

多囊卵巢综合征患者血浆血管活性肠肽水平变化及其潜在病理意义

高霞^{1,2}, 唐奕¹, 蔡素芬¹, 龚斐^{1*}

(1. 中南大学基础医学院生殖与干细胞工程研究所, 湖南长沙 410078;

2. 长治医学院附属和平医院妇产科)

摘要: **目的** 比较多囊卵巢综合征(PCOS)患者与正常女性对照人群两组之间血浆血管活性肠肽(VIP)水平的差异,初步探讨VIP在PCOS发生、发展中的潜在病理意义。**方法** 检测体重指数、血浆VIP和性激素水平,分析血浆VIP水平与体重指数、性激素水平的相关性。**结果** PCOS患者血浆VIP水平显著低于健康对照女性(408.49 ± 25.80 vs 663.85 ± 71.17 ng/L, $P < 0.05$)。所有受试者血浆VIP水平与体重指数、LH/FSH比值、血浆睾酮浓度呈显著负相关($P < 0.05$)。**结论** VIP可能参与PCOS的病理生理过程,能否作为诊断PCOS或判断其预后的一种新的血浆生物标记物,并成为潜在的治疗新靶点,有待进一步研究证实。

关键词: 血管活性肠肽; 多囊卵巢综合征; 性激素; 肥胖

中图分类号:R711 文献标识码:A

Plasma Level of Vasoactive Intestinal Peptide in Patients with Polycystic Ovary Syndrome and its Potential Pathological Significance

GAO Xia, TNAG Yi, CAI Sufen, et al

(*Institute of Reproduction and Stem Cell Engineering, School of Basic Medical Science, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China*)

Abstract: **Objective** To evaluate the difference in plasma level of vasoactive intestinal peptide (VIP) between patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and healthy control subjects, and to explore its potential pathological significance in the genesis and development of PCOS. **Methods** The body mass index and plasma concentrations of VIP and sex hormone were measured. The relationship between plasma level of VIP with hormonal and metabolic parameters was analyzed. **Results** The plasma levels of VIP in PCOS patients were significantly lower than that of healthy control subjects (408.49 ± 25.80 vs 663.85 ± 71.17 ng/L, $P < 0.05$). There was a significantly negative correlation between the plasma VIP concentration with body mass index, LH/FSH ratio and the plasma testosterone concentration in two groups together ($P < 0.05$). **Conclusion** VIP may participate in the pathophysiological process of PCOS. Whether VIP may be used as a novel plasma biomarker or a prognostic factor for PCOS and as a potential therapeutic target in the clinical setting needs to be further investigated.

Key words: vasoactive intestinal peptide; polycystic ovary syndrome; sex hormone; obesity

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种女性生殖功能障碍与代谢功能障碍并存的内分泌紊乱综合征,主要临床表现是稀发排卵或无排卵、高雄激素血症、双侧卵巢多囊样改变^[1]。

除此之外,PCOS患者还兼有血浆黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、睾酮(testosterone)和抗穆勒激素(anti-Mullerian hormone, AMH)水平升高,以及LH/FSH比值倒置、肥胖和胰岛素抵抗^[2,3]。

血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)是由28个氨基酸组成的直链结构的小分子神经肽,属胰高血糖素—胰泌素家族^[4]。VIP是1970

年从猪的小肠中纯化促胰液素时被首次分离,由于具有明显的血管扩张作用,因此命名为VIP^[5]。VIP是肠神经系统中重要的肽类神经递质,属于非胆碱能非肾上腺素能神经递质,广泛分布于循环、免疫、生殖、消化系统以及中枢和外周神经系统。VIP在生物体内具有双重作用,既是胃肠道激素,又是神经肽,其生物学功能多样,与临床多种疾病相关,尤其与胃肠道疾病密切相关^[6]。卵巢神经纤维分布类型和密度分析发现,与健康对照女性比较,PCOS患者卵巢间质中VIP免疫阳性神经纤维数量增加,而卵巢髓质动脉周围VIP免疫阳性神经纤维缺失^[7];猪和大鼠多囊卵巢间质中VIP免疫阳性神经纤维数量也增加^[8-9]。与动情期大鼠比较,在戊酸雌二醇诱导的多囊卵巢大鼠,VIP诱导雄激素和雌二醇释放作用明显增强^[9]。这些研究提示,VIP可能在PCOS的发生、发展中起重要作用。

