

卵巢子宫内膜异位囊肿患者血清及卵巢组织中 AMH 的表达

王康¹,朱根海¹,陈集敏²,蔡俊宏³,洪澜¹

1.海南省人民医院妇科,海南 海口 570000;

2.海南省人民医院病理科,海南 海口 570000;

3.海南省人民医院中心实验室,海南 海口 570000

【摘要】目的 检测卵巢子宫内膜异位囊肿患者血清及卵巢组织的抗苗勒管激素(AMH)表达水平,并与健康人及其他卵巢良性囊肿患者进行对比,以判断异位囊肿本身对患者卵巢储备的影响。**方法** 选择 2016 年 7 月至 2017 年 8 月在海南省人民医院妇科住院行手术治疗的单侧卵巢子宫内膜异位囊肿患者 20 例(实验组),因单侧其他卵巢良性囊肿住院行手术治疗的患者 20 例(对照组 A)和健康女性 20 例(对照组 B)。抽取所有受检者的外周静脉血,测定 AMH 水平。卵巢囊肿患者在行卵巢囊肿剔除术中,取囊肿旁的一小部分正常卵巢组织,采用免疫组化的方法检测卵巢组织中 AMH 抗原表达,采用荧光定量 RT-PCR 的方法检测卵巢组织中 AMH mRNA 相对表达量;对照组 B 仅检测血清 AMH 水平。**结果** 三组受检者间的年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$);实验组和对照组 A 患者的囊肿大小比较差异无统计学意义($P>0.05$);实验组患者的血清 AMH 水平为 (2.34 ± 0.98) ng/mL,明显低于对照组 A 的 (3.14 ± 0.73) ng/mL 及对照组 B 的 (3.46 ± 1.02) ng/mL,差异均有统计学意义($P<0.05$),而对照组 A 与对照组 B 间的血清 AMH 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);实验组患者卵巢组织中的 AMH 阳性表达率为 53.3%,明显低于对照组 A 的 80.0%,差异有统计学意义($P<0.05$);荧光定量 RT-PCR 显示,实验组患者的 AMH mRNA 的相对表达量为 0.48 ± 0.16 ,明显低于对照组 A 的 0.63 ± 0.21 ,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 异位囊肿患者的血清和卵巢组织中的 AMH 的水平均明显低于健康人和其他卵巢良性囊肿患者,异位囊肿对周边卵巢组织存在损伤,进而影响了卵巢储备功能,对异位囊肿患者早诊断早治疗或许可保护患者的卵巢功能。

【关键词】 卵巢子宫内膜异位囊肿;卵巢良性囊肿;血清;卵巢储备功能;抗苗勒管激素

【中图分类号】 R711.75 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2020)06—0689—04

Expression of AMH in serum and ovarian tissues of patients with endometrioma. WANG Kang¹, ZHU Gen-hai¹, CHEN Ji-min², CAI Jun-hong³, HONG Lan¹. 1. Department of Gynecology, Hainan General Hospital, Haikou 570000, Hainan, CHINA; 2. Department of Pathology, Hainan General Hospital, Haikou 570000, Hainan, CHINA; 3. Central Laboratory, Hainan General Hospital, Haikou 570000, Hainan, CHINA

