维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0001－04

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

桂文武，丘　彦，曾品鸿，刘淑文，舒为群

(重庆医科大学临床学院妇产科辅助生殖中心，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨基质金属蛋白酶－9(MMP－9)和组织金属蛋白酶抑制物－1(TIMP－1)在排卵正常妇女子宫内膜种植窗期的表达特点，及其在胚泡植入中的作用。方法：选择排卵正常妇女的子宫内膜，用扫描电镜(SEM)确定分泌中期子宫内膜种植窗开放；用免疫组化法检测15例种植窗期子宫内膜组织中MMP－9/TIMP－1蛋白的表达，并与15例增生期、13例分泌早期、14例分泌晚期内膜的表达相比较。结果：MMP－9/TIMP－1在各期子宫内膜中均呈阳性表达，腺上皮细胞、腔上皮细胞和基质细胞胞浆内均可见棕黄色颗粒沉着。从增生期到分泌早期至种植窗期染色逐渐增强，以种植窗期最明显($P<0.05$)，分泌晚期略低于种植窗期，但明显高于分泌早期和增生期($P<0.05$)。结论：排卵正常妇女种植窗期子宫内膜高表达MMP－9/TIMP－1蛋白，可能参与了胚泡的着床，调节胚胎的植入过程。

【关键词】子宫内膜；种植窗；MMP－9；TIMP－1；胚泡植入

【中国图书分类法分类号】R321.3　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－07－01

Expression of matrix metalloproteinase－9 and tissue inhibitor of metalloproteinase－1 protein in the implantation window phase of endometrium in ovulation normal women

GUI Wenwu, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of matrix metalloproteinase－9 (MMP－9)/tissue inhibitor of metalloproteinase－1 (TIMP－1) protein in the implantation window endometrium phase in ovulation normal women and the role of MMP－9/TIMP－1 on embryo implantation. *Methods*: SEM was used to determine "implantation window" of the mid－secretive phase endometrium in ovulation－normal women. Immunohistochemical analysis was applied to measure the expression of MMP－9/TIMP－1 protein in the implantation window in 15 cases, and MMP－9/TIMP－1 expression in endometrium during different phases were compared. *Results*: MMP－9/TIMP－1 expression in endometrium was observed in luminal, glandular epithelium and stromal cells in different phases. The expression was lower in proliferative phase, and got to the summit in the implantation window and late secretive phase and it expressed significantly higher in the implantation window phase($P<0.05$). There was no difference between the implantation window and late secretive phase. *Conclusion*: Expression of MMP－9/TIMP－1 in the implantation window phase of endometrium is specific in ovulation normal women and may play an important role in regulating the depth of trophoblast invasion during embryo implantation.

【Key words】Endometrium; Implantation window; Matrix metalloproteinase－9; Tissue inhibitor of metalloproteinase－1; Embryo implantation

种植窗期是胚泡着床的最佳时期，此期的子宫内膜将发生一系列包括形态和生理、生化等方面的变化，分泌蛋白的质和量也有所不同，了解此时内膜的变化，已成为生殖内分泌学、辅助生殖技术的一大重点。近年来研究发现，基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其自身抑制物组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)在种植窗期高表达对胚胎着床有

作者介绍：桂文武(1966－　)男，主治医师，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

重要作用[1,2]。本研究拟通过 MMP－9 及 TIMP－1 在子宫内膜种植窗期表达的研究，探讨二者在胚胎植入中的作用。

1 材料与方法

1.1 标本来源

重庆医科大学临床学院辅助生殖中心 2001 年 4 月～2002 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 标本的分组

1.2.1 增生期宫内膜组

阴道 B 超监测卵泡生长，10mm≤卵泡＜18mm，内膜厚度≤10mm，同时尿 LH(－)前进行标本采集；宫内膜 HE 切片，符合 Noyes 分期标准的增生期内膜；符合条件的标本共 15 例。

1.2.2 分泌期宫内膜分组

阴道 B 超监测卵泡生长，当卵泡直径≥14mm 时开始测定尿 LH，在优势卵泡≥16mm，尿 LH(＋)后随机行内膜活检术。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。宫内膜 HE 切片，符合 Noyes 分期标准的分泌期内膜；

