

不同超促排卵方案对子宫内膜性激素受体和 白血病抑制因子表达的影响

潘永苗,石一复,陈怀增,周彩云

(浙江大学医学院 附属妇产科医院,浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的:探讨促性腺激素释放激素激动剂(GnRHa)长方案和单纯促性腺激素(PMSG)超促排卵对分泌期子宫内膜雌、孕激素受体和白血病抑制因子(LIF)表达的影响。方法:以小鼠为超促排卵动物模型,采用GnRHa+PMSG长方案促排卵,以单用PMSG促排卵和自然周期为对照,在排卵后取子宫内膜,免疫组化定量测定腺上皮细胞雌、孕激素受体表达水平;逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量检测内膜LIF mRNA表达。结果:免疫组化显示:GnRHa+PMSG组在注hCG后内膜腺上皮细胞ER、PR免疫组化阳性细胞百分率为 $(88.46 \pm 2.51)\%$ 、 $(84.71 \pm 2.21)\%$,染色强度为 (0.415 ± 0.048) AU、 (0.454 ± 0.046) AU,均低于自然周期组同期值,分别为 $(92.36 \pm 2.33)\%$ 、 $(87.82 \pm 1.22)\%$ 和 (0.602 ± 0.051) AU、 (0.542 ± 0.055) AU ($P < 0.01$);但高于单纯PMSG组,分别为 $(82.62 \pm 1.63)\%$ 、 $(74.19 \pm 1.39)\%$ 和 (0.366 ± 0.044) AU、 (0.364 ± 0.028) AU (P 均 < 0.05)。RT-PCR显示:GnRHa+PMSG组注入hCG后内膜LIF mRNA表达相对量 (1.703 ± 0.549) 高于单纯PMSG组 (1.535 ± 0.641) , $P < 0.01$,但两者均低于自然周期组 (1.959 ± 0.778) , $P < 0.01$ 。结论:GnRHa长方案辅助超促排卵可影响子宫内膜性激素受体和LIF的表达水平,可能对内膜容受性有一定影响,但优于单纯促性腺激素方案。

[关键词] 子宫内膜;性腺甾类激素;受体,雌激素/分析;受体,孕酮/分析;超排卵;促性腺素释放激素/拮抗剂和抑制剂;白细胞介素6;疾病模型,动物

[中图分类号] R 977.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)03-0300-04

Expression of estrogen receptor, progesterone receptor and leukemia inhibitory factor on endometrium during different ovarian stimulation protocols in mice

PAN Yong-miao, SHI Yi-fu, CHEN Huai-zen, ZHOU Chai-yun (*The Affiliated Obstetrics and Gynecology Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the influence of superovulation by GnRHa protocol and pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) alone on the expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and leukemia inhibitory factor (LIF) mRNA on endometrium. **Methods:** Forty-five femal ICR mice were randomly allocated into 3 groups; (1) GnRHa + PMSG group; alarelin was give first for desensitizing the pituitary, then superovulation with PMSG; (2) PMSG group; mice were injected with PMSG only; (3) Natural cycle group; mice were given with

收稿日期:2007-04-04 修回日期:2008-03-15

作者简介:潘永苗(1969—)男,硕士,主要从事妇产科生殖内分泌工作;Email:panyongm@zju.edu.cn.

same volume of saline. Endometrium samples were taken at 48 hours after given hCG or ovulation (control group). ER and PR in glandular cells were detected with SP immunohistochemistry semiquantitatively. Expression of LIF mRNA on endometrium was detected with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis. **Results:** The positive rate(%) and expression intense (AU) of ER and PR on glandular epithelium cells were significantly lower in GnRHa+PMSG group and PMSG group than those in natural cycle group (all $P<0.01$). The expression of LIF mRNA was significantly lower in GnRHa+PMSG group and PMSG group than that in natural cycle group (all $P<0.01$); but the expressions of ER,PR and LIF in GnRHa+PMSG group were higher than those in PMSG group. **Conclusion:** The protocol with GnRHa down regulates the expressions of ER,PR and the LIF mRNA on the mice of secretive phase endometrium,suggesting it may have an adverse effect on the endometrial receptivity in mice,but it may still be better than PMSG alone.

