

基础研究

DOI: 10.11699/cyxh20130725

基质金属蛋白酶-9 和基质金属蛋白酶组织抑制物-3 在反复体外受精-胚胎移植助孕失败患者子宫内膜中的表达

王 芳, 鲜 红, 滕文顶

(成都市妇女儿童中心医院生殖医学中心, 成都 610091)

【摘要】目的:检测基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)和基质金属蛋白酶组织抑制物-3(tissue inhibitor of metalloproteinase-3, TIMP-3)在反复体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)助孕失败患者子宫内膜中的表达,并探讨 MMP-9、TIMP-3 与胚胎着床的关系及可能机制。**方法:**应用免疫组织化学 SP 法,检测 40 例反复 IVF-ET 助孕(≥ 3 次)失败者(实验组)及 40 例经 1 次 IVF-ET 助孕即妊娠者(对照组)的黄体中期内膜 MMP-9 和 TIMP-3 表达。**结果:**MMP-9 在实验组的表达明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);而 TIMP-3 在两组间表达的差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**MMP-9 在黄体中期内膜的表达降低可能会通过影响胚胎着床而导致反复 IVF-ET 助孕失败的发生。

【关键词】基质金属蛋白酶-9;基质金属蛋白酶组织抑制物-3;不孕症;体外受精-胚胎移植;胚胎着床

【中国图书分类法分类号】R711.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-05-06

Expressions of matrix metalloproteinase -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 in the endometrium of patients experiencing recurrent in vitro fertilization-embryo transfer failure

WANG Fang, XIAN Hong, TENG Wending

(Center of Reproductive Medicine, Chengdu Women's and Children's Central Hospital)

【Abstract】Objective: To detect expressions of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (MMP-9/TIMP-3) in the endometrium of patients experiencing recurrent in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) failure and to explore the possible mechanism. **Methods:** Expressions of MMP-9/TIMP-3 in endometrium at mid-luteal phase in 40 patients experiencing recurrent IVF-ET failure (experiment group) and 40 pregnant women with IVF-ET once a time (control group) were detected by immunohistochemistry SP. **Results:** Expressions of MMP-9 in experimental group were significantly lower than those of control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in TIMP-3 expressions between both groups ($P > 0.05$). **Conclusions:** Recurrent IVF-ET failure is possibly caused by lower expressions of MMP-9 in endometrium at mid-luteal phase.

【Key words】 matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of metalloproteinase-3; infertility; in vitro fertilization-embryo transfer; embryo implantation

目前,体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)已成为治疗不孕症的主要手段之一。在过去的二十年间,尽管 IVF-ET 技术已经得到飞速发展,但首次 IVF-ET 新鲜周期移植的成功率仍然止步于 60%~70%,反复 IVF-ET 助孕失败的情况仍时有发生。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是参与细胞外基质降解与重塑的主要酶类,在人体内多个器官和组织均有表达,并在许多生理和病理过程中发挥重要作用。近年来的研究发现, MMPs 在子宫内膜间质细胞、滋养细胞中有规律性表达^[1],并在月经来潮、卵泡发育及排卵、胚胎植入、胚胎发育等涉及细胞外基质降解

与重塑的各种生殖生理学活动中具有特别重要的意义^[2-3]。基质金属蛋白酶组织抑制物(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 的特异性抑制因子,一般伴随 MMPs 的分泌而分泌。TIMPs 以 1:1 的比例与一定类型的 MMPs 形成复合体,阻断 MMPs 与作用底物的结合,从而抑制 MMPs 的活性。MMPs 与 TIMPs 分泌失衡可能导致某些病理或特殊生理情况的发生。Horka 等^[4]报道, IVF-ET 助孕后妊娠妇女的血清和卵泡液 MMP-9 浓度明显高于经 IVF-ET 治疗未妊娠者,提示血清或卵泡液中 MMP-9 水平与 IVF-ET 助孕的妊娠结局相关。本研究通过检测反复 IVF-ET 助孕失败患者子宫内膜中 MMP-9 和 TIMP-3 的表达,探讨 MMP-9 和 TIMP-3 在胚胎着床中的作用及可能机制。

作者介绍:王 芳, Email: postwf@163.com,

研究方向:生殖与不孕研究。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2010 年 1 月至 2012 年 6 月在四川省成都市妇女儿童中心医院行 IVF-ET 的不孕症患者,并满足以下条件:年龄 20~35 岁;月经周期 28~30 d;无痛经;基础性激素水平正常;基础体温双相,黄体中期血孕酮 ≥ 10 ng/ml;既往无 IVF-ET 助孕史;男方精液检查正常。

1.2 纳入标准

实验组:①3 次及以上 IVF-ET 助孕未妊娠;②3 次 IVF-ET 均为新鲜周期胚胎移植;③每次 IVF-ET 移植 2、3 个优质胚胎;④术后无并发症。对照组:①1 次 IVF-ET 助孕即妊娠者;②新鲜周期胚胎移植;③移植 2、3 个优质胚胎;④术后无并发症。

