

子宫内膜异位症小鼠巨噬细胞移动抑制因子变化规律的研究

周卫东¹, 陈琼华^{2*}, 许雅云², 张 聪¹, 石 艳¹, 陈清西^{1*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

2. 福建医科大学附属厦门第一医院, 福建 厦门 361004)

摘要: 利用 BALB/c 小鼠子宫内膜异位症(EMs)模型, 采用实时荧光定量 PCR 技术和酶联免疫吸附试验, 从 mRNA 水平和蛋白水平上检测了 EMs BALB/c 小鼠腹腔免疫细胞和腹腔液中的巨噬细胞移动抑制因子(MIF)在造模后变化情况。结果显示: 造模后的 21 d 内 MIF 在基因水平和蛋白水平上都高于对照组, 尤其在异位灶形成的早期阶段增加更为显著。提示 MIF 与 EMs 的发生发展过程关系密切, 可能参与早期的病理活动过程。

关键词: 子宫内膜异位症; 巨噬细胞移动抑制因子; 实时荧光定量 PCR; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: R 711.71

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2010)02-0272-04

子宫内膜异位症(EMs)是指子宫内膜出现于子宫腔以外的区域(主要在盆腔腹膜)所引起的一种病变。EMs 是最常见的妇科疾病之一, 伴随着疼痛、不孕等症状, 在育龄妇女中, 其发病率大约为 10%, 且还有上升的趋势^[1]。EMs 的确切发病机制还不清楚, 目前以 Sampson 的“经血逆流种植学说”为主导, 并认为: 一些有活性的子宫内膜组织碎片随经血逆流至腹腔, 经历粘附-侵袭-血管形成的过程, 逐渐形成具有分泌激素并对激素产生反应的活性病灶^[2]。巨噬细胞移动抑制因子(MIF)是一种重要的免疫和促血管生成因子, 文献报道, EMs 患者腹腔液中 MIF 的水平显著高于正常妇女, 提示 MIF 在 EMs 发病过程中发挥了重要作用^[3-4]。但是, 在 EMs 发生发展过程中 MIF 发生怎样的变化, 目前未见报道。本研究构建 EMs 小鼠模型, 分别运用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 EMs 小鼠中 MIF 基因和蛋白水平, 观察从子宫内膜到达盆腔至异位灶形成后的一段时间内(21 d) EMs 小鼠腹腔微环境中 MIF 的变化情况, 以期揭示 MIF 在 EMs 发病过程中可能存在的作用。

1 材料与方法

收稿日期: 2009-05-15

基金项目: 厦门市科技计划指导性项目(3502Z20077047; 3502Z20084006)

* 通讯作者: chenqx@xmu.edu.cn; cqhua616@xmu.edu.cn

1.1 动物、仪器与试剂

SPF 级 BALB/c 小鼠 175 只, 雌性, 8 周龄, 体重 19~21 g, 性周期 4~5 d, 厦门大学生命科学院实验动物中心提供。在室温 21~23℃、湿度 60%~75%、12 h 光照交替的条件下喂养。

仪器: Roter-Gene3000 荧光定量 PCR 仪为澳大利亚 Corbett Research 公司产品; BIO-RAD My Cycler 型普通 PCR 仪和 SIGMA 1-14 离心机分别为美国 BIO-RAD 和 SIGMA 产品。试剂: RNAspin Mini Kit 购自瑞典 GE Healthcare 公司; RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; ELISA 试剂盒购自美国 R & D Systems 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动物分组及 EM 小鼠模型的建立

挑选符合条件的 BALB/c 小鼠 175 只, 随机分成接受鼠 110 只为研究组, 捐赠鼠 55 只, 未造模组 10 只为对照组。参照我们之前报道过的方法^[5]制作成 EMs 小鼠模型。设立 11 个观察日(即造模手术后的第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18 和 21 天), 每次观察 10 只。

1.3 样品收集

颈椎脱臼法处死小鼠, 腹腔注射 3 mL 无菌 PBS, 反复冲洗小鼠腹腔腔给予轻揉腹部 20 次, 尽可能吸尽腹腔洗液置于 2 个 PE 管中, 1 个管离心 10 000 r/min, 1 min, 弃上清液, 收集沉淀细胞, 并迅速放入液氮罐中, 用于提取 RNA; 另 1 管离心 2 000 r/min, 5 min, 收集上清液, 迅速放入液氮罐中, 用于酶联免疫吸附试验。