根据 Noyes 分期再将分泌期宫内膜分为三组：分泌期早期组：病理检查为分泌期早期者归为该组，共 13 例。种植窗期组：将病理检查为分泌中期的内膜全部送 SEM 检查，电镜见到胞饮突者入选该组，共 15 例。分泌期晚期组：病理检查为分泌期晚期者归为该组，共 14 例。

1.2.3 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。

1.2.4 方法

1.2.4.1 电镜标本制作

①新鲜内膜标本用 0.1mol/L 的 PBS(或生理盐水)清洗，去除血迹。②在 4℃条件下用 4%戊二醛固定 2～4h 后，用 0.1mol/L 的 PBS 缓冲。③在 4℃条件下用 O_sO_4 后固定 2h，取出用冰冻蒸馏水清洗 3 次。④2%单宁酸导电处理(过夜)。⑤在 30%、50%、70%、90%、100%的乙醇里逐级脱水，每级 10～15min。⑥乙醇配制 30%、50%、70%、90%、100%的叔丁醇逐级干燥，每级 10～15min。⑦加入少量 100%的叔丁醇液 N_2 冷冻，放入干燥仪内干燥 4～6h。⑧镀膜处理后观察。

1.2.4.2 免疫组化染色

采用 S－P 法：严格按照操作说明进行。阴性对照，用 PBS 代替一抗，其余步骤相同。

1.3 结果观察与判断

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。

1.4 统计学处理

计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用 SPSS 10.0 软件系统进行方差分析。

2 结 果

2.1 种植窗期扫描电镜(SEM)观察

表 1 各组标本 MMP－9 表达的光密度值测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	MMP－9	P			
①	15	0.068±0.0177		★	■	▲
②	13	0.086±0.0178	◆		■	▲
③	15	0.122±0.0183	◆◆	★★		○
④	14	0.111±0.0183	◆◆	★★	○	

注：①增生期组 ②分泌早期组 ③种植窗期组 ④分泌晚期组 多个样本均数间两两比较(方差齐同，选 Bonferron 法方差分析)

◆◆为与①比较 $P<0.01$ ◆为与①比较 $P<0.05$ ★★为与②比较 $P<0.01$ ★为与②比较 $P<0.05$ ■为与③比较 $P<0.01$ ▲为与④比较 $P<0.01$ ○为无意义

表 2 各组标本 TIMP－1 表达的光密度值测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	TIMP－1	P			
①	15	0.060±0.0193		★	■	▲
②	13	0.083±0.0138	◆		■	▲
③	15	0.106±0.0136	◆	★		○
④	14	0.103±0.0172	◆	★	○	

注：①增生期组 ②分泌早期组 ③种植窗期组 ④分泌晚期组 多个样本均数间两两比较(方差齐同，选 Bonferron 法方差分析)

◆为与①比较 $P<0.01$ ★为与②比较 $P<0.01$ ■为与③比较 $P<0.01$ ▲为与④比较 $P<0.01$ ○为无意义

SEM 下见示胞饮突(pinopodes)结构(图 2、3)。分泌期子宫内膜上皮发育良好的微绒毛细胞(microvilli cells，MV)占据大部分子宫腔表面，MV 逐渐肿胀、变粗，膜状突起形成，发展到整个细胞的顶部，MV 变短变少，相互融合，形成发育中的胞饮突，最后当微绒毛完全消失，膜状突起变大，高于纤毛细胞，就形成发育良好的胞饮突，形状如蘑菇，具有球