[Abstract] **Objective** To evaluate the expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in serum and ovarian tissues of patients with endometrioma, compared with that in healthy people and other patients with benign ovarian cysts to determine the impact of endometrioma on ovarian reserve. **Methods** A total of 20 women with unilateral endometrioma undergoing surgical treatment from July 2016 to August 2017 in Hainan General Hospital were enrolled, as the experimental group. In the same period, 20 women with other unilateral ovarian benign cyst undergoing surgical treatment were enrolled as the control group A, and 20 healthy women were selected as control group B. Serum AMH levels were determined in all women of the three groups. Immunohistochemistry was used to detect AMH protein expression, and quantitative RT-PCR was used to detect AMH mRNA expression in ovarian tissues. **Results** There was no statistical difference in age between the three groups ($P>0.05$). There was no statistical difference in the size of cyst between the experimental group and the control group A ($P>0.05$). Serum AMH level in the experimental group was (2.34 ± 0.98) ng/mL, which was significantly lower than (3.14 ± 0.73) ng/mL in the control group A and (3.46 ± 1.02) ng/mL in the control group B ($P<0.05$); while there was no significant difference between the control group A and the control group B ($P>0.05$). The positive expression rate of AMH protein in the ovarian tissues of the experimental group was 53.3%, which was significantly lower than 80.0% in the control group A. Quantitative RT-PCR showed that the relative expression of AMH mRNA in the experimental group was 0.48 ± 0.16 versus 0.63 ± 0.21 in the control group A ($P<0.05$). **Conclusion** The expression levels of AMH in serum and ovarian tissues of patients with endometrioma was significantly lower than that in healthy people and other patients with benign ovarian cysts. Endometrioma has adverse effect on ovarian reserve. Early diagnosis and intervention may protect patients' ovarian function.

【Key words】 Endometrioma; Ovarian benign cyst; Serum; Ovarian reserve; Anti-Müllerian hormone (AMH)

基金项目:2015 年度海南省自然科学基金科研课题(编号:20158314);2014 年度海南省卫生厅科研课题(编号:14A210268)

通讯作者:王康,E-mail:13698970502@163.com

子宫内膜异位症发生于大概 10% 的生育年龄的妇女,因其对生育功能的影响及严重的疼痛,对女性的身心健康造成较大影响。因子宫内膜异位症的病因及疾病发生发展的机制并不十分清楚,就其对生育功能影响而言也错综复杂,无法用单一因素解释。卵巢子宫内膜异位囊肿是子宫内膜异位症的最常见病理类型和患者最主要的就诊原因,异位囊肿患者的不孕率明显高于正常人群,异位囊肿对不孕的影响,其中的一个因素可能是异位囊肿影响了卵巢的储备功能。腹腔镜下异位囊肿的剥除是目前首选的处理方式,此手术方式可能对卵巢功能造成损伤^[1]。而事实上,异位囊肿本身是否已经造成卵巢功能的损害,目前尚未达成一致的意见。抗苗勒管激素(anti-mullerian hormone, AMH)是卵巢储备功能比较可靠的标志物,受月经周期、口服避孕药和 GnRH 激动剂的影响甚微^[2]。由此推测,测定异位囊肿患者血清及卵巢组织中 AMH 的水平,可评判异位囊肿对卵巢功能的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取于 2016 年 7 月至 2017 年 8 月在海南省人民医院妇科住院行卵巢囊肿剔除手术的单侧异位囊肿患者 20 例(实验组)和单侧其他卵巢良性囊肿患者 20 例(对照组 A),其中畸胎瘤 12 例,囊腺瘤 8 例,术后均经病理证实。入选标准:年龄 20~35 岁,无任何合并症,既往无生殖器官的手术史。选取同期体检的健康女性 20 例作为对照组 B。本研究经海南省人民医院伦理委员会批准,对研究对象均予以充分告知并取得其同意。

1.2 标本采集及检测方法 实验组、对照组 A 患者在手术前于清晨抽取空腹外周静脉血 3~4 mL,对照组 B 来院体检时抽取外周静脉血 3~4 mL,对所有静脉血进行离心(3 000 r/min,5 min),取血清,放置于-20℃冰箱待一起检测。实验组和对照组 A 患者在行腹腔镜囊肿剥除术时,取囊肿周围约 5 mm×6 mm×1 mm 的一小块肉眼正常的卵巢皮质,并立即放入-80℃ 冰箱保存,术后囊肿的性质均经病理证实。统一用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血清 AMH 水平,试剂盒为武汉华美公司生产。卵巢组织中 AMH 检测采用免疫组化方法,AMH 兔单抗、即用型快捷免疫组化试剂盒购自上海生工,按照试剂盒说明书操作完成。荧光定量 RT-PCR 测定卵巢组织中 AMH mRNA 表达,引物序列为 F:5'-CGCCTGGTGGTCCTACAC-3'、R:5'-GAA CCTCAGCGAGGGTGTT-3'; β-actin 引物序列 F:5'-CGGGACCTGACTGACTACCTC-3'、R:5'-TAAT-GTCACGCACGATTCCC-3',由上海生工合成。RN28-EASYspin Plus RNA 快速提取试剂盒购自艾德莱(Aidlab)公司、One-step SYBR real-time RT-PCT 试剂盒购自百泰克(Biotek)公司。参考文献设置反转

