

输卵管积水术后可改善种植窗期子宫内膜白血病抑制因子和整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达

李 瑾, 钟依平*, 张祖威, 吴海涛, 应 瑛, 周灿权, 徐艳文, 齐 诤

(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨输卵管积水手术治疗对改善子宫内膜白血病抑制因子(LIF)和整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达的意义。【方法】选择输卵管积水患者 60 例, 输卵管阻塞患者 30 例, 应用免疫组化方法测定输卵管积水患者手术治疗前后及阻塞组患者种植窗期子宫内膜 LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达情况。【结果】LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 在输卵管积水患者手术前种植窗期子宫内膜的表达水平明显低于阻塞组 ($P < 0.05$), 经手术治疗后, 子宫内膜种植窗期的 LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达水平与阻塞组无明显差异 ($P > 0.05$), 手术治疗前后子宫内膜种植窗期的 LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达水平有统计学差异 ($P < 0.05$)。【结论】输卵管积水降低了种植窗期子宫内膜 LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达水平, LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 可能是影响输卵管积水患者子宫内膜容受性的重要因子, 手术治疗可改善种植窗期子宫内膜 LIF 和整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达。

关键词: 输卵管积水; 白血病抑制因子; 整合素 $\alpha v \beta 3$; 种植窗期子宫内膜

中图分类号: R713.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)01-0094-05

Surgery of Hydrosalpinx Improves Expression of LIF and Integrin $\alpha v \beta 3$ in Endometrial at Implantation Window

LI Jin, ZHONG Yi-ping, ZHANG Zu-wei, WU Hai-tao, YING ying, ZHOU Can-quan, XU Yan-wen, QI Quan
(Obstetrics and Gynecology Department, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of the management of hydrosalpinx on the expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and integrin $\alpha v \beta 3$ in the endometrium at the time of the implantation window. 【Methods】 The expression of LIF and integrin $\alpha v \beta 3$ in the endometrium during the implantation window were examined by immunohistochemical method in 60 patients with hydrosalpinx and 30 patients suffering from tubal occlusion without hydrosalpinx. 【Results】 The expression of LIF and integrin $\alpha v \beta 3$ in the endometrium at the time of the implantation window before the surgery were significantly lower than the control group ($P < 0.05$). After the surgery, the expression of endometrial LIF and integrin $\alpha v \beta 3$ were not statistically significant compared with the control group ($P > 0.05$). The expression of endometrial LIF and integrin $\alpha v \beta 3$ were statistically significant before-and-after the surgery ($P < 0.05$). 【Conclusions】 The expression of LIF and integrin $\alpha v \beta 3$ in the endometrium at implantation window decreased in patients with hydrosalpinx, LIF and integrin $\alpha v \beta 3$ may be the important factors that affect the endometrial receptivity, and prior management of hydrosalpinx can improve the expression.

Key words: hydrosalpinx; leukemia inhibitory factor; integrin $\alpha v \beta 3$; endometrium during the implantation window

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(1):94-98]

子宫内膜受卵巢甾体激素影响而呈现周期性改变, 使胚胎只能在适当的时期植入子宫。胚胎种植 (blastocyst implantation) 在自然界哺乳类动物都

存在一个共同的现象, 即总是发生在受精后的 3 ~ 5 d (相当于自然周期的第 21 ~ 23 天或 LH 峰的第 6 ~ 8 天), 即在子宫内膜“种植窗” (implantation

收稿日期: 2011-08-22

基金项目: 广东省科技计划项目 (2009B030801155); 广东省人口计生委科研项目 (2010243)

