

IFN- γ 对妊娠早期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴中 IGF-1 表达的影响

司丽芳^{1,2}, 范光丽¹, 赵瑾³, 朱灿鑫⁴, 雷林滨¹

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471002;

3 上海朝翔生物技术有限公司, 上海 201609; 4 河南夏邑畜牧局, 河南 夏邑 476443)

【摘要】 **【目的】** 确定干扰素 γ (IFN- γ) 对妊娠早期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴中 IGF-1 表达的影响。**【方法】** 将妊娠 9 d 的 SD 大鼠随机分为对照组、试验 1 组和试验 2 组, 采用生殖道肌肉注射的方法, 对照组大鼠生殖道肌肉注射生理盐水, 试验组大鼠注射 IFN- γ , 其中 1 组剂量为 2.5×10^4 U/只, 2 组剂量为 7.5×10^4 U/只。各试验组均在注射 48h 后灌注取材、免疫组化 SP 法染色, 光镜下观察。**【结果】** 注射 2.5×10^4 U/只和 7.5×10^4 U/只的 IFN- γ 均能下调妊娠大鼠下丘脑室周核、视上核、视前大细胞核、视前内侧核、视前外侧核、视前交叉上核、弓状核、腺垂体、卵巢黄体及子宫蜕膜基质细胞和子宫腺中 IGF-1 的表达。**【结论】** IFN- γ 对妊娠早期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴中 IGF-1 的表达具有下调作用, 高剂量 IFN- γ 的下调作用更显著。

【关键词】 胰岛素样生长因子-1; 干扰素- γ ; 免疫组化; 下丘脑-垂体-卵巢轴; 妊娠大鼠

【中图分类号】 S859.79⁺7

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0001-05

Effects of IFN- γ on the expression of IGF-1 in Hypothalamus-Pituitary ovary-Gonad axis of early pregnant rats

SI Li-fang^{1,2}, FAN Guang-li¹, ZHAO Jin³, ZHU Chan-xin⁴, LEI Lin-bin¹

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471002, China; 3 Shanghai Zhaoxiang Biotechnology co., Ltd. Shanghai 201609, China; 4 Henan Xiayi of Pasturage, Xiayi, Henan 476443, China)

Abstract: **【Objective】** The study investigated the effect of interferon- γ (IFN- γ) on the expression and distribution of insulin-like growth factor-1(IGF-1) immunoreactive production in Hypothalamus-Pituitary ovary-Gonad axis of earlier pregnant rats in the post-implantation period. **【Method】** In this study the ultrasensitive immunohistochemistry SP method was used 9 d pregnant rats were divided into control group, experimental group one and experimental group two. The control group was injected physiological brine and the two experiment groups were injected 2.5×10^4 U and 7.5×10^4 U of IFN- γ in vaginal muscular respectively. Experiment materials were collected after perfusion from each group which was injected 48 h ago, then stained by ultrasensitive immunohistochemistry SP method. And the results were observed and analyzed. **【Result】** The expressions of IGF-1 in pre-opticus medianus, nucleus supra-opticus, nucleus pre-opticus mango cellularis, nucleus pre-opticus medialis, nucleus pre-opticus lateralis, nucleus pre-opticus suprachiasmatic and arcuate nucleus of the hypothalamus, adenohypophysis, corpus luteum of ovary, stroma cells of uterus decidua and uterine gland were reduced after being injected 2.5×10^4 U and 7.5×10^4 U IFN-

* [收稿日期] 2008-11-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(39670550); 西北农林科技大学研究生科技创新基金项目(05ych020)

[作者简介] 司丽芳(1976—), 女, 河南商丘人, 在读博士, 主要从事神经生殖免疫研究。E-mail: silifang2004@yahoo.com.cn

[通信作者] 范光丽(1943—), 女, 山西太原人, 教授, 主要从事神经生物学和发育生物学研究。

γ.【Conclusion】 The results suggested that IFN-γ could reduce the expression of IGF-1 immunological reaction production in Hypothalamus-Pituitary gland-Gonad axis. High dose of IFN-γ showed a much more significant down regulation.

