论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1634-04

角质细胞生长因子对无排卵功血子宫内膜上皮细胞 PCNA、ER 和 PR 表达的影响

王 欣[1],程 湘[1],成 娅[1],刘 萍[1],林桂兰[1],杨合荣[2],王 惠[2] (第三军医大学:[1]新桥医院妇产科,重庆 400037,[2]西南医院妇产科,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 EEC 中增殖细胞核抗原 PCNA、雌激素受体 ER 和孕激素受体 PR 表达的影响。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,免疫组化法检测 PCNA、ER 和 PR 的表达变化,RT-PCR 检测 ER 和 PR mRNA 表达的变化。结果 免疫组化染色结果,PCNA 蛋白表达位于细胞核,ER 和 PR 蛋白表达主要位于细胞核内,少数可见细胞质着色;50 ng/ml KGF 作用后,正常组和功血组 PCNA 表达分别较作用前的对照组显著增高,ER 和 PR 表达分别较作用前的对照组显著增高($P<0.05$);PCNA 和 ER 表达的增加幅度在正常组和功血组之间无显著差异($P>0.05$);而功血组 PR 表达的增加幅度显著高于正常组($P<0.05$);50 ng/ml KGF 作用后,RT-PCR 方法检测正常组和功血组 ER 和 PR 的 mRNA 表达,分别较作用前的对照组显著增高($P<0.05$)。结论 KGF 对体外培养的无排卵型功血和正常的子宫内膜上皮细胞均有增加 PCNA、ER 和 PR 表达的作用,但增加程度有差异,提示两组的子宫内膜上皮细胞生长均受 KGF 的影响,但无排卵功血可能存在与正常的子宫内膜上皮细胞不同的生长机制。

关键词:无排卵型功血;子宫内膜上皮细胞;KGF;雌激素受体;孕激素受体;PCNA
中图法分类号:R329.25;R341;R711.520.2 文献标识码:A

Effect of keratinocyte growth factor on expressions of PCNA, ER and PR in cultured endometrial epithelial cells

WANG Xin[1], CHENG Xiang[1], CHENG Ya[1], LIU Ping[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 PCNA, ER and PR expressions of cultured endometrial epithelial cells (EECs) from the patients with anovulatory dysfunctional uterine bleeding (ADUB). Methods EECs from the patients with ADUB were separated and cultured with KGF of different concentration, with the normal EECs as control. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA), estrogen receptor (ER), and progesterone receptor (PR) were detected by immunocytochemistry. The mRNA expressions of ER and PR were determined by RT-PCR. Results PCNA was only expressed within nucleus. ER and PR proteins were mainly expressed within nucleus, and some also expressed in plasma. KGF (50 ng/ml) increased PCNA, ER and PR expressions in both ADUB and normal EECs ($P<0.05$). KGF (50 ng/ml) increased the mRNA expressions of ER and PR in both ADUB and normal EECs ($P<0.05$). The increment of PCNA and ER expressions in ADUB group was the same as that in normal group ($P>0.05$), but the increment of PR expressions in ADUB group was more than that in normal group ($P<0.05$). Conclusion KGF can increase PCNA, ER and PR expressions in cultured ADUB and normal EECs, but the increment in the two groups is significantly different, indicating that EECs from ADUB endometrium and normal endometrium react to the stimulation of KGF in different ways.

Key words: dysfunctional uterine bleeding; endometrium; epithelial cell; ER; PR; KGF; PCNA

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。最近的研究表明功血是在激素调节下子宫局部微环境发生改变的结果[1],其表现之一为子宫内膜修复缺陷。角质细胞生长因子(keratinocyte growth factor, KGF)是特

作者简介:王 欣,女,陕西省西安市人,硕士,主治医师,主要从事妇科内分泌及心理咨询方面的研究,现在兰州军区乌鲁木齐总医院感染控制科。电话:(0991)8344799
通信作者:程 湘,电话:(023)68774542
收稿日期:2007-09-24;修回日期:2008-04-05

异性促进上皮细胞生长分化的因子,在机体再上皮化过程中起重要作用[2]。研究表明,在功血患者增生过长的子宫内膜,KGF mRNA 表达降低[3]。我们以往的研究结果显示,无排卵性功血子宫内膜腺上皮的 ER 和 PR 的表达显著下降[4]。KGF 对无排卵型功血子宫内膜上皮细胞中 PCNA、ER 和 PR 表达有何影响目前尚不清楚。