作者简介: 李瑾, 硕士, 研究方向: 生殖医学, E-mail: lijin_doctor@yahoo.cn; * 通信作者: 钟依平, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 生殖医学, E-mail: zypdoctor@126.com

window)开启时进入宫腔,胚胎和子宫内膜按严格的时空顺序分泌相关蛋白和局部因子,达到相互识别,相互融合进而完成着床^[1]。这些有生物活性的细胞因子和蛋白质因子称为子宫内膜容受性标记物。女性不孕中,输卵管性因素是最常见因素,约占40%,其中输卵管积水又占输卵管性不孕的10%~30%。体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)最初就是用于输卵管因素引起的不孕,然而大量的研究表明输卵管积水的存在降低了种植率及妊娠率^[2],输卵管积水对于IVF-ET影响的具体机制尚不清楚,文献报道输卵管积水对子宫内膜容受性的影响是主要原因之一^[3]。本文通过比较输卵管积水患者与输卵管阻塞患者种植窗期子宫内膜白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达及输卵管积水患者手术治疗前后种植窗期子宫内膜 LIF 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达,来探讨输卵管积水患者 IVF-ET 不良结局的原因。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2010 年 4 月至 2010 年 12 月就诊于中山大学附属第一医院生殖医学中心的输卵管积水患者 60 例及输卵管阻塞无积水患者 30 例。所有患者年龄 < 40 周岁,月经周期规律,内分泌检查正常,基础体温呈双相且近半年未服用激素类药物。排除子宫内膜异位症、子宫肌瘤、多囊卵巢综合征、卵巢肿瘤、不明原因不孕、免疫性不孕、慢性全身性疾病、性传播疾病、滋养细胞疾病、嗜烟酒等以及男性因素所致不孕。

1.2 研究方法

1.2.1 诊断方法 输卵管积水:由子宫输卵管碘油造影(hysterosalpingography, HSG)或腹腔镜(laparoscopy, LAP)诊断并超声提示一侧或双侧输卵管积水声像。输卵管阻塞:由 HSG 或 LAP 诊断的输卵管阻塞病变并超声检查未发现输卵管积水声像。

1.2.2 输卵管积水的主要手术方法 经阴道超声引导下输卵管积水抽吸术;腹腔镜下输卵管造口术;腹腔镜下输卵管近端结扎术;腹腔镜下输卵管切除术。

1.2.3 标本采集与处理 研究对象自月经周期的

第 10 天开始用尿 LH 试纸,测出尿 LH 峰,结合阴道超声监测和查血检查性激素,排卵后的第 7~8 天用刮匙于近宫底处搔刮取内膜组织,生理盐水漂洗样本尽可能减少血液污染,标本固定液固定,石蜡包埋切片。每例组织标本均需经病理学检查证实为分泌期内膜,输卵管积水患者在手术治疗前后种植窗期各取 1 次内膜,对照组取 1 次内膜。

1.2.4 免疫组化试剂 小鼠抗人白血病抑制因子(LIF)单克隆抗体购自 R&D 公司,抗体稀释浓度为 1:80;小鼠抗人整合素 $\alpha v\beta 3$ 单克隆抗体购自 Abcam 公司,抗体稀释浓度为 1:80;实验步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3 结果判定

每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 400$), Image-Pro Plus 5.1 Chinese 图像分析软件测量光密度(integrated optical density, IOD)值。

1.4 统计学分析

结果用平均光密度值以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,本实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。 P 值为双侧概率,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

在光镜下观察,LIF 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 主要定位于子宫内膜腺上皮的细胞膜和细胞浆,间质表达较弱。输卵管积水患者手术前后的子宫内膜 LIF 表达均有统计学差异($P < 0.05$)。输卵管积水患者手术前(图 1A)与对照组(图 1C)的子宫内膜 LIF 表达有统计学差异($P < 0.05$)。输卵管积水患者手术后(图 1B)与对照组的子宫内膜 LIF 的表达无统计学差异($P > 0.05$;表 1)。

表 1 输卵管积水患者手术前后及阻塞组种植窗期子宫内膜 LIF 的表达

Table 1 The expression of endometrial LIF and integrin $\alpha v\beta 3$ before and after surgery and control group ($\bar{x} \pm s$)

