妊娠合并症

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001339

IL-27及其受体在未足月胎膜早破发病中的相关研究

王寒冰，尹楠林，袁　雨，漆洪波
（重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探讨白介素-27（interleukin-27，IL-27）及其特异性受体 WSX-1/TCCR 诱导人胎膜组织产生炎性效应在未足月胎膜早破中的作用。**方法**：①将手术室收集到的胎膜组织分为正常足月组和未足月胎膜早破组，将培养的胎膜组织分为对照组、实验组（IL-27 处理 12 h 组以及 IL-27 处理 24 h 组）；②Western blot 和免疫组化分析 WSX-1 在未足月胎膜早破早产和正常足月孕妇胎膜组织中的表达；③培养原代人胎膜组织，鉴定其是否存活；④IL-27 处理培养的胎膜组织，提取处理的人胎膜组织蛋白，用荧光定量 PCR 和明胶酶谱检测 MMP2、MMP9 的表达。**结果**：①IL-27 特异性受体 WSX-1 在未足月胎膜早破早产孕妇胎膜组织中的表达明显高于正常足月孕妇（P=0.0149）；②成功培养原代人胎膜组织；③人重组 IL-27 蛋白刺激胎膜组织后 MMP2、MMP9 的表达明显升高。**结论**：IL-27 可诱导人胎膜组织产生炎性效应，增强 MMP2 和 MMP9 的表达，参与未足月胎膜早破早产的发病。

【关键词】未足月胎膜早破早产；胎膜组织；白介素-27；基质金属蛋白酶
【中图分类号】R714.24　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-10-12

Role of IL-27 and it's receptor in the pathogenesis of preterm premature rupture of membrane

Wang Hanbing, Yin Nanlin, Yuan Yu, Qi Hongbo
(*Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To discuss the role of interleukin-27 (IL-27) and its special receptor WSX-1/TCCR in inducing inflammatory effects on human fetal membrane in preterm premature rupture of membrane. ***Methods***: ①The expression of IL-27 special receptor WSX-1 in fetal membrane of preterm premature rupture of membrane and normal term birth was analyzed by western blot and immunohistochemistry assay. ②Primary human fetal membrane was isolated and cultured and its survival was identified by RT-PCR. ③The fetal membranes were divided into control group and the experimental group, treated by 10 ng/mL human recombinant IL-27 and then RNA and protein were extracted. MMP2 and MMP9 mRNA level was detected and their activity was examed by quantitative RT-PCR and Gelatin zymography, respectively. ***Results***: ①The expression of IL-27 receptor WSX-1 had significant differences between preterm premature rupture of membrane and normal term birth. ②Primary human fetal membrane was successfully isolated and cultured for processing. ③Expressions of MMP2 and MMP9 were obviously higher in IL-27 treatment group; P<0.05 was statistically significant. ***Conclusion***: IL-27 could induce human fetal membrane to produce MMP2 and MMP9 in the pathogenesis of preterm premature rupture of membrane.

【Key words】preterm premature rupture of membrane; primary human fetal membrane; interleukin-27; matrix metalloproteinases

早产（preterm birth）是指妊娠不足 37 周的分娩[1]。在我国，早产的定义为孕 28 周至不足 37 周的分娩。早产是新生儿死亡的主要原因，也是产前住院的最常见因素。全球每年约有 1 500 万早产儿出生，我国已成为早产儿出生率第二大的国家[2]。早产根据病因被分为自发性早产、未足月胎膜早破和治疗性早产[3]。其中，未足月胎膜早破（preterm premature rupture of membrane，PPROM）的发生率占早产发生率的 30%~40%，成为新生儿患病和死亡的主要原因。目

作者介绍：王寒冰，Email：wanghanbing1012@163.com，
研究方向：早产与炎症的关系。
通信作者：漆洪波，Email：qihongbo728@163.com。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81471472）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170623.1058.006.html（2017-06-23）

