

## NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在亚临床甲减孕鼠胎盘中的表达及意义

张 吟<sup>1</sup>, 许小凤<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京中医药大学附属常州市中医医院妇科, 江苏 常州 213003; <sup>2</sup>南京中医药大学附属苏州市中医医院生殖医学科, 江苏 苏州 215000)

**[摘要]** 目的:通过研究核转录因子- $\kappa$ B (Nuclear Kappa B, NF- $\kappa$ B)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的变化,分析亚临床甲减孕鼠早期先兆流产的发生机制。**方法:**采用免疫组织化学法、Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中(E10)和正常组中的表达情况,分析二者与亚临床甲减孕鼠早期先兆流产的相关性。**结果:**NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的阳性表达率分别为 16.7%和 50.0%,而在正常组胎盘组织中的阳性率分别为 83.3%和 100.0%,差异均有统计学意义;Western blot 检测结果与免疫组织化学检测结果基本一致。**结论:**NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中低表达,导致滋养细胞侵袭力下降,对判断妊娠期亚临床甲减早期先兆流产发生机制具有重要指导意义。

**[关键词]** 亚临床甲减;胎盘;核转录因子- $\kappa$ B 基质金属蛋白酶-9;免疫组织化学法;Western blot

**[中图分类号]** R329.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)05-0580-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170512

## Expression and significance of NF- $\kappa$ B and MMP-9 in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism

Zhang Yin<sup>1</sup>, Xu Xiaofeng<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Changzhou Traditional Chinese Medicine Hospital affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Changzhou 213003; <sup>2</sup>Suzhou Traditional Chinese Medicine Hospital affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Suzhou 21500, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the expressions of Nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism and study the occurrence mechanism of threatened abortion. **Methods:** The expressions of NF- $\kappa$ B and MMP-9 in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism and normal pregnant rats were detected by immunohistochemistry and Western blotting assay. Correlations between the expressions and the occurrence mechanism of threatened abortion of subclinical hypothyroidism were analyzed. **Results:** The positive rates of NF- $\kappa$ B and MMP-9 in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism were 16.7% and 50%, respectively, while in normal placental tissues were 83.3% and 100%, respectively. The differences were significant (all  $P < 0.05$ ). The results of Western blotting assay were consistent with those of immunohistochemistry. **Conclusion:** The expression levels of NF- $\kappa$ B and MMP-9 in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism have a high correlation with the invasion, and joint detection of the above indicators, and it is instructional for judgement the occurrence mechanism of threatened abortion of subclinical hypothyroidism.

**[Key words]** subclinical hypothyroidism; placenta; Nuclear Kappa B; matrix metalloproteinase-9; immunohistochemistry; Western blot

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):580-583]

**[基金项目]** 苏州市科技局科技发展计划(SYSD2012115, SYSD2013126); 苏州市卫生局科技项目(LCZX201512)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: xxf196308@sina.com

亚临床甲减在普通人群中的发病率逐年升高,在妇女中发病率可达到男性的 2 倍以上,妊娠期患病率为 2%~5%,且随年龄增加患病率呈上升趋势<sup>[1-2]</sup>。妊娠期亚临床甲减可影响妊娠的过程和结局,引起流产、早产、胎盘早剥等不良妊娠结局的发生增加<sup>[3-5]</sup>,还可以导致子代智力发育水平下降<sup>[6-7]</sup>,但具体机制尚不清楚。本实验研究通过对核因子(NF)- $\kappa$ B 和基质金属蛋白酶(MMP)-9 行免疫组织化学染色,同时应用 Western blot 检测 2 种蛋白的表达,探讨其在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的变化,为探索妊娠期亚临床甲减对母胎影响的发生机制提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

20 只雌性 Wistar 大鼠,体重 180~200 g;10 只雄性 Wistar 大鼠,体重 250~300 g[SPF 级,许可证号:SCXK(京)2012-0001,北京维通利华实验动物技术有限公司]。饲养于中国药科大学江宁校区动物实验中心,室温 22~24℃(术后 2 d 内 26℃),相对湿度 40%~70%,自然昼夜光线照明,室内通风良好。大鼠自由饮食与饮水,定期更换垫料并保持室内清洁。将 20 只雌性 Wistar 大鼠随机分为亚临床甲减组和正常对照组,每组 10 只。

免疫组织化学 SP 检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),兔抗人浓缩型 NF- $\kappa$ B p65 单克隆抗体(CST 公司,美国),兔抗人浓缩型 MMP-9 多克隆抗体(Affinity 公司,美国),DAB 显色剂(DAKO 公司,丹麦),BCA 蛋白定量试剂盒(南京百斯凯科技有限公司),RIPA 试剂(上海翊圣生物科技有限公司)