	Before the surgery ($n = 60$)	After the surgery ($n = 60$)	Control group ($n = 30$)
LIF	0.42 \pm 0.17	0.58 \pm 0.21	0.60 \pm 0.22
$\alpha v\beta 3$	0.29 \pm 0.10	0.58 \pm 0.17	0.55 \pm 0.11

输卵管积水患者手术前后的子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达均有统计学差异($P < 0.05$)。输卵管积水患者手术前(图 2A)与对照组(图 2C)的子宫内

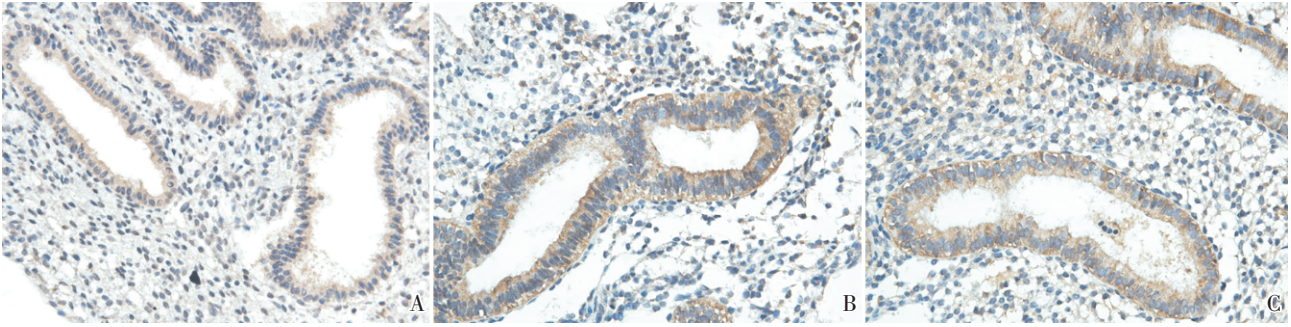


图 1 输卵管积水患者种植窗期子宫内膜 LIF 的表达(免疫组化染色)

Fig.1 The expression of LIF in the endometrium at implantation window before and after surgery in patients with hydrosalpinx and control group (immunohistochemical staining)

A: the expression of endometrial LIF before surgery in patients with hydrosalpinx is weak; B: the expression of endometrial LIF after surgery is stronger; C: the expression of endometrial LIF in control group is similar with the patients after surgery. ($\times 400$)

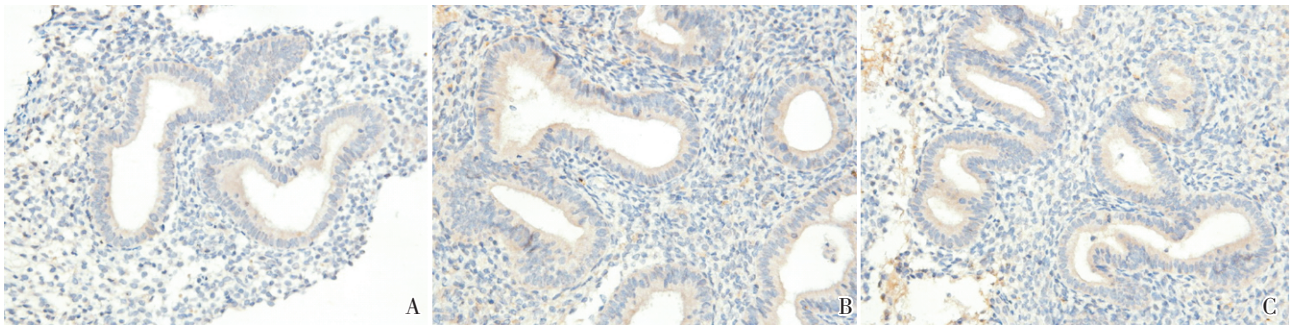


图 2 输卵管积水患者种植窗期子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达(免疫组化染色)

Fig.2 The expression of integrin $\alpha v \beta 3$ in the endometrium at implantation window before and after surgery in patients with hydrosalpinx and control group (immunohistochemical staining)