本研究以PCOS患者及正常女性对照人群为研究对象,分析PCOS患者的血浆性激素水平,进一步比较两组人群之间血浆VIP水平的差异,并分析血浆VIP水平与体重指数、血浆LH/FSH比值和血浆睾酮水平的相关性,初步探讨VIP在PCOS发生、发展的病理生理过程中的可能作用和潜在病理意义。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象 收集2014年12月至2015年3月在中信湘雅生殖与遗传专科医院门诊接受助孕治疗的患者88例。所有患者均无遗传性疾病家族史,均为汉族,在被告知本研究的意义后都签署了知情同意书。对照组34例,满足以下条件:(1)年龄:21~38岁之间;(2)正常月经周期21~40天之间,平均月经周期在 28 ± 4 天,排卵规律;(3)不孕原因为:男方因素。PCOS患者54例,满足以下条件:(1)年龄:21~38岁之间;(2)月经周期不规律,平均月经周期在2~3个月;(3)临床诊断为PCOS,符合2003年欧洲人类生殖和胚胎协会/美国生殖医学学会(ESHRE/ASRM)制定的鹿特丹标准^[10]。所有观察对象均于卵泡期(闭经者日期不限)专人经阴道行盆腔超声检查,同时排除卵巢囊肿等其他异常情况。

所有患者在实验前6个月均排除服用避孕药史或卵巢打孔手术史。所有患者均排除严重内科疾病、近期感染以及外伤手术史。记录所有受试者的

月经史、身高、体重等人体测量参数。在月经的第2~5天患者空腹抽血,所采血样一部分采用乙二胺四乙酸二钠(EDTA Na₂)抗凝,立即加入抑肽酶400 mU/L(北京东亚免疫研究所),以1300 g离心20分钟,分离血浆于-80℃保存用于测量血浆VIP浓度;另一部分血样分离血浆采用雅培内分泌测定系统,测量促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、黄体生成素、雌二醇、睾酮、催乳激素(prolactin, PRL)和AMH。

1.2 体重指数测定 以体重指数(body mass index, BMI)反映患者肥胖程度。 $BMI = \text{体重} / (\text{身高} \times \text{身高}) (\text{kg} / \text{m}^2)$ 。原卫生部疾病控制司对1990年代以来我国13项大规模流行病学调查、总计约24万成人的数据汇总分析,提出中国成人超重与肥胖症预防与控制指南^[11],对中国人BMI进行分级,18.5 ≤ BMI < 23.9为正常体重,24 ≤ BMI < 27.9为超重, BMI ≥ 28为肥胖。参照指南标准本实验中BMI ≥ 24 kg/m²认为超重。

1.3 血浆VIP浓度测定 血浆VIP浓度测定按ELISA试剂盒说明书的步骤进行操作。ELISA试剂盒是武汉贝茵莱生物科技有限公司产品。样品吸光度测定采用DTX880多功能酶标仪(美国Beckman-Coulter公司)。

1.4 血浆性激素测定 收集的 plasma 样本采用微粒子酶免分析法(microparticle enzyme immunoassay, MEIA)于雅培内分泌测定仪(Abbott AxSYM)上分析测定血浆FSH、LH、雌二醇(E₂)、睾酮、PRL和AMH浓度。检测批内变异系数为3.2%~9.7%,批间变异 < 3.9%。性激素检测试剂均为AxSYM产品。

1.5 统计学方法 数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 17.0版统计软件包分析结果,两组间差异采用t检验进行分析,多组间差异采用单因素方差分析和Newman-Student-Keuls检验进行分析,相关性分析采用Pearson相关分析。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 对照人群与PCOS患者卵泡数、人体测量参数和血浆激素水平的比较 超声检查发现,34例健康对照女性中25例左、右侧卵巢内2~9 mm窦卵泡数均 < 12个,9例单侧卵巢内2~9 mm窦卵泡数

在 13~15 个之间,而 54 例 PCOS 患者中除 1 例外左、右侧卵巢内 2~9 mm 窦卵泡数均 >15 个。如表 1 所示,健康对照女性与 PCOS 患者在年龄、血浆 E2 和 PRL 水平组间无显著差异,PCOS 患者血浆 FSH 水平显著低于健康对照女性,而 PCOS 患者 BMI (BMI >25 者:对照组 2/34 例,PCOS 组 25/54 例)、血浆 LH 水平、LH/FSH 比值、血浆睾酮水平 (PCOS 组 12/54 例血浆睾酮水平 <0.84 ng/mL) 以及血浆 AMH 水平均显著高于健康对照女性。

