论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1148-03

晚孕期肛提肌Ⅰ、Ⅲ型胶原和基质金属蛋白酶-1表达研究

董 黎[1],张 曦[1],马豫焕[2],张菊新[3],王 悦[3],杨 立[1] ([1]郑州大学第三附属医院妇产科,郑州 450000;[2]郑州市第九人民医院妇产科,郑州 450000;[3]河南省人民医院妇产科,郑州 450000)

摘 要:目的 探讨妊娠晚期妇女和未育妇女肛提肌Ⅰ、Ⅲ型胶原和基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)mRNA的表达水平及两者之间的相关性。**方法** 选取20例妊娠晚期孕妇[年龄(28±4)岁,孕龄(39±3)周]为晚期妊娠组。同时,选取因会阴裂伤留取肛提肌组织标本的5例会阴裂伤的已婚未育妇女[年龄(25±4)岁]为对照组。采用HE染色观察肛提肌形态,免疫组织化学和半定量逆转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)法检测标本中Ⅰ、Ⅲ型胶原和MMP-1 mRNA表达水平。**结果** 晚期妊娠组肛提肌组织肌纤维肥大,排列紧密但略微紊乱,无变性坏死表现。晚期妊娠组Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达及二者比例均显著高于对照组($P<0.05$);而MMP-1 mRNA表达水平显著低于对照组($P<0.05$)。**结论** 妊娠晚期妇女肛提肌胶原合成增加,降解降低,出现肌纤维肥大,支持力量增加。

关键词: 孕妇;胶原;基质金属蛋白酶-1

中图法分类号: R322.46;R329.3;R714.14 **文献标识码:** A

Expressions of collagen type Ⅰ and Ⅲ, and MMP-1 in levator ani muscle of pregnant women in the third trimester

DONG Li[1], ZHANG Xi[1], MA Yu-huan[2], ZHANG Ju-xin[3], WANG Yue[3], YANG Li[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Ninth People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, People's Hospital of Henan Province, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of the expressions of collagens type Ⅰ, type Ⅲ, and MMP-1 in the levator ani muscle of pregnant women. **Methods** Twenty women after vaginal delivery [age mean (28±4) years, duration of pregnancy mean (39±3) weeks] were the late pregnant group and 5 women with perineal laceration but without delivery [age mean (25±4) years] served as the control group. All of them accepted our informed consent. Their levator ani muscle tissue samples were extracted. Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), haematoxylin-eosin (HE) staining and immunohistochemistry were performed to detect the expressions of collagens type Ⅰ, type Ⅲ, and MMP-1. **Results** The muscle fiber of levator ani from the late pregnant group was more hypertrophy than that of the control group, in an close but bit of disordered arrange without necrotic appearance. The late pregnant group showed increased positive staining of collagen types Ⅰ and Ⅲ and elevated ratio of type Ⅰ/Ⅲ ($P<0.05$). The optical density (OD) values of MMP-1 mRNA in the late pregnant group was lower than control group ($P<0.05$). **Conclusion** Muscle fiber of levator ani from the late pregnant group is more hypertrophy than that of the control group, and accommodation of collagen is increased relatively.

Key words: pregnant women; collagen; matrix metalloproteinase-1

女性压力性尿失禁(stress urinary incontinence, SUI)是女性尿失禁常见的类型,临床人群发病率高达35%,显著影响女性患者的日常生活和工作[1]。有关女性SUI的发病原因目前还不清楚,最近研究表明妊娠导致的盆底支持组织的结构和功能改变是其重要原因[2]。但是,有关妊娠对女性盆底肌的影响目前还不清楚。研究表明盆底肌肉支持功能与胶原蛋白和基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, MMP-1)表达密切相关[3]。本研究对妊娠晚期妇女肛提肌Ⅰ、Ⅲ型胶原和MMP-1 mRNA的表达水平,以及二者之间的相关性进行研究,探讨妊娠晚期妇女盆底支持组织的改变。

作者简介:董 黎,女,河南省鹤壁市人,博士,主治医师,主要从事妇产科泌尿方面的研究。电话:(0371)65580450,E-mail: donglili181@126.com

收稿日期:2008-04-11;修回日期:2008-05-08

1　对象与方法

1.1　研究对象

选取郑州大学第三附属医院妇产科住院初产妇志愿者 20 例为晚期妊娠组。其年龄 21～30(28±4)岁,孕(39±3)周,均为经阴道分娩和会阴侧切,同时,在郑州市第九人民医院妇产科选取已婚未育会阴裂伤患者 5 例为对照组,年龄 20～28(25±4)岁。所有研究对象无良恶性腹部盆腔肿瘤及影响下泌尿道生殖系统功能的内科系统和神经系统疾病。本研究经伦理委员会批准,所有研究对象对参加本研究表示知情同意。

