

卵巢早衰检测方式的研究进展

耿婷婷 龙晓宇

中图分类号 R117

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.047

卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 通常是指卵巢衰竭所导致女性 40 岁之前出现闭经的现象。2008 年, Weltck 等提出用更加科学准确的命名原发性卵巢功能不全 (primary ovarian insufficiency, POI) 来取代卵巢早衰, 使其涵盖的范围更大, 包括了卵泡活动的生殖功能低下和卵泡完全衰竭。

POF 的特点是原发性或继发性闭经伴随血促性腺激素水平升高和雌激素水平降低, 并伴有一系列低雌激素症状和长期存在特异性闭经相关症状, 如潮热多汗、面部潮红、怕冷、性欲低下、抑郁等。POF 是一种多因素、高度异质性的疾病, 涉及的因素包括遗传、免疫、激素作用障碍、酶缺陷、医源性、环境、感染、心理等^[1]。现有 POF 的诊断标准单一, 即使确诊后替代治疗也仅是针对症状缓解, 并无法从异质性的病因上治疗。因此, 越来越多的研究者采用更新、更加精准的检测方式, 一方面, 可以进行病因分型为下一步根据不同机制有针对性的治疗提供可能; 另一方面, 通过新型检测的高敏感度, 在卵巢功能异常的早期阶段发现患 POF 的风险。下面就从免疫、激素、超声、基因等角度, 对 POF 的检测进行综述。

一、免疫学检测

Sliva 等^[2]提出, 把多项自身免疫抗体的检测和伴随的自身免疫疾病融合到自身免疫型卵巢功能不全的诊断标准当中。这些检测可用于筛选出自身免疫反应导致的 POF 患者, 为病因治疗提供基础。检测的高敏感度也有助于在抗体累积到器质性损害之前检测到早期循环血液中的少量抗体, 以发现患 POF 的高危人群。

1. 外周血淋巴细胞亚群变化: POF 患者的自身免疫性卵巢损伤与 T 细胞亚群失衡和 T 细胞介导的损伤有关。T 细胞分为 CD4⁺T 和 CD8⁺T, 通过分泌细

胞因子作用于 B 细胞, B 细胞产生自身抗体, 自身抗体作用于具有特异性抗原的卵巢靶细胞, 过度的抗原抗体反应导致卵巢的损伤。Vujovic 等^[3]指出, POF 患者外周血中产生自身抗体的 B 细胞增加, 辅助 T 细胞/抑制性 T 细胞比值上升, 抑制性 T 细胞比例下降, 自然杀伤细胞的数量和活性的下降。李玉华等^[4]采用流式细胞仪检测 POF 患者的外周血 T 淋巴细胞, 发现这部分患者与健康对照组相比, 外周血 CD4⁺T 细胞减少和 CD8⁺T 细胞增多, CD4⁺T/CD8⁺T 明显降低。外周血 T 淋巴细胞亚群的变化可做为早期预测 POF 的参考指标。

2. 自身抗体: (1) 与卵巢相关的自身抗体: 抗卵巢抗体 (ovarian autoantibodies, AOAs) 一直是卵巢自身免疫研究的焦点之一, 包括抗卵泡内膜细胞抗体、抗颗粒细胞膜抗体、抗卵浆抗体、抗透明带抗体和抗黄体细胞抗体。其检测主要是通过间接免疫荧光法和酶联免疫吸附试验 (ELISA)^[2]。POF 患者外周血中的 AOAs 效价高于正常妇女, 而 40% ~ 50% 的 POF 患者或原因不明的不育患者的体内可以测到 AOAs。Shamilova 等^[5]研究发现, AOAs 10IU/ml 以上的 POF 患者大多 CGG 重复数正常, 区别于 CGG 重复数过低或过高者, 提示了 AOAs 可以作为免疫因素介导 POF 的筛选指标。由于这部分免疫型 POF 患者卵巢储备功能和原始卵泡池保存相对较好, 提示免疫型 POF 在治疗和预后方面有其独特性。但值得注意的是, AOAs 是可以作用于多种抗原成分的异质性抗体, 并且 AOAs 和卵巢损伤间的直接关系尚不充分, 因此 AOAs 的检测方式仍需要进一步完善。视网膜醛脱氢酶 (ALDH1A1) 和硒结合蛋白-1 (SBP1) 在 POF 相关的自身免疫方面也有其特异性。Seby 等^[6]通过血清检测发现, 60% POF 和不孕不育患者的重组 ALDH1A1、SBP1 或烯醇化酶为阳性, 提示 ALDH1A1 和 SBP1 可以用于识别自身免疫型 POF 的特异性检测。

