

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.010

TGF- β 1 和 IGF-1 mRNA 在早期胚胎停育绒毛组织中的表达及意义*

栾丽霞 李 怡 赵宏喜 姜 峰 丁迎春 刘成娟 尹国武 Δ

(第四军医大学附属唐都医院妇产科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:通过检测胚胎停育患者绒毛组织中 TGF- β 1 和 IGF-1 mRNA 的表达,探讨其在胚胎停育发病机制中的作用。**方法:**用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测正常人流(20 例),胚胎停育(25 例)绒毛组织中 TGF- β 1 和 IGF-1 基因在转录水平的表达。**结果:**(1)与对照组相比,实验组绒毛组织中 TGF- β 1 mRNA 表达量降低($P < 0.05$), (2)胚胎停育患者绒毛中 IGF-1 mRNA 表达量升高($P < 0.05$)。 (3)绒毛组织中 TGF- β 1 与 IGF-1 的表达呈负相关($r = -0.793, P < 0.05$)。**结论:**TGF- β 1、IGF-1 的表达在基因转录水平发生改变, TGF- β 1 表达的降低可能上调了 IGF-1 的表达,提示两者可能共同参与了胚胎停育的发生。

关键词:胚胎停育;绒毛组织;TGF- β 1;IGF-1;RT-PCR

中图分类号:R714 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)02-240-04

Study on Expression of TGF- β 1 and IGF-1 mRNA in the Chorionic Villi of Early Embryo Growth Arrest*

LUAN Li-xia, LI Yi, ZHAO Hong-xi, JIANG Feng, DING Ying-wu, LIU Cheng-juan, YIN Guo-wu Δ

(Department of Obstetrics and Gynecology, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: Onto investigate the expression of TGF- β 1 and IGF-1 mRNA in the chorionic villi of early embryo growth arrest in order to evaluate the role of early embryo growth arrest. **Methods:** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used in the normal groups (20 cases) and the early embryo growth arrest group (25 cases) to quantitatively determining TGF- β 1 mRNA and IGF-1 mRNA in the chorionic villi tissues. Their quantities were noted by the density of TGF- β 1/ β -actin or IGF-1/ β -actin. **Results:** (1) Compared with that in the normal group, the mRNA expression level of TGF- β 1 of early embryo growth arrest was lower ($P < 0.05$), (2) The levels of IGF-1 was significantly higher ($P < 0.05$). (3) There was a negative correlation between the TGF- β 1 and IGF-1 in chorionic villi tissues($r = -0.793, P < 0.05$). **Conclusion:** The abnormal expression of the TGF- β 1 and IGF-1 was already changed at the level of transcription. TGF- β 1 may increase the expression of IGF-1 in some extent, which indicated that they might be involved in the pathogenesis of early embryo growth arrest.

Key words: Early embryo growth arrest; Chorionic villi tissues; TGF- β 1; IGF-1; RT-PCR

Chinese Library Classification: R714 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)02-240-04

前言

胚胎停育是指妊娠早期胚胎因某种原因所致发育停止。造成胚胎停育的原因除遗传、免疫、感染及染色体等已明确的影响因素外,尚有许多不明原因。其中滋养细胞分化不良,浸润异常是导致早期胚胎停育的原因之一^[1]。本研究拟通过研究转化生长因子(TGF- β 1)与胰岛素样因子-1(IGF-1)在停育绒毛与正常人流患者绒毛之间的差异性表达。进一步探讨胚胎停育的病因。

1 材料与方法

1.1 研究对象

随机选取来我院门诊 2010 年 5 月至 2011 年 1 月在我院妇产科门诊就诊经 B 超证实为胚胎停育而行清宫术患者 25 例为实验组,平均年龄(28.2 ± 3.3)岁,平均停经天数(57.6 ± 6.4)

