

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130306

精氨酸甲基转移酶 4 及其产物不对称二甲基精氨酸 在多囊卵巢综合征中的初步探讨

石雯沁, 赵纯全

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)患者、人正常对照组血清及 PCOS 模型大鼠、大鼠对照组血清中不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginines, ADMA)的含量,以及 PCOS 模型大鼠卵巢组织中蛋白质精氨酸甲基转移酶 4(protein arginine methyltransferase 4, PRMT4)的表达情况,研究二者与 PCOS 之间的关系。**方法:**运用 ELISA 测定 49 例 PCOS 患者、20 例人正常对照组以及 20 例 PCOS 模型大鼠、20 例大鼠对照组血清中 ADMA 的含量,并采用免疫组化 SP 法测定 PCOS 模型大鼠卵巢组织中 PRMT4 的表达。**结果:**(1)人血清中 ADMA 含量 PCOS 组为 $(0.49 \pm 0.35) \mu\text{mol/L}$, 对照组为 $(0.26 \pm 0.09) \mu\text{mol/L}$, 两组差异具有统计学意义($P=0.00$);(2)大鼠血清中, PCOS 模型组 ADMA 含量为 $(0.55 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$, 对照组为 $(0.23 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$, 两组差异具有统计学意义($P=0.00$);(3)大鼠卵巢组织中, 模型组 PRMT4 积分光密度(integral optical density, IOD)值为 $(44.96 \pm 9.40) \mu\text{mol/L}$, 对照组为 $(18.27 \pm 3.83) \mu\text{mol/L}$, 两组差异具有统计学意义($P=0.00$)。**结论:**PRMT4 的含量累积可能导致其产物 ADMA 的生成增加, 共同参与 PCOS 血管内皮功能紊乱产生, 从而促进 PCOS 的发展。

【关键词】多囊卵巢综合征; 蛋白质精氨酸甲基转移酶 4; 不对称二甲基精氨酸

【中国图书分类法分类号】R711.75

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-09-10

Protein arginine methyltransferase 4 and methylated metabolite asymmetric dimethylarginines in polycystic ovary syndrome

SHI Wenqin, ZHAO Chunquan

(Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate levels of asymmetric dimethylarginines (ADMA) in serum of women with and without polycystic ovary syndrome (PCOS), PCOS model rats and control rats, to explore expressions of protein arginine methyltransferase 4 (PRMT4) in ovarian tissues of PCOS model rats and to explore relationship between levels of ADMA and PRMT4 and PCOS. **Methods:** ELISA was used to investigate levels of ADMA in serum of 49 PCOS patients, 20 normal patients, 20 PCOS model rats and 20 normal rats. Expressions of PRMT4 in ovarian tissues were detected by SP immunohistochemical method (including 20 PCOS model rats and 20 control rats). **Results:** (1) In human serum, ADMA concentrations were $(0.49 \pm 0.35) \mu\text{mol/L}$ and $(0.26 \pm 0.09) \mu\text{mol/L}$ in PCOS group and control group respectively, with significant differences between two groups ($P=0.00$). (2) In rat serum, ADMA concentrations were $(0.55 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$ and $(0.23 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$ in PCOS group and control group respectively, with significant differences between two groups ($P=0.00$). (3) In rat ovarian tissues, PRMT4 integral optical density values were $(44.96 \pm 9.40) \mu\text{mol/L}$ and $(18.27 \pm 3.83) \mu\text{mol/L}$ in PCOS group and control group respectively, with significant differences between two groups ($P=0.00$). **Conclusions:** In ovarian tissues, increased expressions of PRMT4 may bring about elevated ADMA level in serum, which causes endothelial dysfunction of PCOS and affects PCOS development.

