

## 米非司酮对人早孕期绒毛中 PGF2 $\alpha$ 合成及表达的影响

唐 薇, 王自能, 金海燕

(暨南大学附属第一医院 妇产科, 广东 广州 510630)

**[摘 要]** 目的: 通过对比观察米非司酮对人早孕期绒毛中前列腺素合成及表达的影响, 探讨米非司酮终止早孕的分子机制。方法: 采用免疫组化法检测环加氧酶-2(COX-2)及 ELISA 法检测前列腺素 F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ) 在米非司酮药流组与人流对照组(孕 7~9 周各 12 例)绒毛中表达的差异, 了解米非司酮对人早孕期绒毛前列腺素合成及表达的影响。结果: 米非司酮药流组滋养细胞中 COX-2 的表达较人流对照组明显增加( $P < 0.01$ ), 其 PU 值( $\bar{x} \pm S$ )分别为(33.52  $\pm$  9.16, 13.42  $\pm$  7.53)。米非司酮药流组绒毛中 PGF2 $\alpha$  的表达较人流对照组明显增加( $P < 0.01$ ), 其质量浓度值( $\bar{x} \pm S$ )分别为(30.14  $\pm$  8.20, 15.01  $\pm$  4.14) ng/mL。结论: 米非司酮可产生孕酮撤退效应, 导致前列腺素合成酶 COX-2 水平升高, 引起 PGF2 $\alpha$  合成增加, 不利于妊娠的维持。

**[关键词]** 米非司酮; 绒毛; 滋养细胞; 环加氧酶-2; 前列腺素 F2 $\alpha$

**[中图分类号]** R714.23 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)02-0166-04

## Effect of mifepristone on synthesis and expression of prostaglandin F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ) in human villus of early pregnancy

TANG Wei, WANG Zi-neng, JIN Hai-yan

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

**[Abstract]** **Aim:** To investigate the effect of mifepristone on the synthesis and expression of prostaglandin F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ) in human villus during the early pregnancy and its molecular mechanism of mifepristone used for medical abortion. **Methods:** The patients in early pregnancy(7~9 weeks) were divided into mifepristone group ( $n = 12$ ) and artificial abortion group( $n = 12$ ) at random. Immunohistochemistry (streptavidin-peroxidase, S-P) was used to detect the level of cyclooxygenase-2(COX-2) in human villous trophoblasts and the expression of PGF2 $\alpha$  in human villus was determined with enzyme linked immunosorbent assay. **Results:** The expression of COX-2 and PGF2 $\alpha$  in mifepristone group was significantly higher than that of control group ( $P < 0.01$ ). The PU value of COX-2 ( $\bar{x} \pm S$ ) was (33.52  $\pm$  9.16) and (13.42  $\pm$  7.53). The concentration of PGF2 $\alpha$  ( $\bar{x} \pm S$ ) was (30.14  $\pm$  8.20) and (15.01  $\pm$  4.14) (ng/mL) respectively. **Conclusion:** Antiprogesterone mifepristone can increase the synthesis and expression of PGF2 $\alpha$  in human villus during the early pregnancy and consequently be unfavorable for maintenance of pregnancy.

**[收稿日期]** 2008-10-02

**[基金项目]** 广东省中医药局基金项目(2008095)

**[作者简介]** 唐 薇(1978-), 女, 博士研究生, 研究方向: 妇产科病理

通讯作者: 王自能, 男, 教授, 博士生导师, Tel: 020-85221951; E-mail: wangzineng2007@126.com

[Key words] mifepristone; villus; trophoblasts; cyclooxygenase-2 (COX-2); prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ )

1957年Bergstrom<sup>[1]</sup>从精液中分离出一种前列腺素(prostaglandin, PG)结晶,随后又分离到一系列的PGs。PGs是一族含有20个碳原子的不饱和脂肪酸,由一个5碳环和2条侧链组成,基本结构是前列腺烷酸,根据其五碳环及双侧链的结构不同及功能基团取代部位的不同分3类、9型。除红细胞外,天然PGs广泛存在于人体组织中,对各种生理过程有作用。在女性生殖方面对输卵管运动、卵巢功能及子宫舒缩功能有直接影响<sup>[2]</sup>,其中PGE2/PGF2比例平衡对胚胎植入及胚胎存活十分重要。