1.3 排除标准

①合并子宫内膜异位症者;②病理检查提示所采集内膜不处于黄体中期;③经病理检查发现子宫内膜有病变者;④ IVF-ET 周期的任何时间发现输卵管积水者。

1.4 标本采集及处理

在降调当月或开始促排卵的上一周期,行阴道超声监测排卵,于排卵后 7 d 行血孕酮检测,对满足条件者,采用一次性宫腔组织吸引管(诺德)采集子宫内膜标本。所取标本经病理学检查,并根据 Noyes 评分标准判断所处时期。冲洗子宫内膜标本,去除表面血迹,10%中性甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋,5 μ m 厚连续切片 4 张,3 张用于免疫组化,1 张行 HE 染色。

1.5 主要试剂

小鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体(美国 Santa Cruz),山羊抗人 TIMP-3 多克隆抗体(美国 Santa Cruz),超敏 SP(鼠/兔)试剂盒(美国 Santa Cruz),DAB 显色剂(福州迈新)。

1.6 结果判定

采用由北京航空航天大学图像中心研制的真彩色病理图像分析系统软件,在 40 $\times$ 10 的高倍视野下,选择具有代表性的视野,计算阳性染色区占全视野的面积比(吸光度=阳性面积/统计面积),获得所选高倍视野阳性染色区的吸光度值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 15.0 软件进行数据统计分析。MMP-9 和 TIMP-3 的吸光度值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)的形式表示。MMP-9 和 TIMP-3 在 2 组间的表达比较用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 实验组和对照组患者的临床特征

本研究共纳入 80 例患者,实验组和对照组各 40 例。患者年龄、不孕年限、血清基础卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)水平、窦卵泡(antral follicle, AFC)数目、雌二醇(estrogen2, E2)等指标在 2 组间的差异无统计学意义,具有良好的基线可比性(表 1)。

表 1 实验组和对照组患者的临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of patients in experiment group and control group

临床特征	实验组	对照组	t 值	P 值
年龄(岁)	27.4 $\pm$ 3.7	28.1 $\pm$ 4.0	-0.73	0.468
不孕年限(年)	5.1 $\pm$ 4.0	5.3 $\pm$ 2.4	-0.27	0.787
E2(pg/ml)	42.4 $\pm$ 14.0	46.9 $\pm$ 14.6	-1.42	0.159
FSH(mIU/ml)	6.8 $\pm$ 1.9	7.3 $\pm$ 2.3	-1.16	0.246
AFC(个)	14.2 $\pm$ 3.2	13.3 $\pm$ 3.6	1.12	0.266

2.2 MMP-9 及 TIMP-3 在黄体中期子宫内膜的表达

所检测的全部子宫内膜标本中, MMP-9 及 TIMP-3 均呈阳性表达, 腺上皮细胞、腔上皮细胞和基质细胞细胞质内均可见棕黄色物质沉着(图 1~4)。对照组无阳性染色, 排除了非特异性染色的可能。

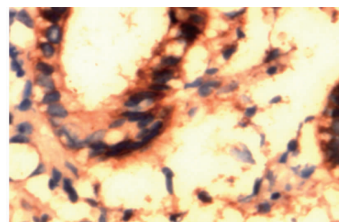


图 1 实验组 MMP-9 的表达(DAB 染色, 400 $\times$)

Fig.1 Expressions of MMP-9 in experiment group (DAB staining, 400 $\times$)

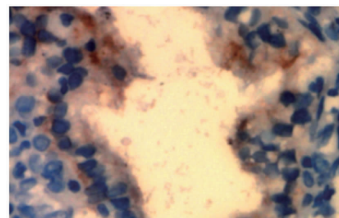


图 2 对照组 MMP-9 的表达(DAB 染色, 400 $\times$)

Fig.2 Expressions of MMP-9 in control group (DAB staining, 400 $\times$)

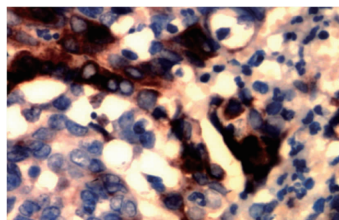


图 3 实验组 TIMP-3 的表达(DAB 染色, 400 $\times$)

Fig.3 Expressions of TIMP-3 in experiment group (DAB staining, 400 $\times$)

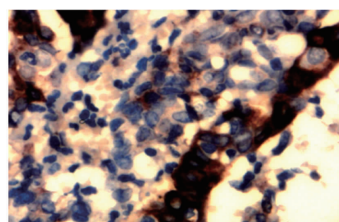


图 4 对照组 TIMP-3 的表达(DAB 染色, 400 $\times$)

Fig.4 Expressions of TIMP-3 in control group (DAB staining, 400 $\times$)

实验组黄体中期子宫内膜 MMP-9 的表达强度较对照组低,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 2 组间 TIMP-3 的表达强度无明显差异($P > 0.05$)(表 2)。

表 2 MMP-9 和 TIMP-3 在黄体中期子宫内膜的表达 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Expressions of MMP-9 and TIMP-3 in endometrium at mid-luteal phase ($\bar{x} \pm s$)

