文章编号:1000-5404(2008)03-0247-04

论著

角质细胞生长因子对无排卵型功血子宫内膜上皮细胞生长与分泌 CA125 的影响

程 湘[1],王 欣[1],成 娅[1],陈波洁[1],刘 萍[1],王 智[1],林桂兰[1],杨合荣[2],王 惠[2] (第三军医大学:新桥医院妇产科,重庆 400037,[2]西南医院妇产科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)对离体培养的无排卵型功血子宫内膜上皮细胞生长和分泌 CA125 的影响。**方法** 体外培养无排卵型功血子宫内膜上皮细胞,加入不同浓度的 KGF 作用后,微量噻唑蓝分析法检测细胞量,了解生长情况,磁酶免法测定 CA125 分泌,分析两者之间的相关性,并与培养的正常子宫内膜上皮细胞进行比较。**结果** ①无排卵型功血子宫内膜上皮细胞与正常子宫内膜上皮细胞的外观特征相似;CK19 免疫组化染色结果为无排卵型功血子宫内膜上皮细胞的细胞质被染成棕黄色。②不同浓度的 KGF 作用体外培养的无排卵型功血子宫内膜上皮细胞后,细胞增生明显,但增生程度不如正常子宫内膜上皮细胞($P<0.05$)。③不同浓度 KGF 作用后两组子宫内膜上皮细胞的 CA125 浓度均升高,无排卵型功血子宫内膜上皮细胞的增高程度明显低于正常子宫内膜上皮细胞($P<0.05$)。④正常和功血的子宫内膜上皮细胞中二者的吸光度值与细胞培养上清液中的 CA125 浓度有显著的相关性,两者的相关系数分别为 0.681 和 0.885($P<0.05$)。**结论** KGF 对体外培养的无排卵型功血子宫内膜上皮细胞有促进生长和分泌 CA125 的作用,但促进作用的程度不如正常子宫内膜上皮细胞,提示无排卵型功血子宫内膜上皮细胞存在与正常子宫内膜上皮细胞不同的生长机制和功能,可能参与无排卵型功血的发病。

关键词:无排卵型功血;子宫内膜上皮细胞;角质细胞生长因子;CA125
中图法分类号:R329.26;R394.2;R711.52 **文献标识码:**A

Effect of keratinocyte growth factor on growth and CA125 secretion of cultured endometrial epithelial cells

CHENG Xiang[1], WANG Xin[1], CHENG Ya[1], CHEN Bo-jie[1], LIU Ping[1], WANG Zhi[1], LIN Gui-lan[1], YANG He-rong[2], WANG Hui[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of keratinocyte growth factor (KGF) on growth and CA125 secretion of cultured endometrial epithelial cells (EECs) from the patients of anovulatory dysfunctional uterine bleeding (ADUB). Methods The EECs from 30 cases of ADUB and 22 cases of resected uterus due to other diseases but with normal menstruation were separated and cultured with KGF of different concentration. Their growth curves were drawn by MTT method. Quantity of CA125 in EECs was determined. Results EECs from ADUB patients appeared similar to normal EECs and were CK19 positive. KGF increased the proliferation of EECs from ADUB patients significantly ($P<0.05$), but the proliferation degree was lower than that of normal EECs. KGF increased the CA125 secretion by EECs from ADUB patients significantly ($P<0.05$), but the degree of CA125 secretion was lower than that of normal EECs. The proliferation of EECs was correlated significantly with CA125 secretion ($P<0.05$). Conclusion KGF enhances the growth and CA125 secretion of cultured EECs from ADUB patients, but the degree in EECs from ADUB patients was lower than that of normal EECs. These suggest that EECs from ADUB patients have different growth mechanism with normal EECs.

