论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0900-05

妊娠期大鼠胎盘组织中 Rho/ROCK 蛋白动态变化特点

韩新美[1],韩 健[1],杨博萍[1],俞丽丽[1],周元国[2],易 萍[1],李 力[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:妇产科[1],第七研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

【摘要】 **目的** 研究 Rho 亚家族蛋白(RhoA、B、C)与 Rho 激酶即 ROCK(ROCKⅠ、Ⅱ)在大鼠不同孕期胎盘中的表达水平及其动态变化特点。**方法** 正常受孕的 20 只雌性大鼠分为孕 7、10、13、15、18 d 组;各组孕鼠正常饲养,并分别于妊娠第 7、10、13、15、18 天剖宫取胎盘,测量胎盘湿重及胎盘直径,并记录胎盘个数;采用 Western blot 及免疫组化法测定胎盘组织中 RhoA、B、C 与 ROCKⅠ、Ⅱ蛋白的表达水平。**结果** 随着孕龄增加,大鼠胎盘的质量和直径都在增加;Western blot 及免疫组化法检测结果显示,RhoA、RhoC 的表达水平在孕 13、15、18 d 组显著高于孕 7、10 d 组($P<0.01$),而 RhoB 表达水平无明显差异($P>0.05$)。ROCKⅠ、ROCKⅡ在孕 18 d 组表达显著高于孕 7、10、13、15 d 组($P<0.01$)。**结论** RhoA、RhoC、ROCKⅠ、ROCKⅡ在大鼠胎盘组织中的表达呈上升趋势,而 RhoB 则无明显变化;Rho/ROCK 信号通路在正常妊娠不同时期的大鼠胎盘组织中发挥重要作用。

【关键词】 Rho;ROCK;妊娠;胎盘

【中图法分类号】 R321.4;R329.26;R341 【文献标志码】 A

Dynamic expression profiles of Rho/ROCK proteins in rat placenta

Han Xinmei[1], Han Jian[1], Yang Boping[1], Yu Lili[1], Zhou Yuanguo[2], Yi Ping[1], Li Li[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 7, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the expressions and the dynamic changes of Rho proteins (RhoA, RhoB and RhoC) and their kinase ROCK (ROCKⅠ and ROCKⅡ) in rat placenta at different stages of gestation. **Methods** A total of 20 pregnant female rats were randomly divided into 5 groups ($n=4$). Their placents were obtained when the rats were pregnant at 7, 10, 13, 15, and 18 d respectively. Wet weight and diameter of the placenta were measured, and the number of the placenta was counted and recorded. The expression levels of RhoA, RhoB, RhoC, ROCKⅠ and ROCKⅡ were detected by immunohistochemical staining and Western blot analysis. **Results** With the increase of gestational period, the weight and diameter of the placenta were increased. The expression levels of RhoA and RhoC in 13, 15, and 18 d of pregnant groups were significantly higher than those in 7 and 10 d of pregnant groups ($P<0.01$), but the expression of RhoB had no obvious difference among these groups ($P>0.05$). ROCKⅠ and ROCKⅡ in 18 d of pregnant group was expressed significantly higher than those in 7, 10, 13 and 15 d of pregnant groups ($P<0.01$). **Conclusion** The expression levels of RhoA, RhoC, ROCKⅠ and ROCKⅡ are increased in rat placental tissues with the elapse of pregnant period, but that of RhoB has no such significant change. These results indicate that Rho/ROCK signaling pathway may play an essential role in the development of placenta during normal pregnancy.

