

[文章编号] 1000-4718(2008)10-2037-05

## 抗苗勒氏管激素对人黄素化颗粒 细胞激素分泌的影响\*

李琳, 杨冬梓<sup>△</sup>, 莫亚勤, 陈晓莉, 何英明, 黄宇宏  
(中山大学附属第二医院妇产科, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 探讨抗苗勒氏管激素 (AMH) 对人颗粒细胞激素产生分时段的影响。方法: 采用人黄素化颗粒细胞原代培养, 分组加入不同浓度的 AMH, 分时段测定细胞培养液中的雌二醇 (E<sub>2</sub>) 和孕酮 (P) 浓度。结果: 细胞培养液中 E<sub>2</sub>、P 浓度均随培养时间延长而升高, 升高幅度渐下降。随着 AMH 浓度的增加, 颗粒细胞的 E<sub>2</sub> 和 P 分泌明显降低, AMH 5 μg/L 组到 20 μg/L 组间有剂量依赖性, AMH 50 μg/L 组与 20 μg/L 组比较无显著差别。结论: AMH 可以降低体外培养人黄素化颗粒细胞的雌、孕激素分泌, 并有一定的剂量依赖性, 提示 AMH 可以影响颗粒细胞的激素合成过程。

**[关键词]** 抗苗勒氏管激素; 粒层细胞; 激素类, 合成  
**[中图分类号]** R711 **[文献标识码]** A

### Effect of anti - Müllerian hormone on hormone secretion in cultured human luteinized granulosa cells

LI Lin, YANG Dong - zi, MO Ya - qin, CHEN Xiao - li, HE Ying - ming, HUANG Yu - hong

(Department of Obstetric and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat - sen University, Guangdong 510120, China. E - mail: yangdz@mail.sysu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the effect of anti - Müllerian hormone (AMH) on hormone secretion of cultured human luteinized granulosa cells. **METHODS:** Human luteinized granulosa cells were cultured with different concentrations of AMH. The levels of estrogen and progesterone in the supernatants were measured. **RESULTS:** The levels of estrogen and progesterone increased gradually and peaked at 72 h. The secretions of estrogen and progesterone were significantly inhibited by AMH with concentration dependence (5 μg/L to 20 μg/L). No significant difference was found in estrogen and progesterone levels in the presence of AMH at concentrations from 20 μg/L to 50 μg/L group. **CONCLUSION:** AMH decreases the secretion of estrogen and progesterone in cultured human luteinized granulosa cells in a concentration dependent manner, suggesting that AMH negatively affect hormone secretion in granulosa cells.

**[KEY WORDS]** Anti - mullerian ducts hormone; Granulosa cells; Hormones, synthetic

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种常见的妇科内分泌疾病, 以偶发排卵或持续无排卵、临床和 (或) 生化高雄激素血症、胰岛素抵抗和卵巢多囊性改变为主要的临床特征<sup>[1]</sup>。研究发现 PCOS 患者存在卵泡发育停滞<sup>[2]</sup>, 目前其机制尚不明确<sup>[3]</sup>, 卵泡局部高雄激素环境为其可能机制之一, 近年来认为转化生长因子 β (transforming growth factor - β, TGF - β) 对卵泡发育的局部调控机制亦有可能参与此过程<sup>[1]</sup>。抗苗勒氏管激素 (anti - Müllerian hormone, AMH) 是 TGF - β 家族成员之一, 在雌性动物由卵巢颗粒细胞分泌<sup>[4]</sup>, 在次级卵泡、窦

前卵泡和直径 ≤ 4 mm 的小窦状卵泡中表达最高, 在大窦状卵泡 (直径 4 - 8 mm) 中表达逐渐下降, 而始基和初级卵泡中几乎无表达<sup>[5-7]</sup>。体内和体外动物实验证实 AMH 可抑制始基卵泡的募集, 并降低生长卵泡对 FSH 的敏感性, 在卵泡发育过程中发挥重要调控作用<sup>[8]</sup>。研究发现, PCOS 患者的血清 AMH 水平明显增高<sup>[9]</sup>, 但目前尚不清楚 AMH 在 PCOS 发病中的作用机制。本研究采用人黄素化颗粒细胞原代培养, 研究不同浓度的 AMH 对人黄素化颗粒细胞激素分泌的影响, 探讨 AMH 是否可能影响颗粒细胞功能而导致卵泡发育停滞。