本课题主要研究 KGF 对体外培养的无排卵型功血(anovulatory dysfunctional uterine bleeding,ADUB)子宫内膜上皮细胞(endometrial epithelial cell,EEC)的影响。将 KGF 加入到培养的 EEC 中作用后,应用微量噻唑蓝分析(Microculture Tetrazolium Test, MTT)法检测细胞的吸光度值、免疫细胞化学染色观察增殖细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen, PCNA)及雌激素受体(estrogen receptor, ER)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)的蛋白表达,RT-PCR 技术测定 ER 和 PR mRNA 的表达,以期了解 KGF 对无排卵型功血 EEC 中 PCNA、ER 和 PR 表达的影响,初步探讨无排卵型功血子宫内膜生长修复缺陷的分子机制。

1　材料与方法

1.1　主要仪器和试剂

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

1.1.2　KGF 配制　用含 0.5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基 2 ml 稀释 10 μg KGF(5 μg/ml),最终浓度为 10、20、50、100、200、500 ng/ml。

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

1.2　材料来源

2004 年 4 月至 2004 年 12 月在本院及西南医院就诊的部分妇科患者,年龄 27~52 岁。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)。①功血组:月经紊乱患者 30 例,经全身及妇科检查未发现有器质性病变,B 超时期诊刮,病理诊断增生期样子宫内膜 16 例,单纯性子宫内膜增生过长 14 例,符合无排卵型功血子宫内膜。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。经腹切除子宫后立即刮取内膜。病理诊断增殖期子宫内膜 9 例,分泌期子宫内膜 13 例,符合正常子宫内膜。所有患者术前 3 个月无使用激素类药物史。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。

1.3　MTT 显色实验

1.3.1　干预细胞　① 接种细胞:纯化后的无排卵型功血或正常 EEC 以 4×10^4/ml 的密度接种于 96 孔板中,培养 36 h;② 细胞同步化:换无血清 DMEM/F12 培养液再孵育 24 h,使细胞生长同步进入休止期。③ KGF 干预:换含不同浓度 KGF(0、10、20、50、100、200、500 ng/ml)的低血清培养液,作用 48 h 后换液测吸光度值。每组设 6 个复孔,每次实验重复 3 次。

1.3.2　吸光度值检测　每个孔内加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h,吸弃培养液,加入 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。

1.4　免疫细胞化学染色

1.4.1　子宫内膜上皮细胞的分离培养　参见文献[5]。

1.4.2　细胞爬片制备　① 纯化后的 EEC 接种于 24 孔板中培养 36 h。② 细胞同步化:换无血清 DMEM/F12 培养液孵育 24 h。③ KGF 干预:换含 50 ng/ml KGF 的低血清培养液,作用 48 h。对照组不加 KGF,换含 0.5% 胎牛血清的培养基继续培养 48 h。

1.4.3　免疫细胞化学染色　培养细胞 10% 甲醛固定,按照试剂盒说明书操作。

1.5　RT-PCR

1.5.1　样本制备　① 纯化后的 EEC 以 5×10^5 ml^{-1} 的细胞数接种于 50 ml 培养瓶中培养 36 h。② 细胞同步化:换无血清 DMEM/F12 培养液孵育 24 h。③ KGF 干预:换含 50 ng/ml KGF 的培养液,作用 48 h。对照组不加 KGF,换含 0.5% 胎牛血清的培养基培养 48 h。

1.5.2　RT-PCR 反应　按照试剂盒说明书操作。产物取 3 μl 在 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像仪进行分析,结果以目的片段光密度值/β-actin 光密度值表示。

1.6　统计学方法

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。

2　结果

2.1　免疫细胞化学结果

免疫细胞化学染色结果,PCNA 蛋白表达主要位于细胞核,呈棕黄色至深棕色,细胞质未见染色。通过前期我们观察不同浓度 KGF 对 EEC 生长的影响,选择 50 ng/ml KGF 作为刺激浓度[6]。50 ng/ml KGF 作用后,正常 + KGF 组和功血 + KGF 组 EEC 的 PCNA 表达分别较正常组和功血组增高,差异显著($P<0.05$)。正常 + KGF 组 PCNA 表达灰度值的增高幅度与正常组比较相似,差异不显著($P>0.05$)。ER 和 PR 蛋白表达阳性颗粒主要位于细胞核内,少数可见细胞质着色,呈棕黄色至深棕色,细胞质着色较细胞核着色稍浅;高倍镜下阳性染色呈颗粒状。50 ng/ml KGF 作用后,正常 + KGF 组和功血 + KGF 组 EEC 的 ER 和 PR 表达分别较正常组和功血组增高,差异显著($P<0.05$)。功血 + KGF 组 EEC 的 ER 表达灰度值的增高幅度与正常组比较相似,差异不显著($P>0.05$)。而功血 + KGF 组 EEC 的 PR 表达灰度值的增高幅度明显高于正常 + KGF 组,差异显著($P<0.05$)。见表 1,图 1、2。

