

内异方对模型大鼠内异灶组织 TGF- β_1 的 mRNA 及蛋白表达的调控作用

付金荣*, 郑锦, 王芳, 田立霞, 许华云, 姜卉
(上海中医药大学附属龙华医院妇科, 上海 200032)

[摘要] 目的:探讨内异方对实验性大鼠子宫内膜异位灶组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的 mRNA 及蛋白表达的调控作用。方法:SD 大鼠采用自身种植法建立子宫内膜异位症(EMS)模型,分为假手术组、模型组、内异方低、高剂量(含生药 25.2、50.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)、孕三烯酮对照组(2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹),ig 3 周后,应用 RT-PCR 检测内异灶组织中 TGF- β_1 mRNA 的表达,Western 印迹检测内异灶组织 TGF- β_1 的蛋白表达。结果:模型组 TGF- β_1 mRNA 及蛋白表达水平明显高于假手术组($P < 0.01$),内异方组明显低于模型组($P < 0.01$),与孕三烯酮对照组相比无明显差异。结论:大鼠模型内异灶中 TGF- β_1 mRNA 及蛋白的表达升高,内异方通过下调 TGF- β_1 mRNA 及蛋白的表达,起到抗 EMS 的作用。

[关键词] 内异症模型;转化生长因子- β_1 ;内异方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)04-0227-03

Controlling Effects of Neiyi Fang on Expression of mRNA and Protein of TGF- β_1 in Model Rats with EMS Iesions

FU Jin-rong*, ZHENG Jin, WANG Fang, TIAN Li-xia, XU Hua-yun, JIANG Hui

(Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the controlling effects of Neiyi Fang on expression of mRNA and protein of (TGF- β_1) in endometriosis(EMS) lesions of model rats. **Method:** The model of EMS was duplicated in SD rats, rats were divided into sham group, model group, low-dose of Neiyi Fang group(25.2 g·kg⁻¹·d⁻¹), high-dose of Neiyi Fang group(50.4 g·kg⁻¹·d⁻¹) and western medicine (gestrinone) group(2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹). RT-PCR was used to detect the expression of mRNA of TGF- β_1 in EMS lesions. Western blot was used to detect the expression of protein of TGF- β_1 . **Result:** The level of expression of mRNA and protein of TGF- β_1 in the model group was clearly higher than that in the sham group ($P < 0.01$), while in the Neiyi Fang group, the level was clearly lower than that in the model group ($P < 0.01$). The level in the Neiyi Fang group was no significant difference than in the western medicine group. **Conclusion:** The expression of mRNA and protein of TGF- β_1 in EMS lesions of model rats were increased. Neiyi Fang resisted EMS through decreasing the expression of mRNA and protein of TGF- β_1 .

[Key words] model of EMS; TGF- β_1 ; Neiyi Fang

子宫内膜异位症(endometriosis, EMS)具有类似恶性肿瘤的种植侵袭和远处转移的能力。其发病

机制未完全阐明。近年来转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)与 EMS 的关系受到人们的重视。TGF- β_1 可使细胞外基质胶原含量增加,促使胶原纤维和纤维蛋白的形成,使脱落的子宫内膜细胞在盆腔内黏附、聚集,促使 EMS 发生^[1],本研究采用 RT-PCR 法检测 EMS 大鼠内异灶中 TGF- β_1 的 mRNA 表达水平,Western 印迹检测 TGF- β_1 的蛋白表达,探讨 EMS 发病机制及内异方的调控作用。

[收稿日期] 2011-09-20

[基金项目] 上海市科委专项课题资助项目(09dz1976800)

[通讯作者] *付金荣,博士,主任医师,主要从事中医药防治子宫内膜异位症及不孕症的临床研究, Tel: 13041689916, E-mail: fujinrong2006@sina.com

1 材料

1.1 试剂和仪器 Trizol(Invitrogen 公司), Reverse Transcription System (Promega 公司), DEPC (Sigma 公司), GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega 公司), 引物合成(上海生物工程公司), 荧光定量 7500 型 PCR 仪(ABI 公司), RNA/DNA calculator(Pharmacia 公司), 高速冷冻离心机(Beckman 公司), 电泳仪和转膜仪(BioRad 公司)。

1.2 药品 内异方水煎剂(组成药物:云茯苓、桂枝、皂角刺、石见穿、莪术、水蛭等)购自上海中医药大学附属龙华医院,由上海中医药大学实验动物中心煎制;孕三烯酮片(北京紫竹药业有限公司,批号 53030402), TGF- β_1 酶联免疫试剂盒(钰森生物科技有限公司)。其他生化试剂均购自 BBI。

2 方法

2.1 造模 9 周龄雌性 SD 大鼠, SPF 级, 体重(160 ± 10)g, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(沪)2007-0005。参照 Berkley 等^[2]方法行大鼠自身种植内膜, 造模成功评判标准:成功异位内膜有积液形成突起, 并测量成活内膜长、宽、高, 计算其体积, 凡积液高度 > 1.5 mm 者作为成功模型, 并选出 1 只送病检。然后随机分组, 而假手术组按上述方法行 2 次开腹, 切除左侧子宫 1 段, 但不行种植。所有动物喂养 3 周, 每日行阴道涂片, 显微镜下观察, 选择无情期处死动物, 取材。

