

RhoB/ROCK 蛋白分子在重度子痫前期的表达 *

杨博萍 韩 健[△] 韩新美 俞丽丽 颜耀华 周元国 李 力[△]

(第三军医大学大坪医院 妇产科 重庆 400042)

摘要 目的 探讨 RhoB/ROCK 蛋白分子在重度子痫前期(severe preeclampsia, sPE)患者胎盘组织中表达水平以及意义。方法 取 sPE 产妇和正常产妇胎盘组织各 20 例,通过 Western blot 和免疫组化检测胎盘组织中 Rho 亚家族蛋白(RhoB、RhoC)及其 Rho 激酶即 ROCK(ROCKI、ROCKII)蛋白的表达水平,应用 Spearman 等级相关分析法检验 RhoB、RhoC 与 ROCKI、ROCKII 蛋白表达水平的相关性。结果: RhoB、ROCKI、ROCKII 蛋白在 sPE 表达水平增加 ($P < 0.05$);sPE 患者胎盘组织中 RhoB 与 ROCKI、ROCKII 蛋白表达水平均呈正相关 ($r = 0.793$ $r = 0.901$, $P < 0.05$)。结论 RhoB 及其与下游分子 ROCKI、ROCKII 构成的信号通路,在 sPE 的发病中可能发挥着重要的作用。

关键词 RhoB ROCK 重度子痫前期

中图分类号 R714.245 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)08-1410-04

The Expression of RhoB/ROCK Molecules in Severe Preeclampsia*

YANG Bo-ping, HAN Jian[△], HAN Xin-mei, YU Li-li, YAN Yao-hua, ZHOU Yuan-guo, LI Li[△]

(Daping Hospital, The Third Military Medical University, People's Republic of China, Chongqing 400042, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of RhoB and ROCK in severe preeclampsia and explore its clinical implication. **Methods:** Western blotting and immunohistochemical staining methods were used to detect the expression of Rho proteins (RhoB, RhoC) and kinase ROCK (ROCKI, ROCKII) in the placenta tissue including 20 severe preeclampsia pregnancy patients and 20 healthy pregnant women as control group. The correlation of the expression of RhoB, RhoC and ROCKI, ROCKII were analyzed Spearman rank correlation analysis. **Results:** RhoB, ROCK and ROCK II were more abundant in the placenta tissue of the severe preeclampsia than in the normal placenta ($P < 0.05$). In severe preeclampsia group, the expression of RhoB and ROCKI, ROCK II had positive relationship ($r = 0.793$, $r = 0.901$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Signaling pathway constituted RhoB and its downstream molecules ROCKI, ROCK II, may play essential role in severe preeclampsia.

Key words: RhoB ROCK ; Severe preeclampsia

Chinese Library Classification(CLC): R714.245 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)08-1410-04

前言

子痫前期 I(pre-eclampsia, PE)是严重威胁孕产妇和胎儿健康的重要产科疾病,其发病机制至今未明。Rho/ROCK 信号通路由 Rho 亚家族蛋白(Ras homologue protein family)及其重要下游分子 ROCK(Rho-associated protein kinase)组成,广泛参与细胞的信号转导过程,通过作用于下游分子调节多种生物学过程。研究表明,PE 患者胎盘组织 RhoA 蛋白表达水平显著上调,提示 RhoA/ROCK 信号通路参与晚孕阶段 PE 的发病过程,但 RhoB/ROCK 信号通路和 RhoC/ROCK 信号通路与 PE 发病的关系及可能存在的作用机制目前尚不明确^[1],其在子痫前期患者胎盘的表达情况亦不明了。本实验拟通过检测胎盘组织中的 RhoB、RhoC、ROCKI、ROCKII 蛋白分子的表达,初步探讨 Rho 亚家族蛋白(RhoB、RhoC)及其下游分子 ROCK 在重度子痫前期胎盘组织中的表达水平及特点,为研究 sPE 的发病机制提供