前认为未足月胎膜早破早产是一个多因素引起的综合征，包括宫内炎症、母胎免疫耐受异常、黄体酮降低和压力应激等，其中宫内免疫炎症的激活被认为是引起未足月胎膜早破早产的重要因素[4]。炎症发生时，由于多种免疫细胞如 $CD4^+$ T 细胞、DC 和 NK 细胞等通过调节粘附分子和细胞因子等炎性介质的表达，使得大量白细胞增殖并迁移至母胎界面，释放更多 TNF、IL-1 及基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase，MMP）等因子产生过度炎症反应，导致胎膜细胞外基质的溶解退化，从而损伤胎膜并最终诱发破膜[5]。白介素-27（interleukin-27，IL-27）是一种异源二聚体细胞因子，与其受体 WSX-1/gp130 结合后能产生强大的促炎效应，促进其他炎性因子、趋化因子和粘附分子等释放，参与哮喘、克罗恩病、风湿性关节炎等过度性炎性疾病的发生[6]。那么，IL-27 能否通过调节基质金属蛋白酶的释放而损伤胎膜功能，从而在 PPROM 发病中发挥作用，值得我们深入探究。本研究主要探讨 IL-27 刺激原代人胎膜组织释放基质金属蛋白酶导致胎膜损伤甚至破膜，从而参与未足月胎膜早破的发生，该研究可能为未足月胎膜早破早产的预防和诊断提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究符合重庆医科大学附属第一医院人体试验伦理委员会所制定的伦理学标准，并取得患者的知情同意。纳入标准为孕周为 28 周至不足 37 周胎膜早破孕妇和孕周≥37 周的单胎孕妇，排除子痫前期、妊娠期高血压、妊娠期肝内胆汁淤积症等并发症的剖宫产分娩孕妇。本实验所采集符合标准的标本共 20 例，未足月胎膜早破和足月剖宫产各 10 例。

1.2 主要试剂及仪器

人重组 IL-27 和人 IL-27Rα/WXS-1/TCCR 购自美国 R&D 公司；培养基 DMEM/High Glucose 购于美国 Gibco 公司；胎牛血清为美国 Sciencell 公司；兔抗山羊二抗和免疫组化所用 DAB 均来自中国中杉金桥公司；提取 RNA 所用 RNAiso Plus、RNA 逆转录试剂盒及荧光定量 PCR 试剂盒均来自日本 Takara 公司。紫外分光光度计为 Thermo scientific NaVoDoP 1000；荧光定量 PCR 检测系统为 Bio-Rad 公司产品；酶标仪购自美国 Bio TeK 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 剖宫产胎盘娩出后，避开破膜处，即刻在无菌条件下沿胎盘边缘 2 cm 以上采集胎膜组织 4 份。用无菌 PBS 清洗胎膜，直至血迹冲洗干净。用无菌纱布蘸干后一份置于 4%多聚甲醛中固定后行石蜡包埋切片，剩下 3 份置于无菌无酶冻存管并迅速放入液氮中保存待测。

1.3.2 Western blot 检测 IL-27 特异性受体 WXS-1/TCCR 在胎膜组织中的蛋白表达 分别提取未足月胎膜早破和正常剖宫产孕妇胎膜组织蛋白，BCA 法检测蛋白水平，蛋白上样量为 40 μg。进行电泳分离、转膜、封闭、一抗孵育过夜（WSX-1 为 1:1 000；β-actin 为 1:1 000）、二抗孵育 1 h（兔抗山羊 IgG 1:1 000），ECL 化学发光检测系统检测。用 Image Lab 5.2 图像分析软件进行分析。

1.3.3 免疫组化分析 WXS-1/TCCR 在胎膜组织中的定位 胎膜组织采集后 4%多聚甲醛固定，石蜡包埋，切片厚度 5 μm。分别进行二甲苯脱蜡、梯度酒精水化、95 ℃抗原热修复和封闭后滴加山羊抗人 WSX-1 抗体（1:50），置于湿盒，4 ℃孵育过夜，滴加 HRP 标记的兔抗山羊二抗（1:100），37 孵育 30 min，DAB 显色后封片显微镜下观察。