2.2 分组与给药 将造模成功大鼠随机分为假手术组(生理盐水 2 mL/只)、模型组、内异方低、高剂量组(25.2, 50.4 g·kg⁻¹·d⁻¹, 约相当于成人剂量的 10, 20 倍)、孕三烯酮对照组(2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。均 ig, 2 mL/只, 1 次/d, 连续 3 周。

2.3 检测指标 给药 3 周后, 将大鼠麻醉开腹, 取内异灶组织用液氮保存待检。

2.3.1 TGF- β_1 mRNA 测定 取内异灶组织 100 mg, 制成匀浆后, 按照 Trizol[®] 试剂制造商提供的步骤进行总 RNA 提取。以紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度, 其吸光度 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0。逆转录总反应体系为 20 μ L (Takara 公司), 放入荧光 PCR 仪 65 $^{\circ}$ C 15 min, 37 $^{\circ}$ C 1.5 h, 94 $^{\circ}$ C 5 min 结束。然后取逆转录后的 cDNA 3 μ L 在 20 μ L RT-PCR 体系中扩增。PCR 所用引物序列(TGF- β_1 基因:上游引物 5'-AGAGAAGAAGCTGCTGTGTA-3'; 下游引物 5'-GGTTGTGTTGGTTGTAGAG-3'; GAPDH 基因:上游引物 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'; 下游 5'-GGCATGGACTGTGCTCATGAG-3')。(运用

Primer Premier 5 结合 Dnastar 分析软件及网上 BLAST 分析, 设计并合成引物)。RT-PCR 程序: 50 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min 转至 90 $^{\circ}$ C 40 个循环。PCR 每循环 1 次就收集 1 个数据, 建立实时扩增曲线, 准确地确定 C_t 值, 根据 C_t 值确定起始 DNA 拷贝数, 每个样本均做复孔, 取平均值。以 TGF- β_1 同内参 GAPDH 值反映各基因 mRNA 的表达水平。结果判定: 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [$Y = 2^{-\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_t$ 目的基因 - C_t 内标基因)] 法对 TGF- β_1 基因表达水平进行检测。用 GAPDH 基因的平均 C_t 值对 TGF- β_1 基因的 C_t 进行校准, 比较病灶组织和正常组织中 TGF- β_1 表达的差异。

2.3.2 Western 印迹检测 TGF- β_1 的蛋白表达 内异灶组织称质量后切块, 加入组织裂解液抽提蛋白质。以 BCA 蛋白定量方法测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳方法分离样品, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜(Millipore 公司)。将膜置于反应盒中, 加入丽春红 S 染色 30 s, 观察转印效果。TBST 洗膜后加入稀释好的一抗(sc-146, 兔抗大鼠以 1:250 稀释)抗体孵育膜 2 h, 洗膜 3 次, 加入稀释好的二抗(羊抗兔以 1:5 000 稀释)抗体, 室温 1 h 振荡孵育。洗膜 3 次。将膜置于 HRP-ECL 发光检测试剂盒(PIRECE)反应液中室温孵育, X 射线胶片曝光, 以 β -actin 为内参照, 用 Quantity one 软件分析图片上特异条带的灰度值, 以相对表达量表示蛋白表达的水平。

相对表达量 = 目的蛋白灰度/ β -actin 灰度

2.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件处理, 计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 EMS 大鼠内异灶组织 TGF- β_1 mRNA 表达的影响 模型组 TGF- β_1 mRNA 的 C_t 值显著低于正常组($P < 0.01$), 说明模型组 mRNA 表达水平显著高于正常组; 内异方低、高剂量组以及孕三烯酮组 mRNA C_t 值均显著高于模型组($P < 0.01$), 而与假手术组无统计学差异, 说明给药 3 组 TGF- β_1 mRNA 表达显著低于模型组。见表 1。

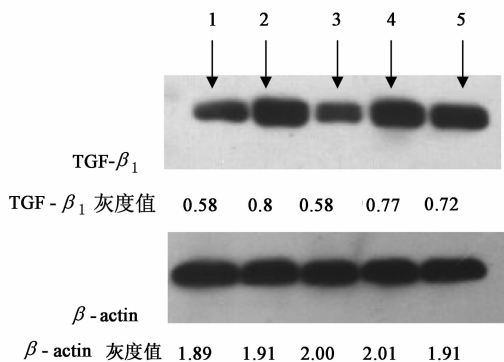
3.2 对 EMS 大鼠内异灶组织 TGF- β_1 蛋白表达的影响 假手术组 TGF- β_1 蛋白相对表达量为 30.7% (0.58/1.89), 模型组为 41.9% (0.8/1.91), TGF- β_1 蛋白表达比假手术组显著增强; 孕三烯酮为 29.0% (0.58/2.0), 对该模型有较强作用, 明显下调 TGF- β_1 的表达; 内异方低、高剂量组分别为 38.3% (0.77/2.01), 37.7% (0.72/1.91), 也有一定下调

