

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)10-0884-04

人卵子发生过程中卵母细胞 PTEN 基因的表达及其意义

娄超, 黄高昇, 王哲, 梁蓉, 王娟红, 王文清, 张伟平 (第四军医大学基础部病理学教研室, 陕西西安 710033)

Expression of PTEN in human oocyte during oogenesis and its significance

LOU Chao, HUANG Gao-Sheng, WANG Zhe, LIANG Rong, WANG Juan-Hong, WANG Wen-Qing, ZHANG Wei-Ping

Department of Pathology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To study the relationship between PTEN gene and human oocytes during the oogenesis. METHODS: Expressions of PTEN and PCNA proteins in human oocytes were detected by EnVision immunohistochemistry, and the expression of PTEN mRNA was detected by *in situ* hybridization. RESULTS: The expression of PTEN was found in 8/10 cases and PCNA was detected in 10/10 cases in human ovary. The theca cells in theca interna of human secondary follicle also expressed PTEN, but most of the granule cells, follicle cells and stromal cells in human ovary did not express or weakly expressed PTEN and PCNA. The expression of PTEN mRNA was consistent with that of the protein, which was detected in 7/10 cases of oocytes in human ovary. Most of the follicle cells and stromal cells in human ovary did not express or weakly expressed PTEN mRNA. CONCLUSION: The expression of PTEN may have some close relation with human oocytes' growth, maturation and enlargement.

【Keywords】 PTEN gene; oogenesis; oocytes; large cell; *in situ* hybridization

【摘要】目的: 研究在人卵子发生过程中 PTEN 基因与卵母细胞的关系。方法: EnVision 免疫组化染色方法检测人卵巢组织中卵母细胞 PTEN 与 PCNA 的表达; 原位杂交法检测人卵巢组织中卵母细胞 PTEN mRNA 表达。结果: 8/10 例人卵巢的卵母细胞表达 PTEN 蛋白, 10/10 例卵母细胞表达 PCNA, 同时人卵巢次级卵泡内层卵泡膜细胞(theca interna)也表达 PTEN, 但卵巢的颗粒细胞、卵泡细胞和间质细胞大多不表达或弱表达 PTEN 与 PCNA。PTEN mRNA 表达结果基本与 PTEN 蛋白一致, 7/10 例人卵巢的卵母细胞表达 PTEN mRNA, 卵巢的卵泡细胞和间质细胞大多不表达或弱表达 PTEN mRNA。结论: PTEN 的

表达可能与卵母细胞的生长、成熟和变大有关。

【关键词】PTEN 基因; 卵子发生; 卵母细胞; 大细胞; 原位杂交

【中图分类号】R321.1 【文献标识码】A

0 引言

卵母细胞是人体中最重要的生殖细胞, 随着卵母细胞的成熟, 其直径从约 40 μm 长至 125 ~ 150 μm 而成为人体内生理性大细胞之一。在卵子发生过程中是什么因素控制着卵母细胞生长发育由小变大呢? PTEN 基因(phosphatase and tension homology deletion on chromosome ten, PTEN)早期被认为是一种抑癌基因, 最近研究表明 PTEN 与细胞大小有关, 尤其是与神经元和心肌细胞肥大有密切关系^[1-6], 那么 PTEN 与卵母细胞的成熟变大是否有关? 我们应用 EnVision 免疫组化方法和原位杂交法对人卵巢组织标本进行了 PTEN 的定位, 以探讨 PTEN 在卵母细胞发育成熟过程中所起的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 11 例卵巢手术标本取自西京医院病理科, 为手术切除卵巢肿瘤或其他病变所带周围正常卵巢组织, 患者平均 [26 \pm 2.1 (14 ~ 32)] 岁, 11 例卵巢活检标本中有 1 例所选卵巢切片中未见卵母细胞。单克隆鼠抗 PTEN 抗体(MS-1601-S1)购自美国 Neomarkers 公司, 单克隆鼠抗 PCNA 抗体(M0437)购自美国 Antibody Diagnostica Inc 公司, PTEN 的阴性对照 - 鼠 IgM 阴性对照抗体(X0942), PCNA 的阴性对照小鼠正常血清(X0910)及 EnVision 试剂盒, 均购自 DAKO 公司。PTEN 原位杂交检测试剂盒购自武汉博士德公司, 采用地高辛标记寡核苷酸探针。

