

SOCS3 诱导反复自然流产患者蜕膜及绒毛组织 Th1/Th2 转换的作用

刘立群, 游泽山, 李 婕, 李再仪

(中山大学附属第一医院黄埔院区妇科, 广东 广州 510700)

摘要:【目的】探讨细胞因子信号转导负调控因子(SOCS3)诱导反复自然流产(RSA)患者蜕膜及绒毛组织 Th1/Th2 转换的作用。【方法】采用 ELISA 方法检测 27 例 RSA 患者蜕膜及绒毛组织 Th1 细胞因子(IL-2、IFN- γ)和 Th2 细胞因子(IL-4、IL-10)的表达水平,采用流式细胞仪检测蜕膜及绒毛组织中 Th1 和 Th2 细胞水平及其比率,采用 western-blot 方法检测蜕膜及绒毛组织 SOCS3 蛋白表达水平,同时与 30 例正常妊娠行人工流产者比较。【结果】RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 IL-2、IFN- γ 表达水平明显高于对照组($P < 0.05$),而 RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 IL-4、IL-10 表达水平明显低于正常对照组($P < 0.05$);RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 Th1 细胞水平及 Th1/Th2 比率明显高于对照组($P < 0.05$),而 Th2 细胞水平明显低于对照组($P < 0.05$);RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 SOCS3 蛋白表达水平明显低于对照组($P < 0.05$)。【结论】RSA 患者蜕膜及绒毛组织中 SOCS3 蛋白表达过低可诱导 Th1/Th2 失衡,使得 Th1 细胞介导的免疫损伤作用占主导地位,最终导致 RSA 发生。

关键词:细胞因子信号转导负调控因子;反复自然流产;蜕膜;绒毛;T 辅助细胞

中图分类号:R714.2

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)04-0574-04

Role of Th1/Th2 Transform Induced by SOCS3 in Decidua and Villi of Patients with Recurrent Spontaneous Abortion

LIU Li-qun, YOU Ze-shan, LI Jie, LI Zai-yi

(Department of Gynecology, Huangpu District of the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510700, China)

Abstract:【Objective】To investigate the role of Th1/Th2 transform induced by suppressor of cytokine signaling (SOCS3) in decidua and villi of the patients with recurrent spontaneous abortion. 【Methods】The expression levels of Th1 cytokines (IL-2, IFN- γ) and Th2 cytokines (IL-4, IL-10) in decidua and villus of RSA patients (27 cases) were detected by ELISA methods. The levels and ratio of Th1, Th2 cell in decidua and villus were detected by flow cytometry. The expression levels of SOCS3 protein in decidua and villi were detected by Western-blot, and 30 cases of normal pregnancy artificial abortion act as control group. 【Results】The expression of IL-2, IFN- γ in decidua and villi of RSA group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), while the expression of IL-4, IL-10 in decidua and villi of RSA group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The level of Th1 cell and ratio of Th1/Th2 in RSA group were significantly higher than that of control group ($P < 0.05$), while the level of Th2 cells was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of SOCS3 protein in decidua and chorion of RSA group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). 【Conclusion】The low expression of SOCS3 protein in decidua and villi of RSA patients could induce imbalance of Th1/Th2, immune injury of mediated by Th1 cell was dominate, eventually lead to the occurrence of RSA.

Key words: suppressor of cytokine signaling; recurrent spontaneous abortion; decidua; chorionic villi; T helper cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(4):574-577]

反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指妇女连续出现 3 次或 3 次以上的自然

流产,其发病原因仍未完全研究透彻,目前认为可能由多种因素共同所诱发^[1]。从免疫学方面来解

收稿日期:2013-01-23

基金项目:广东省自然科学基金(S2011010003522)

作者简介:刘立群,硕士,主治医师,研究方向:妇科, E-mail:liuliquanhp@126.com

释,妊娠可视为一种同种异体移植现象,胚胎组织与母体之间的免疫学关系极为复杂和特殊,T辅助细胞的功能性分化与反复自然流产之间的相关性研究已成为相关领域的关注焦点。大多数研究人员认为 Th1/Th2 型细胞因子平衡状态出现失衡,并向 Th1 型细胞因子发生明显转变现象与自然流产存在着较为密切的相关性,较多研究结果已证实,Th1 型细胞因子可对胚胎组织造成严重的毒害作用,进而阻碍胚胎组织的早期发育过程,而 Th2 型细胞因子则可以起到维持妊娠正常进行的重要作用,但何种作用机制调控 Th1 型细胞因子的转化过程仍不清楚。近些来有部分研究结果发现细胞因子信号转导抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)表达与孕妇外周血 Th1/Th2 平衡失调存在一定的相关性^[2-3],但较少涉及到蜕膜及绒毛等组织的相关性研究。因此本研究拟探讨 SOCS3 诱导 RSA 患者蜕膜及绒毛组织 Th1/Th2 转换的作用。

