

# 寿胎丸对小鼠自然流产模型蜕膜组织细胞因子信号转导抑制因子基因表达的影响

刘慧萍, 尤昭玲\*, 卢芳国, 何冬梅, 赖毛华, 周 琼, 邓菁英, 王 芳  
(湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

**[摘要]** 目的: 探讨寿胎丸对小鼠自然流产模型蜕膜组织细胞因子信号转导抑制因子(SOCS)中 SOCS1mRNA, SOCS3mRNA 表达的影响。方法: 设立小鼠正常妊娠与反复自然流产模型, 并将反复自然流产模型小鼠随机分为 4 组, 分别为模型组、寿胎丸低、中、高剂量组, 应用原位杂交法检测孕 14 d 各组蜕膜组织 SOCS1mRNA 和 SOCS3mRNA 表达。结果: SOCS1mRNA 和 SOCS3mRNA 在各组均有表达, 模型组 SOCS1mRNA 比正常妊娠组明显升高( $P < 0.01$ ), 而 SOCS3mRNA 比正常妊娠组明显降低( $P < 0.01$ ); 寿胎丸低、中、高剂量组 SOCS1mRNA 表达明显低于模型组( $P < 0.01$ ), 而 SOCS3mRNA 明显高于模型组( $P < 0.01$ )。结论: 寿胎丸可能通过降低自然流产模型小鼠蜕膜组织 SOCS1mRNA 表达, 而升高 SOCS3mRNA 表达, 从而调控 Th 向 Th2 分化, 以达到改善妊娠预后的目的。

**[关键词]** 反复自然流产; 基因; 寿胎丸; 小鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)04-0057-03

反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是妊娠期常见的一种并发症, 其病因涉及遗传、免疫、内分泌及感染等多种因素, 但在 40%~60% 病因不明的 RSA 患者中, 多数是由于母胎免疫调节异常所致<sup>[1]</sup>。妊娠免疫耐受机理是近年来国内外研究的热点, 母体与胎儿免疫因素在 RSA 发病中的作用得到重视<sup>[2]</sup>。近年研究发现 RSA 与 Th1/Th2 型细胞因子的失调有关, 新近研究发现细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)与 Th1/Th2 细胞的分化有密切关系<sup>[3]</sup>, 因此探讨 SOCS 基因与 RSA 的相关性, 为治疗 RSA 提供了一条途径。寿胎丸是临床治疗反复自然流产的有效中药复方, 为了进一步探讨寿胎丸的作用机制, 本实验观察寿胎丸对自然流产小鼠模型 SOCS1mRNA 和 SOCS3mRNA 表达的影响。

## 1 材料

**1.1 药物** 寿胎丸浸膏, 由 4 味中药组成: 菟丝子 400 g, 续断 200 g, 桑寄生 200 g, 阿胶 200 g。

**1.2 实验动物** 健康雌性 CBA/J 小鼠, 雄性 DBA/

2, Balb/c 小鼠, SPF 级, 8 周龄, 由中国医学科学院实验动物研究所提供, 合格证: SCXK(京)2005-0013。

**1.3 主要试剂和仪器** SOCS1mRNA 原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: DISH-SBA1), SOCS3mRNA 原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号: DISH-SBA3); MIAS 医学图像分析系统(北航公司), Shandon 型冰冻切片机(英国 Shandon 公司)。

## 2 方法

**2.1 造模** 将 50 只雌性 CBA/J 小鼠分别与 20 只雄性 DBA/2 和 5 只 BALB/c 小鼠按 2:1 合笼交配, 检出阴栓者计为妊娠第 0 天。分别建立反复自然流产模型鼠 40 只与正常妊娠模型鼠 10 只。

**2.2 实验分组及给药** CBA/J × BALB/c 孕鼠作为正常妊娠组(10 例)。CBA/J × DBA/2 孕鼠作为反复自然流产模型(40 例)按妊娠顺序随机分为模型组、寿胎丸低( $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 中( $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 高剂量组( $12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。自妊娠第 1 天开始灌胃, 正常妊娠组和模型组给予等量的生理盐水灌胃, 另 3 组给予寿胎丸混悬液灌胃, 直至孕 14 d。寿胎丸剂量以生药量计算。