天。B 超提示孕囊内未见胎芽及胎心搏动。对照组:与实验同期正常早孕要求人流患者 20 例,平均年龄(27.6 ± 3.6)岁,平均停经天数(53.3 ± 8.4)天。B 超提示见胚胎及胎心搏动。以上 2 组患者均月经规律(月经周期 28-32 天),近期(3 个月)未服用甾体类药物,且排除解剖结构、内分泌等方面的异常及生殖道感染病史。无肝炎、结核、性病等传染病史。男方精液未见异常,夫妇染色体核型未见异常,双方均否认遗传病史。两组胚胎经培养后查染色体未见明显异常。两组患者年龄及停经天数均无统计学差异($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与处理 人流手术中所收集绒毛经灭菌用水漂洗后,擦干。立即放入经 DEPC 浸泡、高温消毒过的冻存管中。迅速放入液氮,保存过夜后放入 -80℃ 冰箱保存待用。

1.2.2 主要试剂 RNAiso PLUS Total RNA 提取试剂 (TaKaRa)、RT 试剂盒 (TaKaRa)、PCR 试剂盒 (TaKaRa)、

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30973208;31000660)

作者简介:栾丽霞(1987-),女,硕士,主要研究方向:围产医学,E-mail:luanlixia1987@163.com,电话:13659291927

Δ 通讯作者:尹国武, E-mail:tdgwyinmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-06-30 接受日期:2013-07-26)

marker (DL1000、TaKaRa), RNase-free H₂O 去离子水(天根)。

1.2.3 RT-PCR 反应引物 MEDLINE 基因库检索 TGF- β 1、IGF-1 基因全序列,软件 Primer 5.0 设计其引物,以 β -actin 为

内参照,内参照及目的基因序列见表 1,均由北京奥科生物技术公司合成。

表 1 引物
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 5-3 (Primer sequence)	PCR 产物大小 Product size(bp)
β -actin	F:AGCGAGCATCCCCAAAGTT R:GGGCACGAAGGCTCATCATT	286
TGF- β 1	F:CTACGCCAAGGAGGTCAC R:TTGCTGAGGTATCGCCAG	240
IGF-1	F:AGGAAGTACATTTGAAGAACGCAAGT R:CCTGCGGTGGCATGTCA	103

1.2.4 样品 RNA 的提取 取出 -80℃ 冰箱中保存待测的绒毛组织,剪取 100 mg 左右,放入研钵中,倒入液氮研磨;研磨至粉状,加入 1 mL RNAiso (购自 TAKARA 公司),继续研磨使 RNAiso 与呈粉状的组织充分接触,直至研磨成为液态,将溶液移至 1.5 mL 离心管中,室温静置 5 min;4℃ 离心 5 min,12000 r/min;吸取上清液至新 EP 管中,加入 200 μ L 氯仿,室温静置 5 min,4℃ 离心 15 min,12000 r/min;吸取上清液至新 EP 管中加入等体积异丙醇,摇匀室温静置 10 min,4℃ 离心 10 min,12000 r/min;弃去上清加入 1 mL 无水乙醇,4℃ 离心 5 min,12000 r/min,弃上清,超净台内室温将乙醇挥发完全;加入 30 μ L RNase-freeDH₂O 水溶解。置于紫外分光光度仪上 260-280 测量吸光度值,两者比值在 1.7-2.0 之间者用于逆转录反应。绒毛总 RNA 用 1.5%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法检测所提取 RNA 质量(见图 1)。取 500 ng 总 RNA(TotalRNA)进行实验,剩余 RNA -80℃ 冷冻保存。

1.2.5 反转录体系及反应参数 5 $\times$ PrimerScript buffer 2 μ L, primeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μ L, Oligo dT Primer 0.5 μ L。Random 6 mers 0.5 μ L取 500 ng 总 RNA (Total RNA)。Rnase-free DH₂O 补足到 10 μ L。以上总体积为 10 μ L,反转录合成 cDNA。以上操作均在冰上进行。37℃ 15 min,85℃ 5 sec。产物 4℃ 保存。反应结束后进行 PCR 反应。

