文章编号:1001-6880(2014)6-0967-04

安子合剂对构建抗心磷脂抗体阳性流产模型小鼠 mmp2、mmp9 表达的影响

丁　超[1*],陆启滨[2]

[1]南京中医药大学;[2] 南京中医药大学附属江苏省中医院,南京 210029

摘　要:从细胞增殖的角度研究安子合剂对 ACA 阳性流产小鼠母胎界面 mmp2、mmp9 蛋白的表达及意义。方法:采用 Westen Blot 方法分别检测 mmp2、mmp9 在 ACA 阳性流产模型组、空白对照组、安子合剂低/中/高剂量组和阿司匹林组母胎界面胎盘与蜕膜中蛋白水平的表达。通过 Image pool3.0 软件分析显示①ACA 阳性先兆流产模型小鼠胎盘中 mmp2 灰度积比值(0.152)较空白对照组(0.611)降低,安子合剂低剂量组 mmp2 灰度积比值(0.451)接近空白对照组;胎盘中安子合剂低剂量组 mmp9 灰度积比值(0.497)接近空白对照组(0.644);②蜕膜中安子合剂低剂量组 mmp2 灰度积比值(0.692)接近空白对照组(0.232);蜕膜中安子合剂低剂量组 mmp9 灰度积比值(1.085)接近空白对照组(1.627)。安子合剂能够调节滋养层细胞的增殖与 mmp2、mmp9 蛋白表达之间的平衡。

关键词:安子合剂;抗心磷脂抗体;流产;mmp2;mmp9

中图分类号:R284.2　　**文献标识码**:A

Anziheji Effect on mmp2 and mmp9 of ACA Positive Abortion in Mice

DING Chao[1*],LU Qi-bin[2]

[1]*Nanjing university of Chinese medicine*;[2]*Chinese medicine hospital of jiangsu province*,*Nanjing 210029*,*China*

Abstract:From the perspective of cell proliferation,researching Anziheji on the expression and meaning of mmp2 and mmp9,which are on maternal-fetal interface of the ACA positive threatened abortion in mice. Using Westen blot method to detect the protein levels expression of mmp2 and mmp9 in the placenta and decidua of model group and normal group, Anziheji low/medium/high dose group and aspirin group. The results of the research showed①the Gray scale deposition ratio of mmp2 in the placenta of ACA positive threatened abortion model mice(0.152)is lower than the normal group (0.611),the Gray scale deposition ratio of mmp2 in the placenta of the low dose(0.451)is close to the normal group; the Gray scale deposition ratio of mmp9 in the placenta of the low dose(0.497)is close to the normal group(0.644);② the Gray scale deposition ratio of mmp2 in the decidua of the low dose(0.692)is close to the normal group(0.232);the Gray scale deposition ratio of mmp9 in the decidua of the low dose (1.085)is close to the normal group(1.627). Anziheji can regulate the balance of the proliferation in the trophoblast cell and the expression of mmp2,mmp9.

Key words:Anziheji;ACA;abortion;mmp2;mmp9

安子合剂是陆启滨教授根据病机“脾肾两虚,血热夹瘀”所创的治疗抗心磷脂抗体(Anticardiolipin antibodies,ACA)阳性流产的中药复方,在临床研究中已十余年,取得了显著的疗效。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,mmps)是一类活性依赖于锌离子和钙离子的蛋白水解酶,主要生理功能是降解细胞外基质(ECM)成分[1],调控细胞外基质的含量和胎膜结构 MAPK 信号途径的下游蛋白,是导致滋养细胞侵袭的关键酶。mmp2 启动子区存在基因多态性,能够改变其基因转录活性,影响蛋白的表达,与多种疾病相关[2-4]。近几年来研究显示,mmps 在生殖过程中参与了多种生物学功能,如月经的产生,胚泡的植入以及胎盘的形成等等。课题组在前期实验研究中证实了安子合剂中药血清及安子合剂生药能明显提高滋养细胞的增殖活力,本文拟从细胞增殖的角度考虑安子合剂能否调控基质金属蛋白酶-2(mmp2)和基质金属蛋白酶-9(mmp9)蛋白水平及其表达的意义。

收稿日期:2014-04-22　　接受日期:2014-05-22

*通讯作者 E-mail:dc19860923@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/C 雌性小鼠 12 只,购自扬州大学比较医学中心。随机分为 ACA 阳性流产模型组、安子合剂高、中、低剂量组、阿司匹林组、空白对照组。