环加氧酶(cyclooxygenase, COX),又称前列腺素H合成酶(prostaglandin H synthase, PGHS)、环氧化酶、环氧合酶等,具有环氧合酶和过氧化物合成酶的双重功能,细胞膜的磷脂在磷脂酶的作用下水解出花生四烯酸(arachidonic acid, AA),AA经过COX的作用转变为PGs,发挥多种生物学作用<sup>[3]</sup>,COX是PGs合成的重要限速酶。

米非司酮配伍前列腺素对终止早孕有显著的临床效果及米非司酮可以促进宫颈成熟和提高子宫肌层对前列腺素的敏感性,在我国已将米非司酮广泛用于早孕( $\leq 7$ 周)的药物流产;8~12周的早孕晚期药物流产效果肯定,流产未完全者用药后再行清宫术,手术容易进行且减少创伤机会;据此多家医院将米非司酮配伍米索前列醇作为终止早孕晚期的首选方法,但是合理剂量与给药途径则尚待探讨<sup>[4]</sup>。本实验探讨米非司酮对人早孕期绒毛中前列腺素合成及表达的影响,并将药流组的孕周扩大至7~9周,进而了解米非司酮终孕的可能分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

选取2007-08-01~2008-03-31在暨南大学第一附属医院妇科要求终止早孕的早孕妇女,研究对象知情同意。

纳入标准:经双合诊、妊娠试验,B超确诊为宫内早孕;平时月经规则,经量正常;半年内未服用激素类药物及抗前列腺素药物;无生殖系统炎症及肿瘤;未放置宫内节育器。

### 1.2 用药与分组

将病例随机分成2组:

A组(人流对照组,  $n=12$ 例):年龄19~34岁,停经7~9周(孕50~56 d共7例,孕57~63 d共5例),常规负压吸引流产,收集绒毛。B组(米非司酮药流组,  $n=12$ 例):年龄20~40岁,停经7~9周(孕50~56 d共4例,孕57~63 d共8例),顿服米非司酮150 mg,24~48 h内常规负压吸引流产,收集绒毛。

### 1.3 主要试剂与仪器

兔抗人COX-2多克隆浓缩型(抗体稀释浓度1:50)抗体,SP免疫组化试剂盒及DAB显色剂均购自福州迈新生物技术开发公司;PGF2 $\alpha$ 定量酶联免疫检测试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。

Q550IW显微镜计算机图像分析系统购自Leica公司。680型酶标仪购自BIO-RAD公司。

### 1.4 实验方法

(1)标本处理 绒毛组织用体积分数为0.9%生理盐水冲洗后将部分新鲜组织立即置于-80℃超低温冰箱冻存备用,其余组织在体积分数为10%的中性甲醛中固定12~24 h,常规石蜡包埋后制成4~5  $\mu\text{m}$ 厚的组织切片。切片苏木素伊红(HE)染色光镜下观察组织学形态,筛选组织标本。

(2)免疫组化检测环加氧酶-2(COX-2) 采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶染色法(S-P法)。组织切片常规脱蜡后,浸于10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.0)中,微波炉内加热至100℃,15 min,自然冷却至室温;PBS冲洗3次后加过氧化物酶阻断剂50  $\mu\text{L}$ (试剂A),室温下孵育10 min;PBS冲洗3次后加非免疫性动物血清50  $\mu\text{L}$ (试剂B),室温下孵育10 min;甩去血清后加稀释好的一抗50  $\mu\text{L}$ ,放置于4℃的冰箱中过夜;PBS冲洗3次后加生物素标记的二抗50  $\mu\text{L}$ (试剂C),室温下孵育10 min;PBS冲洗3次后加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液50  $\mu\text{L}$ (试剂D),室温下孵育10 min;PBS冲洗3次后加新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)液100  $\mu\text{L}$ ,显色5 min后流水冲洗中止显色,脱水,封片。实验设PBS代替一抗为阴性对照和阳性对照。

(3)ELISA法检测PGF2 $\alpha$  用组织匀浆器按匀浆介质(PBS)体积总量为组织块质量的4倍制成20%组织匀浆液。按照PGF2 $\alpha$ 定量酶联免疫检测