【**Key words**】 Rho; ROCK; pregnancy; placenta

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772338, 30801247). Corresponding author: Li Li, E-mail: xglili@mail.dph-fsi.com; Yi Ping, E-mail: pingyi@tom.com

子痫前期(pre-eclampsia, PE)是严重威胁孕产妇和胎儿健康的重要产科并发症,特指妊娠 20 周以后出现高血压、蛋白尿、水肿等症状,继发颅内病变、抽搐甚至昏迷[1]。流行病学调查显示,该病平均发病率为 2%~8%,在我国为 9%~10%,略高于欧美发达国家。PE 的病因和发病机制尚不明确,目前滋养细胞侵袭行为的调控因素已成为 PE 的研究热点。Rho 蛋

【基金项目】 国家自然科学基金(30772338,30801247)

【通信作者】 李 力,E-mail:xglili@mail.dph-fsi.com

易 萍,E-mail:pingyi@tom.com

白是 Ras 相关单体 GTP 酶，它通过激活其下游靶分子 ROCK（Rho associated colied coil forming protein kinase）来调节细胞的多种行为，因此 Rho/ROCK 信号通路又有“分子开关”之说。有研究表明 Rho/ROCK 信号转导通路在调节滋养细胞侵袭、增殖及凋亡等方面发挥着重要作用[2-3]，从而来调节胎盘的功能。也有研究证实在子痫前期患者的胎盘中 ROCKⅡ表达显著高于正常妊娠者[3]。因此绘制出 Rho/ROCK 信号传导通路在滋养细胞的动态变化图谱，并观察其动态变化规律与临床上滋养细胞节制性侵袭的内在联系就显得相当重要了。本实验就着重研究 Rho/ROCK 在正常妊娠不同时期的表达水平及其动态变化特点，拟为子痫前期这一病理性妊娠的发病机理提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级成年 Wistar 大鼠 40 只，雌雄各半（购自第三军医大学大坪医院实验动物中心）。一抗：Rabbit polyclonal to RhoA（ab68826）、Rabbit polyclonal to RhoB（ab68827）、Rabbit polyclonal to RhoC（ab64659）均购自美国 Abcam 公司；ROCKⅠ/ROKβ、ROCKⅡ/ROKα 购自美国 BD biosciences 公司。二抗：Goat anti-rabbit IgG-HRP 购自北京中杉公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 将大鼠于晚上 18:00 按雌雄 1:1 合笼，次晨 8:00 观察饲养笼下的托盘，发现阴栓为受孕成功有 20 只，并规定为妊娠第 0 天[4-5]。将成功受孕的 20 只雌性大鼠分为 5 组：孕 7、10、13、15、18 d 组，每组 4 只。在室温 25 ℃、相对湿度 40% ~70% 的屏障系统内饲养，动物的饲料和饮水不受限制。

1.2.2 标本的采集 将孕 7、10、13、15、18 d 组大鼠分别于妊娠第 7、10、13、15、18 天，在速眠新肌肉注射麻醉下，剖宫取胎盘，冰冷生理盐水洗去血迹，滤纸吸干，天平称量胎盘湿质量，并记录胎盘个数及胎盘直径大小。将胎盘在无菌纱布上尽量吸干水分后，取部分胎盘组织置于 4% 多聚甲醛中固定，剩下的胎盘组织全部放入冻存管中，并迅速放于液氮罐内保存备用。取完标本后追加速眠新剂量将大鼠处死。

1.2.3 免疫组化检测 RhoA、B、C 及 ROCKⅠ、Ⅱ的表达 孕鼠的胎盘称量测定完毕后，取部分胎盘置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h；石蜡包埋，切片。采用免疫组化 ABC 法测定胎盘中 RhoA、B、C、ROCKⅠ、Ⅱ的表达。一抗：RhoA 1∶1 500、RhoB 1∶1 500、RhoC 1∶1 500、ROCKⅠ 1∶500、ROCKⅡ 1∶1 500 稀释。参照免疫组化试剂说明书，严格按照操作步骤进行。以 PBS 代替一抗作阴性对照，DAB 显色，苏木精浅染，中性树胶封片镜检。以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。

1.2.4 Westernblot 检测 RhoA、B、C 及 ROCKⅠ、Ⅱ蛋白的表达 提取蛋白，BCA 法蛋白定量，行蛋白电泳，电转印于 PVDF 膜，剪下相应的蛋白电泳条带，3% BSA 室温封闭 2 h，加入相应的一抗（RhoA 1∶300、RhoB 1∶300、RhoC 1∶300、ROCKⅠ 1∶1 000、ROCKⅡ 1∶1 000），4 ℃过夜，TBS 缓冲液洗膜 3 次，加入 HRP 标记的二抗，37 孵育 1 h，洗膜 3 次；电化学发光法（ECL）显影，并用 Quantity One 4.62 软件（Bio-Rad Laboratories）对电泳条进行灰度值分析，以目的条带与内参照条带的比值代表目的蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理