表 1 健康对照女性与 PCOS 患者人体测量参数、血浆性激素水平的比较

	对照 (n = 34)	PCOS (n = 54)	P 值
年龄	27.8 ± 0.7	27.8 ± 0.5	0.979
BMI (kg/m ²)	20.90 ± 2.77	24.82 ± 0.54	0.000
FSH (mIU/mL)	5.82 ± 1.86	4.90 ± 1.46	0.011
LH (mIU/mL)	4.14 ± 0.29	7.19 ± 4.45	0.000
LH/FSH	0.73 ± 0.30	1.46 ± 0.70	0.000
E2 (pg/mL)	33.97 ± 2.64	40.00 ± 3.46	0.215
T (ng/mL)	0.85 ± 0.10	1.45 ± 0.10	0.000
PRL (ng/mL)	19.25 ± 1.40	18.61 ± 1.74	0.795
AMH (ng/mL)	5.03 ± 0.46	10.02 ± 0.71	0.000

T: 睾酮

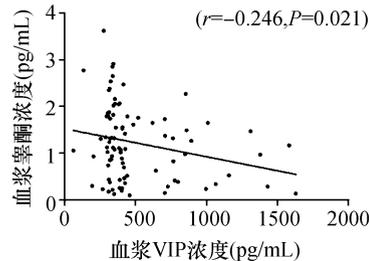
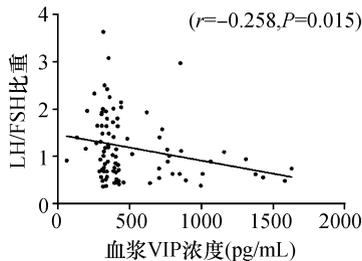
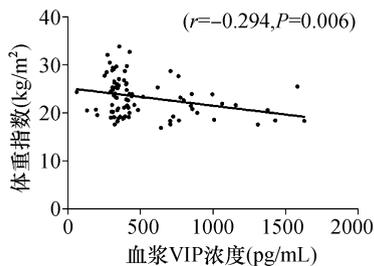


图 2 两组受试者血浆 VIP 水平与 BMI、LH/FSH 和血浆睾酮水平的相关性分析 (n = 88)

1.4 PCOS 患者血浆 VIP 水平与 BMI、LH/FSH 的分层分析

以 BMI = 24 分层,两组受试者或 PCOS 患者中 BMI <24 者血浆 VIP 水平显著高于 BMI ≥24 者 (图 3, P < 0.05)。以 LH/FSH 比值分层分析,在两组受试者中分析血浆 VIP 水平同 LH/FSH 比值的关 系,结果显示随着 LH/FSH 比值的升高血浆 VIP 水平显著降低, LH/FSH = 1~2 组或 LH/FSH >2 组与 LH/FSH <1 组比较,其血浆 VIP 水平有显著性差异 (图 4A, P < 0.05); 而 PCOS 患者血浆 VIP 水平以 LH/FSH 比值分层分析时,各组间无显著差异 (图 4B, P > 0.05)。

1.2 对照人群与 PCOS 患者血浆 VIP 水平的比较

如图 1 所示,PCOS 患者血浆 VIP 水平显著低于健康对照女性 (408.49 ± 25.80 vs 663.85 ± 71.17 ng/L, P = 0.002)。

