

正常妊娠与自然流产模型小鼠蜕膜组织细胞因子信号 转导抑制因子基因表达的差异

尤昭玲^{*}, 刘慧萍, 雷 磊, 赖毛华, 何冬梅, 邓菁英, 王 芳, 周 琼
(湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 目的: 检测细胞因子信号转导抑制因子 SOCS1mRNA、SOCS2mRNA、SOCS3mRNA 在正常妊娠模型与反复自然流产

[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

模型小鼠的不同表达。方法:建立反复自然流产小鼠模型 CBA/J×DBA/2 及正常妊娠小鼠模型 CBA/J×BALB/c,取孕 14 d 的蜕膜组织,原位杂交方法检测 SOCS1mRNA、SOCS2mRNA、SOCS3mRNA 基因的表达。结果:SOCS1mRNA、SOCS2mRNA、SOCS3mRNA 在自然流产小鼠模型及正常妊娠小鼠模型蜕膜组织均有表达,与正常妊娠组比较,在反复自然流产小鼠 SOCS1mRNA 表达升高($P < 0.01$),而 SOCS3mRNA 表达降低($P < 0.01$)。结论:SOCS1mRNA、SOCS3mRNA 可能在妊娠的维持中发挥主要作用。

[关键词] 反复自然流产;小鼠;基因表达

[中图分类号] 285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)03-0029-03

反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是一种常见的病理性妊娠,是指妊娠 20 周之前,3 次或 3 次以上出现不明原因的流产,发生率为育龄妇女的 3%,其发生的原因有以下几种:3%~5% 的染色体或基因的异常,17% 的内分泌因素,5% 的感染因素,10% 的子宫异常,50%~60% 被认为是免疫因素,但是至今免疫机制仍不明确^[1]。近年免疫学研究发现,反复自然流产与 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 型细胞的分化有密切关系^[2],我们通过比较正常妊娠与反复自然流产的 SOCS1mRNA、SOCS2mRNA、SOCS3mRNA 的不同表达,来观察 SOCS 与反复自然流产的相关性。为治疗 RSA 提供了一条途径。

1 材料

1.1 实验动物 健康雌性 CBA/J,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。在湖南中医药大学清洁级实验动物中心饲养,自由饮水摄食,每天保持 12 h 明、12 h 暗环境。

1.2 主要试剂 SOCS1mRNA(批号: DISH-SBA1)、SOCS2mRNA(批号: MK2543-m)、SOCS3mRNA(批号: DISH-SBA3)均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.3 主要仪器 LEICA DM LB2 型双目显微镜(德国 LEICA 公司);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);Motic B5 显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)等。

2 方法

2.1 动物模型 将雌性 20 只 CBA/J 小鼠分别与雄性 5 只 DBA/2 及 5 只 BALB/c 小鼠分别按 2:1 合笼交配,分别建立自然流产模型 CBA/J×DBA/2 与正常妊娠模型 CBA×BALB/c,雌雄 2:1 分笼饲养检出阴栓者计为妊娠第 0 天。

2.2 原位杂交法检测 SOCS1mRNA、SOCS2mRNA、

SOCS3mRNA 表达

2.2.1 标本取材及预处理 于孕 14 d 断颈处死小鼠,切取子宫组织(含蜕膜组织),迅速修整、称重,将子宫沿纵剖面切开,放入用 DEPC 水及 0.1 M 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℃ 入 DEPC 处理的 20% 蔗糖过夜至沉,取出用异戊烷-液氮法速冻,液氮罐保存备检。

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

2.2.3 原位杂交操作程序 将装有载玻片的密封盒从 -70℃ 冰箱中取出,开盒前将其平衡至室温。30% H₂O₂ 1 份+ 纯甲醇 50 份混合,室温处理 30 min。蒸馏水洗涤 3 次。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。

2.2.4 图像分析 杂交信号强弱用平均灰度值表示,灰度值越小,说明其阳性反应的程度越高,表达越强。每个标本连续切片,随机选取 2 张切片(相当于每组 8 张切片),先在低倍镜下(10×10)对子宫蜕膜组织进行准确定位再在高倍镜下(10×40)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。SOCS1 mRNA、SOCS2 mRNA、SOCS3 mRNA 的细胞胞浆着色呈棕黄色。