录、PCR 参数,实验结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (即 AMH 基因与 β -actin 基因 cDNA 含量的相对比值)表示。

1.3 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件分析数据,计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间两两比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组受检者的基本情况比较 实验组患者年龄 19~33 岁,平均(30.04 ± 2.32)岁,对照组 A 患者年龄 21~32 岁,平均(28.48 ± 2.57)岁,对照组 B 年龄 21~33 岁,平均(29.23 ± 3.47)岁,三组受检者的年龄比较差异无统计学意义($F=4.38, P>0.05$)。实验组患者的囊肿直径 3.8~10.6 cm,平均(6.41 ± 3.29) cm,对照组 A 患者的囊肿直径 5.2~9.9 cm,平均(5.74 ± 2.13) cm,两组患者的囊肿大小比较差异无统计学意义($t=1.14, P>0.05$)。

2.2 三组受检者的血清 AMH 水平比较 实验组患者的血清 AMH 水平为(2.34 ± 0.98) ng/mL,对照组 A 患者为(3.14 ± 0.73) ng/mL,对照组 B 为(3.46 ± 1.02) ng/mL,实验组患者血清 AMH 显著低于对照组 A ($t=4.38, P<0.05$),并显著低于对照组 B ($t=3.24, P<0.05$);而对照组 A 和对照组 B 患者的血清 AMH 水平比较差异无统计学意义($t=1.03, P>0.05$)。

2.3 实验组和对照组 A 患者卵巢组织中 AMH 蛋白表达水平比较 实验组患者卵巢组织中的 AMH 阳性表达率为 53.3% (11/20),明显低于对照组 A 患者的 80.0% (17/20),差异有统计学意义($\chi^2=3.824, P<0.05$)。AMH 蛋白的免疫组化阳性表达表现为颗粒细胞胞浆中有棕黄色/浅黄色颗粒(图 1)。阴性表达为颗粒细胞的胞浆中没有棕黄色颗粒(图 2)。

2.4 实验组和对照组 A 患者卵巢组织中 AMH mRNA 的相对表达量比较 实验组患者卵巢组织中 AMH mRNA 的相对表达量为 0.48 ± 0.16 ,明显低于对照组 A 患者的 0.63 ± 0.21 ,差异有统计学意义($t=2.59, P<0.05$)。