### 1.2 方法

#### 1.2.1 制作亚临床甲减孕鼠的模型

参照 Escobar-Morreale<sup>[8]</sup>的方法制作亚临床甲减大鼠模型。甲状腺切除术恢复 1 个月后,当雌鼠体重稳定在 200 g 左右时,开始皮下注射 L-T4[95  $\mu$ g(kg·d)],10 d 后测定甲状腺功能,当血清促甲状腺激素(TSH)高于正常、而总甲状腺素(TT4)水平在正常范围时,提示亚临床甲减大鼠建模成功。正常对照组行甲状腺切除假手术,仅手术切开颈部暴露甲状腺,不切除甲状腺。术后恢复 1 个月,皮下等量注射含有 1%牛血清白蛋白<sup>[9]</sup>的 PBS 溶液 10 d。亚临床甲减大鼠模型建立成功后与正常的雄鼠合笼交配,雌:雄=2:1。当雌鼠阴道涂片镜下发现精子确定为妊娠 0 d,记为 E0。在 E0~E10,继续予 L-T4[9.5  $\mu$ g(kg·d)]持续

皮下注射。

#### 1.2.2 免疫组化染色

石蜡切片常规脱蜡至水,根据一抗的要求,对组织进行相应的抗原修复;滴加过氧化物酶阻断试剂,室温下孵育 10 min;滴加封闭液封闭 10 min;滴加一抗 NF- $\kappa$ B p65(工作浓度:1:100),MMP-9(工作浓度:1:200),室温下孵育 60 min;加二抗 DAKO REALTME<sub>n</sub>Vision<sup>TM</sup>/HRP,Rabbit/Mouse,37℃ 孵育 40 min;滴加新鲜配制 DAB 显色试剂显色;自来水冲洗终止显色,苏木素复染,PBS 返蓝,切片经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 阳性表达的判定:细胞核、细胞质中染有棕黄色、褐色颗粒,计算阳性细胞百分比评分, $\leq 5\%$ 为 0 分, $>5\% \sim 20\%$ 为 1 分, $>20\% \sim 50\%$ 为 2 分, $>50\% \sim 75\%$ 为 3 分, $>75\%$ 为 4 分;无着色 0 分,浅黄色 1 分,黄色 2 分,深黄色 3 分。两者相乘,0 分为阴性(-),1~4 分为+,5~8 分为++,9~12 分为+++,+~+++均视为阳性。

#### 1.2.3 Western blot 检测蛋白表达

RIPA 裂解液提取总蛋白并定量,取 50  $\mu$ g 蛋白,置入 5 $\times$ 缓冲液(4:1),100℃水浴,5 min $\times$ 3 次;SDS-PAGE 电泳,后转至 PVDF 膜;取出膜,加 5%脱脂奶粉,弃封闭液滴加特异性的一抗(NF- $\kappa$ B p65 单克隆抗体 1:1 000 稀释;兔抗人浓缩型 MMP-9 多克隆抗体 1:2 000 稀释;GAPDH 1:150 稀释)4℃孵育过夜,加 TBST 洗涤液 10 min $\times$ 3 次,ECL 法检测条带,进行密度定量分析。

### 1.3 统计学方法

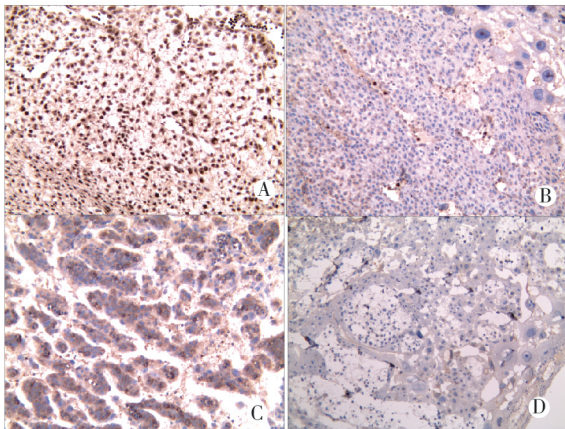
应用 SPSS17.0 统计软件分析,计量资料结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用 *t* 检验;计数资料以百分率表示,采用  $\chi^2$  检验、Fisher 精确概率法,相关性分析采用 Spearman 检验。 $P\leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 免疫组化检测 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在大鼠胎盘组织的表达及相关性

结果 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在所有大鼠胎盘组织中均有表达(图 1),其中将染色程度 $>++$ 定义为强阳性表达。NF- $\kappa$ B 的阳性表达定位于细胞核,呈棕黄色颗粒样物质,NF- $\kappa$ B 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的强阳性表达率为 16.7%(1/6),低于正常组织中的强阳性表达率 83.3%(5/6),存在统计学差异( $\chi^2=10.894,P=0.015$ ),病理性半定量分析结果显示