运用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，多组间数据采用单因素方差分析组组间比较。

2 结果

2.1 一般情况

在整个实验期间，各组大鼠精神状态佳，无死亡，无流产。测量各组大鼠胎盘重量和胎盘直径发现，随着孕龄增加，大鼠胎盘的重量和直径都在增加，与既往的研究相符合。

2.2 Rho/ROCK 的表达定位

RhoA、B、C，ROCKⅠ、Ⅱ在孕 7、10、13、15、18 d 组的胎盘组织中均有表达，且主要表达在滋养细胞的胞质中（图 1、2）。

2.3 RhoA、B、C 的表达

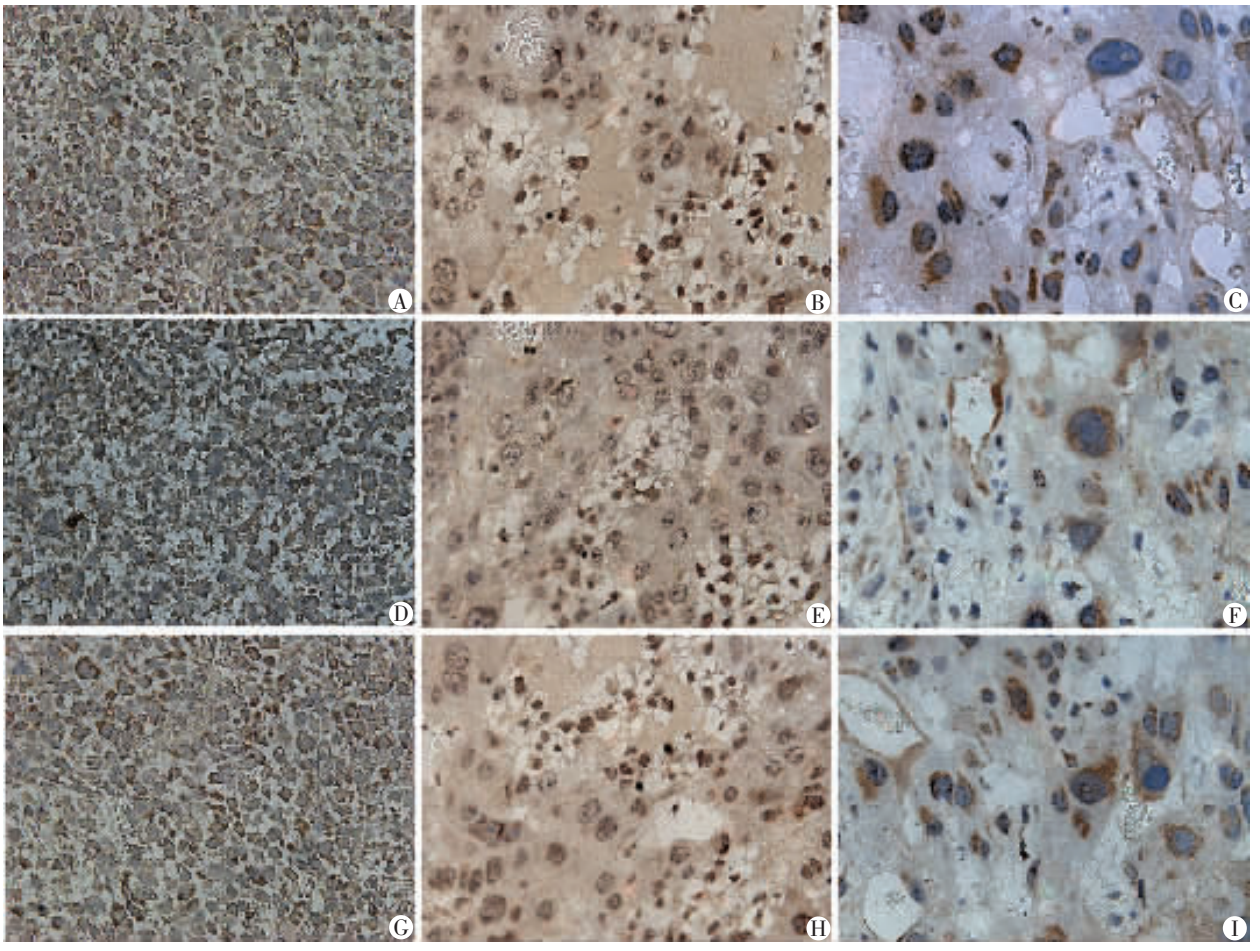
正常妊娠的大鼠胎盘组织中 RhoA 表达水平在孕 10、13、15、18 d 组显著高于孕 7 d 组（$P<0.05$），且孕 13、15、18 d 组较 7、10 d 组表达水平有非常显著的差异（$P<0.01$）。随着孕龄增长，RhoA 的表达水平呈上升趋势。RhoB 在各妊娠时期的表达水平无明显差异（$P>0.05$）。RhoC 的表达水平在孕 10、13、15、18 d 组显著高于孕 7 d 组（$P<0.05$），且孕 13、15、18 d 组较 7、10 d 组表达水平有非常显著的差异（$P<0.01$）。随着孕龄增长，RhoC 的表达水平呈上升趋势（图 1、3）。

