

钙网质蛋白在多囊卵巢综合征大鼠子宫内膜的表达及意义*

汪宇¹ 王丽岩^{2△} 贺立新² 马瑞凤³

(1 内蒙古医学院 内蒙古 呼和浩特 010059 2 内蒙古医学院附属医院生殖中心 内蒙古 呼和浩特 010059 ;

3 内蒙古医学院 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要 目的:研究钙网质蛋白(CRT)在 PCOS 大鼠子宫内膜中的表达及生物学意义。方法:60 只雌性 SD 大鼠随机分为 PCOS 组和对照组,每组各 30 只。给模型组 24 日龄大鼠皮下埋植左旋甲基炔诺酮硅胶棒 3 mm / 只,3 d 后 BID 皮下注射人绒毛膜促性腺激素 1.5 IU。给对照组皮下注射等体积生理盐水。注射 9 d 后观察大鼠卵巢形态学(HE 染色),化学发光法测定性激素水平。结果:模型组大鼠卵巢重量和体积均显著高于对照组($P<0.01$)。模型组大鼠卵巢出现类多囊卵巢综合征的改变。模型组卵巢各级发育期卵泡及黄体少见,卵泡多呈囊性扩张。模型组大鼠血清孕激素、睾酮、空腹胰岛素、空腹血糖水平均显著高于对照组($P<0.05$);卵泡刺激素(FSH)水平显著低于对照组($P<0.05$)。LH / FSH 比值显著高于对照组($P<0.05$)。采用免疫组织化学方法及灰度值测定,定量分析 CRT 在 PCOS 组和对照组的子宫内膜中表达。CRT 在两组中的子宫内膜中均有表达。PCOS 组子宫内膜上皮 CRT 表达显著低于对照组($P<0.01$)。结论:避孕硅胶棒联合 hCG 诱导 SD 大鼠多囊卵巢综合征模型是较好的 PCOS 模型。CRT 与 PCOS 的发病密切相关。

关键词: 多囊卵巢综合征;子宫内膜;动物模型;钙网质蛋白

中图分类号: Q95-3 R711.75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)11-2075-04

Expression and Significance of Calreticulin in Endometrium of Rats with Polycystic Ovarian Syndrome*

WANG Yu¹, WANG Li-yan^{2△}, HE Li-xin², MA Rui-feng³

(Assisted Reproductive Center, the First Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression and biological significance of apoptosis regulatory CRT in the follicles and endometrium of polycystic ovarian syndrome (PCOS) in rat model. **Methods:** Sixty rats were randomly divided into two groups: PCOS group ($n=30$) and control group ($n=30$). The rats in the experimental group were given subcutaneous implanting of levonorgestrel silica gel staff and injected 115 IU hCG twice daily for 9 days from the 4th day. The rats in the control group were injected with normal saline at the same time. Ovarian morphologic changes, sex hormone levels were detected. **Results:** The weight and volume of ovarian in the model rats were higher than that in the control rats' ($P<0.01$). The rats in model group had similar pathological appearance to polycystic ovary. The multiple follicular cysts, and the number of theca cells and interstitial cells increased in the ovaries of modeling group showed. There was less developed follicles and corpus lutea. The progesterone, testosterone, luteinizing hormone, fasting insulin, glucose the LH / FSH ratio were significantly higher in experimental group than those in control group, so as. There was the expression of apoptosis regulatory protein CRT. The CRT protein expressed in endometrium in PCOS group and control group. The expression of CRT of endometrial in PCOS rats were significantly lower ($P<0.01$) than those in control group. **Conclusion:** The rat model induced by levonorgestrel with hCG was proved to be an ideal PCOS animal model. CRT may be closely correlated with the pathogenesis of PCOS.