NF-κB 的分值为  $5.50 \pm 1.98$ , 低于对照组的  $6.83 \pm 2.48$  ( $P=0.023$ ); MMP-9 定位于细胞浆, 呈棕黄色颗粒样物质, 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的强阳性表达率 50.0% (3/6), 低于正常组织中的强阳性表达率 100% (6/6), 存在统计学差异 ( $\chi^2=5.178, P=0.023$ ), MMP-9 病理性半定量分析结果的分值为  $7.67 \pm 2.88$ , 低于对照组的  $9.23 \pm 1.37$  ( $P=0.002$ )。NF-κB 和 MMP-9 表达呈明显正相关 ( $r=0.79, P=0.003$ )。



A: 正常孕鼠胎盘组织中 NF-κB 的表达; B: 亚临床甲减孕鼠胎盘组织中 NF-κB 的表达; C: 正常孕鼠胎盘组织中 MMP-9 的表达; D: 亚临床甲减孕鼠胎盘组织中 MMP-9 的表达。

图 1 免疫组织化学法检测亚临床甲减孕鼠胎盘组织及正常组织中 NF-κB 和 MMP-9 的表达 (SP, ×200)

Figure 1 Expression of NF-κB and MMP-9 protein in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism and normal tissues detected by immunohistochemistry (SP, ×200)

### 2.2 Western blot 检测 NF-κB 和 MMP-9 在大鼠胎盘组织的表达

以 NF-κB/GAPDH 比值做蛋白定量检测, NF-κB 蛋白在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的表达水平 ( $0.23 \pm 0.02$ ) 亦较正常对照胎盘组织 ( $0.58 \pm 0.02$ ) 低, 有统计学差异 ( $P < 0.001$ ); MMP-9 蛋白在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的表达水平 ( $0.05 \pm 0.01$ ) 亦较正常对照胎盘组织 ( $0.28 \pm 0.05$ ) 低, 有统计学差异 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

### 3 讨论

NF-κB 作为一个核转录因子, 几乎存在于机体的每一种细胞类型中, 在细胞侵袭过程中发挥重要作用<sup>[10]</sup>。能够被包括 TNF-α 和 LPS 在内的 400 多个不同的刺激因素快速激活, 而甲状腺受体互动蛋白 6 (thyroid receptor-interacting protein 6, TRIP6) 的活

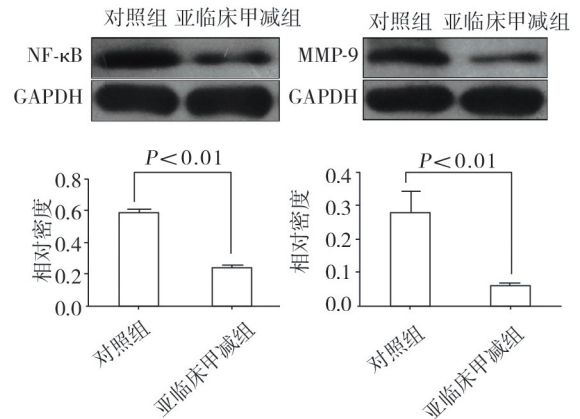


图 2 Western blot 检测亚临床甲减孕鼠及正常胎盘组织中 NF-κB、MMP-9 蛋白的表达

Figure 2 Expression of NF-κB and MMP-9 protein in placental tissues of pregnant rats with subclinical hypothyroidism and normal tissues detected by Western blot

性降低可以抑制 TNF、Nod1 和 IL-1 所活化的 NF-κB 信号通路<sup>[11]</sup>。当细胞未被激活时, NF-κB 以转录惰性的形式静止地存在于细胞浆内。NF-κB 被激活后进入细胞核, 可结合到目的基因的启动子区域调控基因的表达而发挥功能<sup>[12]</sup>。Vermeulen 等<sup>[13]</sup>证实 NF-κB 转录激活能够调控 MMPs 的表达。Huang 等<sup>[14]</sup>报道 NF-κB 被抑制, 会导致 MMP-9 的表达下调, 从而影响细胞的侵袭。

MMP-9 是 MMPs 家族分子量最大的基质金属蛋白酶, 主要由中性粒细胞和巨噬细胞分泌, 在降解和重组细胞外基质的过程中发挥着核心作用, 能通过降解绝大部分的子宫内膜细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 完成浸润过程, 使得高阻力低容量的血管最终转化为高容量低阻力的血管, 是决定滋养细胞侵袭力的重要因子<sup>[15]</sup>。若 MMP-9 的表达出现异常, 则会导致滋养细胞的侵袭力减弱而导致不良妊娠的发生。Plaks 等<sup>[16]</sup>学者对缺乏 MMP-9 表达的妊娠小鼠模型进行研究, 结果提示该类型小鼠的妊娠并发症, 如先兆子痫及宫内生长受限的发生率明显升高, 推测这与 MMP-9 的分泌减少, 导致滋养细胞早期浸润不足、胎盘血管形成异常和血供不足相关。文献报道均表明 MMP-9 与 NF-κB 密切相关, 协同调节滋养层细胞的侵袭能力, 进而影响妊娠结局。