1.2 方法

1.2.1 原位杂交检测 PTEN mRNA 石蜡包埋卵巢组织 5 μm 厚连续切片, 载玻片经 1 mL/L DEPC 水处理并已挂好 APES 胶, 杂交所有液体均加入 1 mL/L DEPC 处理, 所有玻璃和金属器皿均在 180 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烤 4 h 以除去 RNA 酶。杂交过程严格按试剂盒说明书进行, 基本过程如下: 石蜡切片常规脱蜡至水, 切片滴加 3 g/L 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 暴露 PTEN mRNA, 原位杂交用 PBS 洗 3 次, 蒸馏水洗 1 次。按每

收稿日期 2005-01-13; 修回日期 2005-01-28

通讯作者: 黄高昇. Tel. (029) 83374541 Ext. 318 Email. huanggs@fmmu.edu.cn

作者简介: 娄超 (1970-), 男 (汉族), 河北省邯郸市人, 博士生 (导师: 黄高昇). Tel. (029) 83374541 Ext. 318 Email. louchao@fmmu.edu.cn

张切片滴加 20 μL 的预杂交液, 恒温箱 38 ~ 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 2 ~ 4 h 吸取多余预杂交液, 不洗, 按每张切片滴加 20 μL 的地高辛标记 PTEN 探针杂交液, 加盖原位杂交专用盖玻片于组织上, 恒温箱 38 ~ 42 $^{\circ}\text{C}$ 过夜. 滴加生物素化鼠抗地高辛, 原位杂交用 PBS 洗 4 次, 滴加 SABC, 滴加生物素化过氧化物酶, 原位杂交用 PBS 洗 4 次. DAB 显色, 苏木素复染, 充分水洗, 脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜下观察. 原位杂交检测 PTEN mRNA 阳性细胞胞质出现棕黄色颗粒. 用已知 PTEN mRNA 阳性表达的前列腺癌标本做阳性对照, 用 1 mL/L DEPC 水代替地高辛标记 PTEN 探针做空白对照.

1.2.2 免疫组织化学 石蜡包埋卵巢组织 5 μm 厚连续切片, 载玻片已挂好 APES 胶, 免疫组化染色具体步骤按说明书进行. 抗原修复用被推荐为欧洲免疫组化实验室质控评定标准方法^[7]的高温高压组织抗原修复法, 一抗稀释浓度为 PTEN 1:100, PCNA 1:100, 行 EnVision 法免疫组化标记, DAB 显色, 苏木素复染, 充分水洗, 脱水、透明, 中性树胶封片, 镜下观察. PTEN 阳性着色定位于细胞质内, 凡是细胞质出现棕黄色颗粒为 PTEN 蛋白阳性细胞. PCNA 阳性着色定位于细胞核和细胞质, 深棕黄色. 用已知 PTEN 阳性表达的前列腺癌标本做阳性对照, 用与单抗稀释浓度相同的 PTEN 阴性对照抗体、小鼠正常血清和 PBS 分别代替一抗为阴性和空白对照.

2 结果

2.1 原位杂交检测 PTEN mRNA 在 10 例卵巢标本中有 7 例卵母细胞 PTEN mRNA 杂交阳性, 阳性率 70%. 卵巢中处于不同发育期的卵母细胞都有 PTEN mRNA 表达, 细胞质出现棕黄色颗粒, 卵巢的卵泡细胞和间质细胞大多不表达或弱表达 PTEN mRNA (Fig 1), 空白对照的杂交结果为阴性.