Key words: PCOS; Endometrium; Animal model; Calreticulin

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R711.75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)11-2075-04

前言

多囊卵巢综合征(PCOS)是育龄女性最常见的内分泌紊乱性疾病,是引起不育的主要原因。PCOS 集合了一组多系统的慢性内分泌紊乱,如月经不规律、多毛、肥胖、高脂血症、高雄激素化的各种表现,囊状卵泡、胰岛素抵抗和不孕等^[3]。由于长时期的雌激素刺激,有可能发展为子宫内膜增生甚至导致子宫内膜癌^[4-6]。对于不孕不育的治疗,临床上促排卵药物及方法的运用

使得排卵率大大提高,然后妊娠率却不理想,其原因为患者子宫内膜存在缺陷,子宫内膜容受性下降,而胚泡成功的植入取决于胚泡的侵入能力和子宫内膜的容受性。Calreticulin(钙网质蛋白 CRT)是一可溶性的分子伴侣,是内质网与肌浆网中主要的钙结合蛋白,能调节细胞多种生理功能,如作为凝集素样分子伴侣,协助蛋白质正确折叠、维持细胞 Ca^{2+} 稳态、参与调节细胞凋亡、黏附、类固醇敏感性基因表达和自身免疫反应等^[7-9]。本研究通过复制 Bogovich K^[1]的避孕硅胶棒联合 hCG 诱

* 基金项目:内蒙古教育厅科研基金(NJZY08102)

作者简介:汪宇(1984-)男,硕士研究生,研究方向生殖医学,电话 15947413120, E-mail:852003091@qq.com

△通讯作者:王丽岩 教授 邮箱 wangliyan5598@163.com

(收稿日期 2010-12-18 接受日期 2011-01-16)

导 SD 大鼠多囊卵巢综合征的模型,观察了 PCOS 动物模型卵巢卵泡及子宫内膜的病理改变,同时应用免疫组化 SP 法检测了 CRT 在子宫内膜的表达,探讨 PCOS 动物模型中 CRT 在子宫内膜中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

21 日龄雌性 SD 大鼠 (北京维通利华公司), 60 只大鼠随机分入模型组和对照组, 每组 30 只。

1.2 试剂

左旋 18- 甲基炔诺酮硅胶棒, 上海达华制药厂, 上海市计划生育科学研究所, 每根含 75mg 左旋 18- 甲基炔诺酮; 人绒毛膜促性腺激素 (HCG), 苏州新宝制药厂, 鼠抗 Calreticulin 单克隆抗体和 SP 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。血清雌二醇 (estradiol, E2)、睾酮 (testosterone, T)、孕激素 (progesterone, P)、FSH、LH、胰岛素检测试剂盒 (天津九鼎医学生物有限公司)

1.3 造模

将两组大鼠于 21 日龄时断乳, 每日光照 12 h。适应性喂养 3 d 至 24 日龄, 模型组大鼠注射 0.24 mol/L 水合氯醛麻醉后皮下埋植左旋 18- 甲基炔诺酮硅胶棒(3mm), 27 日龄时开始每日 2 次皮下注射 hCG 1.5 IU, 共 9d 至 36 日龄; 对照组大鼠每日注射等量生理盐水。

1.4 标本采集

两组大鼠在给药的第 9 日于 20 时开始禁食。次晨称重后腹腔注入 0.24 mol/L 水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉后断头处死, 取腹主动脉血, 取血后用 PBS 冲洗卵巢至渗液清亮, 摘取双侧卵巢, 在解剖显微镜下去除卵巢表面的脂肪组织, 观察卵巢大体解剖情况并分别测量双侧卵巢的长、宽、高, 称双侧卵巢质量, 用 40g/L 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋。血液标本经 3000r/min 离心 3 min 后, 收集血清, -20℃ 保存, 血清 E2、T、P、FSH、

LH 及空腹胰岛素的检测采用放射免疫法, 空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 的检测采用己糖激酶法。

1.5 实验方法

取 SD 大鼠卵巢、子宫, 用 10% 的中性甲醛固定, 常规石蜡切片, 厚度为 4 μm, 其中一张切片作 HE 染色行组织病理学检查, 另一张切片作免疫组化, 按 SP 法试剂盒操作说明进行。加 0.3% 的过氧化氢阻断过氧化物酶后, 经微波抗原修复。DAB 显色, 苏木精复染, 脱水、透明、封片, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.6 形态学观察

