

生长激素受体在宫腔粘连患者子宫内膜组织中的表达及意义

任 娟, 卫 兵, 宋恩学, 王文艳, 张丽丽

摘要 目的 探讨生长激素受体(GHR)在宫腔粘连(IUA)患者子宫内膜组织中的表达及意义。方法 通过免疫组化MaxVision两步法和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法分别检测IUA患者(研究组)和非IUA患者(对照组)子宫内膜组织中GHR蛋白和GHR mRNA的表达情况。结果 研究组GHR蛋白表达、GHR mRNA和对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。子宫内膜腺体与子宫内膜间质中GHR蛋白表达比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 IUA患者子宫内膜组织中GHR的表达低于非IUA患者,而且这种表达在子宫内膜腺体中较多,在子宫内膜间质中较少,为IUA患者在宫腔粘连分离术后使用生长激素提供一定的理论参考。

关键词 宫腔粘连; 生长激素; 生长激素受体

中图分类号 R 711.74

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)07-1004-04

宫腔粘连(intrauterine adhesions, IUA)临床主要表现为月经量减少甚至闭经、周期性下腹痛、不孕、反复流产、产后胎盘粘连甚至植入等^[1]。近年来IUA患病率逐年增加, IUA已严重影响着现代女性的生活质量和生育要求。IUA的治疗主要包括经宫腔镜下宫腔粘连分离术^[2](transcervical resection of adhesions, TCRA)和术后应用雌孕激素促子宫内膜生长。研究^[3-4]报道,生长激素(growth hormone, GH)在体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)中对反应不良性子宫内膜和子宫内膜反应不良性闭经中都有促进子宫内膜发育的作用,这些研究均提示GH可能促进子宫内膜的生长。部分研究者在此基础上试图加用GH来提高IUA治疗的效果^[5],但目前关于GH研究主要偏于临床,尚缺乏基础研究的证据。该研究通过免疫组化MaxVision两步法和实时荧光定量PCR(quantita-

tive real time-PCR, qRT-PCR)法,研究生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)在IUA和非IUA患者子宫内膜组织中的表达情况,为IUA患者TCRA术后使用GH提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选取2013年11月~2014年5月在安徽医科大学第二附属医院行宫腔镜检查并确诊为IUA患者28例作为研究组,年龄20~35(29.62 ± 2.52)岁。同期因其他原因(子宫纵隔、不孕或节育器嵌顿)行宫腔镜检查确诊为非IUA患者22例作为对照组,年龄20~40(28.80 ± 3.34)岁,并且这些非IUA患者既往都有过宫腔操作史。

1.1.2 主要手术设备 宫腔镜及冷光源、腹腔镜、异物钳(德国STORZ公司);监视器(日本SONY公司);液体膨宫泵(德国Aesculap公司);荧光定量PCR仪(美国Thermo公司);微孔板迷你离心机(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.1.3 主要试剂 免疫组化一抗:兔抗人GHR单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);二抗:即用型快捷免疫组化MaxVisionTM试剂盒(鼠/兔)(福州迈新生物技术开发有限公司);TRIzol试剂和引物(美国Invitrogen公司);逆转录试剂盒(美国Thermo公司);QuantiFast SyBr Green PCR kit(德国Qiagen公司);核酸染料(上海赛百盛公司)。

1.1.4 术前准备 患者空腹状态于上午9时前抽取静脉血检查GH,均未见异常,闭经者手术时间不受限制,月经减少者在卵泡期手术。

1.1.5 标本采集 两组患者均行宫腔镜检查,在检查中或TCRA操作过程中,视需要在正常子宫内膜组织中,用异物钳钳取适量(质量约20 mg)的内膜组织作为标本。

1.2 检测方法

1.2.1 免疫组化MaxVision两步法 ①取存档蜡块,连续切片4 μm ,贴片,65 $^{\circ}\text{C}$ 温箱烤片2 h,二甲苯脱蜡;②柠檬酸盐缓冲液高压抗原修复,PBS冲洗3次,每次3 min;③免疫组化染色按MaxVision