1 材料与方法

1.1 临床资料

27 例 RSA 患者均为本院 2007 年 2 月-2012 年 2 月期间住院治疗妇女,均符合相关诊断标准^[4],平均年龄为 (28.7 ± 7.4) 岁,平均孕天数为 (47.3 ± 9.2) d。同期选择 30 例正常妊娠行人工流产者作为对照组,平均年龄为 (27.7 ± 8.5) 岁,平均孕天数为 (45.8 ± 9.7) d。两组在年龄及孕天数等方面比较无显著差异性($P > 0.05$),且两组均除外胚胎染色体异常因素所导致的流产或妊娠,此外本研究已通过院伦理委员会审核,且 RSA 患者及流产者均知情并签字予以同意。

1.2 实验试剂

ELISA 检测试剂盒(IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10)购自深圳晶美生物技术有限公司;鼠抗人 FICT- γ 干扰素、PE-白细胞介素-4、FITC-IgG 和 PE-IgG 抗体购自美国 Becton Dickinson 公司;鼠抗人 SOCS3 多克隆抗体购自北京中杉生物技术有限公司。

1.3 Th1/Th2 细胞因子检测

使用无菌生理盐水将 RSA 患者及流产者的绒毛、蜕膜组织漂洗干净并去除血迹,然后置入盛有 1 mL 生理盐水的组织匀浆器中予以碾磨,随后在

100 ℃温度条件下水浴 10 min,再次在匀浆器中碾磨处理,最后在 4 ℃温度条件下,3 000 r/min 离心(离心半径 $r = 13.5$ cm)15 min 后取组织上清,在-70 ℃温度条件下保存留待检测。

1.4 Th 细胞水平检测

分别将各组蜕膜或绒毛组织碾碎彻底,并制备细胞悬液,然后将其与刺激剂充分予以混匀,放置在 37 ℃温度条件下的培养箱内孵育处理 4 h。按一定顺序加入各种流式荧光抗体,避光反应 20 min 后用 PBS 溶液洗涤处理 2 次,最后上流式细胞仪进行检测,计数 10 000 个 CD4⁺ 淋巴细胞中 Th1 和 Th2 细胞所占的百分比及 Th1/Th2 比率^[5]。

1.5 SOCS3 蛋白检测

采用 Western Blot 法检测蜕膜及绒毛组织 SOCS3 蛋白的表达水平,分别称取 40 μ g 蜕膜或绒毛组织总蛋白,在 94 ℃温度条件下加热处理 10 min,然后使用分离胶对组织样品予以 SDS-PAGE 电泳,从凝胶组织中将蛋白质物质转移至滤膜上,电泳转印处理后行 Western Blot 检测,一抗以 1:200 予以稀释处理,二抗则以 1:750 予以稀释处理,最后采用 DAB 试剂盒显色处理,如有蛋白质条带出现立即用大量 PBS 溶液冲洗以终止 Western Blot 反应过程,实验结果采用专用扫描仪器分析和处理,其中 SOCS3 为 30 ku,目的蛋白/GAPDH 的灰度比值表示其蛋白的相对表达水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件对实验数据进行分析 and 处理,细胞因子和 SOCS3 蛋白表达水平比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 两组蜕膜及绒毛组织液中细胞因子表达水平比较

RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 IL-2、IFN- γ 表达水平明显高于对照组($P < 0.05$),而 RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 IL-4、IL-10 表达水平明显低于正常对照组($P < 0.05$,表 1、表 2)。

2.2 两组蜕膜及绒毛组织中 Th1、Th2 细胞水平及其比率比较

RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 Th1 细胞水平及 Th1/Th2 比率明显高于对照组($P < 0.05$),而 Th2 细胞水平明显低于对照组($P < 0.05$,表 3)。

表 1 两组蜕膜组织液中细胞因子表达水平比较

Table 1 Comparison of cytokines expression levels in the decidua tissues liquid of two groups (ng/L)

Group	Cases	Th1		Th2	
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
RSA	27	132.7 $\pm$ 92.4 ¹⁾	218.6 $\pm$ 67.7 ¹⁾	22.6 $\pm$ 9.8 ¹⁾	54.0 $\pm$ 19.2 ¹⁾
Control	30	102.1 $\pm$ 30.3	88.7 $\pm$ 32.9	58.7 $\pm$ 17.1	137.4 $\pm$ 38.3