卵巢组织石蜡切片常规脱蜡水合后苏木素复染 15 min; 10 mL/L 盐酸乙醇分化; 10 mL/L 伊红溶液染色 3 min; 脱水、透明、中性树胶封片。光镜下观察卵巢形态学变化。各种类型卵泡的镜下诊断参照 Stener- Victorin 等^[2]的标准。

1.7 子宫内膜中 CRT 的表达

HE 染色切片光镜下观察病理形态改变。应用免疫组织化学 SP 法进行组织染色, 按照试剂盒说明书步骤进行, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性表达为细胞胞质及细胞膜出现棕黄色染色颗粒, 观察棕黄色颗粒分布与染色深浅程度, 表明有 CRT 表达。每张切片随机取 5 个不同视野, 经图像分析系统分析标准灰度值。灰度值大蛋白表达少, 反之则表达多。

1.8 统计学分析

计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 按两独立样本 t 检验分析。计数资料按 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

模型组和对照组大鼠均发育良好, 体毛润泽, 行为、体征变化无明显差异, 反应灵活。两组大鼠的体质量无显著差异, 模型组大鼠的卵巢重量和体积均显著大于对照组 ($P<0.01$) (表 1)。

表 1 模型组和对照组一般情况的比较

Table 1 General condition differences between modeling and control group

Items	Weight (g)	Ovarian volume (mL)	Ovarian weight (mg)
PCOS group	101.78± 5.91	0.049± 0.01●	48.77± 12.82●
Control group	98.37± 7.64	0.03± 0.01	25.35± 8.91

● $P<0.01$ compared with control

2.2 卵巢、子宫形态学观察

PCOS 组大鼠的卵巢体积 (48.7647 ± 12.81696) mm³, 显著高于对照组 [(25.3527 ± 8.91358 cm³, $P<0.01$)]。模型组大鼠的卵巢质量 (101.7833 ± 5.91270) mg 亦显著高于对照组 [(98.3667 ± 7.63605) mg, $P<0.01$]。PCOS 组大鼠卵巢表面略显苍白, 肉眼可见包膜下多个扩张的卵泡, 而对照组卵巢表面呈粉红色。光镜下对照组可见各级卵泡和黄体发育, 颗粒细胞形态完整, 排列整齐, 多为 7~9 层, 胞质丰富、染色质致密, 间质细胞 1~2 层, 呈梭形排列。PCOS 组卵泡呈囊性扩张, 颗粒细胞层减少 (1~4 层) 甚至消失, 颗粒细胞排列疏松, 间质细胞增生。子宫内膜上皮多呈乳头状增生, 内膜明显增厚, 排列紊乱 (图 1、2)。

2.3 血清性激素水平及胰岛素抵抗的评估

PCOS 组大鼠血清 P、T 水平显著高于对照组 ($P<0.05$); FSH 水平显著低于对照组 ($P<0.01$); 两组大鼠血清 LH 水平无显著性差异; PCOS 组 LH/FSH 比值显著高于对照组 ($P<0.01$), PCOS 组大鼠血清 FINS、FBG 值均显著高于对照组 ($P<0.05$, 表 2)。

2.3 CRT 在子宫内膜中的表达

CRT 蛋白在 PCOS 组与对照组的子宫内膜中均有表达, CRT 蛋白棕黄色颗粒主要定位于腺上皮以及腔上皮的胞浆中, 间质中表达较弱。PCOS 组子宫内膜上皮 CRT 蛋白表达明显低于对照组, 两组间有显著性差异 ($P<0.05$), (见表 3) (图 3、图 4)。