Key words: IGF-1; IFN-γ; immunohistochemistry; Hypothalamus-Pituitary gland-Gonad axis; pregnant rat

胚胎期是动物个体发育的重要阶段,多种生长因子和激素在胚胎生长发育及妊娠母体内各器官的功能活动中起着重要的调控作用,其中胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor 1, IGF-1)被证明是妊娠过程中胎儿与母体之间的重要调节因子^[1-4]。IGF-1 是下丘脑-垂体-性腺轴中影响动物生殖活动的重要因子。在胚胎植入后期,在母体与胎儿形成的局部环境中含有多细胞因子,各种因子相互协调共同维持母胎之间免疫微环境的稳定。干扰素 γ(IFN-γ)属于 Th1 型细胞因子,具有参与妊娠子宫内膜基质细胞的蜕膜化并维持妊娠的作用^[5]。有研究表明,超生理剂量的 IFN-γ 具有抗生育作用^[6]。目前,关于 IFN-γ 和 IGF-1 与妊娠关系的研究多集中于单个因子在子宫及胎盘中的表达上,而关于 IFN-γ 和 IGF-1 在妊娠中相互作用的研究至今尚未见报道。为此,本研究以妊娠 9 d 的大鼠为模型,研究了外源性 IFN-γ 对妊娠早期大鼠下丘脑-垂体-卵巢轴中 IGF-1 表达的影响,以便进一步阐明 IFN-γ 在妊娠中的作用、IGF-1 在下丘脑-垂体-卵巢轴中对妊娠的神经免疫调控及其二者在妊娠中的相互作用机制,为进一步研究细胞因子网络对妊娠的调控机制提供形态学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康、未产、体质量约 250 g 的性成熟 SD 大鼠 40 只(雌性 30 只,雄性 10 只),购自第四军医大学实验动物中心,清洁级饲养,自由采食和饮水。

1.1.2 试剂与仪器 试剂:重组大鼠 IFN-γ 制剂、兔抗大鼠 IGF-1 多克隆抗体,均购自武汉博士德生物工程有限公司;免疫组化超敏 SP 试剂盒,福州迈新生物技术开发公司产品;牛血清白蛋白购自华美生物工程有限公司。试验仪器:Leica 2245 石蜡切片机,德国 Leica 公司产品;Motic 生物显微镜,厦门 Motic 实业有限公司生产。

1.2 试验设计

将体质量 220~260 g 的性成熟 SD 雌性大鼠饲

养于清洁级动物房,自由饮水和采食,每日 12 h 光照,在发情期前 1 d 晚上与性成熟雄性大鼠 1:1 合笼交配。次日晨(8:00)检查有阴栓或用蘸有生理盐水的棉签镜检有精子者判为妊娠,当天计为妊娠第 1 天(D1),妊娠大鼠单独饲养。取妊娠 9 d 的大鼠随机分成 3 组,每组 10 只,对照组大鼠注射生理盐水,试验 1 组注射 IFN-γ 2.5×10^4 U/只,试验 2 组注射 IFN-γ 7.5×10^4 U/只,注射方法为阴道口肌肉注射^[7]。

1.3 大鼠下丘脑、垂体和卵巢切片的制备

各组大鼠均在注射 IFN-γ 48 h 后,用 10%水合氯醛麻醉,灌注,取下丘脑、垂体、子宫及卵巢。乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋后连续切片,片厚 5 μm,隔 3 取 3,共制得 3 套切片,1 套用于 IGF-1 免疫组化染色,1 套进行 HE 染色以作阳性细胞定位,1 套用于阴性对照。

1.4 大鼠下丘脑、垂体和卵巢的免疫组化反应与图像分析

一抗为兔抗大鼠 IGF-1 多克隆抗体(做 1:100 倍稀释),阴性对照以 PBS 缓冲液替代一抗,按免疫组化超敏 SP 试剂盒操作说明进行反应。脱水、透明,封片,光镜下观察照像。应用江苏捷达高清晰图像分析系统进行分析,计算阳性产物的灰度值和阳性面积^[8],再计算出相对表达量 μ^2 , $\mu^2 = \text{光镜倍数} \times \text{阳性产物灰度值} \times \text{阳性面积}$ 。

2 结果与分析

2.1 IFN-γ 对妊娠大鼠下丘脑中 IGF-1 表达的影响

免疫组化反应的切片背景无色或浅蓝色,免疫阳性产物为蓝色或蓝黑色,而对照组切片不显色为阴性。结果可见,对照组大鼠下丘脑室周核(图 1A)、视上核、视前大细胞核(图 2A)、视前内侧核、视前外侧核、视前交叉上核及弓状核大部分免疫阳性细胞均呈蓝色或蓝黑色强阳性着色,胞体内深蓝色颗粒融合成团,阳性细胞轮廓清楚;阳性物质位于胞质和胞核;各核团阳性细胞体呈不规则的圆形、卵圆形、梭形等,聚集或分散存在。试验 1 组大鼠下丘