表1 KGF 作用前后子宫内膜上皮细胞 PCNA、ER 和 PR 的灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	PCNA	ER	PR
正常组	197.67 ± 10.23	190.57 ± 5.39	195.71 ± 12.56
正常组 + KGF	229.93 ± 13.97[a]	227.64 ± 11.38[a]	210.11 ± 8.22[a]
功血组	183.08 ± 6.75	174.70 ± 8.19	175.31 ± 8.15
功血组 + KGF	213.71 ± 9.31[b]	203.21 ± 12.84[b]	208.00 ± 6.96[b]
Δ 正常组	32.26 ± 11.35	37.07 ± 10.23	14.40 ± 7.44
Δ 功血组	30.63 ± 7.54	28.51 ± 10.52	32.69 ± 8.35[c]

Δ 正常组 =(正常组 + KGF)灰度值 - 正常组灰度值;Δ 功血组 =(功血组 + KGF)灰度值 - 正常组灰度值;a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与功血组比较;c:$P < 0.05$,与△正常组比较

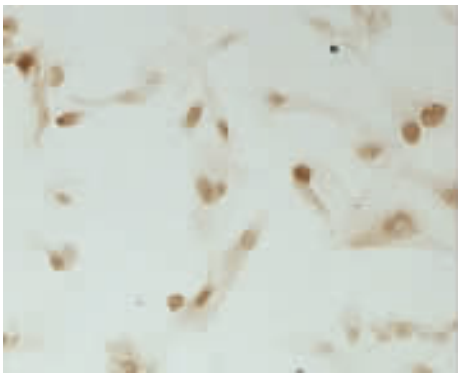


图1 功血 + KGF 组体外培养 EEC 的 ER 表达情况 (S-P ×400)

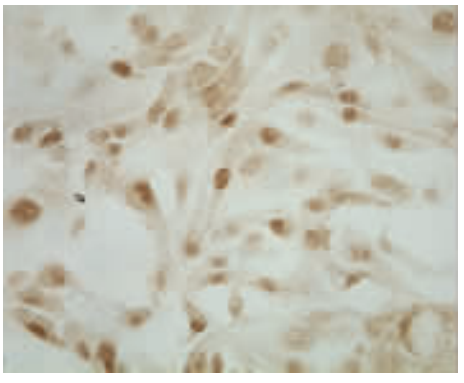
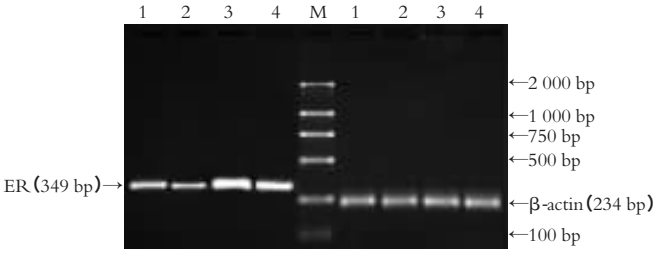


图2 正常 + KGF 组体外培养 EEC 的 ER 表达情况 (S-P ×400)

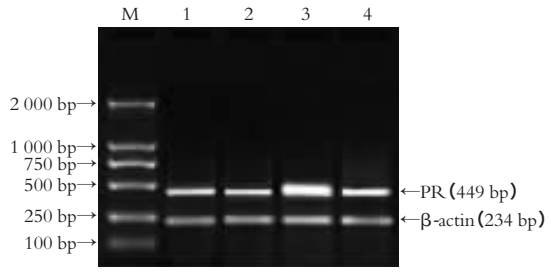
2.2 RT-PCR 结果

用 RT-PCR 方法对 EEC 中 ER 和 PR mRNA 进行检测,结果显示 50 ng/ml KGF 作用后,正常 + KGF 组和功血 + KGF 组 EEC 的 ER 和 PR mRNA 表达分别较正常组和功血组增高,差异显著($P < 0.05$)。见表2,图3,4。