1.2 实验用药

安子合剂:250 mL/瓶,主要成分为:川断、桑寄生、菟丝子、杜仲、太子参、白术、苎麻根、黄芩、丹参等。由江苏省中医院提供,分别浓缩成安子合剂高、中、低剂量,相当于生药含量的 7.54、3.77、1.885 g/mL。②阿司匹林:石药集团欧意药业有限公司,国药准字 H13023635。取阿司匹林肠溶片,溶于蒸馏水中,配成 0.975 mg/mL(75 mg 溶于 76.9 mL 蒸馏水)的溶液。

1.3 主要试剂

全蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白含量检测试剂盒,由南京凯基提供;5 × SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、WB 一抗稀释液、WB 二抗稀释液、Westen Blot 抗体清除缓冲液等,由南京鹭飞提供;内参一抗(β-Actin)由 Immunoway 提供;二抗(羊抗小鼠 IgG-HRP)、二抗(羊抗兔 IgG-HRP),由 Jackson 提供。

1.4 实验方法

在妊娠第 15 d 时处死各组孕鼠,取子宫、胎盘。Westen-Blot 方法检测各组孕鼠 mmp2、mmp9 蛋白表达,Image pool3.0 软件分析各组孕鼠 mmp2、mmp9 灰度积比值(详见图 1、表 1、表 2)。

1.5 实验步骤

蛋白样本提取制备:各个组别蛋白的提取。

蛋白定量(BCA 方法):测定各组蛋白浓度

Westen Blot 检测蛋白含量:SDS-PAG 的制备;样本准备和上样电泳;湿电转移;PVDF 膜封闭;抗体与靶蛋白结合;显影和图像分析。

2 实验结果:

2.1 安子合剂对各组孕鼠胎盘中 mmp2、mmp9 蛋白的调节作用

结果如图 1、表 1 所示,模型组小鼠胎盘中 mmp2 蛋白表达较对照组明显降低;与模型组相比,安子合剂低剂量组、中剂量组、阿司匹林组均能显著升高 mmp2 的蛋白表达,其中安子合剂低剂量组疗效优于中剂量组和阿司匹林组;模型组小鼠胎盘中 mmp9 蛋白较对照组明显降低,安子合剂低剂量组 mmp9 的蛋白表达接近空白对照组。抗心磷脂抗体阳性流产小鼠在早期妊娠胎盘形成过程中 mmp2、mmp9 表达降低,提示滋养层细胞的减少,细胞增殖活性降低,通过不同剂量的安子合剂能够提高 mmp2、mmp9 的表达。

2.2 安子合剂对各组孕鼠蜕膜中 mmp2、mmp9 蛋白的调节作用

结果如图 1、表 2 所示,模型组小鼠蜕膜中 mmp2 蛋白表达较对照组明显升高,安子合剂低剂量组 mmp2 蛋白表达接近对照组;模型组小鼠蜕膜中 mmp9 蛋白表达较对照组明显升高,安子合剂低剂量组 mmp9 蛋白表达接近对照组。结果证明抗心磷脂抗体阳性流产小鼠中滋养层细胞对母体蜕膜的侵润升高,安子合剂能有效降低小鼠蜕膜中 mmp2、mmp9 蛋白的表达。

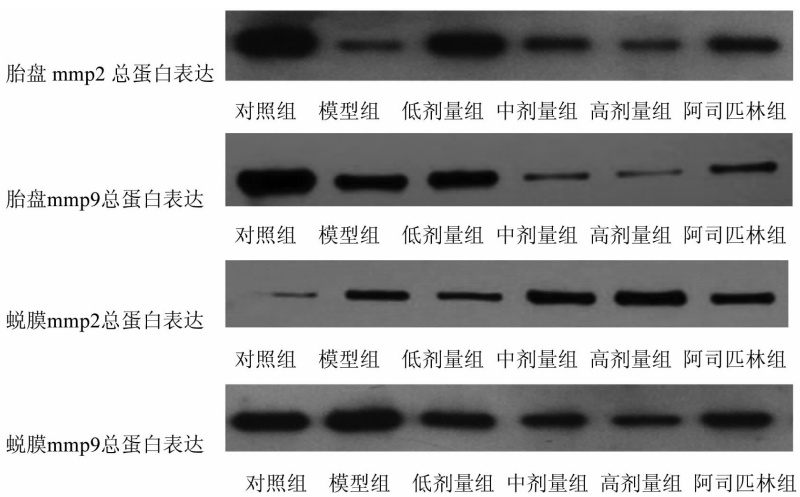

图 1 各组孕鼠胎盘、蜕膜中 mmp2、mmp9 蛋白表达

Fig. 1 the expression protein of mmp2 and mmp9 in the placenta and decidua

表 1　各组孕鼠胎盘中 mmp2、mmp9 灰度积比值比较

Table 1　the Gray scale deposition ratio of mmp2 and mmp9 in the placenta

组别 Group	样本数 (n)	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	mmp2	mmp9
模型组	2	–	0.152	0.636
空白对照组	2	–	0.611	0.644
安子合剂组	2	37.7	0.451	0.497
	2	75.4	0.287	0.437
	2	150.8	0.131	0.224
阿司匹林组	2	–	0.337	0.509