脑与妊娠有关的 7 个核团中阳性细胞多呈蓝色的弱阳性着色,阳性细胞轮廓不清,在高倍镜下可见到有浅蓝色颗粒(图 1B 和图 2B),其阳性表达较对照组显著降低($P<0.05$)(表 1)。试验 2 组妊娠大鼠下丘脑各核团中阳性细胞数量较少,呈灰色,轮廓不清(图 1C 和图 2C),阳性产物表达极弱,阳性表达较试验 1 组显著降低($P<0.05$),较对照组极显著降低($P<0.01$)(表 1)。

表 1 IFN- γ 对植入后期妊娠大鼠下丘脑-垂体-性腺轴中 IGF-1 表达的影响

Table 1 Effect of IFN- γ on the expression of IGF-1 in the HPG axis of post-implantation period pregnant rats

表达部位 Expressiom position	IGF-1 阳性产物的相对表达量 Relative expression of IGF-1 immunological reaction production		
	对照组 Control group	试验 1 组 Experimental group one	试验 2 组 Experimental group two
下丘脑室周核 Nucleus pre-opticus periventricularis	48.461 $\pm$ 7.041	38.021 $\pm$ 4.034 A	27.416 $\pm$ 4.299 ab
下丘脑视上核 Nucleus supra-opticus	47.163 $\pm$ 2.363	37.731 $\pm$ 5.066 a	29.805 $\pm$ 5.369 aB
下丘脑视前大细胞核 Nucleus pre-opticus mango cellularis	32.071 $\pm$ 4.744	25.702 $\pm$ 3.694 a	20.034 $\pm$ 5.632 aB
下丘脑视前内侧核 Nucleus pre-opticus medialis	57.853 $\pm$ 6.447	46.017 $\pm$ 3.163 A	37.912 $\pm$ 4.877 ab
下丘脑视前外侧核 Nucleus pre-opticus lateralis	45.212 $\pm$ 2.654	38.045 $\pm$ 2.193 a	29.382 $\pm$ 3.085 ab
下丘脑视前交叉上核 Nucleus pre-opticus suprachiasmatic	46.903 $\pm$ 3.916	38.271 $\pm$ 4.971 A	30.514 $\pm$ 4.825 aB
下丘脑弓状核 Arcuate nucleus of the hypothalamus	50.762 $\pm$ 6.593	41.709 $\pm$ 3.251 A	27.384 $\pm$ 2.653 ab
腺垂体 Adenohypophysis	36.668 $\pm$ 5.213	29.625 $\pm$ 2.558 A	22.176 $\pm$ 3.285 ab
卵巢黄体 Corpus luteum of ovary	43.514 $\pm$ 2.876	52.085 $\pm$ 4.339 A	31.832 $\pm$ 4.121 ab
子宫蜕膜及腺体 Stroma cells of uterus decidua and uterine gland	38.744 $\pm$ 2.658	28.765 $\pm$ 3.511 a	20.646 $\pm$ 3.388 ab

注:数据后标“A”者表示与对照组相比差异显著($P<0.05$);标“B”者表示与试验 1 组相比差异显著($P<0.05$);标“a”者表示与对照组相比差异极显著($P<0.01$);标“b”者表示与试验 1 组相比差异极显著($P<0.01$)。

Note:The data with “A”means it has significant difference when compared with control group($P<0.05$). The data with “B”means it has significant difference when compared with experimental group one ($P<0.05$). The data with “a”means the difference is very significant when compared with control group ($P<0.01$). The data with “b”means the difference is very significant when compared with experimental group one ($P<0.01$).

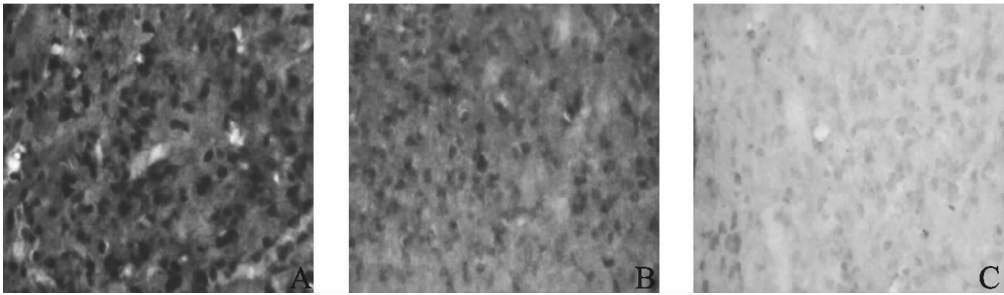


图 1 大鼠下丘脑室周核 IGF-1 免疫组化反应结果($\times 400$)
A. 对照组;B. 试验 1 组;C. 试验 2 组

Fig. 1 Immunohistochemical staining of IGF-1 in the nucleus pre-opticus periventricularis rats($\times 400$)