1.4 总 RNA 提取及 RT-PCR

总 RNA 的提取:采用 RNAspin Mini 试剂盒提取,操作按照说明书进行。cDNA 合成:按 RT-PCR 试剂盒说明书配制 RT-PCR 反应体系 20 μL , 含 4 μL PrimeScript Buffer (5 \times), 1.0 μL PrimeScript RT Enzyme Mix, 1.0 μL Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$), 1.0 μL Random 6 mers (100 $\mu\text{mol/L}$), 10 μL Total RNA, 3 μL ddH₂O。反转录反应条件为:37 15 min(反转录反应);85 5 s(反转录酶的失活反应)。RT-PCR:按 RT-PCR 试剂盒说明书进行。引物序列由宝生物工程大连有限公司合成,以 β -actin 为内参。 β -actin 上游引物序列:5'-CA TCCGTAAGACCTCTA TGCCAAC-3';下游引物序列:5'-A TGGA GC-CACCGA TCCACA-3'。MIF 上游引物序列:5' CTG-CACA GCA TCGGCAA GA-3';下游引物序列:5'-TT-GGCA GCGTTCA TGTCGTAA-3'。20 μL 体系中含 10 μL SYBR Premix EX Taq(2 \times), 0.4 μL PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.4 μL PCR Reverse Primer(10 $\mu\text{mol/L}$), 1.6 μL cDNA 和 7.6 μL ddH₂O。反应条件为:95 预变性 10 s, 1 个循环;95 5 s, 60 20 s, 45 个循环。反应在 Roter-Gene3000 荧光定量 PCR 仪上进行。RT-PCR 产物利用仪器上自带的 RG-3000 系统软件分析,可观察扩增曲线和熔解曲线,并对 cDNA 的含量进行定量分析,计算样本的 CT 值。通过 $2^{-\text{CT}}$ 方法^[6]分析 MIF 基因的相对表达情况。

1.5 ELISA

腹腔液 MIF 的蛋白定量用 ELISA 测定,具体操作按照试剂盒(Mouse MIF ELISA kit)说明进行。

1.6 统计分析

采用 SPSS 14.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两样本 t 检验,相关性分析采用 person 相关分析,以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 造模结果

造模后于第 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 15, 18, 21 天观察每次剖腹 10 只接受鼠,了解造模结果。第 1 天见异位灶生长,第 2 天开始出现鲜红色斑点或血泡,此后病灶的颜色和大小也随着时间发生变化,逐渐变为白色或透亮的囊肿或疤痕。取下病损组织,用常规石蜡包埋、HE 染色,根据 EMs 的病理学诊断标准,镜下可见子宫内腺体或间质者可确诊为子宫内膜异位症。图 1、2 显示的分别是 EMs 小鼠模型和异位灶病理组织切

片图。在 110 只接受鼠中,有 101 只造模成功,成功率为 91.82%,造模效果良好。

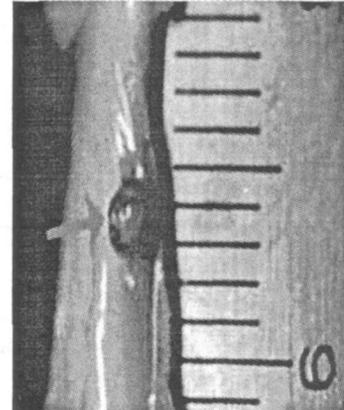


图 1 BALB/c 小鼠 EMs 模型

Fig. 1 The EMs model of BALB/c mice

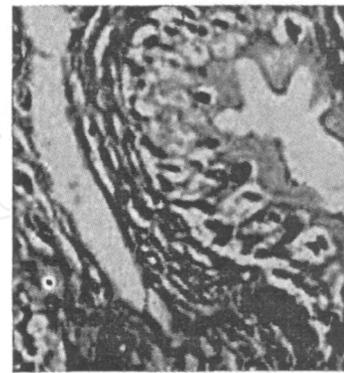


图 2 异位灶病理组织切片

Fig. 2 Mouse pathology of ectopic tissue

2.2 不同造模时间内 EMs 小鼠模型 MIF mRNA 的变化情况

用 RT-PCR 检测 120 只 BALB/c 小鼠(其中未造模组 10 只为对照组)腹腔液中免疫细胞 MIF mRNA 的水平,观察在造模后不同观察日内 MIF mRNA 表达的变化情况(图 3),并将对照组规定为第 0 天。结果显示,造模后 MIF mRNA 的水平在 11 个观察日里均显著高于未造模组且呈现出一定的变化规律。第 1 天开始上升,至第 2 天达到第 1 个峰值,而后至第 5 天回落到一低值;在第 6 天和第 12 天分别又出现 2 个峰值,在其他时间里则在一定水平上波动。第 1 个峰值(3.64 ± 0.21)又明显比第 2 个峰值(1.88 ± 0.15)和第 3 个峰值(1.88 ± 0.11)要高($p < 0.01$);而第 2 个峰值和第 3 个峰值之间无显著性差异($p > 0.05$);造模后第 1~3 天的均值(2.70 ± 0.83)显著高于第 4~21 天的均值(1.54 ± 0.23) ($p < 0.05$);第 4~21 天的均值亦显著高于对照组(1.00 ± 0.09) ($p < 0.05$)。

