文章编号:1000-5404(2012)02-0141-04

论著

PKC-ε、h1 calponin 在不同孕期小鼠子宫平滑肌中的表达及意义

李乐赛[1],周 婷[2],周昌菊[1] (410013 长沙,中南大学湘雅三医院妇产科[1];410005 长沙,湖南师范大学附属省人民医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨蛋白激酶 C epsilon(protein kinase C epsilon,PKC-ε)及碱性调宁蛋白(h1 calponin ,h1 CaP)在妊娠小鼠子宫平滑肌细胞中总蛋白和磷酸化蛋白的时空表达变化及与足月临产、早产的关系和机制。**方法** 建立小鼠酒精灌胃早产模型。按妊娠阶段的不同,将小鼠分为未孕组、早孕组(孕7 d)、中孕组(孕12 d)、晚孕组(孕18 d)、足月产组和早产组,每组各10例。应用 Western blot 检测子宫平滑肌中 PKC-ε、磷酸化 PKC-ε(pPKC-ε)、h1 CaP、磷酸化 h1 CaP(ph1 CaP)的蛋白表达。**结果** 足月产组和早产组 PKC-ε 蛋白表达均显著高于未孕、早孕、中孕组($P<0.01$),晚孕组、足月产组、早产组相比较差异无统计学意义($P>0.05$);足月产组和早产组 h1 CaP 蛋白表达均显著高于未孕、早孕、中孕组($P<0.01$),晚孕组、足月产组、早产组相比较,差异无统计学意义($P>0.05$);足月产组和早产组 pPKC-ε/PKC-ε 值均显著高于未孕、早孕、中孕组及晚孕组($P<0.01$),足月产组与早产组相比较差异无统计学意义($P>0.05$);足月产组和早产组 ph1 CaP/h1 CaP 值均显著高于未孕、早孕、中孕组及晚孕组($P<0.01$),足月产组与早产组相比较差异无统计学意义($P>0.05$);pPKC-ε/PKC-ε 的变化与 ph1 CaP/h1 CaP 的变化呈正相关($r=0.73$,$P<0.05$)。**结论** PKC-ε 及 h1 CaP 蛋白表达在临产前即达到最高峰,pPKC-ε 及 ph1 CaP 水平在临产时达最高峰。PKC-ε 可通过激活 h1 CaP 参与足月产及早产的分娩发动。

[关键词] 蛋白激酶 C epsilon;碱性调宁蛋白;分娩启动;早产;子宫平滑肌
[中图法分类号] R714.12;R322.65;R329.26 [文献标志码] A

Expressions of PKC-ε and h1 calponin in myometrium of pregnant mice at different period of pregnancy

Li Lesai[1], Zhou Ting[2], Zhou Changju[1] ([1]Department of Gynecology and Obstetrics, Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan Province, 410013; [2]Department of Gynecology and Obstetrics, Provincial People's Hospital, Hunan Normal University, Changsha, Hunan Province, 410005, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate level changes of protein kinase C epsilon (PKC-ε)/phosphorylated PKC-ε (pPKC-ε) and h1 calponin (h1 CaP)/phosphorylated h1 CaP (ph1 CaP) in myometrium of pregnant mice during pregnancy, and to investigate their relationship with labor at term and preterm and the involved mechanisms. **Methods** Pregnant mice were given 6 mg/g ethanol by gavage to construct mouse model of preterm labor. According to different periods of pregnancy, mice were divided into a non-pregnancy (NP) group, an early pregnancy (EP, gestational day 7) group, a middle pregnancy (MP, gestational day 12) group, a late pregnancy (LP, gestational day 18) group, a term labor (TL) group and a preterm labor (PL) group. Each group included 10 mice. Protein levels of PKC-ε/pPKC-ε and h1 CaP/ph1 CaP in mice myometrium were detected by Western blotting. **Results** Protein levels of PKC-ε and h1 Cap in the TL and PL groups were significantly higher than those in the NP, EP and MP groups ($P<0.01$), while the differences among the LP, TL and PL groups were not significant ($P>0.05$). The ratios of pPKC-ε/PKC-ε and ph1 CaP/h1 CaP in the TL and PL groups were significantly higher than those in the NP, EP, MP and LP groups ($P<0.01$), while the difference between the TL and PL groups was not significant ($P>0.05$). The change of pPKC-ε/PKC-ε was positively correlated with the change of ph1 CaP/h1 CaP ($r=0.73$, $P<0.05$). **Conclusion** Protein levels of PKC-ε and h1 CaP in mice myometrium both reach the peak at pre-labor. Levels of pPKC-ε and ph1CaP both reach the peak at parturition. PKC-ε is suggested to contribute to the initiation of term and preterm labor through h1 CaP phosphorylation.