1.3.4 原代人胎膜组织的培养 剖宫产胎盘娩出后即刻在无菌条件下沿胎盘边缘 2 cm 以上采集胎膜组织。用无菌 PBS 清洗胎膜，直至血迹冲洗干净，用无菌眼科剪将其剪为 1 cm × 1 cm 大小，再次用 PBS 清洗后用无菌纱布蘸干，置于 6 孔板中用 2 mL 15% DMEM/High Glucose 于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养。每天换液，肉眼观察培养液颜色变化初步判断其是否存活，不同时间点提取 RNA 进行 RT-PCR 进一步检测其是否存活。培养 2 d 后处理，分为对照组和实验组分别予以刺激。对照组为正常培养的胎膜组织；实验组予以人重组 IL-27 10 ng/mL 分别刺激 12 h 和 24 h。

1.3.5 qRT-PCR 检测 IL-27 刺激胎膜组织产生 MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达情况 将上述处理的胎膜组织在液氮中研碎，RNAiso plus 提取 RNA，用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA，反应条件为：95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 10 s，退火和延伸温度均为 53 ℃，作用 40 个循环，溶解曲线设定为从 65 ℃~95 ℃，每隔 0.5 ℃读取一次荧光信号。$2^{-\Delta\Delta Q}$ 方法分析 mRNA 的相对转录水平。所用引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物列表

Tab.1 Oligonucleotides used for real-time PCR

引物	序列
GAPDH 正义链：	5'-CAAGAGCACAAGAGCAAGAGAG-3'
GAPDH反义链：	5'-CTACATGGCAACTGTGAGGAG-3'
MMP2正义链：	5'-AACTGGTCCGTGTGAAGTATG-3'
MMP2反义链：	5'-GGTATCAGTGCAGCTGTTGTA-3'
MMP9正义链：	5'-GGGCTTAGATCATTCCTCAGTG-3'
MMP9反义链：	5'-GCCATTCACGTCGTCCTTAT-3'

1.3.6 明胶酶谱检测 IL-27 刺激胎膜组织产生 MMP2 和 MMP9 的酶活性 处理后提取胎膜组织蛋白，配制含 0.1%明胶的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶行 SDS-PAGE 电泳，将凝胶置于洗脱液中震荡洗涤，明胶缓冲液 37 ℃ 孵育 48 h 后考马斯亮蓝溶液染色，脱色液脱色后凝胶成像，Image Lab 5.2 软件分析。

以上实验均重复 3 次。

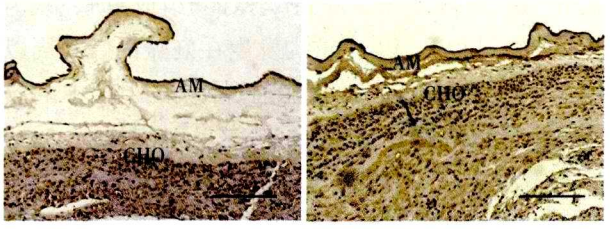
1.4 统计方法

数据作图及分析采用 Graphpad Prism 5.01 软件(Prism 5;Graphpad Software,La Jolla,CA,USA);计量资料均用均数 ± 标准差表示,两组间比较采用独立样本 t 检验分析,检验水准 α=0.05。

2 结 果

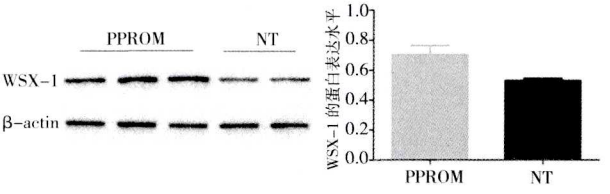
2.1 正常足月和未足月胎膜早破早产孕妇胎膜组织中 WSX-1 的蛋白表达

免疫组化结果表明,WSX-1 主要表达于羊膜上皮细胞,绒毛膜和蜕膜中也有表达。与正常足月胎膜相比,未足月胎膜早破早产孕妇的胎膜组织中 WSX-1 阳性表达明显增高;Western blot 结果表明,IL-27 特异性受体 WSX-1 在未足月胎膜早破孕妇胎膜组织中的表达明显高于正常足月孕妇,定量分析有明显统计学差异(t=2.692,P=0.015),如图 1、表 2 所示。