A: the expression of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ before surgery in patients with hydrosalpinx is weak; B: the expression of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ after surgery is stronger; C: the expression of endometrial integrin $\alpha v \beta 3$ in control group is similar with the patients after surgery. ($\times 400$)

膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 表达有统计学差异($P < 0.05$)。输卵管积水患者手术后(图 2B)与对照组的子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 的表达无统计学差异($P > 0.05$; 表 1)。

3 讨论

白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)是属于 IL-6 家族中的一个多功能的细胞因子。LIF 基因是单拷贝基因,在小鼠位于第 11 号染色体,片段长 6.3 ku,在人位于第 22 号染色体上,片段长 6.0 ku,均含有 3 个外显子和 2 个内含子及 5' 端和 3' 端侧翼非编码区。成熟 LIF 蛋白是一种在天冬酰胺残基上高度糖基化的分泌型蛋白,由 180 个氨基酸残基组成。LIF 是通过与细胞表面受体相结合而发挥生物学效应,从而影响生殖活

动的许多环节,包括卵泡发育、胚胎发育和着床、妊娠维持等^[4]。LIF 被认为是子宫内膜容受性的标记物之一,具有广泛生物学功能,在卵巢、卵泡液、输卵管、胚胎滋养层、子宫内膜及蜕膜等多种组织中均有表达。

子宫内膜 LIF 基因的表达对哺乳动物胚胎着床过程起重要的调节作用。LIF 对胚胎滋养层的调节和分化有增强加固的效应,它在胚胎种植过程中的黏附和侵入阶段具有重要作用。LIF 表达于早期妊娠的蜕膜、绒毛膜和子宫内膜的自然杀伤细胞。已经有研究证实,LIF 可以通过调节胚胎滋养层细胞的侵袭能力和影响机体免疫耐受,从而调控胚胎种植。这些研究都证明了 LIF 的表达对胚胎的着床是必需的^[5]。有学者用特异的 RNA 酶保护法观察到,LIF 和 LIF mRNA 表达于整个月经周

期的子宫内膜上皮,但是在胚胎着床时期,即分泌中、晚期和妊娠早期子宫内膜的上皮细胞内的LIF mRNA及蛋白质的表达出现显著增加^[6]。已有研究报道LIF在黄体中、晚期的子宫内膜上皮细胞中的表达会出现一个飞速增长,在这个时期不明原因不孕妇女的子宫内膜上皮细胞中LIF的表达较可妊娠妇女低很多。黄体中期子宫内膜LIF表达量测定结果显示,复发性流产患者子宫内膜LIF表达量均低于正常生育妇女。并且发现,已育妇女分泌期子宫内膜中LIF的量是增殖期的22倍以上,而不孕妇女的分泌期的LIF表达水平较增殖期明显低下^[7]。这提示,LIF可能在启动胚胎着床和维持妊娠方面起重要作用。

本研究结果显示在输卵管积水患者手术前种植窗期子宫内膜的LIF的表达水平明显低于无积水的输卵管阻塞病人,经手术治疗后,其子宫内膜种植窗期的LIF表达水平与对照组无明显差异,手术前后子宫内膜种植窗期的LIF的表达水平有统计学差异。说明输卵管积水影响了子宫内膜种植窗期的LIF的表达,手术治疗后LIF的表达增加。这与文献的报道是一致的,Seli等^[8]研究发现,输卵管积水患者种植窗期子宫内膜LIF的表达远低于正常女性,积水的输卵管被切除后LIF表达增强。Emre等^[9]研究表明输卵管积水患者种植窗期子宫内膜LIF的表达较正常对照组明显降低,而输卵管积水患者行输卵管切除术后LIF的表达较术前明显上升,说明输卵管积水降低了种植窗期子宫内膜LIF的表达水平。输卵管积水是慢性盆腔炎症的一种表现,输卵管积水内所含的细胞毒性因子浓度较高,有可能会通过积液返流入宫腔进而影响子宫内膜,Copperman等^[10]将输卵管积水患者和输卵管正常患者的子宫内膜进行对比,发现输卵管积水患者子宫内膜炎性细胞总数比输卵管正常患者明显增加,而以IL-2为代表的炎症因子表达也明显强于正常组。IL-2是Th-1型淋巴细胞分泌的特异性细胞因子,Piccinni等^[11]研究发现Th-1型细胞因子可下调LIF的表达,输卵管积水患者子宫内膜IL-2表达增加可能会降低LIF的表达。

