 VEGF 基因启动子区 - 2578C/A 位点基因型及等位基因分布频率分析

两组 VEGF 基因启动子区 - 2578C/A 位点 CC、CA、AA 基因型频率、等位基因 C、A 频率、显性遗传模型 CC、CA + AA 频率、隐性遗传模型 AA、CA + CC 频率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见下页表 4,图 2。

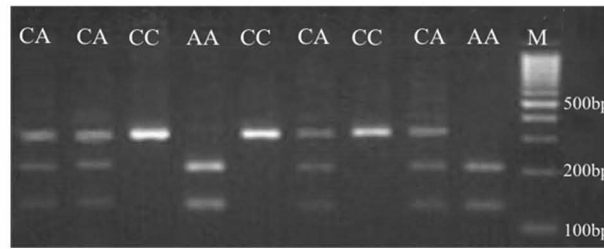


图 2 VEGF 基因启动子区 - 2578C/A 位点电泳图

2.4 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 位点基因型及等位基因分布频率分析

两组 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 位点 GG、GA、

AA 基因型频率、等位基因 G、A 频率、显性遗传模型 GG、GA + AA 频率、隐性遗传模型 AA、GA + GG 频率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 5、图 3。

表 3 VEGF 基因启动子区多态性位点 Hardy-Weinberg 平衡检验[例(%)]

位点	基因型	对照组				研究组			
		实测值	理论值	$\chi^2$ 值	$P$ 值	实测值	理论值	$\chi^2$ 值	$P$ 值
-2578C/A	CC	42(42.00)	45(45.00)	0.904	0.636	46(46.00)	48(48.00)	0.081	0.960
	CA	31(31.00)	25(25.00)			31(31.00)	30(30.00)		
	AA	27(27.00)	30(30.00)			23(23.00)	22(22.00)		
-1154G/A	GG	55(55.00)	52(52.00)	0.618	0.734	50(50.00)	54(54.00)	0.553	0.758
	GA	33(33.00)	38(38.00)			37(37.00)	32(32.00)		
	AA	12(12.00)	10(10.00)			13(13.00)	14(14.00)		
-460C/T	TT	45(45.00)	48(48.00)	0.532	0.766	67(67.00)	69(69.00)	0.211	0.900
	TC	21(21.00)	17(17.00)			21(21.00)	22(22.00)		
	CC	34(34.00)	35(35.00)			12(12.00)	15(15.00)		
+936C/T	CC	47(47.00)	43(43.00)	0.448	0.799	15(15.00)	18(18.00)	0.351	0.839
	CT	16(16.00)	19(19.00)			26(26.00)	26(26.00)		
	TT	37(37.00)	38(38.00)			59(59.00)	56(56.00)		

表 4 VEGF 基因启动子区 -2578C/A 位点基因型及等位基因分布频率[例(%)]

-2578C/A 位点		对照组( $n=100$ )	研究组( $n=100$ )	$\chi^2$ 值	$P$ 值	OR(95% CI)
基因型	CC	42(42.00)	46(46.00)	0.502	0.778	0.675(0.584-0.798)
	CA	31(31.00)	31(31.00)			0.584(0.498-0.712)
	AA	27(27.00)	23(23.00)			1
等位基因	C	115(57.50)	123(61.50)	0.664	0.415	0.772(0.700-0.799)
	A	85(42.50)	77(38.50)			1
显性遗传模型	CC	42(42.00)	46(46.00)	0.325	0.569	0.700(0.602-0.897)
	CA + AA	58(58.00)	54(54.00)			1
隐性遗传模型	AA	27(27.00)	23(23.00)	0.427	0.514	1
	CA + CC	73(73.00)	77(77.00)			0.632(0.546-0.902)

表 5 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 位点基因型及等位基因分布频率[例(%)]

