

人绒毛膜促性腺激素和胰岛素对多囊卵巢综合征卵泡内膜细胞雄激素分泌的影响

王蔼明 卢春华 乔杰 李美芝

【摘要】 目的 检验多囊卵巢综合征(PCOS)患者卵巢卵泡内膜细胞(简称内膜细胞)雄激素合成是否异常。方法 对来自8例PCOS的卵巢卵泡与18例正常妇女卵巢卵泡内膜细胞进行单层培养,采用放射免疫法测定两者在基础状态、人绒毛膜促性腺激素(hCG)和胰岛素(INS)刺激作用下培养液中17 α -羟孕酮(OH-P)、雄烯二酮(A)、孕酮(P)。结果 在基础状态、hCG与INS刺激作用下,PCOS患者的卵巢内膜细胞分泌A、OHP和P的量与正常妇女相比,除在基础状态下P无明显增加外($P>0.05$),其余均显著增加,分别为几倍到十几倍($P<0.05\sim 0.001$)。此外,hCG和INS还有协同刺激作用。PCOS患者3种激素分泌的持续时间比正常妇女长。结论 PCOS患者的卵巢内膜细胞存在雄激素的合成异常,INS可能起关键作用。

【关键词】 多囊卵巢综合征 泡膜细胞 雄激素类 胰岛素 促性腺素类,绒毛膜

Effects of Human Chorionic Gonadotropine and Insulin on Androgen Production by Cultured Thecal Cells from Patients with Polycystic Ovary Syndrome Wang Aiming, Lu Chunhua, Qiao Jie, et al. Department of Gynecology and Obstetrics, The Third Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100083

【Abstract】 Objective To examine whether hypersecretion of ovarian androgen in polycystic ovary syndrome (PCOS) results from abnormal androgen biosynthesis by theca interna cells. Methods Ovarian theca interna cells of from 18 normal and 8 PCOS women were cultured in primary monolayers for 10 days. Androstenedione(A)、17 α -hydroxyprogesterone(OH-P) and progesterone(P) accumulation in the culture medium were examined under basal, hCG and insulin-stimulated conditons by RIA. Results There was a significant increase in basal、hCG and insulin-stimulated A and 17 α -OHP production by PCO-theca cells as compared to the corresponding valueo by normal theca cells($P<0.05\sim 0.001$). P production by PCO-theca cells was also significantly increased under hCG and insulin-stimulated conditions ($P<0.01\sim 0.001$). Steroid accumulation in PCO-theca cells lasted longer than in normal theca cells. In addition, insulin also augmented hCG-stimulated steroid accumulation in both groups. Conclusion There was abnormal regulation of androgen production by theca interna cells from PCOS, in which insulin may play an important role.

【Key words】 Polycystic ovary syndrome Theca cells Androgens Insulin Gonadotropins, chorionic

本研究通过对多囊卵巢综合征(PCOS)和正常卵巢的卵泡内膜细胞(简称内膜细胞)的单层培养,比较研究两者在基础状态、hCG和胰岛素(INS)刺激作用下雄烯二酮(A)、17-羟孕酮(OH-P)和孕酮(P)的分泌,探讨PCOS患者卵巢内膜细胞雄激素合成是否异常。

资料与方法

一、资料

标本来源:18份正常卵巢和8份多囊卵巢卵泡的标本,分别来自于1996年5月至1997年5月行妇科手术的18例卵巢正常妇女(正常组)和8例PCOS患者(PCOS组,其中3例为行卵巢楔形切除),年龄28~40岁。正常组的月经周期正常。PCOS组的患者均具备下列条件:(1)B超检测每侧卵巢有10个以上卵泡,直径2~8mm,卵巢基质密度增强;(2)月经稀发(5例)和闭经(3例);(3)血雄激素增高,睾酮(T)>2.2nmol/L和(或)A>9nmol/L或黄体生成素(LH)/促卵泡激素(FSH)>2;(4)3个月内未用过激素类药物。3例PCOS患者术前诊断为有INS抵抗和高INS血症,另5例因条件所限未行INS测定。

二、方法

1.标本采集:正常妇女和月经稀发PCOS患者手术时处于卵泡期(周期第4~12天),术中卵巢没有近期黄体。正常卵泡数共33个,均为外观透明清亮的卵泡,多囊卵巢的卵泡约100个,卵泡的直径均为3~8mm。