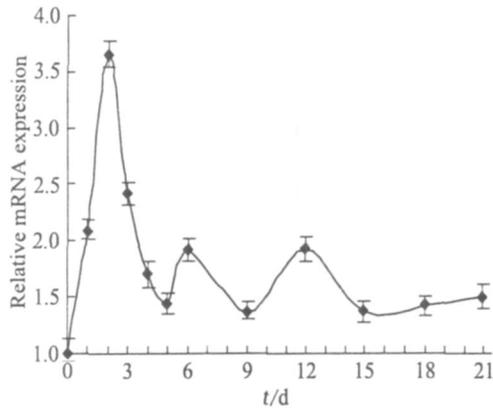


图3 MIF mRNA水平随时间的变化情况

Fig. 3 Change in mRNA level of MIF over time

2.3 不同造模时间内 EMs 小鼠模型 MIF 浓度的变化情况

从图4可以看出,造模后MIF的浓度在11个观察日里均显著高于未造模组且呈现出一定的变化规律。从造模第1天起小鼠腹腔液中MIF的浓度随即开始上升,并于第3天达到最高峰,并于第5天回落至最低值;第12天再次出现一个峰值,而后再下降并在一定水平内波动。第1个峰值 $[(1.109 \pm 0.061) \text{ ng/mL}]$ 又显著高于第2个峰值 $[(0.774 \pm 0.046) \text{ ng/mL}]$ ($p < 0.05$)。造模后第1~4天的均值 $[(0.983 \pm 0.105) \text{ ng/mL}]$ 显著高于第5~21天的均值 $[(0.629 \pm 0.081) \text{ ng/mL}]$ ($p < 0.05$);第5~21天的均值显著高于对照组 $[(0.38 \pm 0.02) \text{ ng/mL}]$ ($p < 0.05$)。

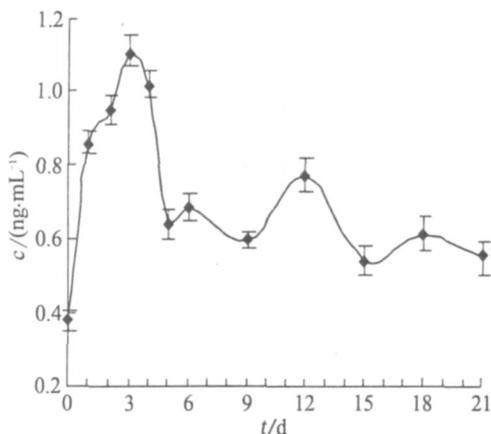


图4 MIF蛋白水平随时间的变化情况

Fig. 4 Change in the protein level of MIF over time

3 讨论

EMs是一种受多种因素影响的疾病,其发病机制还尚不清楚。越来越多的证据表明炎症反应与EMs有着密切的联系。研究发现,与健康妇女相比EMs患者

腹腔内巨噬细胞的数目和活性增加,其分泌的一些炎症相关因子如IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, MMP-9等也有明显的上升^[7]。因此,另一炎症相关因子MIF与EMs有着何种联系,值得我们研究。尽管已有报道EMs患者腹腔液MIF水平显著高于正常人,但MIF的上升是发生在异位病灶形成之前还是形成之后以及它的变化是否遵循着某种模式均尚不清楚。

MIF于1966年首次被报道,是最早发现的细胞因子之一^[8]。近年来,人们发现MIF是一种重要的多功能细胞因子,参与了炎症反应、免疫应答、细胞增殖、血管生成以及肿瘤形成等多种生理生化过程,与多种炎症疾病和自身免疫疾病的发病有关^[9-10]。Yang等^[11]研究发现,人的子宫内膜异位细胞能够分泌MIF,并具有促进人内皮细胞有丝分裂作用,可能与EMs中新生血管形成过程有关。Kats等^[12]采用RT-PCR和Western Blot技术,发现EMs患者的异位组织中,MIF在基因和蛋白水平上都高效表达,尤其是在有明显血管形成和白细胞浸润的异位灶中,MIF的高表达更为明显;另外MIF在异位组织中的高效表达主要是在间质中的内皮细胞、巨噬细胞和T淋巴细胞,暗示MIF与血管形成和炎症局部浸润有着紧密联系。

