

Annexin I 在 PCOS 大鼠颗粒细胞中的表达及意义*

马瑞凤 王丽岩[△] 贺立新 汪 宇

(内蒙古医学院 妇产科生殖中心 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要 目的 探讨膜联蛋白 I (Annexin I) 在多囊卵巢综合征 (PCOS) 大鼠卵泡颗粒细胞的表达及生物学意义。方法 采用免疫组织化学方法及灰度值测定 Annexin I 在 PCOS 组和对照组的卵泡颗粒细胞中的表达。结果 Annexin I 在两组中的各级卵泡颗粒细胞中均有表达,PCOS 组 Annexin I 在窦状卵泡中表达显著高于对照组($P<0.05$)。结论 PCOS 组 Annexin I 在窦状卵泡颗粒细胞的表达上调,且 PCOS 中窦状卵泡颗粒细胞的凋亡增加,说明 Annexin I 参与了卵巢颗粒细胞的凋亡过程,并且发挥了重要作用。

关键词 多囊卵巢综合征 卵泡 颗粒细胞 膜联蛋白 I

中图分类号 Q95-3, R711.75 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 18-3434-04

Expression and Significance of Annexin I in Granulosa Cells of Rats with Polycystic Ovarian Syndrome*

MA Rui-feng, WANG Li-yan[△], HE Li-xin, WANG Yu

(Obstetrics and Gynecology Reproductive Center, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059 China)

ABSTRACT Objective: To study the expression and biological significance of annexin I in the granulosa cell of polycystic ovarian syndrome (PCOS) in rat model. **Methods:** The expression of annexin I was detected by immunohistochemical method, and the quantitative analysis was performed by the gray value in PCOS and control group. **Results:** The annexin I expressed in different classes of preantral follicles in both PCOS group and control group. When the diameter of the follicle reached to 60~120 μ m, the annexin I expression had significant difference between the PCOS group and control group ($P<0.05$). **Conclusion:** The annexin I expression evidently increased in sinusoid follicle and the granulosa cell of apoptosis raised in PCOS group, which illuminated annexin I participated in the process of apoptosis in granulosa cell and played an important role.

Key words: Polycystic ovarian syndrome; Follicle; Granulosa cell; Annexin I

Chinese Library Classification: Q95-3, R711.75 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)18-3434-04

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是一种发病多因性、临床表现多态性的内分泌综合征,以高雄激素血症、多个囊性卵泡、卵巢间质增生和排卵障碍为主要特征,是导致育龄期妇女月经紊乱最常见的原因之一。PCOS 患者卵泡发育障碍、不能形成优势卵泡,卵泡颗粒细胞减少而膜细胞增生,卵泡不能充分成熟,导致卵巢呈多囊性改变。PCOS 病因病理机制复杂,涉及神经、内分泌、代谢系统及卵巢局部^[1]产生的调节因子等多种调控因素影响。本研究观察了 PCOS 动物模型卵巢卵泡的病理改变,同时应用免疫组化 SP 法及灰度值的测定检测了 Annexin I 在卵巢卵泡的表达,探讨 PCOS 动物模型中 Annexin I 在卵巢卵泡生长、发育及闭锁中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

左旋 18- 甲基炔诺酮硅胶棒 (上海达华制药厂), 每根含 75mg 左旋 18- 甲基炔诺酮; 人绒毛膜促性腺激素 (Human

Chorionic Gonadotropin, HCG) (苏州新宝制药厂) 鼠抗 Annexin I 单克隆抗体和 SP 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 动物模型的建立

实验选用 60 只 24 日龄未成年雌性 SD 大鼠 (购自北京维通利华公司), 随机分成模型组 and 对照组, 每组 30 只。模型组 24 日龄皮下埋植左旋 18- 甲基炔诺酮硅胶棒 (3mm), 27 日龄时皮下注射 1.5U HCG 2 次/日, 共注射 9 天至 36 日龄。对照组每天注射等量生理盐水。

1.3 实验方法

两组 SD 大鼠 36 日龄 20 时开始禁食水, 次日晨称重后取眼眶静脉血, -20℃ 保存, 3000r/min 离心后取血清, 血清雌二醇 (Estradiol, E2)、睾酮 (Testosterone, T)、孕酮 (Progesterone, P)、卵泡刺激素 (Follicle-Stimulating Hormone, FSH)、黄体生成素 (Luteinizing Hormone, LH) 及空腹胰岛素 (Fasting Insulin, FINS) 检测使用放射免疫法, 空腹血糖 (Fasting Blood Glucose,

* 基金项目 内蒙古自治区卫生厅科技项目 (NJZY2010224)

