

研究报告

妊娠大鼠子宫和胎盘中 TGF- β 1 的表达及 IFN γ 对其表达的影响*刘美玲^{1,2)} 彭景梗^{1)**} 孙泉红^{1,2)} 杨颖¹⁾ 夏红飞^{1,2)}⁽¹⁾中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080;⁽²⁾中国科学院研究生院生物系, 北京 100039)

摘要 采用半定量 RT-PCR、蛋白质印迹和免疫组化等方法, 对大鼠妊娠过程中子宫和胎盘转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的动态表达和表达定位, 及体内注射超生理剂量的 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN γ) 后 TGF- β 1 的表达进行检测, 探讨了妊娠子宫和胎盘中 TGF- β 1 的表达规律、定位及与 IFN γ 的关系. 正常妊娠各个时期大鼠子宫和胎盘中均能检测到 TGF- β 1 mRNA 和蛋白质的表达. 半定量 RT-PCR 结果表明: 妊娠早期 (D1~D9) 子宫 TGF- β 1 mRNA 的表达呈递增趋势, 胚泡植入前 (D4), 子宫 TGF- β 1 mRNA 的表达较低, 胚泡植入早期 (D6) TGF- β 1 mRNA 的表达显著升高, 植入后期 (D9) TGF- β 1 mRNA 的表达达高峰, 妊娠中期 (D15) 和妊娠晚期 (D19) TGF- β 1 mRNA 的表达逐渐降低; 妊娠早 (D9)、中 (D15)、晚期 (D19) 胎盘中 TGF- β 1 mRNA 的表达呈时效递增, D15 胎盘中 TGF- β 1 mRNA 的表达高于 D9 ($P < 0.01$), D19 胎盘中 TGF- β 1 mRNA 的表达高于 D15 ($P < 0.01$). 免疫组化结果显示, 妊娠早期 TGF- β 1 主要在子宫蜕膜中表达, 中晚期主要在滋养层表达. 生殖道肌肉注射超生理剂量的 IFN γ 能下调 TGF- β 1 的表达, 且呈一定的剂量依赖关系. 提示: 在妊娠不同时期子宫和胎盘中 TGF- β 1 的表达呈显著的时空动态变化, IFN γ 对 TGF- β 1 mRNA 的表达有调节作用.

关键词 妊娠大鼠, 胎盘, 子宫, 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1), γ 干扰素 (IFN γ)

学科分类号 Q4

转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β) 是一类多功能的细胞生长增殖调节多肽, 通过细胞表面的受体信号转导途径调控细胞的增殖、分化和凋亡, 在许多组织的发育中发挥重要作用. TGF- β 还参与成熟哺乳动物机体的免疫调节、细胞黏附及细胞外基质的合成和储存, 并与多种肿瘤的发生相关联. 近年的研究发现, TGF- β 1 在正常妊娠胎盘和子宫蜕膜及胎儿中均有表达, 参与包括胚胎着床、滋养层细胞的增殖、分化及浸润, 黏附分子的表达, 母胎免疫等妊娠中多种生物学功能的调节^[1]. 妊娠期敲除 TGF- β 1 基因的小鼠, 50% 的胎鼠死于宫腔内, 其余 50% 出生后死于不能控制的炎症反应^[2], 可见 TGF- β 1 与妊娠的维持和胚胎的正常发育密切相关. 目前对 TGF- β 1 在妊娠期表达的研究大多集中在早期, 而妊娠不同时期 TGF- β 1 的表达和定位未见报道. 妊娠期间母体子宫与胎盘的局部环境中含有多细胞因子, 各种因子相互协调, 共同维持母胎之间免疫微环境的稳定. IFN γ 属 Th1 型细胞因子, 是妊娠必需的因子之一. 研究表明超生理剂量的 IFN γ 具有抗生育作用, 体外实验表明 IFN γ 和 TGF- β 1 在抗

原提呈、MHC II 抗原的表达等免疫方面起相互拮抗的作用^[3]. 但 IFN γ 和 TGF- β 1 在妊娠过程中的相互关系则未见报道. 本实验以大鼠为模型研究了妊娠不同时期 TGF- β 1 的动态表达、表达定位及体内注射超生理剂量的 IFN γ 对 TGF- β 1 表达的影响.

1 材料和方法

1.1 实验动物

体重为 220 g~260 g 的性成熟 Sprague-Dawley 雌性大鼠, 饲养于清洁级动物房, 自由饮水和进食, 每日 12 h 光照, 在发情期前一天晚上与性成熟雄性大鼠 (1:1) 合笼交配, 次日晨 (8:00) 检查有阴栓者定为妊娠第 1 天 (D1), 根据胚胎发育过程的特点 (大鼠一般 5.5 天胚泡植入子宫内膜) 将妊娠分为三个阶段: 妊娠早期 (D1~D9)、妊娠中期

*国家自然科学基金资助项目 (30370165) 和中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KSCX2-SW-201).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62571277, Fax: 010-62529248

E-mail: pengjp@ioz.ac.cn

收稿日期: 2004-11-12, 接受日期: 2004-12-28

(D10~15) 和妊娠晚期 (又称分娩前期, D16~D19), 妊娠早期分为植入前期 (D1~D4)、植入期 (D5~D6)、植入后期 (D7~D9)。

1.2 样品的收集

为检测不同妊娠时期大鼠子宫和胎盘 TGF- β 1 的表达变化, 于妊娠早期 (植入前期、植入期、植入后期)、妊娠中期、妊娠晚期分别选取 D4、D6、D9、D15、D19 孕鼠麻醉后处死, 麻醉方法是肌肉注射氨基甲酸乙酯 (1 g/kg), 剖腹取子宫, 剔净系膜组织, 出现胎盘的时期剥离胎盘, 用灭菌 PBS 冲洗 3 遍, 冻存于 -80℃ 冰箱中备用。

