

卵巢过度刺激综合征中囊性纤维化跨膜转导调节器的表达

靳 镭 汤瑞玲

(华中科技大学附属同济医院生殖中心, 武汉, 430030)

【摘要】 目的: 探讨囊性纤维化跨膜转导调节器(CFTR)在卵巢过度刺激综合征(OHSS)发病中的变化及意义。方法: 22日龄未成年Wistar雌鼠随机分为过度刺激组(实验组, $n=16$)和常规刺激组(对照组, $n=16$), PMSG 10 IU 1 d, 连续腹腔注射4 d, d 5注射hCG 30 IU; 对照组PMSG仅注射2 d, hCG减量为10 IU。测血 E_2 水平, 尾静脉注入美兰液, 30 min后取腹腔灌洗液和卵巢, 用分光光度计测定腹腔灌洗液和卵巢组织中美兰含量, 以判断腹膜和卵巢血管通透性; 采用免疫组织化学法和免疫印记法检测卵巢CFTR蛋白表达量。结果: 实验组大鼠卵巢重量、血 E_2 水平、腹腔液和卵巢中美兰含量显著高于对照组; 免疫组化法检测到CFTR表达于卵巢黄体细胞以及未排卵泡的黄素化颗粒细胞和卵泡膜细胞胞浆, 免疫组化和免疫印记定量分析均显示实验组卵巢CFTR蛋白表达量显著高于对照组。结论: 血清 E_2 水平异常升高, 使体内CFTR表达量显著增加从而参与OHSS的一些病理生理变化。

关键词: 囊性纤维化跨膜转导调节器(CFTR); 卵巢过度刺激综合征(OHSS); 氯离子通道

中图分类号: R711.75 文献标识码: A 文章编号: 0253-357X(2007)08-0508-06

卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)是辅助生育技术中超促排卵时发生的一种医源性并发症, 由于外源性促超排卵药物的应用, OHSS的发生不断增多。OHSS总的发生率为1%-14%, 重度为0.5%-2.0%^[1]。OHSS严重时可出现肝肾功能衰竭, 低血容量休克, 成人呼吸窘迫综合症, 弥散性血管内凝血(DIC), 甚至危及生命^[2]。OHSS发病机理尚不太清楚, 可能与大量应用促性腺激素(gonadotrophin, Gn)后卵巢释放一系列血管活性物质有关, 如 E_2 、P、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth

factor, VEGF)、肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)、激肽-缓激肽系统(kinin-kallikrein system)、前列腺素(prostaglandins, PGs)、NO、细胞因子(cytokines)等, 均可导致局部和全身毛细血管通透性增加^[3]。近来一些学者研究提示: OHSS患者的水、电解质失调还可能与体内囊性纤维化跨膜转导调节器(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)的异常高表达有关。CFTR是一种环磷腺苷(cAMP)依赖Cl⁻通道, 存在于多种分泌上皮的细胞膜, 其通过调节Cl⁻的跨膜转运, 维持着细胞内外的水、电解质平衡。本研究将着重探讨CFTR与OHSS发病的关系。

通讯作者: 靳 镭; Tel: +86-27-83662822;
E-mail: ljin@tjh.tjmu.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 动物及分组

清洁级雌性Wistar大鼠, 22日龄, 体重49-58 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: SYXK(鄂)2004-0028。黑暗 12 h, 光照 12 h。32 只 Wistar 大鼠随机分为: 过度刺激组(实验组), 常规刺激组(对照组), 每组16只。

1.2 方 法

1.2.1 卵巢过度刺激综合征模型的建立 根据Ujioka 等的方法建立卵巢过激模型^[4]。实验组: 连续 4 d 皮下注射含有10 IU PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin, 天津实验动物中心)的生理盐水0.2 ml, d 5皮下注射含有30 IU hCG(丽珠药业)的生理盐水 0.2 ml。对照组: 给药方法同实验组, 但PMSG仅给 2 d, hCG减为 10 IU。

