文章编号:1000-5404(2010)10-1083-04

论著

分娩相关基因在早产和足月产子宫肌层的差异表达及其意义

张利宏,陈 诚,王 琳,常 青 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[摘要] **目的** 研究分娩相关基因白介素-8(IL-8)、缩宫素受体(oxytocin receptor,OTR)和前列腺素H合成酶-2(prostaglandin H synthase type-2,PGHS-2)在早产和足月产子宫肌层的差异表达。**方法** 选取17例早产临产(preterm labour,PTL)和31例早产未临产(preterm no labour,PTNL)孕妇作为研究组,6例足月临产(term labour,TL)和6例足月未临产(term no labour,TNL)孕妇作为对照组,活检取子宫(下段)肌层组织,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)及Western blot法检测各组子宫肌层中IL-8、OTR和PGHS-2 mRNA及蛋白的表达水平,结合临床资料对检测结果进行统计学分析。**结果** 子宫下段肌层中,IL-8 mRNA的表达在PTL组显著低于TL组($P<0.01$),但均显著高于对应的未临产组(PTNL,$P<0.05$;TNL,$P<0.01$);PGHS-2 mRNA表达水平在PTL组显著低于TL组($P<0.05$),而后者又显著高于TNL组($P<0.01$);OTR mRNA和蛋白表达水平在各组中均未见显著差异($P>0.05$);PGHS-2蛋白表达在TL组要显著高于TNL组($P<0.05$)而在PTL与PTNL组间则未见明显区别($P>0.05$)。Spearman非参数相关性分析显示在PTNL组中IL-8基因表达与孕周显著相关($r=0.294$, $P=0.042$)。多元线性回归显示,早产组IL-8、OTR及PGHS-2基因表达均存在一定程度的相互影响,但在足月产组中则不明显。**结论** 早产与足月产子宫肌层分娩相关基因表达存在显著的差异,可能与早产进程相关。

[关键词] 早产;子宫肌层;IL-8;OTR;PGHS-2
[中图法分类号] R322.65; R394.2; R714 **[文献标志码]** A

Differential expressions and clinical significance of labour-associated genes in preterm labour and term labour myometrium

Zhang Lihong, Chen Cheng, Wang Lin, Chang Qing (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the differential expressions of labour-associated genes, including interleukin-8 (IL-8), oxytocin receptor (OTR) and prostaglandin H synthase type-2 (PGHS-2)) between preterm labour and term labour myometrium and their clinical significance. **Methods** Seventeen cases of preterm labour (PTL) and 31 cases of preterm no labour (PTNL) of pregnant women were selected as study group, while 6 cases of term labour (TL) and 6 cases term no labour (TNL) of pregnant women were chosen as control. Lower myometrial tissue biopsies were collected to detect the expressions of IL-8, OTR and PGHS-2 by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) as well as Western blot analysis. The expression data were then statistically analyzed in combination with clinical data. **Results** In the lower myometrial tissues, the mRNA levels of IL-8 and PGHS-2 were significantly lower in PTL group than in TL samples ($P<0.01$ for IL-8 and $P<0.05$ for PGHS-2). IL-8 mRNA levels in PTL group and TL group were significantly up-regulated compared to those of PTNL and TNL groups respectively ($P<0.05$ and $P<0.01$ respectively). There was no significant difference of PGHS-2 mRNA levels between PTL and PTNL groups ($P>0.05$), but the PGHS-2 mRNA level was significantly higher in TL group than in TNL group ($P<0.05$). The protein level of PGHS-2 was higher in TL group than in TNL group ($P<0.05$), but there was no difference of PGHS-2 protein among TL, PTL and PTNL groups ($P>0.05$). Correlation analysis suggested that the mRNA level of IL-8 was significantly correlated with gestational age in PTNL group ($r=0.294$, $P=0.042$). Multiple linear regression analysis showed a mutual control effect of the expressions of IL-8, OTR and PGHS-2 in preterm but not in term labour group. **Conclusion** Our results show that there are significant differences of the expression of labour-associated genes in lower myometrum between preterm labour and term labour, which

[基金项目] 国家自然科学基金(30901611)
[通信作者] 常 青,电话:(023)68765399,E-mail:cqli@yahoo.com.cn

might becorrelated with the progression of preterm labour.