Compared with control group, 1) $P < 0.05$

表 2 两组绒毛组织液中细胞因子表达水平比较

Table 2 Comparison of cytokines expression levels in the chorionic villi tissues liquid of two groups (ng/L)

Group	Cases	Th1 cytokine		Th2 cytokine	
		IFN- γ	IL-2	IL-4	IL-10
RSA	27	117.3 $\pm$ 77.9 ¹⁾	174.3 $\pm$ 51.0 ¹⁾	18.7 $\pm$ 7.4 ¹⁾	46.3 $\pm$ 14.5 ¹⁾
Control	30	89.8 $\pm$ 24.4	71.1 $\pm$ 23.5	52.3 $\pm$ 12.1	120.5 $\pm$ 33.4

Compared with control group, 1) $P < 0.05$

2.3 两组蜕膜及绒毛组织 SOCS3 蛋白表达水平比较

RSA组患者蜕膜及绒毛组织中 SOCS3 蛋白表达水平明显低于对照组($P < 0.05$, 图 1)。

3 讨 论

妊娠生理过程比较复杂,而其是否最终成功由母体和胚胎组织之间双向免疫调节的动态平衡所决定,妊娠期间母体内免疫调节机制主要表现为免疫系统耐受或免疫抑制能力增强,而体内的免疫排斥反应相应明显减弱,如此种平衡状态因某些因素遭到严重破坏,则可引起病理性妊娠,甚至最后发生 RSA。而从生殖免疫学角度来观察,妊娠是一种特殊的免疫耐受形式,Th1/Th2 型细胞因子网络系统在妊娠期间免疫耐受调节中起着关键性的作用。已有较多研究发现,Th2 型细胞因子

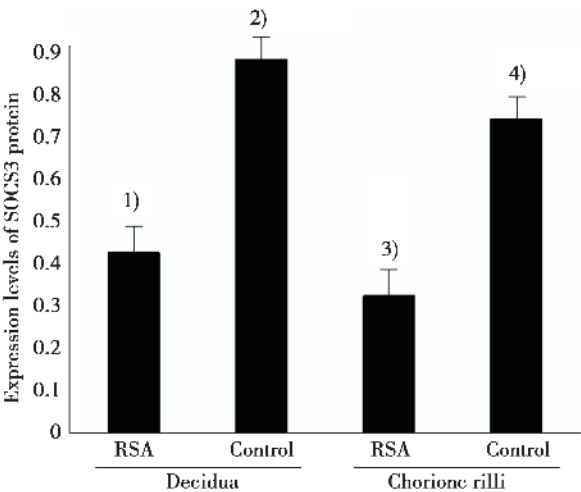
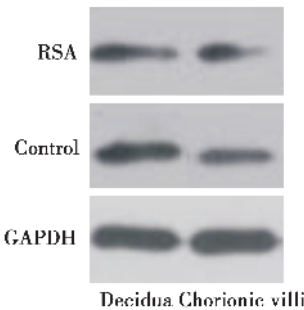


图 1 两组蜕膜及绒毛组织 SOCS3 蛋白表达水平比较
Fig.1 Comparison of SOCS3 protein in the decidua and chorionic villi of two groups

1) vs 2) $P < 0.05$; 3) vs 4) $P < 0.05$

在正常妊娠母体与胚胎组织界面上处于优势地位,而 Th1 型细胞因子如占有优势地位也可导致诸多病理性妊娠现象和 RSA 产生,由此可知确保 Th1/Th2 处于平衡状态对妊娠正常进行和妊娠适时终止显得极为重要。

SOCS3 是最近才发现的蛋白质家族,可受某些细胞因子诱导大量合成和分泌,对多种细胞因子的信号传导通路均可加以抑制,其对 Th1/Th2 平衡状态的调节作用表现尤为突出^[6-7]。研究发现

表 3 两组蜕膜及绒毛组织中 Th1、Th2 细胞水平及其比率比较

Table 3 Comparison of Th1, Th2 cell levels and their ratio in the decidua and chorionic villi of the two groups

