

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2008)03-0270-03

多囊卵巢综合征促排卵治疗后子宫内膜 HOXA10 的表达

王 玮¹, 李晓冬², 郝桂敏¹, 徐素欣¹ (河北医科大学第二医院:¹生殖科,²妇产科,河北石家庄 050000)

Expression of HOXA10 in endometrium of polycystic ovary syndrome after ovulation induction

WANG Wei¹, LI Xiao-Dong², HAO Gui-Min¹, XU Su-Xin¹¹Department of Reproduction, ²Department of Obstetrics and Gynecology, Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

【Abstract】 AIM: To explore the features of homeobox gene A10 (HOXA10) expression in endometrium of polycystic ovary syndrome (PCOS) after ovulation induction. **METHODS:** Twenty PCOS patients were induced to ovulate for two or three cycles by gradually increasing dose of menotrophin. There were 15 women with regular menstruation in control group. The endometria of the controls and the PCOS patients who were not pregnant after successful ovulation induction ($n=12$) were biopsied within 24 h after menstrual onset. The histological characteristics of endometria were observed by HE staining in experimental group and control group. The expressions of HOXA10 protein and gene in endometria of experimental group and control group were detected by immunohistochemistry and reverse transcription-polymerase chain reaction technology (RT-PCR) respectively. **RESULTS:** Immunohistochemistry assay showed that the expression of HOXA10 protein would be seen in glandular epithelia of endometrium and interstitial cells of experimental group and control group. HOXA10 was located in cytoplasm. Expression intensity of HOXA10 protein in experimental group was weaker than that in control group ($P < 0.05$). RT-PCR showed that the ratio of HOXA10 mRNA to β -actin in experimental group was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** The expressions of HOXA10 mRNA and protein in the endometria of PCOS patients treated by ovulation induction are lower compared with those of control group, which might be correlated with endometrial dysfunction.

【Keywords】 homeobox gene; PCOS; endometrium

【摘要】目的:探讨多囊卵巢综合征(PCOS)患者经促排卵治疗后子宫内膜同源框基因 A10(HOXA10)蛋白和基因水平表达的特点。方法:PCOS 患者 20 例,月经周期规则的 15 例患者为对照组。PCOS 患者用尿促性素小剂量递增法促排卵 2~3 周期,选取促排卵治疗成功而并未妊娠的 PCOS 患者 12 例,对照组 15 例,于月经来潮 24 h 内诊刮子宫内膜,行 HE 染色观察子宫内膜形态学特点和免疫组织化学测定 HOXA10 蛋白的表达,并用 RT-PCR 方法检测子宫内膜 HOXA10 mRNA 的表达。结果:免疫组织化学检测结果表明 PCOS 组和对照组子宫内膜标本均可见 HOXA10 蛋白的表达,主要表达在腺上皮和间质细胞胞质内,而 PCOS 组子宫内膜 HOXA10 蛋白的表达弱于对照组。RT-PCR 检测显示 PCOS 组子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达强度低于对照组。结论:PCOS 患者促排卵后子宫内膜 HOXA10 的低表达现象,可能与子宫内膜的功能受损有关。

【关键词】 同源框基因;多囊卵巢综合征;子宫内膜**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A

0 引言

同源框基因 A10(HOXA10)^[1]是细胞发育的重要转录因子和控制胚胎发育的主控基因。成年期子宫内膜经历着活跃的周期性变化,这种周期性的组织破坏、再构建和重组的过程与胚胎发育过程的调控有某些相似之处,生育期的子宫内膜表达 HOXA10 基因^[2]。HOXA10 基因不仅调节子宫内膜细胞的增生与分化,同时还能影响相邻细胞间及远距离的信息传递,在正常月经周期和妊娠过程中诱导子宫内膜的正常分化和发育^[3]。多囊卵巢综合征(PCOS)是最常见的妇科内分泌疾病,约占无排卵性不孕症的 75%^[4],诱发排卵治疗是主要的治疗手段。近 80% PCOS 患者可获得排卵,但妊娠率仅 35%~40%^[5]。我们观察 PCOS 患者经促排卵治疗后子宫内膜 HOXA10 基因的表达,以探讨 PCOS 患者子宫内膜容受缺陷与该基因的关系。