1.2.6 PCR 反应体系及参数 选取 50 μ L 体系的 PCR 试剂盒, Premix taq 25 μ L,取模板 cDNA 1 μ L,另取上下游引物各 1 μ L。RNase-free DH₂O 水补足到 50 μ L。反应条件:TGF- β 1 94℃ 3min;94℃ 30 s;55℃ 30 s;72℃ 30 s;72℃ 5 min 共 31 个循环。IGF-1:94℃ 3 min;94℃ 30 s;60℃ 30s;72℃ 30s;72℃ 5 min 共 30 个循环。 β -actin:94℃ 3 min;94℃ 30 s;55℃ 30 s;72℃ 30 s;72℃ 5 min 共 35 个循环。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外下凝胶成像,Image-ProPlus 软件分析灰度。所有实验均用不同批次的标本重复 3 次。RT-PCR 产物量经过 β -actin 校正。

1.3 统计学处理

统计学分析采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析(等密度值/灰度比)。计量资料以表示,两组间差异性比较采用独立样本 t 检验,相关性检验采用 spearman 等级相关法相关系数

用 r 表示。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绒毛组织中总 RNA 质量,正常人流绒毛组与胚胎停育组 RNA 质量图

图 1 显示总 RNA 在 28S、18S、5S 条带完整清晰,提示绒毛总 RNA 完整性较好,可以进行后续试验。

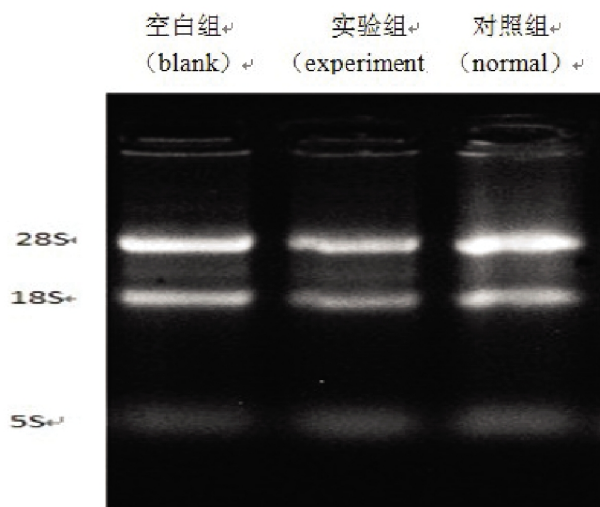


图 1 RNA 电泳图谱

Fig. 1 The quality of RNA

2.2 实验组与对照组绒毛组织中 β -actin、TGF- β 1、IGF-1 的表达

2.3 TGF- β 1、IGF-1 mRNA 在实验组与对照组绒毛组织中的表达水平的比较

实验组绒毛组织 TGF- β 1mRNA 的表达量低于对照组,差异有统计学意义(P < 0.05),实验组绒毛组织 IGF-1mRNA 的表达量高于对照组,差异有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 TGF- β 1 与 IGF-1 表达的关系

对绒毛组织中 TGF- β 1 与 IGF-1 的表达进行相关性分析,表明两者呈负相关(r = -0.793, P < 0.05)。

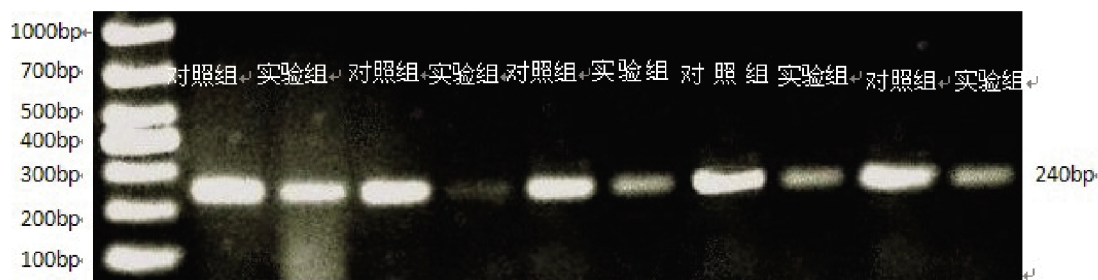


图2 实验组与对照组患者绒毛组织中 TGF-β1 的表达

Fig.2 Expression of TGF-β1 in the chorionic villi tissues between the experiments and the normal group