-1154G/A 位点		对照组( $n=100$ )	研究组( $n=100$ )	$\chi^2$ 值	$P$ 值	OR(95% CI)
基因型	GG	55(55.00)	50(50.00)	0.507	0.776	0.875(0.708-1.023)
	GA	33(33.00)	37(37.00)			0.667(0.564-0.778)
	AA	12(12.00)	13(13.00)			1
等位基因	G	143(71.50)	137(68.50)	0.429	0.513	0.902(0.802-1.023)
	A	57(28.50)	63(31.50)			1
显性遗传模型	GG	55(55.00)	50(50.00)	0.501	0.479	1
	GA + AA	45(45.00)	50(50.00)			0.775(0.684-0.889)
隐性遗传模型	AA	12(12.00)	13(13.00)	0.046	0.831	1
	GA + GG	88(88.00)	87(87.00)			0.623(0.598-0.892)

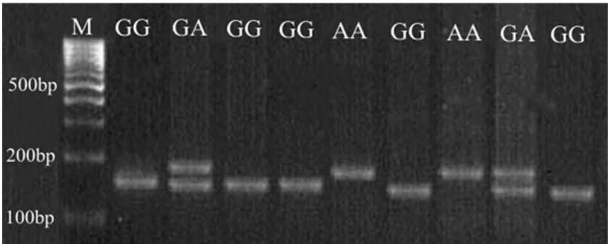


图 3 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 位点电泳图

2.5 VEGF 基因启动子区 -460C/T 位点基因型及等位基因分布频率分析

两组 VEGF 基因启动子区 -460C/T 位点 TC 基因型频率比较无统计学差异( $P > 0.05$ );研究组 VEGF 基因启动子区 -460C/T 位点 TT 基因型频率、等位基因 T 频率、显性遗传模型 TT 基因型、隐性遗传模型 TC + TT 基因型频率均高于对照组( $P < 0.05$ ),与 CC 基因型比

较,TC 基因型薄型子宫内膜风险增加 1.453 倍,TT 基因型薄型子宫内膜风险增加 2.446 倍;与 C 等位基因比较,T 等位基因薄型子宫内膜风险增加 2.897 倍;在显性遗传模型中,TT 基因型携带者薄型子宫内膜风险是 TC + CC 型携带者的 1.556 倍;在隐性遗传模型中,TC + TT 基因型携带者薄型子宫内膜风险是 CC 型携带者的 1.463 倍。见表 6、图 4。

2.6 VEGF 基因启动子区 +936C/T 位点基因型及等位基因分布频率分析

研究组 VEGF 基因启动子区 +936C/T 位点 TT 基因型频率、TC 基因型频率、等位基因 T 频率、显性遗传模型 TT 基因型、隐性遗传模型 TC + TT 基因型频率均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),与 CC 基因型比较,TC 基因型薄型子宫内膜风险增加 1.675 倍,TT 基因型薄型子宫内膜

风险增加 2.229 倍;与 C 等位基因比较,T 等位基因薄型子宫内膜风险增加 2.012 倍;在显性遗传模型中,TT 基因型携带者薄型子宫内膜风险是 TC + CC 型携带者的 1.798 倍;在隐性遗传模型中,TC + TT 基因型携带者薄型子宫内膜风险是 CC 型携带者的 1.667 倍。见表 7、图 5。

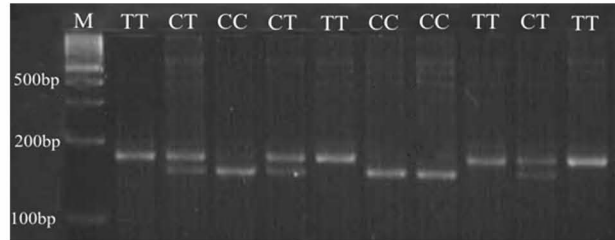


图 4 VEGF 基因启动子区 -460C/T 位点电泳图

表 6 VEGF 基因启动子区 -460C/T 位点基因型及等位基因分布频率分析[例( % )]