1.2　研究方法

1.2.1　标本搜集与处理　　分别于妊娠晚期孕妇阴道分娩胎儿娩出后会阴侧切口处和会阴裂伤患者裂伤口处提取修补时剪除的肛提肌组织 2 块,每块样本组织厚 3～5 mm,质量 4～6 g;生理盐水冲洗后,其中 1 块组织立即置入 Ep 管内放入液氮灌内冻存;另 1 块组织立即置入 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h 以上,常规脱水石蜡包埋连续切片 4 张,厚度为 4 μm,1 张用于 HE 染色,2 张用于免疫组化,备用片 1 张,收取组织切片置入恒温箱 60 ℃以下烤片 1 h,使组织载玻片上充分展开并严密黏附。

1.2.2　主要仪器和试剂　　美国 ZYMED 公司鼠抗人Ⅰ、Ⅲ型胶原单克隆抗体和即用型鼠免疫组织化学 S-P 试剂盒,美国 Invitrogen 公司 Trizol 试剂,上海生工反转录试剂盒、PCR 合成试剂盒,日本 Olympus 公司光学显微镜,德国 Leica 公司光学显微镜照相系统,HERAEUS 公司台式高速低温离心机,BIOMETRA 公司 PCR 仪,MMP-1 引物(362 bp)由赛百盛生物有限公司合成,上游序列:GTGGCTCAGTTTGTCCTC,下游序列:GCCGCAACACGATGTAAG。

1.2.3　实验方法　　对两组肛提肌组织切片均行 HE 染色和免疫组织化学染色。免疫组织化学采用链霉素抗生物蛋白素-过氧化物酶(S-P)法按照试剂说明书操作,微波热修复抗原;用 Trizol 试剂提取两组肛提肌组织 RNA,紫外分光光度计测定其 $D(260)$ 和 $D(280)$ 值,结果显示 $D(260)/D(280)=1.87$,所提 RNA 无 DNA 和蛋白的污染。逆转录后进行 PCR 扩增,GAPDH 为内参照,反应体系 50 μl,反应条件:95 ℃预变性 5 min,94 ℃45 s,55 ℃退火 45 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸 6 min,4 ℃终止反应。

1.2.4　结果判定　　免疫组化采用 Image-Pro Plus 5.1 免疫组化定量分析软件进行图像分析;1% 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 扩增产物,UVI 凝胶图像分析软件进行半定量分析显示。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行两随机独立样本的 t 检验和 Pearson 相关性分析。

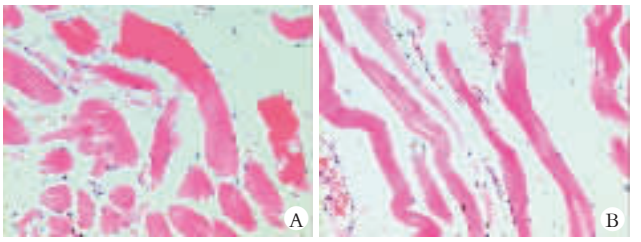
2　结果

2.1　晚期妊娠组和对照组肛提肌形态学变化

HE 染色镜下观察组织学切片,两组肛提肌组织均由彼此紧密相连的肌纤维构成,肌束间含有成纤维细胞和血管等结构,肌纤维为均染的粉红色,细胞核位于肌纤维的周边,肌纤维无变性坏死表现;但晚期妊娠组肛提肌肌纤维较对照组肥大,排列紧密,但略微紊乱(图 1)。

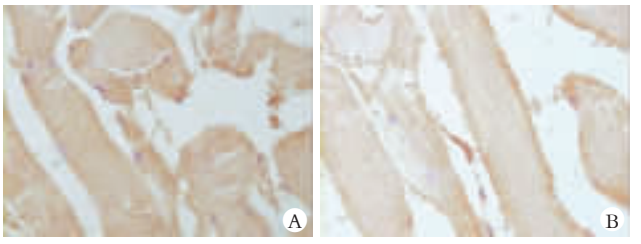
2.2　晚期妊娠组和对照组肛提肌Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达

计算机图像分析系统测定结果显示,晚期妊娠组肛提肌Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达及Ⅰ/Ⅲ型胶原显著高于对照组($P<0.05$,图 2、3,表 1)。