2.内膜细胞的分离与培养^[1]:剥离完整的卵泡,测量直径。剪开卵泡壁,刮除基底膜颗粒细胞。剥离卵泡内膜,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,剪碎,用0.03%胶原酶-I消化。细胞离心(1000r/min,5分钟)沉淀后,冲洗2次。台盼蓝液监测活细胞为70%~90%,以每孔 1×10^5 细胞数于24孔塑料培养板内培养。先以含10%小牛血清M199液0.5ml培养24小时后换无血清培养液,同时加影响因素(hCG及INS)。计量培养的天数是从培养24小时后开始,最长培养10天(温度37℃,CO₂浓度5%)。每例的不同卵泡内膜细胞混合培养。

3.对hCG的剂量反应:3份正常组和2份PCOS组内膜细胞的hCG浓度分别为0,0.01,0.1,0.5,1,5kIU/L,对照组每份标本每种浓度有2个平行培养孔,PCOS组有3个平行培养孔。激素及药物:hCG(profasi)为5000IU,购于瑞士Serono公司;INS为牛结合型INS,购于美国Sigma公司。以M199培养液配制贮存液,加样时按不同浓度以M199培养液稀释。

4.内膜细胞分泌激素的时间:6份正常组和3份PCOS组内膜细胞培养10天,每48小时取培养液1次,每份有2~3个平行培养孔,每孔加hCG 0.5kIU/L。16份正常组和6份PCOS组的内膜细胞各分为4个组,分别为基础状态、hCG、INS和hCG+INS组,每份标本每个因素有1~3个平行培养孔。hCG浓度为0.5kIU/L,INS为10μg/L(无排卵PCOS患者口服75g糖后血中INS的平均水平^[2])。PCOS患者的标本有重叠。

5.培养液中激素测定:培养液贮存于-20℃,1~2个月。采用天津DPC公司放射免疫试剂盒,测定培养液原液中的A、OH-P和P。批内与批间差异分别<5%和<8%。每孔培养液均测定3种激素,激素值计算以每1000个细胞数为单位。

三、统计学处理

采用t检验,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结果

一、内膜细胞生长情况

内膜细胞24小时内贴壁,呈梭形生长,hCG和INS对其形态无影响,两组细胞形态也无区别。见附图。

二、对hCG的剂量反应

hCG剂量较低时,3种激素均依hCG剂量增加有不同程度地增加,各激素明显增加的hCG浓度基本为0.5kIU/L,但随hCG浓度进一步增加,OH-P和A的分泌减少,P的分泌则增加。两组对不同剂量hCG敏感度明显不同,PCOS组分泌的3种激素量均比正常组高,但发生最大反应的hCG浓度基本相同。见表1。

三、激素变化的时间曲线

两组内膜细胞第一个48小时分泌A和OHP的量最高。分泌量下降的时间不同,正常组于第4天开始下降,第6天几乎测不出。PCOS组虽于第4天有所下降,第6天才开始明显下降。PCOS组P开始时升高不明显,于第4天明显上升,并持续高分泌状态至第8天,对照组于第6天已降到很低。见表2。

四、hCG、INS及INS与hCG的协同刺激作用

在基础状态下、hCG与INS分别刺激作用下,PCOS组内膜细胞分泌A、OHP和P的量与正常组相比,除基础状态下的P无明显增加外($P>0.05$),其余均显著增加,分别为几倍到十几倍($P<0.05\sim 0.001$)。hCG与INS协同刺激作用下,两组均较单一刺激作用下分泌激素增加。见表3。

表1 两组内膜细胞不同剂量hCG刺激作用下分泌各激素比较($\bar{x}\pm s$)

组别	激素	hCG(kIU/L)					
		0	0.01	0.1	0.5	1.0	5.0
正常组	A	9.0 ± 4.5	49.9 ± 25.3	24.2 ± 16.1	67.8 ± 43.4	56.0 ± 23.7	54.1 ± 11.6
	OH-P	30.1 ± 15.0	53.2 ± 10.5	142.0 ± 72.3	154.6 ± 32.3	123.0 ± 45.1	104.5 ± 31.4
	P	36.1 ± 11.2	106.6 ± 36.7	250.3 ± 101.3	367.4 ± 79.6	355.2 ± 81.2	400.8 ± 152.4
PCOS组	A	38.2 ± 10.1*	105.4 ± 32.4*	136.2 ± 45.2**	520.0 ± 113.5***	462.3 ± 98.3**	423.5 ± 108.2**
	OH-P	130.0 ± 43.2**	322.2 ± 16.7**	353.4 ± 126.8*	445.6 ± 176.5*	500.2 ± 130.0**	364.5 ± 86.2*
	P	80.3 ± 40.1*	352.6 ± 142.3*	634.6 ± 266.9*	976.5 ± 342.7*	1 004.1 ± 331.8**	1 100.0 ± 456.3**