1:正常组;2:功血组;3:正常 + KGF 组;4:功血 + KGF 组;M:DNA 标准

图3 KGF 对子宫内膜上皮细胞 ER mRNA 表达的影响



M:DNA 标准;1:正常组;2:功血组;3:正常 + KGF 组;4:功血 + KGF 组

图4 KGF 对子宫内膜上皮细胞 PR mRNA 表达的影响

表2 KGF 对子宫内膜上皮细胞 ER mRNA 和 PR mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ER/β-actin	PR/β-actin
正常组	1.078 ± 0.039	1.162 ± 0.042
正常组 + KGF	1.596 ± 0.105[a]	1.437 ± 0.063[a]
功血组	0.967 ± 0.065	1.083 ± 0.053
功血组 + KGF	1.418 ± 0.116[b]	1.310 ± 0.086[b]

a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与功血组比较

3 讨论

无排卵型功血(anovulatory dysfunctional uterine bleeding, ADUB)是临床常见病,目前主要采用雌孕激素、清宫术、子宫内膜切除和子宫切除等方法治疗[3]。雌孕激素治疗仅部分患者有效,部分患者顾虑副作用而拒绝该方法。子宫内膜切除和子宫切除为不可逆的有创性治疗,年轻患者慎用。因此,针对功血发病机制进行研究,寻找新的治疗途径非常必要。无排卵型功血的发病与子宫内膜止血和修复机制缺陷有关,而子宫内膜修复障碍起重要作用。子宫内膜生长修复包括上皮再生与血管再生。目前尚无资料表明 ADUB 的子宫内膜生长修复过程和机制是否与正常月经相同。作为性器官,正常月经子宫内膜修复受到雌孕激素作用的影响,而雌孕激素是通过其受体发挥作用的。文献报道,无排卵型功血子宫内膜组织增生程度不一,其 ER 和 PR 表达的情况,不同作者的研究结果差异较大。有文献报道,增生过长子宫内膜 ER 和 PR 的含量依子宫内膜的增生程度增加而呈下降趋势,另有报道发现二者无相关或呈相反的趋势,说明功血子宫内膜的增生具有异质性,二者之间的关系非常复杂[7-10]。我们以往的研究结果显示,从正常增生期、增生期样到单纯性增生过长子宫内膜,腺上皮 ER 和 PR 的表达依次显著下降。体外培养的无排卵型功血 EEC 的 ER 和 PR 表达也低于正常 EEC 的表达,与在体组织 ER、PR 的表达相一致[3]。

正常月经子宫内膜修复机制与伤口愈合机制相似,在大量调节因子的作用下完成。近期研究表明,无排卵型功血患者的激素生理功能和子宫内膜生长微环境往往不正常。子宫内膜生长的微环境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、相关酶及雌、孕激素受体等,相互间形成复杂的调控机制,共同调节着子宫内膜的正常生长和生理功能。在众多的生长因子中,KGF 是非常重要的影响子宫内膜生长的因子,特异性地促进子宫内膜上皮细胞生长。研究表明,在功血患者增生过长的子宫内膜,KGF mRNA 表达降低[9]。我们以往的研究结果显示,无排卵性功血子宫内膜腺上皮的 ER 和 PR 的表达显著下降[4]。因此我们采用培养的 EEC 进行体外实验,用免疫组化检测方法,观察 KGF 对子宫内膜上皮细胞 PCNA、ER 和 PR 表达的影响。结果表明,适当浓度的 KGF 可上调无排卵型功血及正常子宫内膜上皮细胞 PCNA、ER 和 PR 蛋白的表达;RT-PCR 结果也表明,KGF 可使 PCNA、ER 和 PR mRNA 的表达增加。说明 KGF 与其他生长因子一样,对 ER 和 PR 的表达均有上调作用。PCNA 是增殖细胞核抗原,其表达增高提示细胞生长能力增强,生长加速。我们前期的研究工作还发现,原代培养的无排卵型功血子宫内膜上皮细胞经不同浓度 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。对正常 EEC 给予不同浓度 KGF 后,得到相同结果。并且 KGF50 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、分泌的影响作用相当,表明 KGF 对子宫内膜上皮细胞的刺激作用呈剂量依赖性[6]。子宫内膜上皮细胞是雌激素和孕激素作用的靶向细胞,KGF 作用能够刺激细胞 PCNA、ER 和 PR 的表达增加,结果可能使该细胞对雌激素和孕激素的作用更加敏感,增生作用加强,子宫内膜修复过程加快,因此将来临床有可能应用增加 KGF 作用的方法来治疗无排卵型功血,提高治疗效果。

