

生长激素释放激素拮抗剂对人异位子宫内膜抑制增殖作用与 cAMP 信号通路相关

黄 勇 汪期明

摘 要 **目的** 研究生长激素释放激素拮抗剂对异位子宫内膜细胞增殖的作用及与 cAMP 信号通路的关系。**方法** 异位子宫内膜组织采自子宫内膜异位症的妇女,分离异位子宫内膜基质细胞(ESC)。并加入 GHRH 拮抗剂 JV-1-36 培养。GHRH, GHRH 受体(GHRH-R)和 GHRH-R 剪接变异体(SV)1 mRNA 由反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测,细胞增殖通过细胞对 BrdU 的摄入来检测,放免法检测细胞内 cAMP 水平。**结果** GHRH-R mRNA 表达于 ESC,而不表达于正常子宫内膜组织;SV1 mRNA 表达于正常子宫内膜及 ESC。GHRH 拮抗剂 JV-1-36 能降低异位子宫内膜基质细胞 cAMP,减少细胞 BrdU 摄入。**结论** GHRH 拮抗剂 JV-1-36 能抑制异位子宫内膜基质细胞增殖,其机制可能与 cAMP 信号通路有关。

关键词 子宫内膜异位症 剪接变异体 1 生长激素释放激素拮抗剂 信号通路 环磷腺苷

Growth Hormone-releasing Hormone Inhibits Proliferation of Human Ectopic Endometriotic Stromal Cells Possibly Through cAMP-dependent Signal Pathway. Huang Yong, Wang Qiming. Department of Gynecologic and Obstetric, Ningbo Women & Children's Hospital, Zhejiang 315012, China

Abstract Objective To study the inhibitory effect of GHRH antagonists on ectopic endometrial cell proliferation may be act through cAMP signal pathway. **Methods** Ectopic endometrial tissues were collected from women with endometriosis. Human ectopic endometrial stromal cells(ESC) were isolated and cultured. ESC were treated with GHRH antagonist JV-1-36. Expression of GHRH, GHRH receptor (GHRH-R) and GHRH-R splice variant (SV)1 mRNA were determined by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The ESC proliferation was assessed by 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels was studied by ELISA. **Results** The ESCs, but not normal endometrial tissues, expressed GHRH-R mRNA. SV1 mRNA was determined in normal endometrial tissues. In ESCs, JV-1-36 reduced cAMP production and incorporation of BrdU. **Conclusion** GHRH antagonist JV-1-36 can inhibit the proliferation of ectopic endometrial stromal cells and its mechanism may be related to the cAMP signaling pathway.

Key words Endometriosis; SV1; GHRH antagonists; Signal transduction; cAMP

子宫内膜组织出现在子宫体以外部位时称子宫内膜异位症,是最常见的妇科良性疾病之一,其发病机制最为人们广为接受的是种植学说,即经血倒流,内膜种植在腹膜并生长。因而,异位子宫内膜在激素作用下发生增殖,诱导炎症反应及血管形成。与正常的子宫内膜组织相比,异位子宫内膜细胞增殖能力及生存能力增强,而且基因表达异常,如研究发现子宫内膜异位症患者子宫内膜组织中表达芳香化酶和激素受体^[1]。生长激素释放激素(GHRH),是一个含有 42~44 氨基酸的多肽激素,最初认为其由下丘脑分泌,在垂体腺中发挥作用,GHRH 刺激生长激素的合

成和分泌,调节垂体亲躯体细胞的增殖和分化,最近发现 GHRH 还表达于垂体外的正常人体组织和卵巢癌组织,包括正常的子宫内膜、子宫内膜癌、子宫内膜异位组织,提示这个多肽可能作为一种自分泌或旁分泌生长因子促进细胞增殖^[2]。笔者推测 GHRH 可能以类似的方式刺激子宫内膜异位症或子宫内膜癌的发生,使用拮抗生长激素释放激素的类似物可以治疗此类疾病。

在本研究中,笔者评估了子宫内膜异位症患者在位和异位子宫内膜组织中 GHRH 受体和 SV1 的表达,进而,我们确定 GHRH 拮抗剂 JV-1-36 对异位 ESC 增殖的影响。最后,探讨 JV-1-36 对细胞的影响与 cAMP 信号通路的关系。

材料与方法

1. 样品采集:笔者收集的异位子宫内膜组织来自腹腔镜

基金项目:浙江省医药卫生科技研究计划项目(2009B145)