作者简介 马瑞凤 (1984-), 女, 硕士研究生, 电话 13848147250

[△] 通讯作者 王丽岩, 女, 教授, 主要研究方向 生殖内分泌。电话 0471-6637039, E-mail wangliyan5598@163.com

(收稿日期: 2011-02-18 接受日期: 2011-03-13)

FBG) 采用己糖激酶法。大鼠腹腔注射 0.24mol/L 水合氯醛 (400mg/kg) 麻醉后断头处死,取其卵巢,去除周围脂肪组织,观察卵巢形态学变化,测量卵巢重量,并分别测量双侧卵巢长、宽、高。用 10%的中性甲醛固定,常规石蜡切片,厚度为 4μm,其中一张切片作 HE 染色行组织病理学检查,另一张切片作免疫组化,按 SP 法试剂盒操作说明进行。加 0.3%的过氧化氢阻断过氧化物酶后,经微波抗原修复,DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、封片,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 结果判断

HE 染色切片光镜下观察病理形态改变。免疫组化 SP 染色后细胞膜和 / 或细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞,表明有 Annexin I 表达。每张切片随机取 5 个不同视野,经图像分析系统分析标准灰度值。灰度值大(染色强度弱、透光强)蛋白表达少,反之则表达多。卵泡直径的选择以卵泡内有完整卵细胞的平面为最大平面。图像分析系统卵泡放大倍数为 100 倍,卵泡分级按照卵泡直径的大小分为 始基卵泡(≤ 30μm)、初始卵泡(30~60μm)、窦前卵泡(60~120μm)及窦状卵泡(≥ 120μm) [2]。所有数据均用 SPSS13.0 统计软件处理。计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,按两独立样本 t 检验分析。

2 多囊卵巢综合征大鼠模型诱导的实验研究结果

2.1 一般状况

两组大鼠均发育良好,体毛润泽,行为、体征变化无明显差异,反应灵活。模型组大鼠的体质量 (101.78± 5.91) mg 高于对照组 (98.37± 7.64) mg,但差异无显著性(P=0. 058)。

2.2 形态学变化

(1) 肉眼观 对照组卵巢色泽红,模型组卵巢表面颜色略苍白,可见多个较大囊泡。模型组大鼠的卵巢重量 (0. 049± 0. 008) cm³ 显著高于对照组 [(0. 026± 0. 008) cm³,P=0. 00],模型组大鼠的卵巢体积 (48. 8± 12. 8)mg 亦显著高于对照组 [(25. 4± 8. 9)mg,P=0. 00]。

(2)镜下观 (见图 1) HE 染色光镜下对照组可见各级卵泡和黄体,颗粒细胞形态完整,排列整齐(多为 8~9 层),胞质丰富、染色质致密,间质细胞 1~2 层,呈梭形排列。PCOS 模型组卵泡呈囊性扩张,卵泡内卵母细胞或放射冠消失,颗粒细胞层变薄(多为 2~3 层),排列疏松,卵泡膜细胞、间质细胞增生。卵泡早期凋亡形态上主要颗粒细胞与卵泡壁分离,晚期为颗粒细胞散在性分布卵泡腔 [3]。