Key words: dysfunctional uterine bleeding; CA125; endometrial epithelial cell; keratinocyte growth factor

功能失调性子宫出血(简称功血)是由于调节生殖的神经内分泌机制失常引起的异常子宫出血。以往的研究对正常月经子宫内膜生长修复的形态学过程了解得较为清楚,但分子机制不明。而对无排卵型功血(anovulatory dysfunctional uterine bleeding, ADUB)子宫内膜生长修复的形态学及分子机制报道甚少,无排卵型功血与正常月经的子宫内膜生长修复过程及机制是

作者简介:程 湘,女,重庆市人,博士,副主任医师,主要从事女性内分泌和肿瘤方面的研究,发表论文 40 篇。电话:(023)68774542
收稿日期:2007-01-12;修回日期:2007-10-20

否相同亦不明了。在前期研究中，我们成功培养无排卵型功血的子宫内膜上皮细胞（endometrial epithelial cell，EEC），观察到培养的原代细胞在体外的生物学特性与体内类似，可以用做子宫内膜上皮细胞体外研究的较好模型[1,2]。本研究采用此模型，观察角质细胞生长因子（keratinocyte growth factor，KGF）对子宫内膜上皮细胞生长和分泌CA125的影响，分析这两项指标之间的相关性，初步探讨无排卵型功血发病的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂来源 DMEM/F12培养粉和胎牛血清购自HyClone公司；胶原酶Ⅲ型购自Sigma公司；鼠抗角蛋白-19（CK-19）多抗工作液购自北京中山生物技术公司。

1.1.2 不同浓度的KGF配制 用含0.5%胎牛血清的DMEM/F12培养液稀释KGF，最终浓度为10、20、50、100、200、500 ng/ml。

1.1.3 1%Ⅲ型胶原酶配制 100 mg胶原酶加入80 ml的DMEM/F12培养液，磁力搅拌充分溶解，调pH至7.35，加DMEM/F12培养液至100 ml，0.22 μm微孔滤器过滤分装，于-20 ℃保存。

1.1.4 组织与细胞来源 2004年4－12月在本院及西南医院妇产科就诊的52例患者，分别入选无排卵型功血组（简称功血组）和正常对照组（简称正常组）。所有患者术前3个月无使用激素类药物史，年龄在27～52岁。所取的每例子宫内膜标本分为2份，一份以10%甲醛固定后行HE染色，一份用于细胞培养。①功血组：月经紊乱患者30例，经全身及妇科检查未发现器质性病变，B超提示子宫内膜厚度＞1 cm。所有患者在出血时进行诊断性刮宫，病理诊断符合无排卵型功血，其中增生期样子宫内膜16例，单纯性子宫内膜增生过长14例。②正常组：月经正常、因其他疾病行子宫切除手术的患者22例。两组患者在年龄、孕次和产次方面无显著性差异（$P>0.05$），切除子宫后立即取材。病理诊断正常子宫内膜，其中增殖期9例，分泌期13例。

1.2 方法

1.2.1 EEC的分离和原代培养 参照Mylonas等[3]的方法，采用胶原酶消化和筛网分离结合法，并加以改良。原代培养的EEC接种于玻片，细胞长满后取出，制备细胞爬片。S-P法进行细胞爬片的CK19免疫组化染色，图像仪分析细胞片中CK19所测灰度值的百分比。

1.2.2 MTT显色实验 ①接种细胞：纯化后的EEC以4×10^4 ml^{-1}的细胞数接种于96孔板中，培养36 h。②细胞同步化：无血清DMEM/F12培养液孵育24 h。③KGF作用：不同浓度KGF（0、10、20、50、100、200、500 ng/ml）的低血清培养液，培养48 h。④吸光度值检测：每个孔内加入5 mg/ml的MTT 20 μl，培养4 h后，换150 μl DMSO，振荡10 min，在酶标仪上以490 nm波长测定每孔吸光度值[D(490)]，用只加培养液的空白对照孔调零。

1.2.3 细胞培养上清液CA125的检测 收集培养细胞的上清液，-20 ℃冻存。按试剂盒说明书进行操作。先绘制标准曲线，复管测定。在BIOZYME-1型测定仪上以各测定项目的定量程序测定，自动绘制标准曲线，并将拟合后的数据存入相应的定量程序，然后以同样方法测定标本。将各管用仪器测定，通过内置曲线进行拟合，直接打印出测定值（浓度）。