注: A、OH-P、P单位均为每48小时pmol/1000 cells(下同); * $P<0.05$ ** $P<0.01$
*** $P<0.001$

表2 两组内膜细胞不同时间分泌各激素比较($\bar{x}\pm s$)

组别	激素	培养天数				
		2	4	6	8	10
正常组	A	67.0 ± 2.3	55.6 ± 23.7	0.00	0.00	0.00
	OH-P	330.2 ± 65.4	272.3 ± 85.5	22.4 ± 13.7	17.0 ± 5.8	0.00
	P	213.2 ± 56.1	382.7 ± 43.6	180.7 ± 76.5	81.3 ± 53.3	18.1 ± 9.0
PCOS组	A	567.4 ± 34.6**	325.4 ± 97.6*	307.2 ± 121.5	291.4 ± 52.4	82.3 ± 34.7
	OH-P	575.5 ± 231.6*	376.5 ± 143.4	297.1 ± 87.8**	160.7 ± 75.4	107.3 ± 41.7
	P	1 485.5 ± 454.7***	2 160.4 ± 623.1**	2 463.2 ± 745.4***	1 866.6 ± 564.2***	1 277.3 ± 332.9***

*P < 0.05 **P < 0.01 ***P < 0.001

表3 两组内膜细胞分泌各激素的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	标本 份数	A				OH-P				P			
		基础 状态	hCG	INS	hCG +INS	基础 状态	hCG	INS	hCG +INS	基础 状态	hCG	INS	hCG +INS
正常 组	6	9.8 ± 6.1	77.0 ± 16.3	80.0 ± 26.9	152.1 ± 46.7	22.5 ± 13.2	75.4 ± 29.6	52.6 ± 22.0	164.2 ± 38.8	36.0 ± 15.1	203.2 ± 76.1	232.5 ± 171.3	456.7 ± 176.7
PCOS 组	6	148.9 ± 28.3	576.13 ± 264.2	532.9 ± 259.4	823.2 ± 374.9	128.00 ± 127.4	509.2 ± 191.7	508.2 ± 209.5	864.3 ± 484.0	80.0 ± 41.1	1 085.3 ± 585.0	2 165.0 ± 612.1	2 863.5 ± 389.3
P值		< 0.001	< 0.0001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.05	< 0.05	< 0.001	< 0.05	< 0.001	< 0.01	< 0.01

注：hCG为0.5 kIU/L；INS为10 μ g/L

五、INS抵抗患者对INS刺激作用的反应

3例术前确诊外周INS抵抗的内膜细胞在INS的刺激作用下，分泌A、OH-P和P量分别为 523.3 ± 105.3 、 541.3 ± 104.2 和 847.3 ± 136.4 。与其它PCOS患者的内膜细胞相比，A、OH-P和P的分泌量相近。

讨论

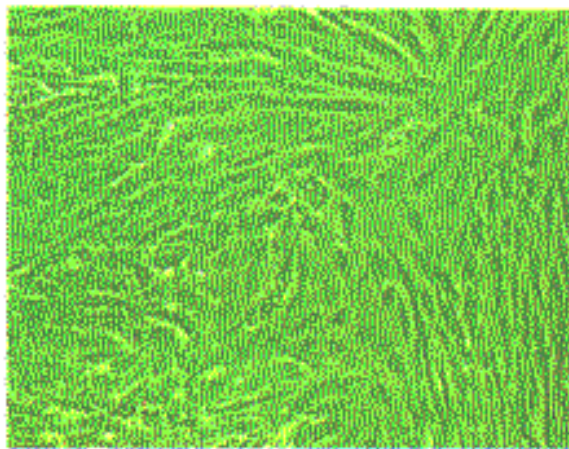
本研究中的PCOS患者和正常妇女的内膜细胞在hCG刺激作用下，A、OH-P和P的分泌均增加，而且较低量浓度时呈剂量依赖性增加。随hCG浓度的增加，激素分泌量却不再增加，可能与酶活性发生变化有关。Erickson等^[3]的研究表明，排卵前LH高峰时的浓度可使内膜细胞17 α -羟化酶和C17,20裂解酶的活性发生不可逆性丧失，孕激素向A和T的转化受阻，使P的产生增加。本研究中采用hCG浓度为1~5kIU/L，与排卵前LH高峰时的量接近^[3]。