为检测 IFN γ 对子宫和胎盘 TGF- β 1 表达的影响, 各个妊娠时期的孕鼠随机分为 4 组, 采取阴道口肌肉注射的方法, 于各个时期取材前 48 h 4 组分别注射生理盐水 (对照组)、 2.5×10^4 U IFN γ (实验组 I)、 5×10^4 U IFN γ (实验组 II)、 10×10^4 U IFN γ (实验组 III), 注射体积均是 100 μ l。取材时期及方法同上所述。药物处理方法和剂量参照我们实验室近期文献报道^[4]。

1.3 主要试剂

人重组 IFN γ 、组织总 RNA 提取试剂盒 TRIzol reagent (Invitrogen 公司)、RT-PCR 试剂盒 (Promega 公司)、TGF- β 1 和 β -actin 的引物 (上海博亚公司合成)、TGF- β 1 抗体 (Santa Cruz Inc.

sc-146)、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (Vector Laboratories, Inc. ZB-2301)、DAB 显色试剂盒 (Zymed Laboratories, Inc. ZL19032)、 β -actin 抗体 (Santa Cruz Inc. sc-1616)。

1.4 总 RNA 的提取和半定量 RT-PCR

收集各个时期的子宫和胎盘用 TRIzol 一步法提取组织总 RNA, RNA 溶于无核酸酶水中, 取样用紫外分光光度计测 A_{260}/A_{280} 吸收值, 剩余的存放于 -20℃ 冰箱备用。RT-PCR 实验用 Promega 公司 Accesss RT-PCR System Kit, 将反转录和特异片段扩增在一个反应管中进行, 反应管中加入提取的总 RNA 2 μ g 作为模板。TGF- β 1 和 β -actin 的引物序列及扩增长度见表 1, TGF- β 1 的引物及 RT-PCR 的条件参考 Park 等^[5]的设计, TGF- β 1 RT-PCR 的条件为 48℃ 45 min; 94℃ 5 min; 94℃ 50 s, 55℃ 30 s, 72℃ 2 min, 进行 30 个循环; 72℃ 10 min. β -actin 的扩增条件和 TGF- β 1 相同。为确保扩增的特异性, 各组均设 3 种对照, 分别是用无核酸酶水代替 RNA 样品、不加逆转录酶、不经逆转录进行直接 PCR, 其他条件不变。产物在 2.0% 琼脂糖凝胶 (含终浓度 0.5 mg/L 溴化乙锭) 上电泳, 电泳图谱用 Quantity One 软件 (Bio-Rad Inc.) 进行分析, 测条带的 A 值, 所得值经内参照 β -actin 校正, 对校正值进行统计学分析。

Table 1 Primers and expanding product size of RT-PCR

	Primers	Sequence	Product size/bp
TGF- β 1	Up-primer	GAGAGCCCTGGATACCAACTACTG	173
	Down-primer	GTGTGTCCAGGCTCCAAATGTAG	
β -actin	Up-primer	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA	548
	Down-primer	CTCCTTATTGTACGCACGATTTC	

1.5 子宫和胎盘组织切片的制备

分别取 D4、D9、D15、D19 的孕鼠, 肌肉注射氨基甲酸乙酯 (1 g/kg) 进行麻醉, 开胸灌流, 先快速灌注生理盐水 200 ml 左右, 再缓慢灌注 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L PBS, pH 7.4) 200 ml, 大鼠出现四肢抽搐, 身体僵硬后剥腹取出子宫 (含胎儿和胎盘), 剔除系膜, 移入 4% 多聚甲醛中固定 6 h, 再放入 20% 蔗糖中脱水至下沉。取组织做连续横切片 (Leica 冰冻切片仪), 片厚 10 μ m, 存放于 -80℃ 冰箱中备用。

1.6 TGF- β 1 的免疫组化染色

采用 DAB 法进行免疫组化检测, 子宫切片常

规固定, 漂洗, 0.3% H_2O_2 室温 30 min, 2 mol/L 盐酸 37℃ 40 min, 5% 奶粉室温封闭 40 min, 用 10% 羊血清 37℃ 室温封闭 20 min, TGF- β 1 抗体 (1:200) 37℃ 孵育 2 h, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (1:1 000) 37℃ 孵育 1 h, DAB 显色 (A、B、C 3 种液体各一滴加入 1 ml PBS 中) 6 min, 苏木精染核 40 s, 以上各步骤间均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次。显色后常规脱水、透明、封片。光镜下观察, 棕色着色处为阳性。对照组用未免疫的兔血清代替一抗, 其他步骤相同。

1.7 子宫和胎盘组织蛋白的提取和定量测定

将按上述方法 1.2 收集的样品, 称取 100 mg

置于蛋白质裂解液中 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton-X100, 0.5% PMSF) 低温匀浆, 1 400 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 Lowry 法测定蛋白质含量, 并分装置于 -20℃ 保存, 用于蛋白质印迹检测.

1.8 蛋白质印迹检测 TGF-β1 的表达

将提取的组织蛋白 (100 μg) 加 2×SDS 上样缓冲液 (总体积 20 μl), 100℃ 变性 5 min, 上样于 15% 的聚丙烯酰胺凝胶 (Bio-Rad 公司) 电泳 2 h, 用电转膜仪 (Bio-Rad 公司) 转移到硝酸纤维素膜上, 约 90 min, 5% 的脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 兔抗鼠 TGF-β1 抗体 (1:200) 37℃ 孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次×10 min, 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (1:10 000) 37℃ 孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次×10 min, 膜上加 ECL (PIERCE 公司) 荧光显影剂, 在暗室内压片、洗片. 用抗体洗脱液 50℃ 洗膜 30 min, 同样的方法

显示 β-actin 条带, 作为加样的内参照, β-actin 抗体 (1:500); 辣根酶标记兔抗鼠 IgG (1:10 000).