组别	MMP-9	TIMP-3
实验组	0.136 ± 0.016	0.123 ± 0.011
对照组	0.174 ± 0.014	0.125 ± 0.018
<i>t</i> 值	-11.340	-0.671
<i>P</i> 值	0.000	0.504

3 讨 论

MMP-9 是子宫内膜所分泌的 MMPs 中最主要的蛋白水解酶。Jeziorska 等^[2]报道,MMP-9 和 TIMP-3 在月经周期的增生期和分泌期子宫内膜中均有表达,但分泌期子宫内膜的表达强度较增生期明显增高,这可能与胚胎着床具有密切的联系。Reponen 等^[5]发现,MMP-9 和 TIMP-3 特异性表达于小鼠子宫内膜胚胎着床区,进一步提示,MMP-9 和 TIMP-3 可能在胚胎着床中发挥关键性的作用。

研究表明,子宫内膜着床区细胞外基质成分的降解发生于胚胎着床的定位、黏附和植入 3 个阶段,从而有利于绒毛滋养层细胞穿透母体子宫内膜,使胚胎得以进入蜕膜^[6]。本研究发现,实验组与对照组相比,MMP-9 在子宫内膜的表达强度明显减弱,而其抑制物 TIMP-3 在两组间的表达无显著差异。反复 IVF-ET 失败患者的子宫内膜 MMP-9 分泌量减少,而相对增多的 TIMP-3 使 MMP-9 的活性显著降低,从而使 MMP-9 对细胞外基质的降解与重塑能力下降,影响子宫内膜蜕膜化、内膜血管和胎盘血管的生成,使滋养细胞无法与子宫内膜建立进一步的联系而导致着床失败。此外,MMP-9 可通过对细胞外基质的重塑来促进胚胎着床过程中蜕膜的止血^[7],当 MMP-9 分泌减少时,已着床胚胎容易发生蜕膜剥离和流产,这可能也是导致反复 IVF-ET 助孕失败的原因之一。

随着临床操作技术和胚胎培养技术的不断提高,行 IVF-ET 治疗的大多数不孕症患者都能获得多个质量优良的胚胎,然而在胚胎移植之后,仍有高达 30%~40% 的病例未能妊娠,其中不乏反复 IVF-ET 助孕仍失败者。本研究结果提示,黄体中期子宫内膜 MMP-9 的表达下降与反复 IVF-ET 助孕失败

具有一定程度的关联,MMP-9 可能在胚胎着床中发挥重要的作用。黄体中期子宫内膜 MMP-9 的表达降低或缺陷,以及 MMP-9/TIMP-3 分泌失衡将可能影响胚胎着床或使已着床胚胎发生早期流产,导致反复 IVF-ET 助孕失败。Konac 等^[8]研究发现,IVF-ET 助孕(≥ 2 次)失败组 MMP-9 的 mRNA 转录水平与对照组相比没有差异。综上所述,反复 IVF-ET 助孕失败者黄体中期子宫内膜 MMP-9 表达降低可能与 MMP-9 mRNA 的翻译减少相关,但其具体作用机制及调节因素还有待进一步的研究。本研究认为,MMP-9 在黄体中期子宫内膜的表达可作为 IVF-ET 助孕后是否妊娠的预测指标之一,同时也可能成为胚胎着床失败,特别是反复 IVF-ET 助孕失败的基因治疗靶标。

参 考 文 献

- [1] Huang H Y, Wen Y, Irwin J C, et al. Cytokine-mediated regulation of 92-kilodalton type IV collagenase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 messenger ribonucleic acid expression in human endometrial stromal cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(5): 1721-1729.
- [2] Jeziorska M, Nagase H, Salomonsen L A, et al. Immunolocalization of the matrix metalloproteinases gelatinase B and stromelysin1 in human endometrium throughout the menstrual cycle[J]. J Reprod Fertil, 1996, 107(1): 43-51.
- [3] Turpeenniemi-Hujanen T, Feinberg R F, Kauppila A, et al. Extra-cellular matrix interactions in early human embryos: implications for normal implantation events[J]. Fertil Steril, 1995, 64(1): 132-138.
- [4] Horka P, Malickov K, Jarosova R, et al. Matrix metalloproteinases in serum and the follicular fluid of women treated by in vitro fertilization [J]. J Assist Reprod Genet, 2012, 29(11): 1207-1212.
- [5] Reponen P, Leivo I, Sahlberg C. 92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation[J]. Dev Dyn, 1995, 202(4): 388-396.
- [6] Wang H, Li Q, Shao L, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, -14, and tissue inhibitors of metalloproteinase-1, -2, -3 in the endometrium and placenta of rhesus monkey (Macaca mulatta) during early pregnancy[J]. Biol Reprod, 2001, 65(1): 31-40.
- [7] Nuttall R K, Kennedy T G. Gelatinases A and B and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 2, and 3 during in vivo and in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells[J]. Biol Reprod, 1999, 60(2): 471-478.
- [8] Konac E, Alp E, Onen H L, et al. Endometrial mRNA expression of matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and cell adhesion molecules in unexplained infertility and implantation failure patients[J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(3): 391-397.

(责任编辑:唐秋姗)