

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01309

· 论 著 ·

纤溶酶原激活因子及抑制因子在多囊卵巢综合征患者卵巢中的表达

申景欣, 潘琼, 薛敏*

中南大学湘雅三医院妇科, 长沙 410013

[摘要] **目的** 探讨纤溶酶原激活因子[组织型纤溶酶原激活因子(t-PA)、尿激酶型纤溶酶原激活因子(u-PA)]及其抑制因子1(PAI-1)与多囊卵巢综合征(PCOS)发病机制之间的关联。**方法** 选择2007年12月至2008年10月于中南大学湘雅三医院接受宫腹腔镜检查及手术的PCOS患者共30例及正常卵巢活检标本20例,用化学发光法检测血清性激素水平,免疫组化方法检测t-PA、u-PA及PAI-1的表达。**结果** PCOS组u-PA、t-PA在颗粒细胞中表达阳性率分别为20.00%及26.67%,在卵泡膜细胞中表达阳性率分别为33.33%及20.00%,对照组u-PA、t-PA在颗粒细胞中表达阳性率分别为65.00%及75.00%,在卵泡膜细胞中表达阳性率分别为75.00%及50.00%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。PCOS组PAI-1在卵泡膜细胞中表达阳性率为56.67%,在间质细胞中表达阳性率为63.33%,对照组PAI-1在卵泡膜细胞中表达阳性率为10.00%,在间质细胞中表达阳性率为10.00%,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** PCOS患者卵巢组织中纤溶酶原激活、抑制因子的异常表达与PCOS排卵障碍的发生密切相关。

[关键词] 多囊卵巢综合征;纤溶酶原激活物;纤溶酶原激活因子抑制因子1;卵巢

[中图分类号] R 711.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1309-05

Expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in ovarian of patients with polycystic ovary syndrome

SHEN Jing-xin, PAN Qiong, XUE Min*

Department of Gynecology, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the association of polycystic ovary syndrome (PCOS) with plasminogen activator (tissue-type plasminogen activator [t-PA], urokinase-type plasminogen activator [u-PA]) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). **Methods** The ovary tissues of 30 PCOS patients who were treated in our hospital from Dec. 2007 to Oct. 2008 and 20 healthy controls were collected. The expression of t-PA, u-PA, and PAI-1 was examined by immunohistochemistry method. **Results** In PCOS group, the positive rates of u-PA, t-PA in the granulosa cells were 20.00% and 26.67%, and in the theca cells were 33.33% and 20.00%, respectively; in the control group, the positive rates of u-PA, t-PA in the granulosa cells were 65.00% and 75.00%, in the theca cells were 75.00% and 50.00%, respectively; and there were significant differences between the two groups ($P<0.05$). In PCOS group, the positive rate of PAI-1 was 56.67% in the theca cells and 63.33% in interstitial cells; in the control group, the positive rates of PAI-1 were 10.00% both in the theca cells and the interstitial cells; and there were significant differences between the two groups ($P<0.05$). **Conclusion** The disruption of plasminogen activator system may be involved in ovulation disorder of PCOS.

[Key words] polycystic ovary syndrome; plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor 1; ovary

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12):1309-1313]

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是妇科最常见的内分泌紊乱性疾病,其发病机制复杂,至今尚未阐明。纤溶酶原激活因子(plasminogen activator, PA)是卵巢蛋白基质水解过程中一种重要的局部调节因子,在卵巢局部起作用,在卵

泡发育各阶段通过调节卵巢功能而影响排卵^[1-2]。纤溶酶原激活因子抑制因子1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)是其主要抑制剂。近年研究发现PCOS患者PA和PAI-1的表达发生改变^[3-5],提示PA和PAI-1可能与PCOS发病有关。本研究

[收稿日期] 2010-09-14 **[接受日期]** 2010-11-26

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金(B2006-027), Supported by Scientific Research Foundation of the Health Ministry of Hunan Province (B2006-027).