新的线索。

1 材料与方法

1.1 研究对象及分组

选择 2009 年 1 月~2010 年 9 月在第三军医大学大坪医院和新桥医院产科剖宫产分娩的产妇 40 例,每位患者都签署知情同意书。重度子痫前期组(severe preeclampsia, sPE)20 例,正常妊娠组(normal pregnancy, NP)20 例,两组孕妇年龄比较差异无统计学意义($P > 0.05$),均在临产之前行剖宫产,无其它妊娠合并症,重度子痫前期诊断标准《妇产科学》(第 7 版)^[2]。

1.2 标本采集与预处理

胎盘娩出后,无菌条件下剪取胎盘母体面中央无钙化区组织(约 1.0cm³ 大小),弃除胎盘底蜕膜,用 PBS 漂洗干净^[3],去除血液,置于无菌纱布上浸干,部分标本置入液氮冻存,部分以 4%多聚甲醛中固定。

* 基金项目 国家自然科学基金(30901612)

作者简介 杨博萍(1983-),女,硕士研究生,研究方向 围产医学 E-mail:Bopingxx@163.com 电话:13629783802

△通讯作者 李力(1955-),女,教授,博导 E-mail:lilidaping@yahoo.cn

韩健(1980-),男,博士 E-mail:HJ.TMMU.OBGYN@gmail.com

(收稿日期 2011-09-08 接受日期 2011-09-30)

1.3 方法

1.3.1 免疫组化检测 将胎盘组织置于 4%多聚甲醛中固定 24h ,石蜡包埋、切片(4μm) ,采用免疫组化 ABC 法检测胎盘组织中 RhoB、RhoC、ROCK I 、ROCKII 蛋白表达。参照免疫组化试剂说明书 ,严格按照步骤进行。一抗(RhoB1:1500、RhoC1:1500、ROCK-I 1:500、ROCK-II 1:1500)4℃过夜 ,以 PBS 代替一抗做阴性对照 ,DAB 染色 ,苏木素复染 ,常规脱水、透明、干燥。光镜下观察组织中出現棕黄色颗粒为阳性。

1.3.2 Western blot 按常规方法从胎盘中提取蛋白 ,SDS-PAGE 步骤按常规操作 ,电泳(100 mV, 1.5 h) ,封闭(5%的脱脂牛奶 ,1 h) 。应用不同的单克隆抗体 (Rabbit polyclonal to RhoB、RhoC , 1:2000 ,美国 Abcam 公司 ;Rabbit polyclonal to ROCK 、ROC-K II ,1:300 ,美国 BD biosciences 公司) 孵育 ,然后再与过氧化物酶标记的二抗(Goat anti-rabbit IgG-HRP ,购自北京中杉公司) 孵育 ,应用化学增强发光方法显示条带。应用 quantityone 4.62

软件(Quantity One ,Bio-Rad Laboratories)对凝胶电泳条带进行灰度值分析 ,以目的条带和内参条带(GAPDH)的比值作为目的蛋白表达的相对含量。

1.3.3 相关性分析 重度子痫前期组 RhoB 与 ROCK 、ROC-KII 的表达水平呈显著正相关($r = 0.793$, $r = 0.901$, $P < 0.05$) 。

1.4 统计方法

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,采用 SPSS13.0 统计软件 ,计量资料两组间比较用 t 检验 ,应用 Spernman 相关检验 Rho 和 ROCK 蛋白间表达的相关性 , $P < 0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重度子痫前期组产妇胎盘、胎儿临床参数

重度子痫前期组产妇胎盘重量、胎儿体重均小于正常组 ($P < 0.05$) 。正常组与重度子痫前期组产妇年龄、孕周比较 ,差异无统计学意义($P > 0.05$) ,见表 1。

表 1 正常组和重度子痫前期组的产妇的临床参数情况比较($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Comparison of clinical characters between normal pregnancy and severe preeclampsia

C haracters	Normal pregnancy (N=20)	Severe preeclampsia (N=20)
Age (years)	33.0 $\pm$ 4.2	34.0 $\pm$ 4.0
Gestational age (weeks)	35.3 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 3.5
Placenta weight (g)	0.714 $\pm$ 0.16	0.468 $\pm$ 0.18 [#]
Baby birth weight (g)	3.512 $\pm$ 0.43	2.012 $\pm$ 0.55 [#]