维普资讯 http://www.cqvip.com

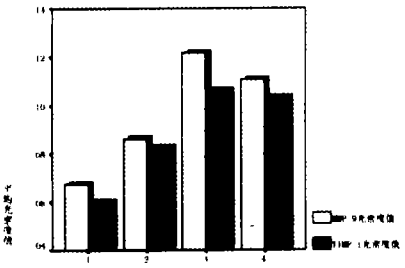


图 1 子宫内膜各组标本 MMP－9 与 TIMP－1 的光密度值测定结果

注:1.增生期组 2.分泌早期组 3.种植窗期组 4.分泌晚期组

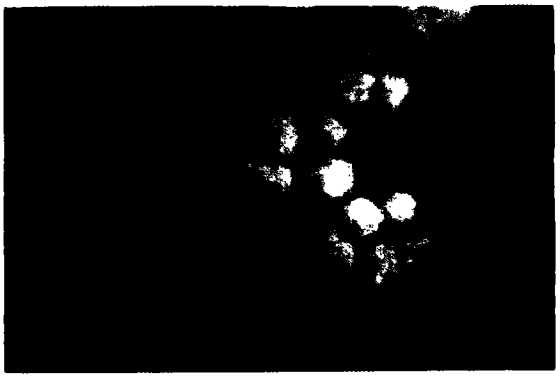


图 2 种植窗期子宫内膜扫描电镜图图示胞饮突结构,内膜表面呈现鹅卵石样外观

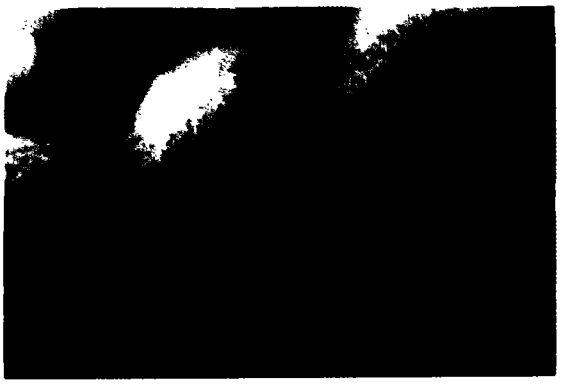


图 3 放大的胞饮突结构,外观如蘑菇状×5500



图 4 增生期子宫内膜 MMP－9/TIMP－1 蛋白的表达,腺上皮细胞和基质细胞胞浆内见少量的棕黄色颗粒沉着。DAB×400

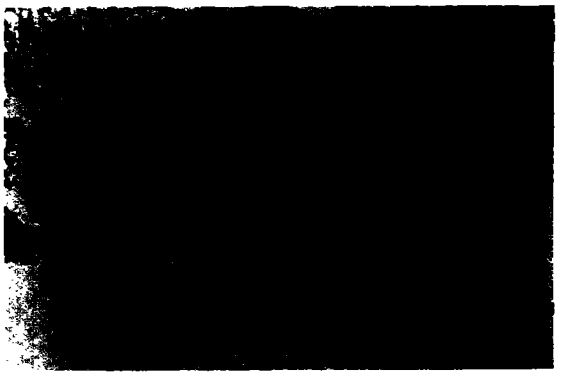


图 5 分泌早期子宫内膜 MMP－9/TIMP－1 蛋白的表达,腺上皮细胞和基质细胞胞浆内见中量的棕黄色颗粒沉着。DAB×400



图 6 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大量的棕黄色颗粒沉着。DAB×400



图 7 分泌晚期子宫内膜 MMP－9/TIMP－1 蛋白的表达,腺上皮细胞和基质细胞胞浆内见中量到大量的棕黄色颗粒沉着。DAB×400

形突起,使内膜表面呈现鹅卵石样外观。

2.2 各组宫内膜免疫组化染色

全部子宫内膜标本中 MMP－9/TIMP－1 蛋白均呈阳性表达,膜上皮细胞、腔上皮细胞及基质细胞胞浆内均有棕黄色颗粒沉着(图 4～7),但不同期别的内膜表达的强弱不同,种植窗期最强。经半定量测定分析,种植窗期、分泌晚期 MMP－9/TIMP－1

维普资讯 http://www.cqvip.com

的表达明显高于其它各期,与增生期比差异有极显著性($P<0.01$);与分泌早期比差异有显著性($P<0.05$)。(见表 1、2 及图 1)

3 讨 论

3.1 子宫内膜种植窗与胞饮突

正常子宫内膜只在很短的关键时期内允许胚胎着床,胚泡与子宫内膜双方必须同时分化到一段特定时间,着床才能成功,这要求来源于胚泡的滋养层发育到具有浸润能力阶段,即具有附着能力阶段,而子宫内膜处于可接受性状态即具有对胚泡的容受性阶段——"种植窗"或"着床窗"(implantation window/nidation window)。因此,"种植窗"可以定义为活化态胚胎与接受态子宫相互作用,有利于胚胎着床的短暂时期。一旦子宫出现接受态即"种植窗开放",便自动向非接受态转变即"种植窗关闭"。