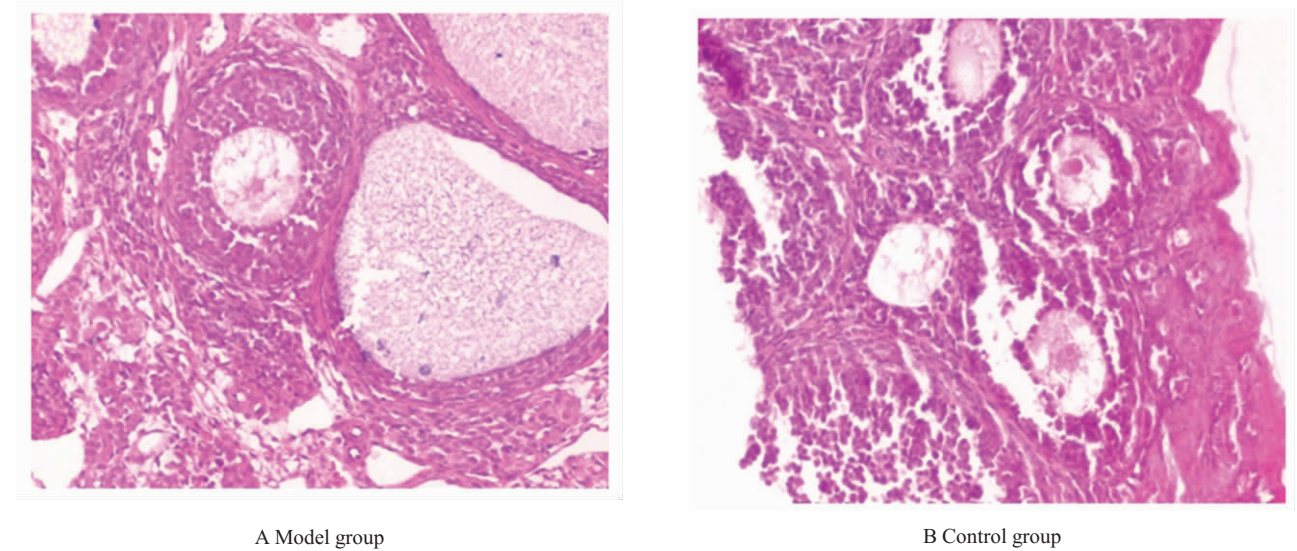


图 1 卵巢形态学(HE× 200)
Fig.1 Ovarian morphology (HE× 200)

2.3 血清学检测 (见表 1)

表 1 两组性激素、空腹血糖和空腹胰岛素水平比较 (n=30)

Table1 The comparison of sex hormones,fasting plasma glucose and fasting insulin levels in two group(n=30)

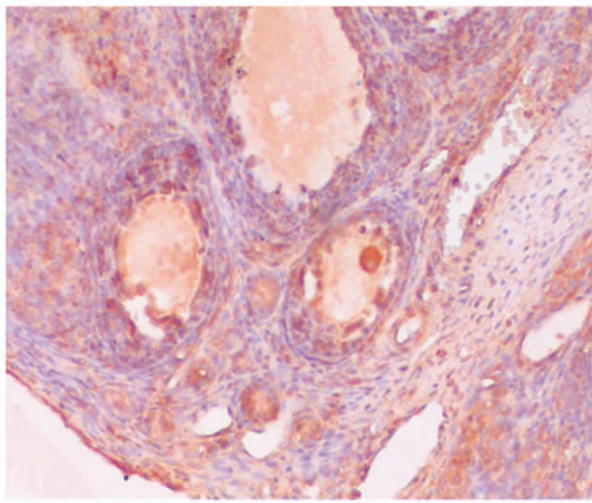
Group	E2	P	T	FSH	LH	LH/ FSH	FINS	FBG
Model group	113.914± 28.593	19.847± 18.323*	0.353± 0.145*	1.085± 0.568**	1.572± 0.616	1.913± 0.349**	16.923± 2.791**	4.416± 0.239**
Control group	102.0950± 34.246	9.617± 3.815	0.296± 0.0389	2.006± 0.369	1.316± 0.428	0.307± 0.506	12.132± 3.128	3.961± 0.193

注 PCOS 与对照组比较 *P<0.05, **P<0.01
Note: PCOS compared with controls *P<0.05, **P<0.01

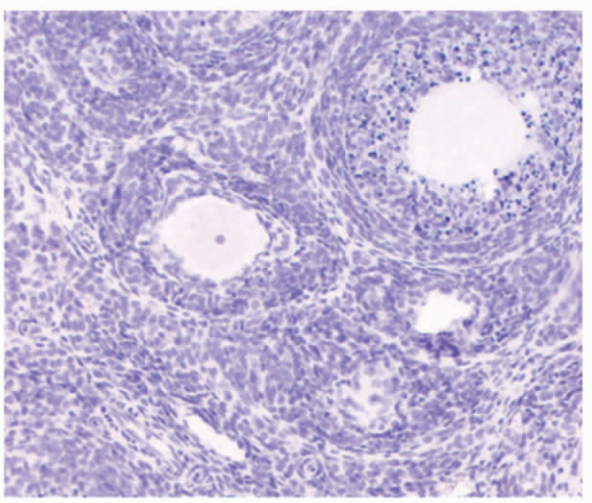
2.4 Annexin I 在卵巢卵泡中的表达 (见图 2)

Annexin I 在 PCOS 及对照组的各级卵泡中均有表达。

PCOS 组直径在 60~120μm 的卵泡中 Annexin I 表达明显高于对照组,有显著性差异(P<0. 01) (见表 2)。



A Model group



B Control group

图 2 两组卵泡中 Annexin I 的表达(× 200)

Fig.2 The expression of Annexin I in folliculars of two groups(× 200)

表 2 两组不同直径卵泡 Annexin I 灰度值表达的比较(̄x± s) (n=30)

Comparison of gray value expression of Annexin I of different diameter folliculars in two groups (̄x± s) (n=30)

