维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0846-05

月经过少子宫内膜中基质金属蛋白酶-11及基质金属蛋白酶抑制物-1表达及意义

周晓曦,袁 瑞,姚珍薇

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨基质金属蛋白酶-11(MMP-11)和基质金属蛋白抑制物-1(TIMP-1)在月经过少患者子宫内膜中的表达与月经过少发病机制的关系。方法:采用免疫组织化学S-P法检测MMP-11蛋白和TIMP-1蛋白在月经过少子宫内膜和正常子宫内膜中的表达。结果:月经过少组子宫内膜MMP-11蛋白表达在增殖期腺上皮和间质均显著低于正常子宫内膜($P<0.05$,$P<0.05$);月经过少组子宫内膜腺上皮中TIMP-1蛋白表达,在增殖期和分泌期均显著低于正常子宫内膜($P<0.05$,$P<0.05$)。而间质细胞TIMP-1蛋白表达在增殖期和分泌期与正常子宫内膜间质细胞差异无显著性($P>0.05$,$P>0.05$)。结论:MMP-11可能参与了子宫内膜的重建、增生。MMP-11的调节为多因素调节,TIMP-1仅是其中因素之一。

【关键词】子宫内膜;月经过少;基质金属蛋白酶-11;基质金属蛋白抑制物-1;免疫组化

【中国图书分类法分类号】R711.51 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-14

Expression of matrix metalloproteinases-11 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in endometrium of hypomenorrhea

ZHOU Xiaoxi, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of matrix metalloproteinases-11 (MMP-11) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 (TIMP-1) in endometrium of hypomenorrhea patients and its association with the pathogenesis of hypomenorrhea. *Methods*: Immunohistochemical S-P assay was used to detect the expression of MMP-11 protein and TIMP-1 protein in endometrium of hypomenorrhea patients and in normal endometrium. *Results*: MMP-11 expression in endometrial glandular cells and stromal cells of hypomenorrhea patients was lower than that of normal subjects ($P<0.05$, $P<0.05$). TIMP-1 expression in endometrial glandular cells was lower than that of normal subjects during the proliferative and secretory phases ($P<0.05$, $P<0.05$). TIMP-1 expression in stromal cells was not significiantly different between hypomenorrhea patients and normal subjects during the proliferative and secretory phases ($P>0.05$, $P>0.05$). *Conclusions*: MMP-11 might participate in the re-establishment and generation of endometrium. There are multiple factors in regulatoring the expression of MMP-11. TIMP-1 is just one of the factors.

【Key words】Endometrium; Hypomenorrhea; Matrix metalloproteinases-11; Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1; Immunohistochemistry

随着宫腔镜技术的广泛运用,临床发现一些月经过少的患者性激素测定正常,宫腔镜检查并无粘连、瘢痕存在,而是子宫内膜薄,色泽较白,表现为内膜发育不良,用雌激素周期治疗效果并不理想甚至无效。对于这类患者月经过少的发病机理目前尚不清楚,国内外尚无相关报道。近年来发现基质金属蛋白酶(MMPs)及其抑制物(TIMPs)表达于子宫内膜,并参与了月经发生、内膜重塑、内膜血管形成等。研究发现基质金属蛋白酶-11(MMP-11)主要表达于增殖期子宫内膜,认为其参与了子宫内膜的修复[1]。本研究采用免疫组化S-P法检测月经过少子宫内膜和正常子宫内膜中MMP-11和TIMP-1蛋白的表达,以探讨MMP-11及其抑制物TIMP-1与月经过少发病机制的关系。

作者介绍:周晓曦(1975-),女,硕士,主治医师,主要研究方向:妇科生殖与内分泌。

1 资料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 研究对象

2005 年 1 月～2006 年 5 月因月经过少就诊于重庆医科大学附属第一医院妇产科的患者 38 例。月经过少的诊断标准为月经量少于 30ml,或行经期少于 2 天。患者平均年龄为 29 岁(20～40 岁),性激素测定无异常,宫腔镜检查子宫内膜较薄,宫腔无粘连,之前患者未经性激素治疗。对照组为正常子宫内膜 30 例,取材于其它原因行宫腔镜检查,子宫内膜无病变者。标本取材后用 10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,制成 5μm 厚的石蜡切片。

