短篇论著

文章编号:1000-5404(2012)05-0458-03

早产子宫平滑肌组织中前列腺素合成酶-2表达的调控机制

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

[摘要] **目的** 初步研究早产子宫平滑肌组织中调控PGHS-2表达的分子机制。**方法** 采用胶原酶原代培养早产子宫平滑肌细胞,Western blot检测该细胞中调控PGHS-2表达的信号分子NF-κB p65蛋白的表达和迁移情况;检测子宫平滑肌组织中MAPK信号分子的表达情况。**结果** 采用胶原酶消化法,成功培养原代子宫平滑肌细胞并免疫组化鉴定;与对照组比较,PGE_2显著抑制子宫平滑肌细胞中NF-κB p65蛋白的表达($P<0.05$),呈时间依赖性;LPS和IL-1β刺激细胞后,NF-κB p65蛋白由细胞质向细胞核迁移,参与PGHS-2转录活化;加入PGE_2后,该迁移效应被显著抑制;在早产子宫平滑肌组织中,MAPK信号分子JNK1/2/3与p38激酶的磷酸化水平较足月产显著增加($P<0.05$)。**结论** 早产子宫平滑肌组织中,PGE_2显著抑制NF-κB P65蛋白的表达和活化;PGHS-2的表达调控可能与MAPK信号通路直接相关。

[关键词] 早产;子宫平滑肌细胞;PGHS-2;调控机制
[中图法分类号] R714.21; R322.65; R394.1 [文献标志码] A

前列腺素在分娩的发动和维持中发挥关键作用。前列腺素合成酶-2(prostaglandin H synthase type-2,PGHS-2)作为调控前列腺素合成的关键酶,被认为与分娩发动直接相关[1];细胞内相关信号通路如核转录因子(nuclear transcription factor-κB,NF-κB)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)均参与其表达调控[2]。我们在前期研究中发现:未临产时,早产子宫平滑肌组织中PGHS-2的表达显著高于足月产;临产后,早产子宫平滑肌组织中PGHS-2的表达却低于足月产[3]。该表达差异提示早产子宫平滑肌组织中PGHS-2的调控可能与足月产不同,本实验我们将初步探讨早产子宫平滑肌组织中调控PGHS-2表达的分子机制。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取本院妊娠32~36^{+6}周行剖宫产终止妊娠患者(手术指征包括胎儿窘迫、先露异常、前置胎盘等),患者均早产临产,术前充分知情同意。在行子宫下段剖宫产手术时,于胎儿取出后从子宫切口切缘取10 mm×10 mm×5 mm肌层组织,生理盐水冲净血迹和羊水后,置于消毒瓶(内置培养液+双抗),冰浴状态下30 min内移至实验室分离培养。同时选取妊娠37周后行剖宫产终止妊娠患者(已临产)子宫平滑肌组织对比研究。

1.2 试剂及配制

①培养液:胎牛血清+DMEM培养基(Invitrogen公司)+双抗、青霉素100 U/ml+链霉素100 U/ml(华北制药,河北);②消化液:Ⅱ型胶原酶(Amersco公司)溶于培养基中,浓度为0.2 mg/ml;③抗体:小鼠抗人α-actin抗体和Desmin抗体购自中杉金桥公司;兔抗人PGHS-2多克隆抗体、p38磷酸化抗体、JNK1/2/3磷酸化抗体、ERK1/2磷酸化抗体购自Cell Signaling Technology公司;兔抗人NF-κB p65多克隆抗体及IκBa抗体购自碧云天公司;④Western blot试剂:4%~12% Bis-Tris预制胶等购自Invitrogen公司;⑤前列腺素E_2(prostaglandin E_2,PGE_2)和DAPI RIPA试剂购自Sigma公司。

1.3 实验方法

1.3.1 子宫平滑肌细胞的分离培养及鉴定 将子宫平滑肌组织修剪为2 mm×2 mm×2 mm大小,加入消化液消化约12 h后,离心,去上清液,加培养液吹打混匀后接种培养1~2 d,2 d换液1次,倒置显微镜观察细胞生长情况。8~10 d细胞贴壁达90%时,即可传代。胰酶消化传代后培养3 d,常规方法固定,加入1∶100稀释的小鼠抗人α-actin抗体或Desmin抗体;激光共聚焦显微镜观察相应蛋白着色情况。

1.3.2 Western blot检测PGE_2对培养的子宫平滑肌细胞NF-κB p65表达的影响 将子宫平滑肌细胞分为2组,分别加入1 μmol/L PGE_2和相同体积的PBS继续培养。于第8、16、24小时用RIPA细胞裂解液法提取总蛋白,4%~12% Bis-Tris预制胶电泳,常规电转印过夜;加入1∶1 000稀释兔抗人NF-κB p65的多克隆抗体及二抗,加入发光液,暗室胶片曝光显影、定影。