作者单位:315012 宁波市妇女儿童医院妇产科

通讯作者:汪期明,电子信箱:huang1yong@yahoo.com.cn

手术中,39 名有卵巢子宫内异位症的妇女(年龄范围:36.4 ± 7.0 岁),插入 Trocar 后立即吸出腹膜液,尽量减少血液污染,同时采集在位内膜组织,所有病人均有正常的月经周期,在手术前 6 个月没有接受激素治疗或卵巢手术。根据修订后的美国生殖医学学会子宫内异位症分类,所有病例均为子宫内异位症Ⅲ/Ⅳ期。所有取材均经患者同意并签订知情同意书。准备进行细胞培养的在位和异位子宫内组织放置于 DMEM/F12 培养基(GIBCO-BRL)中,冰块保存,立即转送到实验室,用来进行 RT-PCR 的在位和异位子宫内组织取样后立即置于液氮中,在 -80℃ 保存。

2. 人 ESC 的分离和培养:从卵巢子宫内异位组织纯化和培养 ESC^[3]。在无菌培养基中采集底层薄膜中分离的新鲜子宫内异位病灶。大约取 1.0 ~ 1.5 g 的组织,切碎,放入加有 2.5 mg/ml I 型胶原酶(Sigma, St Louis, MO)和 15 U/ml 的脱氧核糖核酸酶(Takara 公司)的 DMEM/F12 中培养,37℃ 振荡 2h。产生的悬浮液过滤分离。碎片经 100 μm 的尼龙细胞过滤器(Becton Dickinson 公司)移除,再经过 70 μm 尼龙细胞过滤器(Becton Dickinson 公司)清除一些上皮腺体。留在过滤器中的基质细胞经离心收集,置于 DMEM/F12 混匀,接种于 100 μm 的接种板(Iwaki 公司),经 37℃ 30 min 的黏附,用 PBS 漂洗去除没有黏附力的上皮细胞和血细胞。细胞培养使用加有 10% 胎儿牛血清和抗生素(Sigma 公司)的 DMEM/F12。ESC 的纯度 > 95%,通过阳性免疫细胞化学染色可证实为波形蛋白。当细胞汇合,就可用于第一阶段的实验。

3. 巢式 RT-PCR 检测 GHRH 受体的剪接变异体 1 (SV1):使用 RNeasy 试剂盒(Qiagen 公司)从组织和细胞中提取总 RNA。1 μg 总 RNA 在 20 μl 的体系中进行反转录,然后按照制造商使用说明用 ReverTra Dash RT-PCR 试剂盒扩增(Toyobo 公司)。各引物由武汉晶赛生物有限公司合成。为确定 GHRH 受体 SV₁ 的存在,笔者采用的是巢式 RT-PCR,它提高了试验的特异性和敏感度。特定引物各 0.3 μmol/L 按以下循环条件进行初步扩增:94℃, 5 min;然后 94℃, 30 s, 60℃, 2 s, 74℃ 70 s, 共 30 个循环。接下来,2 μl 的 PCR 产物作为 DNA 模板进行第 2 次 PCR,使用特定引物各 0.3 mmol/L 按以下循环条件进行第 2 步扩增:94℃, 5 min;然后, 94℃, 30 s, 63℃, 2 s, 74℃ 20 s, 共 30 个循环。

4. 确定 GHRH 受体的存在:用特定引物各 0.25 μmol/L 按以下循环条件进行初步扩增:94℃, 5 min;然后 94℃, 30 s, 64℃, 2 s, 74℃ 10 s, 共 30 个循环。接下来,2 μl 的 PCR 产物作为 DNA 模板进行第 2 次 PCR,使用特定引物按以下循环条件进行第 2 步扩增:94℃, 5 min;然后, 94℃ 30 s, 62℃ 2 s, 74℃ 5 s, 共 25 个循环。第 2 步 PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分析,加溴化乙锭进行观察,人甘油醛脱氢酶(GAPDH) cDNA 作为阳性对照组,未反转录的 RT 作为阴性对照组,与之对比可 RNA 定量。PCR 产物使用 QIAEX II 凝胶提取试剂盒(Qiagen 公司)纯化,其序列使用 ABI PRISM310 遗传分析仪(Applied Biosystems, Foster City, CA)鉴定。