[基金项目] 湖南省科技厅科技计划项目(2010SK3126);湖南省博士生科研创新项目(CX2010B059)
[通信作者] 周昌菊,电话:(0731) 88618493,E-mail:zhouchanju8816@yahoo.com.cn

[**Key words**] protein kinase C epsilon; h1 calponin; initiation of labor; preterm labor; myometrium

Supported by the Sci-Tech Project of Department of Science and Technology of Hunan Province (2010SK3126) and a PhD Innovation Grant from Hunan Province (CX2010B059). Corresponding author: Zhou Changju, Tel: 86-731-88618493, E-mail: zhouchanju8816@yahoo.com.cn

宫缩抑制剂的使用已超过半个世纪,但早产的发生率仍未下降[1]。若要更有效的干预和治疗早产,必须阐明足月临产和早产的启动机制。我课题组前期研究发现,人类临产后,子宫平滑肌细胞中碱性调宁蛋白(h1 calponin,h1 CaP)的表达水平较未临产时明显上调[2-3]。h1 CaP是一种细肌丝相关蛋白,参与平滑肌收缩的调控。有研究提示:血管平滑肌细胞受到外界刺激时,蛋白激酶C epsilon(protein kinase C epsilon,PKC-ε)可作为上游因子,促进h1 CaP的磷酸化,通过下游一系列级联反应,最终引起平滑肌收缩[4]。由于不同部位、不同类型的平滑肌收缩机制有差异[4],PKC-ε及h1 CaP在子宫平滑肌的收缩调控中是否存在着类似的机制尚属未知。随着妊娠进展,子宫平滑肌中PKC-ε、h1 CaP的蛋白表达水平及磷酸化程度发生怎样的变化,这种变化与分娩启动有着怎样的关系都有待研究。本研究应用孕鼠及早产模型,通过检测不同孕期、足月产和早产时小鼠子宫平滑肌组织中PKC-ε、磷酸化PKC-ε(pPKC-ε)、h1 CaP、磷酸化h1 CaP(ph1 CaP)表达水平的变化,探讨PKC-ε、h1 CaP在孕鼠子宫平滑肌中不同时间节点的规律及与分娩的关系和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物来源、分组及标本处理

BALB/c小鼠由湖南师范大学生命科学院提供并饲养。共90只,30只雄性,60只雌性。体质量25~30 g,60~80日龄,适应性养殖1周后,按雄:雌为1:2的比例合笼交配,次日8:00检查阴道栓,见栓者定为妊娠第0天。随机取孕鼠共分为5组:早孕组(孕7 d)、中孕组(孕12 d)、晚孕组(孕18 d)、足月临产组(足月分娩第1胎鼠仔时)及早产组各组10只,健康未孕雌鼠10只作为对照组(NP)。无菌取各组小鼠子宫平滑肌,清除内膜,生理盐水清洗后投入液氮储存待测。

1.2 小鼠早产模型的建立

参照Morgan等[5]的方法建立小鼠早产模型:取孕鼠10只,于妊娠第16天予20%酒精,以6 mg/g一次性灌胃诱发早产。孕鼠于孕19 d前自然分娩视为建模成功。成功获取7只早产小鼠,早产率70%。早产小鼠自然分娩1只胎仔时立即剖宫取子宫平滑肌组织。