2.4 ROCKⅠ、Ⅱ的表达

正常妊娠的大鼠胎盘组织中 ROCKⅠ、Ⅱ在孕 18 d 组表达显著高于孕 7、10、13、15 d 组（$P<0.01$）。随着孕龄增长，ROCKⅠ、Ⅱ的表达呈上升的趋势（图 2、4）。

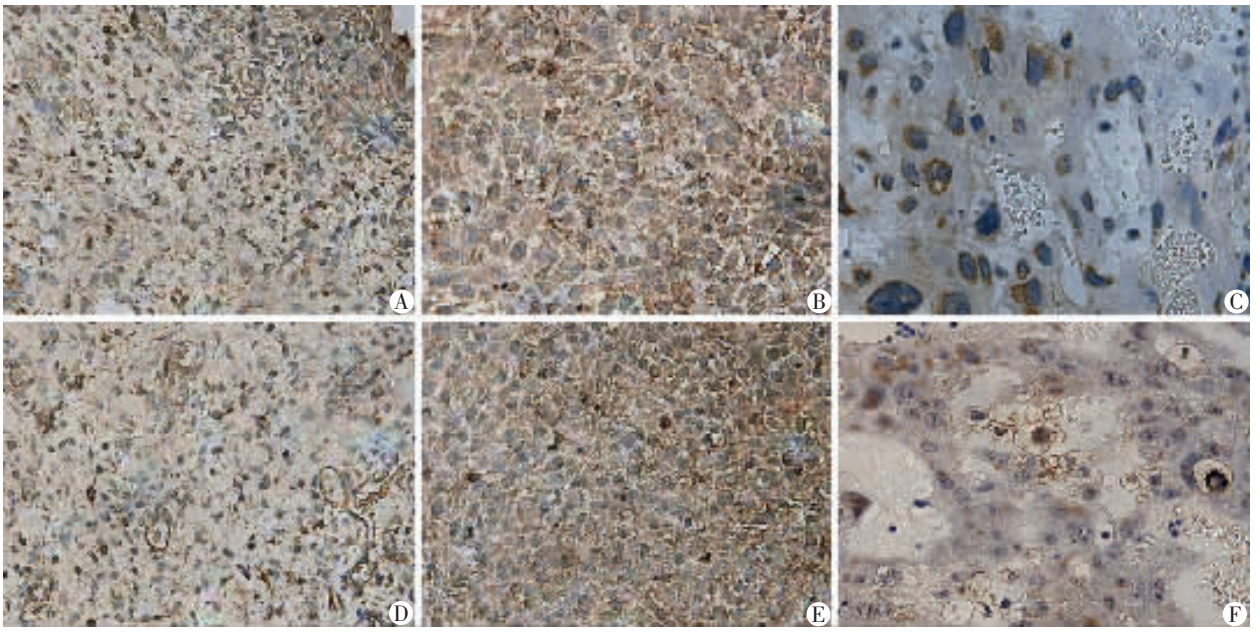
3 讨论

哺乳动物胎盘的形成，依赖于母-胎界面来自于胎儿成分的滋养细胞与母体蜕膜的特异识别，进而滋养细胞通过侵袭行为浸入母体蜕膜形成了血窦，以保证胎母间营养物质的交换和代谢产物的排出。到妊娠晚期，随着胎盘的成熟，滋养细胞也在凋亡。滋养细胞的生物学行为受到生长因子、黏附分子、细胞因子和激素等多种因素的影响。各种细胞外刺激通过细胞内的信号传导来调节效应因子的基因和蛋白表达，从而来调节滋养细胞的生物学活性。滋养细胞细胞的生物学行为受到严格的时空调控，一旦其调控机制失调，就可以导致子痫前期等疾病的发生。近年来经多方研究总结，形成了子痫前期的病因学假说，即在多基因的遗传背景下子痫前期的易感性增加，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，为后期发病提供解剖病理基础。自从 Shiokawa 等[6]



