维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)03-0358-03

子宫内膜种植窗期基质金属蛋白酶-9及其抑制物-1的表达与雌孕激素关系

桂文武，丘　彦，辛贵邦，周永芳，王炼炼，熊秀梅

（重庆医科大学附属第一医院妇产科辅助生殖中心，重庆　400016）

【摘　要】目的：探讨内膜种植窗期基质金属蛋白酶-9（MMP-9）及组织金属蛋白酶抑制物-1（TIMP-1）与血清雌孕激素的关系。方法：选择排卵正常妇女的种植窗期子宫内膜31例，同时抽取其静脉血；用免疫组化法检测种植窗期子宫内膜组织中MMP-9/TIMP-1蛋白的表达；测定种植窗期血清雌（E_2）、孕激素（P）值。分析MMP-9/TIMP-1蛋白分别与血清E_2、P的相关性。结果：种植窗期子宫内膜组织中MMP-9/TIMP-1蛋白表达的光密度值分别为：0.163±0.025、0.143±0.015；同期血清E_2、P值分别为：182.153±45.774pg/ml、22.997±6.697ng/ml；MMP-9与血清P呈负相关性（$P<0.001$），TIMP-1与P无相关性（$P>0.05$）；MMP-9/TIMP-1与血清E_2均无相关性（$P>0.05$）。结论：MMP-9与血清P呈负相关，TIMP-1与P无相关性。MMP-9/TIMP-1与血清E_2均无相关性。

【关键词】MMP-9；TIMP-1；种植窗；雌激素；孕激素

【中国图书分类法分类号】R71　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2005-11-30

The relation between expression of MMP-9/TIMP-1 in the implantation window phase of endometrium and estrodial and progesteron

GUI Wenwu, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the relation between the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) / tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) protein in the implantation window endometrium phase and serum estradiol and progesterone. *Methods*: 31 women with regular ovulation were included to obtain endometrium samples in implantation window phase, and at the same time serum were abstracted from vein for E_2 and P testing. Immunohistochemical analysis was applied to measure the expression of MMP-9/TIMP-1 protein in the implantation window. Analysis the correlationship between MMP-9/TIMP-1 and E_2 and P. *Results*: The light dense of the expression of MMP-9 / TIMP-1 protein in the endometrium of implantation window were 0.163±0.025, 0.143±0.015 respectively, and the corresponding serum E_2, P were 182.153±45.774pg/ml, 22.997±6.697ng/ml respectively. There was negative correlationship between MMP-9 and P（$P<0.001$）, no correlationship was found between TIMP-1 and P, neither was MMP-9/TIMP-1 and E_2. *Conclusion*: MMP-9 and P were correlated negatively,however there was no correlationship were found between TIMP-1and P,and between MMP-9/TIMP-1 and E_2.

【Key words】Matrix metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Plantation window; Estradiol; Progesterone

胚胎植入是人类生殖过程的重要环节。子宫内膜种植窗期（implantation window）是胚泡着床的最佳时期，此时一系列因子在内膜上的表达与胚胎的植入密切相关，因此研究种植窗期某些因子的表达以及它们同激素的关系，可以为辅助生殖技术中的黄体支持治疗提供一些理论依据。先前关于基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinases-9，MMP-9）及其自身抑制物组织金属蛋白酶抑制物-1（tissue inhibitor of metalloproteinases-1，TIMP-1）在月经周期中表达的研究表明[1]，MMP-9从增生期到分泌期逐渐增强，以种植窗期表达最强，而TIMP-1的表达规律与MMP-9相似；MMP-9/TIMP-1在种植窗期的高表达可能参与了胚泡的着床，调节胚胎的植入过程。本研究拟探讨种植窗期内膜MMP-9/TIMP-1的表达与同期血清雌激素和孕激素的关系。

作者介绍：桂文武（1966-　），男，讲师，硕士，
主要研究方向：生殖内分泌和辅助生殖。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 标本来源

重庆医科大学附属第一医院辅助生殖中心 2002 年 4 月~2003 年 10 月间所获得的生育年龄妇女子宫内膜标本。入选标准:①因男性因素不孕在我中心就诊的年龄 23~35 岁的排卵正常妇女;②月经周期规则;③获取标本前 3 个月未使用过影响内分泌的药物(甾体激素);④取内膜周期避孕;⑤取内膜时宫腔内无异常发现;

1.2 标本的福选

经阴道 B 超连续监测卵泡生长,并动态测定尿 LH,于排卵后 2~10 天行内膜活检术。内膜分为两份,一份送病理检查确定组织学分期及作免疫组化染色;一份准备送电镜检查。同时抽静脉血 4ml,静置后分离无溶血血清,-20℃冰箱保存,以备血雌孕激素用;符合 Noyes 分期标准的分泌中期内膜,全部送电镜检查,镜下见到胞饮突(见图 1)者确定为种植窗期内膜[1],共 31 例。将这 31 例血清全部送检,测定雌孕激素值。