: $P < 0.05$,重度子痫前期组与正常组比较差异显著

Note:Compared with normal pregnancy, # $P < 0.05$

2.2 RhoB、RhoC 蛋白在胎盘组织中的表达

RhoB、RhoC 蛋白在正常和 sPE 胎盘合体滋养细胞、细胞滋养细胞、内皮细胞和一些基质细胞的胞浆中均有表达 ,但主要表达在合体滋养细胞胞质中(图 1) 。重度子痫前期组 RhoB 蛋白表达显著高于正常组($P < 0.05$) ,而 RhoC 表达与正常组相比无明显差异($P > 0.05$)(图 2)

2.3 ROCK I、ROCK II 蛋白的表达

ROCK I 和 ROCKII 蛋白在正常和 sPE 胎盘合体滋养细胞、细胞滋养细胞、内皮细胞和一些基质细胞的胞浆中均有表达 ,但主要表达在合体滋养细胞胞质中(图 3) 。重度子痫前期

组 ROCK I、ROCK II 蛋白表达显著高于正常组 ($P < 0.05$) (图 4)。

3 讨论

子痫前期是严重威胁孕产妇和胎儿健康的重要产科特有疾病 ,由于 PE 的病因和发病机制尚不明确 ,因此临床治疗长期以来以“对症治疗结合终止妊娠”为主 ,治疗效果差。近年来经多方研究总结 ,形成了 PE 的两阶段病因学假说 ,即第一阶段 :在多基因的遗传背景下 PE 易感性增加 ,多种原因导致早孕滋养细胞侵袭不足 ,胎盘浅着床、合体滋养层发育不良 ,为后期发

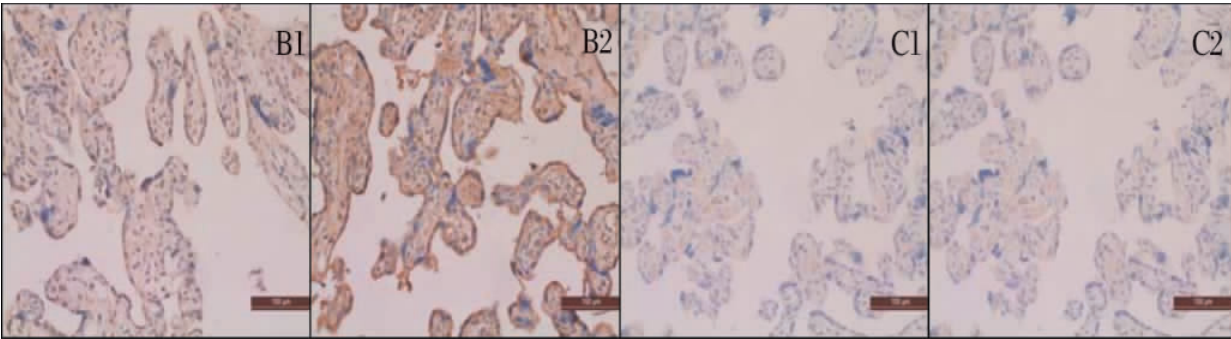


图 1 免疫组化中胎盘组织中 RhoB、RhoC 的定位(200×) : 1-2 分别为正常组、重度子痫前期组 B-C 分别为 RhoB、RhoC
Fig.1 Localization of RhoB and RhoC in normal pregnancy and severe preeclampsia in (200×)