A. Control group;B. Experimental group 1;C. Experimental group 2

2.2 IFN- γ 对妊娠大鼠垂体中 IGF-1 表达的影响

由免疫组化染色结果可见,对照组大鼠腺垂体中 IGF-1 主要表达于腺垂体的小圆形细胞的细胞质中,在大圆形、椭圆形、三角形、多角形和不规则细胞的细胞质中也有一定分布,阳性细胞胞质中 IGF-1

免疫阳性产物呈蓝黑色,胞核呈空泡状居于胞体中央,阳性细胞轮廓清楚。试验 1 组大鼠腺垂体中 IGF-1 也主要表达于腺垂体的小圆形细胞、大圆形细胞、椭圆形细胞、三角形细胞、多角形细胞和不规则细胞的胞质中,但其阳性细胞胞质中 IGF-1 免疫

阳性产物多呈蓝色,且阳性颗粒稀疏,表达量显著低于对照组($P<0.05$)(表 1)。试验 2 组大鼠腺垂体

各细胞中 IGF-1 的阳性表达很弱,其表达量极显著低于对照组及试验 1 组($P<0.01$)(表 1)。

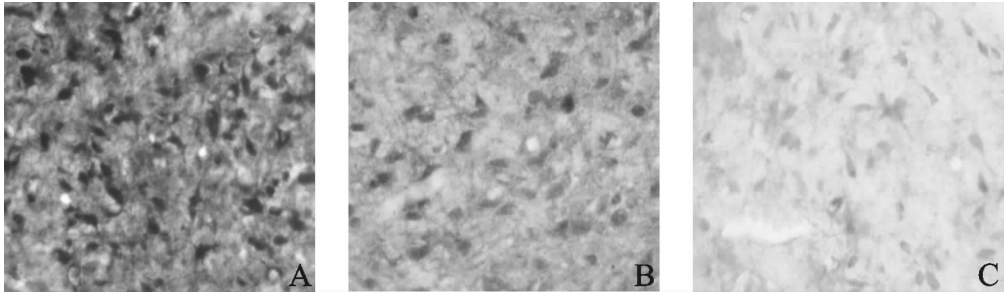


图 2 大鼠下丘脑视前大细胞核 IGF-1 免疫组化反应结果(×400)

A. 对照组;B. 试验 1 组;C. 试验 2 组

Fig. 2 Immunohistochemical staining of IGF-1 in the nucleus pre-opticus mango cellularis hypothalami rats(×400)

A. Control group;B. Experimental group 1;C. Experimental group 2

2.3 IFN- γ 对妊娠大鼠卵巢及子宫中 IGF-1 表达的影响

由免疫组化反应结果可见,对照组大鼠卵巢中 IGF-1 主要表达于黄体的粒性黄体细胞,阳性细胞的胞膜及胞质内蓝黑色的阳性颗粒融合成团,中央的胞核呈空泡状,阳性细胞轮廓清楚(图 3A)。试验 1 组大鼠卵巢黄体粒性黄体细胞中阳性颗粒均匀分布于胞膜及部分胞质(图 3B),阳性产物呈深蓝色,

其表达较对照组显著降低($P<0.05$)(表 1)。试验 2 组大鼠卵巢黄体粒性黄体细胞中 IGF-1 阳性产物呈灰色,阳性细胞体轮廓不清(图 3C),IGF-1 表达很弱,表达量极显著低于对照组和试验 1 组($P<0.01$)(表 1);各试验组大鼠子宫的阳性表达部位是子宫蜕膜和子宫腺,随着 IFN- γ 注射剂量的增大 IGF-1 表达逐渐减弱。

