

研究论文

IK细胞因子在小鼠早孕期子宫内膜的表达规律及其在胚胎着床中的作用

邵如月 刘学庆 丁裕斌 陈雪梅 高茹菲 王应雄 何俊琳*

(重庆医科大学公共卫生学院生殖生物学研究室, 重庆 400016)

摘要 通过Real-time PCR、Western blot及免疫组织化学方法分析了IK细胞因子(IK cytokine)在早孕小鼠(妊娠D1~D7)子宫内膜中的表达规律及宫角注射IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸后对胚胎着床的影响。结果显示, IK细胞因子mRNA表达在D1~D4逐渐升高, 于D4达到高峰($P<0.05$); Western blot和免疫组织化学结果与Real-time PCR结果基本一致, 其蛋白表达在D1~D5逐渐升高, 于D5达到高峰($P<0.05$); IK细胞因子在D5胚胎着床点的表达显著高于着床旁组织; 假孕小鼠子宫内膜IK细胞因子蛋白表达明显低于正常妊娠, 且整个假孕过程中没有表达高峰; 宫角注射IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸后24 h和48 h(即D4和D5)子宫内膜IK细胞因子表达明显受到抑制, MHCII抗原表达增强, 且胚胎着床数量明显减少($P<0.05$), 提示IK细胞因子在胚胎着床中发挥着重要作用。

关键词 IK细胞因子; 胚胎着床; MHCII; 免疫耐受

胚胎着床是胚胎与子宫之间复杂而精细的对话过程, 是成功妊娠的重要环节, 也是胚胎进一步发育的必经之路^[1-2]。胚胎着床的成功需要母胎间的配合与协作, 包括胚胎正常发育到胚泡期、子宫内膜处于“植入窗口期(即具有容受性)”、滋养层的黏附和侵入等。这些过程需要一系列分子(如前列腺素类、白三烯类激素、细胞因子、生长因子等)的调控和相互作用, 这些分子网络在子宫内膜容受性的建立和胚泡的活化过程中发挥作用, 其中细胞因子(cytokine)在这一过程中发挥着至关重要的作用^[3]。

细胞因子是由机体多种细胞合成和分泌的具有多功能的小分子糖蛋白, 它们通过与细胞表面的相应受体结合在细胞间传递信息、调节细胞的生理过程、提高机体的免疫力。由于其在免疫系统中的作用, 细胞因子参与了免疫性疾病、炎症及传染性疾病的发生、发展^[4], 但其功能并非仅局限于免疫系统, 它们也可作为细胞内信号参与子宫内膜细胞功能和母胎对话的调节^[5-6]。胚泡进入容受态的子宫可促进滋养层细胞和子宫上皮分泌细胞因子, 这些细胞因子通过调节许多黏附分子的表达来调节子宫内膜容受性的建立^[6-7]。细胞因子及其信号表达下调会

导致哺乳动物胚胎着床失败及胎盘形成异常^[8]。

IK细胞因子(IK cytokine)基因位于2p15-p14, 其编码的蛋白质分子量为19 kDa^[9], 最初是从K562红白血病细胞系的培养基中分离、提纯的, 能抑制IFN- γ 诱导的HLA class II antigen表达, 而且作为一个调节蛋白也能抑制MHCII抗原的表达^[10-11]。已有研究表明, IK细胞因子参与造血细胞HLA-DR表达的调节, 并通过调节HLA-DR的表达在生长因子依赖的CD34⁺细胞的增殖、分化中发挥作用^[12]。胚胎被认为是一种同种半抗原移植体, 在整个妊娠过程中是免疫耐受的, 对MHCII抗原表达的调节被认为在母胎免疫耐受中起主要作用^[13]。已知IK细胞因子与MHCII抗原表达密切相关, 但IK细胞因子是否参与了母胎免疫耐受的调节? 在妊娠过程是否发挥作用? 目前未见相关报道。本研究分析了IK细胞因子在小鼠早孕期子宫内膜的表达规律, 并探讨其在胚胎着床中的作用, 为胚胎着床机制、妊娠失败的