1.2.2 腹膜、卵巢血管通透性和卵巢重量的测定 注射 hCG 后 48 h, 每组 8 只动物在苯巴比妥钠 (80 mg/kg)麻醉下, 从尾静脉注入 0.2 ml 美兰溶液 (5 mmol/L), 30 min后用 5 ml 生理盐水灌洗腹腔, 收集灌洗液, 立刻加入 50 μ l NaOH (0.1 mol/L), 以清除蛋白质造成的混浊。取腹腔液后立即取卵巢, 称重, 计算双侧卵巢总重量。将卵巢置入 4 ml 二甲基甲酰胺中, 65 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 24 h。腹腔灌洗液和卵巢孵育液在室温下 900 \times g 离心 10 min, 取上清, 应用分光光度计在美兰最大吸收光谱 660 nm 处检测吸光度, 从标准曲线上查得美兰含量。

1.2.3 血清和卵巢标本收集、保存 每组另外8只注射hCG 48 h在苯巴比妥钠(80 mg/kg)麻醉下剖腹抽取下腔静脉血 3 ml, 室温放置 1 h, 3 000 \times g 离心 10 min, 吸取血清贮存于 -20 $^{\circ}$ C 待用。同时取出双侧卵巢, 一侧卵巢用 4% 多聚甲醛常温固定 24 h 后石蜡包埋, 切片 (5 μ m)。另外一侧卵巢用冻存管立即冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 待行 Western blot 检测。所有动物均在取完标本后处死。

1.2.4 血清E₂水平测定 采用放射免疫法(RIA)测定血清 E₂ 水平, 放免试剂盒购自天津 DPC 公司, 严格按说明书要求操作。

1.2.5 卵巢组织中CFTR的蛋白分布 应用免疫组化方法(SP法)检测石蜡切片中CFTR的蛋白分布。操作按SP法试剂盒(武汉凌飞科技公司)说明书要求

进行: 石蜡切片经脱蜡、水化、3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶后, 用正常兔血清阻断非特异结合, 加入一抗 (1:50 稀释) 后置 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 依次滴二抗、三抗, 应用二氨基联苯胺 (3,3'-diaminobenzidine, DAB, 武汉凌飞科技公司) 显色封片。光学显微镜下细胞胞浆内呈现棕黄色颗粒为阳性信号。以 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。

1.2.6 免疫印迹法(Western blot)检测卵巢组织中CFTR的蛋白表达 用含 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 100 μ g/ml PMSF, 1% Triton X-100, 0.02% Na₂S₂O₈, 0.5% NP-40, 1 μ g/ml Aprotinin 的细胞裂解液匀浆冻存的卵巢组织, 提取总蛋白, 用 Bradford 比色法测定蛋白含量。每个样本取总蛋白 100 μ g 与等体积 1 \times SDS 上样缓冲液混合, 点样于 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质, 湿式电转膜至硝酸纤维素膜 (NC) 上, 5% 脱脂奶粉 + 95% TBS 封闭, 与 1:400 稀释的羊抗人 CFTR 多克隆抗体 (能识别大鼠 CFTR 蛋白, 购自美国 Santa Cruz 公司, Sc-8909) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后与 1:8 000 稀释的辣根酶标记兔抗羊抗体 (武汉凌飞科技公司) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 化学发光试剂 (ECL, 碧云天) 反应 5 min, 曝光 10-15 min, 冲洗胶片。同法检测 β -actin 蛋白, 作为内参, 一抗为 1:400 稀释兔抗鼠单克隆抗体 (武汉凌飞科技公司), 二抗用 1:8 000 稀释辣根酶标记的羊抗兔抗体 (武汉凌飞科技公司)。

1.3 结果判定

1.3.1 免疫组化结果分析 采用 HPLAS-1000 图像分析系统 (武汉千屏影像技术有限责任公司) 进行分析, 切片在镜下按统一放大倍数 (\times 200) 测量, 每张切片测定 5 个视野, 计算阳性反应物质的平均光密度 (integrated optical density, IOD) 值, 其值代表切片中阳性产物的相对强度。

1.3.2 免疫印记结果分析 采用 Kodak Digital Science ID 图像分析系统 (美国 KODAK 公司) 对免疫反应阳性条带进行灰度测定。

1.4 统计分析

采用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验分析, 计量数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, *P* < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 过度刺激卵巢模型的确立