**2.3 原位杂交法检测 SOCS1mRNA, SOCS3mRNA 表达**

**2.3.1 标本取材及预处理** 于孕 14 天断颈处死小

**[收稿日期]** 2008-06-12

**[基金项目]** 湖南省科技计划重点项目(2007FJ2005)

**[通讯作者]** \* 尤昭玲, Tel: (0731) 8451000; E-mail: yujioda@21cn.com

鼠,切取子宫组织(含蜕膜组织),放入用 DEPC 水及 0.1M PBS 液冲洗后迅速入 4% 多聚甲醛液固定 20 min,在 PBS 中清洗组织样品 2 次,4 °C 入 DEPC 处理的 20% 蔗糖过夜至沉,取出标本放入异戊烷-液氮法速冻,液氮罐保存备检。

**2.3.2 冰冻切片** 标本从液氮中取出,复温到 -20 °C OCT 包埋,冰冻切片机连续制备厚 8 μm 的冰冻切片。

**2.3.3 原位杂交操作程序** 暴露 mRNA 核酸片段 → 后固定 → 预杂交 → 杂交后洗涤 → 滴加封闭液 → 滴加生物素化鼠抗地高辛 → 滴加生物素化过氧化物酶 → DAB 显色后,以 95%,100% 乙醇脱水,烘干,二甲苯透明,中性树脂封片。

**2.3.4 图像分析** 每个标本连续切片随机选取 2 张切片,先在显微镜低倍镜下对子宫蜕膜组织进行准确定位再在高倍镜下观察阳性细胞的形态和分布,然后用连有三目光学显微镜的数字彩色图像显微图像分析系统进行定位、定量,每张切片选取 4 个不同区域(相当于每组 32 个区域),分析各区域平均灰度。SOCS1mRNA,SOCS3mRNA 阳性的细胞胞浆着色呈棕黄色。

