

PCOS患者卵泡基底膜蛋白的免疫组化研究

冯淑英, 邝健全, 余妙真, 杨冬梓, 翁梅英, 李琳

(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

摘要 【目的】探讨多囊卵巢综合征(PCOS)卵巢细胞外基质代谢是否存在异常。【方法】收集 PCOS 卵巢组织 20 例作为 PCOS 组, 正常妇女卵巢组织 23 例作为对照组, 用 SP 免疫组化法比较两组不同期别卵泡基底膜的 Ⅰ型胶原、层连接蛋白及串珠样蛋白聚糖 3 种主要蛋白组分的表达。【结果】两组原始卵泡基底膜 3 种主要蛋白组分的表达相似; PCOS 组初级卵泡基底膜的 Ⅰ型胶原、层连接蛋白的表达明显多于对照组 ($P < 0.05$); PCOS 组早期次级卵泡及囊状卵泡基底膜的 Ⅰ型胶原、层连接蛋白及串珠样蛋白聚糖的表达明显多于对照组 ($P < 0.05$)。【结论】PCOS 发育中卵泡基底膜的构成成分表达增多, 表明 PCOS 卵巢细胞外基质代谢异常。

关键词: 多囊卵巢综合征; 卵泡; 基底膜; 细胞外基质

中图分类号: R711.75

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0161-04

Immunohistochemistry of Follicular Basic Membrane Components and Contents in Patients with Polycystic Ovary Syndrome

FENG Shu-ying, KUANG Jian-quan, YU Miao-zhen, YANG Dong-zhi, WENG Mei-ying, LI Lin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objective】 To explore whether the metabolism of ovarian extra cellular matrix is abnormal in the patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). 【Methods】 Twenty cases of ovarian tissues from the women with PCOS were enrolled as study group and another 23 cases of ovarian tissues in normal women were selected as control group. S-P immunohistochemical method was adopted to detect the contents of collagen, laminin, and perlecan in follicular basic membrane in different periods. 【Result】 The contents of collagen and laminin in basic membrane of primordial follicles were similar in both groups ($P > 0.05$). The expression of collagen and laminin in primary and secondary follicles were higher in PCOS group than control group ($P < 0.05$). The expression of collagen, laminin, and perlecan in pre-sinusoid and sinusoid follicles were obviously higher in PCOS group than control group ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The increasing of the contents of basic membrane in PCOS developing follicles shows that the metabolism of ovarian extra cellular matrix is abnormal in women with PCOS.

Key words: polycystic ovary syndrome; follicular basement membrane; extra cellular matrix; follicle

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006(2):161-164]

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是育龄妇女常见的妇科内分泌紊乱性疾病。近年来研究发现胰岛素抵抗在 PCOS 的发病中起着非常重要的作用, 但是, 胰岛素抵抗和高胰岛素血症同样也存在于 2 型糖尿病 (NIDDM) 患者, 而且两者的胰岛素敏感性均下降 35%~40%, 然而卵巢功能障碍仅发生在 PCOS 患者, 而不常见于 NIDDM 患者。在内科领域, 有研究已证明胰岛素抵抗可引起细胞外基质代谢异常, 即使在糖

尿病早期已经有肾小球基底膜、视网膜毛细血管基底膜及其它基底膜的明显增厚, 最后导致各器官的功能异常。PCOS 妇女是否也存在卵巢细胞外基质代谢异常, 卵泡基底膜厚度、构成成分改变, 导致卵巢功能异常, 目前还不清楚。在卵巢, 从原始卵泡到发育成熟的囊状卵泡, 卵泡表面都有一层基底膜将卵母细胞、颗粒细胞与周围的间质或卵泡内膜细胞层隔离开, 基底膜具有分子筛的功能, 所有出入卵泡的物质均需经它的筛选^[1]。卵泡

收稿日期: 2005-10-25

基金项目: 卫生部资金资助项目 (D000095007)

作者简介: 冯淑英 (1967-), 女, 主治医师, 广东东莞人; 邝健全, 教授, 博士生导师, 通讯作者。

基底膜是由 型胶原 (collagen)、层连接蛋白 (laminin LM) 及串珠样蛋白聚糖 (perlecan) 3 种主要蛋白组分构成。这 3 种主要蛋白组分含量的改变会影响基底膜的分子筛功能。本研究用免疫组织化学法测定 PCOS 妇女不同发育期别的卵泡基底膜 3 种主要蛋白组分的表达, 并与正常妇女作比较, 从而探讨 PCOS 患者卵巢细胞外基质代谢是否存在异常。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