【Key words】 polycystic ovary syndrome; protein arginine methyltransferase 4; asymmetric dimethylarginines

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种发病多因性、临床表现呈多态性的内分泌综合征,是妇产科领域中最常见的内分泌疾病。

作者介绍:石雯沁, Email: sunhanle99992000@hotmail.com,

研究方向: 妇科内分泌方向。

通信作者: 赵纯全, Email: zcq113@yahoo.com.cn。

基金项目: 重庆市卫生局 2012 年重点资助项目(编号: 2012-1-016)。

以雄激素过多、排卵障碍以及多囊卵巢为主要特征^[1]。一般认为, PCOS 在青春期及育龄妇女中发生率均较高, 为 5%~10%, 无排卵性不孕妇女中约为 75%, 多毛妇女可高达 85% 以上。PCOS 常引起月经紊乱、痤疮、多毛、不孕、肥胖等, 远期易并发 2 型糖尿病、心血管疾病及子宫内膜癌, 严重威胁女性的健康和生活质量。

目前,PCOS 的病因尚不十分清楚。有研究表明,PCOS 与血管内皮功能失调存在相关性。本文旨在研究蛋白质精氨酸甲基转移酶 4(protein arginine methyltransferase4, PRMT4) 及其产物不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginines, ADMA) 与 PCOS 的相关性, 期待可在其病因学上得到进一步的探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

PCOS 组选择 2011 年 4 月-2012 年 3 月在重庆医科大学妇科门诊就诊的 PCOS 患者 49 例。纳入标准为:2003 年美国生殖医学会鹿特丹会议制定的诊断标准,须符合以下 3 项中的 2 项:①月经稀发、经量少或闭经;②雄激素水平上升的临床(如多毛、痤疮)及或生化依据;③卵巢多囊性改变(超声提示一侧或双侧卵巢直径为 2~9 mm 卵泡至少 12 个以上)。且排除高泌乳素血症、甲状腺疾病、库欣综合征、糖尿病等其他内分泌疾病,肝肾功能正常者。人正常对照组则选择同期就诊的年龄匹配、月经规律、临床及生化排除高雄激素的女性 25 例。

本研究得到重庆医科大学附属第一医院伦理委员会同意,所有参与者均自愿参与。

目前临床上 PCOS 的治疗倾向于保守治疗,以药物为主,于是采用 PCOS 大鼠模型进行组织学实验。雌性 SD 大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供,将它们随机分入 PCOS 模型组和对照组,每组各 20 只。

1.2 研究方法

1.2.1 内分泌检查 由我院妇科检验室同一时间段(早晨 8~10 点)抽取静脉血,月经规则者于月经周期第 1~4 天、月经稀发或闭经者随时或孕酮撤退性出血第 1~4 天空腹取血 5 ml,血液标本以 10% 乙二胺四乙酸钠(EDTA)抗凝,经 2 000 r/min 离心 10 min,吸取上层血清,在 -70 ℃ 冷冻管保存待测。血清催乳素(prolactin, PRL)、黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)、雌二醇(estradiol2, E2)、睾酮(testosterone, T)测定采用自动化学免疫发光法,标本由我院妇科实验室进行检测。血清 ADMA 测定采用酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒,由美国 Bio-Rad 公司提供,操作按照说明书进行。

1.2.2 B 超检查 由我院妇科超声室专科医师操作。均选用腹部 B 超。月经规律者于月经干净第 1~4 天(卵泡早期)进行 B 超检查,月经稀发或闭经者随时或孕酮撤退性出血后第 1~4 天进行检查。

1.2.3 大鼠 PCOS 模型

1.2.3.1 大鼠 PCOS 模型的建立^[2-3] 雌性 SD 大鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。将 6 周龄 SD 大鼠随机分入模型组和对照组,每组 20 只。2 组大鼠均清洁级饲养,环境温度 20 ℃~23 ℃,湿度 40%~60%,每日光照 12 h,自由饮水,喂以标准大鼠颗粒饲料。适应性喂养 2 d 后于 44 d 同龄开始,模