5. 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)的摄入:通过测量细胞摄入 5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)的量来评估 GHRH 对 ESC 增殖的影响,BrdU 的摄入由 Biotrak 酶联检测免疫吸附试验(ELISA)检测系统(Amersham Pharmacia Biotech)检测,这种方法在以前的文献中报道过,简单地说,ESC 接种到 96 孔板,每孔加入 100 ml 含有 10% 胎牛血清的培养基,其中细胞数为 4000 个,培养 48 h,然后血清饥饿 48 h^[4]。再加入含 1% 的活性炭胎牛血清的新鲜培养基,其中含有控制载体或溶解 JV-1-36(Weil am Rhein, Germany)的二甲基亚砜(DMSO),用培养基稀释至 10⁻⁶ mol/L。DMSO 的最终浓度为 0.1%。细胞在 24 h 和 48 h 培养期间的最后 4 h 加入 10 μl BrdU 溶液孵育。孵化完成后移除培养基;每孔加入 200 μl 固定液固定细胞和使 DNA 变性。过氧化物酶标记的抗 BrdU 与新合成的细胞中的 BrdU 结合。免疫复合物由随后的底物反应所检测,由此产生的颜色使用 DigiScan 酶标仪在 450 nm 处读取(ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria)。

6. cAMP 浓度的检测:异位子宫内组织细胞以 14 × 10⁴ 个细胞/孔接种在 6 孔板中,血清饥饿 12 h,并随后加入 JV-1-36 分别孵育 5 min、15 min、30 min,孵化液中加入 100 mmol/L 的 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)防止 cAMP 的降解。然后移除培养基,并用 0.1 N 的 HCl 将细胞溶解,细胞裂解液以 28 g 离心 10 min 后,使用直接 cAMP 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(Immunotech 公司)进行 cAMP 的测定,步骤按制造商的说明进行操作。

7. 统计学方法:数据用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。*t* 检验用于配对比较和单向方差分析(ANOVA)。*P* < 0.05 说明统计学意义上有差异。

结 果

1. GHRH-R 和 SV1 mRNA 在子宫内异位组织和 ESCs 中的表达:对子宫内异位症患者在位(*n* = 15)和异位(*n* = 24)子宫内组织及异位子宫内组织中分离出的原代 ESC(*n* = 9)全长 GHRH-R 和 SV1 mRNA 表达水平进行了评估。SV1 mRNA 表达于大多数异位子宫内组织(18/24),在位子宫内组织(9/15),和所有的 ESCs。在 ESCs 能检测到低水平的全长 GHRH-R mRNA,而在位和异位起源子宫内组织中却未能检测到(图 1)。

2. JV-1-36 抑制异位 ESC 增殖:GHRH 拮抗剂能抑制多种类型细胞的增殖。选用 GHRH 拮抗剂 JV-1-36 研究其对异位 ESC 的增殖抑制效果。在不同 JV-1-36 浓度的含血清培养基中进行细胞培养 48 h。与未经处理的细胞相比,除了在 0.05 mmol/L 这个浓度点没有观察到影响外,其他浓度 JV-1-36 (0.1 ~ 10.0 mmol/L 的)均能抑制 ESC 增殖。抑制效果最好的浓度在 5 mmol/L 和 10 mmol/L(图 2)。JV-

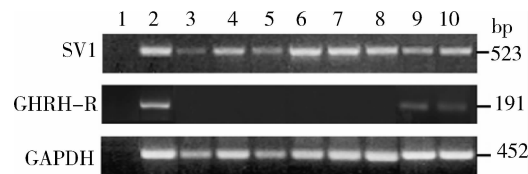


图 1 在位和异位内膜组织及原异位内膜间质细胞 (ESCs) 中生长激素释放激素受体 (GHRH-R) 及其剪接变体 1 (SV1) mRNA 的表达

方法采用巢式 RT-PCR。泳道 1: 阴性对照; 泳道 2: 阳性对照组 (人脑垂体); 泳道 3~5: 子宫内位异位症在位子宫内位组织; 泳道 6~8: 子宫内位异位症异位子宫内位组织; 泳道 9~10: 异位子宫内位组织 ESCs。正如预期的那样, 扩增产物 523 bp 与 SV-1 相对应, 191 bp 对应于 GHRH-R, 452 bp 对应于内参 GAPDH

1-36 在无血清条件下的抑制效果减弱 (数据未显示), 可能是因为与血清处理过的细胞相比, 未经血清处理的细胞增殖能力大大降低, 因此 JV-1-36 不能进一步降低细胞增殖。这些结果表明, GHRH 拮抗剂抑制了异位子宫内位细胞的增殖。