收集 2002 年 12 月至 2004 年 3 月因 PCOS 在中山大学附属第二医院行腹腔镜卵巢开窗活检或开腹卵巢楔形切除治疗的妇女的卵巢组织 20 例 (年龄 20~40 岁) 为一组, 另收集因子宫肌瘤或早期宫颈癌, 行肌瘤剔除或子宫切除并行卵巢活检, 而且月经周期正常, 无代谢性疾病妇女的卵巢组织 23 例 (年龄 20~40 岁) 作为对照组。PCOS 的诊断标准同 2003 年 Rotterdam 通过的标准^[2]。所有对象近 3 月无妊娠、分娩、流产、使用激素史。根据 2000 年 GcGee EA^[3] 提出的卵泡分级将卵泡分成 3 级: 原始卵泡级、初级卵泡级及早期次级卵泡、囊状卵泡级。

1.2 标本收集及处理

术中取约 5 mm³ 大小的卵巢组织放于液氮中速冻, 后转移于 -80 的冰箱中保存。用冰冻切片机切出 5 μm 的厚片, 进行免疫组织化学染色。

1.3 主要试剂和免疫组化染色

型胶原及层连接蛋白单克隆抗体购自福建迈新公司, 串珠样蛋白聚糖单克隆抗体购自

NewMarker 公司; SP 免疫组化试剂盒购自中山公司, 其余试剂均为国产分析纯。采用免疫组化 SP 法染色, 以 PBS 代替一抗为阴性对照, 阳性对照片由福建迈新公司提供的。

1.4 阳性结果判断及评定方法

型胶原、层连接蛋白和串珠样蛋白聚糖经 S-P 法免疫组化染色后, 卵泡周围无阳性反应为 (-), 卵泡周围出现阳性反应带呈浅棕色不连续为 (+), 呈连续棕色细线为 (++), 呈深棕色粗线为 (+++)。

1.5 统计学方法

应用 SPSS10.0 统计软件作统计分析。计量资料数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组妇女不同类型卵泡基底膜中的 型胶原、层连接蛋白和串珠样蛋白聚糖的表达程度比较用秩和检验。

2 结 果

对照组和 PCOS 组的年龄分别是 (30.6 ± 8.4) 岁和 (28.4 ± 5.6) 岁, 两组比较无显著差异 (P > 0.05)。对照组共找到 23 个原始卵泡, 10 个初级卵泡, 5 个早期次级卵泡, 3 个囊状卵泡; PCOS 组共找到 20 个原始卵泡, 15 个初级卵泡, 5 个早期次级卵泡, 5 个囊状卵泡; 所有的卵泡均为非闭锁卵泡。

2.1 原始卵泡基底膜 3 种主要蛋白表达

两组原始卵泡基底膜的 型胶原、层连接蛋白表达相似, 大部分表现为 (+) (图 1a), 两组之间的差异无统计学意义 (P > 0.05); 两组原始卵泡基底膜中的串珠样蛋白聚糖表达均为阴性。(表 1)。

表 1 两组妇女原始卵泡基底膜 3 种主要蛋白表达的评级比较

Table 1 Comparison of the expression of three main proteins in primordial follicle basement membrane between two groups

Group	Control (n=23)					Control (n=20)					Chi	P
	α(-)	1(+)	2(++)	3(+++)	Median	α(-)	1(+)	2(++)	3(+++)	Median		
Collagen	0	21	2	0	1.05	0	17	3	0	1.09	0.404	0.525
Laminin	2	20	1	0	0.98	0	19	1	0	1.03	0.982	0.322
Perlecan	23	0	0	0	0.00	20	0	0	0	0.00	0.000	1.000

2.2 初级卵泡基底膜 3 种主要蛋白表达

与原始卵泡相比, 两组初级及次级卵泡基底膜的 型胶原、层连接蛋白表达均明显增强 (图 1b); 发育前后比较有统计学意义 (P < 0.05)。初级

卵泡中 PCOS 组基底膜的 型胶原、层连接蛋白表达比正常组强 (图 1c), 两组比较有统计学意义 (P < 0.05)。两组初级及次级卵泡基底膜中的串珠样蛋白聚糖表达也均为阴性 (表 2)。

表 2 两组妇女初级卵泡基底膜 3 种主要蛋白表达的评级比较

Table 2 Comparison of the expression of three main proteins in primary follicle basement membrane between two groups