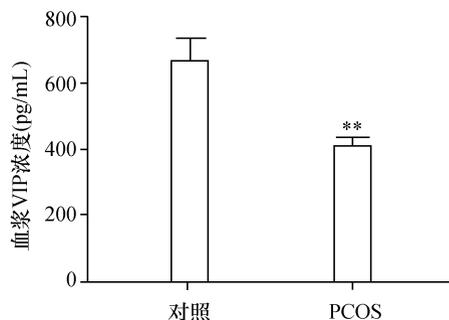


图 1 PCOS 患者和健康对照女性血浆 VIP 浓度 ** : P < 0.01 vs 对照组。对照组: n = 34; PCOS 组: n = 54

1.3 血浆 VIP 水平与体重指数和性激素水平的相关性分析

如图 2 所示,在两组受试者血浆 VIP 水平与 BMI、LH/FSH 比值、血浆睾酮浓度呈显著负相关 (P < 0.05)。

3 讨 论

在本研究中,按鹿特丹标准诊断 PCOS,比较了 34 例健康对照女性和 54 例 PCOS 患者的窦卵泡数、体重指数和血浆性激素水平。同以往研究相似^[1,2,12,13],本研究结果也显示按鹿特丹诊断标准纳入的 PCOS 患者卵巢呈多囊性改变 (54 例 PCOS 患者中除 1 例外左、右侧卵巢内 2~9 mm 窦卵泡数均 >15 个),并且体重指数、血浆 LH 水平、LH/FSH 比值、血浆睾酮水平以及血浆 AMH 水平均显著高于健康对照女性。

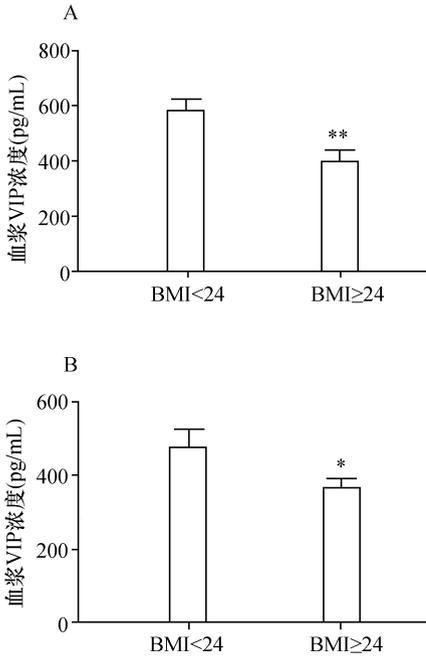


图3 两组受试者(A)和PCOS患者(B)血浆VIP水平的BMI分层分析结果 A: **: $P < 0.01$ vs BMI < 24 ($P = 0.004$)。BMI < 24组: $n = 53$; BMI ≥ 24组: $n = 35$; B: *: $P < 0.05$ vs BMI < 24 ($P = 0.046$)。BMI < 24组: $n = 24$; BMI ≥ 24组: $n = 30$

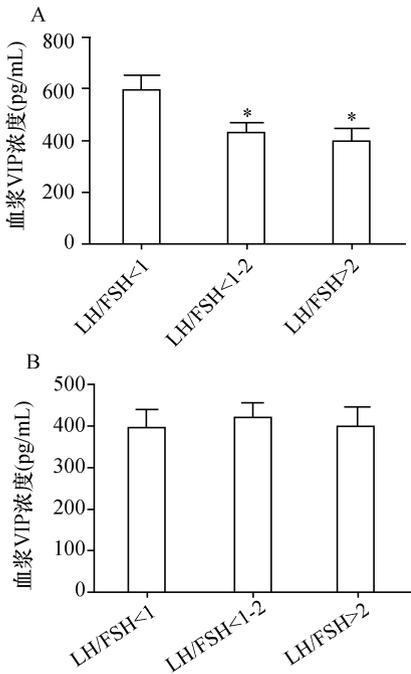


图4 两组受试者(A)和PCOS患者(B)血浆VIP水平的LH/FSH比值分层分析结果 A: *: $P < 0.05$ vs LH/FSH < 1 ($P = 0.026$)。LH/FSH < 1组: $n = 43$; LH/FSH = 1~2组: $n = 34$; LH/FSH > 2组: $n = 11$; B: $P > 0.05$ vs LH/FSH < 1。LH/FSH < 1组: $n = 14$; LH/FSH = 1~2组: $n = 29$; LH/FSH > 2组: $n = 11$

目前PCOS确切的发病机制仍不清楚,普遍认为其与遗传因素、营养失衡、睡眠功能障碍、环境内分泌干扰、氧化应激等因素关系密切^[14]。文献报道,C反应蛋白、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-6、IL-18及IL-13等炎症指标在PCOS患者血清中的水平较正常对照组升高^[15-18]。尤其是IL-18水平的升高,已在一些针对不同种族中PCOS患者的评估研究中得到证实^[18]。这些研究提示,PCOS患者可能存在低水平的慢性炎症。

