

# 白细胞介素 1 $\beta$ 对胚泡植入前后子宫基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 表达的影响

孙敬<sup>①②</sup> 彭景樾<sup>②</sup> 夏红飞<sup>②</sup> 陈宏<sup>①③\*</sup>

(① 西北农林科技大学动物科技学院 陕西 杨凌 712100 ;

② 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080 ;

③ 徐州师范大学细胞与分子生物学研究所 徐州 221116)

**摘要** :采用半定量 RT-PCR、免疫组化等方法,对处于胚泡植入前后时期 SD 妊娠大鼠体内注射超生理剂量的白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 检测处理前后妊娠子宫中基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 的表达变化,探讨 IL-1 $\beta$  对 MMP2 表达的影响。统计分析结果,妊娠 D4 及妊娠 D9 处理组与对照组无明显差异,妊娠 D6 处理组 MMP2 表达明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ) ;免疫组织化学检测结果,妊娠 D4, MMP2 主要表达于子宫腔上皮,基质及腺体表达较少;妊娠 D6,对照组 MMP2 表达主要分布于子宫腔上皮,处理组在子宫腔上皮处 MMP2 表达降低,妊娠 D9, MMP2 主要表达于子宫蜕膜层。结果表明,妊娠 D6,即胚泡植入时,IL-1 $\beta$  可明显抑制子宫腔上皮 MMP2 的表达。

**关键词** :SD 大鼠;白细胞介素 1 $\beta$ ;基质金属蛋白酶 2;子宫

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)04-01-05

## Effect of IL-1 $\beta$ on the Expression of MMP2 in Uterus before and after Blastocyst Implantation

SUN Jing<sup>①②</sup> PENG Jing-Pian<sup>②</sup> XIA Hong-Fei<sup>②</sup> CHEN Hong<sup>①③</sup>

(① *College of Animal Science and Technology, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shanxi 712100*; ② *State Key Lab of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080* ;

③ *Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China* )

**Abstract** :Effect of IL-1 $\beta$  on the expression of MMP2 in SD rat uterus before and after blastocyst implantation was investigated by RT-PCR and immunohistochemistry. RT-PCR and statistical analysis showed that there was no significant difference between control group and treatment group on the 4<sup>th</sup> day and 9<sup>th</sup> day of pregnancy. On the 6<sup>th</sup> day of pregnancy the expression of MMP2 in control group was significantly higher than that in treatment group. Immunohistochemistry showed that on the 4<sup>th</sup> day of pregnancy MMP2 was expressed mainly in luminal epithelium while a little expression was detected in matrix and gland ; on the 6<sup>th</sup> day of pregnancy MMP2 was expressed in luminal epithelium in control group, but expression was decreased in luminal epithelium in treatment group ; on the 9<sup>th</sup> day of pregnancy MMP2 was expressed in decidua. The results show that IL-1 $\beta$  significantly down-regulate the expression of MMP2 in luminal epithelium of uterus on the 6<sup>th</sup> day of pregnancy when blastocyst implantation takes place.

**Key words** SD rat ; IL-1 $\beta$  ; MMP2 ; Uterus

基金项目 中国科学院动物研究所计划生育生殖生物学国家重点实验室开发计划基金项目 ;

\* 通讯作者, E-mail : chenhong1212@263.net ;