1 对象和方法

1.1 对象 2005-06/2006-10 因不孕而就诊于河北医科大学第二医院生殖医学科的 PCOS 患者 20 例为 PCOS 组,年龄[31.6 ± 3.0(23~37)]岁。以同期月经周期规则、因输卵管因素或其他因素就诊的 15 例

收稿日期 2007-09-03; 接受日期 2007-10-08

基金项目 河北省科学技术研究发展指导计划项目(052761614)

通讯作者 郝桂敏. Tel (0311)66002721 Email haoguimin@163.com

作者简介:王 玮,博士,主治医师. Tel (0311)66002721 Email:

wjianjiao@163.com

患者为对照组,年龄[30.6±3.3(25~38)]岁。对PCOS患者用尿促性素小剂量递增法促排卵2~3周期。所有促排卵的PCOS患者及对照组均经B超监测,待卵泡成熟后,指导性交或行人工授精。PCOS的诊断标准按照2003年鹿特丹修正的诊断标准^[6]以下3项中符合2项:排卵稀发或无排卵,高雄激素血症的临床和/或生化体征;多卵巢巢。排除其他病因(先天性肾上腺皮质增生、分泌雄激素的肿瘤和库欣综合征)。标本来源:选取PCOS促排卵治疗成功而并未妊娠的患者12例,对照组15例,均征得患者同意,于月经来潮24h内行诊断性刮宫。刮取的子宫内膜组织用100 mL/L多聚甲醛固定,行HE染色和免疫组织化学测定,其中未妊娠的PCOS患者和对照组均选取8例分泌期的子宫内膜标本立即放入液氮中用于mRNA的提取。主要试剂:HOXA10羊抗多克隆抗体浓缩液(sc-7938)效价1:50(SANTA CRUZ公司);Elivision™ Plus免疫组化试剂盒、DAB显色剂(福州迈新生物技术开发有限公司); β -actin抗体(Santa Cruz公司);HOXA10引物由北京赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 光镜观察 取各组子宫内膜标本,常规制备4 μ m连续石蜡切片8张,HE染色后于光镜下进行观察。

1.2.2 免疫组织化学染色检测 取子宫内膜切片行常规脱蜡至水,3 mL/L双氧水孵育15 min,PBS冲洗,滴加一抗4℃过夜。用PBS代替一抗作为阴性对照,PBS冲洗,滴加Post-blocking聚合物增强剂(试剂A),室温孵育30 min。PBS冲洗,滴加poly-HRP-anti mouse IgG酶标抗鼠聚合物(试剂B),室温孵育30 min。PBS冲洗,DAB显色剂显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,中性树脂封片,光学显微镜下观察照相。HOXA10免疫组化染色以细胞质黄色为阳性信号。所有图像信息采用捷达801图像分析系统,对所有切片中阳性区域的单位光密度值(Density)进行定量测定和分析。由2名有经验的病理科医师采用双盲法评估分。对少数不易判断的切片重新共同阅片而定。

1.2.3 RT-PCR方法测定 Trizol法提取子宫内膜组织中总RNA。逆转录反应体系15 μ L,包括细胞组织总RNA 4 μ L,0.5 g/L随机引物1 μ L, 5×10^7 u/L RNasin 0.5 μ L, $5 \times$ M-MLV逆转录反应缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl,pH 8.3,250 mmol/L KCl,50 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L DTT,2.5 mmol/L Spermidin) 3 μ L,10 mmol/L dNTP 1.5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 0.5 μ L,1 mL/L DEPC水3.5 μ L(2×10^8 u/L) M-MLV逆转录酶1 μ L。37℃ 60 min,95℃ 5 min灭活M-