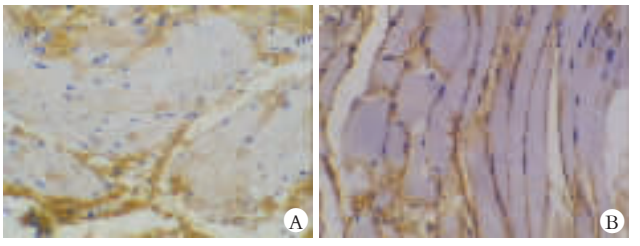
A:晚期妊娠组;B:对照组

图 1　晚期妊娠组和对照组肛提肌形态观察　(HE×200)



A:晚期妊娠组;B:对照组

图 2　晚期妊娠组和对照组肛提肌Ⅰ型胶原表达　(S-P×400)



A:晚期妊娠组;B:对照组

图 3　晚期妊娠组和对照组肛提肌Ⅲ型胶原表达　(S-P×400)

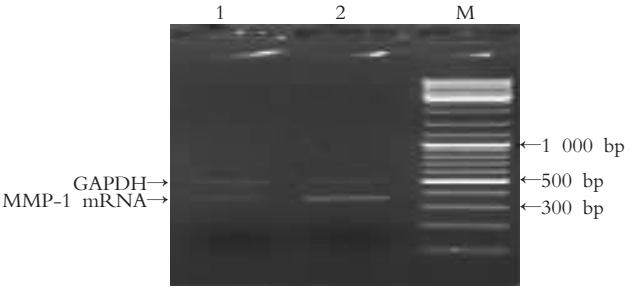
表 1　两组肛提肌Ⅰ、Ⅲ型胶原的积分光密度值($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原	Ⅰ/Ⅲ型胶原
晚期妊娠组	20	131.2990±5.5707[a]	95.6490±5.7937[a]	1.3775±0.009[a]
对照组	5	91.2550±3.9038	80.0250±4.3382	1.1425±0.1115

a:$P<0.05$,与对照组比较

2.3　晚期妊娠组和对照组肛提肌 MMP-1 mRNA 表达

晚期妊娠组 MMP-1 mRNA 表达水平较对照组明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4,表 2)。



1:对照组;2:晚期妊娠组;M:标准

图 4　晚期妊娠组和对照组肛提肌 MMP-1 mRNA 表达

表2 肛提肌 MMP-1 mRNA 光密度值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	光密度值
晚期妊娠组	20	1.280 0 ± 0.003 3[a]
对照组	5	1.410 0 ± 0.018 2

a: $P < 0.05$,与对照组比较

2.4 Ⅰ、Ⅲ型胶原与 MMP-1 mRNA 相关分析

晚期妊娠组Ⅰ型和Ⅲ型胶原与 MMP-1 mRNA 表达水平相关分析显示:Ⅰ型胶原 $r = -0.607$, $P < 0.05$;Ⅲ型胶原 $r = -0.192$, $P < 0.05$。说明晚期妊娠组Ⅰ型胶原与 MMP-1 mRNA 表达水平呈负相关。

3 讨论

女性妊娠可导致其盆底组织结构和功能发生变化[4]。当盆底肌受损时,其主要成分——肛提肌支托和关闭尿道的作用即明显下降,可导致 SUI 的发生。

Tunn 等[5]于 2006 年采用 MRI 方法观察 SUI 患者肛提肌的变化,发现 SUI 患者肛提肌功能虚弱与其形态改变有关。我们研究也发现妊娠晚期妇女肛提肌肌纤维较对照组肥大,其形态发生了改变,但同时也发现妊娠晚期妇女肛提肌肌纤维排列紧密,肌纤维也未见变性坏死,提示妊娠晚期妇女盆底支持力量存在上升的趋势,这和以往研究报道[6] SUI 患者肛提肌组织形态学表现为肌纤维密度降低不一致,也提出了一个问题:既然妊娠晚期妇女盆底支持力量上升,为何孕期妇女常见 SUI 症状发生?推测其原因可能为妊娠时期增大的子宫导致腹压升高,压迫作用可能造成盆底组织机械性拉伸损伤导致其自身产生代偿性损伤修复,且妊娠时胎盘分泌大量雌激素,肛提肌也存在大量雌激素受体[7],雌激素作用肛提肌刺激肌纤维增生,以对抗不断升高的腹压。这也和我们对妊娠晚期妇女进行尿动力学检查得出的结果一致[8]。我们同时发现妊娠晚期妇女和对照组相比,肛提肌肌束略微紊乱,这也表明肌纤维处于代谢活跃状态。当这种自身代偿性损伤修复不足以抵抗不断升高的腹压时,就发生了漏尿。