2.3 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, $P < 0.05$ 被认为差异有显著性。

3 结果

原位杂交法检测蜕膜组织 SOCS 基因的表达 SOCS1mRNA、SOCS2mRNA、SOCS3mRNA 在自然流产小鼠模型组及正常妊娠小鼠模型组蜕膜组织均表

达,但与正常妊娠组比较,SOCS1mRNA 在自然流产小鼠表达升高($P < 0.01$),而 SOCS3mRNA 表达降低($P < 0.01$)(表和图)。**4 讨论**

近年来,随着分子生物学和分子免疫学等技术的应用,生殖免疫调节机理的研究取得了很大进展。SOCS 蛋白是近年发现的细胞因子的负调控因子,调控众多细胞因子和激素的信号转导^[3]共有 8 种,功

表 1 两组小鼠蜕膜组织 SOCS 基因表达的平均灰度值比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | SOCS1mRNA | SOCS2mRNA | SOCS3mRNA |
|---------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
| 正常妊娠组 | 169.12 ± 8.02 | 125.37 ± 9.11 | 145.16 ± 7.14 |
| 自然流产模型组 | 140.31 ± 5.15 ¹⁾ | 122.09 ± 6.27 | 168.19 ± 8.07 ¹⁾ |

注:与正常妊娠组比较¹⁾ $P < 0.01$

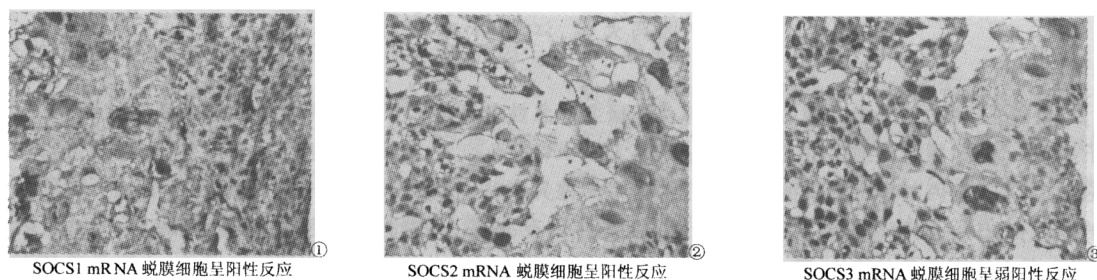


图 自然流产组蜕膜组织 SOCSmRNA 原位杂交染色($\times 400$)

能研究较为明确的是 SOCS1 SOCS2 和 SOCS3。SOCS 与 Th1/Th2 型细胞的分化有密切关系,其机制可能是 SOCS 家族参与 Th 细胞的增殖和分化,SOCS1 抑制 IL-12 诱导的 T 细胞增殖^[4]和 NK 细胞生成 IFN- γ ,从而抑制其细胞毒活性,SOCS3 与 IL-2 相互拮抗,抑制未致敏 Th 细胞增殖^[5],研究还发现 Th2 细胞表达高水平 SOCS3,SOCS3 抑制 Th2 细胞中 IL-12 诱导的 STAT4 活化,而持续激活 IL-4/STAT6 信号,是维持 Th2 细胞亚群的重要原因^[6]。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^[7],因此,我们通过对 CBA/J \times DBA/2 免疫性自然流产小鼠模型^[8]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。本实验结果说明 SOCS1mRNA, SOCS3mRNA 的适量表达均有利妊娠的维持,但是如果 SOCS1mRNA 过度表达 SOCS3mRNA 表达过低将导致流产。由此可见,反复自然流产与 SOCS 的差异表达有关,其机制可能是通过对 Th1/Th2 平衡的调控而起作用。

[参考文献]

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2004. 99-100.

[2] 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]. Immunol, 2005, 175(7): 4662-4668.

[3] Fletcher J, Starr R. The role of suppressors of cytokine signaling in thymopoiesis And T cell activation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(9): 1774-1786.

[4] Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, *et al.* A novel cytokine-inducible gene CIS encodes anSH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors[J]. EMBO J, 1995, 14: 2816.

[5] Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, *et al.* Suppressor of cytokine signaling 3 regulates proliferation and activation of T-helper cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 278-297.

[6] Yamamoto K, Yamaguchi M, Miyasaka N, *et al.* SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 310: 1188.

[7] 邱丽华. 原因不明复发性流产与 Th1/Th2 型细胞因子[J]. 国外医学·计划生育分册, 2000, 19(1): 20-23.

[8] 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比较[J]. 生殖医学杂志, 2003, 12(5): 283-287.