1.3 统计方法

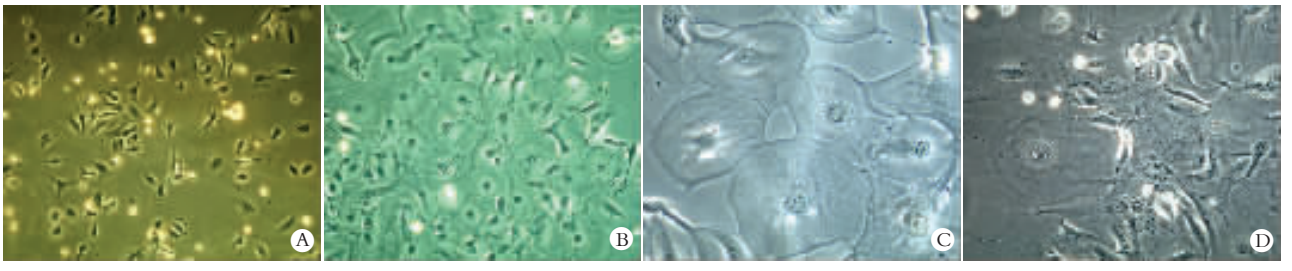
数据均以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 12.0统计软件，两组间比较行t检验，多组间比较行单因素方差分析和LSD检验，相关性采用线性回归分析及相关分析。

2 结果

2.1 EEC的体外生长及形态学特点

倒置显微镜下观察，无排卵型功血EEC与正常EEC的外观特征相似。细胞接种后贴壁生长，到接种后5 d，细胞呈多角形或圆形，双核或多核，体积进一步增大。细胞团扩大并相互融合成片，可铺满瓶壁的70%～90%。间质细胞或成纤维细胞的污染极少，为进行实验的最佳时间。见图1。接种后6～7 d，上皮细胞形态类似，大而不规则，少数细胞脱壁。正常的EEC在接种第5天后，无排卵型功血的EEC在接种第6天后，其细胞数均开始减少。由于细胞同步化处理需要2～3 d，而原代培养细胞的生长时间是5～6 d，因此我们选择KGF作用48 h，观察其对EEC增生的影响。

免疫组化染色后在光镜下观察，无排卵型功血EEC的细胞质被染成棕黄色，CK19表达阳性。细胞片CK19染色半定量分析：灰度值（210.87±8.22），CK19阳性细胞数占细胞总数的95%。阴性对照则仅见细胞核呈蓝色，细胞质未见着色。见图2。



A 接种后1 d（×200）；B 接种后3 d（×200）；C 接种后5 d（×400）；D 接种后7 d（×200）

图1 原代培养的无排卵型功血EEC形态观察 （倒置显微镜）

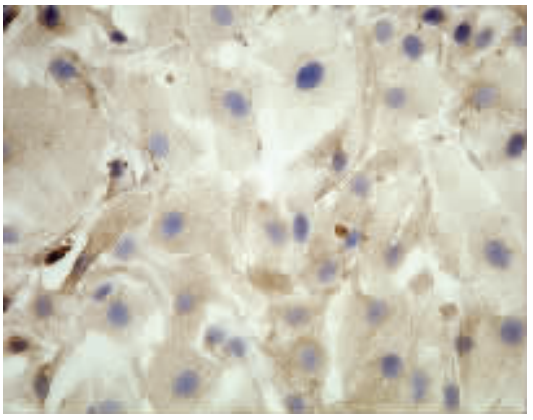


图 2　无排卵功血 EEC 的 CK19 免疫组化染色结果　(S-P × 400)