胞饮突(pinopodes)是在扫描电镜下所见宫腔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。它可能与囊胚在子宫内膜的粘附、种植密切相关。现在越来越多的研究表明,胞饮突是子宫内膜容受性或种植窗开放的特异形态学标记[3~6]。因而本实验将胞饮突的出现作为确认种植窗开放的标志。

3.2 MMP—9/TIMP-1 在种植窗期的表达特点

本实验的各组子宫内膜标本中,MMP-9 都为阳性表达,腺上皮细胞、腔上皮细胞和基质细胞胞浆内均可见棕黄色物质沉着。从增生期到分泌期逐渐增强,以种植窗期表达最强。种植窗期、分泌晚期 MMP-9 的表达与增生期、分泌早期比较差异有显著性($P<0.01$);分泌晚期略低于种植窗期,差异无显著性($P>0.05$)。TIMP-1 在种植窗期和分泌晚期的表达与其它各期比较差异有显著性($P<0.05$),表达规律与 MMP-9 相似。这一结果与其他学者[7~9]的研究结果相似。

3.3 MMP—9/TIMP-1 与胚泡着床

胚胎种植包括胚泡与子宫内膜的粘附,滋养层细胞水解内膜并侵入基质。滋养层细胞对于宫内膜的浸润首先表现为细胞外基质的降解,MMPs 是特异降解细胞外基质的酶类,与胚泡植入密切相关,是胚泡滋养层侵入性标志。MMPs 在胚泡植入中的作用主要表现在以下几方面:①参与了子宫内膜的蜕膜化过程[10]。②参与胚泡着床过程中蜕膜的止血[11],防止由于滋养细胞的侵袭引起蜕膜出血而导致蜕膜剥离和流产。③参与子宫内膜血管的生成和维持,促进内膜的发育,营养着床后的胚胎。本实验中种植窗期 MMP-9 的表达特异性的增高,可能有利于分泌期的内膜蜕膜化,使细胞连接疏松,有利绒毛滋养层细胞穿透子宫内膜,使胚泡得以进入蜕膜中;此外 MMP-9 的高表达还与胎盘的血管形成有关[8]。另一方面,种植窗期 TIMP-1 的高表达,可以避免子宫内膜细胞外基质被 MMP-9 过度降解,阻止滋养层细胞的过度浸润[2],调节 MMP-9 的作用。洪丽华等[9]的研究表明,不明原因不孕妇女种植窗 MMP-9/TIMP-1 的表达明显弱于正常对照组种植窗的表达($P<0.05$),因而认为此类不孕妇女子宫内膜种植窗期 MMP-9 及 TIMP-1 的低表达,可能是影响胚胎着床导致不孕的重要因素之一。这从反面证明了 MMP-9/TIMP-1 在胚胎植入中的作用。

总之,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。

参 考 文 献

[1] Jeziorska M, Nagase H, Salamonsen LA, et al. Immunolocalization of the matrixmetalloproteinases gelatinase B and stromelysin 1 in human endometrium throughout the menstrual cycle[J]. Reprod Fertil, 1996; 107(1): 43-51.

[2] Nuttal RK, Kennedy TG. Epidermal growth factor and basic fibrolast growth factor increase the production of matrix metalloproteinases during in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells[J]. Endocrinology, 2000; 141(2): 629-636.

[3] Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice[J]. Hum Reprod; 1999; 14(suppl 2): 99-106.

[4] Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, et al. Surface morphology of the human endometrium[J]. Basic and clinical aspects. Ann N Y Acad Sci, 2000; 900: 316-324.

[5] 马艳华,刑福琪. 子宫内膜上皮细胞胞饮突与月经周期的关系[J]. 中华妇产科杂志, 2001; 36(11): 686.

[6] Nardo LG, Sabatini L, Rai R, et al. Pinopode expression during human implantation[J]. Eur Obstet Gynecol Reprod Biol, 2002; 101(2): 104-108.