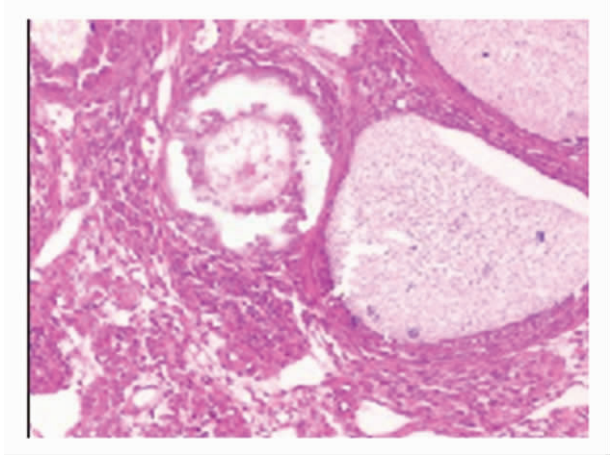


图1 模型组卵巢 HE 染色
Fig.1 Ovary HE staining of PCOS group

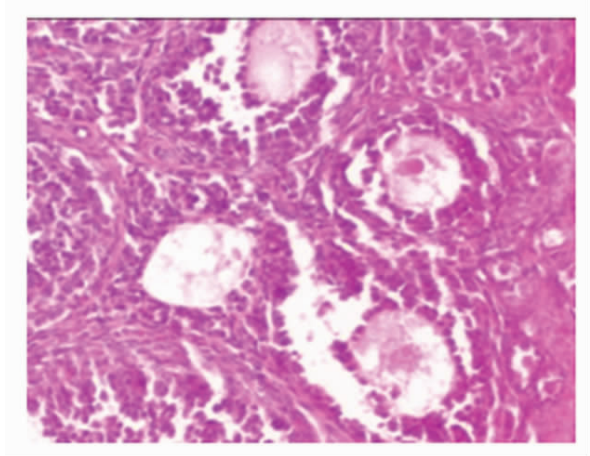


图2 对照组卵巢 HE 染色
Fig.2 Ovary HE staining of control group

表 2 模型组和对照组血清性激素水平及胰岛素抵抗的比较

Table 2 Comparison of the levels of sex hormones and insulin resistance index between modeling and control group($\bar{x} \pm s$, n = 30)

Items	E2 (pmol/L)	P (nmol/L)	T (nmol/L)	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	LH/FSH	FINS (mIU/L)	FBG (mmol/L)
PCOS group	113.91± 28.59	19.85± 18.32●	0.35± 0.14●	1.09± 0.57●●	1.57± 0.62	1.46± 0.73●●	16.92± 2.79●●	4.42± 0.24●●
Control group	102.10± 34.25	9.62± 3.82	0.29± 0.039	2.01± 0.37	1.32± 0.43	0.96± 0.69	12.13± 3.13	3.96± 0.19

● P < 0.05 compared with control ●● P < 0.01 compared with control

表 3 PCOS 组与对照组的子宫内膜上皮 CRT 表达比较

Tab.3 The comparison of CRT expression in endometrial epithelium between PCOS group and control group ($\bar{x} \pm s$)

Items	n	Gray value of CRT expression
PCOS group	30	58.36± 2.69●●
Control group	30	52.32± 1.81