2.2　不同浓度 KGF 对 EEC 生长的影响

在培养的 EEC 中,加入不同浓度的 KGF,代表细胞量的 $D(490)$ 均明显增加。KGF 浓度为 50、100 ng/ml 时,刺激 EEC 增生的作用比较明显,其中 50 ng/ml 的作用最强 ($P<0.05$),并且功血组的 EEC 在 KGF 作用后 $D(490)$ 增加,幅度为 (0.109 ± 0.010),明显低于正常组的增加幅度 (0.151 ± 0.017) ($P<0.05$)。KGF 低浓度(10、20 ng/ml)与高浓度(200、500 ng/ml)刺激 EEC 增生的作用相似,差异无显著性 ($P>0.05$)。因此我们取 50 ng/ml 作为后续实验的 KGF 作用浓度,结果见表 1。

2.3　不同浓度 KGF 对 EEC 分泌 CA125 的影响

不同浓度 KGF 作用后两组 EEC 的 CA125 浓度均升高,浓度为 50、100 ng/ml 时,KGF 刺激 EEC 分泌 CA125 的作用比较明显,其中 50 ng/ml 时的作用最强 。功血组的 EEC 在 KGF 作用下 CA125 浓度增高,幅度为 (212.50 ± 45.21) U/ml,明显低于正常组的增高幅度 (270.71 ± 25.24) U/ml ($P<0.05$)。浓度为 500 ng/ml 与 10 ng/ml,KGF 对两组 EEC 刺激 CA125 分泌的作用相似,差异无显著性 ($P>0.05$)。结果见表 2。

2.4　EEC 的 CA125 浓度与细胞生长的相关分析

对 50 ng/ml KGF 作用后 EEC MTT 法所测 $D(490)$ 与培养细胞上清 CA125 浓度的相互关系进行线性回归及直线相关分析,结果显示:代表细胞生长的指标[MTT 法所测 $D(490)$]与反映细胞分泌功能的指标(培养细胞上清的 CA125 浓度)有显著的相关性。正常组的回归方程:$\hat{y}=35.44+126.80x$,Pearson 相关系数 $r=0.681$ ($P<0.05$);功血组的回归方程:$\hat{y}=60.86+231.95x$,Pearson 相关系数 $r=0.885$ ($P<0.01$);表明无排卵型功血 EEC 和正常的 EEC 一样,其 CA125 的分泌与细胞的生长呈正相关,提示在 KGF 的作用下 EEC CA125 的分泌与细胞生长有关。

3　讨论

近年的研究表明,无排卵型功血是神经内分泌机制异常使子宫内膜在激素作用失常的影响下局部微环境中多种分子发生改变的结果。子宫内膜局部微环境中的多种分子包括生长因子及其受体、细胞因子及其受体、血管活性物质、细胞外基质及相关酶等,它们共同参与了子宫内膜的生长修复。目前认为,刺激 EEC 生长的因子有角质细胞生长因子、表皮生长因子、胰岛素样生长因子-Ⅰ、内皮素及肝细胞生长因子等。抑制上皮细胞生长的因子有转化生长因子-β 等。KGF 是由 Rubin 等[4]从人胚胎肺成纤维细胞的培养上清中分离纯化出的一种相对分子质量约为 28×10^3 的单链多肽,由间质细胞分泌,介导间质与上皮之间的相互作用,在机体多种组织中都有表达。KGF 是上皮细胞特异性的有丝分裂原,具有促进上皮细胞增生、分化和伤口愈合等功能。在促进角膜上皮生长修复的实验中观察到,KGF 能够加速伤口角膜的上皮化[5]。近期的研究发现,KGF 的表达与情绪状态有密切的关系。给予小鼠紧张刺激制备焦虑模型后,小鼠成纤维细胞表达 KGF 的 mRNA 明显减少,表皮细胞带也变薄,提示焦虑情绪通过减少 KGF 表达,对伤口愈合有不良影响[6]。我们在临床工作中观察到多种妇科疾病的患者合并情绪障碍,其中包括功血。近期我们的研究表明,焦虑状态下的大鼠其卵巢内分泌功能受到抑制,性激素分泌减少,性周期延长,子宫内膜腺体减少,部分上皮增生或脱落[7,8]。在无排卵型功血患者中,子宫内膜局部微环境中 KGF 作用改变是否也影响子宫内膜的结构和功能,目前尚不明了。