2015-03-20 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81100412)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院妇产科,合肥 230601

作者简介:任 娟,女,硕士研究生;

卫 兵,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

weibing1965@hotmail.com

两步法常规流程进行切片中滴加一抗(兔抗人 GHR 单克隆抗体以 1:400 稀释)4℃过夜,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,去除一抗后滴加二抗,试剂盒 37℃温箱中孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次,每次 3 min;④滴加新鲜配制的 DAB 显色;⑤清水冲洗,苏木精浅染,清水冲洗还蓝,梯度乙醇溶液脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,其余操作流程完全相同。

1.2.2 免疫组化结果判断及半定量分析 将制好的切片置显微镜下观察,每个样本随机选取 5 个不重叠 400 倍视野进行测量,阳性信号为棕黄色或棕褐色,根据阳性信号的强弱将结果分为弱、中、强三级,并分别给予 1~3 分:1 分:无信号或信号很弱;2 分:信号中等呈淡黄色或棕黄色;3 分:信号很强呈棕褐色。根据阳性细胞百分率分别给予 1~3 分:1 分:阳性率≤20%;2 分:阳性率 21%~70%;3 分:阳性率 71%~100%。上述两项评分相加作为每例的总积分。结果判定:总积分 1~2 分为阴性(-),3~4 分为阳性(+),5~6 分为强阳性(++)。

1.2.3 qRT-PCR 法 ①从子宫内膜组织中提取 RNA:取子宫内膜组织约 20 mg 经液氮研磨后加入 1 ml TRIzol 裂解;加入 0.2 ml 氯仿,剧烈震荡;4℃12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,加入等体积异丙醇沉降;4℃、12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,加入 1 ml 75% 乙醇溶液;4℃、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,干燥 RNA 沉淀;加入 20~50 μl DEPC 水,55℃促溶 10 min,-80℃保存备用;②RNA 的浓度及纯度的测定:分别测定光密度(optical density,OD)值 OD₂₆₀和 OD₂₈₀以计算 RNA 样品的浓度和纯度;③样品 cDNA 合成:在 0.2 ml 无 RNase PCR 管中,加入总 RNA(质量为 2 μg)、10 μmol/L Oligo 1 μl、DEPC 水补足至 12 μl,轻轻混匀、点动离心;PCR 仪上 65℃加热 5 min,立即冰浴 3 min;在 0.2 ml 无 RNase PCR 管中加入 5×Reaction Buffer 4.0 μl、10 mmol/L dNTP Mix 2 μl、Ribolock™ Rnase inhibitor 1 μl、RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptionase 1 μl;PCR 仪上 42℃加热 60 min,70℃持续 5 min,取出上述反应液,即为 cDNA,-80℃保存备用;④荧光定量 PCR 反应(SYBR GREEN 方法):取出上述反应液 1 μl 作为荧光定量的模板,反应体系如下:2×SYBR Green mixture 5 μl、上游引物(10

μmol/L)和下游引物(10 μmol/L)各 1 μl、cDNA 1 μl、无 RNA 酶水 2 μl,总共 10 μl。反应条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 10 s,60℃退火、延伸 30 s,共 40 个循环。本实验所用人类基因扩增引物序列见表 1。

表 1 本实验所用人类基因扩增引物

基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
β-actin	F: GGGAAATCGTGCCTGACATTAAGG	185
	R: CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG	
GHR	F: CTTTATGCCCGAGGTGAGCGAC	119
	R: GGCAGAGTGAGACCATTTCCG	