[作者简介] 申景欣, 硕士, 医师. E-mail: shenjingxin@gmail.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0731-88618221, E-mail: xuemin5908@sina.com

旨在探讨纤溶酶原激活因子及抑制因子与 PCOS 发病机制的关系。

1 资料和方法

1.1 研究对象 PCOS 组:2007 年 12 月至 2008 年 10 月于我院接受腹腔镜检查及手术的 PCOS 患者共 30 例(PCOS 组)。纳入标准以 2003 年 10 月欧洲人类生殖学会(ESHRE)和美国生殖医学学会(ASRM)于荷兰鹿特丹会议上修订的 PCOS 诊断标准为依据^[6]。对照组:同期因输卵管原因不孕或行输卵管结扎行腹腔镜检查未发现卵巢异常的生育期妇女共 20 例,无月经紊乱及血清性激素水平异常,近 3 个月内无激素类药物服用史。两组患者年龄、病程比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。本课题已通过伦理委员会审批,且所有患者均签署知情同意书。

1.2 收集一般资料 测量身高(m)、体质量(kg)、腰围、臀围,计算体质指数(BMI)和腰臀比(WHR)。

1.3 标本采集 (1)两组妇女均于月经周期第 3~5 天(PCOS 闭经者超声检查无优势卵泡)晨采空腹静脉血 5 ml,离心后取血清,化学发光法检测血清性激素。(2)两组妇女均于月经干净后 3~7 d 行腹腔镜手术(3 例闭经患者择期手术),采用日本 Olympus 电视腹腔镜进行手术,观察卵巢表面形态特征。腹腔镜检镜下活检双侧卵巢组织,深至髓质。

1.4 免疫组化测定 一抗均购自武汉博士德生物工程公司。取上述 50 例标本的石蜡切片,组织型 PA(t-PA)、尿激酶型 PA(u-PA)、PAI-1 抗原均采用免疫组化 SP 染色法,具体步骤如下:石蜡切片经二甲苯脱蜡,加过氧化酶阻断液阻断内源性过氧化物酶的活性,枸橼酸盐微波炉修复抗原,用正常山羊血清工作液减少非特异性背景。滴加第一抗体[兔抗人 t-PA(1:100)、u-PA(1:100)、PAI-1(1:100)多克隆抗体],滴加生物素标记山羊抗兔 IgG,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色。以抗原稀释液代替一抗作为阴性对照。

结果分别由两名有经验的病理医生在未知任何

临床与病理资料的情况下根据 1992 年 Pavelivtic 组织半定量方法进行评定。当两位医生判断结果不一致时,采取共同讨论决定。t-PA、u-PA 及 PAI-1 定位于颗粒细胞、卵泡膜细胞和间质细胞的胞质或胞核中,以胞质或胞核内出现棕黄色、棕褐色颗粒的细胞作为阳性细胞。结果评定根据细胞胞质或胞核的染色程度(A)及染色细胞百分率(B)进行评分,首先将染色强度打分:0 分为无色,1 分为浅棕黄色,2 分为棕黄色,3 分为棕褐色。镜下选择 10 个卵泡,计算其颗粒细胞、卵泡膜细胞平均阳性百分率;镜下选择 10 个高倍视野 1 000 个细胞,计算其间质细胞平均阳性百分率。根据平均阳性细胞的百分率,共分为 4 个等级,0 分:无阳性细胞;1 分:阳性细胞 10%;2 分:阳性细胞 11%~50%;3 分:阳性细胞 51%~75%;4 分:阳性细胞>75%。积分数=A×B。A×B=0 判断为(-),A×B=1~2 判断为(+),A×B=3~4 判断为(++),A×B=6~9 判断为(+++)。染色强度与平均阳性细胞百分比的乘积>+,视为免疫反应阳性,+及+以下为阴性,+++为强阳性,凡显色强度与背景无明显差别者为阴性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述,两组间各项指标比较首先采用正态性检验和方差齐性检验,若方差齐则用两独立样本 *t* 检验,若方差不齐则用近似 *t* (*t'*) 检验。等级资料采用 Mann-Whitney *U* 法。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般资料及女性激素测定结果 两组 BMI 和 WHR 差异无统计学意义 [(25.36 ± 3.67) vs (23.97 ± 2.88) kg/m², $P>0.05$; (0.84 ± 0.05) vs (0.83 ± 0.03), $P>0.05$]。PCOS 组黄体生成素(LH)、黄体生成素/卵泡刺激素(LH/FSH)、睾酮(T)测定值均高于对照组,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$),两组间 FSH、雌二醇(E₂)、孕酮(P)、催乳素(PRL)比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 女性激素测定结果