整合素是一类细胞黏附分子,普遍存在于细胞表面,是细胞外基质的一类公共受体,由 α 、 β 两种亚单位以非共价键形式连接形成异二聚体分子。现已发现 α 亚单位14种, β 亚单位9种,两者

组合成20多种整合素。 α 、 β 亚基均由胞外、跨膜、胞内3个区组成。 α 亚单位分子量约120~180 ku,是整合素发挥功能的基本条件, β 亚单位分子量约90~110 ku,不同的 α 、 β 亚单位具有不同的结构形式。 α 、 β 异二聚体的N端肽段暴露于质膜外,较长,连接成球形区域,并含有一个二价阳离子结合域,能够和层连蛋白(laminin, LN)、纤连蛋白(fibronectin, FN)、玻连蛋白(vitronectin, VN)以及人补体C3的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列(Arg-Gly-Asp, RGD)序列发生特异结合。C端位于胞浆内,较短,且不同的 α 、 β 亚单位各具有不同的结构形式。Dou等^[12]研究发现 $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6.1, \alpha 6.2, \alpha v, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 5$ 在整个月经周期子宫内膜中均有表达, $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 5$ 主要在增生期表达,而 $\alpha 4, \alpha 6.2, \alpha v, \beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 5$ 主要在分泌期表达, $\alpha 6.1$ 在整个月经周期子宫内膜中的表达无差异性。其中 $\alpha v, \beta 3$ 在月经周期中表达水平的变化较其他亚基明显。不同的细胞表达不同的整合素分子。哺乳动物细胞表面广泛表达整合素分子。目前,整合素已作为子宫内膜容受性的一个公认的衡量指标。

整合素通过识别配体发挥作用, $\alpha v \beta 3$ 的配体包括骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、糖蛋白(perlecan)、FN、VN、粘着素(tenascin)以及血友病因子(von willebrand factor, vWF)等。OPN在子宫内膜容受性建立期与 $\alpha v \beta 3$ 相识别,与“种植窗期”密切相关。增殖期子宫内膜OPN mRNA表达很弱;分泌中晚期,子宫内膜上皮细胞、淋巴细胞和子宫内膜分泌物中OPN mRNA表达较高^[13]。Lessey^[14]等提出了胚胎植入的“三明治”模型:胚胎和子宫内膜表面表达的整合素作为OPN的受体,与OPN结合,形成了一个识别复合物,OPN处于两整合素分子之间,介导了胚胎与子宫内膜的交互对话。从而使胚胎向子宫内膜黏附。通过无数的“三明治”模型的累加,子宫内膜达到容受状态。另外,整合素可能是种激活因子,使内膜激活,血管通透性增加,促进局部血管舒张,参与内膜的蜕膜化过程,从而有利于胚胎对内膜的黏附,促进着床。研究报道,整合素 $\alpha v \beta 3$ 与RGD序列相连表达于胚胎表面^[14],RGD很有可能作为一个桥梁介导子宫内膜整合素 $\alpha v \beta 3$ 和胚胎所表达的整合素 $\alpha v \beta 3$ 互相识别,具体的机制仍有待研究。以上研究均说明整合素 $\alpha v \beta 3$ 对于胚胎植入非常重要,而且它不仅表达