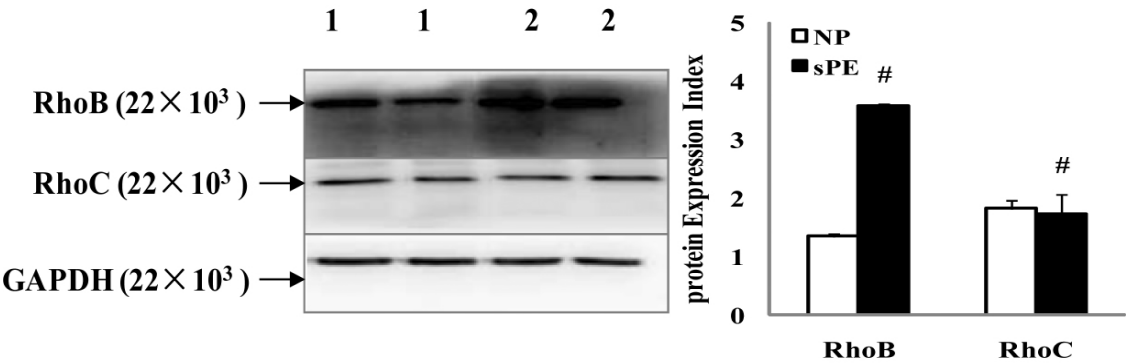


图2 Western-blot 检测胎盘组织中 RhoA、B、C 的表达 # $P<0.05$. 两组比较
 Fig.2 Expression of RhoB and RhoC in normal pregnancy and severe preeclampsia

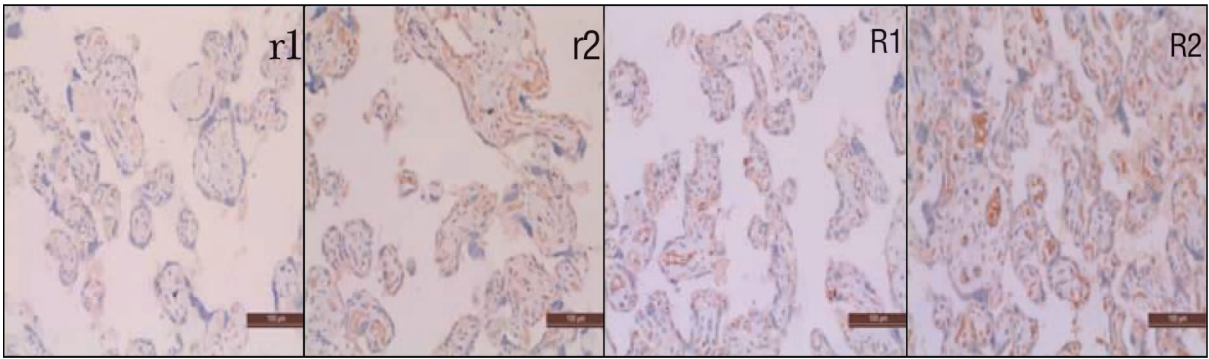


图3 免疫组化胎盘组织中 ROCK I、ROCK II 的表达(200×):1-2 分别为正常组、重度子痫前期组 r-R 分别为 ROCK I、ROCK II
 Fig.3 Localization of ROCK I and ROCK II in normal pregnancy and severe preeclampsia (200×)

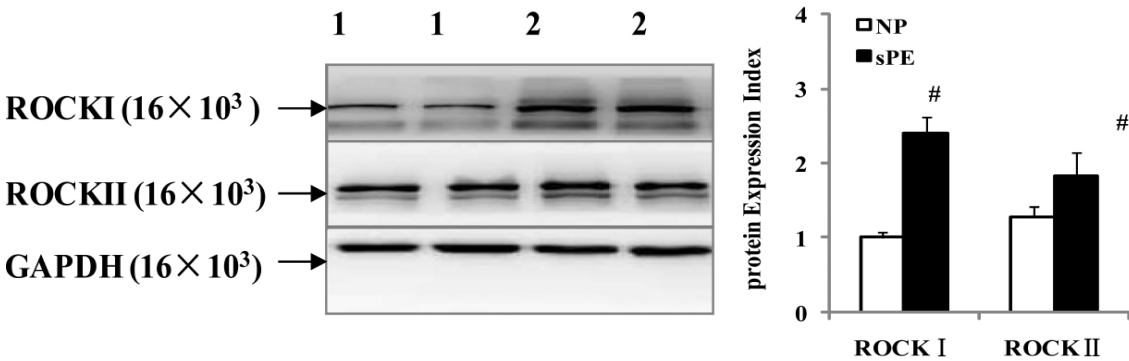


图4 Western-blot 检测胎盘组织中 ROCK I、ROCK II 的表达 # $P<0.05$. 两组比较
 Fig.4 Expression of ROCK I and ROCK II in normal pregnancy and severe preeclampsia