早在 1993 年就有人用 RT-PCR 的方法观察了 KGF 在正常子宫的表达,结果显示在整个月经周期当

表 1　不同浓度 KGF 对 EEC 生长的影响[$D(490)$, $\bar{x}\pm s$]

组别	0 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml
正常组	0.108 ± 0.009^{bc}	0.169 ± 0.017^{abc}	0.201 ± 0.085^{abc}	0.259 ± 0.008^{ac}	0.251 ± 0.009^{ab}	0.192 ± 0.018^{abc}	0.134 ± 0.011^{abc}
功血组	0.091 ± 0.014^{bc}	0.120 ± 0.017^{abc}	0.143 ± 0.016^{abc}	0.200 ± 0.006^{ac}	0.186 ± 0.011^{ab}	0.117 ± 0.010^{abc}	0.096 ± 0.012^{abc}

a:$P<0.05$,与 KGF 0 ng/ml 比较;b:$P<0.05$,与 KGF 50 ng/ml 比较;c:$P<0.05$,与 KGF 100 ng/ml 比较

表 2　不同浓度 KGF 对 EEC CA125 浓度的影响(U/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	0 ng/ml	10 ng/ml	20 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml	500 ng/ml
正常组	85.31 ± 12.53^{bc}	185.31 ± 21.01^{abc}	284.26 ± 29.70^{abc}	356.02 ± 32.98^{ac}	326.93 ± 19.12^{ab}	253.56 ± 24.99^{abc}	227.58 ± 18.93^{abc}
功血组	185.59 ± 37.23^{bc}	261.29 ± 26.06^{abc}	313.51 ± 30.67^{abc}	398.09 ± 20.48^{ac}	382.92 ± 19.76^{ab}	297.66 ± 23.77^{abc}	251.40 ± 14.87^{abc}

a:$P<0.05$,与 KGF 0 ng/ml 比较;b:$P<0.05$,与 KGF 50 ng/ml 比较;c:$P<0.05$,与 KGF 100 ng/ml 比较

中,人的子宫内膜均有 KGF 和 KGFR mRNA 表达,其中上皮细胞富含 KGFR mRNA,基质细胞和肌层富含 KGF mRNA,提示在正常月经周期的人子宫内膜中,KGF 通过旁分泌途径起作用[9]。另有报道,子宫内膜中 KGF mRNA 的表达在月经的各个分期中不同,在分泌期是增生期的 10 倍,分泌晚期表达水平最高,在持续孕激素影响和持续雌激素作用的子宫内膜中 KGF mRNA 表达低。而 KGFR mRNA 在增生期表达水平高,增生晚期表达水平最高,而在持续孕激素作用下的子宫内膜中表达水平低。结果提示 KGF mRNA 的表达是孕激素依赖性的,而 KGFR mRNA 的表达是雌激素依赖性的。Siegfried 等[10]研究发现增生过长的子宫内膜中 KGF mRNA 表达降低,提示 KGF 可能与无排卵型功血子宫内膜上皮生长障碍有关。本实验结果显示,原代培养的无排卵型功血 EEC 经不同浓度 KGF 作用后,与对照组相比,各浓度 KGF 均能增加细胞数量及 CA125 的浓度。KGF 50 ng/ml 时作用最明显,而 KGF 高浓度(500 ng/ml)与低浓度(10 ng/ml)对其生长和分泌的影响作用相当 对正常 EEC 给予不同浓度 KGF 后,得到类似结果,表明 KGF 对 EEC 的刺激作用呈剂量依赖性。

已往的研究表明,KGF 对多种上皮细胞均有促生长作用。而本实验证实 KGF 在体外对 EEC 的生长增殖及分泌均有促进作用,无排卵型功血 EEC 对 KGF 的刺激反应较正常 EEC 低,可能与无排卵型功血 EEC 的结构、功能异常及生长环境改变有关。深入研究 KGF 对无排卵型功血子宫内膜的促生长作用,有望在将来应用 KGF 或增加 KGF 分泌的药物治疗功血,提高功血的治疗水平。

