论著

文章编号:1000-5404(2005)05-0448-03

Leptin mRNA 在早孕绒毛滋养细胞中的表达

蒋立艳,李 真,成 娅,陈波洁,钟序素,林桂兰,杨桂芬 (第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

提 要:目的 测定早孕绒毛滋养细胞中 leptin mRNA 表达,探讨 leptin 在胎盘形成过程中的可能作用。**方法** 取妊娠6~8周绒毛80份,分离、培养细胞滋养细胞并经光电镜、免疫细胞化学鉴定;提取细胞总 RNA,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术测定滋养细胞 leptin mRNA 表达。**结果** ①经光电镜、免疫细胞化学染色鉴定,细胞角蛋白-7(CK-7)染色强阳性,β-hCG染色个别细胞弱阳性,vimentin 染色阴性,表明分离培养的细胞为滋养细胞。②滋养细胞表达 leptin mRNA 在 235 bp 处有区带。**结论** 培养的早孕绒毛滋养细胞表达 leptin mRNA,leptin 可能在胚胎着床、滋养细胞浸润过程中起调控作用。

关键词: leptin;滋养细胞;着床

中图法分类号: R321.4; R329.24; R714.1 **文献标识码:** A

Expression of leptin mRNA in cultured human villous trophoblasts at early pregnancy

JIANG Li-yan, LI Zhen, CHENG Ya, CHEN Bo-jie, ZHONG Xu-su, LIN Gui-lan, YANG Gui-fen (Department Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the probable action of leptin in placenta by determinating the expression of leprin mRNA in trophoblasts. **Methods** Cytotrophoblasts were isolated from 80 cases of the chorionic villi at 6 – 8-week pregnancy, cultured *in vitro*, and observed by light and electron microscope and immunocytochemistry. Total RNA of trophoblasts was extracted. The expression of leptin mRNA in trophoblasts was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Strongly positive staining of cytokeratin-7, weakly positive staining of β-hCG in some cells, and negative staining of vimentin were observed under light and electron microscope and immunocytochemistry, suggesting they were trophoblasts. Leptin mRNA was 235 bp. **Conclusion** Trophoblasts from early pregnancy can express leptin mRNA which may regulate cytotrophoblast invasion in the process of embryo implantation.

Key words: leptin; trophoblast; implantation

瘦素(leptin)是肥胖基因的产物,主要由白色脂肪细胞分泌,其它来源有胎盘、胃肠等组织。作为I型细胞因子参与体内能量平衡、代谢等多种功能[1,2]。近来国外研究显示它还参与胚胎着床、滋养细胞的浸润等过程[3]。本实验从人早孕绒毛中消化、分离出细胞滋养细胞体外培养,用 RT-PCR 方法检测细胞滋养细胞中 leptin mRNA 的表达,分析滋养细胞是否分泌 leptin,为进一步研究 leptin 在胚胎着床中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

第三军医大学新桥医院、西南医院、重庆市妇产科医院门诊自愿实施人工流产的6~8周妊娠妇女,孕龄经 B 超及停经天数估算,共80例。

作者简介:蒋立艳(1966-),女,四川省成都市人,硕士,主治医师,主要从事生殖医学方面的研究,发表论文6篇。电话:(020)85224175

通讯作者:李 真,电话:(023)68755026,E-mail:dengli@public.cta.cq.cn

收稿日期:2003-07-08;修回日期:2004-01-12

1.2 方法

1.2.1 人早孕绒毛细胞滋养细胞的分离培养 参照文献[4]。每次取人工流产6~8周妊娠绒毛10份,机械法分离,酶消化,经 Ficoll 分离介质离心得到单个核细胞,重悬在 DMEM/F-12 + 10%胎牛血清中(细胞密度 4×10^6 cell/孔),接种入6孔细胞培养板中,放入37 ℃,5% CO_2 ~95%空气饱和湿度培养箱中孵育。孵育48 h弃上清,换液再孵育24 h。