(2) 卵巢组织外的自身抗体: POF 患者的自身免疫特

性一方面表现为卵巢相关的自身抗体显著性升高,另一方面表现为卵巢组织外的自身抗体也会受到影响。Kořir Pogačnik 等^[7]的统计表明,约 80% 的 POI 患者个人或家族中患有其他自身免疫病,提示卵巢组织外的自身抗体检测对 POI 诊断的重要性。现有的研究涉及抗甲状腺微粒体抗体、抗双链 DNA 抗体(ds-DNA)、抗核抗体(ANA)、抗肾上腺皮质抗体(AAA)^[8]。虽然不同实验的结果存在一定差异,但较多量的卵巢组织外的自身抗体的检出,提示 POF 患者存在免疫系统异常状态,这对诊断自身免疫性 POF 有一定指导意义。

二、激素检测及激素的有效性

1. 常用的激素检测:目前,临床常用的检测指标主要包括卵泡刺激素(FSH)、黄体生成激素(LH)、雌二醇(E₂)。具体 POF 的诊断标准为血清 FSH > 40 IU/L、LH > 30 IU/L、E₂ < 25 pg/ml,并且需要排出其他疾病和发现并发的疾病,如确认人绒毛膜促性腺激素(β -HCG)为阴性;血清催乳素(PRL)水平正常;甲状腺相关指标 T₃、T₄、TSH、ACTH 正常等。当前尚缺乏能够早期预测和诊断 POF 的确切指标。

2. 抗苗勒氏管激素(AMH):目前,AMH 是外周血中能检测到最早的卵泡产生的物质,反映卵巢的储备功能。AMH 检测的一个优势在于其独立于下丘脑-垂体-性腺轴,在月经周期中波动小,可以随时测量。徐琳等^[9]的研究观察到早期血清 AMH 的降低和血清 E₂ 的升高早于 FSH 的变化,提示 AMH 结合 E₂ 的测定可以作为 POF 的早期诊断指标。美国生殖医学协会(ASRM)研究了 AMH 从 0.3 ng/ml 到 2.7 ng/ml 不同的界值范围,指出 AMH 值 < 1.0 ng/ml 时强烈提示卵巢功能下降。由于可量化评估卵巢功能,AMH 是 POF 病程评估和治疗检测的重要指标。

3. 抑制素(inhibin):抑制素是卵巢颗粒细胞分泌的重要调节蛋白,反馈性抑制垂体 FSH 的分泌,其随年龄变化的趋势与女性卵巢功能有着密切联系。Chand 等^[11]通过对 INHA G769A 基因的变异率进行荟萃分析后发现,抑制素基因突变会导致卵巢衰退,影响受孕能力。莫爱萍等^[12]通过对 POF 患者和健康对照组血清 INHA、INHB 的检测,发现 INHA、INHB 降低对 POF 有一定的诊断意义,而 INHA/INHB 的诊断价值最高。当 INHA/INHB > 62.35 时,POF 的可能性较大,敏感度和特异性均较高。众多研究结果都提出血清抑制素被作为 POF 的敏感度指标,用于早期预测 POF。

三、超声检测

超声是 POF 患者的常规检测之一,是判定 POF 患者卵巢储备功能的一种方式。三维超声的参数包括基础窦卵泡计数(antral follicle count, AFC)、卵巢体积、血流变化等。卵巢储备能力下降可能发展为卵巢衰竭^[10]。因此,超声在 POF 早期诊断和治疗效果跟踪监测方面有着更广阔的应用前景。

1. 卵巢的形态学及基础窦卵泡计数(AFC)变化:卵巢的形态和基础窦卵泡计数(AFC)的变化可以直观反映卵巢的状况。覃春容等^[13]的研究发现,特发性 POF 患者的子宫体积、卵巢平均体积小于正常组,AFC 明显少于对照组。Jayaprakasan 等^[14]的研究表明,AFC 在 POF 患者的激素替代治疗的疗效预后方面有指导意义。卵巢形态学的超声检查区别于激素水平和染色体分析,在 POF 检测中有其重要性。