2.2 免疫组织化学 在 10 例卵巢标本中有 8 例卵母细胞 PTEN 阳性, 阳性率 80%. 卵巢中处于不同发育期的卵母细胞 PTEN 表达都较强, 细胞质出现棕黄色颗粒, 人卵巢次级卵泡内层卵泡膜细胞 (theca interna) 也表达 PTEN, 但卵巢的颗粒细胞、卵泡细胞和间质细胞大多不表达或弱表达 PTEN (Fig 2, 3). 在 10 例卵巢标本中有 10 例卵母细胞 PCNA 阳性, 阳性率 100%. PCNA 同样在不同发育期的卵母细胞中强表达, 细胞质和细胞核呈棕黄色, 卵巢的颗粒细胞、卵泡细胞和间质细胞大多不表达或弱表达 PCNA (Fig 4). 用与单抗稀释浓度相同的 PTEN 阴性对照抗体、小鼠正常血清和 PBS 分别代替一抗所做对照结果均为阴性.

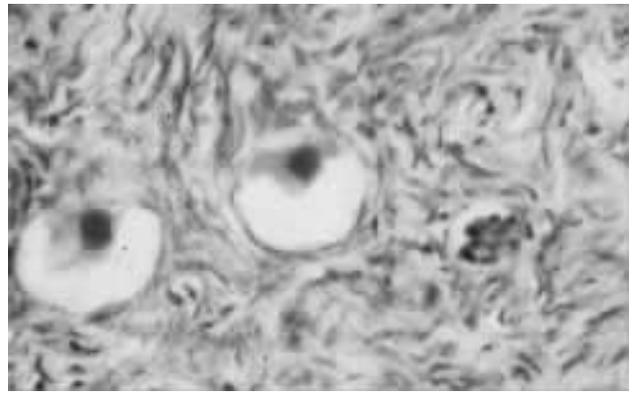


Fig 1 PTEN mRNA positive expression in oocytes, PTEN mRNA negative or weak positive expression in stromal cells around the oocytes analyzed by *in situ* hybridization ISH $\times 200$
图 1 原位杂交 PTEN mRNA 在卵母细胞阳性表达, 周围的间质细胞 PTEN mRNA 为阴性或弱阳性

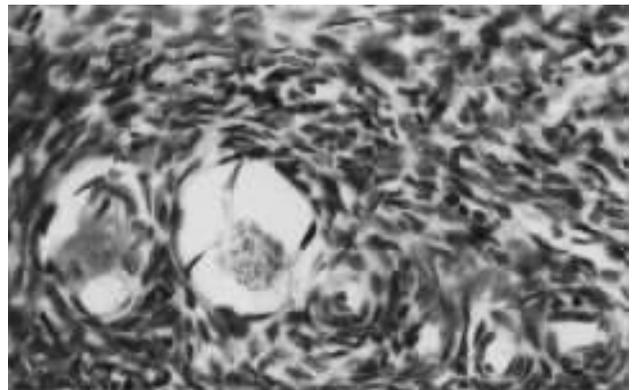


Fig 2 PTEN positive expression in oocytes of primary follicles and PTEN negative or weak positive expression in the stromal cells around the oocytes EnVision $\times 200$
图 2 PTEN 在初级卵泡的卵母细胞的阳性表达, 周围的间质细胞 PTEN 为阴性或弱阳性



Fig 3 PTEN positive expression in oocyte of mature follicle and theca interna and PTEN negative or weak positive expression in stromal cells around the oocyte EnVision $\times 200$
图 3 PTEN 在成熟卵泡中卵母细胞的阳性表达, 周围的间质细胞 PTEN 为阴性或弱阳性. 另外, PTEN 在内层卵泡膜细胞 (theca interna) 阳性表达

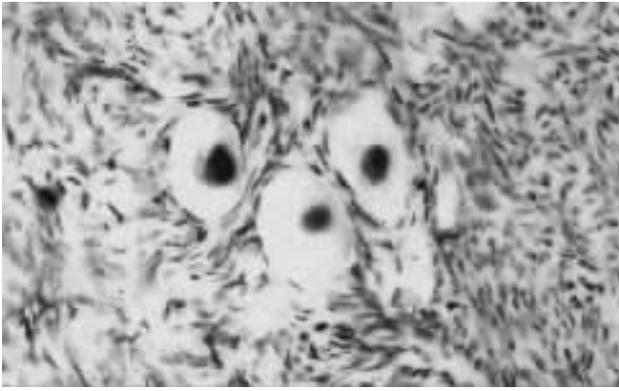


Fig 4 PCNA positive expression in oocytes and PCNA negative or weak positive expression in stromal cells around the oocytes EnVision $\times 200$