试剂盒说明书要求配制洗涤缓冲液和标准溶液。每孔各加入标准品或待测样品 100  $\mu$ L,将反应板充分混匀后置 37  $^{\circ}$ C 120 min;用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次,向滤纸上印干;每孔各加入第一抗体工作液 100  $\mu$ L,将反应板充分混匀后置 37  $^{\circ}$ C 60 min;用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次,向滤纸上印干;每孔各加入酶标抗体工作液 100  $\mu$ L,将反应板置 37  $^{\circ}$ C 30 min;用洗涤液将反应板充分洗涤 4~6 次,向滤纸上印干;每孔各加入底物工作液 100  $\mu$ L,置 37  $^{\circ}$ C 暗处反应 15 min;每孔各加入 100  $\mu$ L 终止液混匀,30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测吸光值。

(4)COX-2 图像分析 光镜下观察参照 HE 对照、阳性对照、阴性对照,以胞浆内呈现棕黄色颗粒为阳性染色,无棕黄色颗粒为阴性染色。采用 Leica Q550IW 图像分析系统,应用申洪<sup>[5]</sup>提出的阳性单位(positive unit, PU)概念定量表达免疫组化阳性反应程度。将排除了切片本底因素后的纯免疫组化反应程度按灰度图像分为 0~100 个等级,每一个等级定义为一个 PU,PU 值大小与阳性反应程度成正比关系。计算公式:  $PU = [(G\alpha - G\beta) / Gmax] \times 100$ , ( $G\alpha$ 、 $G\beta$  分别为待测结构和背景的平均灰度,  $Gmax$  等于 256,为检测仪的最大灰度)。每个标本随机测试 20 个视场中绒毛中间间质的灰度值(记为  $G\beta$ ),以每个绒毛结构中间分别取横轴、纵轴、45 度斜轴与外周表达阳性的滋养细胞交点处测定灰度值记为  $G\alpha$ ,每个绒毛测得 8 个  $G\alpha$  值,利用上述公式计算。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 医学统计软件行进行数据分析。分析结果采用  $t$  检验,滋养细胞中 COX-2 用 PU (均值  $\pm$  标准差) ( $\bar{x} \pm S$ ) 表示;绒毛中 PGF2 $\alpha$  的表达根据试剂盒提供的 PGF2 $\alpha$  各标准浓度的净 A 值制作标准曲线,在标准曲线上查得各样本对应的 PGF2 $\alpha$  质量浓度值,用(均值  $\pm$  标准差) ( $\bar{x} \pm S$ ) ng/mL 表示,以  $P < 0.01$  具有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 免疫组化光镜下组织学形态

米非司酮药流组与人流对照组均可见完整的孕早期绒毛结构。COX-2 主要强表达于绒毛表面的合体滋养细胞胞浆中,细胞滋养细胞胞浆弱表达,血管内皮细胞和间质略有着色,米非司酮药流组阳性染色较人流对照组强(图 1、2)。



图 1 人流对照组 COX-2 免疫组化光镜下(SP  $\times 200$ )

图 2 米非司酮药流组 COX-2 免疫组化光镜下(SP  $\times 200$ )

2.2 COX-2 免疫组化图像分析和 PGF2 $\alpha$  定量酶联免疫检测分析结果

两组 COX-2 的 PU 值比较差别有显著性,在米非司酮药流组滋养细胞的表达较人流对照组明显增强( $t = 74.3, P < 0.01$ );两组 PGF2 $\alpha$  质量浓度值比较差别有显著性,米非司酮药流组绒毛中的表达较人流对照组明显增强( $t = 5.18, P < 0.01$ ,表 1)。

表 1 COX-2 和 PGF2 $\alpha$  在人早孕期绒毛中表达的 PU 值和质量浓度值( $\bar{x} \pm S$ )

组别	标本例数	COX-2 PU 值	$\rho$ (PGF2 $\alpha$ ) / (ng $\cdot$ mL $^{-1}$ )
米非司酮药流组	12	33.52 $\pm$ 9.16	30.14 $\pm$ 8.20
人流对照组	12	13.42 $\pm$ 7.53	15.01 $\pm$ 4.14