收稿日期: 2011-12-26 接受日期: 2012-02-23

国家自然科学基金(No.31071278)和重庆市科学技术委员会科研资助基金(No.CSTC2009BA5082)资助项目

*通讯作者。Tel: 023-68485926, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn

预防和治疗提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用SPF级昆明小鼠购于重庆医科大学实验动物中心[合格证号: SICXK(YU) 2007-0001], 鼠龄8~10周, 体重25~30 g。小鼠饲养于14 h光照, 10 h黑暗, 室温37 °C的环境中, 雌鼠与雄鼠按2:1合笼交配, 次日检查雌鼠阴道, 发现阴栓记为妊娠第一天(D1)。小鼠假孕模型建立, 将正常成年雄鼠输精管结扎后饲养14 d, 与雌鼠按1:2合笼交配, 次日检查雌鼠阴道, 发现阴栓记为假孕第一天(PD1)。

1.2 方法

1.2.1 正常妊娠小鼠子宫内IK细胞因子表达分析

取正常妊娠、假孕D1~D7小鼠子宫内组织50~100 mg置于匀浆器内, 按照TRIzol reagent(Invitrogen公司)试剂盒说明书提取总RNA, 紫外分光光度计测定 D_{260}/D_{280} 比值, 判断RNA纯度和浓度。定量PCR、免疫组织化学和Western blot分析正常妊娠D1~D7雌鼠子宫内组织IK细胞因子的表达, 免疫组织化学分析假孕小鼠PD1~PD7子宫内组织IK细胞因子的表达。此外, 对正常妊娠D5小鼠子宫内着床点和着床旁组织IK细胞因子表达进行了Western blot分析。

(1)定量PCR: IK细胞因子(NCBI序列号: NM_011879)及 β -actin基因引物序列(由上海生工生物技术有限公司合成)如下: IK cytokine sense primer: 5'-ACG CAG AAT GCT ATC C-3', antisense primer: 5'-CAG AGC CTC CTT GTT GT-3'; β -actin sense primer: 5'-CCT GAG GCT CTT TTC CAG CC-3', antisense primer: 5'-TAG AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG T-3'。使用BIO-Rad CFX 96™荧光定量PCR仪进行Real-time PCR, 反应体系(25 μ L)如下: 2 $\times$ SYBR Premix Ex Tag 12.5 μ L, 正向和反向引物各0.5 μ L(10 μ mol/L), cDNA 100 ng, 加水补至25 μ L。Real-time PCR反应条件为: 95 °C预变性30 s; 95 °C变性10 s, 56 °C延伸30 s, 共扩增40个循环, 循环后于56 °C收集荧光信号。将反应产物从65 °C缓慢地上升到95 °C, 温度每升高0.5 °C读取一次荧光值, 由仪器自动绘制溶解曲线, 该实验重复3次, 以 β -actin作为内参使目的基因表达量得到归一化处理, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行数据分析, t 检验进行统计学分析。

(2)免疫组织化学: 将4%多聚甲醛固定的妊娠

D1~D7和假孕PD1~PD7小鼠子宫组织, 经梯度乙醇脱水后, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片(厚度为4 μ m), 免疫组化染色。具体步骤为: 石蜡切片常规脱蜡, 自来水冲洗5 min, 蒸馏水冲洗, PBS浸泡5 min, 抗原热修复(微波20 min), 自然冷却, PBS浸泡3 min $\times$ 3次, 湿盒中3% H_2O_2 室温孵育10 min后PBS浸泡3 min $\times$ 3次。按照SP-9001免疫组化检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)说明书滴加封闭用正常山羊血清工作液, 37 °C孵育30 min, 然后轻轻拭去多余血清, 加入兔来源多克隆IK细胞因子一抗(1:160, Santa Cruz, IK(G-13): sc-135485), 4 °C孵育过夜, 阴性对照用非免疫血清替代IK细胞因子一抗孵育。然后PBS浸泡3 min $\times$ 3次, 滴加生物素标记羊抗兔IgG二抗工作液37 °C孵育30 min, PBS浸泡3 min $\times$ 3次, 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液37 °C孵育30 min, PBS浸泡3 min $\times$ 3次后应用DAB显色剂显色, 苏木精复染细胞核, 梯度酒精脱水后中性树胶封片。采用OLYMPUS BX51显微镜对切片进行拍照。