文献报道,在妇女、猪和大鼠卵巢囊肿时,不仅卵巢内交感神经纤维分布密度增加,而且胆碱能神经和感觉神经的分布也发生重构^[7]。卵巢内神经纤维主要分布于卵泡、黄体、血管和间质腺中^[7]。生理状态下,去甲肾上腺素、乙酰胆碱、P物质、一氧化氮、降钙素基因相关肽、神经肽Y、VIP、生长激素抑制素(somatostatin)、甘丙肽(galanin)、垂体腺苷酸环化酶激活多肽(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)等多种神经递质均在卵巢功能调节中发挥重要作用,参与卵泡发育、排卵、激素生成以及卵巢内血液供应和血流量调节^[7]。已证实,卵巢细胞中表达肾上腺受体、乙酰胆碱受体以及神经肽Y、VIP、甘丙肽和垂体腺苷酸环化酶激活多肽的相应受体^[7]。卵巢神经纤维分布类型和密度分析发现,与对照人群比较,PCOS患者卵巢间质中VIP免疫阳性神经纤维数量增加,而卵巢髓质动脉周围VIP免疫阳性神经纤维缺失^[7];猪和大鼠多囊卵巢间质中VIP免疫阳性神经纤维数量也增加^[8,9]。与动情期大鼠比较,在戊酸雌二醇诱导的多囊卵巢大鼠,VIP诱导雄激素和雌二醇释放作用明显增强^[9]。离体实验也证实,VIP对卵巢功能具有重要的调节作用^[9]。在培养的卵巢颗粒细胞和卵巢,VIP可以刺激雌激素、孕酮和雄激素的释放^[9]。这些研究提示,VIP可能在PCOS的发生、发展中起重要作用。本研究中,我们测定了PCOS患者和健康对照女性的血浆VIP水平,结果发现PCOS患者血浆VIP水平显著降低,两组观测人群血浆VIP水平与体重指数、LH/FSH比值、血浆睾酮浓度呈显著负相关。我们的结果进一步提示,VIP与PCOS的病理生理过程可能相关。

VIP在体内分布广泛,通过调节先天和适应性免疫而发挥强大的抗炎作用^[19]。大量研究发现,在多种慢性炎症性疾病动物模型中VIP具有强大的抗

炎效应,如肺炎、克罗恩病、风湿性关节炎、败血性休克、脑脊髓炎和肝炎等^[20]。如前所述,PCOS 患者存在低水平的慢性炎症,PCOS 患者血浆 VIP 水平降低可能会促进炎症的发展。

VIP 通过活化特异性膜受体 VPAC (VPAC1 和 VPAC2) 发挥其生物学作用,该受体属于 II 类 G 蛋白耦联受体,由 7 次跨膜的 α 螺旋结构和细胞膜内外的短肽部分组成^[28]。VIP 可刺激胰岛素和胰高血糖素的分泌,VPAC2 基因敲除小鼠葡萄糖耐量下降、胰岛素分泌减少^[6,20]。VPAC1 对生长及能量代谢发挥重要作用,VPAC1 基因敲除小鼠生长迟缓、代谢速率增加、机体脂肪量和血清瘦素水平下降^[6,20]。本研究发现 PCOS 患者血浆 VIP 水平降低,是否与其代谢功能障碍有关值得进一步研究。

PCOS 患者不孕的重要原因就是卵子成熟障碍^[11]。卵母细胞的成熟受多因素调控,其中环磷酸腺苷 (cAMP) 是主要的卵母细胞成熟抑制因子^[21]。研究表明,某些促进 cAMP 合成或抑制 cAMP 降解的物质均能使卵母细胞的成熟停滞^[21]。VIP 通过活化特异性膜受体 VPAC 使腺苷酸环化酶剂量依赖性活化,然后使细胞内的 cAMP 浓度增加,而 cAMP 在生殖系统可抑制卵母细胞的成熟^[21]。因此,我们推测 VIP 可能影响卵母细胞的成熟,进而导致 PCOS 患者排卵障碍。离体实验发现,在 FSH 刺激条件下,VIP 可浓度依赖性地抑制小鼠窦前卵泡发育、窦腔形成、颗粒细胞增殖以及雌二醇产生^[22]。但 PCOS 患者血浆 VIP 水平的降低与卵巢中 VIP 免疫阳性神经纤维的分布变化有何具体联系以及血浆 VIP 水平变化如何影响卵巢的功能值得深入研究。

综上所述,本研究发现 PCOS 患者血浆 VIP 浓度显著低于健康对照女性,提示 VIP 可能参与 PCOS 的病理生理过程。VIP 能否作为诊断 PCOS 或判断其预后的一种新的血浆生物标记物,并成为潜在的治疗新靶点,有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] Goodarzi MO, Dumesic DA, Chazenbalk G, et al. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis [J]. *Endocrinology*, 2011, 7(4): 219-231.