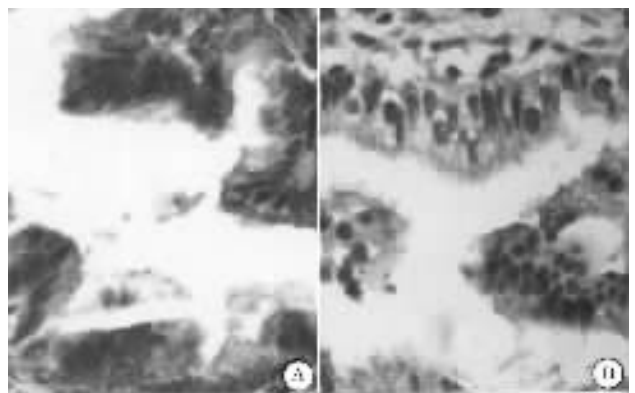
MLV逆转录酶,立即置冰浴中1~2 min,5000 r/min离心1 min后,置-30℃保存。从NCBI-Nucleotide数据库中查找目的基因原始cDNA序列,采用primer 5.0软件设计扩增引物,由北京赛百盛公司合成。HOXA10:上游引物5'-CCTTTGTTCCGTTCTGATA-3',下游引物5'-CTTCTCCGACCACTCTTT-3',扩增产物261 bp; β -actin:上游引物5'-CCAACTGGGACGACAT-3',下游引物:5'-TCTGGGTCATCTTCTCG-3',扩增产物135 bp。扩增反应条件均先采用94℃预变性5 min,HOXA10 94℃变性40 s,55.5℃退火40 s,72℃延伸40 s,40个循环。72℃再延伸10 min,在PCR仪上扩增,PCR产物4℃保存。取25 μ L扩增产物,在15 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳(120 V,40 min),0.05 mL/L Goldview染色,读胶仪读取扩增条带的光密度值并进行分析、照相。以HOXA10与 β -actin的光密度值的比值表示HOXA10 mRNA的相对表达水平。

统计学处理:所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SAS 6.12统计软件进行数据统计分析。

2 结果

2.1 PCOS患者促排卵治疗后子宫内膜组织学特征

PCOS组应用促排卵药物共46周期,其中36周期有排卵,妊娠8例,排卵率78%(36/46),妊娠率40%(8/20)。PCOS组共获得子宫内膜标本12例,其中分泌期子宫内膜9例,分泌不良的子宫内膜3例。对照组共获得子宫内膜标本15例,其中分泌期子宫内膜14例,分泌不良的子宫内膜1例(图1)。



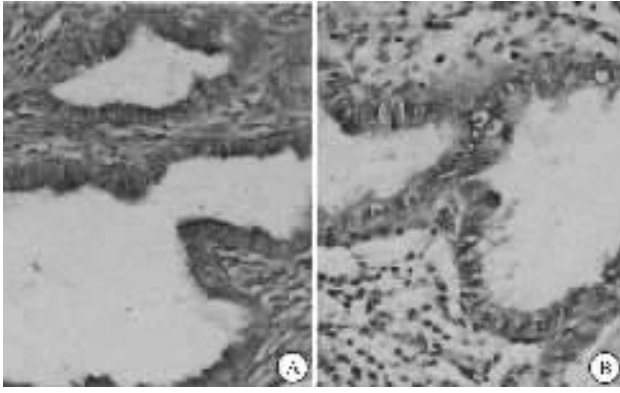
A:分泌期;B:分泌不良。

图1 多卵巢巢综合征患者促排卵治疗后子宫内膜的病理观察 HE $\times 200$

2.2 PCOS患者促排卵后子宫内膜HOXA10免疫组织化学检测

两组子宫内膜标本均可见HOXA10蛋白的表达,在腺上皮和间质细胞胞质内可见程度不

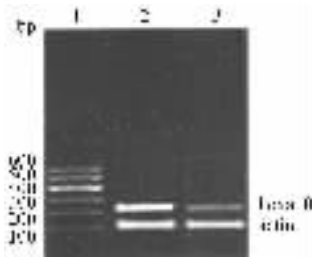
等的黄色颗粒。图像统计分析表明,PCOS 患者组的子宫内膜 HOXA10 的表达为 0.208 ± 0.023 , 弱于对照组的 0.336 ± 0.042 ($P < 0.05$, 图 2)。



A: 对照组; B: PCOS 组。

图 2 多囊卵巢综合征组和对照组子宫内膜 HOXA10 的表达 ElivisionTM Plus 两步法 $\times 200$

2.3 PCOS 患者促排卵后子宫内膜 HOXA10 RT-PCR 结果 两组在 261 bp 处均出现特异性的 HOXA10 基因条带, 在 135 bp 处均出现内参照 β -actin 的特异片段。电泳条带光密度扫描结果显示, PCOS 组子宫内膜 HOXA10 mRNA 表达强度为 0.46 ± 0.16 , 低于对照组的 1.11 ± 0.24 ($P < 0.05$, 图 3)。