病提供解剖病理基础,第二阶段为晚孕时胎盘低灌注、缺血缺氧、代谢障碍,胎盘源性不良因子释放增加,母体免疫耐受失调和血管内皮损伤,最终引发 PE^[4]。
 Rho 亚家族蛋白属于 Ras 超家族小分子量 G 蛋白成员,包括 RhoA、RhoB、RhoC,在细胞的信号转导通路中作为分子开关作用于下游分子调节细胞骨架的重构,进而参与细胞的黏附、细胞的极性和细胞迁移。ROCK 是目前研究最为清楚的 Rho 蛋白的下游靶效应分子,也是最明确的通过 MLC 途径调控细胞微丝骨架重组的胞内信号蛋白。ROCK 具有两种亚型, ROCK I 和 ROCK II^[5]。Shiokawa S 等^[6]对体外培养的滋养细胞的研究发现,RhoA、ROCK I 蛋白在子痫前期胎盘组织中高表

达,且其表达水平与滋养细胞侵袭能力密切相关,ROCK I 抑制剂可呈剂量依赖形式抑制滋养细胞侵袭及迁移,从而造成胎盘浅着床,导致子痫前期的发生。由此可见,RhoA/ROCK I 信号通路调控滋养细胞侵袭及迁移,从而在子痫前期的发病机制中起重要作用。但迄今为止,子痫前期 RhoB、RhoC 及 ROCK II 在 PE 胎盘组织的表达水平以及其主要表达部位尚不明确,RhoB/ROCK I 信号通路和 RhoC/ROCK I 信号通路与 PE 发病的关系及可能存在的作用机制亦不明了。
 本研究通过检测 sPE 胎盘组织 Rho/ROCK I 信号分子的表达水平,初步探讨 Rho/ROCK I 信号通路亚型表达与 sPE 的关系。结果发现,Rho/ROCK I 分子主要表达在合体滋养细胞胞质

中, sPE 胎盘组织中 RhoB 蛋白表达水平显著高于正常组, RhoC 蛋白表达则无明显变化, 而 ROCK 的两种亚型 ROCKI 和 ROCKII 在重度 PE 胎盘组织均显著上调。本实验结果提示, RhoB/ROCK 可能与 PE 发病时合体滋养细胞的病理变化及生物学功能的改变存在重要的关联。本研究应用 Spearman 等级相关分析法初步检验了 RhoB、RhoC 与 ROCKI、ROCKII 蛋白表达水平关系, 发现 sPE 患者胎盘组织 RhoB、与 ROCKI、ROCK II 蛋白表达水平均呈正相关, 而 RhoC 与 ROCKI、ROCKII 蛋白表达水平则无明显相关性。本课题组前期实验研究发现, Rho 亚家族蛋白 RhoA、RhoC 在滋养细胞的侵袭性迁移中起着不同的作用, 滋养细胞的侵袭性迁移并不依赖于 RhoB^[7], 在大鼠妊娠的过程中胎盘组织中 RhoB 蛋白表达水平也无显著变化^[8], 而本实验结果发现在重度子痫前期组患者胎盘 RhoB 蛋白高表达。我们推测 RhoB 很可能也在子痫前期的发病过程中起着重要作用。已有研究发现, 在 Rho 亚家族蛋白中, RhoB 基因序列较 RhoA 和 RhoC 存在不同, RhoB 基因序列较短, 仅有 1 个外显子, 主要来源于生物进化中的反转录行为; 其 mRNA 的半衰期仅为 30 分钟, 提示表达受到高度的调控, RhoB 蛋白只有与 GTP 结合的 RhoB(活化的 RhoB)才能激活下游的信号转导通路, 进而发挥复杂多样的生物学效应^[9]。RhoB 属于即时反应基因, 可被多种基因毒应激因素所诱导, 诸如紫外线、化疗药物等^[10-11], 并能抑制肿瘤细胞增生和诱导细胞凋亡^[12-13]。有研究发现, RhoB 参与细胞凋亡过程, 几乎所有以 DNA 损伤为机制的凋亡过程均依赖于 RhoB 的表达^[14]。RhoB 主要作用是通过调控细胞微丝骨架参与细胞膜泡状结构的形成、膜内化行为, 以及胞内囊泡运输过程结合。Wing-ye Lu^[15]等在发现睾丸组织中 RhoB/ROCK 信号通路通过 LIMK 调控细胞骨架重组与断裂。由此可见, RhoB 及其与下游分子 ROCKI、ROCKII 构成的信号通路, 很可能 sPE 时合体滋养细胞微丝骨架断裂、重组过程中起到关键作用, 进而调控合体滋养细胞凋亡, 合体滋养细胞凋亡增加可能使合体滋养细胞物质交换和分泌功能下降, 从而使胎盘出现缺血、缺氧等病理改变, 进而导致子痫前期临床表现的出现, 但具体的上、下游调节机制有待于通过基因工程等实验手段进一步阐明, 对该问题进行深入研究, 将对进一步阐明 PE 的发病机制、发展新的防治策略具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] 周丽, 乔福元. RhoA 在子痫前期患者胎盘中的表达[J]. 现代妇产科进展, 2006, 15(12): 924-925
Zhou Li, Qiao Fu-yuan. Expression of RhoA in placenta of preeclampsia[J]. Progress in Obstetrics and Gynecology, 2006, 15(12): 924-925
[2] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008:92-99