[Key words] preterm labour; myometrial; interleukin-8; oxytocin receptor; prostaglandin H synthase type-2

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901611). Corresponding author: Chang Qing, Tel: 86-23-68765399, E-mail: cqli@yahoo.com.cn

早产是常见的妊娠并发症之一,也是新生儿患病和死亡的主要原因。其发生源于分娩的过早发动,即子宫组织由静止期向激活期的过早转化,但具体机制尚不清楚。既往研究表明,子宫肌层中一些分娩相关基因如白介素-8(interleukin-8, IL-8)、缩宫素受体(oxytocin receptor, OTR)和前列腺素H合成酶-2(prostaglandin H synthase type-2, PGHS-2)在分娩的启动及维持中起着重要的作用[1-3],但在早产子宫肌层这些分娩相关基因的表达尚不清楚。本研究选取早产临产(preterm labour, PTL)和早产未临产(preterm no labour, PTNL)孕妇作为研究组,足月临产(term labour, TL)和足月未临产(term no labour, TNL)孕妇作为对照组,活检取子宫(下段)肌层组织,采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)及Western blot法检测各组子宫肌层中IL-8、OTR和PGHS-2 mRNA水平及OTR和PGHS-2蛋白的表达,并结合临床资料对检测结果进行统计学分析,观察早产中分娩相关基因的表达。

1 对象与方法

1.1 对象

随机选择本院剖宫产分娩的妊娠32~36^{+6}周早产临产(PTL)和早产未临产(PTNL)孕妇为研究组;取同期37~42周足月临产(TL)和足月未临产(TNL)孕妇为对照组;各组间孕妇年龄无显著差异($P>0.05$)。其中足月未临产和足月临产组孕妇无任何妊娠并发症和合并症。早产组剖宫产指征:胎儿窘迫、妊娠期肝内胆汁淤积综合征(ICP)、先露异常、子痫前期、前置胎盘、胎盘早剥及瘢痕子宫;足月产组剖宫产指征:胎儿窘迫、先露异常、瘢痕子宫(表1)。

1.2 诊断标准

早产:自末次月经第1日计算,妊娠满28周但不足37周分娩者[4];早产临产(PTL):在先兆早产的基础上,如子宫收缩较规则(间隔5~6 min,持续30 s以上),伴以宫颈管消退≥75%以及进行性宫口扩张≥2 cm[5];早产未临产(PTNL):终止妊娠时孕周不足37周且未临产。足月产:自末次月经第1日计算,妊娠满37周但不足42周分娩者[6];足月临产(TL):子宫出现规律且逐渐增强的收缩(间隔5~6 min,持续30 s或以上),同时伴随进行性宫颈管消失、宫口扩张和胎先露部下降,用镇静药物不能抑制;足月未临产(TNL):终止妊娠时孕周超过37周且未临产。

1.3 标本采集及处理

所有孕妇在行子宫下段剖宫产手术时,在胎儿取出后从子宫切口边缘取1 cm×0.5 cm肌层组织,4 ℃保存的0.9%氯化钠液冲净血迹和羊水后,将组织放入低温冻存管中立即投入到液氮中长期保存备用。