1.3.3 激光共聚焦观察PGE_2对炎症因子引起的NF-κB p65的细胞核迁移效应 子宫平滑肌细胞培养24~48 h后分3组:1组不进行任何刺激作为正常对照,1组加入1 μmol/L PGE_2,1组加入等量的PBS;继续培养24 h,后2组各自再分别用10 mg/ml脂多糖(LPS)及10 ng/ml IL-1β刺激3 h。常规方法固定,加入1∶100稀释的兔抗人NF-κB p65抗体;再加入DAPI染色液,激光共聚焦显微镜下观察NF-κB p65的表达及核迁移。

1.3.4 Western blot检测子宫平滑肌组织PGHS-2相关的信号通路分子的表达 取子宫平滑肌组织,用RIPA细胞裂解液法提取总蛋白。4%~12% Bis-Tris预制胶电泳,常法电转印过夜;分别加入兔抗人p38磷酸化抗体(1∶1 000)、JNK1/2/3磷酸化抗体(1∶1 000)、ERK1/2磷酸化抗体(1∶1 000)、NF-κB

[基金项目] 国家自然科学基金(30901611)
* 同等贡献者
[通信作者] 常 青,电话:(023)68765399

p65 多克隆抗体(1∶1 000)、IκBa 抗体(1∶500)及 HRP 标记山羊抗兔二抗(1∶10 000)室温孵育 1 h 后用 0.1% TBST 洗涤;加入底物溶液,暗室胶片曝光显影、定影。

1.4 结果处理及统计学方法

原代培养的人子宫平滑肌细胞采用 Cimple PCI 6.0 图像分析系统分析培养结果;Western blot 结果采用定量分析: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。激光共聚焦显微镜观察细胞内蛋白分子的表达及位置变化。采用 SPSS 10.0 统计软件进行配对样本 t 检验。

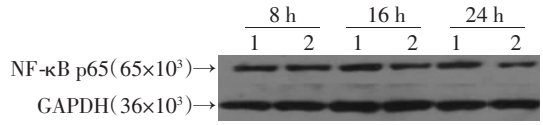
2 结果

2.1 子宫平滑肌细胞的分离培养及鉴定

体外培养的子宫平滑肌细胞呈长梭形伸展开(图 1A)。经平滑肌特异性抗原 α-actin 和 Desmin 染色,细胞阳性表达(图 1B、C),证实培养成功。体外培养的子宫平滑肌细胞需 8 ~ 10 d 爬满瓶壁,经胰蛋白酶消化后,可稳定传代生长。

2.2 PGE_2 对子宫平滑肌细胞 NF-κB p65 蛋白表达的影响

加入 PGE_2 8、16、24 h 后 NF-κB p65 蛋白分别表达为(978.8 ± 87.1)、(2 257.0 ± 118.8)和(1 910.0 ± 96.9);均显著高于相应对照组(794.3 ± 76.5)、(2 109.0 ± 89.4)、(1 707.4 ± 87.8)($P < 0.05$),该作用呈时间依赖性,在 PGE_2 作用 16 h 后尤为显著(图 2)。