1.9 数据统计方法

各组数据均采用 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 统计分析前, 用 Kolmogorov-Smirnov 对所有的数据做正态分布检验. 经检验, 原始数据符合正态分布, 无须转换即可进行统计分析, 数据间的差异比较采用 Student's *t* 检验, 显著性差异以 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 为标准. 以上数据分析均采用 SPSS 软件完成.

2 结 果

2.1 正常妊娠大鼠不同时期子宫和胎盘组织中 TGF-β1 mRNA 的表达

正常妊娠各个时期大鼠子宫和胎盘中均能检测到 TGF-β1 mRNA 的表达, 且不同时期表达量不同. 胚胎植入前 (D4), TGF-β1 mRNA 的表达较低,

Table 2 Determination of TGF-β1 mRNA expression in uterus and placenta in difference stage of gestation

	Early gestation			Midgestation	Late gestation
	D4	D6	D9	D15	D 19
Uterus	1.57±0.023	2.05±0.024	2.14±0.027	1.87±0.031	1.31±0.025
Placenta			1.06±0.008	1.48±0.016	1.82±0.001

n=3.

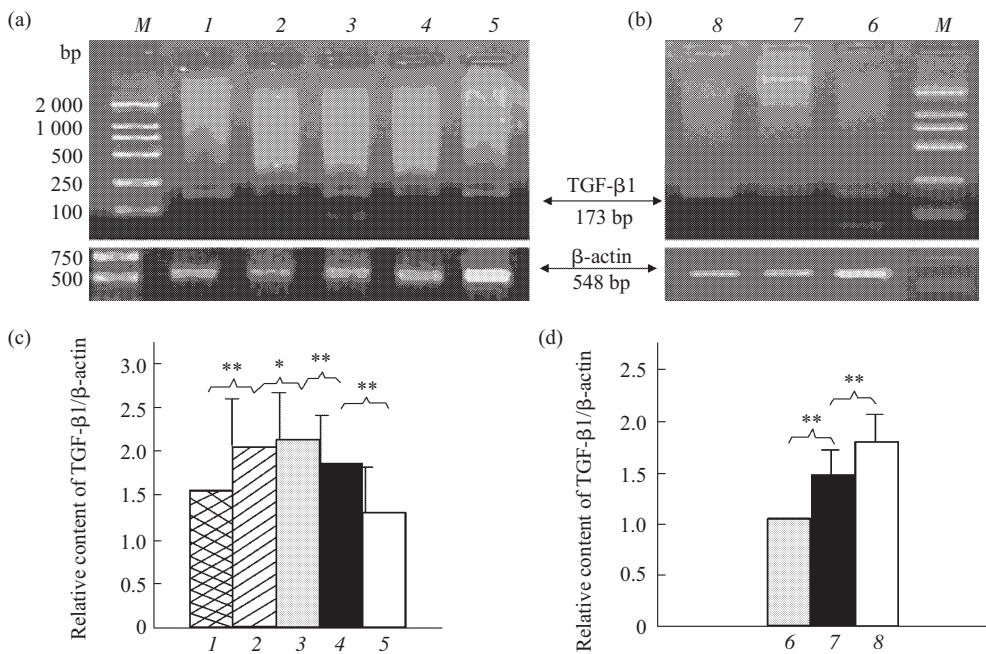


Fig.1 Detection of TGF-β1 mRNA at uterus and placenta in different stages of gestation

(a), (b) the PCR products of TGF-β1 cDNA at uterus and placenta in different stages of gestation. (c), (d) statistical analysis of optical density value. (a) and (b) show TGF-β1 expression at uterus and placenta in different stages of gestation respectively. M: 2 kb DNA ladder marker; 1, 2, 3, 4 and 5 indicate uterus TGF-β1 mRNA expression in D4, D6, D9, D15 and D19 respectively. 6, 7 and 8 indicate placenta TGF-β1 mRNA expression in D9, D15 and D19 respectively. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

胚胎刚植入 (D6) 时其表达显著升高, 且在植入后期 (D9) 的表达达到高峰, 妊娠中期 (D15) 和妊娠晚期 (D19) 其表达量逐渐降低. 密度灰度扫描分析 RT-PCR 的结果显示, D6 子宫 TGF- β 1 mRNA 的表达显著低于 D9 ($P<0.05$), 但高于 D4、D15 和 D19 且均呈十分显著性差异 ($P<0.01$), 在整个妊娠期间妊娠晚期 (D19) 的表达量最低 (表 2, 图 1a 和 c).

在妊娠过程中, 胎盘 TGF- β 1 mRNA 的表达随妊娠的进行而逐渐上升, D15 胎盘中 TGF- β 1 mRNA 的表达显著高于 D9 ($P<0.01$)、低于 D19

($P<0.01$) (表 2, 图 1b 和 d).

2.2 正常妊娠大鼠不同时期子宫和胎盘组织中 TGF- β 1 蛋白表达的免疫组化检测

在植入前期 (D4) 子宫蜕膜检测到 TGF- β 1 蛋白的表达, 免疫阳性反应主要分布在子宫蜕膜腺体周围子宫蜕膜细胞, 植入后期 (D9) TGF- β 1 表达主要在子宫蜕膜基质细胞. 在妊娠中期 (D15), 主要着色细胞在胎盘迷宫层 (labyrinth zone), 妊娠晚期 (D19) 主要着色细胞在胎盘迷宫层和连接带 (junctional zone) (图 2).

