

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

子宮內膜異位症組織中母質金屬蛋白酵素之表現

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： NSC 89-2314-B-002-291

執行期間： 89 年 8 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：吳明義

共同主持人：何弘能

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：台大醫學院婦產科

中 華 民 國 90 年 10 月 24 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-291

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：吳明義 台大醫學院婦產科

共同主持人：何弘能 台大醫學院婦產科

一、中文摘要

探討母質金屬蛋白酵素(MMP-1, 2, 3, 7, 9)和其抑制素(TIMPs-1, 2, 3)的存在與強度和子宮內膜異位之間的可能關係，我們蒐集了 25 個子宮內膜異位症患者與 23 個對照組，檢驗上述的酵素表現，發覺子宮內膜異位症患者在濾泡期時，MMP-1, 3 都有較強的表現，MMP-2 則在黃體期表現較強。相對地，濾泡期其抑制素(TIMPs-1, 2, 3)也變強了，但經過比較後，MMP 比 TIMP 升高較多的還是子宮內膜異位的族群。在比較原位與異位的組織時，後者也有出現 MMP 升高得比 TIMP 升高更多的傾向。這些結果暗示我們，在內膜異位組織多或 MMP 表現太強的時候，就容易形成疾病，侵犯組織，成為子宮內膜異位症。

關鍵詞：子宮內膜異位症、母質金屬蛋白酵素、母質金屬蛋白酵素抑制素

Abstract

To study whether the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs) are altered in eutopic and ectopic endometrium during endometriosis, the expression of MMP-1, 2, 3, 7, 9 and TIMP-1, 2, 3 in tissue from control patients (N = 23) and from patients with endometriosis (N = 25) was examined. This showed that the endometrial tissue in patients with endometriosis expressed an increased level of MMP-1 and MMP-3 in the follicular phase and MMP-2 in the luteal phase. Also noted during endometriosis was an increase in the expression of TIMP-1, 2 and 3 during the follicular phase. However, the increase in

TIMPs was insufficient to block completely the increase in MMPs and a net increase in MMPs over TIMPs could be detected in patients with endometriosis compared to the controls. Furthermore, in endometriosis, a similar net increase in MMPs over TIMPs was noted in ectopic tissue compared to eutopic tissue. This suggests the hypothesis that the heavy burden of ectopic endometrial tissue or excessive expression of MMPs over TIMPs can result in an invasive disease in endometriosis.

Keywords: endometriosis, MMP (matrix metalloproteinase), TIMP (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases)

二、緣由與目的

子宮內膜異位症是生育年齡婦女最常見的疾病之一，但其原因目前仍不清楚。1927年，Sampson 首先提出了大家較接受的假說，他指出藉回流的經血，子宮內膜細胞可經由輸卵管到達腹腔，而形成子宮內膜異位病灶。然而，絕大多數輸卵管通暢的婦女可見回流的經血，但並不是每一位婦女皆會形成子宮內膜異位症，其中的道理令人費解。免疫功能的變化，可能是導致此一疾病進展的原因。這些年來，我們實驗室先後發現，患者腹腔內自然殺手細胞毒殺能力降低，某些 T 細胞活化抗原如 CD25 的比率偏低。一些發炎有關的細胞素，如 IL-6, TNF- α , IL-1 也都升高，巨噬細胞也活化了。但以上現象，究竟是此疾病的因，還是果，仍無定論。從最近我們在子宮頸癌的浸潤淋巴球有關的研究[1]，及妊娠時蜕膜中的 T 淋巴球的變化，認為母質金屬蛋白酵素可能在子宮內膜異位形成，及在部分免疫學變化上扮演某種重要

角色。

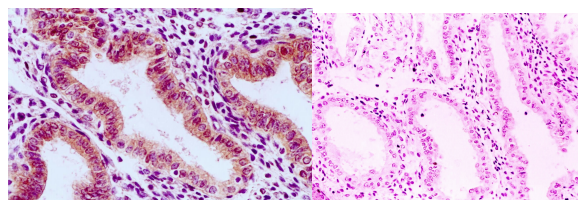
三、研究的方法

選擇不同的病人（子宮內膜異位症 [N=25] 與單純子宮肌瘤 [N=23]），不同位置的內膜組織（子宮內與子宮外），不同的月經週期（濾泡期早期與黃體期中期），來探討母質金屬蛋白酵素 (MMP-1, 2, 3, 7, 9) 和其抑制物質 (TIMP-1, 2, 3) 的存在與強度和子宮內膜異位之間的可能關係。材料是石蠟切片。切片厚度在 2-3 μm 之間，所採用的單株抗體 (CHEMICON International, Temecula, CA) 原始濃度是 2 mg/mL (除了 MMP-9 是 3 mg/mL)，100 倍稀釋，4 過夜，加上二抗 (Immunotech, Marseille Cedex, France) 30 分鐘，再加上 ABC 30 分鐘，色源是 DAB 20 分鐘，最後加上 hematoxylin 1 分鐘。