**2.4 统计方法** 所有数据均用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析和秩和检验, $P < 0.05$  被认为差异有显著性。

### 3 结果

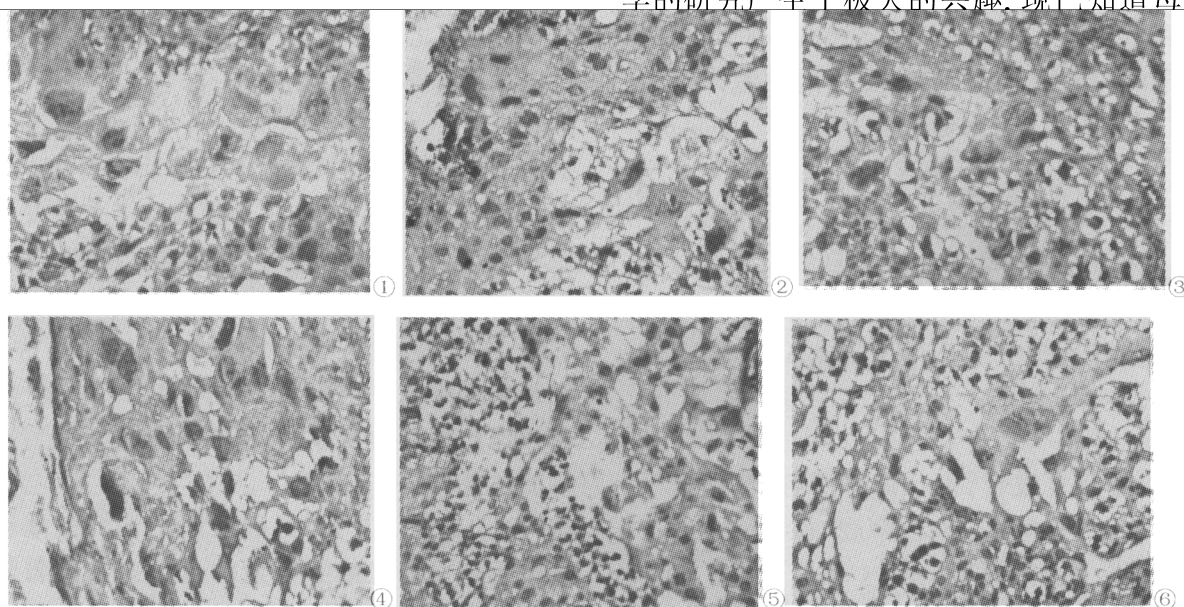


图 1 正常妊娠蜕膜组织 SOCS1mRNA 原位杂交染色,蜕膜细胞呈弱阳性反应,×400。  
图 2 自然流产组蜕膜组织 SOCS1mRNA 原位杂交染色,蜕膜细胞呈阳性反应,×400。  
图 3 寿胎丸中剂量组蜕膜组织 SOCS1mRNA 原位杂交染色,蜕膜细胞呈弱阳性反应,×400。  
图 4 正常妊娠蜕膜组织 SOCS3mRNA 原位杂交染色,蜕膜细胞呈阳性反应,×400。  
图 5 自然流产组蜕膜组织 SOCS3mRNA 原位杂交染色,蜕膜细胞呈弱阳性反应,×400。  
图 6 寿胎丸中剂量组蜕膜组织 SOCS3mRNA 原位杂交染色,蜕膜细胞呈阳性反应,×400。

**3.1 一般情况** 观察小鼠精神状态、活动情况、饮食、二便、毛发光泽度等情况正常。

**3.2 各组小鼠蜕膜组织 SOCS1mRNA, SOCS3mRNA 表达** 各组小鼠 SOCS1mRNA, SOCS3mRNA 在蜕膜组织均有表达,与正常妊娠组比较,模型组 SOCS1mRNA 表达明显升高 ( $P < 0.01$ ),而 SOCS3mRNA 表明明显降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,寿胎丸低,中,高剂量组 SOCS1mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.01$ ),而 SOCS3mRNA 明显升高 ( $P < 0.01$ )。二者在寿胎丸各剂量组之间的表达均无明显差异 ( $P > 0.05$ )。各组灰度值与阳性表达呈反比,详见表 1,图 1~3。

表 1 SOCSmRNA 在各组小鼠蜕膜组织表达的平均灰度值比较( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> )	平均灰度值	
		SOCS1mRNA	SOCS3mRNA
正常妊娠	—	169.12 ± 8.02 <sup>1)</sup>	145.16 ± 7.14 <sup>1)</sup>
自然流产模型	—	140.31 ± 5.15	168.19 ± 8.07
寿胎丸	3	165.18 ± 9.06 <sup>1)</sup>	148.13 ± 6.25 <sup>1)</sup>
	6	168.38 ± 8.13 <sup>1)</sup>	146.41 ± 7.18 <sup>1)</sup>
	12	166.21 ± 7.17 <sup>1)</sup>	147.62 ± 5.03 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$