A. 胎膜组织免疫组化分析(200×)

左图为正常足月(NT)组;右图为 PPROM 组;AM 为羊膜;CHO 为平滑绒毛膜



B. Western blot 及定量分析

NT代表正常足月组;PPROM 代表未足月胎膜早破组

图 1 胎膜组织中 WSX-1 的表达

Fig.1 The expression of WSX-1 in the fetal membrane

表 2 胎膜组织中 WSX-1 蛋白水平的定量分析

Tab.2 Quantitative analysis of WSX-1 in protein level in the two groups

组别	例数	WSX-1蛋白水平
NT组	10	0.529 ± 0.014
PPROM组	10	0.702 ± 0.063[a]

注:NT 代表正常足月组;PPROM 代表未足月胎膜早破组;a:与正常足月妊娠组比较,t=2.692,P=0.015

2.2 成功培养离体人胎膜组织

为了验证所培养的原代人胎膜组织是否存活,采用荧光定量 PCR 的方法。结果如图 2 所示,在不同时间点提取组织 RNA,逆转录为 cDNA 后用 RT-PCR 检测发现胎膜中表达的 IL-27 特异性受体 WSX-1 均有扩增,反映培养的组织存活。

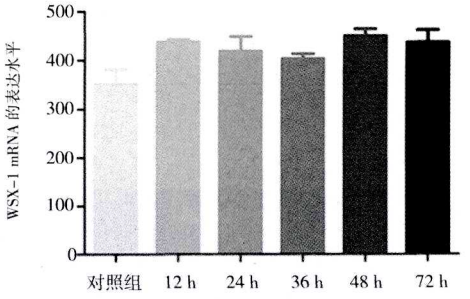
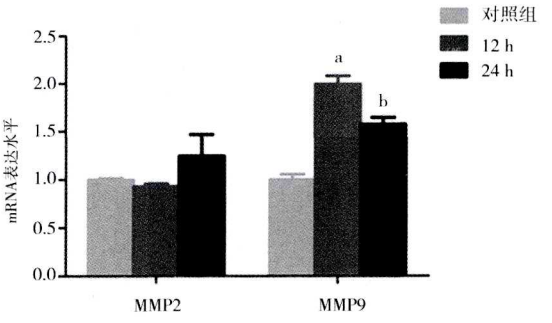


图 2 胎膜 WSX-1 mRNA 表达

Fig.2 WSX-1 mRNA level in the fetal membrane

2.3 IL-27 刺激原代人胎膜组织产生 MMP2、MMP9 的表达情况

IL-27 促进 MMP2、MMP9 mRNA 表达水平升高:对原代人胎膜组织予以 10 ng/mL 人重组 IL-27 刺激后,在 mRNA水平检测其下游 MMP2、MMP9 的表达。如图 3 所示,未足月胎膜早破中经典的因子 MMP2、MMP9 表达升高。其中,MMP2 在 IL-27 处理 24 h 后有升高的趋势,但是由于样本量小、组间差异大等原因,数据没有统计学差异(见表 3)。与对照组相比,IL-27 处理 12 h 后胎膜组织中 MMP9 的 mRNA 表达水平明显升高(P=0.001),处理 24 h 后 MMP9 的 mRNA 表达也明显增强(P=0.004)。



a:与对照组比较,P=0.001;b:与对照组比较,P=0.004

图 3 MMP2 和 MMP9 不同时间点 mRNA 水平

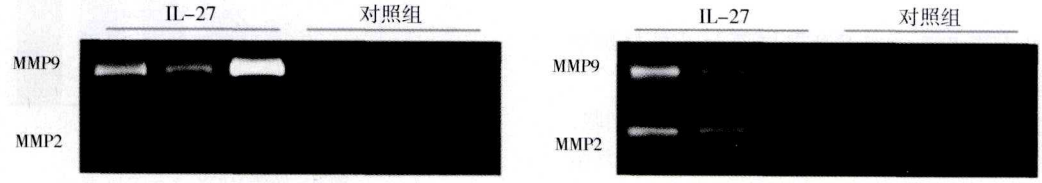
Fig.3 mRNA level of MMP2 and MMP9 in a time depend manner

IL-27 促进 MMP2 和 MMP9 蛋白表达增强:10 ng/mL IL-27 作用于原代人胎膜组织后,明胶酶谱检测其下游MMP2 和 MMP9 的活性。如图 4 所示,与对照组相比,IL-27 处理组中 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达明显升高,这说明 IL-27 可以作用于原代人胎膜组织,导致 MMP2 和 MMP9 的表达增加,这一结果与 mRNA 表达结果一致。