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。qRT-PCR 分析所采用的指标为: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。计量资料采用两独立样本 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 子宫内膜腺体与子宫内膜间质中 GHR 蛋白表达水平比较 免疫组化法检测结果显示:子宫内膜腺体中阳性细胞 30 例,阴性 20 例,阳性细胞率为 60%;子宫内膜间质中阳性细胞 18 例,阴性 32 例,阳性细胞率为 36%;两部位 GHR 蛋白比较差异有统计学意义($\chi^2 = 5.769, P = 0.016$)。图 1A:PBS 阴性对照,子宫内膜腺细胞和间质细胞均呈阴性表现;图 1B:研究组 GHR 蛋白阳性染色主要定位于子宫内膜腺细胞的细胞质中,呈淡黄色(+),而子宫内膜间质细胞(-);图 1C:对照组 GHR 蛋白阳性染色定位于子宫内膜腺细胞和间质细胞的细胞膜和细胞质中(主要定位在细胞质)均呈棕褐色(++);图 1B 和图 1C 中 GHR 蛋白阳性染色都呈弥漫性分布,如风尘状。

2.2 研究组和对照组子宫内膜组织中 GHR 蛋白表达水平比较 免疫组化法检测结果显示研究组 GHR 蛋白表达水平低于对照组(1.70 ± 0.57 vs 2.77 ± 0.75),两组比较差异有统计学意义($t = 3.373, P < 0.05$)。

2.3 研究组和对照组子宫内膜组织中 GHR mRNA 表达水平比较 qRT-PCR 法检测结果显示研究组(16 例)的 GHR mRNA 表达水平低于对照组(14 例)(0.64 ± 0.21 vs 1.00 ± 0.33),两组比较差异有统计学意义($t = 2.329, P < 0.05$)。β-actin、GHR 熔