型组大鼠灌胃服用来曲唑 1 mg/(kg·d),溶于 1%羧甲基纤维素(carboxymethylcellulose, CMC)中,对照组灌胃服用 1% CMC。连续灌服 21 d。

1.2.3.2 标本获取、HE 染色和卵巢形态学观察 2 组大鼠在最后 1 次给药后 24 h,腹腔注入 3%戊巴比妥钠(50 mg/kg 体重)麻醉,腹部用 75%酒精消毒后打开腹腔,暴露腹主动脉,用 10 ml 注射器连接 6 号针头经腹主动脉取血 2~3 ml。迅速摘取双侧卵巢,在解剖显微镜下去除卵巢表面的脂肪组织。用刀片经卵巢中轴切下部分卵巢组织用中性福尔马林固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚的切片。血液标本以 10%EDTA 抗凝,经 2 000 r/min 10 min 离心后收集血清,分装, -70 ℃ 冰箱保存。

1.2.3.3 PRMT4、ADMA 测定 大鼠血清 ADMA 测定采用 ELISA 试剂盒,分别操作按照说明书进行。大鼠卵巢组织 PRMT4 测定采用免疫组化 SP 法,兔抗鼠 PRMT4 抗体购于 Biospan 公司,按说明书进行操作。PRMT4 的测定以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。采用 Image-Pro Plus6.0 分析软件测定阳性区域的积分光密度(integral optical density, IOD)值,测定 5 个区域的阳性细胞,以 IOD 值均值反映蛋白表达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,将人 PCOS 组与正常对照组所测的年龄、FSH、LH、E2、T、PRL、孕酮(progesterone, P)等计量资料以及大鼠 PCOS 模型组与对照组所测的 ADMA、PRMT4 计量资料采用秩和检验,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)进行表示。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCOS 组、人正常对照组一般资料、血清性激素水平及 ADMA 水平分析

人正常对照组年龄分部在 17~32 岁,PCOS 组年龄分部在 17~33 岁,平均年龄见表 1,差异无统计学意义。性激素全套结果示,2 组血清 PRL、E2、FSH、P 差异无统计学意义;而 PCOS 组的 T、LH 以及 LH/FSH 均明显高于人正常对照组,差异具有统计学意义。详见表 1。对比见图 1、2。

表 1 PCOS 组、人正常对照组一般资料、血清性激素及 ADMA 水平
Tab.1 Baseline characteristics, hormone profiles and ADMA levels of PCOS group and human normal control group

指标	PCOS 组 (n=49)	人正常对照组 (n=20)	P 值
年龄(岁)	24.05 ± 4.12	24.80 ± 4.20	0.45
PRL(nmol/L)	14.43 ± 6.04	14.78 ± 7.55	0.75
E2(pmol/L)	57.02 ± 34.01	49.40 ± 32.61	0.36
P(ng/ml)	5.69 ± 5.38	5.26 ± 5.10	0.30
FSH(U/L)	5.93 ± 2.38	5.13 ± 1.90	0.18
LH(U/L)	10.83 ± 6.03	4.25 ± 1.91	0.00
T(nmol/L)	0.63 ± 0.22	0.35 ± 0.14	0.00
LH/FSH	1.95 ± 0.94	0.86 ± 0.33	0.00
人血清 ADMA(μmol/L)	0.49 ± 0.35	0.26 ± 0.09	0.00