表 1 内异方对大鼠内异灶组织 TGF- β_1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	TGF- β_1 /Ct
假手术	-	5	30.64 \pm 0.22 ¹⁾
模型	-	5	26.75 \pm 0.18
内异方	25.2	6	31.03 \pm 0.41 ¹⁾
	52.4	6	30.86 \pm 0.37 ¹⁾
孕三烯酮	2.5 \times 10 ⁻³	6	30.44 \pm 0.15 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

TGF- β_1 表达的作用,高剂量组的效果略好于低剂量组。见图 1。



1. 假手术组 ($n = 5$); 2. 模型组 ($n = 5$); 3. 孕三烯酮 2.5 \times 10⁻³ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 ($n = 6$); 4. 内异方 25.2 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 ($n = 6$); 5. 内异方 50.4 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 ($n = 6$)

图 1 内异方对子宫内异灶大鼠内异灶组织 TGF- β_1 蛋白表达的影响

4 讨论

TGF- β 是一种多功能的多肽类细胞因子。TGF- β 在调控胚胎发育、细胞分化与增殖、发育模式及形态发生、病理发生等方面起着重要的作用^[3,4]。多数研究结果显示^[5,6]:EMS 患者异位内膜及在位内膜中 TGF- β_1 的表达均显著增高,提示 TGF 在 EMS 的发生发展中可能扮演了重要角色。TGF- β_1 是一种负性免疫调节因子,对 T 细胞和巨噬细胞的增殖和活性有抑制作用,使异位内膜逃避免疫监视,局部能够种植,产生类似恶性肿瘤的侵袭性,促进 EMS 的发展。TGF- β_1 是通过与其在细胞膜上的受体结合而发挥其包括导致细胞凋亡在内的各种细胞信号传递作用。TGF- β_1 可诱导产生一种黏附分子 (TIF-2),它可以帮助细胞抵御肿瘤坏死因子 (TNF) 的杀伤作用,从而阻止细胞的凋亡^[7]。异位内膜细胞可通过 TGF- β_1 的高表达而增强自身的抗凋亡能力,得以在宫腔外存活及种植,形成异位病灶。TGF- β_1 还可以通过直接作用于内皮细胞和促进血管生成的细胞因子的共同作用而形成易于血管形成的环境,导致异位病灶周围微血管生成增

多^[8]。TGF- β_1 能促进异位内膜细胞的增殖、生长,促进纤维化和腹膜粘连^[9],导致盆腔粘连,最终导致不孕等严重并发症。由此可见, TGF- β_1 可能参与到 EMS 发病机制中黏附、增殖、血管形成的每个环节。其生物学效应通过信号转导,表达目的基因,从而在形态发生、病理发生等方面起着重要作用。

本研究结果显示,EMS 模型组内异灶组织 TGF- β_1 mRNA 及蛋白表达均明显高于正常组,内异方高、低剂量组 TGF- β_1 mRNA 及蛋白表达水平均明显低于模型组,提示内异方通过降调 TGF- β_1 mRNA 及蛋白表达水平,提高机体免疫力,阻止异位内膜种植,可能是其治疗 EMS 有效机制之一。

[参考文献]

- [1] Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775: 21.
- [2] Berkley K J, Dmitrieva N, Curtis K S, et al. Innervation of ectopic endometrium in a rat model of endometriosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101 (30): 11094.
- [3] Cimaz R, Borghi M O, Gerosa M, et al. Transforming growth factor beta1 in the pathogenesis of autoimmune congenital complete heart block: lesson from twins and triplets discordant for the disease [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54 (1): 356.
- [4] Amjad S B, Carachi R, Edward M. Keratinocyte regulation of TGF-beta and connective tissue growth factor expression; a role in suppression of bear tissue formation [J]. *Wound Repair Regen*, 2007, 15 (5): 748.
- [5] 周秦, 李世胜. 子宫内膜异位症患者凋亡相关基因 TGF- β mRNA 表达的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 14 (10): 2717.
- [6] 裴琛琳, 张怡, 戴芙蓉. TGF-b 和 TGIF 与子宫内膜异位症关系的研究 [J]. *中国医师杂志*, 2009, 9 (11): 1180.
- [7] Carey G B, Chang N S. Cloning and characterization of a transforming growth factor β_1 -induced anti-apoptotic adhesion protein TIF-2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 249 (1): 283.
- [8] Shih S C, Ju M, Liu N, et al. Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (26): 15 859.
- [9] Komiyama S, Aoki D, Komiyama M, et al. Local activation of TGF-beta1 at endometriosis sites [J]. *J Reprod Med*, 2007, 52 (4): 306.

[责任编辑 何伟]