●● P < 0.01 compared with control

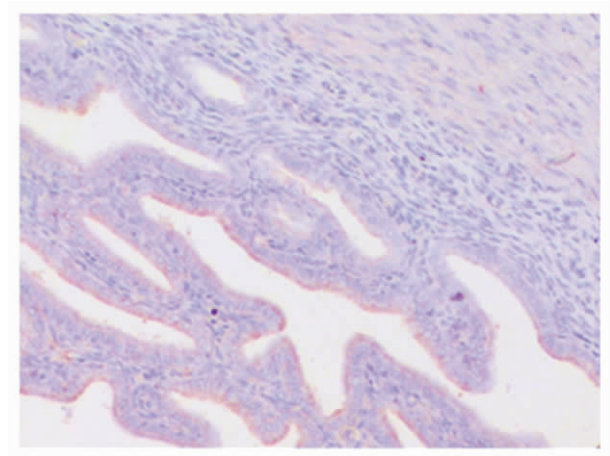


图3 CRT 在模型组子宫内膜上皮的表达
Fig 3 CRT expressed in endometrium in PCOS group

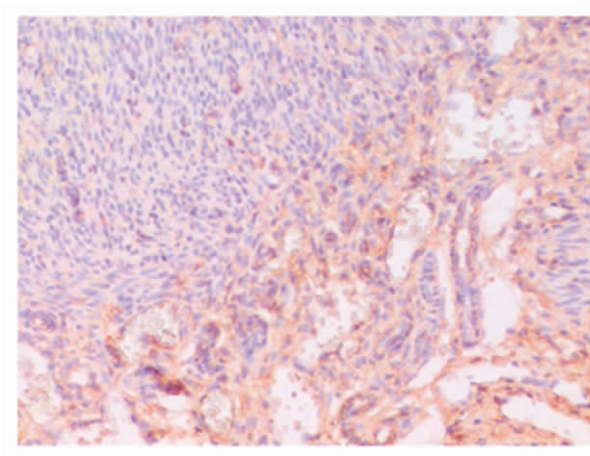


图4 CRT 在对照组子宫内膜上皮的表达
Fig 4 CRT expressed in endometrium in control group

3 讨论

PCOS 是一种以慢性无排卵或稀发排卵、肥胖、高雄血症、高胰岛素血症为主的多系统内分泌异常性疾病^[3]。由于缺乏孕激素对抗的雌激素长期刺激以及多种因素共同作用,可导致患

者子宫内膜增生甚至癌变^[4-6]。CRT 是普遍存在于哺乳动物细胞内质网和肌浆网中的 Ca²⁺ 储存蛋白,能调节细胞多种生理功能,如维持细胞 Ca²⁺ 稳态、协助蛋白质正确折叠、调节细胞凋亡、黏附、基因表达、应激、心血管炎症反应和自身免疫反应等,并且与很多疾病的发生、发展和预后相关的多功能蛋白^[7-9]。机体

对于凋亡细胞的发现和清除可能通过两种途径,一是通过专职吞噬细胞清除,另一种途径则是凋亡细胞胞内因子移动至细胞膜外聚集,启动机体免疫应答。Apetoh L 等研究发现,CRT 具有可作为识别配体促进凋亡细胞被识别并清除,增强 MHC2I 类分子的表达和稳定性;参与肿瘤抗原提呈^[10,11],活化特异性细胞免疫等功能。而细胞凋亡时 CRT 可从细胞内移向细胞膜外并聚集成簇,形成“被吞噬”的信号,可能是细胞凋亡最早出现的特征,该信号可被吞噬细胞识别,从而启动吞噬、清除凋亡细胞的过程^[12,13]。本实验采用免疫组化方法研究了 CRT 在多囊卵巢综合征大鼠和对照组大鼠子宫内膜的表达情况,其主要定位于腺上皮以及腔上皮的胞浆中,证实了 CRT 在 PCOS 组的表达显著低于对照组。在 PCOS 的病理状态下,由于内分泌紊乱雌激素长期刺激导致子宫内膜增生,而 CRT 表达的减少又限制了细胞凋亡,进而加重了子宫内膜细胞的增生。分析其机制,CRT 表达的减少限制了 PCOS 组子宫内膜细胞的凋亡,提示 CRT 可调节细胞的凋亡,可能在 PCOS 动物模型组子宫内膜增生的病理改变中起一定的作用。

PCOS 在育龄期女性中患病率为 5%-10%,无排卵性不孕者中 75%与此相关,而且 PCOS 患者妊娠后的早期流产率高达 30%~50%,且妊娠失败率大于 50%^[14]。胚泡的着床是一种极为复杂的生理过程,其涉及到子宫内膜容受性、胚泡的发育分化以及多种细胞因子、黏附分子的表达等^[15]。Coppolino MG 等研究发现 CRT 可与整合素 $\alpha 2$ 亚单位结合,介导细胞信号转导、细胞黏附、迁移扩散等功能^[16]。整合素是一种激活因子,其表达可使子宫内膜激活,由非黏附状态转变为黏附状态,是子宫内膜容受性的标志之一^[17]。CRT 的表达下调可以降低整合素的黏附特性,影响胚胎的着床。董艳玲等研究发现 CRT mRNA 在妊娠小鼠子宫内膜中的表达明显高于未孕小鼠,且随着妊娠天数的增加呈逐渐增强的趋势。并在妊娠第 4、5 天基质细胞的胞浆中呈现高峰^[17]。提示 CRT 在妊娠早期子宫内膜的持续表达,可能通过调节整合素介导的细胞信号通路而调节胚胎滋养层细胞的黏附、侵袭,参与胚胎着床。本研究提示 PCOS 组 CRT 的低表达可能通过影响整合素的黏附特性而降低了细胞与细胞、细胞基质间的黏附,从而导致胚泡着床的失败。