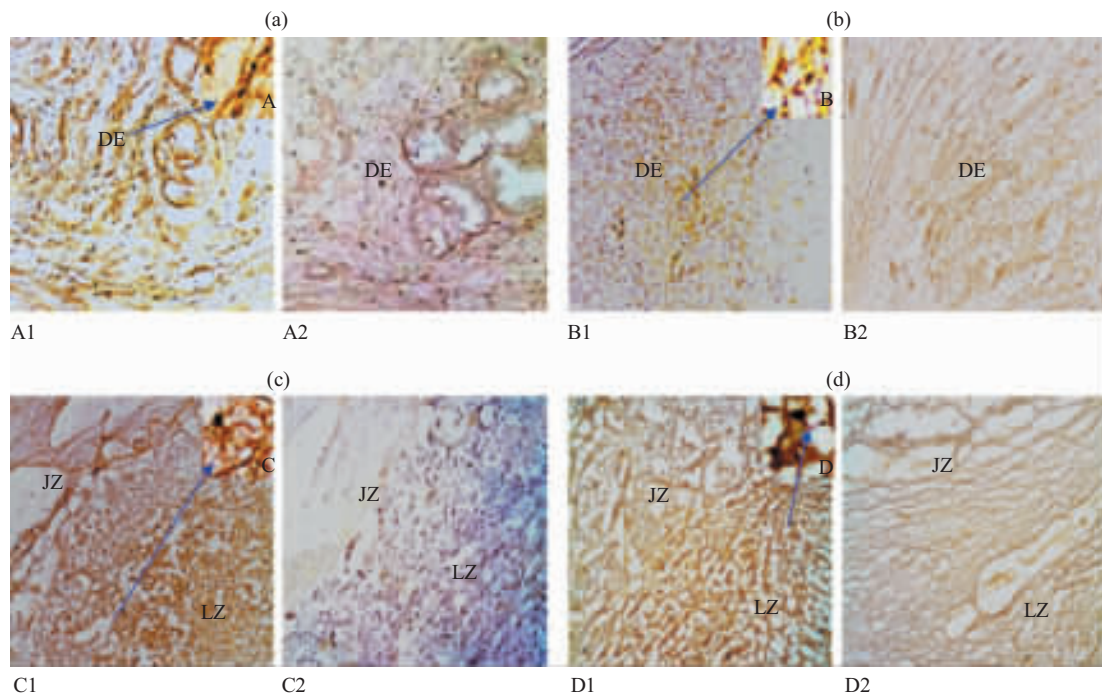


Fig.2 Immunohistochemistry analysis of TGF- β 1 protein in decidual and placental section in different stages of gestation

(a) and (b) show decidual section of D4 and D9 respectively. (c) and (d) show placental section of D15 and D19 respectively. A1, B1, C1 and D1 indicate sections ($\times 100$) of different stages stained with anti TGF- β 1 antibody. A2, B2, C2, and D2 indicate control. Blue arrow show stained location of TGF- β 1 protein. A, B, C and D show magnification of stained location ($\times 400$). DE: decidual; JZ: junctional zone; LZ: labyrinth zone.

2.3 正常妊娠大鼠不同时期子宫和胎盘组织中 TGF- β 1 表达的蛋白质印迹检测

蛋白质印迹检测妊娠大鼠不同时期子宫和胎盘组织中 TGF- β 1 蛋白的表达, 结果表明: D4、D6、D9、D15、和 D19 子宫样品的泳道及 D9、D15、和 D19 胎盘样品的泳道, 在分子质量 25 ku 处均有一特异性条带 (图 3), 表明在正常妊娠大鼠各个时期子宫和胎盘组织中 TGF- β 1 蛋白都有表达.

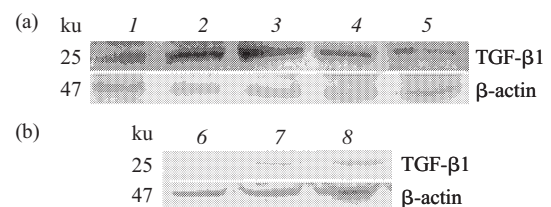


Fig.3 Western blot analysis of TGF- β 1 protein in decidual and placental section in different stages of gestation

(a) and (b) indicate TGF- β 1 protein expression at uterus and placenta in different stages of gestation respectively. 1, 2, 3, 4 and 5 indicate uterus TGF- β protein expression in D4, D6, D9, D15 and D19 respectively. 6, 7 and 8 indicate placenta TGF- β 1 protein expression in D9, D15 and D19 respectively.

2.4 IFN γ 对大鼠妊娠过程中子宫 TGF- β 1 mRNA 表达的影响

不同剂量 IFN γ 处理后，妊娠大鼠早、中、晚各个时期 (D4、D6、D9、D15、D19) 子宫 TGF- β 1 mRNA 的表达均降低，各处理组与相应的对照组比较均呈显著性差异。统计结果表明，D6 的 2.5×10^4 U 处理组与对照组比较差异显著

($P<0.05$)，其余各处理组与相应的对照组比较差异均十分显著($P<0.01$)。且 IFN γ 处理后子宫 TGF- β 1 mRNA 表达降低与所用 IFN γ 呈一定的剂量依赖关系，剂量越大表达量降低越明显(表 3，图 4a)，但不同时期对剂量的依赖程度不同，植入前期 (D4) 和植入后期 (D9) 2.5×10^4 U 处理组与 5×10^4 U 比较呈显著性差异($P<0.01$)， 5×10^4 U 和 10×10^4 U 处理