图4 PCNA在卵母细胞阳性表达,周围的间质细胞PCNA为阴性或弱阳性

3 讨论

卵母细胞是在卵泡中发育成熟的,人的卵母细胞成熟过程可分为4个发育期:原始卵泡、初级卵泡、次级卵泡、成熟卵泡。卵母细胞是一种特殊的大细胞,虽然不分裂,但在垂体激素的刺激下,从原始卵泡发育至成熟卵泡的过程中,卵母细胞的直径由40 μm 增至150 μm ,体积增大3倍以上。我们采集的病例最年轻的14岁,最大32岁,可观察到各期卵泡。PTEN基因是一种重要的抑癌基因,与前列腺癌、脑胶质瘤、肾癌、畸胎瘤的发生、进展有密切的关系^[8-11]。近来,PTEN的研究发现PTEN与细胞大小有关,现已证明PTEN与神经元和心肌细胞肥大有关^[1-3]。因此,卵母细胞中是否存在PTEN基因表达,自然成为令人关注的问题。

从原始卵泡到成熟卵泡4个发育期,卵母细胞中均有PTEN蛋白和PTEN mRNA的强表达,卵母细胞周围的颗粒细胞、卵泡细胞和间质细胞大多不表达或弱表达PTEN,这提示PTEN与卵细胞的成熟变大有密切的关系。PCNA是真核细胞分裂、增殖的可靠标志。在本实验中,我们发现PCNA在卵母细胞中强表达,周围的卵泡细胞和间质细胞PCNA为阴性。众所周知,卵细胞不是增殖细胞,那么为何在卵细胞中有PCNA呢? Zuber等^[12]发现在蟾蜍的卵母细胞和卵中PCNA在细胞质和细胞核都表达,在卵母细胞成熟和随后卵的分裂中PCNA的量没有变化,因此认为PCNA可能是为以后的胚胎发育作储备。在人类,卵母细胞也不能增殖,PCNA同样可能是为以后的胚胎发育作储备。体外培养实验也证明,卵母细胞可以在体外培养但不可能增殖传代。Backman等^[1]研究发现PTEN被敲除后的神经干细胞增殖增强,但PTEN被

敲除、分化完全的神经元细胞增殖没有变化,而出现细胞生长的异常,这种现象也在其他实验中得到印证,比如PTEN被敲除的胚胎干细胞进入G1/S期速度加快,增殖加强^[13],而对已分化并退出细胞周期的细胞增殖没有异常作用而出现生长异常^[21],因此认为PTEN作用在细胞的有丝分裂区域。PTEN对细胞的增殖的影响限于处于有丝分裂的、未分化的细胞,如干细胞,而对有丝分裂后的、已分化的细胞,PTEN仅影响细胞的生长。显然,卵母细胞虽不是终末细胞,但卵母细胞并不发生有丝分裂和分化,因此推测PTEN主要对于卵细胞的生长起作用,促使其逐渐成熟和变大。