- LE Jie. Chinese obstetrics and gynecology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008:92-99
[3] Gupta A K. A comparative study of the effect of three different syttroncphoblast micro-particles preparations on endothelial cells [J]. Placenta, 2005:59-66
[4] 李莉. 子痫前期血管内皮细胞损伤机制的研究进展 [J]. 医学综述 2006, 12(18): 1099-1200
Li Li, Hu Ji-fen. Advances about Injury Mechanism of Vascular endothelial Cell in Eclampsia [J] Medical Recapitulate, 2006, 12(18): 1099-1200
[5] Olson MF. Applications for ROCK kinase inhibition [J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(2): 242-248
[6] Shiokawa S, Iwashita M, Akimoto Y, et al. Small guanosine triphosphate RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration[J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 15(12):5808-5816
[7] Han J, Li L, HU J, et al. Epidermal growth factor stimulates human trophoblast cell migration through Rho A and Rho C activation[J]. Endocrinology, 2010, 151(4):1732-1742
[8] 韩新美, 韩健, 杨博萍, 等. 妊娠期大鼠胎盘组织中 Rho/ROCK 蛋白动态变化特点[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9):900-904
Han Xin mei, Han Jian, Yang Bo-ping, et al. Dynamic expression profiles of Rho/ROCK proteins in rat placenta [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2011, 33(9):900-904
[9] Huang M, Prendergast GC. RhoB in cancer suppression [J]. Histol Histopathol, 2006, 21(2):213-218
[10] Zoppi N, Ghinelli A, Gardella R, et al. Effect of dexamethasone on the assembly of the matrix of fibronectin and on its receptors organization in Ehlers-Danlos syndrome skin fibroblasts [J]. Cell Biol Int, 1998, 22 (7-8):499-508
[11] Lee MJ, Ma Y, LaChapelle L, et al. Glucocorticoid enhances transforming growth factor-beta effects on extracellular matrix protein expression in human placental mesenchymal cells [J]. Biol Reprod, 2004, 70 (5):1246-1252
[12] Kappert K, Schmidt G, Doerr G, et al. Angiotensin II and PDGF- BB stimulate beta (1) - integrin- mediated adhesion and spreading in human VSMCs [J]. Hypertension, 2000, 35(1):255-261
[13] Fukuda K, Xie RL, Chiu JF. Bidirectional morphological changes induced by dexamethasone in Morris hepatoma cell lines McA-RH7777 and McA-RH8994: independence of fibronectin and its receptor [J]. Exp Cell Res, 1991, 195(1):207-213
[14] Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis[J]. Nat Rev Cancer, 2001, 11(2):162-168
[15] Wing-ye L, Sertoli G. Cell Adherens Junction Dynamics in the Testis Are Regulated by RhoB GTPase via the ROCK/LIMK Signaling Pathway1[J]. Biology of reproduction, 2003, 68(1):2189-2206