于子宫内膜还很可能表达于胚胎上皮表面。

本研究结果显示在输卵管积水手术前子宫内膜种植窗期的整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达水平明显低于无积水的输卵管阻塞病人,经手术治疗后,其子宫内膜种植窗期的整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达水平与对照组无明显差异,手术前后子宫内膜种植窗期的整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达水平有统计学差异。说明输卵管积水抑制了子宫内膜种植窗期的整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达,手术治疗后整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达上调。这与文献的报道是一致的。Lessey^[14]等发现输卵管积水患者整合素 $\alpha v\beta 3$ 在种植窗口子宫内膜的表达减少,切除积水输卵管后整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达回复正常。Bildirici^[15]等也得到相似结论,他们观察了 10 例输卵管积水患者,手术前有 8 例种植窗期整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达 HSCORE 评分 <0.7 ,而术后平均评分增加至 2.1 (阳性标准 0.7),输卵管积水患者在输卵管切除术前术后内膜活检标本整合素 $\alpha v\beta 3$ 表达有显著性不同。由此推测,输卵管积水可以通过减少子宫内膜整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达进而降低子宫内膜容受性。

本实验结果显示输卵管积水降低了种植窗期子宫内膜 LIF 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达水平,LIF 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 可能是影响输卵管积水患者子宫内膜容受性的重要因子,手术治疗可改善种植窗期子宫内膜 LIF 和整合素 $\alpha v\beta 3$ 的表达。

参考文献:

- [1] Bruce A, Lessey M. Assessment of endometrial receptivity[J]. *Fertil Steril*, 2011, 96(3): 522-529.
- [2] Taylor E, Gomel V. The uterus and fertility[J]. *Fertil Steril*, 2008, 89(1): 1-16.
- [3] Mijatovic V, Veersema S, Emanuel MH, et al. Essure hysteroscopic tubal occlusion device for the treatment of hydrosalpinx prior to in vitro fertilization-embryo transfer in patients with a contraindication for laparoscopy [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4):1338-1342.
- [4] Aghajanova L. Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction[J]. *Curr Op Obst Gynec*, 2010, 22(3): 213-219.
- [5] Dimitriadis E, Nie G, Hannan NJ, et al. Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface[J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(2-3): 313-322.
- [6] Perrier d, Hauterive S, Charlet-Renard C, et al. Human chorionic gonadotropin and Growth factors at the embryonic endometrial interface control leukemia inhibitory factor(LIF) And interleukin 6(IL-6)secretion by human endometrial epithelium [J]. *HumReprod*, 2004, 19(11): 2633-2643.
- [7] Altmae S, Martinez-Conejero JA, Salumets A, et al. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility[J]. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16(3): 178-187.
- [8] Seli E, Kayisli UA, Cakmak H, et al. Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukaemia inhibitory factor (LIF)expression at the time of the implantation window [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(11): 3012-3017.
- [9] Emre S, Umit AK, Hakan C, et al. Removal of hydrosalpinges increases endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) expression at the time of the implantation window[J]. *Hum Reprod*, 2005, 20(11): 3012-3017.
- [10] Copperman AB, Wells V, Luna M, et al. Presence of hydrosalpinx correlated to endometrial inflammatory response in vivo[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(4): 972-976.
- [11] Piccinni MP, Beloni L, Livi C, et al. Defective production of both leukaemia inhibitory factor and Type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortion[J]. *Nat Med*, 1998, 4(9): 1020-1024.
- [12] Dou Q, Willians RS, Chegini N. Expression of integrin messenger ribonucleic acid in human endometrium; a quantitative reverse transcription polymerase chain reaction study[J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(2): 347-353.
- [13] Apparao KBI. Osteopontin and its receptor alphavbeta (3) integrin are coexpressed in the Human endometrium during the menstrual cycle but regulated differentially [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(10): 4991-5000.
- [14] Lessey BA, Castelbaum AJ. Integrins and implantation in the human [J]. *Rev Endocr MetabDisord* 2002, 3(2): 107-117.
- [15] Bildirici L, Bukulmez O, Ensari A, et al. A prospective evaluation of the effect of salpingectomy on endometrial receptivity in cases of women with communicating by hydrosalpinges [J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(11): 2422-2426.

(编辑 张恩健)