(3)Western blot: 将部分妊娠D1~D7小鼠经3%戊巴比妥钠麻醉后断颈处死, 取出子宫, 分离子宫内组织; 部分妊娠D5小鼠经尾静脉注射0.4%台盼蓝15 min后, 经3%戊巴比妥钠麻醉后断颈处死, 取出子宫, 分离着床点和着床旁。取100 mg小鼠子宫内组织, 用液氮碾磨后, 加入200 μ L蛋白裂解液(碧云天生物技术有限公司)和2 μ L蛋白酶抑制剂PMSF(100 mmol/L), 冰浴震荡裂解20 min, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 取5 μ L裂解上清液用BCA试剂盒测定蛋白质含量。取等量蛋白质提取样品(约50 μ L)按4:1溶于5 $\times$ loading buffer中, 混匀, 沸水煮10 min, 8% SDS-PAGE凝胶电泳, 恒压80 V电泳2 h; 将分离的蛋白质电转至PVDF膜(0.45 μ m)上, 5%脱脂奶粉室温封闭1.5 h; 然后分别与兔来源多克隆IK细胞因子一抗(1:500, Santa Cruz, IK(G-13): sc-135485)和 β -actin一抗(1:500, 北京中杉金桥生物技术有限公司, TA-09) 4 °C孵育12 h, PBST洗涤3次, 每次5 min; 再与5%脱脂奶粉稀释的二抗室温孵育1 h, PBST洗涤3次, 每次5 min; 化学发光ECL法显影观察条带。蛋白质条带采用Quantity One软件进行灰度相对定量分析, 以 β -actin作内参照。

1.2.2 IK细胞因子寡聚脱氧核苷酸子宫角注射

取90只雌鼠于妊娠D3经3%戊巴比妥钠麻醉后, 进行子宫角注射^[14]。其中60只小鼠(实验组)子宫一侧注射5 μ L IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸(浓度: IK

cytokine A-ODNs 10 μg 溶于100 μL 双蒸水中), 另一侧注射等量的IK细胞因子正义寡聚脱氧核苷酸(IK cytokine S-ODNs, 10 μg 溶于100 μL 双蒸水中); 30只双侧均注射等量双蒸水作为对照。将30只实验组小鼠分别于宫角注射后24 h(妊娠D4, 15只)和48 h(妊娠D5, 15只)断颈处死, 取子宫内膜组织进行IK细胞因子免疫组织化学和Western blot分析, 对MHCII抗原进行了mRNA及蛋白质表达分析; 另外30只实验组小鼠和30只对照组小鼠于妊娠D7断颈处死, 取出子宫进行胚胎计数并观察胚胎形态。IK cytokine A-ODNs和IK cytokine S-ODNs由上海博尚生物技术有限公司设计并合成, 序列为: IK cytokine A-ODNs: 5'-GTG AGC CCT TCT CTA ACC CT-3'-FITC, IK cytokine S-ODNs: 5'-AGG GTT AGA GAA GGG CTC AC-3'-FITC, 序列进行了全硫代修饰。MHCII(NCBI序列号: XM_003457013)基因引物序列(由上海生工生物技术有限公司合成)如下: MHCII sense primer: 5'-AAG AAG GAG ACT GTC TGG ATG C-3'; Antisense primer: 5'-TGA ATG ATG AAG ATG GTG CCC-3'。

1.3 统计学分析

所有实验数据均采用SPSS11.5统计软件, t 检验进行分析和处理, 以 $P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 正常妊娠小鼠子宫内膜组织IK细胞因子mRNA的表达