新近的研究表明,给予外源性的 KGF cDNA 后,创伤大鼠表达 IGF-1、IGF-BPJ3、FGF 和胶原酶Ⅳ增加,表达 TGF-β 减少[11],却不增加胶原酶Ⅰ或Ⅲ的表达,提示 KGF 基因转染加速伤口愈合的作用可能是多途径的。对前列腺癌基质细胞的研究观察到,KGF 诱导细胞周期蛋白 D1、Bcl-2、Bcl-xL 和磷酸化 Akt 表达,具有抗凋亡的作用,KGF 抗血清作用后 KGF 则能够终止细胞增生和抗凋亡蛋白的表达[12]。KGF 促进细胞分泌的机制尚不完全清楚。本实验结果显示,KGF 作用后,CA125 的浓度与 EEC 的数量呈显著正相关,提示 EEC 分泌 CA125 和细胞增生有关。KGF 作用后,无排卵型功血 EEC 分泌 CA125 的增长幅度低于正常 EEC,其生长的增长幅度也低于正常 EEC,从另一方面说明 CA125 的分泌与细胞的增生有关。已知 CA125 的分泌与酪氨酸磷酸化途径有关,EGF 可以促进这一磷酸化过程[13]。KGF 受体与 EGF 受体同为酪氨酸激酶型受体,因此推测 KGF 刺激 CA125 分泌也可能与酪氨酸磷酸化途径有关,其具体机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 王 欣,成 娅,程 湘,等. 人子宫内膜腺上皮细胞原代培养方法的改进[J]. 重庆医学,2005,34(5):702-703,705.

[2] 王 欣,程 湘,成 娅,等. 人无排卵功血子宫内膜上皮细胞生物学特性初步研究[J]. 第三军医大学学报,2006,28(20):2050-2053.

[3] Mylonas I, Speer R, Makovitzky J, *et al*. Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodelin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 114(5):405-411.

[4] Rubin J S, Osada H, Finch P W, *et al*. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(3):802-806.

[5] Carrington L M, Boulton M. Hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor regulation of epithelial and stromal corneal wound healing[J]. J Cataract Refract Surg, 2005, 31(2):412-423.

[6] Mercado A M, Quan N, Padgett D A, *et al*. Restraint stress alters the expression of interleukin-1 and keratinocyte growth factor at the wound site:an in situ hybridization study[J]. J Neuroimmunol, 2002, 129(1-2):74-83.

[7] 程 湘,陈正琼,谢荣凯,等. 68 例慢性盆腔炎合并抑郁/焦虑患者的心理特点及治疗效果研究[J]. 第三军医大学学报,2005,27(11):1148-1150.

[8] 程 湘,徐 辉,艾国平,等. 慢性情绪应激对大鼠卵巢功能影响的初步观察[J]. 第三军医大学学报,2007,29(14):1368-1370.

[9] Pekonen F, Nyman T, Rutanen E M. Differential expression of keratinocyte growth factor and its receptor in the human uterus[J]. Mol Cell Endocrinol, 1993, 95(1-2):43-49.

[10] Siegfried S, Pekonen F, Nyman T, *et al*. Expression of mRNA for keratinocyte growth factor and its receptor in human endometrium[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1995, 74(6):410-414.

[11] Pereira C T, Herndon D N, Rocker R, *et al*. Liposomal gene transfer of keratinocyte growth factor improves wound healing by altering growth factor and collagen expression[J]. J Surg Res, 2007, 139(2):222-228.

[12] Huang Y W, Wang L S, Chang H L, *et al*. Effect of keratinocyte growth factor on cell viability in primary cultured human prostate cancer stromal cells[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2006, 100(1-3):24-33.

[13] Hayashi S, Sakamoto T, Inoue A, *et al*. Estrogen and growth factor signaling pathway:basic approaches for clinical application[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 86(3-5):433-442.

(编辑 郭建秀)