第一作者介绍 孙敬,男,硕士研究生,研究方向 动物遗传育种与繁殖。

收稿日期 2005-02-02, 修回日期 2005-04-30

胚泡植入是一个涉及多种细胞因子协同参与的复杂生理过程,其中白细胞介素 1( IL-1 )是一种具有广泛生物学活性的多肽,不仅对多种免疫活性细胞具有重要的调节作用,而且参与炎症、发热、神经内分泌及抗肿瘤等多种生理过程。在妊娠过程中,IL-1 $\beta$  与其相应受体结合上调或下调生殖激素合成,进而影响排卵、黄体形成及退化、胚胎植入、妊娠维持、胎儿发育和分娩发动等一系列妊娠活动<sup>[1,2]</sup>。基质金属蛋白酶( MMPs )是一类结构同源、依赖 Zn<sup>++</sup> 和 Ca<sup>++</sup> 并以细胞外基质成分作为水解底物的蛋白酶家族<sup>[3,4]</sup>,其中 MMP2 是该家族中最主要的成员之一,主要功能是消化细胞外基质,并穿透基膜,在妊娠过程中促进胚泡植入子宫内层<sup>[5,6]</sup>。目前较多资料报道了在妊娠、肿瘤发生等生理过程中 MMPs 表达的时空变化<sup>[7,8]</sup>,关于妊娠过程中 IL-1 $\beta$  对 MMP2 作用的研究未见报道。本实验以 SD 大鼠为模型,研究了 IL-1 $\beta$  对胚泡植入前后子宫中 MMP2 时空表达的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 实验动物** 将 SD 雌鼠与 SD 雄鼠合笼交配,以验栓呈阳性为妊娠第 1 d,根据胚胎发育特点(一般 5.5 d 胚泡植入子宫内层),将妊娠早期分为植入前期( D1 ~ D4 )、植入期( D5 ~ D6 )和植入后期( D7 ~ D9 )。

**1.1.2 材料** 为检测 IL-1 $\beta$  对胚泡植入前后子宫中 MMP2 表达的影响,分别将处于妊娠早期各个阶段(植入前期 D4、植入期 D6 和植入后期 D9)的孕鼠随机分为 3 组,采取阴道口肌肉注射的方法,每组于各个阶段取材前 48 h 分别注射生理盐水(对照组)、250 ng IL-1 $\beta$  和 500 ng IL-1 $\beta$ ,注射体积均为 100  $\mu$ l。48 h 后肌肉注射氨基甲酸乙酯( 1 g/kg 体重)麻醉后处死,剖腹取子宫,剔除系膜组织,用灭菌 PBS 冲洗 3 遍,冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

**1.1.3 主要试剂** TRI-zol reagent 购自 Invitrogen 公司, M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶购自天为时代公司, MMP2 抗体

( Santa Cruz Biotechnology, Inc ) 辣根酶标记山羊抗鼠 IgG 和 DAB 显色试剂盒( Zymed Laboratories ) 购自北京中山生物公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的提取** 按照 TRI-zol 试剂的说明提取子宫组织总 RNA, 纯化后溶于适量灭菌 DEPC 水中,紫外分光光度计定量,并取少量样品电泳检测完整性。

**1.2.2 RT-PCR** 以 RNA 反转录所得 sscDNA 为模板 PCR 扩增 MMP2 和 GAPDH(引物序列见表 1),产物进行凝胶电泳检测。扩增反应条件: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 总共 30 个循环。

表 1 引物及序列

Table 1 Primers and sequence

Gene	Primers sequence
MMP2	5' CACCTACACCAAGAAGCTTCC 3'
	5' AACACAGCCTTCTCCTCCTG 3'
GAPDH	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'
	5' TCCACCACCTGTGTCTGTA 3'

**1.2.3 子宫组织切片的制备** 分别取各个阶段处理组和对照组孕鼠,肌肉注射氨基甲酸乙酯( 1 g/kg 体重)进行麻醉,开胸灌流,先快速灌注生理盐水 200 ml 左右,再缓慢灌注 4% 的多聚甲醛( 0.1 mol/L PBS, pH 7.4 ) 200 ml,大鼠出现四肢抽搐,身体僵硬后剥腹取出子宫,剔除系膜,移入 4% 的多聚甲醛中固定 6 h,再放入 20% 的蔗糖中脱水至下沉。取子宫组织做连续横切片( Leica 冰冻切片机),片厚 10  $\mu$ m,存放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

**1.2.4 MMP2 的免疫组化染色** 采用 DAB 法进行免疫检测,子宫切片常规固定,漂洗 0.3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温 30 min, 2 mol/L 盐酸 37 $^{\circ}$ C 40 min; 5% 奶粉室温封闭 40 min; 10% 封闭用羊血清 37 $^{\circ}$ C 室温封闭 20 min; MMP2 抗体( 1:200 ) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 辣根酶标记山羊抗鼠 IgG( 1:1 000 ) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h; DAB 显色( A、B、C 三种液体各一滴加入 1 ml PBS 中) 6 min; 苏木精染核 40 s; 以上各步骤间均用 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次  $\times$  5 min。显色后常规脱水、透明、封片。光镜下观