[收稿日期] 2007 - 07 - 11 [修回日期] 2008 - 02 - 21

\* [基金项目] 2004 年广东省卫生厅名医工程基金资助项目

△ 通讯作者 Tel: 020 - 81332011; E - mail: yangdz@mail.sysu.edu.cn

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

1.1 标本来源 人黄素化壁层颗粒细胞来自2006年6月至2006年12月在中山大学附属第二医院生殖中心进行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization-embryo transplantation, IVF-ET)的患者,共15例,年龄26-35岁,均为输卵管性和(或)男性因素不孕者。本实验得到本院医学伦理委员会的批准,并与患者签署知情同意书。

1.2 主要试剂 RPMI-1640 干粉、青霉素-链霉素(P-S)双抗(Gibco);胎牛血清(杭州四季青公司);Ficoll 淋巴细胞分离液(相对密度1.077 g/L)(Lymphoprep™);人重组抗苗勒氏管激素(AMH)(R&D);睾酮(testosterone, T)(Sigma);二甲基亚砜(DMSO)(广州威佳试剂公司);0.25%胰酶(Gibco);Trizol(Gibco);雌二醇检测试剂(Bayer);孕激素检测试剂(Bayer);ACS-180 辅助试剂、稀释液(Bayer)。

### 2 方法

2.1 人黄素化颗粒细胞的分离与培养 IVF-ET 受术者均按常规促排卵方案诱发排卵,注射绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG)后36 h,在超声引导下经阴道取卵时留取卵泡液。用Ficoll 密度梯度离心法分离颗粒细胞,2 500 r/min 离心20 min, PBS 洗涤2次,经台盼蓝染色,按活细胞 $1.0 \times 10^8$  cells/L 密度用RPMI-1640 完全培养基(含10% 灭活胎牛血清,2 mmol/L 的L-glutamine,  $1 \times 10^5$  U/L P-S 双抗)接种于24孔板内,每孔含1 mL 的培养基。细胞接种后置于37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养24 h。

2.2 体外培养人黄素化颗粒细胞的激素分泌 培养24 h后更换无血清RPMI-1640 培养基,并加入睾酮,培养基中的睾酮终浓度为 $10^{-7}$  mol/L。共5

例。继续培养120 h,期间于24 h、48 h、72 h、96 h、120 h 分别吸取100 μL 细胞培养液,置于-20℃ 保存待测激素。

2.3 不同浓度AMH与黄素化颗粒细胞共培养 培养24 h后更换无血清RPMI-1640 培养基,分组如下:(1)空白对照组;(2)睾酮对照组;(3)AMH 1 μg/L组;(4)AMH 5 μg/L组;(5)AMH 10 μg/L组;(6)AMH 20 μg/L组;(7)AMH 50 μg/L组。除空白对照组外,其它各组培养基中的睾酮终浓度为 $10^{-7}$  mol/L。每组重复3次。共10例。继续培养72 h后行细胞计数,期间于24 h、48 h 和72 h 分别吸取100 μL 细胞培养液,置于-20℃ 保存待测激素。

2.4 细胞培养液中雌二醇(estrogen, E<sub>2</sub>)和孕酮(progesterone, P)的测定 采用自动化学发光法测定,试剂盒和ACS180·SE 自动化学发光测定仪均由Bayer 公司提供,批内变异系数<5.6%, 批间变异系数<7.2%。因(2)-(7)组的细胞培养液中激素浓度超出仪器检测范围,预实验后将培养液用无血清RPMI-1640 培养基稀释100倍,再上机检测。

### 3 统计学处理

数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,应用SPSS 14.0 统计软件进行分析。计量资料组间比较采用ANOVA,计数资料组间比较采用非参数检验。

