

- 2 覃 萍, 曾 华. 新生儿高胆红素血症对肾小管功能损害与尿 β_2 微球蛋白的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(2): 149-150.
 - 3 俞 君. 新生儿高胆红素血症对肾功能的影响及血 β_2 微球蛋白测定的临床意义[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(7): 659-661.
 - 4 金汉珍, 黄德珉, 官希吉. 实用新生儿学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 269-271.
 - 5 Cole JW, Portman RJ, Lim Y, et al. Urinary beta2-microglobulin in full-term newborns: evidence for proximal tubular dysfunction in infants with meconium-stained amniotic fluid[J]. Pediatrics, 1985, 76(6): 958-964.
 - 6 王宝西, 王茂贵, 袁俊英, 等. 新生儿黄疸与血清尿素氮水平的关系[J]. 新生儿科杂志, 1994, 9(4): 181-182.
 - 7 杨霁云. 新生儿肾功能及其检查[J]. 新生儿科杂志, 1986, 1(8): 134-137.
 - 8 董德长. 实用肾脏病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 1201-1215.
 - 9 王 林, 郭宗远. β_2 -微球蛋白在小儿疾病诊治中的研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(12): 897-898.
- [收稿日期 2011-05-04][本文编辑 黄晓红 吕文娟]

临床研究 · 论著

神经生长因子对子宫腺肌病基质细胞生存率及雌激素受体 α 表达的影响

谢岸团

作者单位: 517100 广东, 河源市连平县人民医院妇产科

作者简介: 谢岸团 (1969-), 女, 大学专科, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤. E-mail: xieantuan@163.com

[摘要] 目的 研究神经生长因子 (NGF) 对子宫腺肌病患者离体培养在位子宫内膜基质细胞雌激素受体 α 表达的影响。方法 用 10 ng/ml、50 ng/ml 和 100 ng/ml 的神经生长因子分别对体外原代培养人子宫内膜细胞进行干预, 用 MTT 法测定内膜基质细胞生长的增殖情况, 用 Western-blotting 测定 50 ng/ml NGF 对病例组基质细胞雌激素受体 α 表达的变化。结果 50 ng/ml 的 NGF 可促进子宫内膜基质细胞增殖, 细胞存活率为 82.61%, 比其他浓度 NGF 显著升高 ($P < 0.05$); 50 ng/ml NGF 对病例组和对照组不同细胞雌激素受体表达有影响, 病例组腺上皮细胞和基质细胞总体均数差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 50 ng/ml 的 NGF 可促进子宫腺肌病在位内膜基质细胞增殖及腺上皮细胞和基质细胞雌激素受体 α 表达。

[关键词] 神经生长因子; 子宫腺肌病; 雌激素受体

[中图分类号] R 711.74 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)10-0935-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2011.10.09

Effect of nerve growth factor on stromal cell proliferation and estrogen receptor α expression of eutopic endometrial cells of adenomyosis uterine XIE An-tuan. Department of Obstetrics and Gynecology, the Lianping County Hospital, Guangdong 517100, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of nerve growth factor on stromal cell proliferation and estrogen receptor α (ER α) expression of eutopic endometrial cells of adenomyosis uterine. **Methods** The eutopic endometrial cells were isolated, cultured and identified in vitro, then added to 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml NGF. The growth and proliferation of the stromal cells were measured by MTT assay; Western-blotting was used to measure the changed ER α . **Results** 50 ng/ml NGF could accelerate the proliferation of eutopic endometrial stromal cells of adenomyosis uterine, it showed a significant difference compared to other group ($P < 0.05$); The expression of ER α in eutopic endometrial stromal cells were significantly increased after the treatment of 50 ng/ml NGF ($P < 0.01$). **Conclusion** 50 ng/ml NGF can significantly accelerate the cell proliferation of eutopic endometrial stromal cells of adenomyosis uterine and increase the expression of ER α .

