

# IFN- $\gamma$ 诱导蛋白 10 及其受体在子痫前期孕妇血清和胎盘组织中的表达

朱敏 王建芳 徐秋莲 薛洪燕 金彦 章根琴 徐攀

**【摘要】** 目的 探讨子痫前期孕妇血清及胎盘组织中 IFN- $\gamma$  诱导蛋白 10(IP-10)及其受体 CXCR3 的表达情况。方法 选择同期住院的晚期正常妊娠、轻度子痫前期和重度子痫前期孕妇各 20 例。采用 ELISA、实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 等方法检测血清 IP-10 水平、CXCR3 mRNA 表达水平,以及胎盘组织中 IP-10、CXCR3 蛋白和 mRNA 表达水平;并对子痫前期孕妇 IP-10 与 CXCR3 进行 Pearson 相关分析。结果 与正常妊娠组比较,轻、重度子痫前期孕妇血清 IP-10 水平和 CXCR3 mRNA 表达水平均有不同程度的增高(均  $P < 0.05$ ),且均为重度子痫前期组高于轻度子痫前期组(均  $P < 0.05$ )。此外,轻、重度子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10、CXCR3 蛋白和 mRNA 水平均明显高于正常妊娠组(均  $P < 0.05$ )。Pearson 相关分析显示,子痫前期孕妇血清 IP-10 水平与外周血 CXCR3 mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.914, P < 0.05$ );子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10 mRNA 表达水平与 CXCR3 mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.907, P < 0.05$ )。结论 IP-10 及其受体 CXCR3 表达上调参与子痫前期病程,子痫前期孕妇血清、胎盘组织中 IP-10 与 CXCR3 均呈正相关,可能与子痫前期的发病有关。

**【关键词】** IFN- $\gamma$  诱导蛋白 10 CXCR3 子痫前期 血清 胎盘

Expression and significance of IFN- $\gamma$  inducible protein 10 and its receptor CXCR3 in serum and placenta in pregnant women with preeclampsia ZHU Min, WANG Jianfang, XU Qiulian, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Jinhua People's Hospital, Jinhua 321000, China

**【Abstract】** Objective To investigate the expression of IFN- $\gamma$  inducible protein 10 (IP-10) and its receptor CXCR3 in placenta and serum of gravidas with preeclampsia. Methods Samples of placenta and serum were collected from normal gravidas, gravidas with mild preeclampsia and gravidas with severe preeclampsia with 20 cases in each group. The protein and mRNA expression of IP-10 and CXCR3 in placenta and serum was detected by ELISA, real-time PCR and Western blot, respectively. Results ELISA showed that serum IP-10 levels in patients with severe or mild preeclampsia were significantly higher than those in normal pregnancy group ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression of CXCR3 in peripheral blood of patients with severe or mild preeclampsia was significantly higher than that in normal pregnancy group ( $P < 0.05$ ). Real-time PCR and Western blot showed that the expression levels of IP-10 and CXCR3 mRNA and protein in the placenta of severe or mild preeclampsia groups were significantly higher than those in normal pregnancy group ( $P < 0.05$ ). Conclusion The elevated expressions of IP-10 and its receptor CXCR3 in the placenta and serum may be involved in the pathogenesis of preeclampsia.

**【Key words】** IFN- $\gamma$  inducible protein 10 CXCR3 Preeclampsia Serm Placenta

子痫前期是导致孕妇和围生儿病死率的主要原因之一,应予以重视,特别是重度子痫前期。子痫前期的病因及发病机制较为复杂,可能与螺旋动脉异常变形、慢性子宫胎盘缺血、上皮细胞功能不良、血管生成障碍、血管内炎症和 Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 型细胞因子失衡等因素有关<sup>[1]</sup>。IFN-

$\gamma$  诱导蛋白 10(inducible protein 10, IP-10)是新发现的一种趋化因子,由 IFN- $\gamma$  诱导产生。相关研究发现 IP-10 具有重要的生物学功能,能介导 Th<sub>1</sub> 型炎症反应,还能抑制血管新生<sup>[2]</sup>。Gotsch 等<sup>[3]</sup>研究发现子痫前期孕妇血清 IP-10 水平明显高于正常妊娠妇女,提示 IP-10 可能与子痫前期的发病有关。故本文通过检测子痫前期孕妇血清及胎盘组织中 IP-10 及其受体 CXCR3 的表达,旨在探讨与子痫前期发病的关系。

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2013KYD276)