### 4 讨论

RSA 是一种常见的病理性妊娠,目前相当一部分 RSA 病例找不到病因,这使人们对 RSA 免疫病因学的研究产生了极大的兴趣,现已知道母体对胎儿

的非己抗原会产生免疫应答,这一免疫应答以 Th2 为主,如果母体产生的是 Th1 型免疫应答,则胎儿容易被排斥,造成流产。目前临床上广泛应用的主动免疫疗法机制之一是使母体对胎儿的反应由 Th1 转变为 Th2。因此寻找决定 Th 分化方向、改变其释放细胞因子特性的因素是一个值得探讨的问题。新近研究发现 SOCS 与 Th1/Th2 细胞的分化有密切关系<sup>[4]</sup>,其机制可能是 SOCS 家族参与 Th 细胞的增殖和分化。尽管研究发现 SOCS 基因参与自身免疫性疾病的发生、发展,但 SOCS 基因在母胎免疫调节中的作用研究尚较少,免疫因素引起的反复自然流产也是一种自身免疫性疾病,且正常妊娠呈 Th2 型免疫优势,妊娠能减轻 Th1 型自身免疫病风湿性关节炎的症状,却加重 Th2 类免疫性疾病系统性红斑狼疮的发展,由此我们推测 SOCS 家族极有可能参与妊娠期 Th2 免疫优势的维持,因此,我们通过对 CBA/J × DBA/2 免疫性自然流产小鼠模型<sup>[7]</sup>和正常妊娠小鼠进行比较,研究 SOCS 基因家族在母胎界面的表达及在母胎免疫调节中的作用。

根据中医“肾主生殖,胞络系于肾”;“藏生殖之精,又藏水谷之精气”;“肾为先天之本,脾为后天之本,生化之源,以滋养育胎”的理论,此类流产属肾虚、胎元不固,我们选用寿胎丸,本方源于《医学衷中参西录》,由菟丝子、桑寄生、川断、阿胶 4 味中药组成,主治滑胎。方中菟丝补肾,肾旺自能荫胎,桑寄生能养血强筋骨,使胎气强壮,续断能补肾,阿胶善伏藏血脉,滋阴补肾。全方补肾养血安胎。临床报道本方治疗 RSA 疗效显著<sup>[5-10]</sup>。为研究寿胎丸调节蜕膜 Th2 免疫应答的优势具体机制,本项目采用国际公认的 CBA × DBA/2 免疫性流产小鼠模型为实验对象,观察寿胎丸对流产小鼠的保胎作用,此模型的特点是母胎界面免疫网络紊乱,蜕膜对胎盘抗原

产生 Th1 类免疫应答。结合以上 SOCS 基因在母胎免疫调节中的作用研究结果,探讨寿胎丸对 CBA × DBA/2 免疫性流产小鼠模型蜕膜 Th2 免疫应答的诱导及对蜕膜 T 细胞 SOCS 基因表达的调节,并在分子水平上探讨寿胎丸及其组方对母胎免疫的调节机制,寻找其作用靶标,对于研制有效的基因调控药物,提高中药防治 RSA 的水平,丰富中药调节母胎免疫的现代理论知识,均具有重要意义。

### [参考文献]

- [1] 董琳,朱晓勇,杜美蓉,等.环孢霉素 A 对小鼠自然流产模型外周 CD4+ CD25+ T 细胞及妊娠结局的影响[J].现代免疫学,2006,26(2):113-115.
- [2] Neale DM, Mor G. The role of Fas mediated apoptosis in preeclampsia[J]. J Perinat Med, 2005, 33(6):471-477.
- [3] Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, et al. Induction of keratinocyte migration Via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial Peptide LL-37[J]. J Immunol. 2005, 175(7):4662-4668.
- [4] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, et al. A novel cytokine inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors[J]. EMBO J, 1995, 14, 2816.
- [5] 朱晓勇,李大金,孙晓溪.正常妊娠与自然流产小鼠模型母胎界面细胞因子表达特征的比较[J].生殖医学杂志,2003,12(5):283-287.
- [6] 蔡雪芬,梁朝霞,王也玲.加味寿胎丸合黄体酮对畸形子宫妊娠保胎治疗 30 例[J].中国中西医结合杂志,2005,25(6):498.
- [7] 潘星宇.寿胎丸加味治疗习惯性流产 62 例疗效观察[J].光明中医,2004,19(4):59-60.
- [8] 李宝华.寿胎丸加味治疗胎漏、胎动不安、堕胎、小产的体会[J].职业与健康,2005,21(1):113-115.
- [9] 刁莉.寿胎丸加减治疗胎漏胎动不安 50 例临床观察[J].临床医学,2004,24(6):27.
- [10] 黄逸玲.寿胎丸加减治疗胚胎宫内生长受限 12 例[J].实用中医药杂志,2006,22(3):135.