[Key words] Nerve growth factor; Adenomyosis; Estrogen receptor

子宫腺肌病是子宫内膜腺体及间质侵入子宫肌层的良性病变。随着妇科研究的不断深入,多数学者^[1]认为子宫腺肌病痛经的发生与子宫内膜神经生长因子(nerve growth factor, NGF)表达增加有关。NGF是靶源性神经营养因子,支持神经元存活、生长分化及维持功能,在调控神经病理疼痛中起重要作用^[2]。子宫腺肌病是一种雌激素依赖性疾病,雌激素不仅对其受体有正向调节,还促使子宫内膜生长。本试验通过对比 NGF 对体外培养子宫腺肌病在位内膜基质细胞雌激素受体 α 表达的影响,为探讨子宫腺肌病的发病机理提供参考,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2010-01 ~ 2010-10 在我院妇产科行子宫切除术患者 18 例,其中病理检查证实为子宫腺肌病者 10 例(增殖期 6 例,分泌期 4 例)为病例组,子宫肌瘤(瘤旁邻近正常内膜组织)8 例(增殖期 5 例,分泌期 3 例)为对照组。两组年龄为 40 ~ 50 岁,平均年龄 45 岁。术前 3 个月未用过激素类药物。术前经患者知情同意后取子宫内膜组织用于细胞培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 手术室无菌获取标本,用手术刀于宫腔后壁处切取子宫内膜组织,在无菌培养皿中用 D-Hanks 液冲洗内膜组织表面血液后,用组织剪剪成不超过 1 mm^3 大小的小块置入刻度离心管中 $1\ 000\text{ rpm}$ 离心 10 min ,弃上清,测量组织体积按复合消化酶与组织体积之比为胰蛋白酶-EDTA 5:1,胶原酶 1:1 的比例加入充分吹打混匀后,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱静置消化约 60 min ,溶液中无颗粒状物质或见散在分布絮状物质后,加入含血清的 DMEM/F12 培养基吹打终止消化。采用 Bongso 等^[3]的离心法分离基质细胞,用二次消化法分离腺上皮细胞。基质细胞分离:将消化的细胞悬液置于刻度离心管中以 500 rpm 离心 3 min ,分别收集上清液(主要是基质细胞)以 $1\ 200\text{ rpm}$ 离心 10 min ,弃上清液即得基质细胞,加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,重悬细胞以 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的密度接种于细胞培养瓶。腺上皮细胞分离:将消化的细胞悬液置于刻度离心管中以 500 rpm 离心 3 min ,收集沉淀物用无血清 DMEM/F12 培养液漂洗, 800 rpm 离心 5 min ,弃上清液加入 0.25% 胰蛋白酶-EDTA,按 1:5 比例加入后放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱静置消化 10 min , 800 rpm 离心 5 min 弃上清液,加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,重悬

细胞按 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的浓度接种细胞。基质细胞和腺上皮细胞在接种 24 h 后均贴壁。两种细胞于接种后 48 h 换液。

1.2.2 细胞免疫组织化学鉴定 将分离培养的腺上皮细胞和基质细胞分别用细胞角蛋白 19(CK-19)和波形蛋白(vimentin)抗体进行免疫组织化学鉴定。用 PBS 代替第一抗体作为阴性对照,显微镜下随机选取 5 个视野($\times 400$)观察。结果采用积分^[4]表示。积分 = 表达阳性细胞百分率积分(PP) $\times$ 染色强度积分(SI)。

1.2.3 NGF 干预 取生长状态良好的对照组子宫内膜基质细胞培养至达 80% 融合后,加入含 0.01% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基吹打成细胞悬液,以每孔 1×10^7 个细胞接种于 96 孔培养板,设 3 个复孔,待细胞近融合时,吸出培养基加入无血清培养基用不同浓度的 NGF(10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml)作用于原代培养的子宫内膜基质细胞 18 h 后,加入 MTT 0.02 ml/孔,继续培养 4 h。用噻唑盐(MTT)法测细胞存活数(选用 490 nm 在酶联免疫监测仪上测量各处的吸光度 A 值),细胞存活率 = 试验组光吸收值 $\div$ 对照组光吸收值 $\times 100\%$ 。根据细胞存活数选出 NGF 最佳促细胞生长的浓度以备后续试验。