作者单位:321000 金华市人民医院产科

通信作者:王建芳, E-mail: jefayeking@163.com

## 1 对象和方法

1.1 对象 选取 2013 年 6 月至 2014 年 6 月住院的子痫前期孕妇 40 例为研究对象,子痫前期的诊断和分类标准参照《妇产科学》<sup>[4]</sup>;轻度子痫前期孕妇 20 例,年龄 24~32 岁,平均(27.03±2.68)岁,孕周 37~39 周,平均(37.89±3.47)周;重度子痫前期孕妇 20 例,年龄 26~34 岁,平均(29.46±3.78)岁,孕周 32~37 周,平均(35.91±1.47)周。选择同期血压正常的晚期正常妊娠妇女 20 例为正常妊娠组,年龄 22~30 岁,平均(26.93±2.11)岁,孕周 38~40 周,平均(39.19±1.56)周。3 组孕妇均为单胎妊娠,既往无心、肝、肾及内分泌疾病史,无其他妊娠合并症及并发症;此外,在年龄、孕周方面比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。本研究经医院伦理委员会批准,并取得患者知情同意。

1.2 主要仪器和试剂 IP-10 ELISA 试剂盒(美国 Sigma 公司),酶标仪(VARIOSKAN FLASH ELx800 型,美国 Thermo 公司),全自动荧光定量 RT-PCR 仪(美国罗氏公司),RNA 反转录试剂盒(日本东洋纺公司),RNA 试剂盒(美国 Promega 公司),IP-10 抗体(美国 CST 公司),CXCR3 抗体(美国 Abcam 公司),兔二抗(美国 Santacruz 公司),PVDF 膜(美国 Sigma 公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 ELISA 检测血清 IP-10 水平 抽取孕妇清晨空腹静脉血 2ml,分离出 1.5ml 血清,置于离心管,-70°C 冰箱储存待检。采用双抗体夹心 ELISA 法检测 IP-10 水平。

1.3.2 Western blot 检测胎盘组织中 IP-10、CXCR3 的蛋白表达 提取胎盘组织总蛋白,采用 Bradford 法测定蛋白浓度,并调整各标本至相同蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 PVDF 膜,4°C 封闭过夜。用平皿以 1:200 的比例在封闭液中稀释一抗,4°C 封闭孵育过夜。孵育一抗完毕,次日 TBST 缓冲液洗膜 3 次。在自封袋中按照 1:4 000 的比例用封闭液稀释二抗,将漂洗好的膜置于稀释好的二抗中,37°C,于摇床上水平摇动,孵育 50min,ECL 显示胶片感光显影。使用 Image J 软件扫描胶片上的图像并得到灰度值,采用积分光密度法统计 Western blot 结果,以 Actin 光密度值作为内参,两者的积分光密度比值即为蛋白相对表达量。

1.3.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测外周血 CXCR3 以及胎盘组织中 IP-10、CXCR3 的 mRNA 相对表达量 (1)提取总 RNA:抽取静脉血 4ml,均为 EDTA 抗凝;采

用淋巴细胞分离液分离出有核细胞;使用 Trizol 试剂盒,按照操作说明书提取总 RNA。并用相同方法提取胎盘组织中总 RNA。(2)逆转录合成 cDNA。(3)引物设计与合成:按照 Genbank 中人的 CXCR3、(内参照)基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物,引物由杭州赫贝科技有限公司合成。IP-10,5'-GTGGCATTCAAGGAG-TACCTC-3'(正义)和 5'-TGATGGCCTTCGATTCTG-GATT-3'(反义);CXCR3,5'-CCACCTAGCTGTAGCA-GACAC-3'(正义)和 5'-AGGGCTCCTGCCTAGAA GTT-3'(反义); $\beta$ -actin 5'-TGACCCAGATCATGTTTGA-GA-3'(正义)和 5'-TACGGCCAGAGGCGTACAGC-3'(反义)。(4)PCR 扩增:采用全自动荧光定量 RT-PCR 仪进行反应。20 $\mu$ l 反应体系中实时荧光定量 RT-PCR 反应预混液(2 $\times$ )10.0 $\mu$ l,上下游引物各 0.4 $\mu$ l,cDNA 2.0 $\mu$ l(终浓度为 0.2 $\mu$ mol/L)。(5)扩增条件:95.0°C 预变性 3min,95.0°C 变性 10s,61.0°C 退火/延伸 20s,共 40 个循环。溶解曲线条件:从 70°C 到 95°C,每 10s 上升 0.5°C。扩增产物进行溶解曲线分析和测序以确定产物的特异性,产物测序由杭州赫贝科技有限公司完成。(6)使用 BIO-RAD CFX Manager 软件进行自动分析并计算结果。循环阈值(Ct)与 mRNA PCR 初始表达量呈负相关。 $\Delta$ Ct 代表目的基因相对于内参照基因的表达量。 $\Delta$ Ct = Ct<sub>脂氧化酶</sub> - Ct<sub>CAPDH</sub>。先将不同组别的  $\Delta$ Ct 值样本均数用 SPSS13.0 软件进行分析,发现差异均有统计学意义,则用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式进行相对定量。