1.3 主要试剂及仪器

MMP-9 抗体、TIMP-1 抗体、超敏 SP 试剂盒和 DAB 显色剂均购自福州迈新公司。KYKY 1000B 型扫描电镜。CM-2000B 型生物医学图像分析系统。雌激素 EIA 试剂盒及孕激素 EIA 试剂盒均购自北京倍爱康生物技术有限公司。

1.4 方法

1.4.1 电镜标本制作及免疫组化染色见参考文献[1]。

1.4.2 磁酶免法 EIA 测定 种植窗期血清激素 E_2 和 P 的浓度:所有样品测定前均恢复至室温,严格按照试剂说明书操作,精密加液。E_2 与 P 的技术参数:

指标	批内变异系数	批间变异系数	灵敏度
E_2	<7.7%	<13.0%	<5pg/ml(18pmol/ml)
P	<3.9%	<10.8%	<0.15ng/ml(0.48nmol/ml)

1.5 结果观察与判断

免疫组化染色的观察及半定量测定:以细胞浆内有棕黄色颗粒沉着为阳性。用 CM-2000B 型图像分析系统测定每张切片阳性表达的光密度值。在 40×10 的高倍视野下,每张切片选择具有代表性的 5 个阳性视野,选取空白区定标,测定每个视野的光密度,求其平均值。

1.6 统计学处理

数据资料中计量资料均以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 软件系统进行 pearson 直线相关性分析。以 $P<0.05$ 为差异有显著性,以 $P<0.01$ 为差异有极显著性。

2 结 果

种植窗期 MMP-9 和 TIMP-1 的表达均为阳性(见图 2),其平均值光密度分别为:0.163±0.025;0.143±0.015。

种植窗期血清 E_2 和 P 的浓度平均值分别为:182.153±45.774pg/ml;22.997±6.697ng/ml。

种植窗期的雌孕激素按双侧估计 80%的界值分别为 E_2:123.5~240.8pg/ml,P:14.4~31.6ng/ml。

种植窗期期子宫内膜 MMP-9/TIMP-1 的表达分别与同期血清 E_2 和 P 的相关性。

3 讨 论

研究发现雌激素本身与 MMPs 的合成无关,但它的存在能促进孕酮抑制 MMPs 的释放,这可能是雌激素通过增加内膜孕酮受体数量,促进内膜对孕

表 1 子宫内膜 MMP-9/TIMP-1 的表达与血清 E_2 和 P 的相关系数(r)

	MMP-9	TIMP-1
E2	-0.185*	0.115*
P	-0.611**	0.274*

注:* 为相关关系无显著性,$P>0.05$;** 为相关关系有显著性,$P<0.001$。

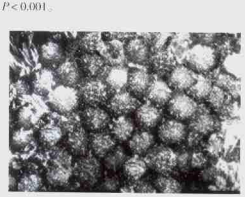


图 1 种植窗期子宫内膜扫描电镜图:示胞饮突结构,内膜表面被复上皮微绒毛细胞膜顶端出现的大而平滑的膜状突起,微绒毛完全消失,形状如蘑菇。×3000



图 2 种植窗期子宫内膜 MMP-9/TIMP-1 蛋白的表达,腺上皮细胞和基质细胞胞浆内见棕黄色颗粒沉着。DAB×400

维普资讯 http://www.cqvip.com

酮反应加强,进而抑制 MMPs 的合成与释放[2,3]。

本实验发现种植窗期 MMP-9 和血清 P 呈负相关($r=0.611, P<0.001$),TIMP-1 与血清 P 无相关性 ($r=0.274, P>0.05$),但有正相关趋势 (见表 1)。MMP-9/TIMP-1 与血清 E_2 浓度无相关关系 ($P>0.05$)。这一结果与 Marbarix 等[2]的研究结果相似。另有离体研究发现,P 撤退时子宫内膜组织可促使多种 MMPs 的合成与分泌,增加 P 浓度时 MMPs 的表达和活性受到抑制[4,5]。Salamonsen 等[5]作子宫内膜体外培养的月经模型时,发现 P 撤退时对 MMPs 抑制减弱,增加 MMPs 的表达和活性,而对 TIMPs 的表达和活性无影响,因而改变 MMPs/TIMPs 的比率,有利于组织的降解。Stao[6]和 Imada[7]等研究兔子时发现,孕激素能增加 TIMPs 的表达,起到抑制 MMPs 的作用。在分泌晚期,当未妊娠时黄体开始萎缩 P 逐渐下降,MMP-9 的活性增高,而 TIMP-1 的活性无改变,因而 MMP-9 /TIMP-1 的平衡发生改变,有利于宫内膜 ECM 的降解,使月经来潮[4,8]。月经期结缔组织降解只发生在局部,而直接受循环激素调节的降解酶类似乎应发生更普遍的降解,因此孕酮缺乏只是为 MMPs 的合成、分泌及活化提供合适的环境,对 MMPs 的调节不可简单化。