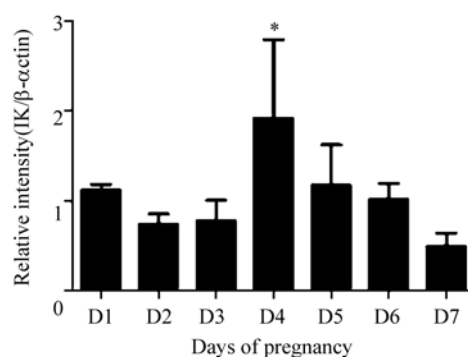
Real-time PCR结果显示, 在妊娠D1~D4, 随着妊娠天数的递增, IK细胞因子mRNA的表达量逐渐升高, 妊娠D4达到高峰(* $P<0.05$), 随后的妊娠D5~D7其表达量逐渐下降(图1)。

2.2 正常妊娠小鼠子宫内膜组织IK细胞因子Western blot分析

Western blot结果显示, 在妊娠D1~D5, 随着妊娠天数的递增, IK细胞因子蛋白质的表达量逐渐升高, 妊娠D5达到高峰(* $P<0.05$), 随后妊娠的D6和D7其表达量逐渐下降(图2)。

2.3 正常妊娠小鼠子宫内膜组织IK细胞因子免疫组织化学分析

免疫组织化学结果发现, IK细胞因子蛋白质在妊娠D1和D2微弱表达于腔上皮和腺上皮, 妊娠D3~D5强烈表达于腔上皮、腺上皮和基质细胞, D5达到高峰, D6、D7表达开始下降(图3)。

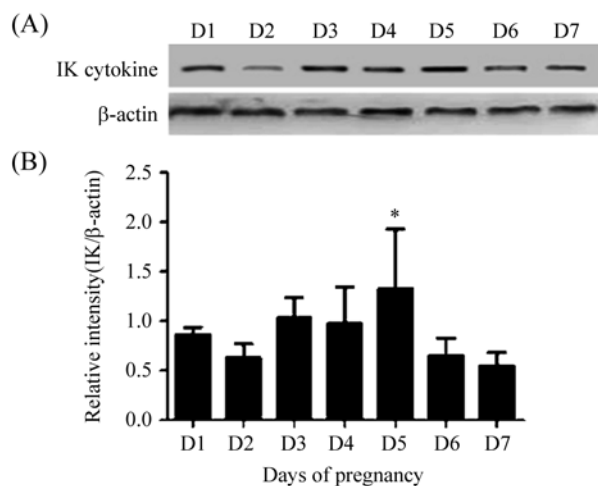


本实验重复3次。* $P<0.05$, D4与其余妊娠天数相比具有统计学差异。

The experiment was replicated for three times. * $P<0.05$, D4 group vs other groups.

图1 Real-time PCR检测IK细胞因子mRNA在正常妊娠D1~D7小鼠子宫内膜中的表达

Fig.1 Real-time PCR analysis of IK cytokine mRNA level in mice endometria during D1~D7 pregnancy



A: Western blot电泳条带; B: IK细胞因子蛋白质在妊娠D1~D7相对表达量。本实验重复3次。* $P<0.05$, D5与其他各组比较。

A: Western blot electrophoresis graph; B: relative densitometric analysis of IK cytokine protein during pregnancy D1~D7. The experiment was replicated for three times. * $P<0.05$, D5 group vs other groups.