1.2.2 细胞鉴定及纯度分析 ①光镜:倒置显微镜下观察分离的细胞滋养细胞并照相。②电镜:取分离、纯化的细胞滋养细胞,3%戊二醛固定后送透射电镜检测。③S-P 法免疫细胞化学染色,一抗分别为 CK-7、vimentin、β-hCG(阴性对照:PBS 替代一抗)鉴定分离所得细胞。图像分析仪分析 CK-7 阳性细胞数,用光密度半定量分析法,计算着色细胞的染色强度及着色细胞数占该类细胞总数的百分比测定细胞纯度。

1.2.3 leptin mRNA 表达检测 应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测:①总 RNA 提取:弃去细胞培养液,室温下每10 cm^2 细胞生长面积(不论细胞数量)加1 ml Tripure 分离试剂,按照 Tripue 试剂盒(德国 Roche 公司产品)说明书,抽提、分相、分离提取总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度、纯度符合要求后,进行逆转录。②cDNA 合成:反应体系中按以下顺序

取量：dNTPs 1 μl，MMLV 1 μl，5 × MMLV 酶反应缓冲液 4 μl，oligo (dT) 161 μl，Rnasin 0.4 μl，RNA 样品 1.5 μg，ddH_2O 补足至 20 μl。混匀后，放置于 37 ℃水浴 2 h。95 ℃热变性 5 min 后，立即使用或于 - 20 ℃深冻保存。③PCR 反应：用 leptin 引物扩增 cDNA 片断，并与内参对照(β-actin)同时扩增检测转录效率。Leptin 引物序列，上游为 5′-GACTTCATTCCTGGGCTCCACC-3′，下游为 5′-CCTGAAGCTTCCAGGACACC-3′ (235 bp)。建立 50 μl 的扩增反应体系，反应条件为 95 ℃变性 30 s，57 ℃杂交 30 s，72 ℃延伸 60 s，共循环 40 次。RT-PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭显色扫入凝胶系统进行成像。检测各扩增带的产物含量(leptin mRNA 密度/β-肌动蛋白 × 100)。

2　结果

2.1　细胞形态及鉴定

倒置显微镜下观察：贴壁的细胞滋养细胞呈立方多角或卵圆形，核较圆，核分裂常见，胞界清楚。随着其分化，逐渐形成多个核，体积大的滋养层巨细胞和/或 STB(图 1)。透射电镜：细胞核膜清晰，核仁明显，见核间孔，常染色质丰富，细胞质中有大量散在游离核糖体，内质网较少，高尔基复合体不发达，有板层状嵴的线粒体(图 2)。免疫细胞化学染色 CK-7 强阳性，胞浆胞膜着色，对上皮型的细胞滋养细胞较为特异，经图像分析检测 IOD (积分光密度) 12.675 ± 1.921 4，AOD (平均光密度) 11.534 3 ± 0.134 32，Oddev(平均光密度方差) 0.041 368 ± 0.103 93，CK-7 阳性细胞数占细胞总数的 91%，即 CTB 的纯度达 91%(图 3)；而 vimentin 阴性，说明分离培养的细胞中无间质细胞生长；β-HCG (±)，说明分离所得细胞滋养细胞已有少量开始分化。

2.2　滋养细胞 leptin mRNA 的表达

培养 72 h 的早孕期胎盘绒毛滋养细胞表达 leptin mRNA，转录的量为(1.812 9 ± 0.481) attomoles/μg 总 RNA，在 235 bp 处条带表达。内参对照 β-actin 在 308 bp 处有区带(图 4)。

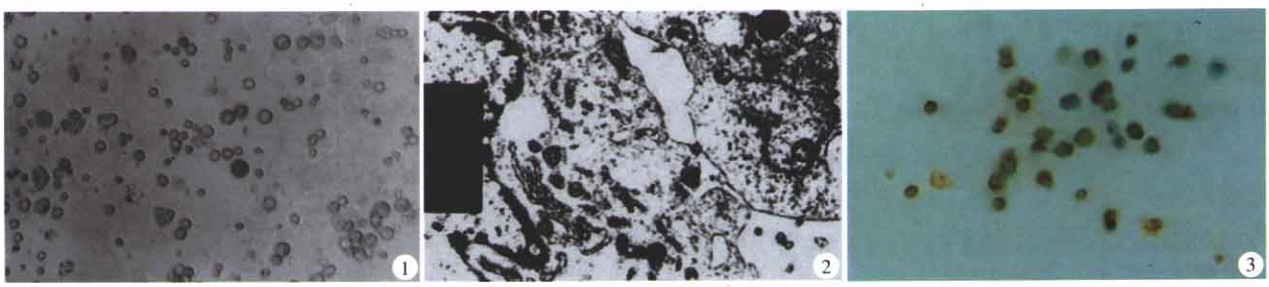


图 1　原代培养 48 h 的滋养细胞　(IM × 100)