1.4 qRT-PCR

选择人GAPDH作为内参。以上引物均由上海生物工程有限公司合成纯化。选取50~75 mg冻存的子宫肌层进行组织匀浆,按RNeasy Mini Kit试剂盒(QIAGEN)说明书提取总RNA,按照qRT-PCR试剂盒(TaKaRa)说明书方法将提取的总RNA反转录成cDNA,阴性对照为无菌去离子水。荧光定量PCR反应体系:2×SYBR Premix Ex *Taq* Ⅱ 12.5 μl,上、下游引物(表2)各1 μl,cDNA模板2 μl,无菌去离子水8.5 μl,反应总体积为25 μl。PCR设定参数:95 ℃预变性30 s;95 ℃20 s;退火温度分别为IL-8 59 ℃,OTR 59 ℃,PGHS-2 60 ℃,GAPDH 60 ℃,退火时间30 s;72 ℃ 20 s;共扩增40个循环。

表2 引物序列及片段长度

基因	上游引物	下游引物	长度
GAPDH	5′-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3′	5′-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3′	201 bp
IL-8	5′-GCCTTCCTGATTTCTGCAGC-3′	5′-CGCAGTGTGGTCCACTCTCA-3′	149 bp
OTR	5′-AGAAGCACTCGCGCCTCTT-3′	5′-AGGTGATGTCCCACAGCAACT-3′	101 bp
PGHS-2	5′-TGTGCAACACTTGACTGGCT-3′	5′-ACTTTCTGTACTGCGGCTGG-3′	296 bp

1.5 Western blot及半定量分析

PBS清洗后按照1 ml/g组织加入RIPA裂解液(碧云天)并立刻在冰上用玻璃匀浆器匀浆20 min,12 000 r/min 4 ℃离心15 min,取上清用BCA法定量后取30 μg蛋白样品进行SDS-PAGE并电转移至0.45 μm PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温振荡封闭2 h,然后分别用1∶250稀释的OTR和PGHS-2一抗4 ℃孵育过夜,以β-actin(1∶2 000)作为内参;孵育完成后TBST洗膜4次,每次7 min;再与HRP标记的1∶5 000二抗室温孵育1 h,TBST洗膜5次,每次5 min;加入发光液后在暗室用X胶片显影。Quantity One软件分析各组蛋白的积分光密度,目的条带积分光密度值与对应的β-actin的积分光密度比值作为目的蛋白的表达水平。同一实验重复3次取其平均值。

表1 研究对象的一般情况

组别	年龄(岁)	孕次	产次	孕周	宫口(cm)	剖宫产指征								
						胎儿窘迫	ICP	先露异常	子痫前期	前置胎盘	双胎	胎盘早剥	瘢痕子宫	妊娠糖尿病
早产组(n=48)														
PTNL(n=31)	31(20~43)	3(1~7)	1(0~2)	35.7(32.1~36.9)	0	2	9	3	7	5	–	2	2	1
PTL(n=17)	28(20~38)	3(1~6)	1(0~2)	35.5(34~36.9)	2(1~5)	1	6	4	2	1	1	1	1	–
足月产组(n=12)														
TNL(n=6)	31(24~37)	3(1~4)	1(0~1)	38.9(38.1~39.5)	0	2	–	2	–	–	–	–	2	–
TL(n=6)	27(26~38)	2(1~3)	0	39.7(39~41.3)	3(1~10)	2	–	1	–	–	1	–	2	–

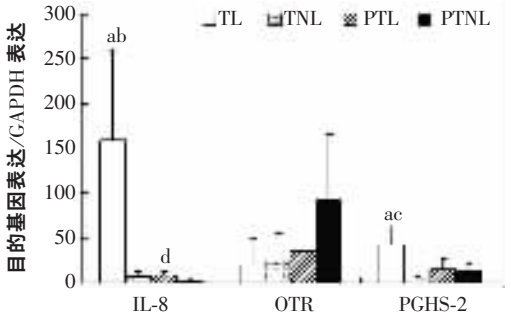
1.6 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 进行统计分析。两组间比较采用完全随机设计资料 Student's t 检验，多组间比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析，相关性分析采用 Spearman 法，回归分析采用多元线性回归。