图2 Western blot检测IK细胞因子蛋白质在妊娠D1~D7小鼠子宫内膜组织中的表达

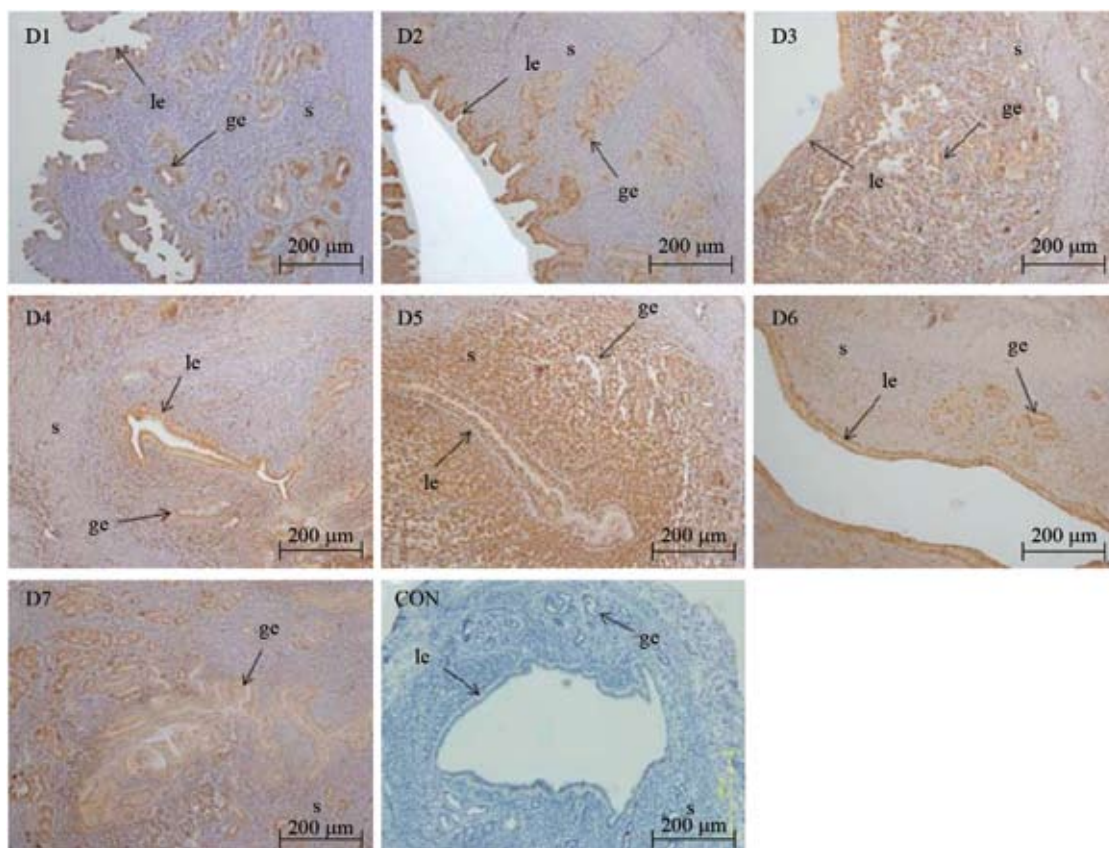
Fig.2 Western blot detection of IK cytokine protein in mice endometria during D1~D7 pregnancy

2.4 正常妊娠小鼠子宫内膜胚胎着床点和着床旁组织IK细胞因子蛋白质的表达

Western blot检测妊娠D5胚胎着床点和着床旁IK细胞因子蛋白质的表达。结果显示, IK细胞因子蛋白质在妊娠D5着床点的表达明显强于着床旁, 且具有统计学差异(* $P<0.05$)(图4)。

2.5 假孕小鼠子宫内膜组织IK细胞因子的表达

通过免疫组织化学检测了IK细胞因子在假孕小

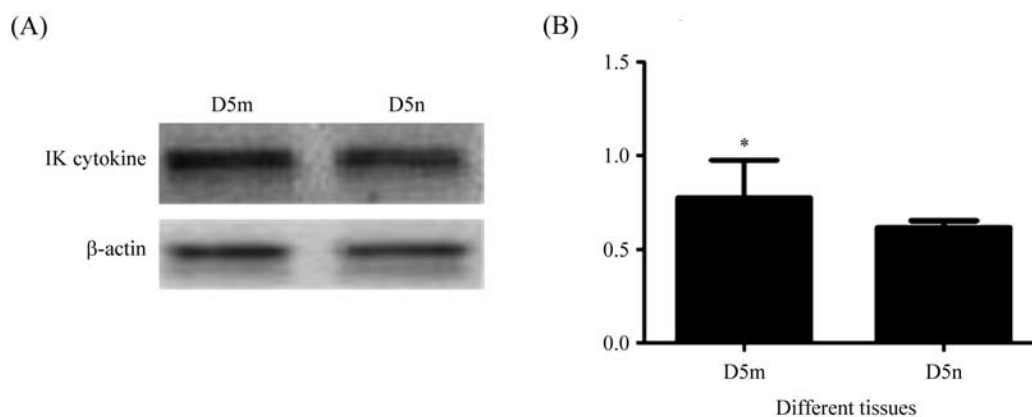


本实验重复3次。le: 腔上皮; ge: 腺上皮; s: 基质细胞; CON: 阴性对照。

The experiment was replicated for three times. le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; s: stroma; CON: negative control.