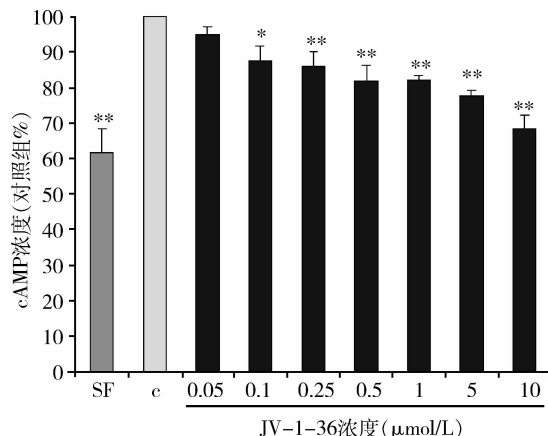


图 2 GHRH 拮抗剂 JV-1-36 对异位子宫内位间质细胞 (ESC) 的增殖的影响

通过细胞 BrdU 的摄入评估。ESC 在无血清培养基 (SF), 或在血清存在下培养 48h, C 为对照组即 JV-1-36 指示浓度。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。3 份不同的组织进行 3 次独立实验, 每个实验重复 5 次。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

3. JV-1-36 降低 cAMP 水平: 众所周知, 环磷酸腺苷是 GHRH 受体的信使, 因此, JV-1-36 对细胞内 cAMP 水平的短期影响可以通过异位 ESC 细胞测定。由于 JV-1-36 在浓度 1~5mmol/L 之间时, 对细胞增殖抑制的效果没有差异, 因此笔者使用最低和最高浓度的 JV-1-36 (1mmol/L 和 10mmol/L) 进行试验。1mmol/L 的 JV-1-36 作用细胞 5 和 15min, 能显著降低了 cAMP 水平, 但作用 30min 时, cAMP 浓度恢复到正常水平。值得注意的是, 10

mmol/L 的 JV-1-36 作用细胞, 对 cAMP 的产生能显示出较强的抑制作用, 虽然在 30min 时抑制作用减弱了, 但仍然较强烈 (图 3)。

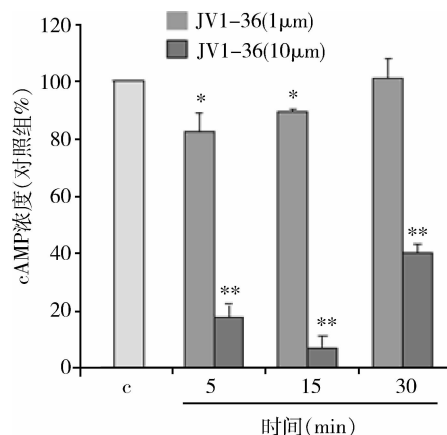


图 3 JV-1-36 对细胞环磷酸腺苷 (cAMP) 的产生的影响

细胞与 JV-1-36 (1 或 10mmol/L) 孵化共 30min, 其中加有 100mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 3 个独立的实验, 每组重复 2 次。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

本研究表明 GHRH 拮抗剂能抑制表达全长 GHRH 受体 mRNA 及其剪接变体 1 (SV1) 的原异位子宫内位细胞。以前的研究发现 GHRH 受体蛋白表达于人类子宫内位, 但子宫内位患者的异位内位组织中只检测到了 SV1, 而没有 GHRH 受体 mRNA, 笔者的研究也发现在子宫内位患者中, GHRH 受体 mRNA 表达其异位 ESC 中, 而不表达于其异位内位组织中, 这可能是由于 ESC 是更具有统一性的细胞群, 因此 GHRH 受体 mRNA 更容易被检测到^[5]。GHRH 受体剪切变体包括 4 个截断 GHRH 受体亚型, 其中, 尤其 SV1 与外周及肿瘤的 GHRH 的自分泌/旁分泌作用相关^[6]。最近的研究表明, 主要的 GHRH 受体剪切变体剪接变体 1, 在子宫内位异位症患者异位及极少部分的在位子宫内位组织中有表达^[5]。从本实验数据中, 笔者发现, 子宫内位异位症患者在位和异位子宫内位组织有类似的 SV1 mRNA 表达模式, 这种差异可能是因为采用不同的研究方法所致。此外, SV1 在在位内位组织表达, 是由于子宫内位异位症患者的在位内位基因表达谱不同于非病理性子宫内位^[7]。然而并不能排除 SV1 能在正常子宫内位中表达, 这需要进一步研究来确定。