1:加入 PBS 培养;2:加入 1 μmol/L PGE_2 培养

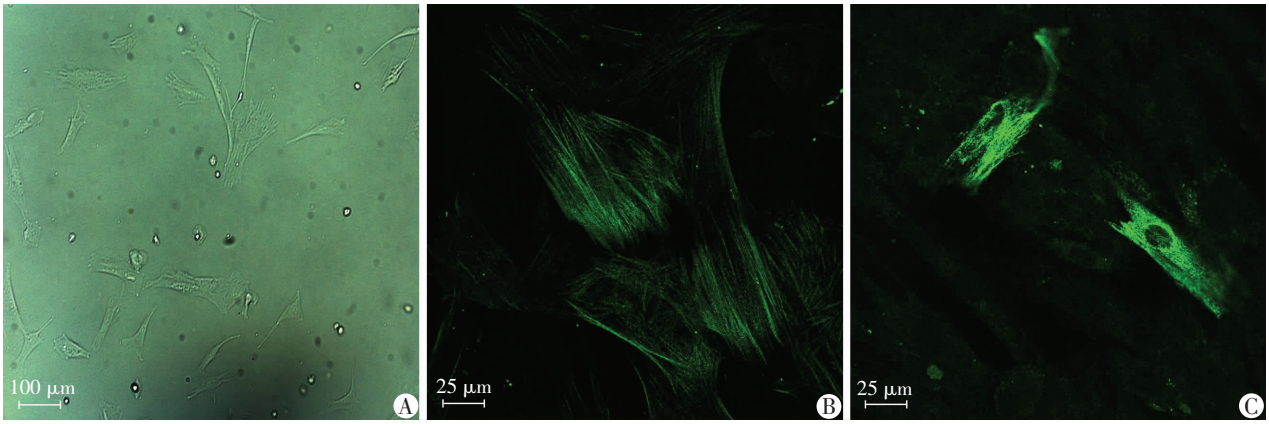
图 2 PGE_2 对培养的子宫平滑肌细胞中 NF-κB p65 表达的影响

2.3 PGE_2 对炎症因子 LPS 和 IL-1β 引起的 NF-κB p65 蛋白细胞核迁移效应的影响

LPS 和 IL-1β 刺激后显著引起 NF-κB p65 蛋白由细胞质向细胞核迁移;加入 PGE_2 后,NF-κB p65 核迁移程度显著低于不加 PGE_2 组(图 3)。

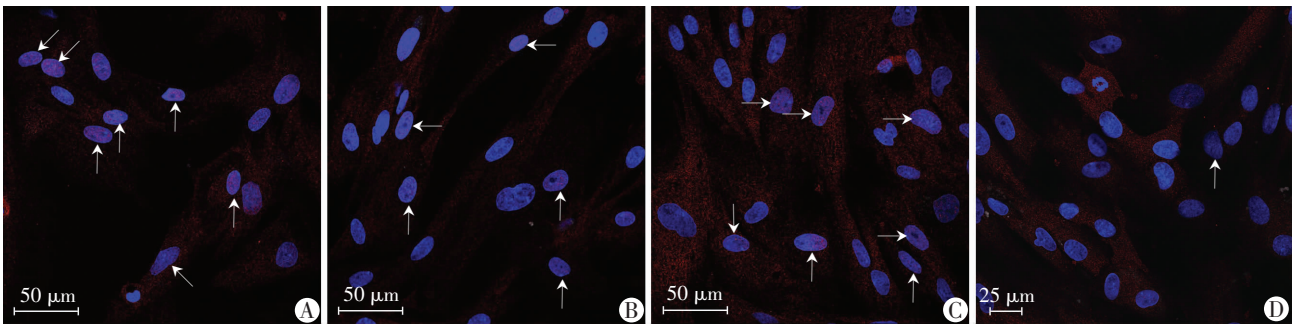
2.4 子宫平滑肌组织 PGHS-2 相关信号通路分子的表达

在早产子宫平滑肌组织中,MAPK 信号分子 JNK1/2/3 与 p38 激酶的磷酸化水平显著高于足月产($P < 0.05$),ERK1/2 的磷酸化水平无显著差别($P > 0.05$);NF-κB p65 以及 IκBa 的表达在早产与足月产之间未见显著差异($P > 0.05$,图 4)。



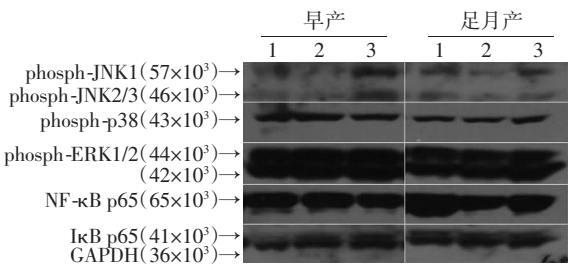
A:倒置显微镜下子宫平滑肌细胞形态;B:激光共聚焦显微镜下 α-actin 蛋白表达;C:激光共聚焦显微镜下 Desmin 蛋白表达

图 1 子宫平滑肌细胞的分离培养及鉴定



A:IL-1β 刺激未经 PGE_2 预处理的细胞;B:IL-1β 刺激经 PGE_2 预处理的细胞;C:LPS 刺激未经 PGE_2 预处理的细胞;D:LPS 刺激经 PGE_2 预处理的细胞 ↑:NF-κB p65 出现明显核转移的细胞

图 3 PGE_2 对炎症因子 LPS 和 IL-1β 引起的 NF-κB p65 蛋白细胞核迁移效应的影响



1~3：3个随机抽取样本

图4 Western blot检测早产与足月产子宫平滑肌组织PGHS-2相关信号通路分子的表达

3 讨论

离体培养的子宫平滑肌细胞仍然表达性激素、前列腺素和催产素等受体[4]，表明分离和培养过程并未改变细胞特异蛋白的表达。原代细胞培养的成功与否和分离的细胞活力及接种密度相关。利用胶原酶消化作用强，不影响细胞活力的优点消化组织，在保证细胞接种密度达到10^4/ml以上，可确保培养成功。经过α-actin或Desmin免疫组化染色，证实本方法培养的原代细胞为目的细胞且未改变原有细胞特征，可满足后续实验需要。