Group	<30	Follicular diameter(μm)		>120
		30-60	60-120	
Model group	52.2480± 0.00147	52.3113± 0.01456	52.3637± 0.03337	52.3947± 0.01852
Control group	52.2530± 0.0021	52.3190± 0.01561	52.4153± 0.04424*	52.4070± 0.02261**

注: PCOS 组与对照组比较,*P<0.01,**P<0.05
Note: PCOS compared with controls *P<0.01,**P<0.05

如表 2 所示,灰度值与蛋白表达成反比,灰度值越小提示蛋白表达越多,反之亦然。模型组 Annexin I 表达明显低于正常对照组,差异有显著性意义 (P<0.01)。

3 讨论

Annexin I 导致 PCOS 可能的发病机制讨论如下。

3.1 Annexin I 与细胞凋亡

细胞凋亡是一种特殊的细胞死亡类型,其存在于女性生殖系统的正常生理过程如卵泡闭锁^[1]、黄体萎缩等。卵泡的生长发育及闭锁与凋亡调节密切相关^[4]。有文献报道,卵泡发育期发生颗粒细胞凋亡,会导致卵泡闭锁^[5],因此颗粒细胞凋亡是卵泡闭锁的基本机制,多种激素、细胞因子、基因表达产物参与其过程的调控,在维持整个卵巢及机体功能平衡方面具有重要作用。

两条凋亡信号传导途径参与了颗粒细胞的凋亡^[6],一是内源性途径又叫线粒体途径,有 Bcl-2 家族参与;二是外源性途径又叫死亡受体途径,由 Fas/Fas-L 和 TNFα 激发,经 cAMP 传导。两条途径最后均激活了细胞凋亡的下游效应器 Caspase-3、6、7 等执行细胞凋亡。其表达的改变能够影响 caspase-3 的活化和钙离子的释放,从而促进细胞凋亡^[7]。

3.1.1 Annexin I 与 Bcl-2 家族 Bcl-2 家族在 mRNA 和蛋白表达水平的升高与颗粒细胞死亡及卵泡闭锁存在持续关系。

Sasson 等^[8]发现在人类卵巢颗粒细胞的凋亡被皮质激素抑制时,细胞内 Bcl-2 的含量增高达 3-7 倍,说明 Bcl-2 能抑制颗粒细胞凋亡,促进卵泡的生长和排卵。

外源性的 Annexin I 可通过提高胞内钙离子浓度和 Bcl-2/Bcl-XL 相关死亡促进因子(Bcl-2/Bcl-XL-2-associated-death promoter,BAD)的去磷酸化而诱导细胞凋亡^[9]。

3.1.2 作为 Fas/Fas-L 及 TNF-α 的调控因子 Fas 是一种 45 kd 的跨膜受体。Xu 等研究认为 Fas 抗原在卵母细胞及某些颗粒细胞上有表达,而 Fas 配体在颗粒细胞上则强表达,证明颗粒细胞上 Fas 配体的表达能诱导表达 Fas 的卵细胞发生凋亡^[10]。

有研究^[11]认为 Annexin I 是肿瘤坏死因子(TNF-α)介导的细胞凋亡途径中的调控因子。Annexin I 调节细胞凋亡遵循两条规律:高浓度的 Annexin I 促进细胞凋亡,减少坏死;低浓度蛋白则无触发凋亡的作用。

当局部微环境中大量 TNF-α 时,Annexin I 可向细胞核移动,可能是为 TNF-α 传递信号,启动细胞凋亡,TNF-α 及其第二信使神经酰胺能刺激培养的早期窦状卵泡凋亡。

另外,Annexin I 可通过参与激活 p38 和 JNK 的信号转导而促进细胞凋亡^[12]。

3.2 Annexin I 作为表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor,EGFR)的磷酸化底物^[13]

Annexin I 抑制 EGF 介导的细胞增殖^[7]。表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)由泡膜细胞产生,在邻近颗粒细胞起旁分泌调节作用,通过刺激 FSH 受体表达和孕酮产生来调节颗粒细胞的活动 PCOS 患者显著特征是高雄激素血症和卵巢呈囊性增大。

PCOS 卵泡发育过程中,颗粒细胞内细胞色素芳香化酶 p450 (aromatase cytochrome p450, p450)是雌激素形成的最后一步限速酶,作为 EGFR 磷酸化底物的 Annexin I 显著增加,EGF 通过与 EGFR 结合可抑制芳香化酶活性,导致芳香化酶表达障碍,抑制睾酮转化为雌二醇,导致雄激素升高,影响卵泡的正常发育成熟,而过多的雄激素又可以引起颗粒细胞的凋亡^[14],最终导致了卵泡的闭锁和多囊。