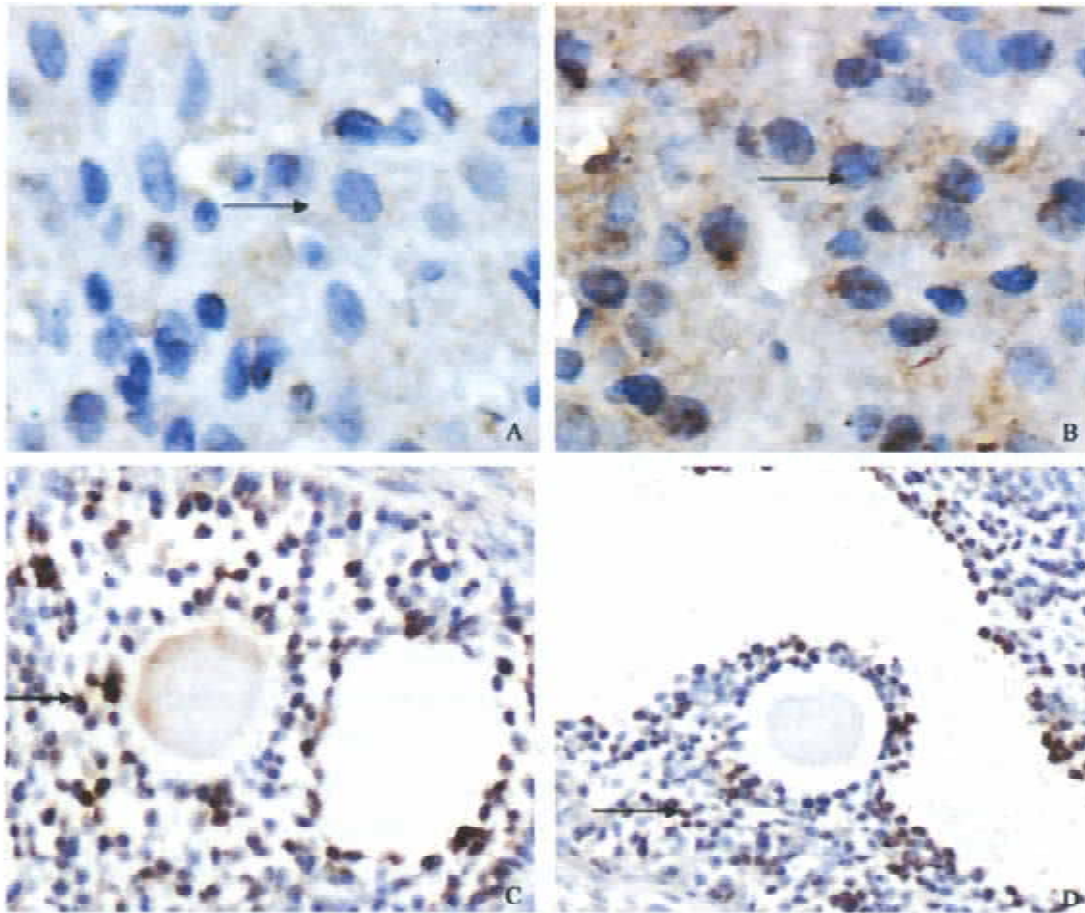
注射 hCG 后 48 h, 实验组卵巢总重量、腹腔液中美兰含量、卵巢组织中美兰含量和血清中 E_2 浓度均有显著增加, 与对照组比较, 其增加量均有显著性差异 ($P < 0.05$) (表 1)。根据 Golan 的标准^[5]: 卵巢体积增大、腹腔毛细血管通透性增加和腹水均出现方可诊断为 OHSS 综合, 本实验结果确证造模已成功。

2.2 卵巢组织中 CFTR 蛋白的表达与变化

2.2.1 免疫组化结果 结果显示注射 hCG 48 h 后对照组与实验组大鼠卵巢组织黄体中均可见 CFTR 呈

棕黄色颗粒表达于黄体细胞的胞浆中, 且实验组的 CFTR 表达强度显著高于对照组 (图 1A、B); 实验组卵巢中不同直径黄素囊肿的粒黄体细胞胞浆内也均可见弥漫的 CFTR 阳性颗粒表达 (图 1C、D)。对免疫阳性细胞进行图像和统计分析, 结果显示对照组 CFTR 阳性物质平均光密度为 0.258 ± 0.066 , 实验组为 0.294 ± 0.048 , 组间比较有显著性差异, $P < 0.01$ 。

2.2.2 Western blot 结果 结果显示注射 hCG 48 h 后实验组与对照组大鼠卵巢组织在相对分子量 170 kD 处均可检测到 CFTR 蛋白条带 (图 2), 二组大鼠卵巢组织 CFTR 与内参 β -actin 灰度的比值分别为 0.667 ± 0.097 、 0.439 ± 0.042 , 二者比较有显著性差异, $P < 0.05$ 。