評估強度方式，用直腸癌當陽性，一抗沒有加當陰性。強度分別為 0-3 分 [2]，分佈的面積也分別給 0-3 分 [3]。把兩者加起來就是它的表現強度 0-6 分 [4]。評分者並不知道這些病歷的資料或分組情形。除了用 Mann-Whitney test 來比較之外，還用 Wilcoxon signed rank test 來測試相對應之內外組織的表現。此外我們用 (MMP-TIMP) 來作相對強度之比較。

四、結果

在濾泡期，子宮內膜異位症的 MMP-1, 3 都比對照組強 (表一)，可是其抑制酵素也都有增加 (TIMP-1, 2, 3)。在黃體期，子宮內膜異位症的 MMP-2 比對照組強。一般而言，腺體部分都比基質部分來的染色強一些 (圖一)，對子宮內膜異位症本身而言，異位的組織也比原位的組織強一些 (表二)，例如濾泡期 MMP-2 就很明顯。黃體期 (MMP-2—TIMP-1) 與 (MMP-2—TIMP-1) 都在子宮內膜異位症高一些 (表三)。濾泡期異位的組織相對於原位組織也有類似的發現。



圖一 (左圖) MMP-1 在子宮內膜異位症患者原位的內膜上染色情形，腺體部分比較明顯 (原始放大 400X)。 (右圖) TIMP-1 在同一個病人染色就幾乎是陰性 (原始放大 200X)。

表一 子宮內膜異位症與對照組母質金屬蛋白酵素與其抑制素之表現

	Gr. 1 (N=9)	Gr. 2 (N=14)	Gr. 3 (N=8)	Gr. 4 (N=17)
MMP-1 (G)	2 (1-4.5) ^{ab}	4 (4-4.25) ^b	4.5 (4-5) ^a	5 (3.5-5)
(S)	2 (0-2.5) ^{ab}	3 (2-4) ^b	4 (2.25-4) ^a	4 (2-4)
MMP-2 (G)	3 (1-3.5)	3 (2-4) ^a	3.5 (3-5)	4 (4-4) ^a
(S)	2 (1-3.5)	2 (2-3) ^a	3 (2-4)	4 (3-4) ^a
MMP-3 (G)	4 (2.5-4)	4 (3.75-5)	4 (4-4.75)	4 (4-5.5)
(S)	3 (2-4) ^a	4 (3-4)	4 (4-4) ^a	4 (3-5)
MMP-7 (G)	4 (2.5-6)	4.5 (4-6)	4 (3-5)	4 (4-5.5)
(S)	4 (2-4.5)	4 (3.5-5)	3.5 (2.25-4)	4 (2.5-5)
MMP-9 (G)	4 (3-6)	4 (3.75-5)	4 (4-5)	5 (3-5)
(S)	3 (2-5)	3 (2-4)	4 (3-4)	4 (2-4.5)
TIMP-1 (G)	2 (2-3.5) ^a	4 (2-5)	4 (4-4.75) ^a	4 (3.5-4)
(S)	2 (2-2.5) ^a	2.5 (2-4)	3 (3-3.75) ^a	3 (2.5-4)
TIMP-2 (G)	3 (2.5-4) ^a	4 (3-5)	4.5 (4-5) ^a	4 (4-4.5)
(S)	3 (2-4) ^a	3.5 (2-4)	4 (3.25-4) ^a	3 (2.5-4)
TIMP-3 (G)	3 (2.5-4) ^a	4 (3-4.25)	5 (4.25-5) ^a	4 (3.5-5)
(S)	2 (1-3) ^a	3 (2-4)	4 (3.25-5) ^a	4 (2.5-4)

Data=median (25-75 %); ^a P < 0.05 between endometriosis and controls by the Mann-Whitney U test. ^b P < 0.05 between follicular and luteal phases. G: glandular, S: stromal. Gr. 1, 2 = control, Gr. 3, 4 endometriosis; Gr. 1, 3 = follicular, Gr. 2, 4 = luteal phases.