2. 卵巢彩色多普勒血流指标变化:随着超声技术的发展,彩色多普勒超声血流动力学参数的变化在 POF 诊断的研究中越来越受到重视。张志兴等^[15]通过阴道彩色多普勒超声观察到,POF 患者与正常对照组相比,巢间质动脉的收缩期峰值流速及舒张末期流速降低,阻力指数及搏动指数显著增高,卵巢血流信号稀少,间接反映了 POF 患者卵巢纤维化的程度。陈丽霞等^[16]对 POF 早期阶段患者进行超声检查和激素检测后发现,子宫卵巢血流动力学参数可以从侧面反映这部分患者病情的严重程度和预后。在 POF 的常规检测中重视超声检查卵巢各参数的变化,有助于动态跟踪 POF 患者的卵巢功能,为其诊治提供依据。

四、遗传检测

Vujovic 等^[3]通过对家族史的分析得出,家族性 POF 的发生率在不同的人群中为 4% ~ 31%。虽然遗传因素在 POF 病因上占有很大比重,但大多数患者并没有接受到分子学诊断。随着 POF 遗传学研究的进展,遗传检测将是未来诊断的重要手段。现处于研究阶段的遗传检测涉及 X 染色体、常染色体、线粒体 DNA 等诸多方面。

1. 细胞核 DNA:X 染色体的异常被认为是引起 POF 的主要病因,随着分子生物学的进展,研究者在常染色体上也发现了越来越多的与 POF 相关的候选基因^[17]。POF-1 基因定位于 X 21.3 ~ Xq27,POF-2 基因定位于 Xq13.3 ~ 21.1。Davies 等^[18]提出,发病年龄在 25 岁以下的 POF 患者和怀疑为 Turner 综合征的患者需要进行染色体检测。脆性 X 染色体

(FMR1)在POF患者中的前突变发生率为4%~5%,在有家族史的患者中阳性率更是高达14%,FMR1前突变的检测可作为患者遗传筛查的一项指标,避免FMR1遗传给下一代。吴柏林等研究发现,减数分裂基因(HFM1)突变会导致POF常染色体隐性遗传,提示了有家族史的潜在患者进行HFM1检测可实现部分POF的早期检测和干预。在遗传学检测中,除了遗传序列改变外,拷贝数变异(copy number variants, CNV)也有重要的研究价值。

甄秀梅等^[20]采用病例-对照研究方法,用Affymetrix SNP6.0芯片对POF患者和对照组的全基因组染色体拷贝数变异(CNV)进行对比分析,结果发现8个新扩增和12个新的微缺失,揭示了中国妇女POF患者基因组拷贝数变异的变化。在这些编码区发现的5个基因SYCE1、CYP2E1、NRXN1、PARK2和CARD11可能与POF有关。骨形态发生蛋白-15(bone morphogenetic protein-15, BMP-15)是重要的卵母细胞源性生长因子,其基因突变在一定程度上对POF的发病起诱发作用^[21]。Persani等^[22]对不同种族的POF患者的BMP-15基因突变进行测定,得到的错义突变率为1.5%~12%,明显高于健康对照组。Philibert等^[23]通过对遗传背景相似的POI年轻患者的NR5A1基因进行分析,发现了影响Amh启动子功能的新变异p.Arg255Cys,证实了已发现变异p.Gly146Ala的高变异率,提示NR5A1(SF-1)的检测在了解卵巢功能中的重要性。除了上述提到的NR5A1、BMP-15外,GDF9、CXCL12、SOHLH2、一氧化氮合酶基因多态性等均在近来发现与POF相关,其检测的特异性需要大量的临床样本验证^[24,25]。而基因组杂交比较技术(CGH)等基因检测技术的发展,也为POF遗传检验提供了平台。

2. 线粒体DNA(mtDNA):Bonomi等^[26]提出血细胞mtDNA含量的测定可作为预测高风险POF的检测方法之一。他们首先证明了血细胞中的mtDNA和卵巢mtDNA之间存在显著的相关性,之后检测了101名POF患者血细胞中的mtDNA。TaqMan拷贝数的分析结果显示,无论是与同年龄段卵巢储备较完整的妇女还是早已正常生理停经的妇女相比,POF患者的血细胞中的mtDNA含量显著下降。虽然具体作用于mtDNA的酶尚未确定,但已经提示血细胞中的mtDNA数量的检测有意义。