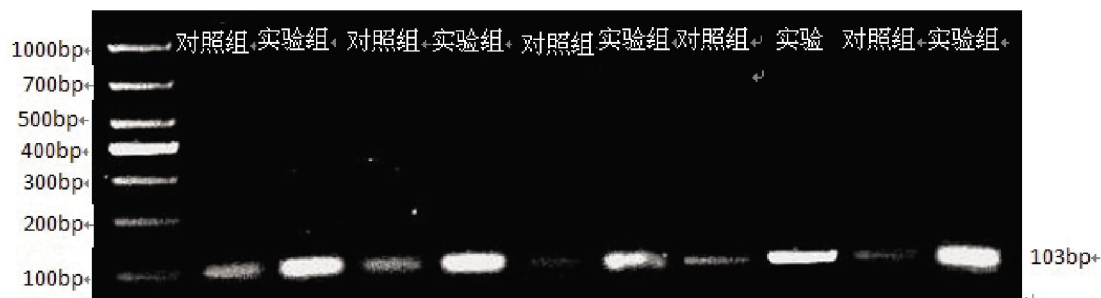


图3 实验组与对照组患者绒毛组织中 IGF-1 的表达

Fig.3 Expression of IGF-1 in the chorionic villi tissues between the experiments and the normal group

表2 两组绒毛组织中 TGF-β1 及 IGF-1mRNA 相对表达量的比较

Table 2 Relative level of TGF-β1 and IGF-1mRNA between the two groups of chorionic villi tissues

组别 Group	n	TGF-β1mRNA	IGF-1mRNA
正常绒毛组 Normal	20	0.68± 0.2	0.92± 0.1
胚胎停育组 Embryonic diapauseuse	25	0.3± 0.2*	1.34± 0.2*
P		0.01	0.04

3 讨论

正常妊娠的维持需要母体与胚胎之间的精细协同作用,其中正常早孕绒毛滋养细胞具有肿瘤细胞的特点。滋养细胞以与肿瘤细胞相似的方式侵入子宫内膜,但与肿瘤细胞不同的是滋养细胞浸润具有时间性和空间性^[2],在时间上限于妊娠早期,空间上限于种植部位的子宫内膜、子宫肌层的浅 1/3。滋养细胞选择性水解子宫内膜基质成分及基底膜,进行胚胎植入及胎盘形成。因此早孕滋养细胞对子宫壁的有限侵入是人类妊娠得以正常进行的关键。

近年来关于 TGF-β1 与病理性妊娠的研究较多^[3-5],其主要由 CD+4^[6]细胞分泌的一种多功能的细胞因子,以自分泌或旁分泌方式对多种组织产生生物学效应^[7],包括调节细胞的增殖、分化;参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的生成等^[8],尤其对于滋养细胞的增殖、分化、免疫功能调节方面具有重要功能^[9]。Selick^[14]等证明在合体滋养细胞和细胞滋养细胞以及绒毛间质细胞有 TGF-β1 的表达。本次试验发现在胚胎停育绒毛组织中 TGF-β1 mRNA 的表达较正常人流绒毛组织中降低。TGF-β1 限制滋养细胞的侵袭机制可能是:(1)TGF-β1 通过诱导金属蛋白酶组织抑制因子 1 (tissue inhibitor of metallo proteinase TIMP-1)产生^[6],加入外源性的重组 TIMP-1 可完全阻断