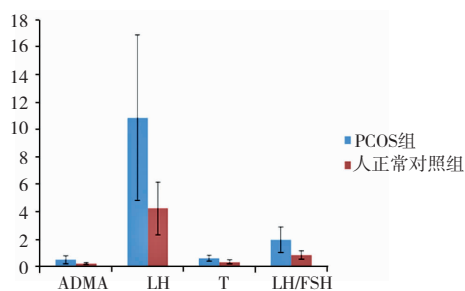


图 1 人 ADMA、LH、T、LH/FSH 含量对比图

Fig.1 Comparison of levels of ADMA, LH, T and LH/FSH in human

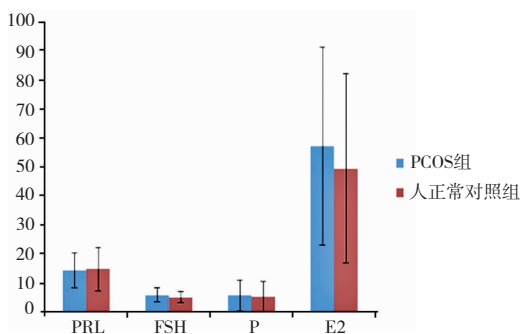


图 2 人 PRL、FSH、P、E2 含量对比图

Fig.2 Comparison of levels of PRL, FSH, P and E2 in human

2.2 大鼠卵巢组织学变化

肉眼观察 PCOS 模型组大鼠卵巢表面苍白, 体积增大, 而大鼠对照组大鼠卵巢色泽红润, 体积无明显改变。光镜下 PCOS 模型组可见大量囊状扩张卵泡, 而大鼠对照组未见。

2.3 大鼠血清中 ADMA、大鼠卵巢组织中 PRMT4 的含量。

PCOS 模型组血清中 ADMA 的含量同样明显高于大鼠对照组, 差异具有统计学意义。PCOS 模型组卵巢组织中 PRMT4 主要在颗粒细胞中表达, 且 PCOS 模型组卵巢组织中 PRMT4 的含量表达明显高于大鼠对照组, 差异亦具有统计学意义。详见表 2。对比见图 3~5。

表 2 大鼠血清中 ADMA 及大鼠卵巢组织中 PRMT4
Tab.2 ADMA levels in serum and PRMT4 levels in ovarian tissues of rats

组别	血清 ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	卵巢 PRMT4 IOD
PCOS 模型组 ($n=20$)	0.55 ± 0.14	44.96 ± 9.40
大鼠对照组 ($n=20$)	0.23 ± 0.08	18.27 ± 3.83
P 值	0.00	0.00

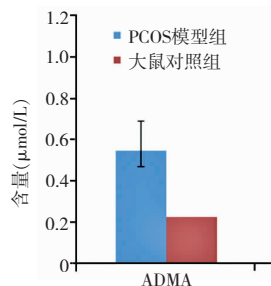


图 3 大鼠血清 ADMA 对比图

Fig.3 Comparison of ADMA in rats' serum

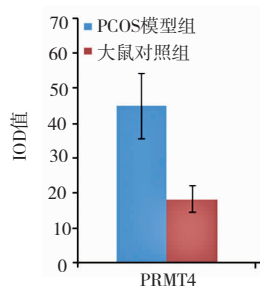
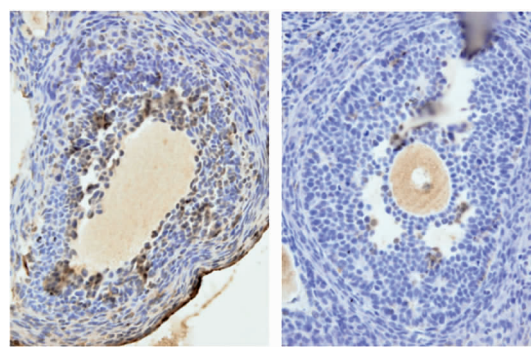


图 4 大鼠卵巢组织 PRMT4 对比图

Fig.4 Comparison of PRMT4 in rats' ovarian tissues



A. PCOS 模型组

B. 大鼠对照组

图 5 PRMT4 在大鼠卵巢组织中的表达 (400 ×)

Fig.5 Expressions of PRMT4 in rats' ovarian tissues (400 ×)