-460C/T 位点		对照组 (n = 100)	研究组 (n = 100)	$\chi^2$ 值	P 值	OR(95% CI)
基因型	TT	45(45.00)	67(67.00)	14.840	<0.001	2.446(1.987-4.536)
	TC	21(21.00)	21(21.00)			1.453(1.002-2.287)
	CC	34(34.00)	12(12.00)			1
等位基因	T	111(55.50)	155(77.50)	21.726	<0.001	2.897(2.012-4.533)
	C	89(44.50)	45(22.50)			1
显性遗传模型	TT	45(45.00)	67(67.00)	9.821	<0.001	1.556(0.731~2.221)
	TC + CC	55(55.00)	33(33.00)			1
隐性遗传模型	CC	34(34.00)	12(12.00)	13.665	<0.001	1
	TC + TT	66(66.00)	88(88.00)			1.463(0.897-2.224)

表 7 VEGF 基因启动子区 +936C/T 位点基因型及等位基因分布频率[例( % )]

+936C/T 位点		对照组 (n = 100)	研究组 (n = 100)	$\chi^2$ 值	P 值	OR(95% CI)
基因型	CC	47(47.00)	15(15.00)	23.940	<0.001	1
	TC	16(16.00)	26(26.00)			1.675(0.976-2.564)
	TT	37(37.00)	59(59.00)			2.229(1.882-4.114)
等位基因	C	110(55.00)	56(28.00)	30.028	<0.001	1
	T	90(45.00)	144(72.00)			2.012(1.786-2.564)
显性遗传模型	TT	37(37.00)	59(59.00)	9.700	0.002	1.798(1.019-2.253)
	TC + CC	63(63.00)	41(41.00)			1
隐性遗传模型	CC	47(47.00)	15(15.00)	23.936	<0.001	1
	TC + TT	53(53.00)	85(85.00)			1.667(0.798-2.215)

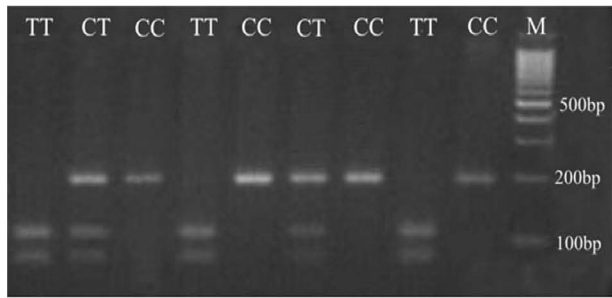


图 5 VEGF 基因启动子区 +936C/T 位点电泳图

2.7 VEGF 基因启动子区位点不同基因型薄型子宫内膜患者血清 VEGF 水平、子宫内膜 VEGF 表达比较

VEGF 基因启动子区位点 -2578C/A、-1154G/A 不同基因型血清 VEGF 水平、子宫内膜 VEGF 阳性率比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ );VEGF 基因启动子区位点 -460C/T 位点 TT、TC 基因型血清 VEGF 水平、子宫内膜 VEGF 阳性率低于 CC 基因型,且 TT 基因型低于 TC 基因型 ( $P < 0.05$ );VEGF 基因启动子区位点 +936C/T 位点 TT、CT 基因型血清 VEGF 水平、子宫内膜