妊娠是一种协调并且复杂的生理过程, 受精卵

着床起源于被外层滋养细胞围绕的胚泡接触和开始穿透子宫内膜上皮,胚泡种植到子宫内膜 2 周后,滋养细胞能够侵袭蜕膜化的子宫内膜<sup>[17]</sup>。滋养细胞的侵袭对于妊娠成功是必要的,这一紧密调节的过程发生障碍会导致妊娠并发症。甲状腺功能减退,导致子宫内膜增殖成熟障碍,进而影响滋养细胞的侵袭和胚胎的发育<sup>[18]</sup>。研究发现,NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 的表达与滋养细胞的侵袭力具有相关性,本研究结果显示,NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的阳性表达低于正常孕鼠胎盘组织,且两者在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中的表达水平呈明显正相关。此外 Western blot 检测结果显示,NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平和 MMP-9 蛋白表达水平呈相同趋势,与免疫组织化学检测结果基本一致。本实验结果表明 NF- $\kappa$ B 和 MMP-9 在亚临床甲减孕鼠胎盘组织中低表达,导致滋养细胞侵袭不足可以作为判断妊娠期亚临床甲减早期先兆流产发生的重要机制,为妊娠期亚临床甲减对母胎影响的发生机制提供了科学依据。但是,还需要基因蛋白组学、更大样本量的深入研究,以获得更为定量及稳定明确的实验结果。

#### [参考文献]

- [1] Lazarus JH, Bestwick JP, Channon S, et al. Antenatal thyroid screening and childhood cognitive function [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(6): 493-501
- [2] Potlukova E, Potluka O, Jiskra J, et al. Is age a risk factor for hypothyroidism in pregnancy An analysis of 5, 223 pregnant women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97(6): 1945-1952
- [3] Benhadi N, Wiersinga WM, Reitsma JB, et al. Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal or neonatal death [J]. *Eur J Endocrinol*, 2009, 160(6): 985-991
- [4] Wang S, Teng WP, Li JX, et al. Effects of maternal sub-clinical hypothyroidism on obstetrical outcomes during early pregnancy [J]. *J Endocrinol Invest*, 2012, 35(3): 322-325
- [5] Negro R, Schwartz A, Gismondi R, et al. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(9): e44-e48
- [6] Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(8): 549-555
- [7] Li Y, Shan Z, Teng W, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25-30 months [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(6): 825-829
- [8] Escobar-Morreale HF, del Rey FE, Obregón MJ, et al. Only the combined treatment with thyroxine and triiodothyronine ensures euthyroidism in all tissues of the thyroidectomized rat [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(6): 2490-2502
- [9] Antonio C Bianco, Grant Anderson, Douglas Forrest, et al. American thyroid association guide to investigating thyroid hormone economy and action in rodent and cell models [J]. *Thyroid*, 2014, 24(1): 106
- [10] Lappas M, Rice G E. The role and regulation of the nuclear factor kappa B signaling pathway in human labour [J]. *Placenta*, 2007, 28(5): 543-556
- [11] Weil R, Isral A, T-cell-receptor-and B-cell-receptor-mediated activation of NF- $\kappa$ B in lymphocytes [J]. *Current Opinion in Immunology*, 2004,16(3): 374-381
- [12] DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, et al. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B [J]. *Nature*, 1997, 388(6642): 548-554
- [13] Vermeulen L, De Wilde G, Notebaert S, et al. Regulation of the transcriptional activity of the nuclear factor- $\kappa$ B p65 subunit [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5): 963-970
- [14] Huang S, Pettaway CA, Uehara H, et al. Blockade of NF- $\kappa$ B activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis [J]. *Oncogene*, 2001, 20(31):4188-4197
- [15] Staun-Ram E, Goldman S, Gabarin D, et al. Expression and importance of matrix metalloproteinase 2 and 9 (MMP-2 and-9) in human trophoblast invasion [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 2(1): 59
- [16] Plaks V, Rinkenberger J, Dai J, et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency phenocopies features of preeclampsia and intrauterine growth restriction [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (27): 11109-11114
- [17] Kumru P, Erdogdu E, Arisoy R, et al. Effect of thyroid dysfunction and autoimmunity on pregnancy outcomes in low risk population. [J] *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 291(5): 1047-1054
- [18] Kosmaczewska A. Low-dose interleukin-2 therapy: A driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(10): 18574-18592

[收稿日期] 2017-02-17