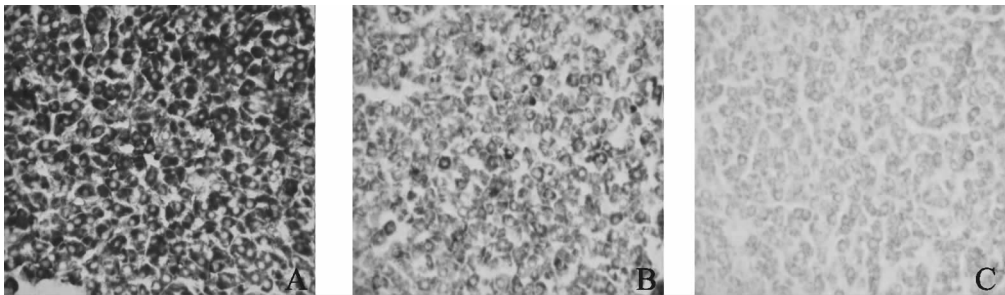


图 3 大鼠卵巢粒性黄体细胞 IGF-1 免疫组化反应结果(×400)

A. 对照组;B. 试验 1 组;C. 试验 2 组

Fig. 3 Immunohistochemical staining of IGF-1 in the granular lutein cell rats(×400)

A. Control group;B. Experimental group 1;C. Experimental group 2

3 讨 论

妊娠是一个复杂而精密的生理过程,在妊娠早期,母胎之间存在着复杂的细胞因子调节网络,以帮助胎儿逃逸母体的免疫排斥^[9]。近年来一系列研究表明^[10-13],IGF-1 不仅在局部对下丘脑-垂体-性腺轴发挥自分泌-旁分泌调控作用,并有可能作为下丘脑-垂体-性腺轴反馈调节中的传递信号之一,在机体的生殖过程中发挥重要作用。IGF-1 可通过垂体门脉系统作用于垂体前叶促性腺激素细胞,刺激其

释放卵泡刺激素和黄体生成素,卵泡刺激素和黄体生成素可协同或以不同方式作用于卵巢及子宫,调控雌性生殖。本研究发现,对照组 IGF-1 在妊娠早期大鼠下丘脑-垂体-性腺轴中有表达,表明 IGF-1 在神经内分泌系统与免疫系统之间,通过下丘脑-垂体-性腺轴的反馈调节调控着妊娠早期大鼠的妊娠过程,以防止流产及其他妊娠并发症的发生,从而使机体能够维持正常的妊娠功能。

IFN- γ 属于 Th1 型细胞因子,其是维持妊娠必不可少的细胞因子之一,妊娠大鼠子宫自然杀伤细

胞刺激蜕膜细胞分泌的 IFN- γ 参与了妊娠蜕膜血管的重建,对保持蜕膜的完整性是必不可缺少的^[14]。Chen 等^[15]检测到,在胚胎植入点有很多细胞均表达 IFN- γ 受体。晋柏等^[16]报道,IFN- γ 对妊娠早期弓浆虫感染的小鼠具有一定的保护作用,可以提高妊娠早期小鼠的免疫水平。因此,机体内一定剂量的 IFN- γ 对成功妊娠是不可缺少的。但 Liu 等^[17]报道,高剂量的 IFN- γ 能抑制孕酮分泌,诱导胎盘细胞凋亡,还可以引起主要组织相容性复合体 MHC II 类抗原的表达,MHC II 类抗原是妊娠过程中造成母胎免疫排斥的主要抗原之一,对维持妊娠极为不利。本研究运用免疫组化 SP 法研究了高剂量的 IFN- γ 对植入后期妊娠大鼠下丘脑-垂体-性腺轴中 IGF-1 表达的影响,结果表明,外源注射 2.5×10^4 和 7.5×10^4 U/只的 IFN- γ 均能够降低 IGF-1 在下丘脑-垂体-性腺轴的表达,推测高剂量的 IFN- γ 可能是通过降低下丘脑-垂体-性腺轴中 IGF-1 对妊娠的神经免疫调控作用影响妊娠。IGF-1 在胚胎植入后期对妊娠的调控作用受 IFN- γ 的影响,IFN- γ 降低胚胎植入后期妊娠大鼠下丘脑-垂体-性腺轴中 IGF-1 的表达,可能是 IFN- γ 不利于维持正常妊娠的原因之一。

[参考文献]