3 讨论

迄今已发现了由两种不同基因编码的 3 种 COX,即 COX-1、COX-2 和 COX-3。COX-1 为结构型酶,活性较稳定,不受诱导物和抑制物的影响而保持恒量,属“管家基因”,促进生理性 PGs 的合成,参与维持机体正常的生理功能,保持内环境稳定。COX-2 为诱导型酶,属“诱导基因”,当细胞受到各种刺激时可迅速合成,参与细胞增殖、分化,并与炎

症、疼痛、肿瘤、心血管等疾病的发生发展密切相关。氧化应激、各种炎症细胞因子、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血小板激活因子(platelet activating factor, PAF)等均可以诱导COX-2的表达。而抗炎症细胞因子IL-4、IL-10、IL-13、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等可抑制LPS、TNF等对COX-2的诱导。一般认为COX-2仅在恶性肿瘤组织和炎症中被诱导表达,近来国外研究证实,生殖系统的子宫内膜上皮和输卵管的分泌上皮中可以检测到COX-2mRNA和蛋白<sup>[6]</sup>,COX基因的适时表达保证了许多重要生殖过程,例如排卵、黄体退化、胚胎着床和分娩等的顺利进行<sup>[7-8]</sup>。人类COX-2的增量调节与足月及早产的分娩发动相关联,有效地抑制COX-2在减弱由炎症引起的早产中可能有重要的作用。Sugino等<sup>[9]</sup>认为孕酮撤退导致蜕膜间质细胞中的铜锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-superoxide dismutase, Cu, Zn-SOD)表达下降、脂质过氧化产物(lipid peroxidation, LPO)和COX-2水平升高、激活核因子- $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)引起PGF2 $\alpha$ 合成增加与所诱发的自然流产有关。

妊娠期PGs合成和降解的研究主要在人类胎膜、蜕膜和子宫的表达,而本研究主要探讨胎盘中PGs的合成和降解作用。刘芳等<sup>[10]</sup>实验表明米非司酮可明显抑制离体人早孕绒毛和蜕膜组织细胞的内分泌激素分泌,刺激前列腺素的合成与释放。本研究结果证实:米非司酮可明显增强人早孕期绒毛中PGF2 $\alpha$ 的合成及表达,推测米非司酮可能通过抗孕激素作用,产生孕酮撤退效应,导致COX-2水平升高,使PGF2 $\alpha$ 合成及表达增加。PGF2 $\alpha$ 引起血管收缩,蜕膜组织变性坏死继而直接或间接影响绒毛组织的血液供应,同时激活子宫平滑肌收缩,导致正常妊娠无法维持而终止。

#### [参考文献]

- [1] BERGSTROM S, SJOVALL J. The isolation of prostaglandin [J]. Acta Chem Scand, 1957, 11(1): 1086 - 1092.
- [2] PATEL F A, CHALLIS J R. Prostaglandins and uterine activity [J]. Front Horm Res, 2001, 27(4): 31 - 56.
- [3] EMMET H, MARCI G, YANA F, et al. Placental expression of enzymes regulating prostaglandin synthesis and degradation [J]. Am J Obstet and Gynecol, 2005, 192(6): 1836 - 1843.
- [4] 史益凭, 朱泰来, 桂幼伦, 等. 停经50~70天早孕妇女药物流产的安全性与有效性临床研究[J]. 中国计划生育学杂志, 1998, 7(9): 468.
- [5] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 12(1): 89 - 92.
- [6] SALES K J, JABBOUR H N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium [J]. Reproduction, 2003, 126(5): 559.
- [7] GROSS G, IMAMURA T, VOGT S K, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents inflammation-mediated preterm labor in the mouse [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000, 278(6): 1415 - 1423.
- [8] TSUBOI K, SUGIMOTO Y, IWANE A, et al. Uterine expression of Prostaglandin H2 synthase in late pregnancy and during parturition in prostaglandin F receptor-deficient mice [J]. Endocrinol, 2000, 141(1): 315 - 324.
- [9] SUGINO N, TAKIGUCHI S, UMEKAWA T, et al. Oxidative stress and pregnancy outcome: A workshop report [J]. Placenta, 2007, 28(suppl): S48 - S50.
- [10] 刘芳, 于俊荣, 樊瑞芹, 等. 米非司酮和利洛司酮对人早孕绒毛、蜕膜分泌功能的影响[J]. 生殖医学杂志, 2006, 15(3): 168 - 171.

[责任编辑:朱颖娜]