Table 3 The effect of IFN γ on the expression of TGF- β 1 in uterus

		Control	Treated with 2.5 $\times 10^4$ U IFN γ	Treated with 5.0 $\times 10^4$ U IFN γ	Treated with 10 $\times 10^4$ U IFN γ
Uterus ($\bar{x}\pm s$)	D4	0.79 $\pm$ 0.003**	0.75 $\pm$ 0.002**	0.69 $\pm$ 0.001**	0.68 $\pm$ 0.021**
	D6	0.82 $\pm$ 0.017*	0.80 $\pm$ 0.001**	0.72 $\pm$ 0.006**	0.59 $\pm$ 0.011**
	D9	1.32 $\pm$ 0.034**	1.01 $\pm$ 0.087**	0.78 $\pm$ 0.002**	0.77 $\pm$ 0.019**
	D15	1.00 $\pm$ 0.001**	0.88 $\pm$ 0.001**	0.84 $\pm$ 0.006**	0.71 $\pm$ 0.002**
	D19	0.82 $\pm$ 0.006**	0.70 $\pm$ 0.017**	0.67 $\pm$ 0.013**	0.65 $\pm$ 0.007**

n=3. * $P<0.05$ compared with control. ** $P<0.01$ compared with control.

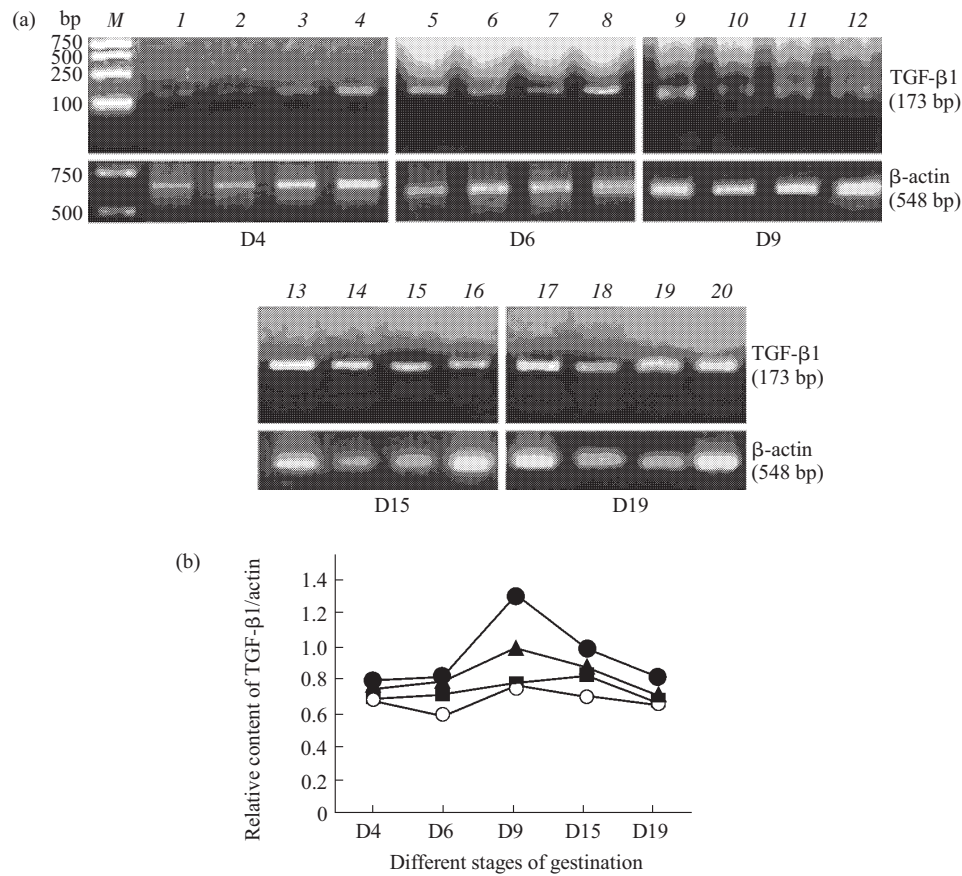


Fig.4 The effect of IFN γ on TGF- β 1 expression at rat uterus in different stages of gestation

(a)the PCR products of TGF- β 1cDNA at uterus in different stages of gestation, after different dose IFN γ treatment. (b)statistical analysis of optical density value. M: 2 kb DNA ladder marker. 1, 5, 9, 13, 17 indicate uterus TGF- β 1 mRNA expression in D4, D6, D9, D15 and D19 after injecting 0.9% saline respectively. 2, 6, 10, 14 and 18 indicate uterus TGF- β 1 mRNA expression in D4, D6, D9, D15 and D19 after injecting 2.5×10^4 U IFN γ respectively. 3, 7, 11, 15 and 19 indicate uterus TGF- β 1 mRNA expression in D4, D6, D9, D15 and D19 after injecting 5×10^4 U IFN γ respectively. 4, 8, 12, 16 and 20 indicate uterus TGF- β 1 mRNA expression in D4, D6, D9, D15 and D19 after injecting 10×10^4 U IFN γ respectively. ●—●: control; ▲—▲: 2.5×10^4 U IFN γ ; ■—■: 5×10^4 U IFN γ ; ○—○: 10×10^4 U IFN γ .