[**Key words**] Endometrium; Gonadal steroid hormones; Receptors,estrogen/anal; Receptors, progesterone/anal; Superovulation; Gonadorelin/antag; Interleukin-6; Disease models,animal

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008,37(3):300-303.]

如何提高体外受精-胚胎移植(IVF-ET)妊娠率是目前迫切要解决的问题,促性腺激素释放激素激动剂(GnRHa)长方案辅助超促排卵为IVF-ET常用方案。该方案有助于提高卵子质量和子宫内膜与胚胎着床的同步化,但有研究显示该方案对子宫内膜组织学、亚细胞结构和胚胎着床时所需粘附分子的分泌可能存在一定影响^[1-3],其机理尚未完全阐明,胚胎植入需要多种细胞因子参与和调节^[1],白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor,LIF)是一种诱发胚胎着床有重要作用的多功能细胞因子,LIF表达异常可直接影响胚胎着床,造成低受孕或不孕的原因之一。本研究采用小鼠为超促排卵动物模型,比较分析GnRHa长方案超促排卵方法对小鼠分泌期子宫内膜雌、孕激素受体以及LIF mRNA表达的影响,以单用孕马血清(PMSG)促排卵和自然周期为对照,探讨该方案对子宫内膜影响的潜在因素,并为临床实践提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及超促排卵 性成熟ICR小鼠45只(浙江省医学科学院实验动物中心提供),

清洁级,体重26~28 g,连续阴道涂片观察2个动情周期正常,随机分成3组各15只。光亮:黑暗为14:10,自由饮水取食。超促排卵过程:自动情周期第3天开始,每天上午腹腔注射给药。
①GnRHa+PMSG组:每日注射GnRHa(Alarelin,上海丽珠)40 μg/100 g体重,至第9天同时给PMSG(Sigma)40 IU/100 g体重,48 h后给hCG(Serono公司)100 IU/100 g体重;
②PMSG组:每日注射等体积生理盐水,第9天注射PMSG 40 IU/100 g体重,48 h后给hCG(Serono公司)100 IU/100 g体重;
③自然周期组:每日注射等体积生理盐水,共10 d。注射hCG后48 h,自然周期组自排卵后(阴道涂片出现排卵征象)48 h,乙醚麻醉小鼠后取其子宫和内膜,部分经液氮预冷后-80℃保存,另一部分福尔马林液固定后,作常规石蜡切片。

1.2 免疫组化测定 单克隆鼠抗ER和兔抗PR抗体,SP试剂盒购自福州迈新生物公司。①阳性细胞计数:每张切片随机取5个高倍视野,计算阳性细胞数百分率,不论染色强度,凡显色均为阳性。②染色强度测定:每张切片随机取60~70个细胞核界限清楚的阳性细胞,采用HPIAS-1000图文分析系统测量阳性细胞核的

平均光密度(MOD),即阳性细胞核单位面积ER、PR 的染色强度,以任意单位(arbitrary unit,AU)表示。

1.3 RT-PCR 半定量测定 LIF mRNA 总RNA 提取:取冻存组织约 100 mg,采用 Trizol 液一步法提取组织中总 RNA,甲醛变性凝胶电泳鉴定 RNA 是否降解,RNA 抽提液经紫外分光光度仪测定样品OD₂₆₀/OD₂₈₀在 1.8~2.0 间,调整相应核酸浓度。RT-PCR:以 RNA 为模板逆转录合成cDNA。以cDNA 为模板体外扩增35 个循环,获取 LIF mRNA。LIF 上游引物为 5'-GGCAACCTCATGAACCAGAT-3',下游引物为 5'-CACGGTACTTGTTGCACAGA-3',扩增片段长度 359 bp;β-Actin 内参照引物为上游引物 5'-TTCCAGCCTTCCTTCTTGG-3',下游引物 5'-TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT-3',扩增片段长度 224 bp。电泳半定量分析:产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶(含 0.5% 溴化乙啶)电