1.2 方 法

MMP-11 和 TIMP-1 多克隆抗体及 SP 试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。操作按 SP 试剂盒要求进行,步骤如下:将制成石蜡切片的载玻片脱蜡,3%过氧化氢灭活内源性酶 15min,柠檬酸缓冲液微波热修复抗原,滴加非免疫性山羊血清以阻断非特异性抗原,加一抗 4℃过夜,后加生物素标记的二抗置于湿盒中常温 15min,链霉素抗生物素蛋白－过氧化物酶置于湿盒中常温 15min,新鲜配置的 DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。用已知阳性切片作为阳性对照,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断标准

MMP-11 和 TIMP-1 的阳性染色为棕褐色,分布于腺上皮细胞胞浆和胞膜及间质细胞胞浆,胞核不着色。选染色均匀区,按阳性细胞百分比:0 (0 分),0～10%(1 分),11%～50%(2 分),51%～100%(3 分);(2)按染色强度分:无染色为阴性 (0 分),黄色为弱阳性 (1 分),棕黄色为中度阳性(2 分),褐黄色或深棕色为强阳性(3 分)。将两个得分相乘,0 分为(－),1～3 分为(+),4～6 分为(++),7～9 分为(+++)。腺上皮细胞和间质细胞分别评分。

1.4 统计学方法

应用 SPSS12.0 统计软件,Mann-Whitney U 检验进行统计学处理。

2 结 果

2.1 子宫内膜 MMP-11 蛋白的表达

2.1.1 正常子宫内膜 MMP-11 蛋白的表达 (见表 1) MMP-11 蛋白可表达于正常子宫内膜的增殖期和分泌期。Mann-Whitney U 检验显示:增殖期腺上皮 MMP-11 蛋白表达高于分泌期,其差异有显著性意义(Z=-3.139, P<0.05)。增殖期间质 MMP-11 蛋白表达高于分泌期间质,其差异有显著性意义(Z=-2.634, P<0.05)。见图 1,2。

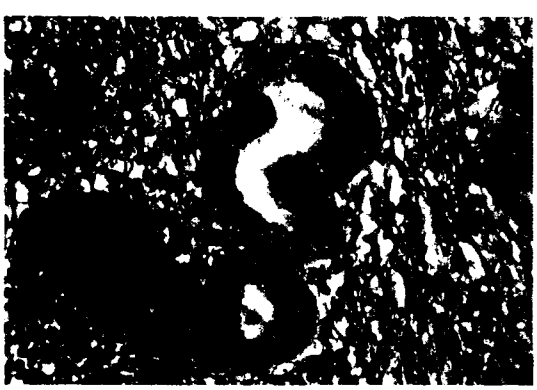


图 1 MMP-11 正常子宫内膜(增殖期)×200

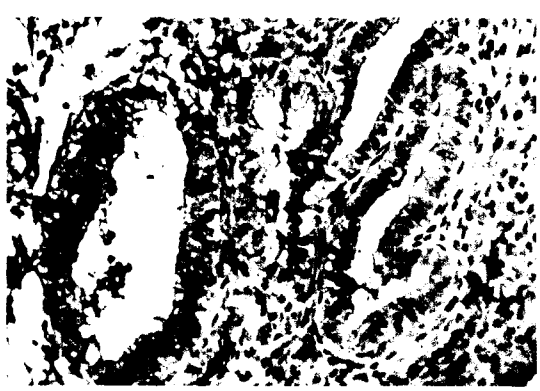


图 2 MMP-11 正常子宫内膜(分泌期)×200

2.1.2 月经过少子宫内膜 MMP-11 蛋白的表达,见表 1 月经过少组子宫内膜 MMP-11 蛋白表达在增殖期和分泌期的腺上皮的差异无显著性意义 (Z=-1.621, P>0.05);在间质中增殖期 MMP-11 蛋白表达高于分泌期,其差异有显著性意义(Z=-3.074, P<0.05)。见图 3,4。

2.1.3 正常与月经过少子宫内膜 MMP-11 蛋白的表达的比较 Mann-Whitney U 检验显示:(1)正常子宫内膜和月经过少子宫内膜腺上皮增殖期 MMP-11 蛋白表达,其差异有极显著性意义,正常组要明显高于月经过少组(Z=-3.127,P<0.05)。正常组在增殖期间质 MMP-11 蛋白表达要高于月经过少组, 其差异有显著性意义 (Z=-2.204,P<0.05)。(2)正常子宫内膜在分泌期腺上皮 MMP-11 蛋白的表达与月经过少组无显著性差异(Z=-0.832,P>0.05)。正常组在分泌期间质 MMP-11 蛋白的表达高于月经过少组, 其差异有显著性意义 (Z=-2.388,P<0.05)。