(下转第 7 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

形成，sFasL 与膜结合型 FasL(mFasL)一样，仍具有与其受体 Fas 抗原交联促细胞凋亡作用，促进 Fas 抗原细胞的凋亡[6]

3.3 sFas 及 sFasL 的表达与内异症相关不孕

对 GnRH 激活的卵巢的体外研究显示，窦前卵泡的卵泡液所含的 sFas 水平明显高于闭锁卵泡的卵泡液，而正常窦前卵泡的卵泡液仅含极少量的 sFasL，提示 Fas－FasL 系统的可溶性形式在卵泡发育过程中有避免卵泡闭锁的作用[7]。本文结果显示：与慢性盆腔炎组及正常生育对照组相比，内异症组血清及腹腔液中 sFas 水平并无明显统计学差异，而同组间相比，血清内浓度明显高于腹腔液中水平，提示内异症不孕与机体及腹腔局部 sFas 水平增高导致的抗凋亡状态无明显相关，且腹腔液 sFas 水平是全身表现的一部分，并非受局部病变的刺激所产生的应激反应。

而另一方面，本文结果显示，内异症不孕患者血清和腹腔液内 sFasL 水平高于慢性盆腔炎致不孕组和生育对照组，这种差异以腹腔液中尤为明显，表明内异症所致不孕与 sFasL 水平增高，尤其是盆腹腔局部 sFasL 水平增高相关。结合前人报道，我们推测 sFasL 可能在内异症盆腹腔局部微环境改变致不孕中具有重要意义：腹腔局部 sFasL 水平过高可能与悬于其中的卵巢 GCs 的 Fas 抗原结合介导卵巢 GCs 的凋亡，促使卵泡过早过多闭锁，从而影响卵母细胞的发育和成熟并导致不孕。但能否将 sFasL 水平作为反应卵巢 GCs 凋亡的客观指标仍有待进一证实。

参 考 文 献

[1] Nakahara K, Sakai N, Saito T, et al. Incidence of apoptotic bodies in membrane granulose of the patients participating in an in vitro fertilization programe[J]. Fertil Seteril, 1997; 67(2): 302－308.

[2] Nakahara K, Saito H, Saito T, et al. The incidence of apoptotic bodies in membrane granulose can predict prognosis of ova from patients participating in an in vitro fertilization program[J]. Fertil Seteril, 1997; 68(2): 312－317.

[3] Hakuno N, Koji T, Yano T, et al. Fas/APO－1/CD95 system as a mediator of granulose cell apoptosis in ovarian folilicle atresia[J]. Endocrinology, 1996; 137(5): 1938－1948.

[4] Arici A. Is the endometrium or oocyte /embryo affected in endometriosis[J]. Hum Reprod, 1999; 14Suppl 2: 77－89.

[5] Cheng JH, Zhou T, Liu CD, et al. Protection from Fas mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule[J]. Science, 1994; 263: 1759－1762.

[6] Yamamoto M, Hirayama R, Naruse K, et al. Structure－activity relationship of hydroxamate－based inhibitors on membrance－bound fas ligand and TNF－alpha processing[J]. Drug Des Discov, 1999; 16(2): 119－130.

[7] Jose de los Santos M, Anderson DJ, Racowsky C, et al. Presence of Fas－Fas ligand system and bcl－2 gene products in cells and fluids from gonadotropin－stimulated human ovaries [J]. Biol Reprod, 2000; 63(6): 1811－1816.

(上接第 4 页)

[7] Soini Y, Alarakkola E, Autio－Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in noenoplastic and metoplastic endometrium [J]. Hum Pathol, 1997; 28(2): 220－226.

[8] 李 黎，陈士玲，刑福琪. 基质金属蛋白酶－9 及其抑制物－3 在人种植窗期子宫内膜的表达特点及作用[J]. 中华妇产科杂志，2000; 35(9): 544－546.

[9] 洪丽华，周馥贞，黄荷凤. 不明原因不孕妇女子宫内膜种植窗期 MMP－9 和 TIMP－1 的表达[J]. 浙江大学学报(医学版)，2002; 31(3): 159－162.

[10] Schatz F, Krikun G, Runic R, et al. Implications of decidualization－associated protease expression in implantation and menstruation[J]. Semin Reprod Endocrinol, 1999; 17(1): 3－12.

[11] Nuttal RK, Kennedy TG. Gelatinases A and B and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 2, and 3 during in vivo and in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells[J]. Biol Reprod, 1999; 60(2): 471－478.