很多数据表明, SV1 或 GHRH 受体介导 GHRH

拮抗剂的抗增殖作用。在本研究中,笔者证明了 GHRH 拮抗剂 JV-1-36 抑制 ESC 的增殖。JV-1-36 对 GHRH 受体具有高度特异性,而且, JV-1-36 在低浓度(如 0.1 mmol/L)对子宫内膜异位细胞的抗增殖作用,与在肿瘤细胞中用相同浓度或使用其他拮抗剂相比,抗增殖作用更显著^[8]。GHRH 能诱导表达 GHRH 受体和 SV1 的细胞产生 cAMP,这包括子宫内膜异位细胞^[9]。此外,笔者还发现 JV-1-36 及其他 GHRH 拮抗剂能减少肿瘤细胞内 cAMP 水平,并抵消 GHRH 诱导的 cAMP 增加^[10]。在本研究中, JV-1-36 能极大降低异位 ESC 细胞 cAMP 水平,表明 GHRH 拮抗剂的抑制作用涉及 cAMP 的信号途径。cAMP 在不同类型细胞增殖和生存中起重要作用,这表明异位 ESC 的增殖可能需要环磷酸腺苷。

目前的研究表明, GHRH 拮抗剂 JV-1-36 抑制表达 GHRH 受体及 SV1 mRNA 的人类异位 ESC 增殖,此外, JV-1-36 还显著降低 cAMP 的产生,综上所述, GHRH 拮抗剂调节子宫内膜异位细胞生长,且与 cAMP 通路相关,为确定其抑制作用及相关机制,需要进一步的子宫内膜异位症细胞和子宫内膜异位症动物模型中的研究。

参考文献

- 1 Hatok J, Zubor P, Galo S, *et al.* Endometrial aromatase mRNA as a possible screening tool for advanced endometriosis and adenomyosis [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2011, 27(5):331-336
- 2 Hoa DB, Takayuki O, Afrit - Azzouzene D, *et al.* Peripheral B cell toler-

- ance and function in transgenic mice expressing an IgD superantigen [J]. *J Immunol*, 2010, 184(8):4143-4158
- 3 Neil S, Yue F, Lijuan H, *et al.* Retinoic acid is a cofactor for translational regulation of vascular endothelial growth factor in human endometrial stromal cells [J]. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(1):148-160
- 4 Tang X, Yano T, Osuga Y, *et al.* Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist cetrorelix [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(8):3721-3727
- 5 Fu L, Osuga Y, Yano T, Takemura Y, *et al.* Expression and possible implication of growth hormone-releasing hormone receptor splice variant 1 in endometriosis [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(1):47-53
- 6 Martari M, Salvatori R. Diseases associated with growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) mutations [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2009, 88:57-84
- 7 Khan MA, Sengupta J, Mittal S, *et al.* Genome-wide expressions in autologous eutopic and ectopic endometrium of fertile women with endometriosis [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10(1):84
- 8 Papadia A, Schally AV, Halmos G, *et al.* Growth hormone-releasing hormone antagonists inhibit growth of human ovarian cancer [J]. *Horm Metab Res*, 2011, 43(11):816-820
- 9 汪期明, 黄勇. 生长激素释放激素受体剪接变异体 1 在子宫内膜异位症中的表达 [J]. *中国妇幼保健*, 2012, 27(28):4441-4444
- 10 Granata R, Trovato L, Gallo MP, *et al.* Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in rat heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2):303-312

(收稿日期:2012-11-19)

(修回日期:2012-11-26)

慢性乙型肝炎中医证型与临床生化指标的关联性分析

李红山 朱德东 傅琪琳 应豪 李德周

摘要 目的 探讨慢性乙型肝炎中医证型与临床单一生化指标的关联性。方法 选择慢性乙型肝炎肝胆湿热证和肝郁脾虚证患者各 200 例,观察两组患者血清 TBIL、DBIL、TBA 含量,血清 ALT、AST、GGT、ALP 活性,血清总蛋白、白蛋白含量及血清蛋白电泳等指标的变化。结果 不同证型的慢性乙型肝炎患者,血清 TBIL、DBIL、TBA 含量,血清 ALT、AST、GGT、ALP 活性,血清总蛋白、白蛋白含量组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),血清蛋白电泳组间比较差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。结论 慢性乙型肝炎肝功能、血清蛋白电泳等单一疾病指标与中医证型无关联性;本研究提示作为整体功能变化表现的中医“证候”,其生物学基础研究应从“指标群组合”入手的研究思路。

关键词 慢性乙型肝炎 中医证候 临床生化指标 关联性

基金项目:肝肾疾病病证教育部重点实验室开放基金资助项目(GS090201)

作者单位:315000 宁波市第二医院肝炎科(李红山、朱德东、应豪、李德周);201203 上海中医药大学肝肾疾病病证教育部重点实验室(傅琪琳)

通讯作者:李红山,电子信箱:lihongshan_1982@126.com