VEGF 阳性率低于 CC 基因型,且 TT 基因型低于 CT 基因型( $P < 0.05$ )。见表 8。

表 8 薄型子宫内膜患者 VEGF 基因启动子区位点不同基因型 VEGF 表达比较

位点	基因型	例数	血清 VEGF (pg/mL)	子宫内膜 VEGF 阳性率(%)
-2578C/A	CC	46	83.12 ± 7.86	23(50.00)
	CA	31	83.99 ± 8.04	18(58.06)
	AA	23	84.54 ± 8.99	14(60.87)
-1154G/A	GG	50	83.56 ± 7.86	29(58.00)
	GA	37	82.90 ± 8.79	18(48.65)
	AA	13	83.45 ± 8.43	8(61.54)
-460C/T	TT	67	75.89 ± 6.66 <sup>*#</sup>	28(41.79) <sup>*#</sup>
	CT	21	80.79 ± 7.86 <sup>*</sup>	15(71.43) <sup>*</sup>
	CC	12	98.78 ± 8.97	12(100.00)
+936C/T	CC	15	97.86 ± 6.56	15(100.00)
	CT	26	82.34 ± 7.68 <sup>*</sup>	20(76.92) <sup>*</sup>
	TT	59	76.65 ± 5.66 <sup>*#</sup>	20(33.90) <sup>*#</sup>

注:与 CC 基因型比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ;与 CT 基因型比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

## 2.8 VEGF 基因的 PPI 网络分析结果

经 STRING 数据库行 VEGF 基因的 PPI 网络分析, PPI 网络图节点图连线即为薄型子宫内膜基因编码蛋白之间的相互作用,结果表明,在薄型子宫内膜中 VEGF 基因与多个易感基因表达有交互作用。如图 6 所示。

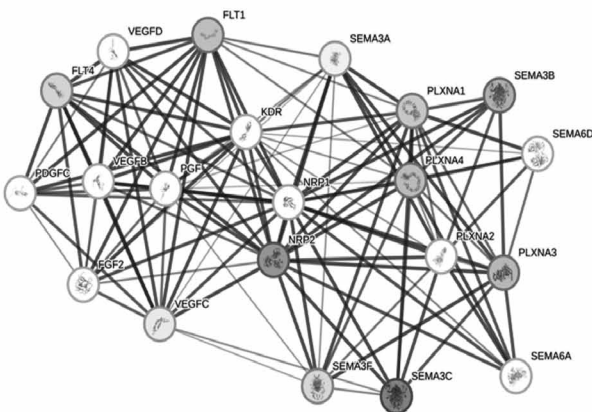


图 6 PPI 网络分析结果图

## 3 讨论

子宫内膜是一种动态组织,包括功能层和基底层,前者受卵巢激素周期性调节,后者则不受卵巢激素调节,是重新形成子宫内膜功能层的生发区域,研究显示,基底层损伤后内膜组织腺上皮生长不良,血管生成明显

减少,从而导致子宫内膜再生困难、变薄,最终形成薄型子宫内膜<sup>[6-7]</sup>。目前认为反复宫腔操作、药物作用、宫腔感染及原发性因素等多种原因均可诱发薄型子宫内膜,当子宫内膜处于较薄状态时,血供减少、容受性降低,导致闭经甚至不孕<sup>[8]</sup>。因生长因子具有替代子宫内膜损伤细胞、受损子宫内膜组织的潜力,临床多数学者开始探索生长因子在薄型子宫内膜中的发生机制,VEGF 作为关键的內皮形成因子,具有高度特异性的血管內皮细胞有丝分裂原,与月经周期中子宫内膜血管生成明显相关<sup>[9-10]</sup>。动物实验发现,VEGF 分泌减少无法与两种跨膜酪氨酸激酶受体结合,从而引起血管內皮细胞分裂增生障碍、血管通透性降低<sup>[11]</sup>。临床研究发现,经治疗后的薄型子宫内膜患者血清 VEGF 水平明显升高,进一步提示 VEGF 在薄型子宫内膜中的作用<sup>[12]</sup>。本研究比较健康人与薄型子宫内膜患者血清 VEGF 水平发现,与健康人相比,薄型子宫内膜患者血清 VEGF 水平及子宫内膜 VEGF 阳性率明显降低,提示 VEGF 缺乏所致的子宫内膜血管生成障碍可能是薄型子宫内膜形成的重要病理机制之一。