表 3 MMP2 和 MMP9 不同时间点 mRNA 水平定量分析

Tab.3 Quantitative analysis of the expression of MMP2 and MMP9 in mRNA level in a time dependent manner

组别	MMP2	F 值	P 值	MMP9	F 值	P 值
对照组	1.000 ± 0.015			1.003 ± 0.057		
12 h 组	0.851 ± 0.081	28.820	0.147	1.997 ± 0.088	2.408	0.001
24 h 组	1.247 ± 0.224	217.700	0.333	1.574 ± 0.073	1.642	0.004



A. IL-27 处理 12 h 组　　B. IL-27 处理 24 h 组

图 4 IL-27 对 MMP2 和 MMP9 活性影响

Fig.4 Effect of IL-27 on the activity of MMP2 and MMP9

3 讨 论

3.1 IL-27 和生殖医学

IL-27 是 IL-6/IL-12 家族成员，可以由多种细胞分泌，如浆细胞、内皮细胞、激活的抗原呈递细胞等。它是由 IL-27 p28 亚基和 EB 病毒诱导基因 3（EBI3）亚基组成的异源二聚体。IL-27 可以与其特异性受体 WSX-1/TCCR 和（或）非特异性受体gp130 结合后产生强大的免疫调节作用，既能活化 Th1 细胞发挥促炎效应，也能抑制 Th2/Th17 细胞分化和诱导 T 细胞产生抑炎因子发挥抑炎效应。因为其特殊的双重炎性作用，成为研究热点。有文献证实 IL-27 可以通过作用胎盘组织参与子痫前期和复发性流产的发病[7-8]；本课题组前期结果表明，IL-27 可以诱导滋养层细胞产生大量炎性介质，增强滋养细胞的侵袭和增殖能力，同时抑制血管形成，从而在子痫前期的发病中有重要意义[9]。宫内炎症是诱发PPROM 的关键因素[5]。基于以上研究结果，我们推测 IL-27 可能通过作用胎盘组织产生炎性效应参与 PPROM 的发病。本研究显示 IL-27 特异性受体 WSX-1 在 PPROM 患者胎膜组织中的表达明显高于正常足月患者，提示 IL-27 在 PPROM 发病中可能发挥了重要作用。

3.2 MMP2、MMP9 与 PPROM

胎膜由羊膜和平滑绒毛膜以及连接两者的细胞外基质（extracellular matrix，ECM）组成。研究认为正常分娩过程中，ECM 重构发生在妊娠最后几周以发动分娩，炎症等因素可能通过降解 ECM 中的胶原蛋白引发胎膜受损从而造成这一过程提前，导致 PPROM 的发生[10]。其中 MMPs 是导致 ECM 重塑的关键因素。MMPs 是一类锌依赖的蛋白水解酶，由滋养细胞、羊膜间质细胞、平滑肌细胞、骨骼肌细胞和多种肿瘤细胞等合成分泌，主要降解多种胶原蛋白。参与水解细胞外基质中的多种成分（胶原蛋白、层粘连蛋白、蛋白多糖等）[11]。它与多种生理过程如血管形成、伤口愈合、骨骼生长、胎盘发育等相关，并参与许多疾病（子痫前期、胎儿宫内发育迟缓、胎膜早破等）的病理过程。根据其主要氨基酸序列和底物特异性，MMPs 分为多种亚型，其中与 PPROM 相关的主要是明胶酶类 MMP2 和 MMP9[3,12]。在既往研究中，已证实激活 MMP2 可以促进胎膜中 ECM 的降解[13]，并且 PPROM 患者胎膜组织中 MMP9 基因表达与 PPROM 有明显相关性[14]。因此本研究成功培养原代人胎膜组织用于后续检测 MMP2 和 MMP9 的表达。

3.3 IL-27 与 MMP2、MMP9 及 PPROM 的关系

本研究通过检测 IL-27 处理的胎膜组中MMP2、MMP9 的表达，发现 IL-27 可以明显增强胎膜组织中 MMP2、MMP9 的表达。其他学者也证明了 LPS 诱导的炎性反应可以激活子宫肌层中 MMP2、MMP9 的表达，降解Ⅰ和Ⅲ型胶原酶，导致子宫肌层溶解，