表二 子宮內膜異位症本身原位與異位組織的母質金屬蛋白酵素與其抑制素之表現

	Gr. 3 (follicular; N=8)		Gr. 4 (luteal; N=17)	
	Eutopic	Ectopic	Eutopic	Ectopic
MMP-1 (G)	4.5 (4-5)	5 (4-5.8)	5 (3.5-5)	4 (3.5-5)
(S)	4 (2.3-4)	4 (3.3-5)	4 (2-4)	4 (2.5-4)
MMP-2 (G)	3.5 (3-5)	4 (4-4.8)	4 (4-4)	4 (4-4)
(S)	3 (2-4) ^a	4 (4-4.3) ^a	4 (3-4)	4 (3-4)
MMP-3 (G)	4 (4-4.8)	4.5 (4-5.8)	4 (4-5.5)	5 (4-5)
(S)	4 (4-4)	4 (3.3-5)	4 (3-5)	4 (3.5-5)
MMP-7 (G)	4 (3-5)	4 (3.3-5)	4 (4-5.5)	4 (4-6)
(S)	3.5 (2.3-4)	3 (2.3-4)	4 (2.5-5)	5 (3-5)
MMP-9 (G)	4 (4-5)	4.5 (2.3-5)	5 (3-5)	4 (3.5-5)
(S)	4 (3-4)	3 (2-4.3)	4 (2-4.5)	4 (3-4)
TIMP-1 (G)	4 (4-4.8)	3.5 (3-4)	4 (3.5-4)	4 (3.5-5)
(S)	3 (3-3.8)	3 (2-3.8)	3 (2.5-4)	4 (2-4)
TIMP-2 (G)	4.5 (4-5)	4 (3.3-4)	4 (4-4.5)	4 (4-5.5)
(S)	4 (3.3-4)	3 (3-4)	3 (2.5-4)	4 (3-5)
TIMP-3 (G)	5 (4.3-5)	4 (3-4)	4 (3.5-5)	4 (3-5)
(S)	4 (3.3-5)	4 (2.3-4)	4 (2.5-4)	4 (2-4)

^a P < 0.05 between eutopic and ectopic tissue in cases with endometriosis by the Wilcoxon Signed rank test.

表三 子宮內膜異位症與對照組母質金屬蛋白酵素減去其抑制素之差別

	Gr. 1 (N=9)	Gr. 2 (N=14)	Gr. 3 (N=8)	Gr. 4 (N=17)
MMP-1 -	0 (-1.5-1) 0 (-2-0)	0.5 (-1-2) 0 (-1.3-2)	0.5 (0-1) 0 (0-1)	1 (-0.5-1.5) 0 (-1-1)
TIMP-2	0 (-2-1) -1 (-2-0)	0 (-1-1) 0 (-1.3-1.3)	0 (0-0.8) 0 (-1.5-0)	1 (-0.5-1) 0 (-1.5-1)
TIMP-3	-1 (-2.5-1.5) 0 (-3-2)	0 (-0.3-1) 0 (-1.3-1.3)	-0.5 (-1-1) -0.5 (-1.8-0)	0 (-1.5-1.5) 0 (-2-1)
MMP-2 -	0 (-2-1) 0 (-1.5-1)	-1 (-1-0) ^a -1 (-2-0.3) ^a	0.5 (-1.8-1) 0.5 (-1.8-1)	0 (-0.5-0.5) ^a 1 (-0.5-1.5) ^a
TIMP-2	-1 (-2-0) 0 (-2-0.5)	-1 (-1.3--1) ^a -1 (-2-0) ^a	-0.5 (-2-0.8) -1 (-1.8-0)	0 (-1-1) ^a 0 (0-1) ^a
TIMP-3	-1 (-1.5-0.5) 0 (-1-1.5)	-1 (-2-0) -0.5 (-2-0)	0 (-2-0) -1 (-1.8-1)	0 (-1.5-1) 0 (0-1)
MMP-3 -	1 (0-1.5) 1 (-0.5-1.5)	0 (-0.3-1.3) 1 (0-2)	0 (0-0.8) 1 (0.3-1)	1 (0-2) 1 (0-1.5)
TIMP-2	0 (-0.5-1.0) 0 (-0.5-1.0)	0 (-1-1) 0 (-0.3-1.3)	0 (-0.8-0) 0 (0-0.8)	0 (-0.5-1) 1 (0-1.5)
TIMP-3	1 (-1-1.5) 1 (-0.5-3)	0 (0-1) 1 (0-1.3)	-0.5 (-1-0) 0 (-1-0.8)	0 (-1-1) 1 (-0.5-1)

^a P < 0.05 between endometriosis and controls by the Mann-Whitney U test. (上 = glandular, 下 = stromal)