本研究发现,MIF在造模后的21d内在基因水平和蛋白水平上都高于对照组,其中异位灶形成的早期阶段(第1~3天),MIF mRNA的均值为 (2.70 ± 0.83) 显著高于中晚期(第4~21天)的均值 (1.54 ± 0.23) ,后者又显著高于对照组 (1.00 ± 0.09) ;异位灶形成的早期阶段(第1~4天)MIF的蛋白浓度均值 $[(0.983 \pm 0.105) \text{ ng/mL}]$ 显著高于中晚期(第5~21天)的均值 $[(0.629 \pm 0.081) \text{ ng/mL}]$,后者又显著高于对照组 $[(0.38 \pm 0.02) \text{ ng/mL}]$ 。可见,不管是在基因水平还是在蛋白水平上,MIF在异位灶形成的早期阶段都出现了高表达的情况。Kats等^[12]曾发现MIF在红色细小的异位灶中的表达显著高于在典型的蓝黑色或者白色异位灶中的表达,提示MIF主要在具有活性及早期阶段的异位灶中表达,支持了我们的研究结果。从MIF在异位灶形成早期的高表达及MIF参与促炎反应及血管形成的生理效应上,有理由推测MIF在EMs早期病灶产生和新生血管形成中起着重要作用。此外,我们的研究还发现MIF在造模后的第1天便显著上升,而此时尚未有异位灶形成。也就是说MIF在异位灶形成之前就开始上升,这和我们之前研究的几种细胞因子的变化规律是一致的^[5]。提示MIF的增加很有可能是EMs形成的原因之一,而不是由EMs引起的结果,这还需要进一步研究证实。

在 11 个观察日里, MIF 的蛋白水平与 mRNA 水平较为一致. 提示 EMs 小鼠模型中后期阶段 MIF 分泌的减少, 更有可能是由于 mRNA 合成减少或者 mRNA 的不稳定性而引起的, 在翻译水平或者翻译后的事件引起的可能性较小. 因此, 在 EMs 中 MIF 在转录水平上如何调节, 有必要进一步深入研究.

综上所述, 本研究显示在 EMs 小鼠造模后的一段时间内, MIF 水平变化遵循着某种较为固定的模式, 其基因和蛋白水平在异位病灶形成前就显著上升, 并在早期阶段(第 1~4 天)维持一高水平, 中晚期(第 5~21 天)明显下降, 但仍显著高于正常小鼠. 提示 MIF 的增加更可能是 EMs 形成的原因而不只是 EMs 引起的结果, 它可能在异位内膜早期的血管形成过程中发挥重要的作用, 从而作为 EMs 病理生理过程中一种关键的细胞调节因子, 值得我们进行更深入的研究.

参考文献:

- [1] Giudice L C, Kao L C. Endometriosis[J]. Lancet, 2004, 364(9447):1789-1799.
- [2] Annemiek W N, Patrick G G, Ayse Y D, et al. Pathogenesis of endometriosis[J]. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, 2004, 18(2):233-244.
- [3] Metz C N, Bucala R. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulation of the immune response[J]. Adv Immunol, 1997, 66:197-223.
- [4] Kat R, Collette T, Metz C N, et al. Marked elevation of macrophage migration inhibitory factor in the peritoneal fluid of women with endometriosis[J]. Fertil Steril, 2002, 78(1):69-76.
- [5] Chen Q H, Zhou W D, Su Z Y, et al. Change of proinflammatory cytokines follows certain patterns after induction of endometriosis in a mouse model[J/OL]. Fertil Steril, (2009-04-01) [2009-05-15] <http://www.sciencedirect.com/science>. 2009. 02. 013.
- [6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [7] Harada T, Iwabe T, Terakawa N. Role of cytokines in endometriosis[J]. Fertility and Sterility, 2001, 76:1-10.
- [8] David J R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction[J]. Pathology, 1966, 56:72-77.
- [9] Nishihira J, Ishibashi T, Fukushima T, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 995:171-182.
- [10] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3:791-800.
- [11] Yang Y, Degranpre P, Kharfi A, et al. Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85:4721-4727.
- [12] Kats R, Metz C N, Akoum A. Macrophage migration inhibitory factor is markedly expressed in active and early-stage endometriotic lesions [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(2):883-889.

Change of MIF after Induction of Endometriosis in a Mouse Model

ZHOU Wei-dong¹, CHEN Qiong-hua^{2*}, XU Ya-yun², ZHANG Cong¹,
SHI Yan¹, CHEN Qing-xi^{1*}

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering,
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. The First Hospital of Xiamen Attached to the Fujian Medical University, Xiamen 361004, China)

Abstract :By using the built BALB/c mice endometriosis model, the mRNA and protein levels of MIF in the peritoneal cavity immune cells and peritoneal fluid of model mice were detected through real-time quantitative RT-PCR and ELISA, respectively. The results showed that in the 21 days after induction the mRNA and protein levels of MIF in model mice were all significantly higher than control group. MIF was markedly expressed in early-stage endometriotic lesions. It was revealed that MIF play a key role in the pathophysiology of endometriosis, and may involve in the early process of the pathology.

Key words :endometriosis; MIF; real-time quantitative PCR; ELISA