滋养细胞的侵入行为;(2)Lash 等发现 TGF-β1 可调节滋养细胞对子宫内膜基质的有限性侵袭,增加外源性 TGF-β1 可剂量依赖性降低 MMP-9 的分泌^[6]。因此,正常妊娠中,TGF-β1 可通过抑制 MMP-9 的分泌,来降低滋养细胞的侵袭能力。TGF-β1 的降低可能使滋养细胞侵袭过深,蜕膜细胞外基质成分过度降解,蜕膜组织坏死脱落,进而导致胚胎植入失败。说明 TGF-β1 对于早期胚胎的稳定着床可能有作用。

IGF-1 是由 70 个氨基酸组成的单链多肽^[11-14]。近年来证明不同组织以及细胞在不同的发育阶段均有 IGF-I 的表达,其不仅以内分泌因子存在于血液循环中,而且还通过自分泌及旁分泌的方式在组织局部环境中发挥作用。IGF-1 主要由绒毛小叶合体滋养细胞、细胞滋养细胞及胎膜的平滑绒毛层细胞合成^[15-16]。从妊娠第 6 周开始产生 IGF-1^[17],推测 IGF-1 在细胞滋养层的侵入、分化和胎盘形成过程中通过自分泌或旁分泌机制发挥重要调节作用^[18];本实验结果发现胚胎停育患者绒毛中 IGF-1mRNA 水平高于正常对照组。IGF-1 在胚胎停育发病机制中的机理可能是:IGF-1 通过旁分泌方式刺激滋养细胞侵蚀,IGF-1 的升高使滋养细胞浸润能力增加,滋养细胞侵袭过深使蜕膜细胞外基质成分过度降解,从而导致胚胎植入不良以及胎盘形成障碍。最终导致胚胎停育的发生^[19]。

本次试验结果与文献报道同类研究相一致^[20,21], IGF-1 与

TGF- β 1 可能具有相关性, 两者可能通过某种信号通路共同调节滋养细胞的分化、迁移及侵袭能力。但关于 IGF-1 与 TGF- β 1 在胚胎发育整个病理生理过程中的作用机制, 需要我们进一步进行研究。

参考文献(References)

- [1] Campbell S, Rowe J, Jackson CJ, et al. In vitro migration of cytotrophoblasts through a decidual endothelial cell monolayer: the role of matrix metalloproteinases[J]. Placenta. 2003, 24(4): 306-315
- [2] Bischof P, Meisser A, Campana A. Regulators of Trophoblast Invasion-A Review[J]. Placenta, 2000, 21(14): 55-60
- [3] Jones RL, Soikos C, Findlay JK, et al. TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta [J]. Reproduction, 2006, 132(2): 217-227
- [4] Rahman AN, Snibson KJ, Lee CS, et al. Effects of implantation and early pregnancy on the expression of cytokines and vascular surface molecules in the sheep endometrium [J]. Reprod Immunol, 2004, 64 (1-2): 45-58
- [5] Tranchot DJ, Grasns G, Pamet MF, et al. Modulations of cytokine expression in pregnant women [J]. Am J Reprod Immunol, 1997, 37 (3): 215-226
- [6] Monzon B, Vadillo O. Modulation of trophoblast function by tumor necrosis factor alpha: A role in pregnancy establishment and maintenance?[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(6): 1574-1580
- [7] Makrydimas G, Plachouras N, Higuera MT, et al. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. [J]. Fetal Diagn Ther, 1994, 9(6): 371-378
- [8] Moustakas A, Pardali K, Gaal A, et al. Mechanisms of TGF-b signaling in regulation of cell growth and differentiation [J]. Immunol Lett, 2002, 82(1-2): 85-91
- [9] Selick CE, Horowitz GM, Gratch M, et al. Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in human implantation sites[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 78(3): 592-596
- [10] Karmakar S, Das C. Modulation of ezrin and E-cadherin expression by IL-1beta and TGF-beta1 in human trophoblasts [J]. J Reprod Immunol, 2004, 64(1-2): 9-29
- [11] Lash GE, Otun HA, Innes BA, et al. Inhibition of trophoblast cell invasion by TGFBI, 2, and 3 is associated with a decrease in active proteases[J]. Biol Reprod, 2005, 73(2): 374-381
- [12] Chi MM, Schlein AL, Moley KH. High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor[J]. Endocrinology, 2000, 141(12): 4784-4792
- [13] Lindsay RS, Westgate JA, Beattie J, et al. Inverse changes in fetal insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-1 in association with higher birth weight in maternal diabetes [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2007, 66(3): 322-328
- [14] Qiu Chunfang MD, Vadachkoria, et al. Maternal plasma concentrations of IGF-1, IGFBP-1, and C-peptide in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 193(5): 1691-1697
- [15] Ben Lagha N, Seurin D, Le Bouc Y, et al. Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-1) involvement in intrauterine growth retardation: study on IGFBP-1 overexpressing transgenic mice [J]. Endocrinology, 2006, 147(10): 4730-4737
- [16] Altinkaynak K, Aksoy H H, Bakan E, et al. Serum IGF-1 and IGFBP-3 in healthy pregnancies and patients with preeclampsia [J]. Clin Biochem, 2003, 36(3): 221-223
- [17] Halhali A, Tovar AR, Torres N, et al. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and I, 25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(5): 1828-1833
- [18] Forbes K, Westwood M, Baker PN, et al. Insulin-like growth factor I and II regulate the life cycle of trophoblast in the developing human placenta[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(6): C1313-1322
- [19] Pang ZJ, Xing FQ. Expression of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor in molar and placental tissues [J]. Arch Gynecol Obstet, 2003, 269(1): 1-4
- [20] Lacey H, Haigh T, Westwood M, et al. Mesenchymally-derived insulin-like growth factor 1 provides a paracrine stimulus for trophoblast migration[J]. BMC Dev Biol, 2002, 2: 5
- [21] J Sowers JR. Effects of insulin and IGF-I on vascular smooth muscle glucose and cation metabolism[J]. Diabetes, 1996, 45, 3: S47-51