NF-κB信号通路参与PGHS-2的表达调控[5]。足月临产后，炎症因子IL-1β等激活NF-κB信号通路，增加PHGS-2表达上调，前列腺素(PGs)生成增加，参与分娩发动[6]。前期研究中我们发现早产临产后PGHS-2的表达显著低于足月临产，与文献[7]报道一致。P65是NF-κB的激活亚单位[8]，而PGHS-2在妊娠及分娩中的作用是通过PGs来发挥的[9]。本研究中，我们发现PGE_2显著抑制NF-κB P65蛋白的表达；同时PGE_2可抑制IL-1β和LPS引起的子宫平滑肌细胞中NF-κB p65蛋白向胞核内迁移，而该迁移作用正是NF-κB途径激活的重要步骤[8]。由于早产临产后，PGE_2对NF-κB P65蛋白的表达和激活均存在抑制作用，从而抑制NF-κB信号通路的激活，可以解释早产临产后PGHS-2表达显著降低的原因。

研究发现：细胞内相关信号通路如NF-κB、MAPK均参与PGHS-2的表达调控[2]。MAPK家族(JNK1/2/3、ERK、p38)分子磷酸化表明其被激活[10]，MAPK信号通路是否也参与早产临产时PGHS-2的表达调控？本研究中，早产子宫平滑肌组织中MAPK-JNK1/2/3及p38激酶磷酸化水平显著高于足月产，尽管ERK激酶未见明显增高，但也说明早产时，MAPK途径已被相关刺激因子激活，进而参与PGHS-2的表达调控及分娩启动；但其具体途径尚需继续研究。

已有的研究表明[11]：足月产子宫平滑肌组织中PGHS-2的表达上调与MAPK和NF-κB信号通路激活相关。本研究表明：与足月产比较，早产子宫平滑肌组织中MAPK信号分子JNK1/2/3与p38激酶的表达明显增加；而PGE_2抑制体外平滑肌细胞中NF-κB p65的表达和活化则提示：PGHS-2的产物PGs参与了NF-κB信号通路对PGHS-2的调控。本研究结果说明早产与足月分娩发动机制不尽相同，PGHS-2的表达可能与MAPK途径直接相关，但其具体分子机制仍需深入研究。

参考文献：

[1] Gauvreau D, Moisan V, Roy M, *et al*. Expression of prostaglandin E synthases in the bovine oviduct[J]. Theriogenology, 2010, 73(1): 103-111.

[2] Tsai A L, Kulmacz R J. Prostaglandin H synthase: resolved and unresolved mechanistic issues[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 493(1): 103-124.

[3] 张利宏，陈诚，王琳，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2010，23(10)：1083-1086.

[4] Sampey B P, Lewis T D, Barbier C S, *et al*. Genistein effects on stromal cells determines epithelial proliferation in endometrial co-cultures[J]. Exp Mol Pathol, 2011, 90(3): 257-263.

[5] Lappas M, Rice G E. Transcriptional regulation of the processes of human labour and delivery[J]. Placenta, 2009, 30 Suppl A: S90-S95.

[6] Braun T, Li S, Moss T J, *et al*. Differential appearance of placentomes and expression of prostaglandin H synthase type 2 in placentome subtypes after betamethasone treatment of sheep late in gestation[J]. Placenta, 2011, 32(4): 295-303.

[7] Markovic D, Vatish M, Gu M, *et al*. The onset of labor alters corticotropin-releasing hormone type 1 receptor variant expression in human myometrium: putative role of interleukin-1beta[J]. Endocrinology, 2009, 148(7): 3205-3213.

[8] Diaz-Munoz M D, Osma-Garcia I C, Cacheiro-Llaguno C, *et al*. Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages[J]. Cell Signal, 2010, 22(10): 1427-1436.

[9] Arrowsmith S, Kendrick A, Wray S. Drugs acting on the pregnant uterus[J]. Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine, 2010, 20(8): 241-247.

[10] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, *et al*. The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(9): 1619-1633.

[11] Blitek A, Waclawik A, Kaczmarek M M, *et al*. Effect of estrus induction on prostaglandin content and prostaglandin synthesis enzyme expression in the uterus of early pregnant pigs[J]. Theriogenology, 2010, 73(9): 1244-1256.

（收稿：2011-09-03；修回：2011-10-23）

（编辑 王小寒）