1.2.4 雌激素受体 α 表达量的检测 将分离的病例组和对照组子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞分别以每孔 5×10^4 个细胞接种于 6 孔培养板,设 3 个复孔,待细胞贴壁近融合时,吸出培养基加入无血清培养基用 50 ng/ml NGF 作用于原代培养的子宫内膜腺上皮细胞和基质细胞 18h 后,采用 Western-blotting 法定量检测病例组和对照组中雌激素受体 α 的表达。细胞总蛋白的提取:细胞去除培养液,用 PBS 洗一遍。按照 6 孔板每孔加入 100 μl 裂解液的比例加入裂解液。用枪吹打数下,使裂解液和细胞充分接触。通常裂解液接触细胞 1 ~ 2 sec 后,细胞就会被裂解。充分裂解后, $12\ 000\text{ g}$ 离心 3 ~ 5 min,取上清液。提取细胞总蛋白后,立即测定蛋白浓度。总蛋白的保存:提取的总蛋白,加入 5 $\times$ SDS 蛋白上样缓冲液(按 5:1 的比例), $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。Western-blotting 检测蛋白的表达:取上述蛋白样品各 30 μg ,进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blotting 分析。玻璃板对齐后放入夹子中卡紧,然后垂直固定在架子上;配 10% 分离胶,加入 TEMED 后立即摇匀、灌胶;当水和胶之间有一条折射线时,再等 3 min 使胶充分凝固,倒去胶上层的水

并用吸水纸将水吸干;配 5% 的浓缩胶,加入 TEMED 后立即摇匀,将剩余空间灌满浓缩胶,然后将梳子插入浓缩胶中;等到浓缩胶凝固后,两手分别捏住梳子的两边竖直向上轻轻将其拔出;用水冲洗一下浓缩胶,将其放入电泳槽中;加足够的电泳缓冲液后开始加样,用微量进样器吸取 15 μ l 样品缓慢加入样品孔中;用 100 V 进行浓缩胶电泳,200 V 在分离胶中电泳,电泳至溴酚蓝刚跑出即终止电泳;取下凝胶转膜。剪取与凝胶样品同样大小的 PVDF 膜和 6 张滤纸,膜在甲醇中浸 5 min,然后连同滤纸,海绵一起浸于转移缓冲液中;在靠负极端(黑色)依次叠放海绵、六层滤纸、胶、膜、六层滤纸、海绵,放于转移装置上;200 mA 转膜 45 min;将膜浸在封闭液中室温封闭 4 h 后,再放 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜;将膜取出直接放入一抗(1:300 稀释)中,室温反应 3 h;TBST 洗膜,15 min $\times$ 3 次;将膜转入二抗(1:1 000)中,室温反应 1 h;TBST 洗膜,15 min $\times$ 3 次;加内参(GAPOH)一抗和二抗;方法类同目标蛋白抗体加法。采用化学发光法(ECL)显影。应用 Vilber Lourmat 凝胶图像分析系统对图像密度扫描并进行拍照。Bandscan5.0 软件定量分析扫描结果。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多个样本均数比较采用完全随机设计的方差分析,均数间两两比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 比色法检测不同浓度 NGF 对子宫内层基质细胞存活率影响 50 ng/ml 的 NGF 可促进子宫内层基质细胞增殖,细胞存活率比同组其他浓度的 NGF 显著升高($P < 0.05$);与空白对照组对子宫内层基质增殖率比较显著升高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 MTT 比色法比较基质细胞存活率