1.3 主要材料与试剂

超低温冰箱为日本Sanyo公司产品。低温高速离心机为美国Beckman公司产品。兔抗人PKCε单克隆抗体购自美国Millipore公司,兔抗人磷酸化PKC-ε抗体购自美国Abcam公司,特异性检测PKC-ε丝氨酸729位点磷酸化蛋白表达。兔抗人h1 CaP单克隆抗体购自美国Millipore公司,兔抗人磷酸化h1 CaP抗体购自美国Santa Cruz公司,特异性检测h1 CaP丝氨酸175位点磷酸化蛋白表达。

1.4 Western blot检测

按细胞总蛋白的提取方法提取总蛋白,10 μl蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,电转至NC膜上,5%脱脂牛奶37 ℃封闭2 h。1:1 000稀释的一抗5 ml,室温孵育2 h,TBST洗涤3次。加入1:5 000稀释的二抗,室温孵育1 h,TST洗涤3次,ECL试剂发光及胶片显影。图片扫描后,并用Image J分析软件将图片上每个特异条带灰度值的数字化。

1.5 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素分析,组间差异比较采用LSD-t检验。

2 结果

2.1 PKC-ε、h1 CaP在不同妊娠阶段及早产小鼠子宫平滑肌中的表达

在妊娠小鼠子宫平滑肌组织中,PKC-ε总蛋白表达量足月产组、早产组显著高于未孕、早孕、中孕组($P<0.01$),早产组、足月产组、晚孕组PKC-ε总蛋白表达量差异无显著性($P>0.05$);h1 CaP总蛋白表达量足月产组、早产组显著高于未孕、早孕、中孕组($P<0.01$),足月产组、晚孕组、早产组差异无显著性($P>0.05$)。见图1、2。

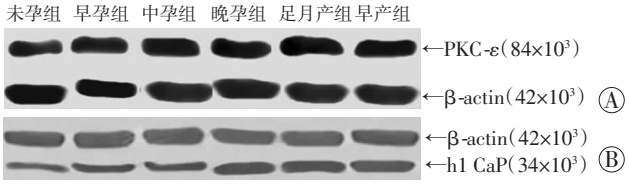
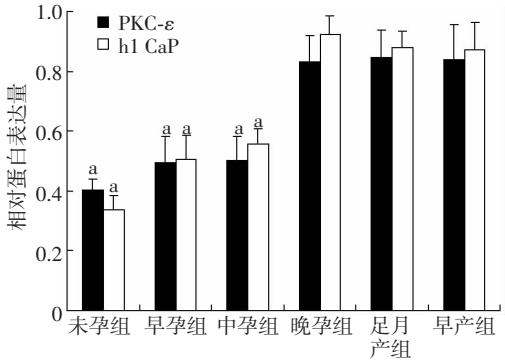


图1 各组小鼠子宫平滑肌细胞PKC-ε(A)与h1 CaP(B)总蛋白表达水平



a:$P<0.01$,与足月产组及早产组比较

图2 各组小鼠子宫平滑肌细胞PKC-ε、h1 CaP总蛋白相对表达水平

2.2 pPKC-ε、ph1 CaP在不同妊娠阶段及早产小鼠子宫平滑肌中的表达

在妊娠小鼠子宫平滑肌组织中,pPKC-ε/PKC-ε值足月产组、早产组显著高于未孕、早孕、中孕、晚孕组($P<0.01$),足月产组与早产组差异无显著性($P>0.05$)。ph1 CaP/h1 CaP值为

足月产组、早产组显著高于未孕、早孕、中孕、晚孕组($P<0.01$),足月产组与早产组间无显著差异($P>0.05$)。见图 3、4。

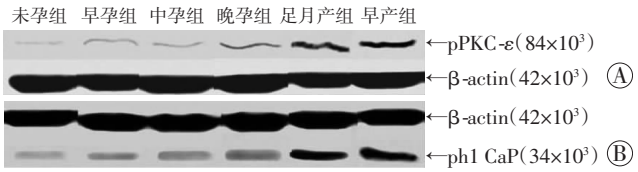
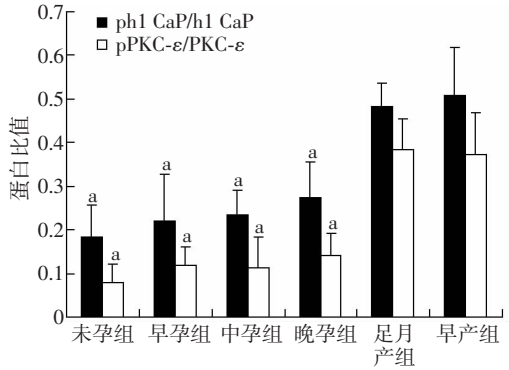