解曲线均呈单一峰,并且解链温度在 80 ℃ 左右,说明产物单一,引物特异性较好,得出的数据可信。见图 2。

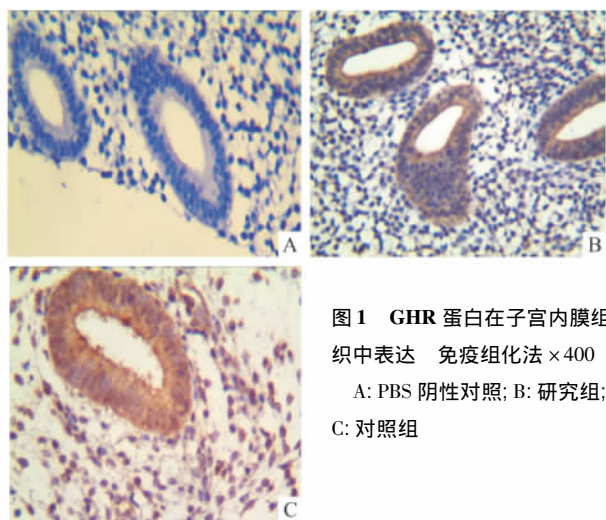


图1 GHR 蛋白在子宫内膜组织中表达 免疫组化法 ×400
A: PBS 阴性对照; B: 研究组;
C: 对照组

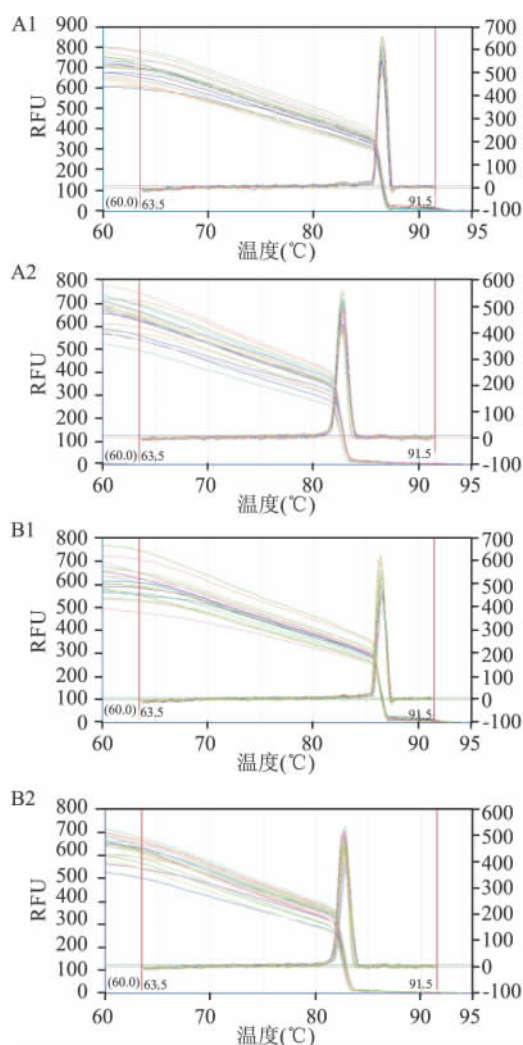


图2 qRT-PCR 熔解曲线

A: 研究组; B: 对照组; 1: β -actin; 2: GHR

3 讨论

成熟的人 GHR 分子是一个含 620 个氨基酸的单链糖蛋白,其中 N 端 246 个氨基酸含 5 个潜在的糖基化位点,位于细胞外,构成激素结合结构域,C 端 350 个氨基酸位于胞内,构成信号转导结构域^[6]。GH 是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链的蛋白质激素,是一种具有广泛生理功能的生长调节激素,在女性人体发育时和雌激素一起促进子宫内膜的生长发育。GH 发挥功能主要经由两个途径:一是诱导肝细胞、肌细胞产生生长介素(somatomedin, SM),再经由 SM 间接起作用;二是直接作用于靶细胞产生生理效应^[7]。无论哪一种方式 GH 都需要首先同细胞表面特异性受体结合,即在生理激素浓度下,1 分子 GH 与 2 分子 GHR 相结合从而导致受体二聚化^[8],再由 GHR 介导将信号传入细胞内促进细胞的有丝分裂,加速细胞的增殖,使内膜组织增生^[9-10]。

正常情况下子宫内膜在雌孕激素作用下有很强的再生能力,只要内膜基底层不受损伤,或者受损的基底层没有完全形成粗糙面,受损部位的内膜能够很快再生而修复。IUA 患者的子宫内膜基底层严重受损,无法再生修复,宫腔部分或全部闭塞,约 90% 由过度刮宫引起。通过查阅以往的研究^[5],GH 研究主要偏于临床,尚缺乏基础研究的证据。本实验同样是在有过宫腔操作史造成子宫内膜受损和血液中 GH 水平无差异的条件下,研究组 GHR 表达水平明显低于对照组,并且这种表达在子宫内膜腺体中的表达较多,而在子宫内膜间质中的表达较少。这表明 GH 有可能是通过促进子宫内膜腺体的增生和发育以增强子宫内膜的厚度和容受性,从而为 IUA 患者 TCRA 术后加用 GH 提供了理论依据,也为临床应用 GH 治疗 IVF-ET 中对反应不良性子宫内膜和子宫内膜反应不良性闭经提供了实验证据。但是如果子宫内膜腺体中 GHR 不足、缺乏或变异,单方面提高 GH 水平并不能提高子宫内膜的厚度及容受性,相反超生理剂量的 GH 对 GHR 有反向调节作用^[11],过量的 GH 将会阻止了受体二聚化和信息传递甚至可能会增加患子宫内膜癌的风险^[12]。

综上所述,研究组 GHR 表达水平低于对照组,可能是由于研究组患者子宫内膜组织中的 GHR 水平较低从而使受损的子宫内膜难以修复或异常修

复; 并且 GHR 蛋白的阳性表达在子宫内膜腺体中较多, 而在子宫内膜间质中表达较少, 这表明 GH 主要是通过与其子宫腺体中的 GHR 结合以促进腺体的增生和发育, 达到促进子宫内膜增生和发育的作用。因此临床使用 GH 治疗 IUA 时, 要充分考虑到 GHR 的数量, 可以探索使用其激素受体激动剂提高受体的数量, 来调整药物在 IUA 治疗过程中使用的剂量, 制定符合患者病情的个体化综合治疗方案, 本实验因收集样本时间较短, 样本数量较少, 今后需扩大更多的样本量作进一步研究。