- [1] Milliola H J, Douglas G C. Binding of insulin-like growth factor-1 to human trophoblast cells during differentiation in vitro [J]. Placenta, 1994, 15: 641-645.
- [2] 卢丽萍, 卢杰平, 潘莉莉, 等. 腹腔液及异位内膜组织 MCP-I、IGF-I 水平变化与子宫内膜异位症发病及不孕的相关性分析 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2008, 16(2): 59-61.
Lu L P, Lu J P, Pan L L, et al. The correlation between the changes of levels of MCP-I and IGF- I in peritoneal fluid and pathogenesis of endometriosis and infertility [J]. Chinese Journal of Birth Health and Heredity, 2008, 16(2): 59-61. (in Chinese)
- [3] Murray M K. Changes in secretory status cell height and percentage ciliation of epithelial lining of sheep fimbriae during early pregnancy [J]. Reproduction, 1996, 106(2): 173-183.
- [4] Irwin J C, Suen L F, Martina N A, et al. Role of the IGF system in trophoblast invasion and preeclampsia [J]. Hum Reprod, 1999, 14(2): 90-96.
- [5] Bulla R, Fischetti F, Bossi F, et al. Feto-maternal immune interaction at the placental level [J]. Lupus, 2004, 13(9): 625-629.
- [6] 曹咏清, 孙德明, 陈幼珍, 等. 人重组 γ -干扰素抗生育效应及其机理研究 [J]. 生殖医学杂志, 1999, 8(2): 98-100.
Cao Y Q, Sun D M, Chen Y Z, et al. Studies on the antifertility effect and the mechanism of action of human recombinant interferon gamma in rabbits [J]. Journal of Reproduction Medicine, 1999, 8(2): 98-100. (in Chinese)
- [7] 刘美玲, 彭景樨, 孙泉红, 等. 妊娠大鼠子宫和胎盘中 TGF- β 1 的表达及 IFN- γ 对其表达的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2005, 32(5): 413-420.
Liu M L, Peng J P, Sun Q H, et al. The expression of TGF- β 1 in uterus and placenta of pregnant rat and its regulation by IFN- γ [J]. Prog Biochem Biophys, 2005, 32(5): 413-420. (in Chinese)
- [8] 胡昌东, 归绥琪. 自然流产患者滋养细胞肝素表皮生长因子的表达和意义 [J]. 上海医学, 2004, 27(7): 491-494.
Hu C D, Gui S Q. Expression and significance of HB-EGF in trophoblast of patients with spontaneous abortion [J]. Shanghai Medical Journal, 2004, 27(7): 491-494. (in Chinese)
- [9] 田仲萍. 细胞因子对妊娠的调节作用 [J]. 国外医学妇产科学分册, 1999, 29(7): 10-13.
Tian Z P. Effect of cytokine on pregnancy modulation [J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 1999, 29(7): 10-13. (in Chinese)
- [10] Corleeta H, Capp E, Strowitzki T. Cycle modulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human endometrium [J]. Braz J Med Biol Res, 2000, 33(7): 1387-1391.
- [11] Brannstrom M, Giesecke L, Movre I C, et al. Leukocyte subpopulations in the rat corpus luteum during pregnancy and pseudopregnancy [J]. Biol Reprod, 1994, 50(5): 7-18.
- [12] Pitzel L, Jarry H, Wuttke W. Effects and interactions of prostaglandin F2 alpha oxytocin and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells [J]. Endocrinology, 1993, 132(2): 48-57.
- [13] Yasuda K, Fuluoka M, Fujiwara H, et al. Effects of interferon on the steroidogenic functions and porcine granulosa cells in culture [J]. Biol Reprod, 1992, 47: 931.
- [14] Ashkat A A, Croy B A. Functions of uterine natural killer cells are mediated by interferon gamma production during murine pregnancy [J]. Semin Immunol, 2001, 13: 235-241.
- [15] Chen H L, Kamath R, Pace J L, et al. Expression of the interleukin gamma receptor gene in mouse placenta is related to stage of trophoblast cells [J]. Placenta, 1994, 15: 109-121.
- [16] 晋 柏, 陈文玮, 王海琦, 等. 重组小鼠 γ -干扰素对弓形虫感染孕鼠外周血及蜕膜 T 细胞亚群的影响 [J]. 江苏医药, 2008, 34(1): 78-80.
Jin B, Chen W W, Wang H Q, et al. Effects of recombinant IFN- γ on T cell subsets in peripheral blood and decidual tissues of pregnant mice infected with Toxoplasma gondii [J]. Jiangsu Med, 2008, 34(1): 78-80. (in Chinese)
- [17] Liu Z, Chen Y, Peng J P. The effect on MHC class II expression and apoptosis in placenta by IFN- γ administration [J]. Contraception, 2002, 65(2): 177-184.