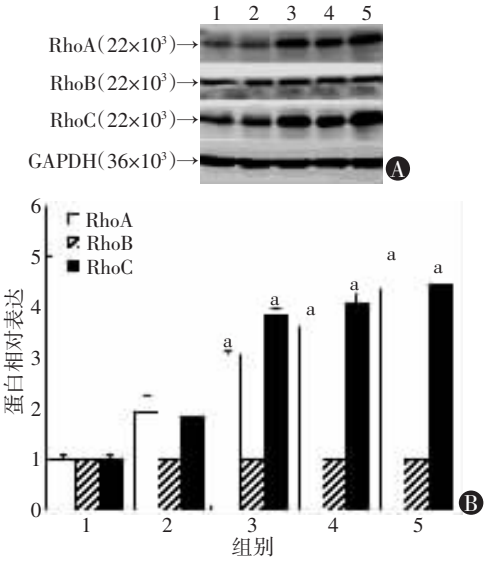
A:孕7 d胎盘中RhoA的表达;B:孕13 d胎盘中RhoA的表达;C:孕18 d胎盘中RhoA的表达;D:孕7 d胎盘中RhoB的表达;E:孕13 d胎盘中RhoB的表达;F:孕18 d胎盘中RhoA的表达;G:孕7 d胎盘中RhoC的表达;H:孕13 d胎盘中RhoC的表达;I:孕18 d胎盘中RhoC的表达

图1 免疫组化检测胎盘组织中RhoA、B、C的表达 (SABC ×400)



A:孕7 d胎盘中ROCKⅠ的表达;B:孕13 d胎盘中ROCKⅠ的表达;C:孕18 d胎盘中ROCKⅠ的表达;D:孕7 d胎盘中ROCKⅡ的表达;E:孕13 d胎盘中ROCKⅡ的表达;F:孕18 d胎盘中ROCKⅡ的表达

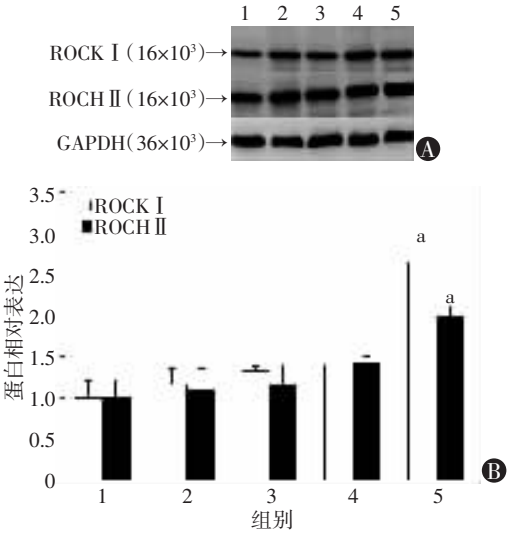
图2 免疫组化检测胎盘组织中ROCKⅠ、Ⅱ的表达 (SABC ×400)