2 结果

2.1 荧光定量 PCR 检测 IL-8、OTR、PGHS-2 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 检测结果显示：子宫下段肌层中，IL-8 mRNA 水平在早产临产（PTL）组显著低于足月产临产（TL）组（$P<0.01$），但均显著高于对应的未临产组［早产未临产（PTNL），$P<0.05$ 与足月产未临产（TNL），$P<0.01$］；PGHS-2 mRNA 水平在 PTL 组显著低于 TL 组（$P<0.05$），而后者又显著高于 TNL 组（$P<0.01$），但在 PTL 组与 PTNL 组间无显著差异（$P>0.05$）；OTR mRNA 水平在各组中差异均不显著（$P>0.05$）（图 1）。



a：$P<0.01$，与 TNL 组比较；b：$P<0.01$，与 PTL 组比较；c：$P<0.05$，与 PTL 组比较；d：$P<0.05$，与 PTNL 组比较

图 1　IL-8、OTR、PGHS-2 mRNA 荧光定量 PCR 检测结果

2.2 Western blot 检测 IL-8、OTR、PGHS-2 蛋白的表达

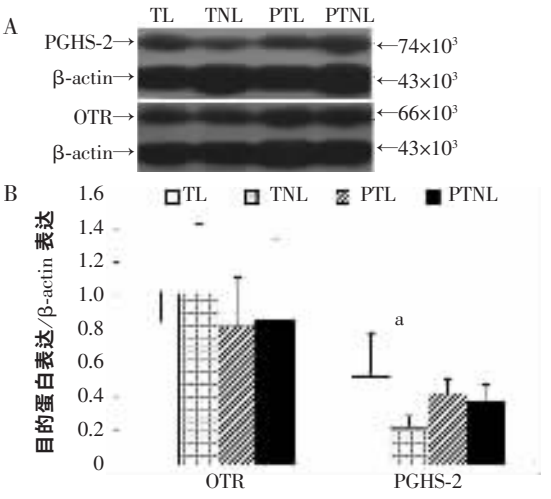
Western blot 检测结果显示：子宫下段肌层中，IL-8 蛋白的表达在早产与足月产各组中均未能检测出来；OTR 蛋白表达水平在早产与足月产各组子宫下段肌层中表达丰富，各组间表达量均未见显著差异（$P>0.05$）；PGHS-2 蛋白表达水平在 TL 组要显著高于 TNL 组（$P>0.05$），PTL 与 PTNL 组中无显著差异（$P>0.05$），但在早产与足月产各对应组中（PTL 与 TL，PTNL 与 TNL）无显著差异（$P>0.05$）（图 2）。

2.3 分娩相关因子与孕周的相关性分析

一些基因的表达可能会随着孕龄的增加而发生改变，这些基因表达的变化先于分娩的发动，从而可能在分娩启动中发挥作用[7]。我们对早产和足月产非参数 Spearman 相关分析发现：IL-8 基因表达在早产与孕周正相关（$r=0.294$，$P<0.05$），但在足月产组与孕周无显著相关；PGHS-2 和 OTR 在两组中与孕周均无明显相关（表 3）。

表 3　分娩相关基因与孕周的非参数相关性分析（Spearman 法）

基因	早产孕周（$n=48$）		足月产孕周（$n=12$）	
	r	P	r	P
IL-8	0.294	0.042	−0.105	0.746
OTR	0.130	0.380	−0.007	0.983
PGHS-2	0.017	0.907	−0.224	0.484