卵巢早衰(POF)的检测方式随着检测技术的进步和研究的深入正逐步成熟和多样化。本文对近年

来POF的检测方式的发展进行了汇总,这些检测方式为诊断POF、寻找POF的病因和针对病因学的特异性治疗提供了参考。然而,这些新型的检测方式仍需要大样本临床检测的验证,如何将上述检测组合出一套高效的检测方案仍需要进一步研究。期望随着POF检测方式特异性和敏感度的提高,使POF在疾病早期阶段得到风险评估和病因学诊断,进而进行早期干预和有针对性的治疗,降低POF的发生率,并为患者带来福音。

参考文献

- 1 Caserta D, Bordi G, Giovanale V, *et al.* Premature ovarian failure in a 17-year-old woman[J]. Clin Exp Obstet Gynecol, 2014, 41(2): 223-225
- 2 Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, *et al.* Autoimmune primary ovarian insufficiency[J]. Autoimmunity Reviews, 2014, 13(4-5): 427-430
- 3 Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure[J]. Menopause International, 2009, 15(2): 72-75
- 4 李玉华, 许玉芳, 朱国平, 等. 卵巢早衰60例临床特征及自身免疫变化分析[J]. 中国热带医学, 2008, 8(7): 1101-1102, 1109
- 5 Shamilova NN, Marchenko LA, Dolgushina NV, *et al.* The role of genetic and autoimmune factors in premature ovarian failure[J]. Assisted Reproduction and Genetics, 2013, 30(5): 617-622
- 6 Edassery SL, Shatavi SV, Kunkel JP, *et al.* Autoantigens in ovarian autoimmunity associated with unexplained infertility and premature ovarian failure[J]. Fertility and Sterility, 2010, 94(7): 2636-2641
- 7 Košir Pogacnik R, Meden Vrtovec H, Vizjak A, *et al.* Possible role of autoimmunity in patients with premature ovarian insufficiency[J]. Fertility and Sterility, 2014, 7(4): 281-290
- 8 李敬. 染色体核型正常的卵巢早衰患者血清自身免疫指标的检测及其意义[D]. 济南: 山东大学, 2010
- 9 徐琳, 任莉, 韩雪松, 等. AMH、FSH、E2在卵巢早衰诊断中的价值[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(3): 96-98
- 10 Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion[J]. Fertility and Sterility, 2012, 98: 1407-1415
- 11 Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. Inhibin and premature ovarian failure[J]. Human Reproduction Update, 2010, 16(1): 39-50
- 12 莫爱萍. 抑制素A和抑制素B对卵巢早衰的诊断价值研究[J]. 海南医学院学报, 2011, 17(9): 1239-1241
- 13 覃春容, 陈士岭, 陈薪, 等. 特发性卵巢早衰的临床特点分析[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(5): 886-889
- 14 Jayaprakasan K, Campbell B, Hopkinson J, *et al.* A prospective, comparative analysis of anti-Müllerian hormone, inhibin-B, and three-dimensional ultrasound determinants of ovarian reserve in the prediction of poor response to controlled ovarian stimulation[J]. Fertility and Sterility, 2010, 93(3): 855-864
- 15 张志兴, 苗竹林, 杨慧, 等. 卵巢早衰患者卵巢纤维化的超声诊断价值[J]. 临床超声医学杂志, 2013, 15(5): 334-336