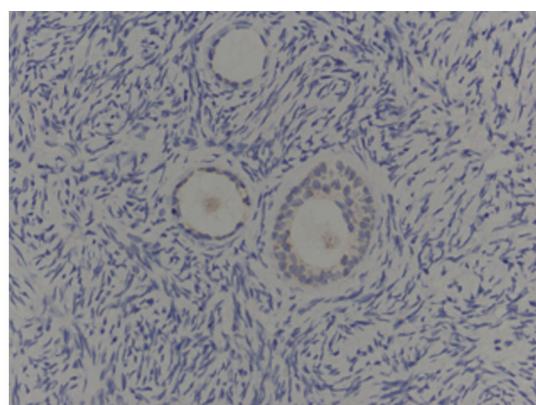


图 1 对照组 A 卵巢组织中 AMH 蛋白的阳性表达情况(S-P×400)
注:颗粒细胞的胞浆中有棕黄色/浅黄色颗粒。

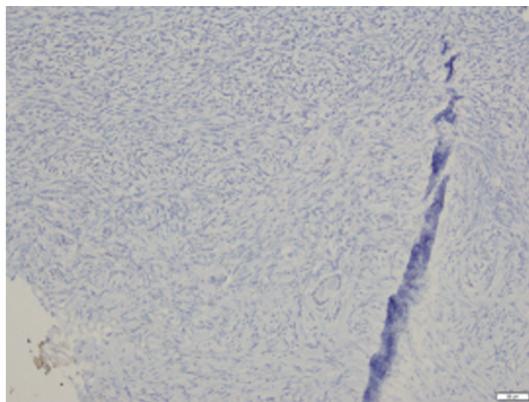


图2 实验组卵巢组织中AMH蛋白的阴性表达情况(S-P×200)

注:颗粒细胞的胞质中没有棕黄色颗粒。

3 讨论

卵巢子宫内膜异位囊肿是子宫内膜异位症的最常见病理类型和患者就医的主要原因,其发生率为17%~44%^[3]。异位囊肿发生发展的病理生理机制未明,有三种学说^[4]:一是种植理论,女性月经的经血可以通过双侧输卵管返流到盆腔,经血中的有些内膜碎片是有活性的,这些有活性的内膜碎片黏附到卵巢表面,获得血供后种植在卵巢表面,侵犯卵巢皮质并在其内生长,反复周期出血,继发卵巢皮质的内陷,生长的内膜一起内陷入卵巢组织内,形成囊肿;第二种理论认为卵巢滤泡囊肿或黄体囊肿等一些功能性囊肿可能在某些情况下会继发形成子宫内膜异位囊肿;第三种理论认为,子宫内膜异位囊肿是由卵巢表面的间皮细胞化生形成,间皮细胞内陷后,在一定的条件下化生成为内膜异位症的腺体和间质。因子宫内膜异位囊肿好发于生育年龄的女性,严重影响女性的生育功能,常常造成生育年龄女性不孕,对女性的身心健康造成影响。异位囊肿对不孕的影响原因错综复杂,其中对卵巢功能的伤害成为大家关注的方向之一。

异位囊肿位于卵巢组织内,囊肿内的液体中已被证实含有损伤正常细胞的物质,如蛋白水解酶、炎症分子、细胞损伤因子、铁和活性氧(ROS)等,对正常的卵巢组织存在潜在的损害,这种损害与异位囊肿对卵巢组织的挤压和拉伸等机械作用无关^[5],这些物质会导致囊肿周围的细胞发生改变,这些改变可能包含一些关键基因表达的改变,并因基因的改变可能和肿瘤的发生相关^[6]。MATSUZAKI等^[7]证实异位囊肿周围的卵巢皮质比其他良性卵巢囊肿周围的卵巢皮质中氧化应激水平高,而这种氧化应激反应被认为是早期卵泡细胞坏死以及卵母细胞凋亡的可能潜在原因。KURODA等^[8]发现异位囊肿周边的正常卵巢皮质中有微小基质植入、卵泡数量减少和活力下降,甚至有基质纤维化的现象,而其他卵巢良性囊肿周围的正常卵巢皮质,并没有发现这些形态学上的改变。

卵巢储备功能的标志物众多,AMH是其中的一

种,AMH由小窦状卵泡及窦前卵泡的颗粒细胞分泌,参与原始卵泡池出口的调节,控制卵泡进入减数分裂期的速度,从而控制原始卵泡池的消耗率,是募集调节因子。血清AMH在月经周期中较为稳定,受到的影响甚微,是子宫内膜异位症卵巢卵泡数目的首选定量标志^[9]。