A：Western blot 检测结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与 TNL 组比较

图 2　OTR 和 PGHS-2 蛋白的表达变化

2.4 各分娩相关因子表达间的相互影响

我们以 IL-8、OTR 及 PGHS-2 其中一个为自变量，其余两个未应变量 IL-8、PGHS-2 和 OTR 的表达进行多元回归分析。结果显示：在早产组中 IL-8、PGHS-2 和 OTR 基因表达间相互影响作用明显，在其各个样本间，IL-8 表达差异的 25.6%（$P<0.01$）是由 PGHS-2 与 OTR 表达的不同引起的，PGHS-2 表达差异的 44.9%（$P<0.01$）是由 IL-8 与 OTR 表达的不同引起的，而 ORT 表达差异的 34.0%（$P<0.01$）则是由 IL-8 与 PGHS-2 表达的不同所引起的。在足月产组 IL-8、PGHS-2 和 OTR 的基因表达与自变量（IL-8、OTR 及 PGHS-2）间均不能建立有效的回归方程（$P>0.05$）提示在足月产中 IL-8、PGHS-2 和 OTR 基因表达间的相互影响不明显。

3 讨论

早产是由于各种原因引起的子宫收缩宫颈扩张综合征[8]，是妊娠常见的并发症，占分娩总数的 5% ~ 15%。早产常见病因有感染、胎膜早破、子宫过度膨胀、子宫颈口关闭不全等等，但其具体的发病机制尚不清楚。为了从分子机制上观察早产的动因，我们分析了一些分娩相关因子如 IL-8、OTR 及 PGHS-2 在早产子宫肌层中的表达特征，发现与足月产存在显著差异，提示这些分娩相关因子的异常表达可能与早产有着密切的联系。同时我们结合临床资料，对这些相关因子的表达特征进行统计学分析，发现早产中这些分娩相关因子表达的影响因素与足月产也存在显著差异。虽然足月产组样本量较早产组样本量小，但足够满足进行相关统计学分析的要求。样本量的大小也可能在一定程度上影响统计学分析的结果，但是，我们关于足月产的研究结果与文献［7］报道的在一定程度上是一致的。

IL-8是一种趋化因子,可由人子宫内膜、绒毛膜蜕膜、胎盘及子宫基层分泌,与白细胞浸润与宫颈成熟相关[9]。随着妊娠进展,子宫壁张力增加,生理性的上调IL-8的表达,引起子宫肌层的炎性浸润并导致IL-1β分泌。IL-1β又可进一步刺激子宫肌层IL-8的合成,从而形成了一个IL-8表达的正向反馈回路,其作用在分娩启动时达到顶点[10,11]。我们结果显示:在早产临产时,子宫肌层IL-8水平显著低于足月临产,这可能是由于早产孕周减少,由子宫壁张力增加引起的IL-8生理性上调作用不明显,导致IL-8正反馈表达通路在一个较低水平上进行,IL-8基因表达在早产组与孕周存在较显著的正相关性也说明了这一点。但是在足月产组中,IL-8基因表达与孕周未发现显著的相关性,这可能是因为在足月产组孕周比较接近,而此时胎儿生长较缓慢,使得IL-8的表达受孕周影响不明显导致。多元线性回归分析显示早产子宫肌层IL-8基因表达在一定程度上受到了OTR及PGHS-2表达的影响,而在足月产中这种影响作用不显著。

OTR的表达一直是动物分娩模型中分娩的标志物,有研究发现它在人分娩过程中表达增高[12]。但有报道称OTR基因的表达不随着分娩的启动增加而是随着妊娠的进展,先于分娩的启动而增加[13]。我们的结果显示早产与足月产中OTR表达无显著差异,与孕周也无显著相关。不管是妊娠的进展还是分娩的启动对OTR的表达均无显著影响。多元线性回归显示早产中OTR基因表达水平受到IL-8及PGHS-2表达的影响,但同IL-8一样,这种现象在足月产中也不明显。