(上接第 271 页)

- [18] 刘泽良, 凌凯, 李清林. 胆囊切除术致胆管损伤 12 例处理探讨[J]. 肝胆胰外科杂志, 2009, 21(4): 316-318
Liu Ze-liang, Ling Kai, Li Qing-lin. Gallbladder resection 12 cases of bile duct injury during processing to investigate [J]. Journal of Hepatopancreatobiliary Surgery, 2009, 21(4): 316-318
- [19] Connor S, Garden OJ. Bile duct injury in the era of laparoscopic cholecystectomy[J]. Br J Surg, 2006, 93(2): 158-68
- [20] Ajay K. Sahajpal, MD, FRCS; Simon C. Chow, BSc; Elijah Dixon, MD, MSc, FRCS; Bile Duct Injuries Associated With Laparoscopic Cholecystectomy Timing of Repair and Long-term Outcomes[J]. Arch Surg, 2010, 145(8): 757-763
- [21] 吴伟新, 沈卫星, 崔恒官, 等. 腹腔镜胆囊切除术后胆漏的临床分析[J]. 中国临床医学, 2012, 19(1): 38-39
Wu Wei-xin, Shen Wei-xing, Cui Heng-guan, et al. Clinical analysis of laparoscopic cholecystectomy bile leakage [J]. Chinese journal of Clinical Medicine, 2012, 19(1): 38-39
- [22] 潘亚敏, 王田田, 周玉宝, 等. ERCP 在手术肝胆漏中的诊治作用[J]. 中华消化内镜杂志, 2009, 26(12): 629-632
Pan Ya-min, Wang Tian-tian, Zhou Yu-bao, et al. The role of ERCP in the diagnosis and treatment of bile leakage after surgery[J]. Chinese Journal of Digestive Endoscopy, 2009, 26(12): 629-632
- [23] Elmi F, Silverman WB. Nasobiliary tube management of post-cholecystectomy bile leaks[J]. J Clin Gastroenterol, 2005, 39(5): 441-444