Tab 1 Determination of female hormone levels

Group	<i>n</i>	FSH <i>z</i> _B /(U·L ⁻¹)	LH <i>z</i> _B /(U·L ⁻¹)	LH/FSH	E ₂ <i>c</i> _B /(pmol·L ⁻¹)	P <i>ρ</i> _B /(μg·L ⁻¹)	T <i>ρ</i> _B /(μg·L ⁻¹)	PRL <i>ρ</i> _B /(μg·L ⁻¹)
PCOS	30	5.43±2.07	11.35±4.17*	1.89±0.85*	187.74±62.45	0.52±0.14	50.47±15.74*	21.30±7.01
Control	20	4.86±2.51	6.34±2.15	0.76±0.45	191.51±34.10	0.45±0.26	23.58±10.56	19.98±5.16

PCOS: Polycystic ovary syndrome; FSH: Follicle-stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone; E₂: Estradiol; P: Progesterone; T: Testosterone; PRL: Prolactin. * $P<0.05$ vs control group

2.2 u-PA、t-PA 及 PAI-1 在 PCOS 组及对照组的

蛋白表达 由图 1 及表 2 可见:(1) u-PA 在 PCOS

组卵泡膜细胞及颗粒细胞中呈弱阳性表达, 均比对照组弱 ($P < 0.01$); 在间质细胞中呈弱阳性表达, 与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在正常对照组, 颗粒细胞、卵泡膜细胞上的染色明显要比间质细胞强, 呈强阳性表达。(2) t-PA 在 PCOS 组间质细胞中弱阳性表达, 与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 颗粒细胞、卵泡膜细胞均呈弱阳性表达, 比对

照组弱 ($P < 0.01$)。正常对照组卵巢中的 t-PA 在颗粒细胞上呈强阳性表达, 较卵泡膜细胞及间质细胞强。(3) PAI-1 在 PCOS 组间质细胞中呈强阳性表达, 比对照组强 ($P < 0.01$); 在卵泡膜细胞中呈阳性表达, 比对照组强 ($P < 0.01$), 而颗粒细胞中弱阳性表达, 与对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

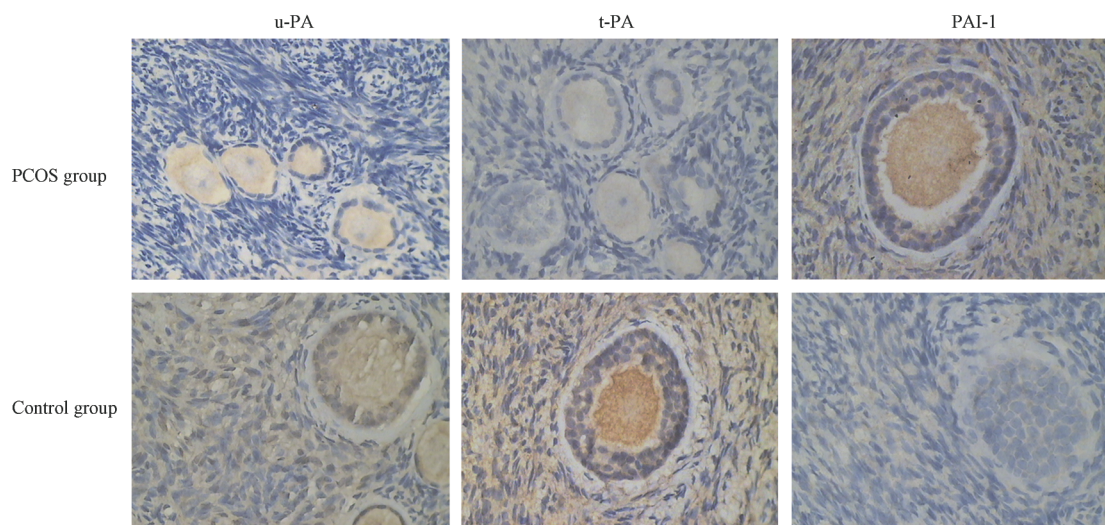


图 1 u-PA、t-PA 及 PAI-1 在 PCOS 组及正常对照组的免疫组化染色图

Fig 1 Immunohistochemical images of u-PA, t-PA, and PAI-1 expression in PCOS group and healthy control group