1: marker; 2: 对照组; 3: PCOS 组。

图 3 多囊卵巢综合征(PCOS)组和对照组子宫内膜 HOXA10 mRNA 的表达

3 讨论

PCOS 是由遗传因素、环境因素参与, 且与雄激素合成及胰岛素分泌异常相关的妇科内分泌疾病^[7], 在育龄妇女发病率高达 5% ~ 10%。子宫内膜不仅仅是卵巢分泌的甾体激素的靶器官, 同时自身还表达一些因子及受体, 并且和妊娠结局有直接关系。HOXA10 在正常月经周期中的变化与子宫内膜的增生分化以及妊娠的建立关系密切, HOXA10 表达异常将影响子宫内膜的发育和妊娠^[8]。有学者观察到子宫内膜异位症的子宫内膜 HOXA10 表达下降, 推测子宫内膜内异症可能造成子宫内膜分子水平发育的变化, 从而对子宫内膜产生负面影响, 降低了子宫内

膜容受性和胚胎着床的机会。动物试验表明, 母体丧失表达 HOXA10 将导致生育力下降, HOXA10 基因缺陷小鼠的子宫体积缩小, 管径变细, 内膜变薄, 腺体数量显著减少, 部分内膜变异为输卵管黏膜。以上研究均提示 HOXA10 基因在子宫内膜的发生和发育过程中起着重要的调控作用。

PCOS 患者经过促排卵治疗后, 虽表现为高排卵率, 但妊娠率不尽理想。这些促使我们对 PCOS 患者子宫内膜功能方面的异常进行深入研究。我们的结果表明, PCOS 患者子宫内膜 HOXA10 的表达明显低于对照组。RT-PCR 检测也证实了上述结果。由于 HOXA10 参与了子宫内膜的增生、分化以及妊娠着床期容受性的建立, 推测 PCOS 子宫内膜 HOXA10 的低表达, 使子宫内膜存在潜在缺陷, 如果此缺陷不能完全纠正, 子宫内膜周期性变化过程中的上皮与间质之间的信息传递就会受到干扰, 使子宫内膜发育受限和功能受损, 临床表现为低妊娠率和高流产率。

我们的结果表明, PCOS 呈现 HOXA10 的低表达现象可能与 PCOS 患者子宫内膜的功能受损有关。因此临床治疗上应从调整激素水平和改善子宫内膜的功能入手。但是由于 PCOS 的异质性、多样性, 应该从多方面去研究子宫内膜水平各因子的异常以及相互关系, 以期能够通过改善子宫内膜内环境而增加临床妊娠率。

【参考文献】

- [1] Cillo C, Cantile M, Faiella A, et al. Homeobox genes in normal and malignant cells [J]. J Cell Physiol, 2001, 188(2): 161-169.
- [2] Daftary GS, Taylor HS. Pleiotropic effects of HOXA10 on the functional development of peri-implantation endometrium [J]. Mol Reprod Dev, 2004, 67(1): 8-14.
- [3] Kim JJ, Fazleabas AT. Uterine receptivity and implantation: The regulation and action of insulin-like growth factor binding protein-1(IGFBP-1), HOXA10 and forkhead transcription factor-1(FOXO-1) in the baboon endometrium [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 16(2): 34-40.
- [4] Seli E, Duleba AJ. Optimizing ovulation induction in women with polycystic ovary syndrome [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2002, 14(3): 245-254.
- [5] Imani B, Eijkemans MJ, de Velde ER, et al. A nomogram to predict the probability of live birth after clomiphene citrate induction of ovulation in normogonadotropic oligomenorrheic infertility [J]. Fertil Steril, 2002, 77(1): 91-97.
- [6] 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.
- [7] Franks S, Mc Carthy MI, Hardy K, et al. Development of polycystic ovary syndrome: Involvement of genetic and environmental factors [J]. Int J Androl, 2006, 29(1): 278-285.
- [8] Wu Y, Halverson G, Basir Z, et al. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 19(3): 371-380.