泳,图谱经拍照、扫描仪成像后,利用 Molecular Analyst 图象分析软件分析扩增条带,LIF mRNA 相对量为 LIF mRNA 吸光度曲线下面积积分与β-Actine 曲线下面积积分之比,以 AU 表示。

1.4 统计方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 SPSS 10.0 统计软件处理,均数间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异。

2 结 果

2.1 子宫内膜腺上皮细胞ER、PR 表达水平 ER 和 PR 在三组子宫内膜腺上皮细胞核内均有明显表达,分布均匀。GnRHa+PMSG 组在注射 HCG 后 48 h,ER、PR 免疫组化阳性率和染色强度均显著高于 PMSG 组(P 均 < 0.05),但两者阳性率和染色强度均低于自然周期组(P 均 < 0.01),见表 1。

表 1 三组腺上皮细胞ER、PR 阳性率和染色强度及 LIF 表达比较

Table 1 The positive percentage of ER and PR and expression intense of ER,PR and LIF mRNA in glandular epithelium cells ($n=15, \bar{x} \pm s$)

组 别	阳性率/%		光密度/AU		
	ER	PR	ER	PR	LIF
自然周期组	92.36±2.33	87.82±1.22	0.602±0.051	0.542±0.055	1.959±0.778
GnRHa+PMSG	88.46±2.51*	84.71±2.21*	0.415±0.048* [#]	0.454±0.046*	1.703±0.549*
PMSG	82.62±1.63 [△]	74.19±1.39 [△]	0.366±0.044 [△]	0.364±0.028 [△]	1.535±0.641 [△]
F	74.54	79.94	98.78	63.16	191.28

vs 自然周期和 PMSG 组,* $P < 0.01$; vs PMSG 组,[#] $P < 0.05$; vs 自然周期,[△] $P < 0.01$

2.2 LIF mRNA 在子宫内膜的表达 小鼠子宫内膜在排卵后 48 h LIF mRNA 均有明显表达。GnRHa+PMSG 超促排卵组在注hCG 后 48 h,子宫内膜 LIF mRNA 表达相对量为 1.703±0.549,而自然周期组为 1.959±0.778,两组比较差异有显著性($P < 0.01$),但两者均高于 PMSG 组($P < 0.01$)。

3 讨 论

雌、孕激素为调节子宫内膜变化的最基本因素,两者通过各自的细胞内受体使内膜腺体

和间质细胞增生发育,为胚胎着床提供物质基础。生理状态下内膜腺上皮细胞ER、PR 呈周期性变化,E₂对 ER、PR 起上调作用,P 则起下调作用。在超促排卵方案中,由于GnRH 激动剂或激抗剂对垂体的抑制作用和外源性促性腺激素改变体内FSH、LH 及 E₂、P 间的生理平衡,均可影响内膜ER、PR 的表达^[5]。我们以前研究显示 GnRHa 长方案超促排卵对小鼠子宫内膜厚度基本无影响,但对内膜组织学成分和细胞超微结构存在一定不良影响^[2-3],这可能与体内 E₂、P 间的生理失衡和其靶组织受体改变相关。本研

究结果显示,两组超促排卵方案腺上皮细胞内ER、PR阳性细胞百分率和染色强度均显著低于自然周期组($P < 0.01$),但GnRH_a长方案优于单纯PMSG组,内膜ER、PR的减少将减弱体内E₂和P对内膜发育的正常调节作用,使细胞内DNA合成下降,减弱雌、孕激素激活T淋巴细胞、巨噬细胞以及具有免疫潜能的内膜细胞产生多种细胞因子作用,降低内膜容受性^[1,4]。