Original magnification: $\times 400$

表 2 u-PA、t-PA 及 PAI-1 在 PCOS 组及正常对照组的表达结果

Tab 2 Expression of u-PA, t-PA, and PAI-1 in PCOS group and control group

Protein	Group	Granulosa cells					Theca cells					Interstitial cells				
		-	+	++	+++	Positive rate	-	+	++	+++	Positive rate	-	+	++	+++	Positive rate
u-PA	PCOS ($n=30$)	10	14	5	1	20.00%	8	12	9	1	33.33%	11	14	4	1	16.67%
	Control ($n=20$)	3	4	8	5	65.00%	1	4	9	6	75.00%	7	9	3	1	20.00%
	<i>P</i>					0.003					0.001					0.814
t-PA	PCOS ($n=30$)	9	13	6	2	26.67%	10	14	5	1	20.00%	10	15	4	1	16.67%
	Control ($n=20$)	2	3	11	4	75.00%	1	9	6	4	50.00%	5	10	5	0	25.00%
	<i>P</i>					0.002					0.004					0.450
PAI-1	PCOS ($n=30$)	8	12	7	3	33.33%	6	7	10	7	56.67%	5	6	12	7	63.33%
	Control ($n=20$)	10	3	6	1	23.33%	7	11	1	1	10.00%	6	12	2	0	10.00%
	<i>P</i>					0.314					0.007					0.001

3 讨论

纤溶酶原系统包括纤溶酶原激活因子和纤溶酶原激活因子抑制因子, 其主要功能是将纤溶酶原激活为纤溶酶, 纤溶酶则通过打开纤维蛋白分子的 Arg-x 和 Lys-x 键, 降解细胞外基质 (ECM) 和基底膜。纤溶酶原激活因子分为两种类型: 组织型 (t-PA) 和尿激酶型 (u-PA)。颗粒细胞主要产生 t-PA, 它占卵泡 PA 活性的 80%~90%, 起主要作用; 卵

膜细胞主要产生 u-PA, 占卵泡 PA 活性的 10%^[2]。纤溶酶原激活因子抑制因子 (PAI) 主要有两种: 血管内皮型 (PAI-1) 和胎盘型 (PAI-2)。而 PAI-1 起主导作用, 是 PA 特异的抑制因子, 能与 PA 以 1:1 比例形成复合物, 抑制 PA 的活性, 阻碍细胞外基质和基底膜降解。

3.1 纤溶酶原系统在 PCOS 卵泡发育及成熟中的作用 纤溶酶原活化在卵泡发育及成熟的生理病理过程中起着非常重要的作用, 因此纤溶酶原系统的

异常与PCOS的发病机制有着密切的关系。正常卵巢滤泡发育与成熟过程中,在促性腺激素作用下,卵泡膜细胞和间质细胞中PAI-1活性下降,颗粒细胞中t-PA活性上升。卵泡的募集主要与卵巢局部因子有关,有研究证明卵巢中表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)作用于颗粒细胞,刺激卵泡生长,PCOS卵泡颗粒细胞中EGF及其受体表达较正常明显升高,颗粒细胞受EGF/GF- α 系统的过度刺激,造成颗粒细胞大量增殖,募集大量未成熟的小卵泡,影响卵巢排卵^[7]。国外研究显示,PCOS患者外周血中t-PA含量检测较正常人低,在肥胖PCOS患者中差异更明显,提示PCOS患者纤溶能力减退^[3]。而PCOS患者中PAI-1较正常人含量高,患者抗纤溶能力增强^[4]。

本研究证明,u-PA、t-PA在PCOS组卵巢颗粒细胞中表达较对照组明显减弱,PAI-1在PCOS组卵泡膜细胞和间质细胞上的表达较对照组明显增强。u-PA在PCOS组卵巢颗粒细胞中的降低,可能会因此而减弱其对颗粒细胞的作用,从而阻碍卵泡的发育和优势卵泡的募集。PAI-1在PCOS卵泡膜细胞和间质细胞中表达升高,进一步提示卵巢对u-PA的作用不敏感,因此失去了u-PA的正常控制作用,导致卵泡发育异常,募集大量小卵泡,而无成熟卵泡发育。这与Yildiz等^[5]的研究结果一致,提示纤溶酶原系统可能与PCOS发病有关。