3 讨论

PCOS 是生育期女性常见的女性内分泌紊乱和糖脂代谢异常的全身性疾病, 是女性不孕主要原因之一。PCOS 的发生发展与高雄激素血症、胰岛素抵抗和脂代谢紊乱三大环节密切相关。PCOS 的病理特点肉眼改变为双侧卵巢对称增大 2~5 倍, 包膜厚呈珠白色, 表面常有扩张血管^[4]。有研究表明, 血管内皮功能不全是 PCOS 的临床特征之一, 与高雄激素血症、肥胖及胰岛素抵抗有着密切的联系, 且 PCOS 患者多有远期合并心血管疾病的风险^[5]。

血管内皮功能不全作为心血管系统损伤的早期标志已得到证实^[6]。它作为动脉粥样硬化的一个关键因素, 被认为是内皮功能的一个不利改变, 导致血管收缩, 促进凝血, 血小板活化、黏附及抗纤维蛋白溶解^[7]; 同时也被认为是 2 型糖尿病发生发展的一个机制, 它是通过损伤外周血管的内皮功能实现的, 并导致糖耐量受损, 高血糖以及胰岛素抵抗^[8]。PCOS 多伴有胰岛素抵抗, 远期易并发 2 型糖尿病。于是推测, 内皮功能不全与 PCOS 之间可能存在某种关联。

ADMA 作为一氧化氮合酶 (NO synthase, NOS) 的内源性竞争性抑制剂^[7], 在离体和在体实验中^[9]均证实外源性 ADMA 呈浓度依赖性减少内皮细胞的 NO 合成和抑制乙酰胆碱诱导的血管舒张反应。ADMA 可抑制 NO 的合成, 使 NO/NOS 通路发生障碍、NO 合成减少, 从而导致血管内皮功能障碍最终可能发展为动脉粥样硬化。多种心血管疾病血浆 ADMA 水平明显升高, 并发现其与血管内皮功能不全密切相关, 故 ADMA 被认为是一个新的内皮功能不全的预测因子^[10-11]。正如本实验结果, 无论是人还

是鼠,患 PCOS 后血清中 ADMA 的含量均高于对照组。ADMA 的升高可能与 PCOS 的临床特征之一血管内皮功能不全有关系。

作为 ADMA 生成过程的关键酶 PRMT4, 又称辅激活因子相关的精氨酸甲基转移酶 (coactivator associated arginine methyltransferase CARM1), 在用来曲唑建模成功后的 PCOS 大鼠模型中发现其在 PCOS 大鼠卵巢颗粒细胞中的表达较对照组明显升高。PRMT4 在某些特定底物存在的情况下能催化精氨酸末端或 ω 的胍基氮原子发生甲基化, 生成甲基精氨酸 (monomethylated arginine, MMA), 并继续催化生成 ADMA^[12]。蛋白质精氨酸甲基转移酶 (protein arginine methyltransferases, PRMTs) 是一种在哺乳动物中常见的酶类, 负责对蛋白质底物中的精氨酸进行甲基化。PRMT 有 2 个亚型, I 型 PRMT 和 II 型 PRMT。I 型 PRMT 的底物为核蛋白, 催化生成 ADMA 和 MMA^[11]。其中有 5 种精氨酸甲基转移酶 (PRMT1、PRMT3、PRMT4/CARM1、PRMT6 和 PRMT8) 表现为 I 型活性, 有 3 种 (PRMT5、PRMT7、PRMT9) 属于 II 型^[13-15]。精氨酸甲基化是一种广泛的翻译后修饰方式, 涉及 RNA 加工、转录调控、信号转导、DNA 修复等多种细胞过程, 并参与调节蛋白质与蛋白质之间的相互作用。PRMTs 表达异常与肿瘤、病毒感染、心血管系统疾病等密切相关。精氨酸甲基化是一种高丰度的修饰方式, 包含甲基精氨酸的蛋白质同样也是高丰度的蛋白质, 研究表明, 参与多种心血管系统调节机制的 NO 在内皮细胞中由内源性 NOS 合成。