[2] Koninger A, Koch L, Edimiris P, et al. Anti-Mullerian hormone: an indicator for the severity of polycystic ovarian syndrome [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2014, 290(5): 1023-1030.

[3] Vrbikova J, Hainer V. Obesity and polycystic ovary syn-

drome [J]. *Obes Facts*, 2009, 2(1): 26-35.

[4] Dorsam G P, Benton K, Failing J, et al. Vasoactive intestinal peptide signaling axis in human leukemia [J]. *World J Biol Chem*, 2011, 2(6): 146-160.

[5] Said SI, Mutt V. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine [J]. *Science*, 1970, 169(3951): 1217-1218.

[6] Moody TW, Ito T, Osefo N, Jensen RT. VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18(1): 61-67.

[7] Wojtkiewicz J, Jana B, Kozłowska A, et al. Innervation pattern of polycystic ovaries in the women [J]. *J Chem Neuroanat*, 2014, 61-62: 147-52.

[8] Kozłowska A, Majewski M, Jana B. Expression of steroidogenic enzymes in porcine polycystic ovaries [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47(2): 257-264.

[9] Parra C, Fiedler JL, Luna SL, et al. Participation of vasoactive intestinal polypeptide in ovarian steroids production during the rat estrous cycle and in the development of estradiol valerate-induced polycystic ovary [J]. *Reproduction*, 2007, 133(1): 147-154.

[10] Rotterdam ESHRE/ASRM-sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19(1): 41-47.

[11] Chen C, Lu FC. The guidelines for prevention and control of overweight and obesity in Chinese adults [J]. *Biomed Environ Sci*, 2004, 17 Suppl: 1-36.

[12] Hickey M, Doherty DA, Atkinson H, et al. Clinical, ultrasound and biochemical features of polycystic ovary syndrome in adolescents: implications for diagnosis [J]. *Hum Reprod*, 2011, 26(6): 1469-1477.

[13] Zhang Z, Gong F, Lu GX. Plasma level of calcitonin gene-related peptide in patients with polycystic ovary syndrome and its relationship to hormonal and metabolic parameters [J]. *Peptides*, 2012, 34(2): 343-348.

[14] 徐晓航, 陈圆辉, 王倩, 张翠莲. 多囊卵巢综合征诊治新进展 [J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2015, 34(2): 160-164.

[15] Amato G, Conte M, Mazziotti G, et al. Serum and follicular fluid cytokines in polycystic ovary syndrome during stimulated cycles. *Obstet Gynecol*, 2003, 101(6): 1177-1182.

(上接第 641 页)

- [16] Vgontzas AN,Trakada G,Bixler EO,et al. Plasma interleukin 6 levels are elevated in polycystic ovary syndrome independently of obesity or sleep apnea. *Metabolism*, 2006,55(8):1076-1082.
- [17] 聂革联. 炎症标志物白细胞介素-13 在多囊卵巢综合征患者外周血的表达水平及临床意义. *重庆医科大学学报*,2013,38(5):546-550.
- [18] Yang Y,Qiao J,Li R,et al. Is interleukin-18 associated with polycystic ovary syndrome? *Reprod Biol Endocrinol*,2011,9:7.
- [19] Corrêa MV,da Costa Rocha MO,de Sousa GR,et al. Low levels of vasoactive intestinal peptide are associated with Chagas disease cardiomyopathy. *Hum Immunol*,2013,74

(10):1375-81.

- [20] 田继康,靳岚. 血管活性肠肽的研究进展. *药物生物技术*,2013,20(6):560-563.
- [21] Vaccari S,Horner K,Mehlmann LM,et al. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol*,2008,316(1):124-134.
- [22] Cecconi S,Rossi G,Barberi M,et al. Effect of pituitary denylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on mouse preantral follicle development in vitro. *Endocrinology*, 2004, 145(4):2071-2079.

(此文编辑:秦旭平)