以往曾认为，PCOS的高雄激素水平归结为卵泡闭锁，卵泡内膜产生大量的雄激素。但近年来的研究表明，PCOS与正常卵巢相比，闭锁卵泡数并不多^[4]。因此，不能以卵泡闭锁来解释。本研究中不仅PCOS患者的内膜细胞分泌激素明显增加，第6~8天时还维持一定的量，说明PCOS患者内膜细胞本身合成激素酶的活性增高。

Barberi等^[5]报道，INS刺激培养的多囊卵巢间质组织雄激素分泌增加。本研究中PCOS患者的内膜细胞与正常妇女相比，不仅hCG刺激作用下雄激素分泌增加，对INS也高度敏感，而单一INS就可刺激A、OHP和P分泌增加。提示，INS对卵巢甾体激素合成的调节起着不可忽视的作用。无排卵的PCOS患者多伴有高INS血症及INS抵抗，而PCOS伴高INS血症患者几乎都有高雄激素血症^[6]。本研究中3例术前已确认有INS抵抗和高INS血症患者的内膜细胞对INS也高度敏感。外周组织对INS的糖代谢作用不敏感，而卵巢对INS刺激作用仍敏感，这可能是由于INS在外周组织与卵巢的作用发挥是通过不同的信号传递系统。Debbie等^[7]提出，INS是通过卵巢的胰岛素样生长因子受体，即所谓的“Cross-talk”发挥作用。但近年来的研究证明，INS还是通过其自身受体发挥作用。John等^[8]的

研究发现,INS刺激胎盘甾体激素合成是通过肌醇聚糖传递信息,与INS在外周组织发挥糖代谢作用所依赖的酪氨酸激酶活性无关。是否INS在卵巢也通过肌醇聚糖所介导,尚不清楚。但因甾体激素合成途径及酶基本相同,如果INS是通过肌醇聚糖传递信息,那么就不难解释INS作用的矛盾,并为PCOS可同时伴有卵巢或肾上腺来源的雄激素增加作出解释。

PCOS患者的内膜细胞可分泌更多的雄激素,有两种可能性,一是PCOS患者的内膜细胞本身雄激素合成酶异常,使得其活性增强;二是体内某种或几种因素的影响,使合成酶活性增高,INS可能起关键作用。PCOS患者的高INS血症使其内膜细胞雄激素合成酶活性增高,产生大量的雄激素,高雄激素环境使卵泡发育障碍,以致发生不排卵。



附图 培养24小时的内膜细胞。倒置显微镜下×20

参考文献

- 1 Gilling-Smith C, Debbie S, Richard W, et al. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol*, 1994, 79: 1158-1165.
- 2 Debbie S, Mason H, Gilling-Smith C, et al. Modulation by insulin of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone actions in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 302-309.
- 3 Erickson GF, Magoffin DA, Jones KL, et al. Theca function in polycystic ovaries of a patient with virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Fertil Steril*, 1989, 51: 173-176.
- 4 Mason H, Debbie S, Richard W, et al. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79: 1355-1360.
- 5 Barberi RL, Makris A, Randall RW, et al. Insulin stimulates androgen accumulation in the incubation of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986, 62: 904-910.
- 6 Poretsky L. On the paradox of insulin-induced hyperandrogenism in insulin-resistant states. *Endocr Rev*, 1991, 12: 3-13.
- 7 Debbie S, Franks S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol*, 1996, 12: 3788-3790.
- 8 John E, Romero G, Laura C, et al. Insulin Mediators are the signal transduction system responsible for insulin's action on human placental steroidogenesis. *Endocrinology*, 1991, 129: 2951-2956.

*本研究受卫生部科研基金资助

作者单位：100083 北京医科大学第三医院妇产科 [王霭明(现在海军总医院妇产科) ,
卢春华, 乔杰, 李美芝]

(收稿：1997-10-50 修回：1998-02-25)

(本文编辑：赵小丽)