## 结 果

### 1 人黄素化颗粒细胞体外培养的生长情况

人黄素化颗粒细胞24 h内贴壁,倒置显微镜下观察到细胞生长呈椭圆形或星形生长,细胞与细胞之间有延长的丝状突起相互连接。细胞核大、类圆,胞浆富含颗粒及空泡(图1)。培养48 h和72 h 各组细胞形态和肉眼观察数目无明显改变,细胞计数各组无差别(表1)。

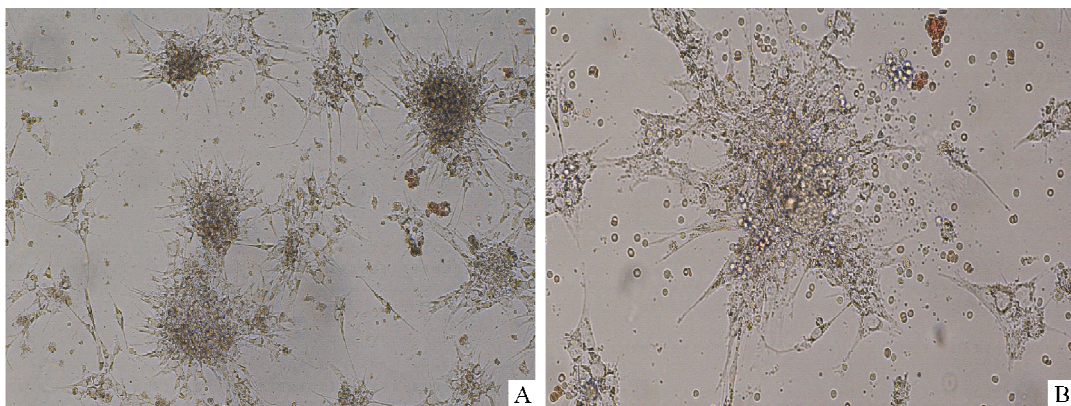


Fig 1 Human luteinized granulosa cells 24 h after adhering. A: ×100; B: ×200.

图1 人黄素化颗粒细胞原代培养

### 2 体外培养人黄素化颗粒细胞的雌二醇(E<sub>2</sub>)和孕激素(P)分泌

以人黄素化颗粒细胞培养的睾酮对照组为预实

验组,如图2所示,发现加入睾酮后,细胞培养液中的E<sub>2</sub>和P浓度均随时间而增加,在培养72 h 达到高峰,之后缓慢下降,故在下一步实验中选择24 h、48 h

和 72 h 取细胞培养液测定 E<sub>2</sub> 和 P 浓度。

### 3 AMH 对人黄素化颗粒细胞 E<sub>2</sub> 分泌的影响

在培养 72 h 结束时各组的细胞计数无差别(表 1),故认为各组的细胞培养液激素水平有可比性。如图 3 所示,空白对照组中几乎无 E<sub>2</sub> 合成,与其它各组比较均有显著差异,在睾酮对照组和不同浓度的 AMH 处理组中,细胞培养液中 E<sub>2</sub> 浓度均随培养时间延长而升高,升高幅度渐下降。在不同浓度 AMH 组中,AMH 1 μg/L 组与睾酮对照组比较无差别,AMH 5 μg/L 到 20 μg/L 组之间有剂量依赖性,可明显降低颗粒细胞的 E<sub>2</sub> 分泌,AMH 50 μg/L 组与 20 μg/L 组比较无显著差别。

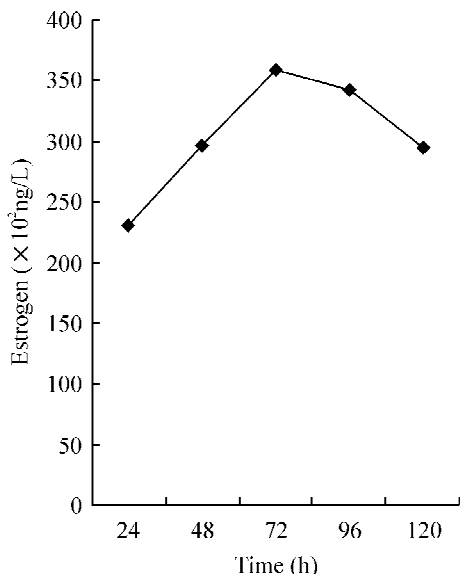


Fig 2 Time - effect relationship of hormone secretion in human luteinized granulosa cells treated with testosterone.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 5$ .