通过对AMH水平的检测,可以初步评估异位囊肿对卵巢功能的影响。HWU等^[10]通过回顾性研究的方法,对141例异位囊肿的不孕症患者和1323例没有异位囊肿的不孕症患者的血清AMH进行了测定,发现异位囊肿不孕症患者的血清AMH水平较低,且差异有统计学意义。STREULI等^[11]的研究结果却有不同,他们认为异位囊肿患者的血清AMH水平并不比正常人群低,而异位囊肿剥除手术后,患者的血清AMH的水平降低。异位囊肿周边正常卵巢组织中的AMH蛋白及基因的表达情况尚未见报道。

本研究结果显示,异位囊肿患者的血清AMH水平明显低于健康女性和其他良性卵巢囊肿的患者,而卵巢良性囊肿的患者和健康女性并无明显的差异,这与大多数的研究一致^[4],故认为异位囊肿对卵巢储备功能造成损伤,而这种损伤与其机械性的压迫无关。经进一步研究囊肿周边的卵巢组织中AMH的蛋白表达和基因表达,笔者发现异位囊肿周边的卵巢组织中其表达明显低于其他卵巢良性囊肿,进一步证实了异位囊肿对周围卵巢组织的损害。

综上所述,异位囊肿对于卵巢功能存在不良影响,对周边卵巢组织造成损伤,引起卵巢储备功能的降低。临幊上应提高对此病的认识,以利于对患者进行生育指导,在卵巢储备明显下降前指导患者受孕和治疗不孕症,有重要的临幊价值,并为未来异位囊肿和周围卵巢皮质损伤之间潜在机制的研究,提供理论基础,以期为子宫内膜异位症相关性不孕的有效治疗带来新的见解。

参考文献

- SOMIGLIANA E, BERLANDA N, BENAGLIA L, et al. Surgical excision of endometriomas and ovarian reserve: a systematic review on serum antimullerian hormone level modifications [J]. Fertil Steril, 2012, 98(6): 1531-1538.
- SEIFER DB, BAKER VL, LEADER B. Age-specific serum anti-Mullerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States [J]. Fertil Steril, 2011, 95(2): 747-750.
- BUSACCA M, VIGNALI M. Ovarian endometriosis: from pathogenesis to surgical treatment [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2003, 15(4): 321-326.
- LEONE ROBERTI MAGGIORE U, GUPTA JK, FERRERO S. Treatment of endometrioma for improving fertility [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2017, 209: 81-85.
- KITAJIMA M, DEFREÈRE S, DOLMANS M, et al. Endometriomas as a possible cause of reduced ovarian reserve in women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2011, 96(3): 685-691.

参麦地黄汤对妊娠期糖尿病患者糖化血红蛋白、脂联素及妊娠结局的影响

任利¹,尚国涛¹,马晓红²,杨琳¹,张婷¹,王艳¹

1.陕西省人民医院临床医院杨凌示范区医院中医科,陕西 杨凌 712100;