组比较无显著性差异($P>0.05$); 胚胎刚植入(D6)时和妊娠中期(D15)其剂量依赖关系十分明显, 3组 $\text{IFN}\gamma$ 处理组之间比较都呈显著性差异($P<0.01$); 妊娠晚期(D19) 2.5×10^4 U处理组与 5×10^4 U处理组呈显著性差异($P<0.05$), 而 5×10^4 U组和 10×10^4 U组比较无显著性差异($P>0.05$)(表3, 图4b)。

2.5 $\text{IFN}\gamma$ 对大鼠妊娠过程中胎盘 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达的影响

妊娠早(D9)、中(D15)、晚(D19)期的胎盘 3 种

不同剂量 $\text{IFN}\gamma$ 处理组 TGF- $\beta 1$ mRNA 的表达均降低, 与对照组比较差异均十分显著($P<0.01$)(表4, 图5a); 所不同的是妊娠早期(D9) 2.5×10^4 U处理组和 5×10^4 U处理组比较无显著性差异($P>0.05$), 5×10^4 U处理组和 10×10^4 U处理组之间呈显著性差异($P<0.01$); 而妊娠中期(D15)和晚期 2.5×10^4 U处理组与 5×10^4 U处理组比较呈显著性差异($P<0.01$), 5×10^4 U和 10×10^4 U处理组比较也有显著性差异($P<0.05$)(表4, 图5b)。

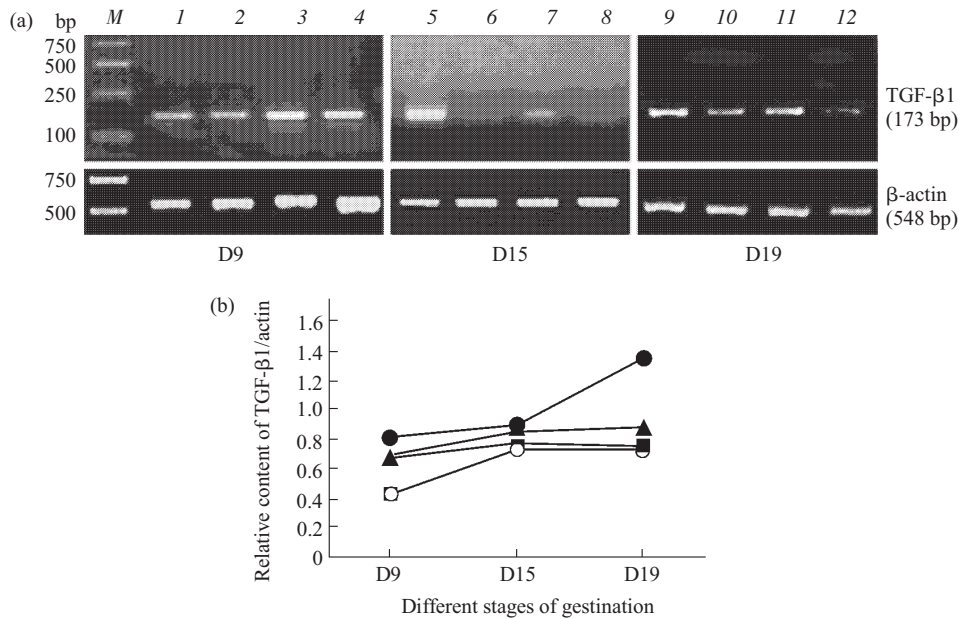


Fig.5 The effect of $\text{IFN}\gamma$ on TGF- $\beta 1$ expression at rat placenta in different stages of gestation

(a) the PCR products of TGF- $\beta 1$ cDNA at placenta in different stages of gestation, after different dose $\text{IFN}\gamma$ treatment. (b) statistical analysis of optical density value. M: 2 kb DNA ladder marker. 1, 5, 9, indicate placenta TGF- $\beta 1$ mRNA expression in D9, D15 and D19 after injecting 0.9% saline respectively. 2, 6, 10 indicate placenta TGF- $\beta 1$ mRNA expression in D9, D15 and D19 after injecting 2.5×10^4 U $\text{IFN}\gamma$ respectively. 3, 7, 11 indicate placenta TGF- $\beta 1$ mRNA expression in D9, D15 and D19 after injecting 5×10^4 U $\text{IFN}\gamma$ respectively. 4, 8, 12 indicate placenta TGF- $\beta 1$ mRNA expression in D9, D15 and D19 after injecting 10×10^4 U $\text{IFN}\gamma$ respectively. ●—●: control; ▲—▲: 2.5×10^4 U $\text{IFN}\gamma$; ■—■: 5×10^4 U $\text{IFN}\gamma$; ○—○: 10×10^4 U $\text{IFN}\gamma$.

Table 4 The effect of $\text{IFN}\gamma$ on the expression of TGF- $\beta 1$ in placenta

		Control	Treated with 2.5×10^4 U $\text{IFN}\gamma$	Treated with 5.0×10^4 U $\text{IFN}\gamma$	Treated with 10×10^4 U $\text{IFN}\gamma$
Placenta ($\bar{x}\pm s$)	D9	$0.89\pm 0.001^{**}$	$0.70\pm 0.035^{**}$	$0.67\pm 0.006^{**}$	$0.43\pm 0.014^{**}$
	D15	$0.90\pm 0.001^{**}$	$0.85\pm 0.001^{**}$	$0.77\pm 0.014^{**}$	$0.74\pm 0.017^{**}$
	D19	$1.36\pm 0.011^{**}$	$0.89\pm 0.017^{**}$	$0.76\pm 0.008^{**}$	$0.74\pm 0.005^{**}$

$n=3$. * $P<0.05$ compared with control. ** $P<0.01$ compared with control.