1～5：分别为孕 7、10、13、15、18 d 组

A：Western blot 结果；B：半定量结果　a：$P<0.01$，与孕 7 d 组比较

图 3　Western blot 检测胎盘组织中 RhoA、B、C 的表达



1～5：分别为孕 7、10、13、15、18 d 组

A：Western blot 结果；B：半定量结果　a：$P<0.01$，与孕 7 d 组比较

图 4　Western blot 检测胎盘组织中 ROCK Ⅰ、Ⅱ的表达

发现 RhoA 在蜕膜细胞中对粘附后胚胎的发育和分化起着重要作用后，Rho/ROCK 信号通路在胎盘滋养细胞中的研究已成为热点。

Rho 亚家族蛋白属于 Ras 超家族小分子量 G 蛋白的成员，包括 RhoA、RhoB、RhoC。它们在细胞的信号转导通路中作为“分子开关”作用于其下游靶效应分子调节细胞骨架的活动，进而参与细胞的黏附、细胞的极性和细胞迁移。Rho 亚家族成员具有高度同源性，RhoA、RhoB、RhoC 蛋白的氨基序列结构大约有 85% 相同。人类 RhoA、RhoB、RhoC 基因位于不同的染色体上。RhoA、RhoB 和 RhoC 在众多组织和细胞中均有表达，但不同组织和细胞中，其表达水平有明显差异[7]。Rho 有许多的下游效应分子，其中 ROCK 是目前研究最为清楚的 Rho 下游靶效应分子。ROCK 有 ROCK-Ⅰ/ROKα、ROCK-Ⅱ/ROKβ 两种同工酶，两者有 64% 的同源性。人类的 ROCK Ⅰ和 ROCK Ⅱ基因位于不同的染色体上，二者在人类的不同组织和细胞中表达水平也不同。

Shiokawa 等[2] 在 2002 年的 Rho/ROCK 在滋养细胞迁移过程中的研究中发现：RhoA 在滋养细胞细胞质呈强阳性表达，ROCK 在滋养细胞中均有表达，RhoA 抑制剂和 ROCK 抑制剂以剂量依赖方式抑制滋养细胞的迁移。本课题组 Han 等[8] 在前期的实验研究中发现 RhoA 和 RhoC 在 EGF 介导的滋养细胞侵袭中起着重要作用，RhoB 在这一过程中无明显作用，所以推测 Rho/ROCK 在早孕期间滋养细胞的侵袭过程中起着重要作用。多项研究表明 Rho/ROCK 在肿瘤细胞的增殖过程中发挥重要[9-11]，滋养细胞具有肿瘤细胞的特性，也被称为“假肿瘤细胞”，因此我们推测 Rho/ROCK 在滋养细胞的增殖过程中可能发挥着一定的作用。Ark 等[3] 发现在正常妊娠和子痫前期患者胎盘中 ROCK Ⅱ均有表达，且子痫前期患者的胎盘中 ROCK Ⅱ的表达较正常妊娠显著增加。吴莉等[12] 发现在子痫前期患者胎盘组织中 ROCK Ⅱ的高表达与其滋养细胞凋亡增加有关，因此推测 ROCK Ⅱ可能参与滋养细胞的凋亡。可见 Rho/ROCK 信号通路成员在正常和病理妊娠过程中均发挥重要作用，但在妊娠过程中的哪个时间段，何种分子起重要作用尚未明晰。