- 16 陈丽霞, 杨柳明, 黄晓利, 等. 卵巢功能围早衰患者彩色多普勒血流指标变化的临床研究[J]. 现代医药卫生, 2012, 28(19): 2891 - 2892
- 17 Beke A, Piko H, Haltrich I *et al.* Molecular cytogenetic analysis of Xq critical regions in premature ovarian failure[J]. Mol Cytogenet, 2013, 20;6(1):62
- 18 Davies MC, Cartwright B. What is the best management strategy for a 20 - year - old woman with premature ovarian failure? [J]. Clinical Endocrinology, 2012, 77(2): 182 - 186
- 19 Wang J, Zhang W, Jiang H, *et al.* Primary Ovarian Insufficiency Collaboration. Mutations in HFM1 in recessive primary ovarian insufficiency[J]. New England Journal of Medicine, 2014, 370(10): 972 - 974
- 20 甄秀梅, 孙义民, 乔杰, 等. 中国卵巢早衰妇女全基因组染色体拷贝数变异分析[J]. 北京大学学报: 医学版, 2013, 45: 841 - 847
- 21 马丽丽, 刘春莲, 徐仙. 骨形态发生蛋白 - 15 基因与卵巢早衰关系的研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(5): 344 - 346
- 22 Persani L, Rossetti R, Cacciatori C. Genes involved in human premature ovarian failure [J]. Journal of Molecular Endocrinology, 2010, 45(5): 257 - 279
- 23 Philibert P, Paris F, Lakhal B, *et al.* NR5A1 (SF - 1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency [J]. Fertility and Sterility, 2013, 99(2): 484 - 489
- 24 Norling A, Hirschberg AL, Rodriguez - Wallberg KA, *et al.* Identification of a duplication within the GDF9 gene and novel candidate genes for primary ovarian insufficiency (POI) by a customized high - resolution array comparative genomic hybridization platform[J]. Human Reproduction, 2014, 29(8): 1818 - 1827
- 25 锁培苏. CXCL12、AMH 基因与中国汉族人群特发性卵巢早衰的分子遗传学研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012
- 26 Bonomi M, Somigliana E, Cacciatori C, *et al.* Blood cell mitochondrial DNA content and premature ovarian aging [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42423

(收稿日期: 2014 - 07 - 09)

(修回日期: 2014 - 07 - 29)

骨桥蛋白在 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化中作用的研究进展

吴雪桐 刘晓民

摘 要 绝大多数 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 患者死于心血管和脑血管并发症或其终点事件, 其共同的病理基础为明显加速的动脉粥样硬化 (AS)。近年来, 随着骨代谢和糖代谢相互关系研究的进展, 骨性调节因子在 T2DM 状态下 AS 发生、发展过程中的作用屡有报道。骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 作为一种体内分布广泛的多功能糖蛋白正日益受到关注。

关键词 骨桥蛋白 2 型糖尿病 动脉粥样硬化

中图分类号 R587 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.048

骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 最早是由骨基质中分离出的一种磷酸糖蛋白黏附分子, 是小型 N 端连接整合糖蛋白 (SIBLING) 家族成员, 因其能在骨组织细胞与骨基质间形成一种桥连而得名^[1,2]。研究发现, OPN 作为一种新型细胞因子广泛分布于多种组织, 且在血管平滑肌细胞 (VSMC)、内皮细胞和单核 - 吞噬细胞的增殖、黏附和迁移过程中起着重要作用^[3]。OPN 在各种急慢性炎症反应 (如伤口愈合、自身免疫疾病、AS) 中表达上调, 在心血管重构过程中也起着调节作用^[3-5]。目前约有 80% 以上的 T2DM 患者死于 AS 所致的冠心病、脑卒中等大血管并发

症, 因此探讨 OPN 等骨性调节因子在糖尿病 AS 中的作用对于深入了解 AS 的发病机制并寻找新的干预靶点具有重要的意义。

一、OPN 的结构和表达分布

1. OPN 的结构特点: OPN 是一种分泌型的磷酸化糖蛋白, 其相对分子质量约为 44 ~ 75 kDa, 含有 264 ~ 314 个氨基酸残基, 其中丝氨酸占 24%, 天门冬氨酸占 19%, 谷氨酸占 17%。OPN 的二级结构有 8 个 α 螺旋和 6 个 β 折叠结构, 1 个特异的 RGD (Arg - Gly - Asp) 细胞黏附位点, 1 个钙结合位点, 2 个肝素结合位点, 3 个凝血酶裂解位点。RGD 细胞黏附位点位于 159 ~ 161 氨基酸残基之间, 与 OPN 发挥黏附功能相关。RGD 序列具有高度的保守性, 一旦变异或缺失将丧失其促进黏附的功能^[6,7]。OPN 主要通过

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第一医院内分泌科

通讯作者: 刘晓民, 主任医师, 电子信箱: wx0522@126.com