2.2 子宫内膜 TIMP-1 蛋白的表达

2.2.1 正常子宫内膜 TIMP-1 蛋白的表达 TIMP-1 蛋白在正常子宫内膜增殖期和分泌期腺上皮的表达都比较强, 其差异无显著性意义 (Z=-0.479,P>

维普资讯 http://www.cqvip.com

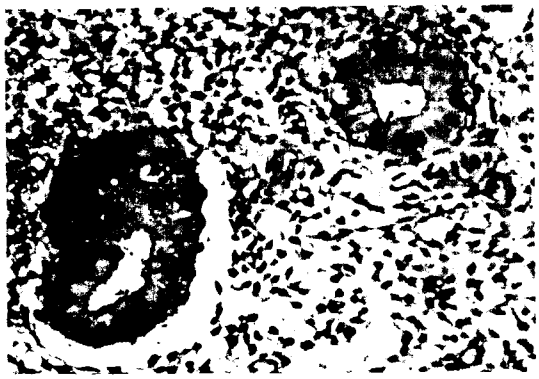


图 3 MMP-11 月经过少子宫内膜(增殖期)×200

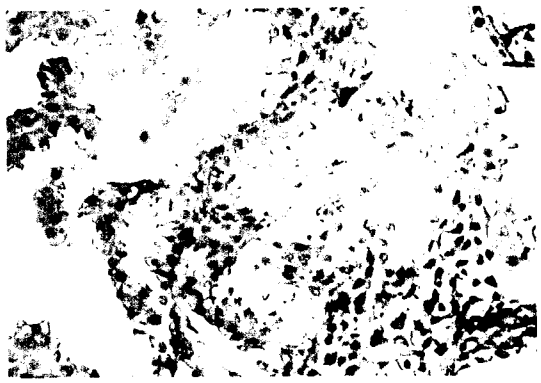


图 4 MMP-11 月经过少子宫内膜(分泌期)×200

表 1 月经过少子宫内膜与正常子宫内膜 MMP-11 的表达

分 组		例数	腺体 MMP-11 表达程度				间质 MMP-11 表达程度			
			−	+	++	+++	−	+	++	+++
正常子宫内膜	增生期	15	1	2	3	9	1	1	4	9
	分泌期	15	6	4	4	1	1	4	9	1
月经过少子宫内膜	增生期	20	6	5	8	1	2	1	14	3
	分泌期	18	9	6	2	1	10	2	5	1

0.05)，在间质中的表达差异无显著性意义（Z=−0.868，P>0.05)。见图 5,6。

2.2.2 月经过少子宫内膜 TIMP-1 蛋白的表达 月经过少组子宫内膜 TIMP-1 蛋白表达在增殖期和分泌期的腺上皮，差异无显著性意义(Z=−1.412，P>0.05)；在间质中增殖期和分泌期 TIMP-1 蛋白表达其差异也无显著性意义(Z=−0.368，P>0.05)见图 7,8。

2.2.3 正常与月经过少子宫内膜 TIMP-1 蛋白的表达的比较 Mann-Whitney U 检验显示：(1)正常子宫内膜和月经过少子宫内膜腺上皮增殖期 TIMP-1 蛋白表达，正常组 TIMP-1 蛋白表达高于月经过少组，其差异有显著性意义(Z=−2.890，P<0.05)。而增殖期间质中 TIMP-1 蛋白表达，正常组和异常组差异无显著性意义(Z=−0.927，P>0.05)。(2) 正常子宫内膜在分泌期腺上皮 TIMP-1 蛋白的表达与月经过少组其差异有显著性意义(Z=−3.119，P<0.05)。正常组在分泌期间质 TIMP-1 蛋白的表达与月经过少组差异无显著性意义(Z=−0.268，P>0.05)。