图 3　各组小鼠子宫平滑肌细胞 pPKC-ε(A)与 ph1 CaP(B)蛋白表达水平



a:$P<0.01$,与足月产组及早产组比较

图 4　各组小鼠子宫平滑肌细胞磷酸化蛋白/总蛋白值变化

2.3　pPKC-ε 与 ph1 CaP 的相关性分析

pPKC-ε/PKC-ε 的变化与 ph1 CaP/h1 CaP 的变化呈正相关($r=0.76, P<0.05$)。

3　讨论

本研究应用孕鼠及早产小鼠模型观察不同妊娠阶段、不同分娩状态下小鼠子宫平滑肌细胞中 PKC-ε 及 h1 CaP 蛋白表达及磷酸化变化情况,发现:①PKC-ε 及 h1 CaP 总蛋白水平随孕期进展而上升,孕晚期达高峰并持续至分娩发动后;② h1 CaP 及 PKC-ε 的磷酸化水平在分娩发动后显著增加;③PKC-ε 及 h1 CaP 总蛋白表达及磷酸化水平在足月产与早产时无显著差异。

h1 CaP 属于肌动蛋白细胞骨架结合蛋白,其功能包括调节肌动蛋白细胞骨架重构、参与平滑肌收缩等方面[6]。本研究发现 h1 CaP 的蛋白表达水平在妊娠期逐渐升高。妊娠期子宫平滑肌细胞经历拉伸、肥大等适应性改变,该过程中子宫平滑肌细胞中的肌丝及细胞骨架发生断裂及破坏,这将需要更多的相关蛋白来修复,因此表现为 h1 CaP 的总蛋白含量增加。小鼠子宫平滑肌中 h1 CaP 总蛋白表达在临产前达到高峰,并持续至临产,这与我们前期报道的人类子宫平滑肌中的结果稍显不一致:人类 h1 CaP 的蛋白表达在临产时达高峰,显著高于晚孕未临产组。这种不一致我们推测与以下因素有关:①人类标本收集受伦理学因素制约,采样时间及分组受限制,导致结果的差异;②小鼠与人类的妊娠维持及分娩发动机制可能稍有差异。

来自血管平滑肌的研究表明,h1 CaP 调控平滑肌收缩的机制为:PKC 使 h1 CaP 磷酸化后,h1 CaP 与肌动球蛋白解离,平滑肌收缩[5];脱磷酸化的 h1 CaP 可抑制肌动球蛋白横桥形成,平滑肌松弛。由此可见,h1 CaP 的磷酸化状态对平滑肌收缩的调控起了关键的作用[7]。本研究中 ph1 CaP/h1 CaP 值在足月产组及早产组达最高峰,提示分娩启动与 h1 CaP 蛋白大量发生磷酸化相关。我们检测的是 h1 CaP 蛋白的丝氨酸 175 位点,这是 PKC 使 h1 CaP 磷酸化的位点,表明 PKC 参与了子宫平滑肌中 h1 CaP 磷酸化的激活过程。