肛提肌通过胶原维持膀胱颈和尿道的位置及尿道的闭合,对尿道发挥收缩作用,来维持尿自禁功能。而Ⅰ、Ⅲ型胶原在骨盆支持组织中数量和质量的缺陷被认为是 SUI 的重要致病因素[9],其比例下降也表明组织支持力量减弱。

本研究镜下组织切片观察显示晚期妊娠组Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白较对照组染色较深,分布较为紧密,且晚期妊娠组Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白含量,Ⅰ/Ⅲ型胶原均显著高于对照组,表明肛提肌在妊娠晚期支持力量增强。我们认为这和妊娠期雌激素上升作用于肛提肌促进胶原增生,从而使胶原纤维变性增粗增大有关。分娩后雌激素明显下降,这些增粗的胶原纤维在分娩后如不能恢复至未孕状态,其结构发生改变导致胶原纤维结构松散,抗张力减弱,进而盆底支持组织力量薄弱,造成产后出现 SUI。

Bakas 等[10,11]发现 SUI 患者耻骨宫颈筋膜Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白含量均明显减少,而其前胶原基因表达量并未发生明显改变,认为盆底组织胶原含量的减少可能是由于前胶原不能正常转化为胶原,或者是由于胶原酶活性增强或含量增高导致胶原降解增多所致,而 MMP-1 为盆底组织Ⅰ、Ⅲ型胶原降解过程中的限速酶。本研究显示晚期妊娠组 MMP-1 mRNA 表达较对照组明显下降,且与Ⅰ型胶原蛋白表达呈负相关,提示妊娠晚期孕妇肛提肌胶原含量增多可能和 MMP-1 在基因转录水平的表达减少有关。在低 MMP-1 水平的情况下,胶原蛋白降解减弱,相对胶原合成增加,使局部组织的胶原含量增加,胶原纤维增粗增大,使盆底组织支持力增强。另外,妊娠期大量增加的雌激素也可能通过抑制 MMP-1 的生成和活性起作用从而抑制胶原降解。

妊娠晚期妇女肛提肌胶原合成增加,降解降低,出现肌纤维肥大,支持力量增加。而对于分娩后造成其盆底支持组织降低,从而导致 SUI 的发生还需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Rogers R G. Clinical practice. Urinary stress incontinence in women [J]. N Engl J Med, 2008, 358(10): 1029 - 1036.

[2] Minassian V A, Stewart W F, Wood G C. Urinary incontinence in women: variation in prevalence estimates and risk factors[J]. Obstet Gynecol, 2008, 111(2 Pt 1): 324 - 331.

[3] Skorupski P, Miotla P, Jankiewicz K, *et al*. Polymorphism of the gene encoding alpha-1 chain of collagen type I and a risk of pelvic organ prolapse ——a preliminary study[J]. Ginekol Pol, 2007, 78(11): 852 - 855.

[4] Viktrup L. The risk of lower urinary tract symptoms five years after the first delivery[J]. Neurourol Urodyn, 2002, 21(1): 2 - 29.

[5] Tunn R, Goldammer K, Neymeyer J, *et al*. MRI morphology of the levator ani muscle, endopelvic fascia, and urethra in women with stress urinary incontinence[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, 126(2): 239 - 245.

[6] 陈 娟, 朗景和, 朱 兰, 等. 压力性尿失禁及盆底组织膨出患者肛提肌形态学的观察[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(8): 519 - 521.

[7] Otto L N, Slayden O D, Clark A L, *et al*. The rhesus macaque as an animal model for pelvic organ prolapse[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 186(3): 416 - 421.

[8] 董 黎, 张 曦, 王鲁文, 等. 孕期女性膀胱功能障碍研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(10): 1298 - 1300.

[9] Kim S, Harvey M A, Johnston S. A review of the epidemiology and pathophysiology of pelvic floor dysfunction: do racial differences matter? [J]. J Obstet Gynaecol Can, 2005, 27(3): 251 - 259.

[10] Bakas P, Liapis A, Salamalekis E, *et al*. Tension-free vaginal tape efficacy in relation to collagen quantity of pubocervical fascia[J]. Gynecol Obstet Invest, 2004, 57(3): 149 - 152.

[11] Bakas P G, Liapis A, Zervolea I, *et al*. mRNA assessment for procollagen production in women with genuine stress urinary incontinence[J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2004, 15(6): 429 - 431.

(编辑 汪勤俭)