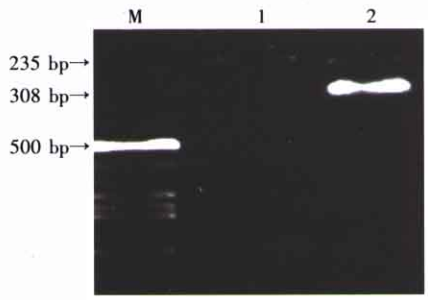
Fig 1　Expression of leptin mRNA in the first generation trophoblasts cultured for 48 h　(IM × 100)

图 2　滋养细胞透射电镜图　(TME × 5 000)

Fig 2　Expression of leptin mRNA in trophoblasts　(TME × 5 000)

图 3　滋养细胞 CK-7 免疫细胞化学染色　(SABC × 200)

Fig 3　Immunocytochemical staining of CK-7 in trophoblasts　(SABC × 200)



M: Marker; 1: Leptin mRNA; 2: Leptin mRNA + β-actin

图 4　滋养细胞 leptin mRNA 表达

Fig 4　Electrophoretic result of leptin mRNA in trophoblasts

3　讨论

3.1　leptin 的结构及生物学作用

1994 年，英国学者 Zhang 等[5] 人采用定位克隆技术成功地克隆了小鼠的 ob 基因，此后 Isse 等[6] 相继从遗传性肥胖小鼠 (ob-/ob-小鼠) 及人的脂肪组织中克隆出肥胖基因的蛋白产物。ob 基因编码的 ob 蛋白质被称为 leptin，现已证明小鼠 ob 基因位于 6 号染色体近端的小眼基因，人类 ob 基因位于 7q31，二者均为单拷贝基因，5′端含有许多转录因子连接部位。人 ob 基因长约 20 kb，由 3 个外显子和 2 个内含子组成。leptin 主要是由白色脂肪细胞分泌的蛋白类激素[3]。由 166 或 167 个氨基酸残基的开放阅读框架组成(前者较后者少肽链第 49 位的谷氨酰胺)，其氨基端有一 21 肽的信号肽，故分泌到胞外的 leptin 为 145 或 146 肽，长 18 ~ 20 kb，分子量为 16×10^3。其结构具有高度保守性，leptin 在翻译后没有糖基化、巯基化等修饰过程，但切去信号肽后可形成分子内二硫键，使整个分子呈球形[7]。Leptin 和其他激素一样，需要与特异的受体结合才能发挥其生物学作用。其与多种组织中多种形式的受体(ob-R)结合，参与体内能量平衡、脂肪贮存等生理过程的调节，并参与代

谢、生殖、血管生成等过程[1]。

3.2 早孕绒毛滋养细胞 leptin mRNA 表达及其意义

胚胎着床过程中滋养细胞的浸润是其关键环节，受到细胞因子、粘附分子、ECM 和蛋白水解酶及其组织抑制物等多种因素的调控。Leptin 作为Ⅰ型细胞因子主要是由白色脂肪细胞分泌的蛋白类激素，其它来源有胎盘、胃和骨骼肌[3]。文献[1]报道在生殖系统中参与生殖内分泌、月经、生育周期及妊娠、泌乳等过程并作为代谢信号启动青春期。国外研究报道 leptin 可能也参与了胚胎着床过程的调控[8]。在本研究中，应用 RT-PCR 技术证实培养的人早孕绒毛滋养细胞有 leptin mRNA 表达。Hoggard 等[9]报道其转录水平在早孕期最高并随妊娠进展而递减。Henson 等[10]研究 leptin 受体在浸润的滋养细胞柱远端绒毛外细胞滋养细胞(extra-villous cytotrophoblast, EVT)强表达，而 leptin mRNA 在滋养细胞柱的所有细胞成分均有表达。国外学者 Gonzalez 等[3]发现 leptin 影响了 $\alpha_{2,5,6}$ 整合素亚单位的表达及 MMPs 的活性改变；Castellucci 等[8]研究也表明增加 leptin 可使培养的 CTB 分泌 MMP-2 和 fFN，并增加 MMP-9 的活性呈剂量依赖。Leptin 和其受体结合通过影响 MMPs 的分泌促进 EVT 的浸润。目前的研究显示 leptin 参与了胚胎着床、滋养细胞浸润的调控，但其作用机制尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Margetic S, Gazzola C, Pegg G G, *et al*. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions[J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2002, 26(11): 1407 - 1433.