- A: 对照组黄体细胞(↑: 弱阳性) CL (corpus luteum) in control group (↑: weak positive) (4 000×)
B: 实验组黄体细胞(↑: 强阳性) CL in experimental group (↑: strong positive) (4 000×)
C: 实验组小直径黄素囊肿中粒黄体细胞(↑: 弥漫强阳性)
the granulosa lutein cells with small diameter in luteinizing cysts in experimental group (↑: strong positive) (200×)
D: 实验组大直径黄素囊肿中粒黄体细胞(↑: 弥漫强阳性)
the granulosa lutein cells with large diameter in luteinizing cysts in experimental group (↑: strong positive) (200×)

图 1 免疫组化显示注射 hCG 48 h 后 CFTR 蛋白在大鼠卵巢组织的表达与分布 (SP 染色)

Figure 1 Immunohistochemical localization of CFTR in rat ovaries 48 h after hCG injection (SP staining)

表 1 注射 hCG 后 48 h 不同剂量 PMSG+hCG 刺激条件下卵巢总重量、腹膜和卵巢美兰含量以及血 E₂ 水平比较

Table 1 Effects of PMSG and hCG on ovarian weight, peritoneal and ovarian Methylene blue content, and serum E₂ concentration at 48 h after hCG injection

组别 Group	n	卵巢重量(mg) Ovarian weight	腹腔液美兰含量 (μg/100 g) Peritoneal Methylene blue content	卵巢美兰含量(ng/mg) Ovarian Methylene blue content	血清E ₂ 浓度 (pg/ml) Serum E ₂ concentration
对照组 Control	8	108.98±4.21	10.60±0.21	10.30±1.30	21.85±1.73
实验组 Experimental	8	319.39±6.35	41.80±0.92	34.63±1.85	56.07±6.45
P		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

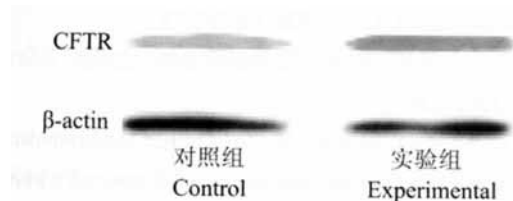


图 2 注射hCG 48 h后实验组和对照组大鼠卵巢组织中CFTR和β-actin免疫印迹蛋白条带

Figure 2 Western blot detected special immunoreactive CFTR bands in rat ovary 48 h after hCG treatment

3 讨论

3.1 CFTR的分布表达及生理功能

囊性纤维化跨膜转导调节器(CFTR)是由囊性纤维化基因编码的一种Cl⁻通道^[6],为一种存在于细胞浆中的跨膜糖蛋白。成熟CFTR糖蛋白分子量为170 kD^[7],存在于多种组织如呼吸道、胰腺、小肠、汗腺以及男女生殖道等组织器官的上皮细胞顶侧膜,当cAMP浓度升高时,其蛋白构型发生改变,通道开放,Cl⁻外流,促使阳离子分泌,导致水沿着渗透梯度排放,在上皮细胞盐类转运、水分流动和离子浓度调节中发挥重要作用。在生育期女性的子宫内膜、输卵管和宫颈上皮以及性成熟小鼠的宫颈、阴道、子宫内膜、输卵管上皮和卵巢表面上皮均可见CFTR在mRNA和蛋白水平的表达^[8,9]。实验证明E₂能增强CFTR在生殖道上皮细胞的表达,而孕酮则抑制其表达^[10,11]。CFTR基因突变可以引起囊性纤维化症,这些患者由于CFTR蛋白缺失或不正常,Cl⁻转运障碍,导致水分流失和分泌物稠厚,从而引起局部组织的阻塞和感染,诱发各种临床症状,如阻塞性肺炎、慢性特发性胰腺炎等;在生殖系统可引起男、女不孕症。严重者可危及

生命,囊性纤维化症是高加索人最常见的遗传性致死性遗传病之一。

3.2 CFTR与OHSS

2005年Ajonuma等用RT-PCR和Western blot及电生理技术检测到外源Gn刺激建立的OHSS成年SD大鼠模型子宫和卵巢均有CFTR mRNA和蛋白表达增加,并有Cl⁻通道活动的亢进,与对照组比较有显著性差异;在卵巢切除大鼠,雌激素也有相同作用,而黄体酮和CFTR抗血清则可减轻OHSS症状;但是在CFTR基因突变小鼠,用E₂则未能诱发OHSS症状,提示CFTR可能与OHSS的发病机制有关^[12]。