已有文献报道PTEN与神经细胞和心肌细胞的肥大有关^[1-3]。就最近发表的有限资料表明,PTEN所致细胞体积变大的机制与磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的平衡有关,即:缺乏PI3K细胞体积变小,过表达或活化使细胞体积变大;而具有磷酸酶活性的PTEN可拮抗PI3K的作用,PTEN丢失,导致细胞体积变大,相反则使细胞体积变小。然而,PTEN与细胞大小的关系是很复杂的。Gao等^[14]认为PTEN通过依赖PI3K和不依赖PI3K的途径影响细胞的生长,说明PTEN尚可通过其他途径作用于细胞的生长。我们的研究发现,卵细胞的PTEN表达明显强于周围体积较小的间质细胞,也说明PTEN与细胞大小的复杂性。本文上面已提到,卵细胞不是有丝分裂的和未分化的细胞,PTEN对卵细胞的影响限于细胞的生长。鉴于以上几点,笔者认为PTEN与人卵细胞形成成熟有关,并有能力影响细胞的大小,这种作用可能独立于PTEN-PI3K通路,但究竟通过何种机制,尚需进一步深入研究,这为探索卵细胞的发生和发展提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Backman SA, Stambolic V, Suzuki A, et al. Deletion of PTEN in mouse brain causes seizures, ataxia and defects in soma size resembling Lhermitte-Duclos disease[J]. *Nat Genet*, 2001; 29(4): 396-403.
- [2] Kwon CH, Zhu X, Zhang J, et al. PTEN regulates neuronal soma size: A mouse model of Lhermitte-Duclos disease[J]. *Nat Genet*, 2001; 29(4): 404-411.
- [3] Crackower MA, Oudit GY, Koziaradzki I, et al. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways[J]. *Cell*, 2002; 110(6): 737-749.
- [4] Backman S, Stambolic V, Mak T. PTEN function in mammalian cell size regulation[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2002; 12(5): 516-522.
- [5] Stocker H, Hafen E. Genetic control of cell size[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2000; 10(5): 529-535.

- [6] Sulis ML, Parsons R. PTEN: From pathology to biology[J]. *Trends Cell Biol* 2003; 13(9): 478-483.
- [7] Anthony R, Bharat J, Andre JB *et al.* Study of interlaboratory reliability and reproducibility of Estrogen and Progesterone receptor assays in Europe[J]. *Am J Clin Pathol* 2001; 115(1): 44-58.
- [8] Torres J, Navarro S, Rogla I *et al.* Heterogeneous lack of expression of the tumour suppressor PTEN protein in human neoplastic tissues[J]. *Eur J Cancer* 2001; 37(1): 114-121.
- [9] Feilolter HE, Nagai MA, Boag AH *et al.* Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas[J]. *Oncogene* 1998; 16(13): 1743-1748.
- [10] Cantley LC, Neel BG. New insights into tumour suppression: PTEN suppresses tumour formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(18): 4240-4245.

- [11] Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumour suppression[J]. *Cell* 2000; 100(4): 387-390.
- [12] Zuber M, Yasui W, Tan EM *et al.* Quantitation and subcellular localization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in oocytes and eggs of *Xenopus laevis*[J]. *Exp Cell Res* 1989; 182(2): 384-393.
- [13] Sun H, Lesche R, Li DM *et al.* PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3-OH-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway[J]. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96(11): 6199-6204.
- [14] Gao X, Neufeld TP, Pan D. Drosophila PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and-independent pathways[J]. *Dev Biol* 2000; 221(2): 404-418.

编辑 王睿

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2005)10-0887-01

腹腔镜卵巢良性肿瘤剥除术电凝法重建卵巢

吴会玲¹, 彭艳¹, 冀亚妮¹, 董俊英²

(1 商洛市卫校附属医院妇产科, 陕西 商洛 726000; 2 汉中市人民医院妇产科, 陕西 汉中 723000)

【关键词】良性肿瘤 腹腔镜法 电凝法

【中图分类号】R737.31 【文献标识码】B

0 引言 腹腔镜手术是妇产科良性肿瘤首选方式^[1]。随着内窥镜、打结缝合技术、电外科技术和超声刀应用, 腹腔镜手术已成为卵巢良性肿物的适应症。现将我院近年来卵巢良性肿瘤剥除术后, 电凝法保留卵巢的体会介绍如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我院自 2003-04/2004-12 月间腹腔镜下行卵巢囊肿剥除术 60 例, 患者年龄 17~47 岁, 平均 32(17~47) 岁, 肿物最大 16 cm×14 cm×10 cm, 最小 6 cm×4 cm×4 cm, 术中冰冻切片均证实为卵巢良性肿瘤。病理分型: 浆液性囊肿 36 例, 粘液性囊肿 4 例, 成熟畸胎瘤 13 例, 卵巢子宫内膜异位囊肿 7 例。