Group	Control (n=10)					Control (n=15)					Chi	P
	α (-)	1(+)	2(++)	3(+++)	Median	α (-)	1(+)	2(++)	3(+++)	Median		
Collagen	0	2	8	0	1.88	0	2	4	9	2.67	6.158	0.013
Laminin	0	3	7	0	1.79	0	0	12	3	2.13	6.000	0.014
Perlecan	10	0	0	0	0.00	15	0	0	0	0.00	0.000	1.000

2.3 早期次级卵泡及囊状卵泡基底膜 3 种主要蛋白表达

在对照组早期次级卵泡及囊状卵泡基底膜型胶原的表达少于初级卵泡 ($P < 0.05$); 层连接蛋白的表达稍增加, 前后比较无统计学意义 ($P > 0.05$); 而且基底膜近卵泡内膜细胞侧的边界不清 (图 1d)。PCOS 组 型胶原的表达比对照组的表

达强 ($P < 0.05$)。PCOS 组的层连接蛋白的表达显著强于对照组 ($P < 0.05$)。串珠样蛋白聚糖在早期次级卵泡开始表达, 对照组串珠样蛋白聚糖在早期次级卵泡及囊状卵泡基底膜中表达评级为 (+)~(++) ; PCOS 组表达更明显, 为 (++) (+++), PCOS 组表达明显强于对照组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 两组妇女早期次级卵泡及囊状卵泡基底膜 3 种主要蛋白表达的评级比较

Table 3 Comparison of the expression of three main proteins in secondary follicle basement membrane between two groups

Group	Control (n=8)					Control (n=10)					Chi	P
	α (-)	1(+)	2(++)	3(+++)	Median	α (-)	1(+)	2(++)	3(+++)	Median		
Collagen	1	6	1	0	1.00	0	0	9	1	2.06	12.537	0.000
Laminin	0	1	7	0	1.93	0	0	5	5	2.50	5.841	0.016
Perlecan	0	4	4	0	1.50	0	1	4	5	2.50	6.120	0.013

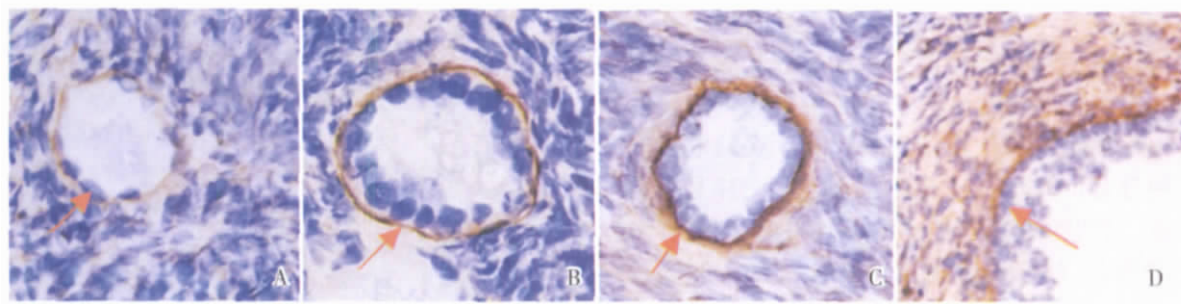


图 1 两组不同级别卵泡基底膜 () 层连接蛋白染色

Fig.1 Immunohistochemical staining of laminin in the basement membrane () in different grade follicles of two groups

A: Primordial follicle of normal group ($\times 400$); B: Primary follicle of normal group ($\times 400$); C: Primary follicle of PCOS group ($\times 400$); D: Secondary follicle of normal group ($\times 200$)

3 讨论

近年研究发现 40% -60% PCOS 患者 (特别是肥胖者) 存在胰岛素抵抗及高胰岛素血症, 这对 PCOS 的发生与发展起着重要作用^[4], 但发病机制尚不清楚。在内科领域, 已有研究已证明胰岛素抵抗可引起细胞外基质代谢异常。本研究发现当卵泡开始发育后, 无论是初级、早期次级、囊状卵泡,

PCOS 卵泡基底膜中的 型胶原、层连接白蛋白表达均较正常妇女高, 早期次级卵泡、囊状卵泡基底膜中的串珠样蛋白聚糖也比正常妇女表达明显增高, 既往研究也证实, PCOS 患者卵巢的白膜增厚、硬化, 卵巢的间质纤维组织增生明显, 所有这些均表明 PCOS 患者的卵巢细胞外基质代谢也存在异常。Rodgers 研究发现卵巢的细胞外基质的代谢在调节卵泡的发育、成熟和排卵过程均起着非常重要的作用^[1]。因此, PCOS 患者卵巢胰岛素抵抗可