在本实验中我们对 Rho 亚家族蛋白在正常妊娠不同时期的胎盘组织中表达水平及动态变化趋势进行了研究。在既往的国内外报道中用大鼠建立子痫前期动物模型的不少，主要有以下几种制作方法：内毒素皮下注射致血管内皮损伤，一氧化氮合酶抑制剂皮下注射致一氧化氮合成降低。本课题组也成功的建立了反复寒冷刺激诱发孕鼠妊娠高血压综合征的动物模型[4]，用大鼠进行这种疾病的优点是：较容易获得任何孕期的大鼠胎盘或对不同孕期中其他指标的连续监测，因此我们选用大鼠的胎盘进行了上述的研究。研究结果显示随着孕龄增加，RhoA、RhoC 的表达水平增加，而 RhoB 表达水平无明显变化，ROCK Ⅰ和 ROCK Ⅱ也表现为上升的趋势。因此我们初步证实了 RhoA、RhoC、ROCK Ⅰ和 ROCK Ⅱ在正常妊娠过程的胎盘组织中发挥了重要作用。在早孕阶段它们可能参与滋养细胞的侵袭，保证胚胎的顺利植入；中孕阶段参与胎盘血管的重铸，保证胎儿的血供；晚孕阶段则参与滋养细胞的凋亡，促进胎盘的成熟。RhoA、RhoC、ROCK Ⅰ和

ROCKⅡ在妊娠不同时期的表达差异表明该分子的表达可能受到严格的时间调控，其在妊娠任何时期表达失衡都可能导致病理性妊娠，如子痫前期等。研究进一步表明了Rho/ROCK在妊娠中的重要作用，并初步描述了各种蛋白的动态变化特点，为探讨子痫前期等病理性妊娠的发病机制提供了新的线索。

参考文献：

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 第6版. 北京：人民卫生出版社，2004：97－104.

[2] Shiokawa S, Iwashita M, Akimoto Y, *et al*. Small guanosine triphospatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(12): 5808－5816.

[3] Ark M, Yilmaz N, Yazici G, *et al*. Rho-associated protein kinase Ⅱ (rock Ⅱ) expression in normal and preeclamptic human placentas [J]. Placenta, 2005, 26(1): 81－84.

[4] 俞丽丽，李力，陈鸣，等. 寒冷刺激诱发孕鼠妊娠高血压综合征动物模型研究[J]. 第三军医大学学报，2001，23(4)：419－421.

[5] 丁雅明，方廖琼，周兰，等. 不同孕期小鼠羊水对小鼠肝癌细胞H_{22}增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(12)：1136－1139.

[6] Shiokawa S, Sakai K, Akimoto Y, *et al*. Function of the small guanosine triphosphate-binding protein RhoA in the process of implantation [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(12): 4742－4749.

[7] Wheeler A P, Ridley A J. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility[J]. Exp Cell Res, 2004, 301(1): 43－49.

[8] Han J, Li L, Hu J, *et al*. Epidermal growth factor stimulates human trophoblast cell migration through RhoA and RhoC activation[J]. Endocrinology, 2010, 151(4): 1732－1742.

[9] Couderc B, Pradines A, Rafii A, *et al*. *In vivo* restoration of RhoB expression leads to ovarian tumor regression [J]. Cancer Gene Ther, 2008, 15(7): 456－464.

[10] Wang H B, Liu X P, Liang J, *et al*. Expression of RhoA and RhoC in colorectal carcinoma and its relations with clinicopathological parameters[J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47(7): 811－817.

[11] Benoit Y D, Lussier C, Ducharme P A, *et al*. Integrin alpha8beta1 regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells *via* a predominant RhoA/ROCK dependent mechanism [J]. Biol Cell, 2009, 101(12): 695－708.

[12] 吴莉，丁依玲. 子痫前期患者胎盘组织中Rho激酶Ⅱ表达与滋养细胞凋亡的研究[J]. 中国妇产科临床杂志，2006，7(6)：422－425.

