

Annexin 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 (Annexin) 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 在 PCOS 组和对照组的卵泡颗粒细胞中的表达。结果 Annexin 在两组中的各级卵泡颗粒细胞中均有表达,PCOS 组 Annexin 在窦状卵泡中表达显著高于对照组($P<0.05$)。结论 PCOS 组 Annexin 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 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
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 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 in the granulosa cell of polycystic ovarian syndrome (PCOS) in rat model. **Methods:** The expression of annexin was detected by immunohistochemical method, and the quantitative analysis was performed by the gray value in PCOS and control group. **Results:** The annexin 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 expression had significant difference between the PCOS group and control group ($P<0.05$). **Conclusion:** The annexin expression evidently increased in sinusoid follicle and the granulosa cell of apoptosis raised in PCOS group, which illuminated annexin participated in the process of apoptosis in granulosa cell and played an important role.
Key words: Polycystic ovarian syndrome; Follicle; Granulosa cell; Annexin
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 在卵巢卵泡的表达,探讨 PCOS 动物模型中 Annexin 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 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 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]。

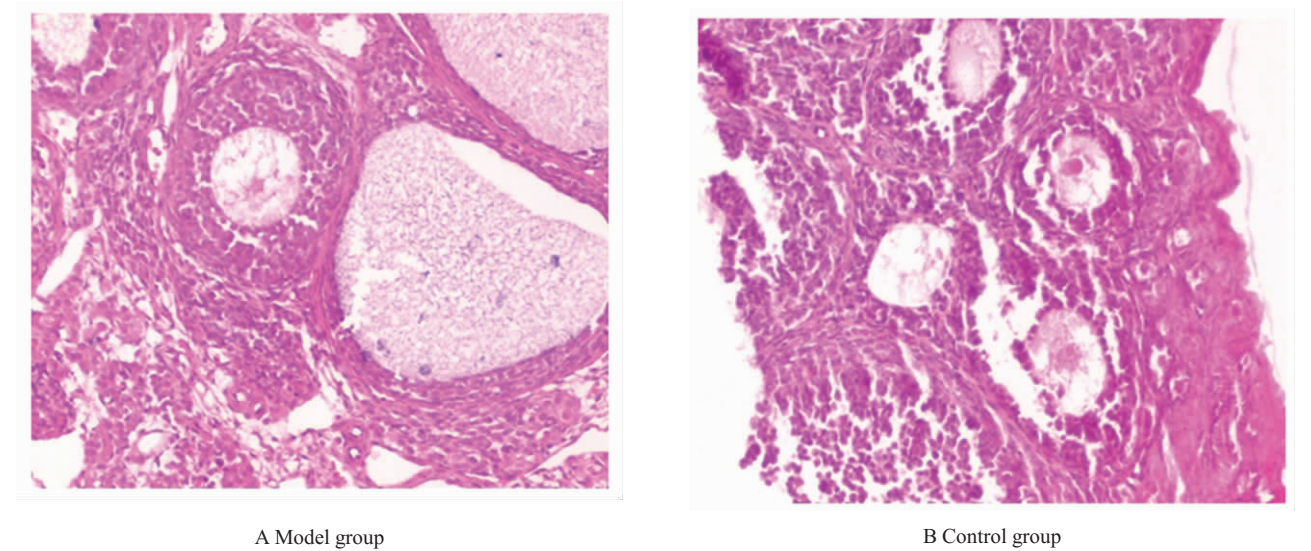


图 1 卵巢形态学(HE× 200)
Fig.1 Ovarian morphology (HE× 200)

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)

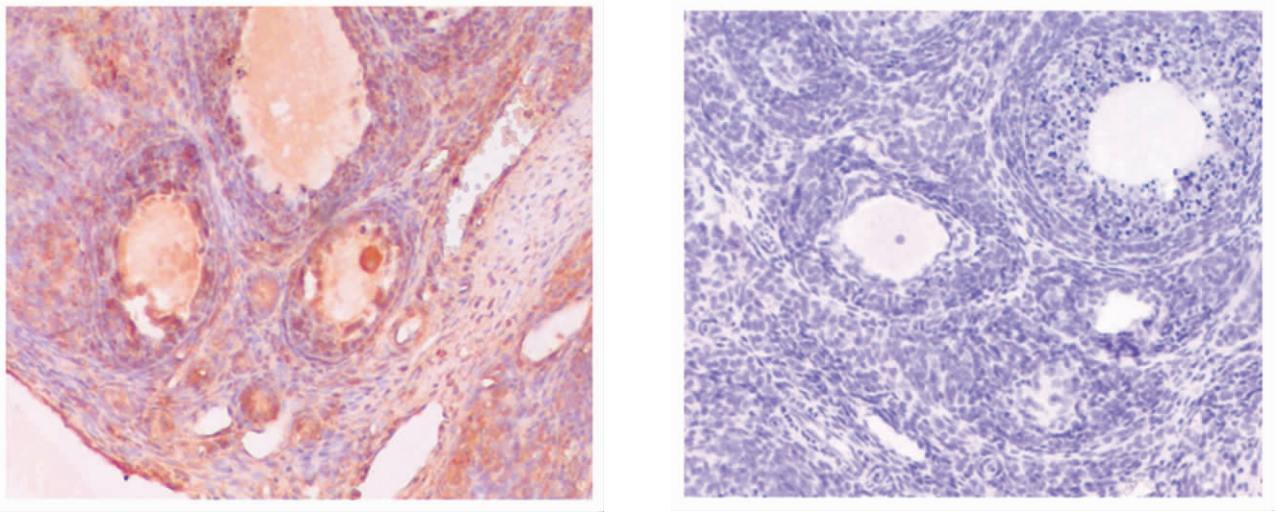
Group	E2	P	T	FSH	LH	LH/ FSH	FINS	FBG
Model group	113.914± 28.593	19.847± 18.323*	0.353± 0.145*	1.085± 0.568**	1.572± 0.616	1.913± 0.349**	16.923± 2.791**	4.416± 0.239**
Control group	102.0950± 34.246	9.617± 3.815	0.296± 0.0389	2.006± 0.369	1.316± 0.428	0.307± 0.506	12.132± 3.128	3.961± 0.193

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 在卵巢卵泡中的表达(见图 2)

Annexin 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 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 的表达(× 200)

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

表2 两组不同直径卵泡 Annexin 灰度值表达的比较 (x̄± s) (n=30)
Comparison of gray value expression of Annexin of different diameter folliculars in two groups (x̄± 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 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 导致 PCOS 可能的发病机制讨论如下。
3.1 Annexin 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 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 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 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 调节细胞凋亡遵循两条规律:高浓度的 Annexin 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 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 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 作为表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor ,EGFR)的磷酸化底物^[13]

Annexin 抑制 EGF 介导的细胞增殖^[7]。表皮生长因子 (Epidemral 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) 是雌激素形成的最后一步限速酶, 作为 EGFR 磷酸化底物的 Annexin 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 抑制 PLA₂, 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 可能是引起细胞增生的信号转导通路的抑制剂^[15]。

3.3 Annexin 与细胞生长分化

有研究表明 Annexin 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 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空蛋白 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汤后滑膜组织膜联蛋白 1 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-1 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 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