3 讨 论

基质金属蛋白酶(MMPs)是重要的蛋白水解酶之一，近年来发现 MMPs 不仅通过对细胞外基质



图 5 TIMP-1 正常子宫内膜（增殖期)×200



图 6 TIMP-1 正常子宫内膜(分泌期)×200

维普资讯 http://www.cqvip.com

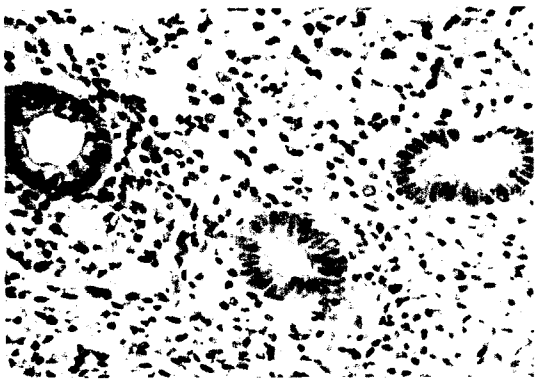


图 7 TIMP-1 月经过少子宫内膜(增殖期)×200

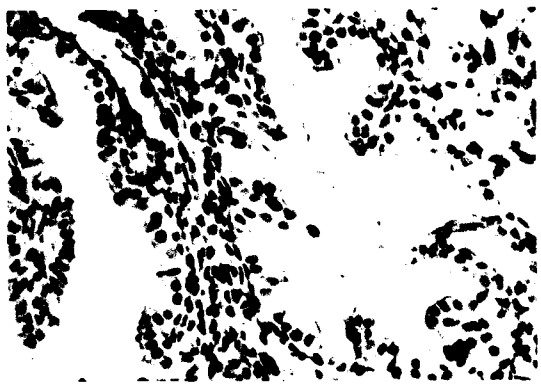


图 8 TIMP-1 月经过少子宫内膜(分泌期)×200

表 2 月经过少子宫内膜与正常子宫内膜 TIMP-1 的表达

分 组		例数	腺体 TIMP-11 表达程度				间质 TIMP-11 表达程度			
			−	+	++	+++	−	+	++	+++
正常子宫内膜	增殖期	15	2	1	3	9	1	2	4	8
	分泌期	15	1	2	5	7	2	1	7	5
月经过少子宫内膜	增殖期	20	2	8	9	1	2	1	9	8
	分泌期	18	7	5	4	2	1	1	8	8

(Extracellular matrix,ECM) 和基底膜(Basement membrane,BM)的降解作用和增强血管生成作用促进肿瘤的侵袭和转移,还在体内基质的合成和分解中起重要作用。MMPs 按底物不同可分为胶原酶(Collagenases)、间质溶素 (Stromelysins)、明胶酶(Gelatinases)、膜型基质金属蛋白酶(Membrane Type MMP MT-MMP)及其他金属弹力蛋白酶。

近年来许多学者对 MMPs 和 TIMPs 在月经周期中的表达研究甚多。总结 Graesslin O[2],Goffin[1]和 Pilka R[3,4]等学者发现,MMPs 在月经周期中的表达可归纳为四种模式:①主要在前月经期和月经期表达,有 MMP-1,-3,-8,-9,-10,-12;②主要在增殖期表达的有 MMP-7,-11,-2,MT3-MMP;③主要在围排卵期表达的有 MMP-26; ④在整个周期都有表达变化不大的有 MMP-13,-14,-16,-17,-19 及 MT1-MMP,MT2-MMP。TIMPs 的表达模式有三种:①TIMP-1,-2 在整个月经周期都有表达,且较稳定;②TIMP-3 在分泌晚期和月经期有明显增加;③TIMP-4 在增殖期增加,在分泌早期达到高峰,然后在以后阶段降低。MMPs 在不同时期表达的复杂性,说明了 MMPs 家族有着不同的功能,表达于月经期的 MMPs 起着降解 ECM 成分,导致组织崩溃的作用;表达于增殖期的 MMPs 和 TIMPs,主要作用在于促进内膜重塑,血管生成。

MMP-11 是间质溶素类的一种,也称为 Stromelysin 3。最早在早期乳腺癌中发现有 MMP-11 过度表达[5]。大多数 MMPs 以无活性的酶原形式分泌到细胞外,而其催化结构域中 Zn-半胱氨酸开关的破坏和随之发生的氨基(N)末端前肽水解,使 MMPs 得激活。而 MMP-11 和多数 MT-MMPs 被细胞内蛋白酶激活,以活性的形式分泌到细胞外,显示了 MMP-11 在 MMPs 家族中可能的独特作用。Goffin F 等通过 RT-PCR 对人正常子宫内膜研究发现:MMP-11 主要在增殖期有强烈表达。孕激素对 MMP-11 有降调节作用,所以在分泌期 MMP-11 表达下降,而在月经期 MMP-11 的表达又增加[1] 。