（收稿：2011-01-10 修回：2011-02-17）

（编辑 邓强庭）

（上接895页）

入院后予抗感染、保胎及局部湿敷消炎治疗，期间无小便困难、尿潴留等症状。3 d后体温正常，血常规：WBC 10.42×10^9/L，N 80.3%，C-反应蛋白：10.1 mg/L。脱出的宫颈表面分泌减少，肿胀稍有好转，仍无法还纳，溃烂面局部组织坏死触血（图1B），在鞍麻下行宫颈部分切除＋宫颈残端环扎术＋阴道前壁纵隔切除术，术后病理报告为“宫颈化脓性炎症，广泛糜烂，局灶黏膜鳞化并累及腺体，黏膜下血管瘤样增生，灶性平滑肌退变，阴道纵隔黏膜慢性炎症，灶性腺潴留囊肿”。术后抗感染治疗1周，血常规恢复正常，仍有不规律宫缩，继续用盐酸利托君保胎治疗至妊娠37周，拆除宫颈环扎线，宫颈残端长约1 cm。拆线5 d后因不规律宫缩3 d宫口不开，患者拒绝阴道分娩要求行剖宫产术终止妊娠，剖出一活女婴，体质量2 700 g，评分10分。术中探查其为双子宫、双宫颈，左侧子宫妊娠，探查宫腔与切除宫颈相通，右侧子宫如孕3个月大小，双侧附件分别位于两子宫角部，外观正常。术后5 d痊愈出院。出院诊断：①妊娠37^{+2}周，G_5P_2，剖宫产；②宫颈脱垂伴感染；③双子宫畸形；④完全性阴道纵隔。

2 讨论

双子宫畸形为胚胎发育时期两侧副中肾管未融合，各自发育成2个子宫和2个宫颈，双侧子宫各有单一的输卵管和卵巢[1]。双子宫伴阴道纵隔妊娠分娩者并不少见，但双子宫在妊娠晚期出现子宫脱垂并宫颈感染嵌顿者实属少见，据国外文献报道，其发病率为1/10 000～1/15 000，自1941年Keettel首次报道以来，可查到文献不足300例[2-3]。一般情况下妊娠前有子宫脱垂者，在妊娠4个月以后都不再脱出[4]。

本例患者有臀位分娩史，产时其阴道纵隔断裂，盆底组织松弛，未妊娠时虽未出现子宫脱垂，但再次妊娠使腹压增加，盆底松弛组织无法支持增大的子宫，进而发展成子宫脱垂，宫颈外露感染、水肿，造成宫颈嵌顿。对于宫颈脱垂感染是否行手术切除部分宫颈需结合具体病情决定，因为切除部分宫颈后易出现宫颈松弛导致早产。此病例入院后加强抗感染治疗，宫颈肿胀虽较前减轻，表面仍有溃烂面，不能回纳。如发生上行性感染，可能出现胎膜早破，引起绒毛膜羊膜炎[5]、宫内感染、胎死宫内，严重者导致孕妇败血症，危及母儿生命。所以我们果断行嵌顿宫颈切除，去除了感染病灶；考虑到宫颈缩短，相对会变得松弛，易出现早产[6]，术中行宫颈环扎术，术后患者卧床并抬高臀部，给予抑制宫缩治疗，将其安全、有效地保胎至足月。宫颈部分切除术后，宫颈组织因疤痕形成，弹性差，经阴道分娩可能出现宫颈裂伤致大出血，可适当放宽剖宫产指征。

参考文献：

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 第7版. 北京：人民卫生出版社，2008：336－337.

[2] Horowitz E R, Yogev Y, Hod M, *et al*. Prolapse and elongation of the cervix during pregnancy[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2002, 77(2): 147－148.

[3] Sawyer D, Frey K. Cervical prolapse during pregnancy [J]. J Am Board Fam Pract, 2000, 13(3): 216－218.

[4] 朱明喆，孙亚楠，付艳. 妊娠37周子宫脱垂伴宫颈嵌顿1例报告[J]. 吉林大学学报：医学版，2008，34(5)：863.

[5] 薄其秀，刘丛华. 胎膜早破的诱发因素及其对母婴的影响[J]. 山东医药，2003，43(11)：55.

[6] 卞书春. 宫颈环扎术治疗宫颈内口松弛10例[J]. 南通医学院学报，2001，21(1)：87.

（收稿：2011-03-02 修回：2011-03-13）

（编辑 吴培红）