3 讨 论

3.1 TGF- $\beta 1$ 在不同妊娠时期大鼠子宫和胎盘组织中表达变化和定位

近年来 TGF- $\beta 1$ 在妊娠中的作用受到越来越多

的重视, 包括妊娠期子宫内的免疫调节、滋养层细胞的浸润及分化、胚胎的发育等. 早在 1992 年, Shull 等^[7]用小鼠的胚胎干细胞通过同源重组的方法获得 TGF- $\beta 1$ 基因减除的小鼠模型, 发现小鼠出生后 20 天左右出现多器官组织的严重炎症反应和组

织坏死, 最终因多器官衰竭而致死. Kulkarni 等^[8]用小鼠的胚胎干细胞通过同源重组的方法获得 TGF- β 1 基因突变, 不能表达 TGF- β 1 的小鼠模型, 实验结果发现有三分之一的小鼠能发育到出生, 但出生 2 周后出现衰竭综合症, 病理检查发现有大量淋巴细胞和巨噬细胞的渗出, 主要在肺和心脏, 许多方面与自身免疫性疾病、移植物抗宿主疾病、及病毒感染有相似表现. 说明 TGF- β 1 在免疫调节方面有重要作用. 文献报道, 自胚胎植入以前子宫内膜上皮就有 TGF- β 1 的表达^[9]. 体外实验发现, TGF- β 1 促进滋养层细胞癌胚纤粘连蛋白的合成, 增强滋养层细胞黏附于细胞外基质的能力, 能抑制滋养层细胞的浸润, 可能与降低基质金属蛋白酶和纤维蛋白溶酶的合成有关, 而这两者是子宫内膜重塑的必需因子. 此外, TGF- β 1 还能上调 TIMP-1 的表达, 下调 uPA 的表达, 促进 LIF 的表达, 促进滋养层的生长, 增强滋养层细胞的合体化^[10]. 本实验结果显示, TGF- β 1 自胚胎着床前既有表达, 至着床后达高峰, 然后妊娠中期开始下降至分娩前期达最低值, 而胎盘则自早期到晚期表达量不断升高. 说明 TGF- β 1 在子宫和胎盘中可能起着不同的作用, TGF- β 1 在妊娠早期子宫表达量较高可能主要起调节母胎免疫、促进胚胎着床的作用, TGF β 1 是免疫抑制因子, 在移植免疫中的研究较多, 它能活化抑制 T 性淋巴细胞和抑制 MHC II 类抗原的表达^[11,12], TGF- β 1 的高表达可能有利于子宫处于一相对免疫耐受的环境中, 有利于子宫接受胚胎, TGF- β 1 促进 LIF 的表达, 通过调节 ECM 的合成和重塑来调节滋养层的黏附和浸润. 而其在妊娠中期和晚期表达量降低, 有利于控制滋养层细胞的浸润, 滋养层细胞浸润过浅或过深都会引起滋养层疾病, 而不利妊娠的进行. TGF- β 1 在胎盘中的表达随妊娠的进行而增加, 妊娠中晚期表达主要定位在胎盘绒毛膜, 可能主要参与滋养层细胞的增殖和分化, 有文献报道 TGF- β 1 促进妊娠早期胎盘内血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达, 而参与胎盘内血管的形成^[13]. 关于 TGF- β 1 在妊娠期子宫和胎盘中的作用和作用机制还有许多未知和不明晰的方面, 需要进一步的研究.

3.2 IFN- γ 对不同妊娠时期大鼠子宫和胎盘组织中 TGF- β 1 mRNA 表达的影响

IFN- γ 是妊娠必需的因子之一, 在妊娠期子宫中主要由自然杀伤细胞(NK cell)分泌, 对保持蜕膜细胞的完整性, 蜕膜血管的重建及“着床窗口”

的打开等方面发挥作用^[14], 但妊娠期子宫蜕膜 IFN- γ 的过高表达对妊娠的维持是不利的. 有许多文献报道, 外源性注射超生理剂量的 IFN- γ 能造成小鼠流产和兔的胚泡着床率降低, 说明 IFN γ 有抗生育作用^[15,16]. 本实验组研究过 IFN- γ 的抗生育机理, 结果发现 IFN- γ 能抑制孕酮的分泌, 诱导胎盘细胞的凋亡, 还能诱导胎盘 MHC II 类抗原的表达^[4,17]. TGF- β 1 和 IFN- γ 都是妊娠期子宫内免疫微环境中细胞因子网络的成员, 从免疫反应上说, 二者起拮抗的作用, TGF- β 1 抑制免疫应答, 而 IFN- γ 促进免疫应答. 在胎盘方面来看, TGF- β 1 促进胎盘滋养层的生长及细胞滋养层细胞的合体化, 而 IFN- γ 诱导胎盘细胞的凋亡. 体外实验发现 IFN γ 能抑制上皮类细胞 TGF- β 1 的表达^[18]. 本实验的结果发现体内注射超生理剂量的 IFN γ 48 h 后, 对妊娠各个时期子宫和胎盘 TGF- β 1 的表达都有降低的作用, 且呈一定的剂量依赖关系. 推测在细胞因子网络中二者有相互拮抗、制约的作用, 与其他细胞因子共同维持妊娠的正常发展. IFN- γ 和 TGF- β 1 在妊娠期间的相互作用及作用机理尚有待进一步的研究阐明.