图 2 人黄素化颗粒细胞激素分泌的时间 - 效应关系

表 1 原代培养人黄素化颗粒细胞的 72 h 细胞计数

Tab 1 The cell count of human luteinized granulosa cells 72 h after culture ( $\bar{x} \pm s$ .  $n = 10$ )

Group	AMH (μg/L)	Cell count( ×10 <sup>6</sup> cells/L)	
		0 h	72 h
Blank	0	1	1.080 ±0.150
Testosterone control	0	1	1.078 ±0.151 *
AMH 1 μg/L	1	1	1.026 ±0.128 *
AMH 5 μg/L	5	1	1.007 ±0.086 *
AMH 10 μg/L	10	1	1.072 ±0.157 *
AMH 20 μg/L	20	1	1.057 ±0.153 *
AMH 50 μg/L	50	1	1.051 ±0.138 *

\*  $P > 0.05$  vs blank group.

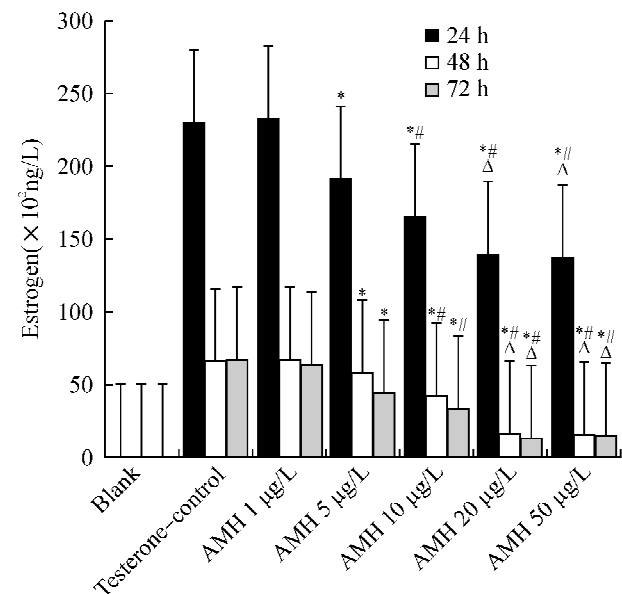
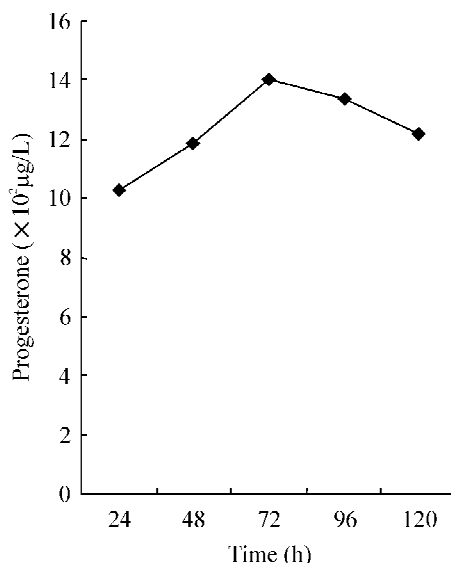


Fig 3 The effect of AMH on E<sub>2</sub> secretion in human luteinized granulosa cells.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 10$ . \*  $P < 0.01$  vs testosterone control; #  $P < 0.01$  vs AMH 5 μg/L group; Δ  $P < 0.01$  vs AMH 10 μg/L group.