察 棕色着色处为阳性。阴性对照用未免疫的羊血清代替一抗,其他步骤相同。

**1.2.5 半定量及统计分析** 以 GAPDH 作内参,重复进行 3 次 MMP2 和 GAPDH 的 PCR 扩增,凝胶电泳图目的基因条带经 Quantity One 软件(Bio-Rad)扫描后,所得各组数据之间的差异比较采用 Student's *t*-检验,显著性差异以  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  为标准。以上数据均采用 SPSS 软件进行统计分析。

## 2 结果

**2.1 MMP2 的表达** 以 GAPDH 作为内参,PCR 产物凝胶电泳结果表明:分别注射 250 ng 和 500 ng IL-1 $\beta$  的妊娠 D6 子宫 MMP2 表达低于对照组妊娠 D6 子宫;分别注射 250 ng、500 ng IL-1 $\beta$  的妊娠 D4 子宫和分别注射 250 ng、500 ng IL-1 $\beta$  的妊娠 D9 子宫与各自相应的对照组妊娠 D4 子宫及妊娠 D9 子宫相比,MMP2 的表达无明显变化(图 1)。

所得数据经 SPSS 软件作统计分析表明:分别注射 250 ng 和 500 ng IL-1 $\beta$  的妊娠 D6 子宫 MMP2 表达显著低于对照组妊娠 D6 子宫( $P <$

0.01);妊娠 D4 及妊娠 D9 处理组与对照组间 MMP2 的表达无明显差异(图 2)。

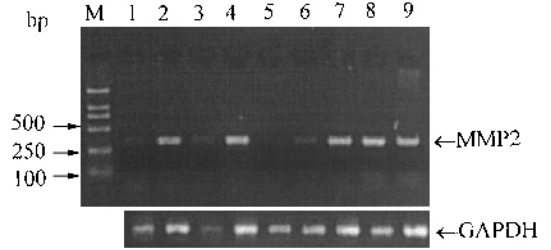


图 1 妊娠早期不同阶段 IL-1 $\beta$  对大鼠子宫中 MMP2 表达的影响

Fig.1 Effect of IL-1 $\beta$  on the expression of MMP2 in rat uterus at different stages of pregnancy

M 标准 DNA (DNA marker);

1 4 7 分别代表妊娠 D4、D6、D9 正常大鼠子宫中 MMP2 的表达;2 5 8 分别代表妊娠 D4、D6、D9 经 250 ng IL-1 $\beta$  处理的大鼠子宫中 MMP2 的表达;3 6 9 分别代表妊娠 D4、D6、D9 经 500 ng IL-1 $\beta$  处理的大鼠子宫中 MMP2 的表达。

1, 4 and 7 indicate the expression of MMP2 in rat uterus (control), on D4, D6 and D9 of pregnancy respectively; 2, 5 and 8 indicate the expression of MMP2 in the uterus of rat treated by 250 ng IL-1 $\beta$  on D4, D6 and D9 of pregnancy respectively; 3, 6 and 9 indicate the expression of MMP2 in the uterus of rat treated by 500 ng IL-1 $\beta$  on D4, D6 and D9 of pregnancy respectively.