Group	Cases	Decidua			Chorionic villi		
		Th1/%	Th2/%	Th1/Th2 ratio	Th1/%	Th2/%	Th1/Th2 ratio
RSA	27	36.4 $\pm$ 5.7 ¹⁾	1.9 $\pm$ 0.3 ¹⁾	20.3 $\pm$ 4.5 ¹⁾	28.1 $\pm$ 5.2 ¹⁾	2.2 $\pm$ 0.41)	14.3 $\pm$ 3.3 ¹⁾
Control	30	15.2 $\pm$ 2.8	3.2 $\pm$ 0.5	5.1 $\pm$ 1.3	13.0 $\pm$ 2.7	3.5 $\pm$ 0.6	4.0 $\pm$ 0.9

Compared with control group, 1) $P < 0.05$

SOCS3 在 Th2 细胞中的表达水平是 Th1 细胞的 23 倍之多^[8], 将 SOCS3 导入 T 细胞基因后可发现, IL-12 介导 Th1 细胞的分化过程受到显著性抑制和阻碍, 而 IL-4 诱导 Th2 细胞分化的过程未受到明显影响, 由此可见 SOCS3 具有促进 T 细胞转化成为 Th2 型细胞的功能作用。SOCS3 基因缺失或发生突变的小鼠体内 Th2 细胞的发育过程受到明显的抑制, 使得 Th1/Th2 平衡状态失衡^[9]。因此认为, SOCS3 与 Th1/Th2 状态失衡、Th2 免疫作用占有优势等均有密切的相关性, 推测 SOCS3 与其他细胞因子和信号传导通路相互作用是确保母体和胚胎组织界面 Th1/Th2 平衡状态和免疫耐受的关键^[10-11]。

本研究结果显示, 与 RSA 组比较正常妊娠时蜕膜及绒毛组织中 Th2 细胞因子及细胞水平均明显升高, 而 Th1 细胞因子和细胞水平均显著下降, 使得 Th1/Th2 比率出现明显的改变, 此结果证实 RSA 患者蜕膜及绒毛组织中 Th1 细胞介导的免疫损伤作用明显。此外研究还发现, RSA 组患者蜕膜及绒毛组织中 SOCS3 蛋白表达水平明显低于对照组 ($P < 0.05$), 由此推测 RSA 患者蜕膜及绒毛组织中 SOCS3 蛋白表达过低可诱导 Th1/Th2 失衡, 使得 Th1 细胞介导的免疫损伤作用占主导地位, 最终导致 RSA 发生。

参考文献:

- [1] Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion[J]. Arch Gynecol Obstet, 2005, 272(2): 95-108.
- [2] Liao L, Zheng R, Wang C, et al. The influence of down-regulation of suppressor of cellular signaling proteins by RNAi on glucose transport of intrauterine growth retardation rats[J]. Pediatr Res, 2011, 69(6): 497-503.
- [3] 赖毛华, 尤昭玲, 雷磊. SOCS 对 Th1/Th2 平衡的调控及妊娠影响的研究概况 [J]. 湖南中医药大学学报, 2008, 28(4): 79-81.
- [4] Lai MH, You ZL, Lei L. Study progress of SOCS on Th1/Th2 balance control and pregnancy[J]. J TCM Univ Hunan, 2008, 28(4): 79-81.
- [5] 乐杰, 谢辛, 林仲秋. 妇产科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1-20.
- [6] Le J, Xie X, Lin ZQ. Obstetrics and Gynecology[M]. 7 ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 1-20.
- [7] Wilczynski JR, Tchorzewsk H, Banasik M, et al. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua normal pregnancy and preeclampsia [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2003, 109(1): 8-14.
- [8] Achmann J, Raue A, Schilling M, et al. Division of labor by dual feedback regulators controls JAK2/STAT5 signaling over broad ligand range [J]. Mol Syst Biol, 2011, 19(7): 516-520.
- [9] Lindemann C, Hackmann O, Delic S, et al. SOCS3 promoter methylation is mutually exclusive to EGFR amplification in gliomas and promotes glioma cell invasion through STAT3 and FAK activation [J]. Acta Neuropathol, 2011, 122(2): 241-251.
- [10] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS Proteins: Negative regulators of cytokine signaling[J]. Stem Cells, 2001, 19(5): 378-387.
- [11] Seki Y, Inoue H, Nagata N, et al. SOCS3 regulates onset and maintenance of TH2-mediated allergic responses[J]. Nat Med, 2003, 9(8): 1047-1054.
- [12] Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, et al. Suppressor of Cytokine Signaling 3 Regulates Proliferation and Activation of T-helper Cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278(32): 29752-29759.
- [13] Poehlmann TG, Busch S, Mussil B, et al. The Possible role of the Jak/STAT Pathway in lymphocytes at the fetomaternal interface [J]. Chem Immunol Allergy, 2005, 89(8): 26-35.

(编辑 张恩健)