能导致卵巢细胞外基质代谢异常,从而进一步影响卵泡的发育、成熟。

2001年 Yen SSC 提出 PCOS 患者的“LH- 卵泡内膜细胞轴”功能异常放大,过高的 LH 刺激卵泡内膜细胞生成过多的雄激素;而“FSH- 颗粒细胞轴”功能低下,颗粒细胞数量减少,芳香化酶功能低下,不能把卵泡内膜细胞合成的雄激素转化为 E_2 ,导致体内雄激素过多,卵泡发育中途停滞,优势卵泡的选择发生障碍,大量小窦状卵泡积聚,卵巢形成多囊状改变。Yen SSC^[5]同时提出“FSH- 颗粒细胞轴”功能低下可能是由于 FSH 对颗粒细胞的作用受阻。FSH 要对颗粒细胞起作用,必须也要穿过卵泡基底膜,因此,基底膜的厚度和组成成份的含量决定基底膜的分子筛功能。本研究发现,两组妇女的原始卵泡基底膜的 I 型胶原、层连接蛋白的表达相似,多为(+);但当卵泡开始发育后,PCOS 卵泡基底膜中的 I 型胶原、层连接蛋白表达均较正常妇女高,早期次级卵泡、囊状卵泡基底膜中的串珠样蛋白聚糖也比正常妇女表达明显增高。基底膜的各种成分表达的改变必然影响其功能,I 型胶原的增多使基底膜变得更坚固,不利于卵泡发育过程基底膜的扩张和卵泡的增大;我们用电镜观察也发现 PCOS 妇女卵泡基底膜比正常妇女的明显增厚^[6],增厚的基底膜必然会影响到其分子筛的功能,从物理角度分析增厚的基底膜常常比薄的基底膜的通透性差,另外,串珠样蛋白聚糖带有大量的负电荷,在基底膜形成严密的电荷屏障,使带有负电荷的分子通过困难。FSH 是糖蛋白激素,它的糖链中含有多量唾液酸,表面带有多量的负电荷,FSH 的等电点只有 4.5,FSH 的通过困难,使 FSH 的作用受阻,颗粒细胞分裂、增殖、分化异常,导致卵泡发育缓慢,大量发育中的卵泡堆积,卵巢呈多囊状,而且优势卵泡的选择受阻,发育中途停滞,不能成熟,排卵障碍。

PCOS 妇女的卵泡基底膜 3 种成分增多的机制还不清楚,但有研究者认为 NIDDM 患者的内皮基底膜增厚是由于胰岛素抵抗使内皮细胞对葡萄

糖的代谢能力下降,葡萄糖在细胞内堆积,而葡萄糖是合成糖蛋白和蛋白聚糖主要原料,上皮内糖蛋白和蛋白聚糖的生物合成是不依赖胰岛素的,使细胞合成糖蛋白和蛋白聚糖增多,分泌到基底膜,使基底膜增厚^[7]。现有大量研究表明 PCOS 妇女存在胰岛素抵抗,PCOS 卵巢胰岛素抵抗可能是引致卵泡基底膜结构和成分异常的原因。

本研究发现卵泡基底膜的成分和含量随卵泡的发育改变,PCOS 妇女发育中的卵泡基底膜中的 I 型胶原、层连接蛋白串珠样蛋白聚糖的表达较正常妇女增多。PCOS 卵巢细胞外基质代谢异常。

参考文献:

- [1] RODGERS R J, IRVING- RODGERS H F, RUSSELL D L. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle [J]. *Reproduction*, 2003, 126(4):415- 424.
- [2] The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1):41- 47.
- [3] McGEE E A, HSUEH A J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles [J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(2):200- 214.
- [4] 王竹晨, 顾熊飞, 杨冬梓, 等. 多囊卵巢综合征患者血浆 TNF- α 、sTNFR2 水平与胰岛素抵抗的相关性 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(3): 268- 271.
- [5] YEN S S C, JAFFE R B, BARBIERI R L. *Reproductive Endocrinology (physiology, pathophysiology and clinical management)* [M]. 4th ed. Harcourt Asia W. B. Saunders, 2001:436- 495.
- [6] 冯淑英, 邝健全, 曹水良, 等. 多囊卵巢综合征患者卵泡基底膜超微结构的研究 [J]. *电子显微学报*, 2005, 24(2):133- 136.
- [7] RAPTIS A E, VIBERTI G. Pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001, 109, Suppl 2:S424- 437.

(编辑 张恩健)