PKC-ε 是属于新型 PKC 的一种亚型[8],PKC-ε 的 C2 区可与 h1 CaP 的 160～182 位点直接绑定[9]。我们发现 PKC-ε 总蛋白水平变化趋势与 h1 CaP 总蛋白的变化一致。而 Kim 等[10]在大鼠子宫平滑肌中检测到 PKC-ε 的蛋白表达随妊娠进展逐渐下降,原因可能在于其实验方法与我们不同,他没有直接提取子宫平滑肌的总蛋白,而是抽提胞浆和包膜的蛋白分别测定。pPKC-ε/PKC-ε 值在足月分娩及早产时达高峰,这也与 h1 CaP 蛋白磷酸化的趋势一致,相关性分析也提示 pPKC-ε/PKC-ε 与 ph1 CaP/h1 CaP 呈正相关。推测:妊娠期 PKC-ε 及 h1 CaP 都处于相对静息状态,此时 h1 CaP 可通过抑制肌动球蛋白横桥形成来抑制子宫平滑肌收缩,从而维持妊娠;分娩启动的信号使 PKC-ε 活化,进而激活 h1 CaP,表现为 h1 CaP 蛋白磷酸化水平显著增加,子宫平滑肌收缩的抑制解除,分娩启动。

早产是分娩提前发动的一种病理状态,早产的动物模型有很多种,从传统的切除双侧卵巢加雌激素诱导早产到脂多糖、白介素、前列腺素诱导早产的模型都各有优劣[11]。酒精灌胃诱导早产模型操作简单,成模率高(93%)[5],故本课题选用该模型初步研究 PKC-ε 及 h1 CaP 蛋白在早产发动时的变化。小鼠早产时 PKC-ε、h1 CaP 的总蛋白表达及磷酸化水平均与足月产时无差异,提示酒精不影响 PKC-ε 及 h1 CaP 的总蛋白及磷酸化蛋白水平改变,PKC-ε/h1 CaP 信号通路的激活可能是小鼠足月分娩,早产的共同过程。

综上,PKC-ε 及 h1 CaP 总蛋白表达在临产前即达到最高峰并持续到分娩发动后,pPKC-ε 及 ph1 CaP 水平在临产时达最高峰。PKC-ε 可通过激活 h1 CaP 参与足月产及早产的分娩发动。今后我们将采用 PKC-ε 的特异性激动剂及抑制剂干预来探讨该通路对子宫平滑肌收缩的调控,以期深入理解该通路在分娩启动及早产中的作用,为早产的防治提供新思路。

参考文献:

[1] Preterm birth: crisis and opportunity[J]. Lancet, 2006, 368(9533): 339.

[2] 陈倩, 谷永红, 周昌菊, 等. Calponin-1 和 Transgelin 蛋白在临产前后妊娠子宫平滑肌中的表达[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(10): 1073 - 1079.
[3] 马薇. 临产前后人子宫平滑肌的比较蛋白质组学研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
[4] Kim H R, Appel S, Vetterkind S, *et al*. Smooth muscle signalling pathways in health and disease[J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(6A): 2165 - 2180.
[5] Morgan K G, Gangopadhyay S S. Invited review: cross-bridge regulation by thin filament-associated proteins[J]. J Appl Physiol, 2001, 91(2): 953 - 962.
[6] 董丽华, 韩梅, 温进坤. Calponin 蛋白家族在细胞骨架重构中的作用[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(3): 321 - 324.
[7] Kreipke C W, Rafols J A. Calponin control of cerebrovascular reactivity: therapeutic implications in brain trauma[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(2): 262 - 269.
[8] Newton P M, Messing R O. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon[J]. Biochem J, 2010, 427(2): 189 - 196.
[9] Leinweber B, Parissenti A M, Gallant C, *et al*. Regulation of protein kinase C by the cytoskeletal protein calponin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(51): 40329 - 40336.
[10] Kim B, Kim Y S, Ahn J, *et al*. Conventional-type protein kinase C contributes to phorbol ester-induced inhibition of rat myometrial tension[J]. Br J Pharmacol, 2003, 139(2): 408 - 414.
[11] Mitchell B F, Taggart M J. Are animal models relevant to key aspects of human parturition? [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2009, 297(3): R525 - R545.