过去认为雌激素是通过与核内受体结合形成复合物而发挥作用的[11]。随着 ERβ 的发现,逐渐认识到雌激素及其受体的信号转导非常复杂,主要有以下 4 条途径:①依赖配体的经典途径;②不依赖配体的途径;③不依赖 ERE 的转录途径;④非转录途径。ER 可以在雌激素与生长因子的作用下发生磷酸化,但磷酸化的程度和途径并不相同,雌激素是通过 Casein 激酶Ⅱ系统使丝氨酸 Serl04、Serl06、Serll8 和 Serl67 这 4 个位点发生磷酸化,而生长因子如 EGF、IGF、TGF 等是通过激活 MAPK 级联系统促使上述 4 个位点的磷酸化。在雌激素应答的乳腺癌细胞系,生长因子和 E2 协同刺激细胞的增生,提示生长因子可以在雌激素的信号途径中表现出协同作用[12]。近年研究表明,无论雌激素存在与否,生长因子受体信号传导都能够调节 ER 的活性和 ER 的信号通路,进而调节其生物学作用[13]。KGF 与其受体结合所激活的信号级联反应参与调节雌激素与 ER 结合后引发的转录活动,提示在 KGF 与雌激素之间可能存在一个正反馈系统,低水平的雌激素可增强 KGF 的表达,KGF 也可增强 ER 的敏感性和表达,使其对低水平的雌激素产生有效的生物反应。月经期子宫内膜的修复可能与这一正反馈系统的正常作用有关。无排卵型功血患者的雌激素水平虽然较正常无明显升高,甚至低于正常水平,但子宫内膜激素受体表达减少,与这一正反馈系统作用失常有关。本实验和我们以往的实验研究结果显示,KGF 可上调 ER 和 PR 的表达,同时还可促进子宫内膜上皮细胞生长和分泌 CA125 并上调其 PCNA 表达这一结果表明,KGF 可能在无排卵型功血子宫内膜生长修复中起重要的促进作用,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Taylor R N, Lebovic D I, Hornung D, *et al*. Endocrine and paracrine regulation of endometrial angiogenesis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2001, 943:109 – 121.

[2] Werner S. Keratinocyte growth factor:a unique player in epithelial repair processes[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 1998, 9(2):153 – 165.

[3] 王　欣, 成　娅,程　湘. 无排卵功血子宫内膜生长修复相关因素的研究进展[J]. 临床军医杂志, 2007, 35(3):447 – 449.

[4] 王　欣,成　娅,程　湘, 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.

[5] 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.

[6] 程　湘,王　欣,成　娅,等. 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. [J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(3):247 – 250.

[7] Gold L I, Saxena B, Mittal K R, *et al*. Increased expression of transforming growth factor beta isoforms and basic fibroblast growth factor in complex hyperplasia and adenocarcinoma of the endometrium:evidence for paracrine and autocrine action[J]. Cancer Res, 1994, 54(9):2347 – 2358.

[8] 韩玉昆,刘　丽,苏　菊. 子宫内膜增生性病变中 Bcl-2、ER、PR 表达及相关性研究[J]. 天津医药, 2001, 29(9):523 – 525.

[9] Chakraborty S, Khurana N, Sharma J B, *et al*. Endometrial hormone receptors in women with dysfunctional uterine bleeding[J]. Arch Gynecol Obstet, 2005, 272(1):17 – 22.

[10] 罗　璐,朱凤川,曾耀英,等. 无排卵型功血患者子宫内膜 VEGF 和雌、孕激素受体的表达[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(2):196 – 200.

[11] Taniguchi F, Harada T, Sakamoto Y, *et al*. Activation of mitogen-activated protein kinase pathway by keratinocyte growth factor or fibroblast growth factor-10 promotes cell proliferation in human endometrial carcinoma cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(2):773 – 780.

[12] 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.

[13] Tamaru N, Hishikawa Y, Ejima K, *et al*. Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis in human breast cancer[J]. Lab Invest, 2004, 84(11):1460 – 1471.

(编辑　王小寒)