月经过少的子宫内膜中 MMP-11 的表达国内外还尚无报道,本研究中 MMP-11 蛋白表达在正常子宫内膜增殖期和分泌期和 Goffin F 等的研究是一致的。MMP-11 蛋白表达于正常子宫内膜的增殖期和分泌期。增殖期腺上皮和间质 MMP-11 蛋白均分别显著高于分泌期。增殖期腺上皮和间质 MMP-11 蛋白表达都较强,两者没有明显差异。分泌期腺上皮和间质 MMP-11 蛋白表达都较弱。研

维普资讯 http://www.cqvip.com

究中发现月经过少组子宫内膜 MMP-11 蛋白表达在增殖期腺上皮和间质均显著低于正常子宫内膜。而分泌期腺上皮月经过少组和正常组两者没有差异，间质中 MMP-11 蛋白表达正常组要高于月经过少组。

TIMPs 是 MMPs 活性的特异性抑制剂，在正常情况下保持平衡，维持体内基质合成和分解代谢的稳定。如前所述，TIMP-1 在整个月经周期都有表达。TIMP-1 蛋白表达在正常子宫内膜增殖期和分泌期都较强，腺上皮和间质没有差异。月经过少组子宫内膜腺上皮中 TIMP-1 蛋白表达，在增殖期和分泌期均显著低于正常子宫内膜。而间质中，在增殖期和分泌期与正常子宫内膜没有差异。不同之处体现在腺上皮上。TIMP-1 蛋白表达较正常组织弱，但 MMP-11 蛋白表达也表现为减弱，说明 TIMP-1 对 MMP-11 的调节不是唯一因素。本研究仅仅揭示了在月经过少子宫内膜中 MMP-11 和 TIMP-1 的改变情况，证明了 MMP-11 可能参与了子宫内膜的重建、增生，但 MMP-11 是怎样参与子宫内膜重建、以及调节 MMP-11 蛋白表达的因素有哪些还需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] Goffin F, Munaut C, FrankenneF, et al. Expression pattern of metalloproteinases in cycling human endometrium[J]. Biol Reprod, 2003; 69(3): 976-984.

[2] Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, et al. Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study[J]. Ann Oncol, 2006; 17(4): 637-645.

[3] Pilka R, Kudela M, Eriksson P. Casslen B MMP-26 mRNA and estrogen receptor alpha co-expression in normal and pathological endometrium[J]. Ceska Gynekol, 2005; 70(1): 56-62.

[4] Pilka R, Kudela M, Eriksson P. Casslen B Endometrial expression profiles of mRNA for selected matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-1[J]. Ceska Gynekol, 2004; 69(6): 472-476.

[5] Basset P, Bellocq JP, Wolf C, et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas[J]. Nature, 1990; 20: 699-704.

(上接第 821 页)

控制转基因 KGF 的表达，从而控制其治疗作用。本研究首次提出应用真核表达载体转染 KGF 基因进入靶细胞，避免了上述缺点，并通过真核表达载体研究 KGF 的作用机理。新型的治疗载体在设计上可控制转染基因的表达，从而降低毒副作用，提高疗效。克隆和构建可在真核细胞中表达 KGF 的的真核表达载体，将为进一步开展肺部疾病的 KGF 基因治疗的临床研究奠定基础。

参 考 文 献

[1] Frank L. Protective Effect of Keratinocyte Growth Factor against Lung Abnormalities Associated with Hyperoxia in Prematurely Born Rats[J]. Biol Neonate, 2003; 83(4): 263-272.

[2] Sugahara K, Iyama K, Kuroda MJ, et al. Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats[J]. J Pathol, 1998; 186(1): 90-98.

[3] Chelly N, Mouhieddine-Gueddiche OB, Barlier-Mur AM, et al. Keratinocyte growth factor enhances maturation of fetal rat lung type II cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999; 20(3): 423-432.

[4] Ray P, Devaux Y, Stolz DB, et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia[J]. PNAS, 2003; 100: 6098-6103.

[5] Morikawa O, Walker TA, Nielsen LD, et al. Effect of Adenovector-Mediated Gene Transfer of Keratinocyte Growth Factor on the Proliferation of Alveolar Type II Cells In Vitro and In Vivo[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000; 23: 626-635.

[6] Jay W, Ticbelaar, Wei Lu, et al. Conditional Expression of Fibroblast Growth Factor-7 in the Developing and Mature Lung[J]. J Biol Chem, 2000; 275(16): 11858-11864.