本实验显示 MMP-9 在分泌中期种植窗表达最强,如何解释 MMP-9 在种植窗表达量骤然增加这种现象,可能有以下几方面原因:①MMPs 除雌孕激素调节外,还受其它一些激素的影响[9],如 GnRH、hCG、糖皮质激素等。②MMPs 除受激素的全身调节外,还受多途径的局部调节[10],如宫内膜的自分泌、旁分泌、细胞调节等。③MMPs 存在多种因子的复杂调节 [5,10,11],如 EGF,IGFs,IL,LIT,TNF 等上调其表达;TGF-α、β 等则下调其表达。④MMPs 家族成员之间的相互激活和调控。MMPs 的活化是一种蛋白水解的级联放大机制,其中 MMP-3、MMP-10 参与了对其他成员的超活化 [12]。⑤P 在月经周期中对 MMPs 的调控具有双重性,高浓度 P 抑制 MMPs 的表达和活性,低水平 P 无调节作用[13]。因此虽然种植窗期 MMP-9 与 P 呈负相关,P 有下调 MMP-9 的作用,但 MMP-9 在分泌中期仍然呈高表达。

另外,本研究还对种植窗期雌孕激素值进行了探讨,按双侧估计 80%的界值分别为 E_2:123.5~240.8pg/ml,P:14.4~31.6ng/ml。这可以为今后种植窗期激素水平的调整提供有用参考,即可以通过黄体支持来调整种植窗期激素水平,从而调整种植窗期一些因子的表达,以提高胚胎种植率。

总之,种植窗期 MMP-9/TIMP-1 与雌孕激素的关系不可简单化,MMP-9/TIMP-1 的调节受多种因素的影响,其确切机制还有待进一步研究。如能搞清楚相互关系将有助于提高辅助生殖的妊娠率。

参 考 文 献

[1] 桂文武,丘 彦,曾品鸿,等. 排卵正常妇女子宫内膜种植窗期基质金属蛋白酶 -9 及其抑制物 -1 的表达特点及作用[J]. 重庆医科大学学报, 2004;29(1):1-4.

[2] Marbaix E, Kokorine I, Donnez J, et al. Rgulation and restricted expression of interstital collagenase suggest a picotal role in the initiation of menstruation[J]. Hum Reprod,1996;11(Suppl 21):134-143.

[3] Keller NK, Sierra-Rivera E, Eisenberg E, et al. Progesterone exposure prevents matrix metalloproteinase-3(MMP-3) stimulation by interlukin-1 alpha in human endometrial stromal cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000;85(4):1611-1619.

[4] Zhang J, Hampton AL, Nie G, et al. Progesterone inhibits activation of latent matrix metalloproteinase (MMP)-2 by membrane-bype 1 MMP:enzymes coordinately expressed in human endometrium[J]. Biol Reprod, 2000;62(1):85-94.

[5] Salamonsen LA, Butt AR, Hammond F R, et al. Production of endometrial matrix metallopteinases,but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone withdrowal in an in vitro model of mensteuation[J].J Clin Endocrinol Metab, 1997;82(5):1409-1415.

[6] Sato T, Ito A, Mori Y, et al. Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts.Modulation of synthesis of procollagenase, prostromelysin and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) by progesterone and oestradiol-17 beta [J]. Biochem J, 1991;275(Pt 3):645-650.

[7] Imada K, Ito A, Itoh Y, et al. Progesterone increases the production of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in rabbit uterine cervical fibroblasts[J]. FEBS Lett, 1994;341(1):109-112.

[8] Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, et al. Decreased tissue inhibitor of metallopteinase in the endometrium of women using depot medroxyprogesterone acetate: a role for altered endometrial matrix metalloproteinase/tissue inhibtor of metallopteinase balance in the pathogenesis of abnormal uterine bleeding[J]? Hum Reprod, 2002;17(5):1189-1198.

[9] Lin LS, Roberts VJ, Yen SS. Expression of human gonadotropin relesasing hormone receptor in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995;80(2):580-585.

[10] 王 晗,葛常辉,辛 毅,等. 雌/孕激素对围着床期小鼠子宫内膜明胶酶表达的影响[J].生殖与避孕, 2001;21(6):364-367.