并且 IL-1 和 TNF-α 等促炎细胞因子均可以诱导子宫肌层中 MMP9 的产生从而参与 PPROM[15]。本研究有力证实 IL-27 是激活胎膜组织中 MMP2、MMP9 表达的关键因子，而激活的 MMP2、MMP9 可以促进胎膜组织 ECM 中胶原蛋白的降解，导致胎膜损伤，从而诱发破膜，由此推断 IL-27 可以通过诱导胎膜组织表达 MMP2、MMP9 在 PPROM 的发病中发挥重要作用。

综上所述，本研究初步证实了孕妇胎膜组织中异常升高的 IL-27 及其受体 WSX-1 与未足月胎膜早破早产有明确相关性，其异常升高可能提示母体存在较为严重的宫内炎症，增加未足月胎膜早破早产的风险，因此可能为临床上 PPROM 的预防和诊断提供新的理论依据。

致谢

对给予本实验平台支持的重庆医科大学临床检验诊断中心和中国－加拿大－新西兰母胎实验室，协助标本采集的产科全体医务人员，给予理论指导与技术支持的宋志新博士致以诚挚的感谢！

参 考 文 献

[1] Chang HH, Larson J, Blencowe H, et al. Preventing preterm births: analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index[J]. Lancet, 2013, 381(9862): 223-234.

[2] Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications[J]. Lancet, 2012, 379(9832): 2162-2172.

[3] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, et al. Epidemiology and causes of preterm birth[J]. Lancet, 2008, 371(9606): 75-84.

[4] Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes[J]. Science, 2014, 345(6198): 760-765.

[5] Kumar D, Moore RM, Mercer BM, et al. The physiology of fetal membrane weakening and rupture: insights gained from the determination of physical properties revisited[J]. Placenta, 2016, 42: 59-73.

[6] Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity[J]. Immunity, 2012, 37(6): 960-969.

[7] Nematollahi Z, Hadinedoushan H, Aflatoonian A, et al. The association between single nucleotide polymorphism in interleukin-27 gene and recurrent pregnancy loss in Iranian women[J]. Iran J Reprod Med, 2015, 13(4): 209-214.

[8] Chen P, Gong Y, Pu Y, et al. Association between polymorphisms in IL-27 gene and pre-eclampsia[J]. Placenta, 2016, 37: 61-64.

[9] Yin N, Zhang H, Luo X, et al. IL-27 activates human trophoblasts to express IP-10 and IL-6: implications in the immunopathophysiology of preeclampsia[J]. Mediators Inflamm, 2014, 2014: 926875.

[10] Geng J, Huang C, Jiang S. Roles and regulation of the matrix metalloproteinase system in parturition[J]. Mol Reprod Dev, 2016, 83(4): 276-286.

[11] Yang CC, Hsiao LD, Yang CM, et al. Thrombin enhanced matrix metalloproteinase-9 expression and migration of SK-N-SH cells via PAR-1, c-Src, PYK2, EGFR, Erk1/2 and AP-1[J]. Mol Neurobiol, 2016 [Epub ahead of print].

[12] Sundrani D, Chavan-Gautam P, Pisal H, et al. Matrix metalloproteinases-2, -3 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in placentas from preterm pregnancies and their association with one-carbon metabolites[J]. Reproduction, 2013, 145(4): 401-410.

[13] Puthiyachirakkal M, Lemerand K, Kumar D, et al. Thrombin weakens the amnion extracellular matrix (ECM) directly rather than through protease activated receptors[J]. Placenta, 2013, 34(10): 924-931.

[14] Enquobahrie DA, Hensley M, Qiu C, et al. Candidate gene and microRNA expression in fetal membranes and preterm delivery risk[J]. Reprod Sci, 2016, 23(6): 731-737.

[15] Lirussi F, O'Brien M, Wendremaire M, et al. SAR150640, a selective beta3-adrenoceptor agonist, prevents human myometrial remodelling and activation of matrix metalloproteinase in an in vitro model of chorioamnionitis[J]. Br J Pharmacol, 2010, 159(6): 1354-1366.

（责任编辑：张辉洁）