综上所述, PCOS 患者血清中 ADMA 水平升高, 此结果与 PCOS 模型大鼠血清中 ADMA 含量一致, 而 PRMT4 在 PCOS 模型大鼠卵巢颗粒细胞质集中表达。通过 PCOS 模型大鼠的实验结果本文猜测 PRMT4 的含量累积可能导致其产物 ADMA 的生成增加, 从而引起血管内皮功能紊乱, 进而可能出现胰岛素抵抗甚至心血管疾病, 促进 PCOS 的发展。但 PRMT4 与 ADMA 是如何具体影响 PCOS 的发生发展的, 还需进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Qiao J, Feng H L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence[J]. Hum Reprod Update, 2011, 17(1): 17-33.
- [2] Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, et al. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease[J]. Arch Med Res, 2004, 35(2): 103-108.
- [3] 刘艳丽, 贾莉婷, 马葆靖, 等. 来曲唑法建立 PCOS 大鼠模型的评价[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(8): 1213-1216.
- [4] Liu Y L, Jia L T, Ma B J, et al. Evaluated study on the letrozole-induced model of polycystic ovarian syndrome in rats[J]. Maternal and Child Health Care of China, 2011, 26(8): 1213-1216.
- [5] 张建民. 卵巢病理学[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 2006: 69-72.
- [6] Zhang J M. Ovarian pathology[M]. Nanchang: Jiangxi Scientific Technical Press, 2006: 69-72.
- [7] Rajendran S, Willoughby S R, Chan W P, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with severe platelet and endothelial dysfunction in both obese and lean subjects[J]. Atherosclerosis, 2009, 204(2): 509-514.
- [8] Heutling D, Schulz H, Nickel I, et al. Asymmetrical dimethylarginine, inflammatory and metabolic parameters in women with polycystic ovary syndrome before and after metformin treatment[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(1): 82-90.
- [9] Moran L J, Hutchison S K, Meyer C, et al. A comprehensive assessment of endothelial function in overweight women with and without PCOS[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(10): 761-770.
- [10] Tousoulis D, Tsarpalis K, Cokkinos D, et al. Effects of insulin resistance on endothelial function: possible mechanisms and clinical implications[J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10(10): 834-842.
- [11] Veresh Z, Racz A, Lotz G, et al. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin II-NAD(P)H oxidase pathway[J]. Hypertension, 2008, 52(5): 960-966.
- [12] Valtonen P, Punnonen K, Saarelainen H, et al. ADMA concentration changes across the menstrual cycle and during oral contraceptive use; the cardiovascular risk in young Finns study[J]. Eur J Endocrinol, 2010, 162(2): 259-265.
- [13] 王亮, 张抒扬. 新的血管内皮损伤标记物——非对称性二甲基精氨酸[J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2011, 5(16): 4795-4798.
- [14] Wang L, Zhang S Y. A new marker of vascular endothelium damage— asymmetrical dimethylarginine[J]. Chin J Clinicians (Electronic Edition), 2011, 5(16): 4795-4798.
- [15] Pamuk B O, Torun A N, Kulaksizoglu M, et al. Asymmetric dimethylarginine levels and carotid intima-media thickness in obese patients with polycystic ovary syndrome and their relationship to metabolic parameters[J]. Fertil Steril, 2010, 93(4): 1227-1233.
- [16] Boisvert F M, Chenard C A, Richard S. Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation[J]. Science STKE, 2005, 2005(271): re2.
- [17] Cook J R, Lee J H, Yang Z H, et al. FBXO11/PRMT9, a new protein arginine methyltransferase, symmetrically dimethylates arginine residues[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(2): 472-481.
- [18] Krause C D, Yang Z H, Kim Y S, et al. Protein arginine methyltransferases: Evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential[J]. Pharmacol Ther, 2007, 113(1): 50-87.

(责任编辑: 冉明会)