1.4 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件,计量资料满足正态分布,用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间比较采用方差分析,相关性分析采用 Pearson 相关分析。

## 2 结果

2.1 血清 IP-10 水平 与正常妊娠组(94.8±14.5)pg/ml 比较,轻、重度子痫前期[(118.8±29.0)、(169.3±28.8)pg/ml]孕妇血清 IP-10 水平明显增高(均  $P < 0.05$ );重度子痫前期孕妇血清 IP-10 水平明显高于轻度子痫前期组( $P < 0.05$ )。

2.2 外周血 CXCR3 mRNA 表达水平比较 与正常正常妊娠组 10.07±5.66 比较,轻、重度子痫前期(26.93±6.48、50.15±6.06)孕妇外周血 CXCR3 mRNA 表达水平明显增高(均  $P < 0.05$ );重度子痫前期孕妇外周血 CXCR3 mRNA 表达水平亦明显高于轻度子痫前期组( $P < 0.05$ )。

2.3 胎盘组织中 IP-10、CXCR3 的蛋白表达水平比较

Western blot 结果显示,3 组孕妇胎盘组织中均有 IP-10、CXCR3 蛋白表达,见图 1。轻、重度子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10、CXCR3 蛋白表达水平均高于正常妊娠组(均  $P<0.05$ );此外,重度子痫前期组孕妇胎盘中 CXCR3 表达水平明显高于轻度子痫前期组( $P<0.05$ ),见表 1。

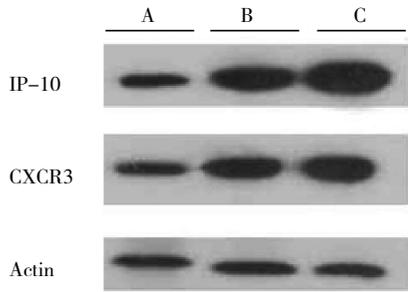


图 1 Western blot 检测胎盘组织中 IP-10、CXCR3 蛋白表达电泳图(A:正常妊娠组;B:轻度子痫前期组;C:重度子痫前期组)

表 1 3 组孕妇胎盘组织中 IP-10、CXCR3 的蛋白表达水平比较

组别	n	IP-10	CXCR3
轻度子痫前期组	20	2.34 ± 0.22*	2.12 ± 0.20*
重度子痫前期组	20	2.52 ± 0.13*	2.87 ± 0.20**
正常妊娠组	20	0.94 ± 0.01	1.02 ± 0.10

注:与正常妊娠组比较,\* $P<0.05$ ;与轻度子痫前期组比较,\*\* $P<0.05$

2.4 胎盘组织中 IP-10、CXCR3 mRNA 表达水平比较 轻、重度子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10、CXCR3 mRNA 表达水平均高于正常妊娠组(均  $P<0.05$ );此外,重度子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10、CXCR3 mRNA 表达水平均高于轻度子痫前期组(均  $P<0.05$ ),见表 2。

表 2 3 组孕妇胎盘组织中 IP-10、CXCR3 mRNA 表达水平比较

组别	n	IP-10	CXCR3
轻度子痫前期组	20	26.71 ± 5.04*	11.11 ± 4.93*
重度子痫前期组	20	41.84 ± 6.39**	22.82 ± 6.11**
正常妊娠组	20	20.85 ± 5.07	4.40 ± 2.46

注:与正常妊娠组比较,\* $P<0.05$ ;与轻度子痫前期组比较,\*\* $P<0.05$

2.5 子痫前期孕妇血清 IP-10 与 CXCR3 的相关性分析 子痫前期孕妇血清 IP-10 水平与外周血 CXCR3 mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.914, P<0.05$ ),见图 2;子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10 mRNA 表达水平与 CXCR3 mRNA 表达水平呈正相关( $r=0.907, P<0.05$ ),见图 3。