3.2 纤溶酶原系统表达失常与PCOS排卵障碍的关系 纤溶酶原系统参与排卵过程中的众多环节,如卵巢蛋白水解、降解滤泡壁、排卵时基底膜与卵泡周围间质消失、卵泡晕的蛋白溶解消化、缝隙连接的断裂。其中任何一个步骤发生障碍,都可能影响排卵。纤溶酶原激活因子促进纤溶酶原转换成纤溶酶,由纤溶酶和金属蛋白酶一起组成的酶解系统降解几乎所有类型的细胞外基质,在组织损伤修复、炎症反应等病理生理过程中起重要作用^[8]。有活性的纤溶酶将纤维蛋白、胶原和滤泡壁等水解成可溶性物质。纤溶酶原激活因子还能通过激活纤溶酶原,将无活性的前胶原酶激活为胶原酶,胶原酶是排卵时基底膜与卵泡周围间质的降解的必要条件。PAI-1是特异的PA活性抑制因子,能以1:1比例与PA形成复合物,抑制PA活性,阻碍细胞外基质和纤维蛋白降解,局部与PA协同表达,共同调节排卵。纤溶酶原系统表达失常,将失去对排卵过程的正常调控,导致了PCOS排卵障碍。

本研究结果提示,PCOS患者PA系统表现异常,t-PA、u-PA水平下降,而PAI-1水平升高。PA系统的这种平衡失调,在卵巢的细胞水平导致受损

的囊泡进一步破坏,从而导致卵巢最终不排卵^[9],与Glueck等^[10]、Devin等^[11]对PCOS大鼠卵巢细胞上的PAI-1呈高度表达的研究结果相一致。对PCOS患者PAI-1基因启动子区4G及5G多态基因检测结果提示,4G基因可能与PCOS的发病有关,4G基因型可能通过影响血浆PAI-1水平而影响卵巢排卵,影响子宫内膜与胎盘局部凝血,导致胚胎发育障碍而发生自然流产^[10,12]。

总之,纤溶酶原系统对卵泡发育与成熟、黄体萎缩有重要作用,在卵泡发育各阶段通过对卵巢功能调节参与排卵。纤溶酶原系统在PCOS卵巢组织上的异常分布、表达提示,它与PCOS发病关系密切。如能在基因水平研究纤溶酶原系统mRNA在PCOS患者卵巢上的表达则可进一步了解纤溶酶原系统与PCOS发病的关系,为临床诊断与治疗提供实验依据。

[参考文献]

[1] Liu K, Feng Q, Gao H J, Hu Z Y, Zou R J, Li Y C, et al. Expression and regulation of plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor type-1, and steroidogenic acute regulatory protein in the rhesus monkey corpus luteum[J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 3611-3617.

[2] 郑兴龙, 龚 汉. 纤溶酶原激活物与排卵的研究[J]. *国外医学: 计划生育分册*, 1993, 12: 15-17.

[3] Lindholm A, Bixo M, Eliasson M, Hudecova M, Arnadottir R, Holte J, et al. Tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in obese and lean patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2010, 26: 743-748.

[4] Oral B, Mermi B, Dilek M, Alanoglu G, Sutcu R. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and other hemostatic parameters in patients with polycystic ovary syndrome[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2009, 25: 110-116.

[5] Yildiz B O, Haznedaroglu I C, Kirazli S. Global fibrinolytic capacity is decreased in polycystic ovary syndrome, suggesting a prothrombotic stat[J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 3871-3875.

[6] Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81: 19-25.

[7] 张 娜, 刘复权, 李彦群, 马洪骏. 转化生长因子- α 及其受体在多囊卵巢综合征大鼠中的表达[J]. *河北医科大学学报*, 2005, 26: 5-7.

[8] Plekhanova O S, Stepauova V V, Ratner E I. Urokinase Plasminogen activator in injured adventitia increases the number of myofibroblasts and augments early proliferation[J]. *J Vasc Res*, 2006, 43: 437-446.

[9] Diamanti-Kandarakis E, Palionko G, Alexandraki K, Bergiele A, Koutsouba T, Bartzis M. The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) gene in polycystic ovary syndrome and its association with plasma PAI-1

- level[J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 150: 793-798.
- [10] Glueck C J, Sieve L, Zhu B H, Wang P. Plasminogen activator inhibitor activity, 4G5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor 1 gene, and first-trimester miscarriage in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Metabolism*, 2006, 55: 345-352.
- [11] Devin J K, Johnson J E, Eren M, Gleaves L A, Bradham W S, Bloodworth J R. Transgenic overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 promotes the development of polycystic ovarian changes in female mice[J]. *J Mol Endocrinol*, 2007, 39: 9-16.
- [12] 赵君利, 陈子江, 赵跃然, 赵力新, 王来成, 唐 蓉, 等. 纤溶酶原激活物抑制因子 1 基因启动子区 4G 和 5G 多态基因型分布及其与多囊卵巢综合征的相关性研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2005, 40: 528-531.

[本文编辑] 孙 岩