参考文献

- [1] Kaneko Y, Lecce L, Day M L et al. Focal adhesion kinase localizes to sites of cell-to-cell contact *in vivo* and increases apically in rat uterine luminal epithelium and the blastocyst at the time of implantation [J]. *J Morphol* 2012, 273(6) : 639 – 50.
- [2] 颜景杏, 洪顺家. 宫腔粘连诊疗的研究进展 [J]. *现代妇产科进展* 2011, 20(11) : 910 – 2.
- [3] 唐奕, 张红, 卢光琇, 等. 生长激素在卵巢低反应患者中的应用研究 [J]. *中国现代医学杂志* 2013, 23(15) : 52 – 3.
- [4] 朱铭伟. 生长激素治疗难治性子宫内膜反应不良性闭经 3 例 [J]. *实用妇产科杂志* 2008, 24(7) : 415 – 6.
- [5] 胡银逢, 卫兵, 宋恩学. 生长激素预防宫腔粘连分离术后再次粘连的作用 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(11) : 1405 – 6.
- [6] Duong B H, Ota T, Ait-Azzouzene D et al. Peripheral B cell tolerance and function in transgenic mice expressing an IgD superantigen [J]. *J Immunol* 2010, 184(8) : 4143 – 58.
- [7] 燕方龙, 李洪森, 王金龙, 等. 重组人生长激素稳定性研究进展 [J]. *上海医药* 2010, 31(9) : 414 – 6.
- [8] 李苏宜. 重组人生长激素干预 GHR 不同表达水平人肝癌细胞的实验研究 [D]. 郑州大学 2010.
- [9] Carrasco de la Fuente M, González-Albarrán O, Pérez López G et al. Diabetic ketoacidosis as the first manifestation of a mixed growth hormone and prolactin-secreting tumor [J]. *Endocrinol Nutr*, 2011, 57(10) : 507 – 9.
- [10] Maffei L, Rochira V, Zirilli L et al. A novel compound heterozygous mutation of the aromatase gene in an adult man: reinforced evidence on the relationship between congenital oestrogen deficiency, adiposity and the metabolic syndrome [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2007, 67(2) : 218 – 24.
- [11] Fang P, Girgis R, Little B M et al. Growth hormone (GH) insensitivity and insulin-like growth factor-I deficiency in Inuit subjects and an Ecuadorian cohort: functional studies of two exon180 GH receptor gene mutations [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93(3) : 1030 – 7.
- [12] 吴芳, 李慕军. 生长激素与子宫内膜发育关系的研究进展 [J]. *医学综述* 2011, 17(10) : 1453 – 5.

Expression and significance of growth hormone receptor in the endometrial tissue of intrauterine adhesion patients

Ren Juan, Wei Bing, Song Enxue, et al

(Dept of Gynecology and Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the growth hormone receptor (GHR) expression and significance of endometrial tissue in patients with intrauterine adhesions. **Methods** Immunohistochemistry MaxVision twostep and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) were used to detect the expression of GHR protein and GHR mRNA IUA in patients endometrial tissue of IUA group (study group) and non IUA group (control group). **Results** Using immunohistochemistry assay to detect GHR protein expression and qRT-PCR to detect the GHR mRNA expression, and the differences between the study group and the control group were statistically significant ($P < 0.05$). Immunohistochemistry was used to detect the expression of GHR protein in endometrial glands and endometrial stroma, the difference between the two parts were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of GHR in endometrial tissue in patients with IUA is lower than those of non-IUA, and this expression is more in endometrial glands, less in endometrial stroma, which provide a theoretical reference for the use of hormone in IUA patients after transcervical resection of adhesions (TCRA).

Key words intrauterine adhesions; growth hormone; growth hormone receptor