本研究依照Ujioka等的方法建立未成年Wistar大鼠OHSS模型^[4],表现为大鼠血E₂水平明显升高,卵巢重量显著增加、体积显著增大、表面呈紫褐色,见多个囊肿形成,雌鼠尾静脉注射美兰30 min后,腹腔灌洗液和卵巢组织中美兰含量均显著增高,提示卵巢和腹膜毛细血管通透性均增加,与常规刺激组相比,差异有显著统计学意义。以上表明在未成年Wistar大鼠建立OHSS模型是可行的,与在成年大鼠造模相比,所用Gn剂量较小,持续注射时间较短,还可以避免上一动情周期的生殖激素水平及卵巢囊肿的影响;具有建模周期短,成本低,操作相对容易的优点。根据大鼠正常动情周期计算,大鼠黄体形成及退化(动情后期及动情间期)持续约70-84 h,hCG注射后48 h相当于黄体早期,适用于外源性hCG诱发的早发型OHSS的研究。

本研究通过免疫组化和免疫印迹方法同时证实OHSS组大鼠卵巢中CFTR蛋白表达强度显著高于常规刺激组,与Ajonuma的实验结果一致,提示

体内高表达的CFTR与OHSS存在相关性。本研究还首次定位CFTR在卵巢组织黄体细胞表达,提示黄体细胞CFTR表达量的改变与OHSS中卵巢囊肿的形成有关。根据本实验结果和CFTR的生理功能,推测其在OHSS发病中的作用机制可能为:①在异常升高的E₂作用下,CFTR异常高表达,C1⁻活动增强,上皮细胞分泌功能亢进,大量液体从组织和间皮细胞向间质和腔隙转移,形成大量胸水、腹水,以及组织水肿,出现OHSS临床症状。有研究发现,雌激素可诱导组织上皮细胞表达CFTR蛋白^[10],而存在于兔和人体胰腺腺泡上皮的CFTR表达也与性激素调节有关^[13],说明体内组织、脏器CFTR表达受卵巢生殖激素调节;卵巢由于黄体细胞高表达CFTR而导致多发性黄体囊肿及滤泡囊肿形成,间质水肿,卵巢体积增大,重量增加。本研究中实验组卵巢重量是对照组的3倍,实验组卵巢可见多个囊肿形成,支持以上推断。②CFTR还可通过抑制上皮Na通道(sodium channel, NaC)而增强水通道(aquaporin, AQP)的作用加速水、电解质分泌,而加重OHSS症状^[14, 15]。③CFTR与其他相关因子之间存在协同、放大作用:在卵巢分泌的其他血管活性物质如VEGF、肾素、激肽系统等作用下,引起血管通透性增加,血浆外渗,血液浓缩,凝血障碍和血栓形成,少尿,进一步加重OHSS的临床症状;其中腹膜和卵巢通透性增加既有可能是腹膜间皮细胞和卵巢黄体细胞Cl⁻通道活动亢进,也有可能是腹膜和卵巢毛细血管通透性增加所致,进一步证实其协同关系。④OHSS过程中产生的活性因子如前列腺素E₂(PGE₂)、白细胞介素-1β(IL-1β)等也可增强体内CFTR的表达^[16, 17],通过循环加强作用,从而进一步加重OHSS临床症状。

总之,OHSS中由于临床Gn的过量使用或病人对Gn反应性过于敏感,出现大批卵泡生长,卵巢多发性黄体囊肿及滤泡囊肿形成,均可能导致卵巢局部和全身血液循环中E₂水平异常升高,体内各靶器官和组织CFTR蛋白表达显著增加,C1⁻通道活动增强,上皮细胞分泌功能亢进,出现OHSS临床症状;同时其他离子通道和血管活性物质的协同作用下,进一步加重OHSS临床症状。本研究对OHSS发病中卵巢CFTR表达量变化的意义进行初步探讨,初步认定卵巢中CFTR表达量的变化与