(**收稿**:2011-08-01;**修回**:2011-09-29)
(编辑 吴培红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2012)02-0144-01

HELLP 综合征并发可逆性脑后部白质病变综合征 1 例

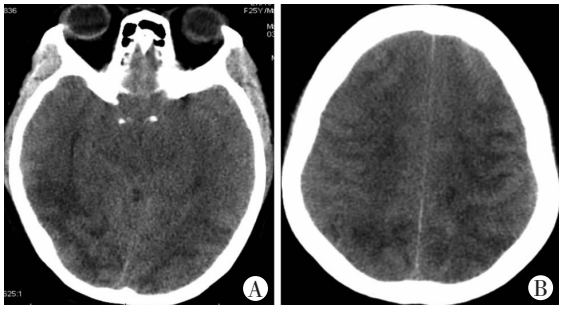
吴兆敏,杨 琴 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[**关键词**] HELLP 综合征;可逆性脑后部白质病变;产后子痫
[**中图法分类号**] R714.24 [**文献标志码**] B

HELLP 综合征(hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome, HELLP syndrome)是妊娠期高血压疾病的严重并发症,以溶血、肝酶升高及血小板减少为特点,常危及母儿生命[1]。可逆性脑后部白质病变综合征(reversible posterior leukoencephalopathy syndrome, RPLS),由 Hinchey 于 1996 年提出,是一种临床影像学疾病。在影像学上主要显示脑后部(尤其是顶枕区)皮质和皮质下水肿。RPLS 可发生在高血压脑病、子痫、高血压伴随肾功能不全和免疫抑制剂或抗肿瘤药物治疗并发症。如果治疗及时恰当,RPLS 是可逆的。近年来 RPLS 逐渐增多,但与 HELLP 综合征同时存在的国外报道也仅数例[2-4],国内少见报道。现就我院 2011 年诊治的 1 例 HELLP 综合征合并 RPLS 报告如下,以提高对该病的认识。

1 临床资料

患者,女性,25 岁,主因"剖宫产术后 15 h,头痛 12 h,突发呼之不应 8 h"于 2011 年 3 月 21 日入我院。患者当日于外院行剖宫产,术中、术后无大出血,产后患者一般情况可,神清,可自由交流。产后 3 h 患者出现头昏、头痛、视物模糊、恶心、呕吐。测血压 180/100 mmHg,考虑"子痫",予"冬眠合剂"治疗无明显缓解。产后 7 h 突发呼之不应而转入我院。在我院急诊室四肢抽搐 1 次。既往体健,怀孕期间无呕吐等妊高征表现。入院查体:浅昏迷,左侧瞳孔 3 mm,光反射迟钝;右侧瞳孔 6 mm,光反射消失。双侧球结膜水肿,压眶未见四肢活动,四肢腱反射(++),左侧病理症阳性。头颅 CT 示:双侧颞顶枕叶见对称性不规则低密度灶(图 1)。脑电图重度弥漫性异常。血常规:红细胞 3.52×10^{12}/L,白细胞 17.93×10^{9}/L,中性粒细胞百分比 80.9%,血小板 29×10^{9}/L,血红蛋白 104 g/L;外周血涂片可见破碎红细胞。肝功:白蛋白 25 g/L,总胆红素 44.1 μmol/L,丙氨酸转氨酶 590 U/L,天冬氨酸转氨酶 1 135 U/L,乳酸脱氢酶 14 169 U/L;肾功:血肌酐 137 μmol/L;尿常规:尿蛋白 +++。凝血功能:严重异常。结合患者产后有血压高、抽搐、溶血、肝酶增高、血小板减少、头颅 CT 示双侧颞顶枕叶白质见对称性不规则低密度灶,故诊断:①妊娠子痫;②HELLP 综合征;③可逆性脑后部白质病变综合征;④剖宫产术后;⑤肺部感染;⑥上消化道出血。入院后积极给予降血压,降颅内压,静脉输地塞米松,输血小板、血浆、红细胞及白蛋白,止血,保肝及血液滤过等治疗,患者溶血、肝酶、血小板、血红蛋白、白蛋白曾一过性改善,但终因合并多器官功能衰竭而死亡。



A:双侧颞枕叶低密度灶;B:双侧顶叶低密度灶

图 1 HELLP 综合征合并 RPLS 患者的头颅 CT 表现

(下转 149 页)

[**通信作者**] 杨 琴,E-mail: xyqh200@126.com