图 3 AMH 对人黄素化颗粒细胞雌二醇 (E<sub>2</sub>) 分泌的影响

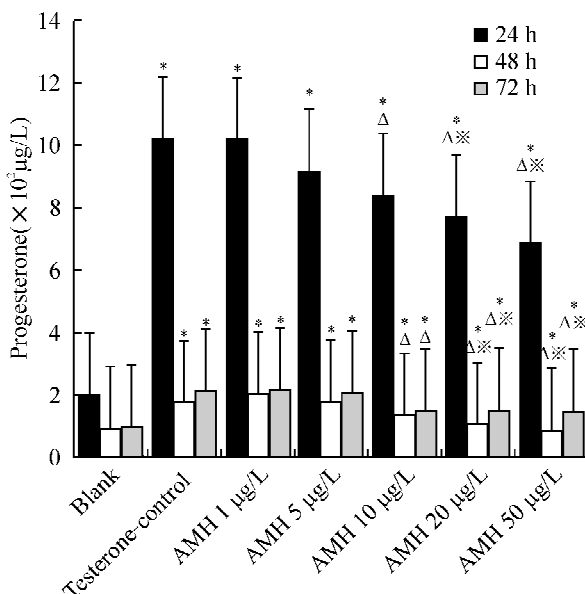


Fig 4 The effect of AMH on P secretion in human luteinized granulosa cells.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 10$ . \*  $P < 0.01$  vs testosterone control; Δ  $P < 0.01$  vs AMH 5 μg/L group; #  $P < 0.01$  vs AMH 10 μg/L group.

图 4 AMH 对人黄素化颗粒细胞孕酮 (P) 分泌的影响

#### 4 AMH 对人黄素化颗粒细胞孕激素 P 分泌的影响

如图 4 所示,在对照组和不同浓度的 AMH 处理组中,细胞培养液中 P 浓度均随培养时间延长而升高,升高幅度渐下降,空白对照组与其它各组比较均有显著差异。在不同浓度 AMH 组中,AMH 1 μg/L 组与睾酮对照组比较无差别,AMH 5 μg/L 到 20 μg/L 组之间有浓度依赖性,可明显降低颗粒细胞的 P 分泌,AMH 50 μg/L 组与 20 μg/L 组比较无显著差别。

### 讨 论

抗苗勒氏管激素 (AMH) 是 TGF-β 家族成员之一,在雌性由卵巢颗粒细胞分泌<sup>[4]</sup>,Durlinger 等<sup>[10]</sup>发现雌性小鼠出生后 4 d 即可在其卵巢颗粒细胞检测到 AMH mRNA 表达。Bezard 等<sup>[5]</sup>用免疫组化方法检测啮齿动物卵巢颗粒细胞上的 AMH mRNA 表达,Baarends 等<sup>[6]</sup>用原位杂交方法检测绵羊卵巢颗粒细胞上的 AMH 蛋白表达,发现 AMH 在早期生长卵泡、窦前卵泡和小窦状卵泡中有特异性表达,而在大窦状卵泡和闭锁卵泡中表达缺失。Weenen 等<sup>[7]</sup>用免疫组化方法检测人卵巢颗粒细胞上的 AMH 蛋白表达,结果显示次级卵泡、窦前卵泡和直径 ≤4 mm 的小窦状卵泡中 AMH 表达最高,在大窦状卵泡 (直径 4-8 mm) 中表达逐渐下降,而在始基和初级卵泡中几乎无表达。以上各项研究结果提示 AMH 主要表达在小窦状卵泡的颗粒细胞。

卵泡液中的 AMH 的浓度高低可能影响卵泡发育。Fanchin 等<sup>[11]</sup>收集 37 例 IVF-ET 受术者的卵泡液 AMH 水平,发现小卵泡 (直径 8-12 mm) 的 AMH 水平为大卵泡 (直径 16-20 mm) 的 3 倍。Andersen 等<sup>[12]</sup>检测手术切除卵巢标本的 35 个窦状卵泡 (直径 3-8 mm) 和 32 个排卵前卵泡的卵泡液 AMH 和 E<sub>2</sub> 水平,发现小窦状卵泡的卵泡液 AMH 浓度最高,并与 E<sub>2</sub> 呈负相关,提示 AMH 与卵泡局部雌激素水平降低可能有关。上述研究均表明,在发育正常的卵泡中,卵泡液 AMH 水平随卵泡增大降低,同时 E<sub>2</sub> 升高,AMH 浓度降低可能是优势卵泡选择的必要条件之一。Pellatt 等<sup>[13]</sup>对卵泡的培养发现,PCOS 患者卵巢颗粒细胞产生的 AMH 较正常有排卵卵巢颗粒细胞增多,在直径 >9 mm 卵泡的卵泡液中 AMH 浓度明显降低,证实了 PCOS 患者卵巢局部的确存在 AMH 表达的增高,AMH 可能通过旁分泌或自分泌的方式影响颗粒细胞功能而在卵巢局部发挥其调控卵泡发育的作用。我们的研究结果显示,在体外培养的人黄素化颗粒细胞的培养液中加入不同剂量的 AMH,当 AMH 浓度为 5 μg/L 时,细胞培养液