[2] Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, *et al*. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans[J]. Nat Med, 1997, 3(9): 952 - 953.

[3] Gonzalez R R, Devoto L, Campana A, *et al*. Effects of leptin, interleukin-1alpha, interleukin-6, and transforming growth factor-beta on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases[J]. Endocrine, 2001, 15(2): 157 - 164.

[4] Clarson L H, Roberts V H, Greenwood S L, *et al*. ATP-stimulated Ca^{2+}-activated K^+ efflux pathway and differentiation of human placental cytotrophoblast cells[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(4): R1077 - 1085.

[5] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, *et al*. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature, 1994, 372(6505): 425 - 432.

[6] Isse N, Ogawa Y, Tamura N, *et al*. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene[J]. J Biol Chem, 1995, 270(46): 27728 - 27733.

[7] Cohen S L, Halaas J L, Friedman J M, *et al*. Human leptin characterization[J]. Nature, 1996, 382(6592): 589.

[8] Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, *et al*. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion[J]. Mol Hum Reprod, 2000, 6(10): 951 - 958.

[9] Hoggard N, Hunter L, Lea R G, *et al*. Ontogeny of the expression of leptin and its receptor in the murine fetus and placenta[J]. Br J Nutr, 2000, 83(3): 317 - 326.

[10] Henson M C, Swan K F, O'Neil J S. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term[J]. Obstet Gynecol, 1998, 92(6): 1020 - 1028.

(编辑 张大春)

(上接 447 页)

威胁。因此，HBsAg 阳性患者的术后器械，应尽量简化处理程序和减少与人的接触，并且做好必要的消毒灭菌措施，才能有效控制医院感染的发生。

目前，部分医院采用清洗消毒设备处理使用后的医用器材，既可高效去处器材表面的污染物，又可通过热水对器材进行消毒，避免了频繁的手工操作对工作人员构成的感染威胁。但是，上述的监测数据表明，只通过清洗消毒器处理 HBsAg 阳性患者的术后器械，不足以去除或杀灭 HBV，而污染器械在化学消毒液短暂浸泡消毒后再用清洗消毒器处理，HBV 则几乎被去除或杀灭，这并非证实清洗消毒器性能差，而是因为 HBV 是一种较特殊的亲脂病毒，一方面具有很强的耐热性，能在100 ℃以下的的环境中存活(绝大多数微生物存活的温度都低于 60 ℃)，清洗消毒器内热水消毒的温度未达100 ℃，不能将其有效杀灭；另一方面，HBV 对化学消毒因子又特别敏感，很容易被化学消毒剂杀灭，与化学消毒剂短暂接触也可被有效灭活[3]。由此可见，HBsAg 阳性患者的术后器械，应先在化学消毒剂中灭活后再进行常规的清洗和消毒，才能取得较满意的效果。

关键词： HBsAg；外科器械；消毒

中图法分类号： R187 **文献标识码：** B

参考文献：

[1] 姚 磊，周长邵，张 征，等. 448 例乙肝标志物不同模式血清循环免疫复合物的检测及临床意义[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：868.

[2] 郝秀丽，王 娟. 预防和控制乙肝在手术中的传播[J]. 海南医学，2003，14(5)：88 - 89.

[3] 丁 柳，雷雪忠，刘 丽，等. 臭氧对乙肝病毒灭活效果检测[J]. 四川医学，2001，22(6)：535 - 536.

(编辑 龙 亮)