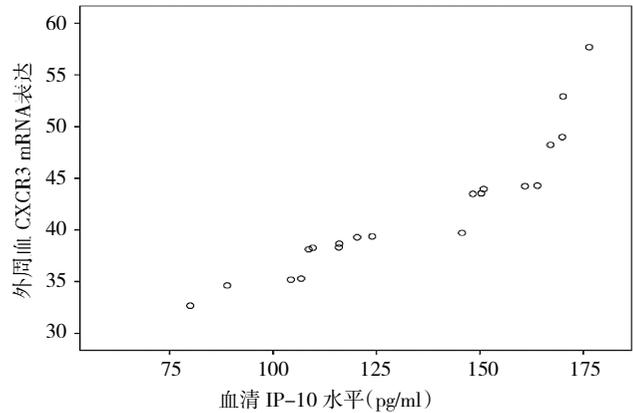


图 2 40 例子痫前期孕妇血清 IP-10 水平与外周血 CXCR3 mRNA 表达水平的散点图

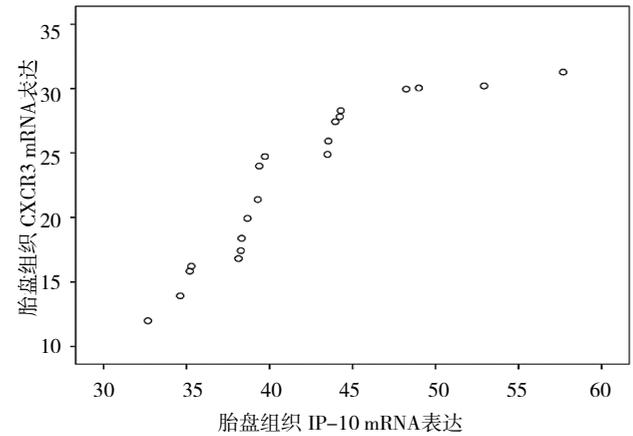


图 3 40 例子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10 mRNA 水平与 CXCR3 mRNA 表达水平的散点图

### 3 讨论

本研究发现子痫前期孕妇血清 IP-10 水平明显升高,且随着病情加重而增高,提示血清 IP-10 水平可在一定程度上反映子痫前期孕妇的炎性损害程度。进一步检测外周血单核细胞中 CXCR3 mRNA 表达水平,发现子痫前期孕妇血清 IP-10 水平与外周血 CXCR3 mRNA 表达水平呈正相关。此外,本研究还发现子痫前期孕妇胎盘组织中能检测到 IP-10、CXCR3 的蛋白和 mRNA 表达,且明显高于正常妊娠组;随着病情加重,IP-10、CXCR3 的蛋白和 mRNA 水平均明显上升。Pearson 相关分析显示,子痫前期孕妇胎盘组织中 IP-10 mRNA 表达水平与 CXCR3 mRNA 表达水平呈正相关。笔者推测 IP-10、CXCR3 参与子痫前期疾病的发生、发展。

IP-10 属于 CXC 家族趋化因子,来源于活化的成纤维细胞、单核巨噬细胞、内皮细胞和各种淋巴细胞等 30 余种细胞。人体 IP-10 mRNA 表达需要 IFN- $\gamma$  的刺激,

且对 IFN- $\gamma$  有剂量和时间的依赖性。因此,IP-10 与 IFN- $\gamma$  在某种程度上具有相互促进作用<sup>[5]</sup>。相关研究发现 IP-10 具有重要的生物学功能,能介导 Th<sub>1</sub> 型炎症反应,还能抑制血管新生<sup>[2]</sup>。目前临床研究发现,在 Th<sub>1</sub> 型炎症反应为主的肺结核、系统性红斑狼疮、皮炎、类风湿性关节炎、病毒性肝炎和动脉粥样硬化等疾病中,Th<sub>1</sub> 细胞高度表达 CXCR3,并能被其配体 IP-10 激活,产生相应的免疫应答反应。同时 IP-10 作为一种抗血管生成的潜在性因子,能增强滋养层细胞黏附、迁移和浸润,能抑制造血干细胞功能,抑制血管新生,参与血管重铸等。体内外研究表明 IP-10 能有效抑制血管新生<sup>[6]</sup>。朱雪娟等<sup>[7]</sup>、Gotsch 等<sup>[3]</sup>研究发现子痫前期孕鼠子宫及胎盘组织中 IP-10 水平明显高于正常妊娠孕鼠,与本研究结果一致。