组别	例数	细胞存活率(%)
空白对照组	8	21.33 $\pm$ 1.23
10 ng/ml	10	60.63 $\pm$ 2.11
病例组 50 ng/ml	10	85.67 $\pm$ 2.13 [*] [▲]
100 ng/ml	10	44.00 $\pm$ 1.34

注:50 ng/ml NGF 组与其它浓度 NGF 组比较,^{*} $P < 0.05$;50 ng/ml NGF 组与对照组比较,[▲] $P < 0.05$

2.2 雌激素受体 α 在子宫内层细胞中表达 50 ng/ml NGF 对病例组和对照组不同细胞雌激素受体表达有影响(见图 1),对照组腺上皮细胞和基质细胞之间总体均数比较差异无统计学意义($P > 0.05$)

外,其余任何两组间总体均数比较差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 雌激素受体 α 在子宫内层细胞中表达($\bar{x} \pm s$)

组 别		例数	雌激素受体 α 表达量
对照组	腺上皮细胞	8	51.30 $\pm$ 3.39
	基质细胞	8	40.63 $\pm$ 2.78
病例组	腺上皮细胞	10	60.77 $\pm$ 5.30 [*]
	基质细胞	10	84.15 $\pm$ 4.24 [▲]

注: $F = 61.94$, $P < 0.01$;病例组腺上皮细胞与对照组腺上皮细胞比较,^{*} $P < 0.01$,病例组基质细胞与对照组基质细胞比较,[▲] $P < 0.01$



注:1,2 对照组腺上皮细胞;3,4 病例组基质细胞;5,6 病例组腺上皮细胞;7,8 对照组基质细胞

图 1 ER- α 蛋白的表达-Western Blot 结果

3 讨论

3.1 NGF 在激素敏感器官中的作用 中枢神经系统和外周神经系统的神经元,神经胶质细胞可合成 NGF。合成的内源性 NGF 既可以作为靶源性逆向神经营养因子影响其上级神经元,还可通过旁分泌,自分泌方式影响周围组织和细胞。对 NGF 起反应的神经元主要有交感神经元,部分感觉神经元和中枢胆碱能神经元。外周的 NGF 对肾上腺素能神经及初级神经元有作用,它可引起这些神经元分化,神经突起生长,激活儿茶酚胺合成酶及神经肽合成酶合成。正常人子宫肌层,子宫内层-肌层界面及子宫内层基底层深部都由神经纤维支配,但子宫内层上 2/3 无神经纤维,目前研究认为子宫腺肌病发生是子宫内层突破薄弱基底层进入子宫肌层,推测子宫腺肌病可能是由于内层基底层分泌 NGF 促局部雌激素受体表达增加,导致内层侵袭,分裂能力增强伴局部神经纤维向内生长。有研究发现,NGF 对神经,非神经组织均具有调节作用。在激素敏感器官(前列腺和子宫)基质细胞调控上皮细胞增殖反应及甾体激素分泌,子宫内层腺上皮细胞对雌、孕激素反应不依赖于自身激素受体,而是依赖于激素受体在间质细胞中表达的强弱^[5]。从本试验结果我们推测是否基质细胞通过产生 NGF 对腺上皮细胞进行调控。