PGHS-2是前列腺素合成途径的核心酶,人类分娩启动的发生主要与PGHS-2的表达及活性增高有关[14]。我们的研究也说明了这一点,在足月产中,TL组的PGHS-2表达显著高于TNL组。然而我们发现,在早产中,PGHS-2在PTL组及PTNL组均有较高的表达,其蛋白表达水平与足月产中TL组无显著差异,提示PGHS-2的异常表达可能是早产的重要促发因素。我们也发现,在早产中PGHS-2在PTL组及PTNL组间无显著差异,早产的分娩活动不能刺激PGHS-2表达升高,这种显现显著不同与足月产,提示早产中PGHS-2表达的调控机制与足月产中可能存在某些差异。多元线性回归显示早产中PGHS-2基因表达受到IL-8及OTR表达的影响而在足月产中这种作用则不明显,两方面的结果均提示PGHS-2基因在早产中的表达调控机制与足月产中可能存在不同,而这正可能与早产的发生有关。

综上所述,我们分析比较了分娩相关因子IL-8、OTR和PGHS-2在早产与足月产中的表达特点,发现早产IL-8与PGHS-2基因有着不同于足月产的异常表达,并可能存在着不同于足月产中的调控机制。我们的研究结果有助于深入了解早产发病机制,为进一步预防与控制早产提供了实验依据。

参考文献:

[1] Sooranna S R, Engineer N, Liang Z, *et al*. Stretch and interleukin 1 beta: pro-labour factors with similar mitogen-activated protein kinase effects but differential patterns of transcription factor activation and gene expression[J]. J Cell Physiol, 2007, 212(1): 195-206.

[2] Arthur P, Taggart M J, Zielnik B, *et al*. Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in the rat during gestation, uterine activation and both term and preterm labour [J]. J Physiol, 2008, 586(Pt 24): 6063-6076.

[3] Mohan A R, Sooranna S R, Lindstrom T M, *et al*. The effect of mechanical stretch on cyclooxygenase type 2 expression and activator protein-1 and nuclear factor-kappaB activity in human amnion cells [J]. Endocrinology, 2007, 148(4): 1850-1857.

[4] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 99.

[5] 徐志红, 徐爱群, 曾蔚越. 早产的定义和分类[J]. 实用妇产科杂志, 2005, 21(11): 643-644.

[6] 乐杰. 妇产科学[M]. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 92.

[7] Tattersall M, Engineer N, Khanjani S, *et al*. Pro-labour myometrial gene expression: are preterm labour and term labour the same? [J]. Reproduction, 2008, 135(4): 569-579.

[8] Domingues M R, Matijasevich A, Barros A J. Physical activity and preterm birth: a literature review [J]. Sports Med, 2009, 39(11): 961-975.

[9] van-Engelen E, de-Groot M W, Breeveld-Dwarkasing V, *et al*. Cervical ripening and parturition in cows are driven by a cascade of pro-inflammatory cytokines[J]. Reprod Domest Anim, 2009, 44(5): 834-841.

[10] Osman I, Young A, Jordan F, *et al*. Leukocyte density and proinflammatory mediator expression in regional human fetal membranes and decidua before and during labor at term[J]. J Soc Gynecol Investig, 2006, 13(2): 97-103.

[11] Christiaens I, Zaragoza D B, Guilbert L, *et al*. Inflammatory processes in preterm and term parturition [J]. J Reprod Immunol, 2008, 79(1): 50-57.

[12] Blanks A M, Shmygol A, Thornton S. Regulation of oxytocin receptors and oxytocin receptor signaling [J]. Semin Reprod Med, 2007, 25(1): 52-59.

[13] Liedman R, Hansson S R, Igidbashian S, *et al*. Myometrial oxytocin receptor mRNA concentrations at preterm and term delivery - the influence of external oxytocin [J]. Gynecol Endocrinol, 2009, 25(3): 188-193.

[14] Olson D M, Ammann C. Role of the prostaglandins in labour and prostaglandin receptor inhibitors in the prevention of preterm labour [J]. Front Biosci, 2007, 12: 1329-1343.

(**收稿**:2010-02-02;**修回**:2010-03-08)

(编辑 王 红)