五、討論

由於月經週期子宮內膜不斷地掉落更新，因此許多母質金屬蛋白酵素曾經被報告[5]。子宮內膜異位症就是逆流的月經細胞所造成，所以許多人懷疑母質金屬蛋白酵素在此扮演的角色[6,7]。

在本實驗中，我們發覺子宮內膜異位症的內膜組織中母質金屬蛋白酵素 MMP-1, 2, 3 表現都比對照組要來得高。但是，其抑制酵素 TIMP-1, 2, 3 也升高了。一般相信，TIMP 是一種緩和 MMP 作用的酵素[8,9]，因此應該是 MMP 升高合併 TIMP 下降，才會導致這種疾病的發生。雖然有人報導 TIMP-1 有時是癌症深層侵犯或轉移的罪魁禍首[10,11]，但我們可不這麼認為，我們推想，應該是倒流的月經細胞實在太多了，在腹腔中引起的 MMP 與 TIMP 交互作用，最後 TIMP 產生的量趕不上 MMP 增加的速度，以致於引起這個疾病。這可以從我們的表三，可以得知內膜異位症的 (MMP—TIMP) 差值比較高，可以佐證。

有人證明子宮內膜組織[12]或異位組織[13]都可以產生 TIMP-1，但是，內膜異位症的腹水或血清中竟然 TIMP-1 都比較少[14]。

他們的解釋是因為內膜組織所產生的 TIMP-1 在病灶中或腹腔內被吸收或破壞了。所以產生量是正常的，但分泌量是缺乏的，所以腹水中較少。但是，內膜異位症患者 MMP 在腹水中卻是比正常人高[15]。MMP 可能也會受到吸收或破壞，可是，也許是它的增加更多，所以足夠到腹水中被測出比較高的緣故。

從這個實驗可以發現，內膜異位症組織不只是 MMP 會升高，TIMP 也跟著高，如果 MMP 是犯罪份子，TIMP 是維持治安的警察，通常一個犯罪率高的城市，警察也會多起來，只是道高一尺，魔高一丈罷了。接下來，可能要利用體外培養技術，測量 MMP 與 TIMP 實際的產生量，更能夠證明我們的理論。

六、參考文獻

- [1] Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, et al. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; 61:237-42.
- [2] Wenzl RJ, Heinzl H. Localization of matrix metalloproteinase-2 in uterine endometrium and ectopic implants. *Gynecol Obstet Invest* 1998, 45:253-7.
- [3] Soini Y, Alarakkola E, Autio-Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Hum Pathol* 1997; 28:220-6.
- [4] Belfiore A, Gangemi P, Costantino A, et al. Negative/low expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor identifies papillary thyroid carcinomas with high risk of distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2322-8.
- [5] Salamonsen LA, Woolley DE. Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Hum Reprod* 1996; 11 Suppl 2: 124-33.
- [6] Bruner KL, Matrisian LM, Rodgers WH, et al. Suppression of matrix metalloproteinases inhibits establishment of ectopic lesions by human

- endometrium in nude mice. *J Clin Invest* 1997; 99:2851-7.
- [7] Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL. Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol* 1996; 14:247-55.
- [8] Denhardt DT, Feng B, Edwards DR, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 1993; 59:329-41.
- [9] Tsuchiya Y, Sato H, Endo Y, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is a negative regulator of the metastatic ability of a human gastric cancer cell line, KKLS, in the chick embryo. *Cancer Res* 1993; 53:1397-402.
- [10] Yoshikawa T, Saitoh M, Tsuburaya A, et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in the plasma of patients with gastric carcinoma. A possible marker for serosal invasion and metastasis. *Cancer* 1999; 86:1929-35.
- [11] Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, et al. Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer. *Cancer Lett* 2000; 151:81-6.
- [12] Rodgers WH, Matrisian LM, Giudice LC, et al. Patterns of matrix metalloproteinase expression in cycling endometrium imply differential functions and regulation by steroid hormones. *J Clin Invest* 1994; 94:946-53.
- [13] Sharpe-Timms KL, Penney LL, Zimmer RL, et al. Partial purification and amino acid sequence analysis of endometriosis protein-II (ENDO-II) reveals homology with tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3784-7.
- [14] Sharpe-Timms KL, Keisler LW, McIntush EW, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 concentrations are attenuated in peritoneal fluid and sera of women with endometriosis and restored in sera by gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Fertil Steril* 1998; 69:1128-34.
- [15] Saito T, Mizumoto H, Kuroki K, et al. [Expression of MMP-3 and TIMP-1 in the endometriosis and the influence of danazol]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1995; 47:495-6.