OHSS发病中卵巢囊肿形成有关,并对其参与OHSS发病的机理做了相关理论推测。关于OHSS中其他各脏器上皮细胞CFTR表达量的变化,OHSS发病的个体因素与CFTR基因多态性的关系,以及关于CFTR拮抗剂是否可用于有效防治OHSS,均有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Brinsden PR, Wdad I, Han SL, *et al.* Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol*, 1995, **102**(10): 767-72.
- [2] 周灿权, 焦泽旭. 卵巢过度刺激综合征. *生殖医学杂志*, 2001, **10**(4): 236-41.
- [3] Ohba T, Ujioka T, Ishikawa K, *et al.* Ovarian hyperstimulation syndrome-model rats; the manifestation and clinical implication. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, **202**(1-2): 47-52.
- [4] Ujioka T, Matsuura K, Kawanno T, *et al.* Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Hum Reprod*, 1997, **12**(8): 1629-34.
- [5] Golan A, Ron-El R, Soffer Y, *et al.* Ovarian hyperstimulation syndrome: an update review. *Obstet Gynecol Surv*, 1989, **44**(6): 430-40.
- [6] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 1989, **245**(4922): 1066-73.
- [7] Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, *et al.* Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 1990, **63**(4): 827-34.
- [8] Tizzano EF, Silver MM, Chitayat D, *et al.* Differential cellular expression of cystic fibrosis transmembrane regulator in human reproductive tissue. *Am J Pathol*, 1994, **144**(5): 906-14.
- [9] Chan LN, Tsang LL, Rowlands DK, *et al.* Distribution and regulation of ENaC subunit and CFTR mRNA expression in murine female reproductive tract. *J Membr Biol*, 2002, **185**(2): 165-76.
- [10] Rochwerger L, Buchwald M. Stimulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression by estrogen *in vivo*. *Endocrinology*, 1993, **133**(2): 921-30.
- [11] Mularoni A, Beck L, Sadir R, *et al.* Down-regulation by progesterone of CFTR expression in endometrial epithelial cells: a study by competitive RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **217**(3): 1105-11.
- [12] Ajonuma LC, Tsang LL, Zhang GH, *et al.* Estrogen-induced

- abnormally high CFTR expression results in ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol Endocrinol*, 2005, **19** (12): 3 038-44.
- [13] Swezey NB, Gauthier C, Gagnon S, *et al.* Progesterone and estradiol inhibit CFTR-mediated ion transport by pancreatic epithelial cells. *Am J Physiol*, 1996, **271** (5 Pt 1): G747-54.
- [14] Schreiber R, Nitschke R, Greger R, *et al.* The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 1999, **274** (17): 11 811-6.
- [15] Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, *et al.* CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*, 1995, **269** (5 225): 847-50.
- [16] Fong SK, Chan HC. Regulation of anion secretion by prostaglandin E₂ in the mouse endometrial epithelium. *Biol Reprod*, 1998, **58** (4): 1 020-5.
- [17] Caferata EG, Gonzalez-Guerrico AM, Giordano L, *et al.* Interleukin-1 beta regulates CFTR expression in human intestinal T84 cells. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1 500** (2): 241-8.
- (2007年2月10日 收稿)

Study on Relationship between Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator and Pathogenesis of Ovarian Hyperstimulation Syndrome

Lei JIN, Rui-ling TANG

(Reproductive Medicine Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Wuhan, 430030)

【ABSTRACT】 Objective: To explore the effect of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). **Methods:** Immature female Wistar rats aged 22 d were divided into two groups: the OHSS group (experimental, $n=16$) was given 10 IU PMSG for 4 consecutive days and given 30 IU hCG on 26-day-old to produce ovarian hyperstimulated manifestations; the conventional stimulation group (control, $n=16$) was given 10 IU PMSG on 24-day-old for 2 consecutive days and given 10 IU hCG on 26-day-old. On 28-day-old, the rats were injected via the tail vein Methylene blue dye solution to evaluate the capillary permeability in the peritoneal cavity and ovary; blood samples were collected from the inferior caval vein to evaluate serum E₂; the expression of CFTR protein in rat ovary was examined by immunohistochemistry and Western blot respectively. **Results:** The peritoneal and ovarian Methylene blue content were significantly higher in experimental group, ovarian weights, serum concentration of E₂ and ovarian CFTR protein expression were also markedly increased. **Conclusion:** Estradiol-induced abnormally high CFTR expression probably result in formation of ovarian cysts and electrolyte disturbances during ovarian hyperstimulation syndrome.

Key words: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR); ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS); chloride channel