3.2 神经生长因子与甾体激素 Romero 等^[6]发现 NGF 促进新生小鼠卵巢 FSH 受体的表达并使其对

促性腺激素产生敏感和依赖,其次对卵泡的生长也有促进作用。Dissen 等^[7]研究显示,NGF 能促进体外培养的牛卵泡膜细胞的孕激素分泌及卵泡膜细胞增生。Salas 等^[8]研究发现,NGF 能促进颗粒细胞 FSH 受体形成,可以提高 FSH 诱导的雌二醇分泌,同时抑制孕激素分泌,显示 NGF 能阻止颗粒细胞过早黄素化,并认为 NGF 是人卵巢内促进甾体激素合成,增加颗粒细胞对促性腺激素反应性的生长因子。NGF 导致前列腺素(PGs)的增加,机制是交感神经节后神经元(肾上腺素能神经末梢)能通过合成 PGE2 和 PGI2。NGF 通过 TrkA 刺激交感神经节后神经元,导致 PGs 的释放增加。NGF 还可通过诱导肥大细胞的 COX 表达而导致 PGs 的产生增加^[9]。雌性哺乳动物处于发情周期与妊娠的过程中时,卵巢、输卵管分泌多种细胞生长因子,其中包括 NGF、表皮生长因子、胰岛素样生长因子等^[10]。最初的研究结果显示 NGF 的生物学功能仅仅限于神经系统,但越来越多的研究表明 NGF 也可以作用于其他系统的非神经细胞,在内分泌系统中,发现 NGF 对内、外分泌腺中激素分泌细胞的分化有作用^[7]。本试验从分子水平证实 50 ng/ml NGF 对子宫内膜基质细胞雌激素受体表达的影响。提示,子宫腺肌病基质细胞存在雌激素的结合位点,推测 NGF 亦可能通过雌激素受体对子宫在位内膜促分裂能力产生影响。

参考文献

- 1 李建勇,瞿全新,李宝江.神经生长因子受体在子宫腺肌病中的表达及意义[J].第三军医大学学报,2010,32(14):1570-1572.
 - 2 蔡文琴.发育神经生物学[M].北京:科学出版社,2007:467-473.
 - 3 Bongso A, Gajra B, Lian NP, et al. Establishment of human endometrial cell cultures[J]. Hum Reprod, 1988, 3(6):705-713.
 - 4 李书勤,孔丽娜,孙青,等. P16、PRB 在子宫内膜异位症和子宫腺肌病中的表达[J].实用医学杂志,2010,26(17):3202-3204.
 - 5 Barbier CS, Becker KA, Troester MA, et al. Expression of exogenous human telomerase in cultures of endometrial stromal cells does not alter their hormone responsiveness[J]. Biol Reprod, 2005, 73(1):106-114.
 - 6 Romero C, Paredes A, Diasen GA, et al. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary[J]. Endocrinology, 2002, 143(4):1485-1494.
 - 7 Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, et al. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary[J]. Endocrinology, 2001, 142(5):2078-2086.
 - 8 Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, et al. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(6):2396-2403.
 - 9 全进毅,张信美,林俊.神经生长因子及其受体与子宫内膜异位症疼痛机制[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2010,29(1):45-47,51.
 - 10 史小林.人类生殖学[M].北京:科学出版社,2003:34-83.
- [收稿日期 2011-04-06][本文编辑 刘京虹 蓝斯琪]

临床研究·论著

超重及肥胖患者血清 IL-6 和 C-反应蛋白水平的检测分析

王权明, 彭云波, 章永旗

作者单位: 547200 广西,南丹县人民医院内一科

作者简介: 王权明(1976-),男,大学本科,医学学士,主治医师,研究方向:冠心病与高血压病的诊治。E-mail:wang_120119@163.com

[摘要] 目的 探讨在超重及肥胖患者中,血清白细胞介素-6(IL-6)、C-反应蛋白(CRP)水平变化及意义。方法 选择 37 例正常体重者和 42 例超重及肥胖患者,常规测量血压、体重、身高,计算体重指数,抽取空腹静脉血检测其血糖、血脂、胰岛素、IL-6、CRP。结果 与正常体重人群相比,在超重及肥胖患者中,收缩压、甘油三酯、IL-6 及 CRP 水平均高于正常体重组($P < 0.05$)。在超重及肥胖患者中,血清 IL-6、CRP 水平均与肥胖相关指数呈正相关。结论 在超重及肥胖人群中,血清 IL-6、CRP 水平增高与体重指数呈正相关,超重及肥胖与炎症密切相关。