多囊卵巢综合征子宫内膜存在缺陷的研究众多,其可能与多种因子的表达异常有关。本实验提供了 CRT 在 PCOS 大鼠模型组及对照组的表达情况,并分析认为 CRT 可能通过与多种基因及因子的相互作用,共同发挥其生物学功能。探讨 CRT 参与 PCOS 子宫内膜病变与胚泡着床的意义及可能的机制,为进一步研究提供了依据。

参考文献(References)

- [1] Bogovich K. Induction of Ovarian Cysts in Progesterone- Synchronized Immature Rats: Evidence that suppression of Follicular aromatase activity Is not a prerequisite for the induction of cystic follicles [J]. Endocrinology, 1989,124 (4) :1646-1653
- [2] Stener V E, Ploj K, Larsson BM, et al. Rats with steroid-induced poly-

- cystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity[J]. Rep rod Biol Endocrinol, 2005, 3(1) : 44-53
- [3] Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrom [J]. N Engl J Med, 2005,352 (12):1223-1236
- [4] Hardiman P, Pillay OC, Atiomo W. Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma[J]. Lancet, 2003, 361(9371) :1810-1812
- [5] Soliman PT. Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer[J]. Obstet Gynecol, 2005, 105 (3) :575-580
- [6] Yamazawa K, Hirai M, Fujito A, et al. Fertility-preserving treatment with progestin, and pathological criteria to predict responses, in young women with endometrial cancer [J]. Hum Reprod, 2007, 22 (7): 1953-1958
- [7] Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, et al. Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria[J]. J Biol Chem, 2002, 277(48):46696-46705
- [8] Mesaeli N, Phillipson C. Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin-deficient cells [J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(4): 1862-1870
- [9] Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, et al. Calreticulin is essential for cardiac development[J]. J Cell Biol, 1999, 144(5):857-868
- [10] Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, et al. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine [J]. Trends MolMed, 2008, 14 (4): 141-151
- [11] Bak SP, Amiel E, Walters JJ, et al. Calreticulin requires an ancillary adjuvant for the induction of efficient cytotoxic T cell responses [J]. Mol Immunol, 2008, 45 (5) : 1414-1423
- [12] Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, et al. The cotranslocation of ERp 57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death [J]. Cell Death Differ, 2008, 15 (9) : 1499-1509
- [13] Gardai SJ, Mc Phillips KA, Frasch SC. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte [J]. Cell, 2005, 123 (2) : 321-334
- [14] Arredondo F, Noble LS. Endocrinology of recurrent pregnancy loss [J]. Semin Reprod Med, 2006, 24:33-39
- [15] Paria BC, Reese J, Das SK, et al. Deciphering the cross-talk of implantation advances and challenges [J]. Science, 2002, 296 (5576): 2185-2188
- [16] Coppolino MG, Woodside MJ, Demareux N, et al. Calreticulin is essential for integrin mediated calcium signalling and cell adhesion[J]. Nature, 1997, 386:843-847
- [17] Creus M,Ordi J, Fabregues F, et al.The effect of different hormone therapies on integrin expression and pinopode formation in the human endometrium: a controlled study [J]. Hum Reprod, 2003, 18 (4): 683-693
- [18] 董艳玲,何俊琳,刘学庆,等. 早孕小鼠子宫内膜钙网蛋白的表达规律[J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30: 372-376

Dong Yan-ling, He Jun-lin, Liu Xue-qing, et al. The expression rule and significance of Calreticulin of early pregnancy [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2008, 30: 372-376