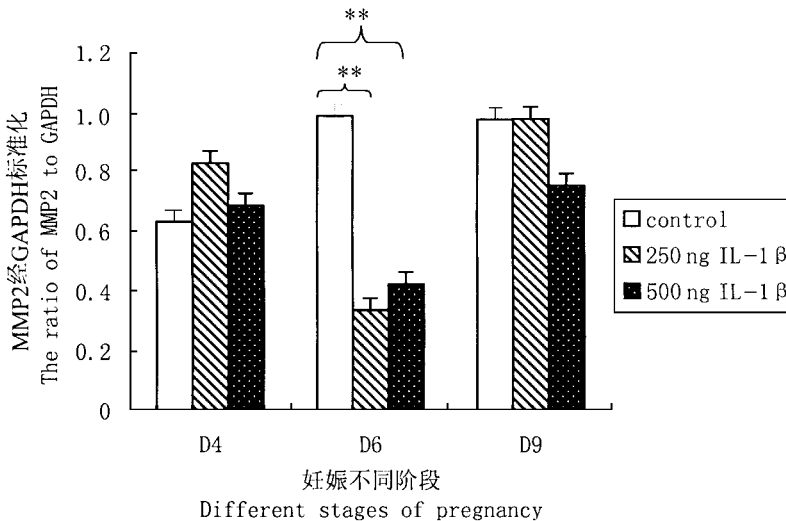


图 2 妊娠不同阶段 IL-1 $\beta$  对大鼠子宫中 MMP2 表达的影响

Fig.2 Effect of IL-1 $\beta$  on the expression of MMP2 in rat uterus at different stages of pregnancy

妊娠 D4、D9 处理组分别与相应对照组子宫相比,MMP2 表达均无明显差异;妊娠 D6 处理组与对照组子宫相比,MMP2 的表达显著降低,图中所有数据均经管家基因 GAPDH 进行标准化,\*\* $P < 0.01$ 。

The expression of MMP2 had no significant difference between control and treatment group, on D4 and D9 of pregnancy respectively. However, MMP2 expression was significantly decreased in treatment group on D6 of pregnancy. The data were standardized by GAPDH, \*\* $P < 0.01$ .