CXCR3 是 IP-10 的受体,两者在子宫均有表达,两者的相互作用发挥着独特的生物学功能。Hanna 等<sup>[8]</sup>、Hirota 等<sup>[9]</sup>应用免疫组化和流式细胞仪分析,发现人绒毛滋养细胞及绒毛外滋养细胞表达 CXCR3,且证实人体子宫内膜上皮及基质细胞中蜕膜自然杀伤细胞表达 IP-10,通过结合 CXCR3 诱导滋养细胞迁移。Dominguez 等<sup>[10]</sup>发现人体子宫内膜细胞上有 IP-10 和 CXCR3 mRNA 表达。Romagnani 等<sup>[11]</sup>研究发现 CXCR3 在内皮细胞的表达具有细胞周期依赖性。在细胞活化和增生情况下,特别在内皮细胞周期的 S/G2-M 期,CXCR3 表达较为明显。以上提示 CXCR3 能够调节 IP-10 抑制血管生成的活性,并控制内皮细胞增生。本研究随着病情加重,胎盘组织中 IP-10、CXCR3 的蛋白和 mRNA 表达水平均明显升高,可推测 IP-10、CXCR3 参与子痫前期病程。

Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 型细胞因子失衡是关于子痫前期发病机制的一个重要学说<sup>[12]</sup>。子痫前期孕妇 Th<sub>1</sub> 型细胞比例和 Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 明显升高,且 Th<sub>2</sub> 型细胞比例明显低于晚期正常妊娠妇女<sup>[1]</sup>。Th<sub>1</sub> 型细胞高度表达 CXCR3,并能被其配体 IP-10 激活,产生相应的免疫应答反应,因此 IP-10-CXCR3 或者通过参与调节 Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> 细胞比例来参与子痫前期病程。子痫前期的病理生理过程,实际上是促血管生成因子和抗血管生成因子的不平衡所致<sup>[13]</sup>。IP-10 具有抑制血管新生的作用,将 IP-10 与人脐带静脉上皮细胞共同培养时,IP-10 能抑制上皮细胞分化成管样结构,并降低血管网状结构的覆盖范围<sup>[2]</sup>。因此,IP-10、CX-

CR3 或通过抑制血管新生来参与子痫前期发生、发展的过程。

综上所述,IP-10 及其受体 CXCR3 表达上调参与子痫前期病程,子痫前期孕妇血清、胎盘组织中 IP-10 与 CXCR3 均呈正相关,可能与子痫前期的发病有关;这为进一步认识子痫前期发病机制提供了依据,也为子痫前期临床检测与治疗开拓了新思路。

#### 4 参考文献

- [1] Jonsson Y, Ruber M, Matthiesen L, et al. Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normol pregnancies[J]. J Reprod Immunol, 2006, 70(1-2): 83-91.
- [2] Sun Y, Finger C, varez-Vallina L, et al. Chronic gene delivery of interferon-inducible protein 10 through replication-competent retrovirus vectors suppresses tumor growth[J]. Cancer Gene Ther, 2005, 12(11):900-912.
- [3] Gotsch F, Romero R, Friel L, et al. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2007, 20(11):777-792.
- [4] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:92-97.
- [5] Luster A D, Unkeless J C, Ravetch J V. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins[J]. Nature, 1985, 315(6021): 672-676.
- [6] Strieter R M, Burdick M D, Gomperts B N, et al. CXCR3 chemokines in angiogenesis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(6):593-609.
- [7] 朱雪娟, 宋建华, 张雪光. 干扰素诱导蛋白 10 在子痫前期大鼠模型的表达[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(4):275-278.
- [8] Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface[J]. Nat Med, 2006, 12(9):1065-1074.
- [9] Hirota Y, Osuga Y, Koga K, et al. The expression and possible roles of chemokine CXCL11 and its receptor CXCR3 in the human endometrium[J]. Immunology, 2006, 177(2):8813-882.
- [10] Dominguez F, Martinez S, Quinonero A, et al. CXCL 10 and IL-6 induce chemotaxis in human trophoblast cell lines[J]. Mol Hum Reprod, 2008, 14(7):423-430.
- [11] Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, et al. Cell cycle-dependent expression of CXCR3 chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity[J]. Clin Invest, 2001, 107(1):53-63.
- [12] Sykes L, Macintyre D A, Yap X J, et al. The Th1:th2 dichotomy of pregnancy and preterm labour[J]. Mediators Inflamm, 2012(2): 967629.
- [13] 罗欣, 黎洪波. 子痫前期发病机制分子生物学研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(4):309-311.

(收稿日期:2016-01-14)

(本文编辑:陈丹)