参 考 文 献

- 1 Ingman W V, Sarah A. Robertson defining the actions of transforming growth factor beta in reproduction. *Bioessays*, 2002, **24** (10): 901~914
- 2 Clark D A, Coker R. Molecules in focus transforming growth factor-beta (TGF- β). *Int J Biol*, 1998, **30**(3): 293~298
- 3 Delvig A A, Lee J J, Chrzanowska-Lightowler Z M, *et al.* TGF-beta1 and IFN-gamma cross-regulate antigen presentation to CD4 T cells by macrophages. *J Leukoc Biol*, 2002, **72**(1):163~166
- 4 刘 喆, 杨 颖, 彭景枫. 人重组 γ -干扰素对兔妊娠的影响. *动物学报*, 2002, **48** (2): 277~280
Liu Z, Yang Y, Peng J P. *Acta Zool Sin*, 2002, **48**(2): 277~280
- 5 Park D Y, Hwang S Y, Suh K S. Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta type II receptor in preneoplastic lesions during chemical hepatocarcinogenesis of rats. *Toxicol Pathol*, 2001, **29** (5): 541~549
- 6 Rupasri Ain, Canham L N, Soares M J, *et al.* Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Developmental Biology*, 2003, **260**: 176~190
- 7 Shull M M, Ormsby I, Kier A B, *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal IFNlammatory disease. *Nature*, 1992, **359** (6397): 693~699
- 8 Kulkarni A B, Huh C G, Becker D, *et al.* Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive IFNlammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (2): 770~774
- 9 Simpson H, Robson S C, Bulmer J N, *et al.* Transforming growth

- factor beta expression in human placenta and placental bed during early pregnancy. *Placenta*, 2002, **23** (1): 44~58
- 10 Karmakar S, Das C. Regulation of trophoblast invasion by IL-1beta and TGF-beta1. *Am J Reprod Immunol*, 2002, **48** (4): 210~219
 - 11 Banu N, Mozes M M, Kopp J B, *et al.* Regulation of inducible class II MHC, costimulatory molecules, and cytokine expression in TGF-beta1 knockout renal epithelial cells: effect of exogenous TGF-beta1. *Exp Nephrol*, 2002, **10** (5~6): 320~331
 - 12 Pazmany T, Kosa J P, Thomas B. Effect of transforming growth factor-b on microglial MHC-class II expression. *J Neuroimmunology*, 2000, **103** (2): 122~130
 - 13 Chung I B, Yelian F D, Zaher Fm, *et al.* Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta*, 2000, **21** (4): 320~324
 - 14 Ashkar A A, Croy B A. Interferon-g contributes to the normalcy of murine pregnancy biology of reproduction. *BioReprod*, 1999, **61**: 493~502
 - 15 Haddad E K, Duclos A J, Antecka E, *et al.* Role of interferon-gamma in the priming of decidual macrophages for nitric oxide production and early pregnancy loss. *Cell Immunol*, 1997, **181** (1): 68~75
 - 16 曹咏清, 孙德明, 陈幼珍, 等. 人重组 γ -干扰素抗生育效应及机理研究. *生殖医学杂志*, 1999, **8** (2): 98~102
 - 17 Liu Z, Chen Y, Peng J P. The effect on MHC class II expression and apoptosis in placenta by IFN γ administration. *Contraception*, 2002, **65**(2): 177~184
 - 18 Wen F Q, Liu X, Kobayashi T, *et al.* Interferon-gamma inhibits transforming growth factor-beta production in human airway epithelial cells by targeting. *Smads Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, **30** (6): 816~822

The Expression of TGF- β 1 in Uterus and Placenta of Pregnant Rat and Its Regulation by IFN γ *

LIU Mei-Ling²⁾, PENG Jing-Pian^{1)**}, SUN Quan-Hong²⁾, YANG Ying¹⁾, XIA Hong-Fei²⁾

⁽¹⁾State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

⁽²⁾Department of Biology, Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract To investigate the expression change and location of transforming growth factor-beta1(TGF- β 1) at uterus and placenta in the course of pregnancy and the effects of interferon gamma (IFN γ) on its expression, the expression of TGF- β 1 was examined in uterus and placenta in different stages of gestation by methods of RT-PCR, Western blot, and immunohistochemistry respectively. And RT-PCR was used to analyze the expression of TGF- β 1 mRNA after injecting different dose of IFN γ . Experimental results indicated that the expression of TGF- β 1 mRNA and TGF- β 1 protein were detected in uterus and placenta in every stage of gestation. The analysis of semie-quantitative RT-PCR that showed the expression of TGF- β 1 mRNA was increasing gradually at uterus during the early stage of gestation (D1~D9). The expression of TGF- β 1 in pre-implantation (D4) period was lower than that in implantation (D6) period and post-implantation (D9) period. The expression in post-implantation (D9) period is highest at uterus during gestation. With the process of gestation, the expression of TGF- β 1 decreased significantly at uterus during mid-stage (D15) and late stage (D19) of gestation. The expression of TGF- β 1 at placenta kept increasing in the course of pregnancy. The expression of TGF- β 1 at mid-stage placenta (D15) was significantly higher ($P<0.01$) compared with that at early stage placenta (D9) and the expression of TGF- β 1 at late-stage placenta D19) was significantly higher ($P<0.01$) compared with that at mid-stage placenta (D15). The analysis of immunohistochemistry indicated TGF- β 1 mostly expressed at decidua during early stage of gestation and at trophoblast during mid-stage and late stage of gestation. After injecting exceeding normal concentration IFN γ by vaginal muscular, the expression of TGF- β 1 was downregulated at uterus and placenta of pregnant rat. The results suggested that the expression of TGF- β 1 was dynamic and spatio-temporal characteristics in uterus and placenta during gestation. IFN γ affected the expression of TGF- β 1 at uterus and placenta in the course of pregnancy.

Key words pregnant rat, placenta, uterus, TGF- β 1, IFN γ

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30370165) and The Key Innovation Research Programs of The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-201).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62571277, Fax: 86-10-62529248, E-mail: pengjp@ioz.ac.cn

Received: November 12, 2004 Accepted: December 28, 2004