**2.2 MMP2 免疫组化检测** 免疫组织化学检测结果:妊娠 D4, MMP2 主要表达于子宫腔上皮, 基质及腺体表达较少; 妊娠 D6, 对照组

MMP2 的表达主要分布于子宫腔上皮, 处理组在子宫腔上皮处 MMP2 表达降低; 妊娠 D9, MMP2 阳性信号主要分布于子宫蜕膜层(图 3)。

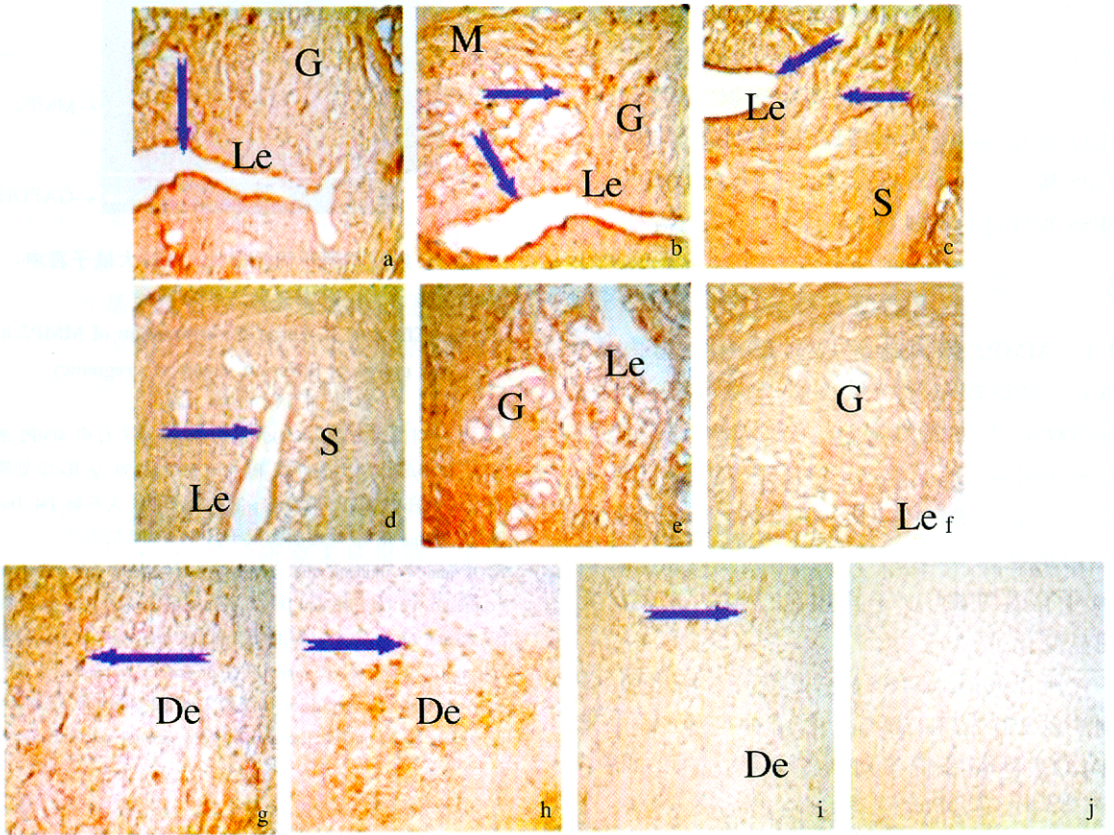


图 3 免疫组化检测不同妊娠时期子宫 MMP2 的表达

Fig.3 The expression of MMP2 detected by immunohistochemistry

a, b, c 分别代表妊娠 D4 子宫对照组、250 ng 及 500 ng 处理组; d, e, f 分别代表妊娠 D6 子宫对照组、250 ng 及 500 ng 处理组; g, h, i 分别代表妊娠 D9 子宫对照组、250 ng 及 500 ng 处理组; j 为阴性对照; Le: 子宫腔上皮; S: 子宫基质; G: 子宫腺体; M: 子宫基层; De: 子宫蜕膜; 蓝色箭头所指处为 MMP2 免疫组化阳性信号。(a~j × 100)

a, b and c, indicate control, 250 ng and 500 ng treatment group on D4 of pregnancy respectively; d, e and f indicate control, 250 ng and 500 ng treatment group on D6 of pregnancy respectively; g, h and i, indicate control, 250 ng and 500 ng treatment group on D9 of pregnancy respectively; j indicate negative control;

Le: luminal epithelium; S: stroma; G: gland; M: myometrium;

De: deciduas. Blue arrows indicate positive signals of MMP2 by immunohistochemistry. (a~j × 100)

### 3 讨论

根据大鼠胚胎发育特点, 其胚泡一般在妊娠第 5 d 至第 6 d 植入子宫内膜<sup>[9]</sup>, 在此期间 MMP2 在子宫和滋养层细胞大量表达, 不断水解细胞外基质, 促进胚泡侵入子宫内膜, 伴随子宫内膜发生蜕膜反应, 胚泡完成植入。已有研究表明, 在胚泡植入前期, IL-1 $\beta$  在子宫中的表

达较高, 胚泡刚植入时 IL-1 $\beta$  的表达显著降低<sup>[10]</sup>, 植入前期 IL-1 $\beta$  的高表达可能与胚泡粘附和入侵时产生的炎症反应有关, 在小鼠 IL-1 $\beta$  通过上调子宫内膜白血病抑制因子(LIF)的表达促进胚泡着床<sup>[11]</sup>, 随着胚泡植入子宫内膜和炎症反应的消失, IL-1 $\beta$  表达减少, 过表达的 IL-1 $\beta$  将引起 IFN $\gamma$  表达上调, 而 LIF 表达下调, 不利于子宫接受态的形成, 从而影响胚泡着

床<sup>[12]</sup>。

最近 ,Paz de la Torre 等<sup>[13]</sup>以大鼠成纤维细胞为材料 ,发现 IL-6 使 PP2A 蛋白催化亚单位的酪氨酸残基发生磷酸化进而降低 PP2A 活性以及延长 c-Jun 的磷酸化状态 ,同时激活 Jak2 信号通路 ,最终可提高 MMP13 mRNA 的表达 ; Yoshihiro Kida 等<sup>[14]</sup>以人的齿龈成纤维细胞为材料 ,发现 IL- $1\beta$  可通过激活 MAPK/AP-1 和 NF- $\kappa$ B 进而提高 MMP1 mRNA 的表达。这些资料给我们一些启示 ,即体外实验已经证实白细胞介素家族成员可通过一定的信号转导通路调节基质金属蛋白酶的表达。本实验以超生理剂量 IL- $1\beta$  分别处理妊娠 D4、D6 和 D9 大鼠子宫 ,发现在妊娠 D6 ,即胚泡植入时 ,经 IL- $1\beta$  处理的子宫在腔上皮处 MMP2 表达显著下降 ,其机理亦可能是 IL- $1\beta$  与子宫腔上皮细胞的 IL-1 受体相结合 ,进而激活某种信号转导通路 ,经过一系列信号传递最终引起 MMP2 表达下调。这一结果暗示白细胞介素与基质金属蛋白酶间存在着一定的联系 ,他们在胚泡植入时子宫发生的一系列生理及形态变化过程中共同发挥作用 ,而且只有当二者及其他有关的因子一同协作并达到理想的平衡状态时 ,子宫才具有接受性 ,胚泡才可正确植入 ,否则将引起妊娠的失败。综上所述 ,本实验发现在胚泡植入时 IL- $1\beta$  可明显抑制子宫腔上皮 MMP2 的表达 ,其具体作用机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献