表 2　各组孕鼠蜕膜中 mmp2、mmp9 灰度积比值比较

Table 2　The Gray scale deposition ratio of mmp2 and mmp9 in the decidua

组别 Group	样本数 (n)	剂量 ($g \cdot kg^{-1}$)	mmp2	mmp9
模型组	2	–	0.487	2.266
空白对照组	2	–	0.232	1.627
安子合剂组	2	37.7	0.692	1.085
	2	75.4	1.268	0.788
	2	150.8	2.029	0.542
阿司匹林组	2	–	0.960	0.643

3　讨论

通过观察不同剂量安子合剂对 ACA 阳性流产小鼠 mmp2、mmp9 蛋白表达的影响,说明安子合剂可修正 ACA 阳性流产小鼠的 mmp2、mmp9 蛋白的表达,使之趋向正常,因此推测调节 mmp2 和 mmp9 蛋白的表达可能是安子合剂治疗 ACA 阳性流产的重要分子机制之一。同时实验证明安子合剂低剂量组具有临床等效性,适当的药物剂量,才能发挥最佳的免疫调节功能,浓度过高则会影响代谢吸收障碍。

mmp9 的表达与基因转录和蛋白分泌水平密切相关,是一个复杂的体系,受细胞因子、炎症、金属蛋白酶类组织抑制剂等多种因素的调节[5],尤其与炎症反应密切相关[6],并通过炎症促进血栓的形成。有研究从 mRNA 及蛋白水平分别检测了人血管内皮细胞上 mmp9 及 NF-kB 的表达,证实 APS 患者血清能明显提高人血管内皮细胞 mmp9 及 NF-kB 的表达,表明 APS 患者血栓形成可能是由 APL 通过 NF-kB 信号途径上调 mmp9 表达所致。本实验研究中发现 ACA 阳性先兆流产模型小鼠 mmp9 蛋白在胎盘中表达的降低和在蜕膜中表达的升高,提示安子合剂可能通过调控血管内皮细胞 mmp9 的表达干预 ACA 诱导的血栓形成。

mmp2 及其特异性组织抑制剂在自发性胎膜早破患者的胎膜组织中表达失衡,从而导致胎膜细胞间基质降解,胎膜细胞间连接强度逐渐减弱,最终发生胎膜破裂[7],因此胎膜张力的维持与胎膜中细胞外基质各种成分合成和降解之间的平衡密切相关。mmp2 的活性受膜型基质金属蛋白酶-1 及其组织抑制剂-2 影响[8]。本研究中发现,ACA 阳性流产模型小鼠胎盘中 mmp2 蛋白表达降低、蜕膜中 mmp2 蛋白表达明显增高,表明 mmp2 表达的失衡是 ACA 阳性流产发病过程中重要因素。

Marbaix 等[9,10]临床研究发现,宫内膜中的 mmp2、mmp9 在体内的变化未发现明显的规律性,然而在体外实验中证实生理浓度的雌、孕激素也可显著降低二者的活性,尤其是 mmp9 的酶活性。胚泡着床、胎盘形成、囊胚和基体之间的协同作用取决于滋养细胞的浸润,而浸润的关键在于基质成分的水解及基底膜如子宫内膜上皮以及蜕膜等穿过滋养细胞。基底膜的主要成分包括 IV 型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白、硫酸类肝素蛋白多糖等,它们都是 mmps 的作用底物,说明基质蛋白酶类在胚泡着床和胎盘形成中起着重要作用。研究发现滋养层细胞对母体蜕膜的浸润能力随着妊娠的持续逐渐降低。Polette 等发现在妊娠早期 mmp9 的分泌最多,而其激活剂 uPA 也主要产生于早期的滋养层细胞[11]。

综上所述,实验中发现 mmp2、mmp9 在 ACA 阳性流产小鼠的胎盘和蜕膜中表达的失衡与滋养细胞的增殖活性密切相关,并且安子合剂能够有效调控这两者之间的平衡,为我们进一步从细胞增殖的角度研究安子合剂对 ACA 阳性流产的疗效机制提供了理论基础。

参考文献

1　Yan ZW(闫兆威),Liu JP(刘金平),Liu D(刘丹),*et al*. Chemical constituents from the bile of anseranser and their ant-iMMP activity. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2008,20:960-963.

(下转第 847 页)