Annexin I 抑制 PLA 2, 使具有促进细胞生长作用的 PGE 合成减少,从而对细胞生长产生强烈的抑制作用,Annexin I 可能是引起细胞增生的信号转导通路的抑制剂^[15]。

3.3 Annexin I 与细胞生长分化

有研究表明 Annexin I 可以抑制细胞增生,其通过与不同生长因子结合蛋白结合,在 MAPK/ERK 信号通路上游影响蛋白复合物的形成和活性,从而抑制 cyclin D1 表达,减少细胞生成^[16]。

综上所述,Annexin I 参与了卵巢颗粒细胞的凋亡过程,并导致了卵泡的闭锁和多囊,对其进一步研究有助于 PCOS 发病机理的明确及临床治疗具有指导意义。

参考文献(References)

[1] Berisha B, Sinowatz F, Sehams D. Expression and localization of fibroblast growth factor(FGF)family members during the final growth of bovine ovarian follicles[J]. Mol Reprod Dev, 2004,67(2):162-171

[2] Stener-Victorin E, Ploj K, Larsson BM, et al. Rats with steroid-induced polycystic ovaries develop hypertension and increased sympathetic nervous system activity[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2005, 3(1): 44-53

[3] Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, et al. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro-and anti-apoptotic molecules [J]. J Reprod Dev, 2006,52(6):695-705

[4] 李梅, 李志凌, 李红发. 多囊卵巢综合征卵巢小泡上凋亡调控蛋白 Bax、Bcl-2 及 Fas、FasL 的表达 [J]. 实用医学杂志, 2004, 20(9): 1027-1029

Li Mei, Li Zhi-ling, Li Hong-fa. The expression on apoptosis adjustable protein, Bax Bcl - 2 and Fas, FasL in polycystic ovarian syndrome' ovarian vesicles[J]. Practical Medical Journal, 2004, 20(9): 1027-1029

[5] Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone[J]. Clin Endocrinol Metab, 1997, 82(1):293-299

[6] Amsterdam A, Keren-Tal I, Aharoni D. Cross-talk between cAMP and p53 generated signals in induction of differentiation and apoptosis in steroidogenic granulosa cells[J]. Steroids, 1996, 61(4): 252-256

[7] Lim LH, Pervaiz S. Annexin 1: the new face of an old molecule[J]. FASEB J, 2007,21(4):968-975

[8] Sasson R, Tajima K, Amsterdam A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5' -mono-phosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells[J]. Endocrinology, 2001,142(2):802-811

[9] Solito E, Kamal A, Russo-Marie F, et al. A novel calcium-dependent proapoptotic effect of annexin 1 on human neutrophils [J]. FASEB J, 2003,17:1544

[10] Dharma S J, Kelkar RL, Nandedkar T D. Fas and Fas ligand protein and mRNA in normal and atretic mouse ovarian follicle[J]. Reproduction, 2003, 126(6):783-789

[11] 蔡颖,梁清华,何国雄等. 胶原诱导性关节炎大鼠灌服痹肿萧汤后滑膜组织膜联蛋白 I 的表达[J]. 中国临床康复, 2006,10(19):63-65

Cai Ying, Liang Qing-hua, He Guo-xiong, et al. Effects of bizhongxiao decoction on annexin- I expression in synovial tissues of rats with collagen-induced arthritis [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006,10(19):63-65

[12] Hsiang CH, Tunoda T, Whang YE, et al. The impact of altered annexin I protein levels on apoptosis and signal transduction pathways in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2006,66(13):1413-1424

[13] Radke S, Austermann J, Russo-Marie F, et al. Specific association of annexin 1 with plasma membrane-resident and internalized EGF receptors mediated through the protein core domain [J]. FEBS Lett, 2004, 578(1-2): 95-98

[14] 伊诺,孔涛,姜恩魁等. IGF-1 对子宫切除所致大鼠卵巢颗粒细胞凋亡的抑制作用[J]. 锦州医学院学报, 2005,26(1):8-11

Yi Nuo, Kong Tao, JIANG En-kui, et al. Inhibition of IGF-I on the Apoptosis of Ovary Granulosa Cells of Rats with Hysterectomy[J]. Jinzhou Med College, 2005,26(1):8-11

[15] Croxtall JD, Gilroy DW, Solito e, et al. Attenuation of glucocorticoid functions in an Anx-A1-/-cell line [J]. Biochem J, 2003, 371 (3): 927-935

[16] Parente L, Solito E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein[J]. Inflamm Res, 2004, 53(4):125-132