中的 E<sub>2</sub> 和 P 浓度较睾酮对照组明显降低,且有一定的剂量依赖性;随着 AMH 浓度增高,雌、孕激素分泌逐渐降低;当 AMH 浓度为 20 μg/L 后,抑制作用不再随着 AMH 浓度增加而加重,提示 AMH 可以降低颗粒细胞的雌、孕激素分泌。

在卵泡的发育过程中,卵泡内局部 E<sub>2</sub> 及 FSH 水平的高低与卵泡的发育成熟密切相关。被募集的卵泡中 FSH 阈值低的卵泡优先发育为优势卵泡,FSH 激活颗粒细胞的 P450 芳香化酶,促进 E<sub>2</sub> 的合成与释放,当优势卵泡直径大于 14 mm 时,局部高浓度的 E<sub>2</sub> 水平又自分泌调节,加强卵泡对 FSH 的敏感性,使优势卵泡的生长速度大大加快<sup>[11]</sup>。由此可见,颗粒细胞的激素分泌功能对于正常卵泡发育十分重要。Fanchin 等<sup>[11]</sup>和 Andersen 等<sup>[12]</sup>研究发现在发育正常的卵泡中,卵泡液 AMH 水平随卵泡增大降低,同时 E<sub>2</sub> 升高。我们的研究显示,AMH 降低颗粒细胞的雌、孕激素分泌,一方面颗粒细胞分泌的 E<sub>2</sub> 不足不利于卵泡的发育,另一方面雄激素向雌激素转化受阻,造成底物雄激素堆积,使卵泡局部雄激素水平增高,在卵泡局部高雄激素环境中颗粒细胞优先将雄激素转化为活性更强的 5α 还原型雄激素二氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT)<sup>[11]</sup>,因此卵泡局部雄激素水平逐渐增高,两方面共同作用的结果可能是使正常的优势卵泡选择受阻,卵泡发育停滞在小窦状卵泡阶段。同时发育停滞的小窦状卵泡产生过多的 AMH,由于小窦状卵泡中的颗粒细胞优先将雄激素转换为 DHT 而非雌激素,进一步加重局部高雄激素环境,如此形成一个恶性循环,最终使大量小窦状卵泡堆积,形成 PCOS 特征性的卵巢多囊性改变,并导致 PCOS 排卵障碍的发生。目前尚不清楚 AMH 影响颗粒细胞激素合成的具体作用机制。有实验发现外源性 AMH 可以抑制体外培养鼠颗粒细胞的芳香化酶合成<sup>[14]</sup>,在人类 AMH 亦有可能通过抑制芳香化酶活性而影响颗粒细胞的激素合成。

### [参 考 文 献]

- [1] Leon Speroff, Marc A. Fritz 主编. 李继俊,主译. 临床妇科内分泌学与不孕[M]. 第 7 版. 山东: 山东科学技术出版社, 2006. 367-387.
- [2] 邵 华,侯丽辉,吴效科. 多囊卵巢综合征的卵泡发育异常[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15 (1): 64-66.
- [3] 曾海涛,梁晓燕,姚书忠,等. 多囊卵巢综合征卵泡颗粒细胞提前对黄体生成素反应[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 373-375.
- [4] Knight PG, Glistler C. TGF-β superfamily members and ovaian follele development[J]. Reproduction, 2006, 132 (2): 191-196.