[ 1 ] Bischof P ,Meisser A ,Campana A. Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion. *Placenta* ,2000 ,**21**( Suppl. A ) S55 ~ 60.

[ 2 ] Kniss D A ,Jams J D. Regulation of parturition update. Endocrine and paracrine effectors of term and preterm labor. *Clin Perinato* ,1998 ,**25**( 4 ) : 819 ~ 836.

[ 3 ] Woessner J F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* ,1995 ,**5**( 8 ) : 2 145 ~ 2 154.

[ 4 ] Hulboy D L ,Rudolph L A ,Matrisian L M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* ,1997 ,**3**( 1 ) : 27 ~ 45.

[ 5 ] Murphy G ,Ward R ,Hembry R M ,et al. Characterization of gelatinase from pig mononuclear leucocytes. *Biochem J* , 1989 ,**258**( 2 ) : 463 ~ 472.

[ 6 ] Marbaix E ,Donnez J ,Courtroy P J ,et al. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 , **89**( 24 ) : 11 789 ~ 11 793.

[ 7 ] Christophe Helary , Alexandrine Foucault-Bertaud , Gaston Godeau , et al. Fibroblast populated dense collagen matrices : cell migration ,cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials* 2005 ,**26**( 13 ) : 1 533 ~ 1 543.

[ 8 ] Séverine Mazaud ,Romain Guyot ,Céline J Guigon ,et al. Basal membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary : contribution of proteinases of the MMP and PA families. *Developmental Biology* 2005 ,**277**( 2 ) : 403 ~ 416.

[ 9 ] Parr M B ,Parr E L ,Munaretto K ,et al. Immunohistochemical localization of prostaglandin synthase in the rat uterus and embryo during the peri-implantation period. *Biol Reprod* , 1988 ,**38**( 2 ) : 333 ~ 343.

[ 10 ] De M Sanford T R ,Wood G W. Expression of interleukin 1 , interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in mouse uterus during the peri-implantation period of pregnancy. *J Reprod Fertil* ,1993 ,**97**( 1 ) : 83 ~ 89.

[ 11 ] 贺斌 ,刘银坤 ,张伟等 . 细胞因子对白血病抑制因子在小鼠孕早期子宫内表达的调节 . 生殖医学杂志 ,2000 , **9**( 4 ) : 33 ~ 37.

[ 12 ] Zhang C Y ,Cao Y Q. The effect of cytokines and steroid hormone on Muc-1 in uterus of early pregnancy mouse. Beijing : The 4<sup>th</sup> International Conference on Reproductive Endocrinology ,Beijing 2001 ,132 ~ 133.

[ 13 ] Paz de la Torre , Teresa Díaz-Sanjuán , Inmaculada García-Ruiz , et al. Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through Janus kinase-2-mediated inhibition of serine/threonine phosphatase-2A. *Cellular Signalling* 2005 ,**17**( 4 ) : 427 ~ 435.

[ 14 ] Yoshihiro Kida , Makoto Kobayashi , Takao Suzuki , et al. Interleukin-1 stimulates cytokines ,prostaglandin E<sub>2</sub> and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF- $\kappa$ B in human gingival fibroblasts. *Cytokine* ,2005 ,**29**( 4 ) : 159 ~ 168.