胚胎着床是一个需要多种细胞因子、细胞外基质及其受体、蛋白水解酶等多因素参与的复杂和精细过程。其中细胞因子通过旁分泌/自分泌作用,构成复杂的细胞因子网络,促使胚泡成功着床。LIF是一种控制胚胎着床的多功能细胞因子,在众多哺乳动物子宫内膜中均有LIF及LIFR的表达,在胚胎着床期达到峰值,着床部位明显高于非着床区,LIF能调节胚胎分化和维持胚胎干细胞的多能性,并可能通过影响胚泡滋养层细胞的扩展调节植入进程,使其与内膜发育同步化,又能调节子宫内膜蛋白质合成和适时向粘附状态转化,为胚胎粘附、入侵作准备^[6-7]。正常子宫内膜LIF、LIFR表达峰值与胚泡LIF和LIFR表达峰值相一致,说明LIF可能通过配体-受体与内膜结合激发促使胚泡着床^[8]。本研究发现GnRH_a长方案和单纯PMSG方案超促排卵后分泌期子宫内膜LIF mRNA均有表达,但表达相对量均显著低于自然周期组($P < 0.01$),这种种植窗口期子宫内膜LIF的低表达可能影响子宫内膜适时向粘附状态转化,导致子宫内膜与胚胎发育非同步化,降低内膜与胚泡间的粘附作用,影响胚泡的植入,降低胚胎着床率^[1]。与GnRH_a长方案相比这种影响可能在单纯PMSG方案超促排卵方案中表现更为明显,而前者可能使内源性激素分泌相对平衡,在提高卵细胞质量的同时改善了内膜的部分分泌功能^[1]。随着研究深入,通过各种药物联合应用或寻找新的超促排卵方法,有望进一步达到生理化的子宫内膜,提高妊娠率。

References:

[1] RUAN H C, ZHU X M, LUO Q, et al. Ovarian

stimulation with GnRH agonist, but not GnRH antagonist, partially restores the expression of endometrial integrin $\beta 3$ and Leukemia inhibitory factor and improves uterine receptivity in mice. [J]. *Hum Reprod*, 2006, 21(10): 2521-2529.

- [2] PAN Yong-miao, Shi Yi-fu (潘永苗, 石一复). The effect of GnRH_a induced superovulation on endometrial morphology and estrogen receptor and progesterone receptor in mice. [J]. *Reproduction and Contraception (生殖与避孕)*, 2002, 13(3): 152-157. (in Chinese)
- [3] HUANG He-feng, SHI Yi-fu, ZHOU Fu-zhen, et al (黄荷凤, 石一复, 周馥贞). Comparison of endometrial histology and ultrastructure during different ovarian stimulation protocols in hamsters. [J]. *Chin J Obstet Gynecol (中华妇产科杂志)*, 1999, 34(6): 360-362. (in Chinese)
- [4] HADI F H, CHANTLER E, ANDERSON E, et al. Ovulation induction and endometrial steroid receptors. [J]. *Hum Reprod*, 1994, 9: 2405-2410.
- [5] EVANGELOS G P, CLAIRE B, EFSTRATIOU K, et al. Steroid receptor expression in late follicular phase endometrium in GnRH antagonist IVF cycles is already altered, indicating initiation of early luteal phase transformation in the absence of secretory changes [J]. *Hum Reprod*, 2005, 20: 1541-1547.
- [6] VOGINANCY D, SALAMONSEN L A. The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy [J]. *Endocrinol*, 1999, 160: 181-190.
- [7] KONDARA ANASZ Z, SIKORA J, MIELCZAREK PALACZ A. Leukaemia inhibitory factor: an important regulator of endometrial function [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2004, 52: 97-105.
- [8] CULLINAN E B, ABBONDAMZO S J, ANDERSON P S, et al. Leukemia inhibitory factor and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 3115-3120.

[责任编辑 黄晓花]