2.苏州市工业园区星湖医院老年科,江苏 苏州 215000

【摘要】目的 探讨参麦地黄汤对妊娠期糖尿病患者糖化血红蛋白、脂联素及妊娠结局的影响,为临床诊疗提供依据。**方法** 回顾性分析2016年6月至2018年6月在陕西省人民医院临床医院杨凌示范区医院接受治疗的135例妊娠期糖尿病患者的临床资料,根据治疗方法不同将患者分为三组,其中46例给予常规运动疗法+胰岛素治疗者为对照组,48例在对照组治疗的基础上给予参麦地黄汤治疗者为观察组,41例单纯给予参麦地黄汤治疗者为参麦地黄汤组。比较三组患者治疗前后的空腹血糖(FBG)、餐后2 h血糖(2 hPG)、糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、血清C-反应蛋白(CRP)、脂联素,以及不良妊娠结局的发生情况。**结果** 治疗后,三组患者的FBG、2 hPG、HbA1c水平均明显降低,且观察组降低较对照组和参麦地黄汤组更明显,差异均有统计学意义($P<0.05$);参麦地黄汤组以上指标与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后,三组患者的FINS、HOMA-IR表达水平均明显降低,且观察组较对照组和参麦地黄汤组降低更明显,差异均有统计学意义($P<0.05$),但参麦地黄汤组以上指标与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$);治疗后,三组患者CRP表达水平有所降低,观察组和参麦地黄汤组患者的CRP分别为 (1.32 ± 0.29) mg/L、 (1.35 ± 0.28) mg/L,明显低于对照组的 (2.36 ± 0.48) mg/L,差异均有统计学意义($P<0.05$);治疗后,三组患者的脂联素表达水平明显升高,观察组和参麦地黄汤组患者的脂联素水平分别为 (36.98 ± 4.51) g/L、 (34.98 ± 4.21) mg/L,明显高于对照组的 (29.85 ± 4.38) g/L,差异均有统计学意义($P<0.05$);观察组患者的不良妊娠结局总发生率为12.50%,明显低于对照组的30.43%和参麦地黄汤组的34.15%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 参麦地黄汤联合常规方法治疗妊娠期糖尿病更能有效调节患者血糖表达水平,有助于缓解患者炎症状态,控制病情发展,改善妊娠结局,值得临床推广使用。

【关键词】 妊娠期糖尿病;参麦地黄汤;糖化血红蛋白;脂联素;妊娠结局

【中图分类号】 R714.256 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2020)06—0692—04

Effect of Shenmai Dihuang Decoction on glycated hemoglobin, adiponectin, and pregnancy outcomes in patients with gestational diabetes. REN Li¹, SHANG Guo-tao¹, MA Xiao-hong², YANG Lin¹, ZHANG Ting¹, WANG Yan¹. 1. Traditional Chinese Medicine Department, Yangling Demonstration Zone Hospital, Clinical Hospital of Shaanxi Provincial People's Hospital, Yangling 712100, Shaanxi, CHINA; 2. Department of Gerontology, Xinghu Hospital of Suzhou Industrial Park, Suzhou 215000, Jiangsu, CHINA

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Shenmai Dihuang Decoction on glycosylated hemoglobin, adiponectin, and pregnancy outcome in patients with gestational diabetes, and to provide evidence for clinical diagnosis and treatment. **Methods** The clinical data of 135 patients with gestational diabetes who were treated in Yangling Demonstration Zone Hospital, Clinical Hospital of Shaanxi Provincial People's Hospital from June 2016 to June 2018 were retrospectively analyzed. The patients were divided into three groups according to different treatment methods, of which 46 patients who received conventional exercise therapy and insulin therapy were enrolled as the control group, 48 pa-

通讯作者:尚国涛,E-mail:shangguotao@126.com

- [6] IWABUCHI T, YOSHIMOTO C, SHIGETOMI H, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in endometriosis and its malignant transformation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 848595.
- [7] MATSUZAKI S, SCHUBERT B. Oxidative stress status in normal ovarian cortex surrounding ovarian endometriosis [J]. Fertil Steril, 2010, 93(7): 2431-2432.
- [8] KURODA M, KURODA K, ARAKAWA A, et al. Histological assessment of impact of ovarian endometrioma and laparoscopic cystectomy on ovarian reserve [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2012, 38 (9): 1187-1193.
- [9] STREULI I, DE ZIEGLER D, GAYET V, et al. In women with

endometriosis anti-Mullerian hormone levels are decreased only in those with previous endometrioma surgery [J]. Hum Reprod, 2012, 27 (11): 3294-3303.

- [10] HWU YM, WU FS, LI SH, et al. The impact of endometrioma and laparoscopic cystectomy on serum anti-Mullerian hormone levels [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9: 80.

- [11] STREULI I, DE ZIEGLER D, GAYET V, et al. In women with endometriosis anti-Mullerian hormone levels are decreased only in those with previous endometrioma surgery [J]. Hum Reprod, 2012, 27 (11): 3294-3303.

(收稿日期:2019-12-27)