(下转第 365 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

DCs提呈，刺激 CD_8^+ 和 CD_4^+ 两种受体细胞，从而提高抗肿瘤的细胞免疫效应，与装载肿瘤抗原肽的疫苗相比，融合细胞可以提供比较持久和稳定的肿瘤相关抗原。本实验提示，在混合淋巴细胞反应及细胞毒试验中，融合细胞具有一些特殊的优势，DCs/SGC7901 刺激同种异体 T 淋巴细胞增殖能力显著高于 DCs、DCs + SGC7901 及 SGC7901。并且随着刺激细胞与效应细胞的比例增加而升高。在细胞毒试验中，DCs/SGC-7901 诱导产生的 CTL 对胃癌细胞的杀伤效应为 21.4% ± 0.0165%，显著高出单纯 DCs（163% ± 00015%）和 SGC7901（112% ± 00156%）的刺激效能。本实验结果与 Matsumoto[12]报道的结果相似，同样显示出融合细胞具有强大的抗肿瘤免疫效应。体外试验的成功为融合疫苗在胃癌肿瘤免疫治疗的体内试验和临床应用研究提供了理论依据，有望通过进一步动物和临床应用研究找到一条治疗和预防胃癌的新途径，提高患者的生活质量和生存率。

在本实验采用的融合方法是 PEG 融合法，其和电融合法在功能上、生物学上有无差异；以及融合细胞的纯化分选，融合效率，在临床方面的具体应用，毒副作用以及剂量等诸多问题还有待进一步研究[13]。

参 考 文 献

[1] Nestle FO, Tun Kyi A, Gilliet M, et al. Vaccination therapy of malignant melanoma [J]. Ther Umsch, 1999;56(6):334-337.

[2] Milazzo C, Reichardt V L, Muller M, et al. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA[J]. Blood, 2003;101(3):977-982.

[3] Kono K, Takahashi A[J], Sugai H, et al. Dendritic cells pulsed with HER-2/neu-derived peptides can induce specific T-cell responses in patients with gastric cancer [J]. Clin Cancer Res, 2002;8(11):3394-3400.

[4] Baldev Vasir, Virginia Borges. fusion of dendritic cells with multiple myeloma cells results in maturation and enhanced antigen presentation [J]. British Journal of Haematology, 2005;129(5): 687-700.

[5] Homma S, Toda G, Gong J, et al . Preventive antitumor activity against hepatocellular carcinoma (HCC) induced by immunization with fusions of dendritic cells and HCC cells in mice[j]. J Gastroenterol, 2001;36(11):764-771.

[6] 盛立霞，邱国强，谢晓宝，等. 两种白血病细胞抗原负载 DC 的体外诱导特异性 CTL 应答的比较[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2005;21(2):205-209.

[7] Homma S, Kikuchi T, Ishiji N, et a1. Cancer immunotherapy by fusions of dendritic and tumour cells and rh-IL-12 [J]. European Journal of Clinical Investigation, 2005;35(4):279-286.

[8] Gong J, Chen D, Kashiwaba M, et a1. Induction of antitumor activity by with fusions of dendritic an carcinoma cells[J].Nat Med, 1997;3(5):558-561.

[9] Noopur R, Hideshima T, Davies F, et a1. Tumour cell/dendritic cell fusions as a vaccination strategy for multiple myeloma [J]. British Journal of Haematology, 2004;125(3):343.

[10] Koido S, Ohana M, Liu C, et al. Dendritic cells fused with human cancer cells: morphology, antigen expression, and T cell stimulation[J]. Clin Immunol, 2004;113(3):261-269.

[11] Homma S, Matai K, Irie M, et al. Immunotherapy using fusions of autologous dendritic cells and tumor cells showed effective clinical response in a patient with advanced gastric carcinoma [J]. J Gastroenterol, 2003;38(10):989-994.

[12] Saito H, Matsumoto S, Tsujitani S, et al. Allogeneic gastric cancer cell-dendritic cell hybrids induce tumor antigen (carcinoembryonic antigen) specific CD_8^+ T cells [J]. Journal of Clinical Oncology, 2005;23(16):2545.

[13] Lindner M, Schirrmacher V. Tumour cell dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylen-glycol versus electro-fusion protocols[J].Eur J Clin Invest, 2002;32(3):207-217.

（上接第 360 页）

[11] Bischof P, Meisser A, Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion-a review[J]. Placenta, 2000; 21(Suppl A): S550-560.

[12] Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, et al. Patterns of metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones [J]. J Clin Invest, 1994;94(3):946-953.

[13] Singer CF, Marbaix E, Kokorine I, et al. The matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) expression in the human endometrium is inversely regulated by interleukin-1 alpha and sex steroids [J]. Ceska-Gynekol, 2000;65(4):211-215.