基因多态性作为个体核苷酸序列差异的表现,虽然此多态性的产生不会影响蛋白质表型,但可调控蛋白质表达<sup>[13]</sup>。人类 VEGF 基因是由 8 个外显子、7 个内含子交替组成的长 14 kb 的基因,位于染色体 6p21.3 上,现有研究表明,人类 VEGF 基因包括 -2578C/A、-1154G/A、-460C/T、+936C/T、+405G/C 等在内的超过 30 个多态性位点突变,认为仅启动子区就存在 10 余种多态性,其多态性参与多种疾病的发生<sup>[5,14-15]</sup>。近年来随着生育年龄的逐渐增大,人群流产次数增多,薄型子宫内膜发生率逐年升高,由此所引起的妊娠率降低严重影响患者生活质量,既往对于薄型子宫内膜的研究主要着眼于宏观因素的探讨,从分子层面的研究较少,本研究从分子层面对薄型子宫内膜的发病原因进行深入研究,以便早期进行预测和干预,减少薄型子宫内膜的发生,降低其不良影响。

本研究发现,VEGF 基因启动子区 -2578C/A 多态性位点与薄型子宫内膜无关,推测上述位点并不会改变 VEGF 转录活性影响子宫内膜血管形成,与既往研究中认为 VEGF 基因启动子区 -2578C/A 多态性位点并不能有效调节 VEGF 活性报道一致<sup>[16]</sup>。

目前有关 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 多态性位点仍无明确的功能研究,但研究发现,-1154G/A 多态性位点与 VEGF 高表达相关<sup>[17]</sup>。本研究发现,薄型子宫内膜患者血清 VEGF 水平降低,而 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 多态性位点与此病发生无关,间接证实了 VEGF 基因启动子区 -1154G/A 提高 VEGF 活性中的作用,并不会具备降低 VEGF 活性的作用。

VEGF 基因启动子区 -460C/T 多态性位点位于 VEGF 基因 5' 非编码区, 认为 -460C 单倍体型可提高 VEGF 基因转录活性, 而 -460T 单倍体型可降低 VEGF 基因转录活性, 认为在 VEGF 过度表达相关疾病中, 与 -460T 单倍体型相比, -460C 单倍体型具有更高的启动子活性和更高的 VEGF 产量<sup>[18]</sup>。而在 VEGF 缺失相关疾病中, 与 -460C 单倍体型相比, -460T 单倍体型具有更低的启动子活性和更低的 VEGF 产量<sup>[19]</sup>。本研究发现, 研究组 VEGF 基因启动子区 -460C/T 位点 TT 基因型、等位基因 T 及显性遗传模型、隐性遗传模型比较差异有统计学意义, 其中在基因型中 TC 基因型 [ $OR(95\% CI) = 1.453(1.002-2.287)$ ]、TT 基因型 [ $OR(95\% CI) = 2.446(1.987-4.536)$ ] 较 CC 基因型有更高的薄型子宫内膜风险概率; 在等位基因中 T 等位基因 [ $OR(95\% CI) = 2.897(2.012-4.533)$ ] 可增加薄型子宫内膜风险 2.897 倍; 而在显性遗传模型中 TT 基因型、在隐性遗传模型中 TC + TT 基因型在一定程度上增加了薄型子宫内膜风险, 此结果提示 VEGF 基因启动子区 -460T > C 位点突变可增加薄型子宫内膜易感性。分析其原因可能为: T 等位基因会降低 VEGF 转录活性而使 VEGF 表达受到抑制, 当 VEGF 表达降低后会阻碍子宫内膜血管生成, 进而增加薄型子宫内膜发生风险。

+936C/T 多态性位点作为常见 VEGF 基因启动子区基因多态性位点, 位于 3' 非编码区, 临床认为此位点 C 向 T 突变时, VEGF 明显缩短, 编码区增强子结合蛋白位点丢失, 从而导致 VEGF 表达降低<sup>[20-21]</sup>。本研究发现, VEGF 基因启动子区 +936C/T 多态性位点与薄型子宫内膜明显相关, 在后续基因型、等位疾病及显性遗传模型、隐性遗传模型分析中发现, 携带 T 等位基因可增加薄型子宫内膜风险, 此结果提示 VEGF 基因启动子区 +936C/T 位点中 C 向 T 突变与薄型子宫内膜有关, 推测其中原因可能与 C 向 T 突变时, VEGF 活性降低有关。