1.2 方法 选气管内全麻, 气腹形成后, 在脐部穿刺后推进腹腔镜, 取头低足交卧位, 先观察上腹部和肝脏、腹腔表面和大网膜, 吸净腹腔液, 然后再检查盆腔器官, 特别双卵巢, 镜下评估囊壁厚薄、颜色、表面血管、蒂长度、囊内容物颜色判断为良性肿物可在腹腔镜下手术, 选取 2~3 个穿刺点。手术器械: 微型剪、单极电凝钳、电凝棒、“U”型弹簧钳。根据情况可完整分离囊肿, 或囊肿开窗术后卷发式剥离, 可剪去多余囊壁, 用单极电凝钳电灼剥离面, 中间用电凝棒, 剥离面可自然向内卷曲成卵巢外形。成熟畸胎瘤剥除时易破裂, 内容物污染腹腔, 有引起化学性腹膜炎危险, 只要用大量温盐水冲洗腹腔^[2-3], 术后不易发生化学性腹膜炎, 掌握标本取出技巧, 避免肿物破

裂污染盆腹腔。

2 结果和讨论

2.1 操作简便无需开腹 仅需弹簧钳及单极电凝钳及电凝棒, 出血少, 重建后和正常卵巢接近, 皮质表面无明显创面痕迹, 不论肿物大小, 无需开腹, 微创、损伤小、术后恢复快、费用低、住院时间短。

2.2 减少术后粘连 正常腹膜内皮及卵巢包膜内皮被证实为具有溶纤维蛋白活性, 在溶纤维蛋白中, 需足够的血供, 组织损伤伴有缺血时纤维组织极化引起粘连; 另外感染及缝线等异物反应也影响纤维蛋白吸收, 增强了腹腔粘连发生。本术式腹膜及卵巢表面既无大损伤, 又不影响血供, 同时无缝线反应, 因而亦很少发生局部组织粘连。

2.3 减少卵巢内异症术后复发 本术式不仅电灼了剥离面, 也烧灼了剥离过程中残留小病灶, 减少了术后复发机会, 治疗更加彻底, 增加了育龄妇女术后受孕率和妊娠率。

2.4 减少了残留卵巢综合征发生 本术式不缝合, 不结扎, 保留原有卵巢结构, 而传统法常规剥除术后, 在缝合残留卵巢组织过程中, 缝合表浅疏松不易止血, 缝合过深、过密, 可致卵巢神经血运受损, 影响始基卵泡发育造成残余卵巢功能破坏, 同时卵巢组织脆性大, 缝线易切割, 渗血多, 炎症, 缝线等使卵巢表面纤维化包膜形成, 影响卵泡发育和排卵, 甚至月经异常和不规则阴道出血。

2.5 微创美观 本术式最大优点是微创, 避免了传统法开腹造成的组织脏器反复损伤, 导致表面粗糙, 纤维素样渗出而形成的膜状、束状、瀑布样粘连, 减少术后并发症发生, 对卵巢结构和功能影响至最小。较小的腹膜损伤, 借助腹膜上皮细胞的趋化作用自然快速愈合, 不易与盆腹腔粘连, 更不会影响卵巢功能。本术式微创、美观、恢复快, 住院时间短, 绝大多数患者易于接受。

【参考文献】

- [1] 郎景和. 新世纪的妇科腹腔镜手术[J]. 中国实用妇科与产科杂志 2003; 19(11): 641.
- [2] 林金芳, 冯赞冲. 附件良性肿块的腹腔镜手术[A]. 实用妇科内镜学 1993: 241-242.
- [3] 尤新民, 鲍泽民. 妇科内镜的临床应用[J]. 中国实用妇科与产科杂志 2003; 19(11): 647.

收稿日期 2004-10-21; 修回日期 2004-12-26

作者简介: 吴会玲(1968-), 女(汉族), 陕西省商洛市人, 学士, 主治医师. Tel. (0914) 2318280 Email. Wuhuilin-231@163.com

编辑 潘伯荣