- [5] Bezdard J, Vigier B, Tran D, et al. Immunocytochemical study of anti - Mullerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post - natal development [J]. J Reprod Fertil, 1987, 80(2):509 - 516.
- [6] Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, et al. Anti - mullerian hormone and anti - mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle and gonadotropin - induced follicle growth [J]. Endocrinology, 1995, 136(11):4951 - 4962.
- [7] Weenen C, Laven JS, von Bergh AR, et al. Anti - Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment [J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(2): 77 - 83.
- [8] Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti - mullerian hormone [J]. Reproduction, 2002, 124(5):601 - 609.
- [9] Pigny P, Jonard S, Robert Y, et al. Serum anti - mullerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 91(33): 941 - 945.
- [10] Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti - Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary [J]. Endocrinology, 2002, 143(3):1076 - 1084.
- [11] Fanchin R, Louafi N, Mendez Lozano DH, et al. Per - follicle measurement indicate that anti - mullerian hormone secretion is modulated by the extent of follicular development and luteinization and may reflect qualitatively the ovarian follicular status [J]. Fertil Steril, 2005, 84(1): 167 - 173.
- [12] Andersen CY, Byskov AG. Estradiol and regulation of anti - mullerian hormone, inhibin - A, and inhibin B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(10): 4064 - 4069.
- [13] Pellatt L, Hanna L, Brincat M, et al. Granulosa cell production of anti - mullerian hormone is increased in polycystic ovaries [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(1):24 - 45.
- [14] di Clemente N, Goxe B, Remy JJ, et al. Inhibitory effect of AMH upon aromatase activity and LH receptors of granulosa cells of rat and porcine immature ovaries [J]. Endocrinology, 1994, 2(4):553 - 558.

## 《临床医师》征稿启事

《中外健康文摘·临床医师》杂志是国家新闻出版总署批准,由国家中医药管理局主管,中国中医药报社和中外健康文摘杂志社主办的国家级医药卫生专业性学术期刊。

本刊已被《中文科技期刊数据库》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《万方数据——数字化期刊群数据库》、《中国学术期刊(光盘版)数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库来源期刊》、《中文生物医学期刊数据库》等收录。

国内统一刊号:CN 11 - 5062/R 国际标准刊号:ISSN 1672 - 5085 邮发代号:80 - 107。

本刊为广大医务工作者提供良好的教育机会和学术交流的平台,用医学的科学理论和临床技术指导医务工作者的医疗服务实践,致力于全面提高医师的综合素质。本刊长期面向全国征集医学学术论文,在本刊发表的论文可获得国家级继续教育学分。

### 【办刊宗旨】

本刊以科学性、学术性和实用性为办刊宗旨,力求及时、准确地反映国内外医学领域基础研究、临床研究、预防医学研究、药学研究中的新成果、新方法、新理论、新动态。

### 【主要栏目】

临床研究、综合医学、护理天地、影像特析、中医中药、妇幼保健、病例(案)探析、卫生防疫、特室特科、综述、论著、名医名院、治院方略、医院文化、院长论坛、创新视点。

### 【来稿要求】

1. 来稿具有科学性、先进性和实用性,论点鲜明、论据充分、数据准确、逻辑严谨、文字通顺、图表规范。每篇论文 2000 - 6000 字(一般不超过 8000 字),短篇 1500 字以内,直接发至电子邮箱或打印在 A4 纸上邮寄至杂志社,来稿请详细注明作者单位、地址、科室、邮编、办公电话、手机号码及 E - mail。

2. 来稿不涉及保密问题,署名无争议,稿件一律文责自负,本刊有权对来稿做文字修改。本刊不退稿,请作者自留底稿,请勿一稿多投。

3. 凡投稿后 10 个工作日未接到稿件处理通知的作者,请及时与本刊联系。

### 【通讯地址】

北京市邮政 72 - 26 信箱《中外健康文摘·临床医师》编辑部

联系人:杜编辑

邮编:100072

电话:010 - 51346361

传真:010 - 51346361

邮箱:kjcxzz@126.com