另外本研究经 STRING 数据库行 VEGF 基因的 PPI 网络分析结果显示, 在薄型子宫内膜中 VEGF 基因与多个易感基因具有交互作用, 此结果提示, VEGF 基因可能通过与多种易感基因相互作用来诱发薄型子宫内膜。

综上所述, VEGF 基因启动子区 -2578C/A、-1154G/A 多态性位点与薄型子宫内膜无关, -460T > C、+936C < T 多态性位点与薄型子宫内膜发生相关, 该位点突变可增加薄型子宫内膜易感性。虽然本研究表明 VEGF 基因启动子区 -2578C/A、-1154G/A、-460C/T、+936C/T 多态性位点与薄型子宫内膜的关系, 但并未与遗传暴露因素或其他相关基因的关系进行深入研究, 后续还需进一步阐明薄型子宫内膜的病理机制, 从

分子层面描述 VEGF 基因在薄型子宫内膜中的作用机制。

**利益冲突** 作者均声明无利益冲突。

## 【参考文献】

- [1] Lv H, Zhao G, Jiang P, et al. Deciphering the endometrial niche of human thin endometrium at single-cell resolution [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(8): e2115912119.
- [2] Gharibeh N, Aghebati-Maleki L, Madani J, et al. Cell-based therapy in thin endometrium and Asherman syndrome [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 33.
- [3] Jing Z, Yi Y, Xi H, et al. Therapeutic effects of VEGF gene-transfected BMSCs Transplantation on thin endometrium in the rat model [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 18(1): 3069741.
- [4] Liu Y, Hong K, Weng W, et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein levels and gene polymorphism with the risk of chronic kidney disease [J]. *Libyan J Med*, 2023, 18(1): 2156675.
- [5] Babah OA, Ojewunmi OO, Osuntoki AA, et al. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) associated with endometriosis in nigerian women [J]. *Hum Genomics*, 2021, 15(1): 64.
- [6] Dogra Y, Singh N, Vanamail P. Autologous platelet-rich plasma optimizes endometrial thickness and pregnancy outcomes in women with refractory thin endometrium of varied aetiology during fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles [J]. *JBRA Assist Reprod*, 2022, 26(1): 13-21.
- [7] Zheng Y, Chen B, Dai J, et al. Thin endometrium is associated with higher risks of preterm birth and low birth weight after frozen single blastocyst transfer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13(1): 1040140.
- [8] 黄冰雪, 魏璐晓, 宋诚, 等. 薄型子宫内膜的治疗研究进展 [J]. *中国性科学*, 2023, 32(11): 43-47.
- [9] Lei L, Lv Q, Jin Y, et al. Angiogenic microspheres for the treatment of a thin endometrium [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2021, 7(10): 4914-4920.
- [10] Le AW, Shan L, Wang ZH, et al. Effects of icariin on the expression of ER, VEGF, and KDR in the endometrial cells of thin endometrium [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 11250-11258.
- [11] 万秋园, 赵文娜, 吴晓玲, 等. 益母草总生物碱对大鼠薄型子宫内膜 VEGF 和 Ang-2 表达的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(24): 2606-2610.
- [12] 郑慧君, 潘鸿, 张虹. 葛根黑苏汤结合芬吗通对薄型子宫内膜不孕症患者中医证候积分、子宫内膜分型与妊娠情况的影响 [J]. *中国性科学*, 2022, 31(6): 129-133.
- [13] Mahajan D, Sambyal V, Uppal MS, et al. Association of VEGF-116G/A promoter polymorphism with esophageal cancer risk: a case-control study and an updated meta-analysis on gastrointestinal tract cancers [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2023, 24(9): 2951-2962.

(下转第 89 页)