图3 免疫组织化学检测IK细胞因子在正常妊娠D1~D7小鼠子宫内膜中的表达

Fig.3 Immunohistochemistry of IK cytokine in mice endometria during early pregnancy



A: Western blot电泳条带; B: 着床点和着床旁IK细胞因子蛋白质相对表达差异。

A: Western blot electrophoresis graph; B: relative densitometric analysis of IK cytokine protein between implantation site (D5m) and inter-implantation segment (D5n).

图4 Western blot检测IK细胞因子蛋白在正常妊娠(D5)小鼠子宫内膜胚胎着床点和着床旁的表达($n=3$)

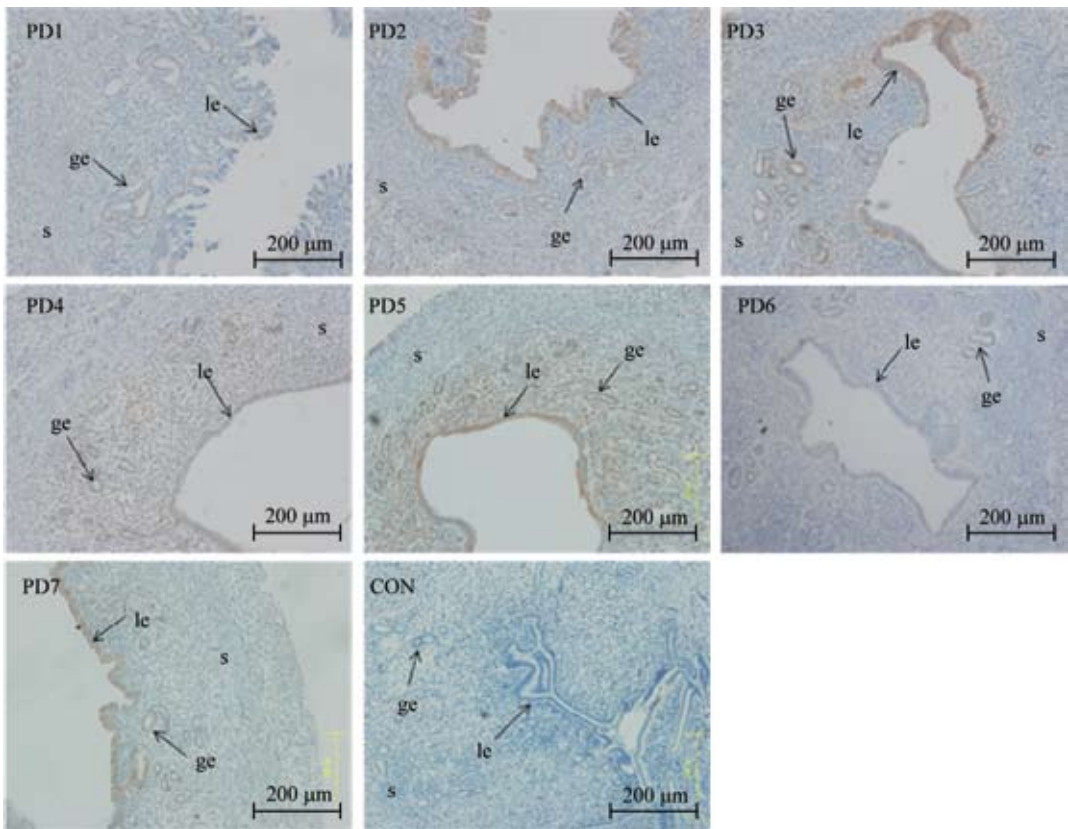
Fig.4 Comparison of IK cytokine protein expression in mice endometria between implantation site and inter-implantation segment($n=3$)

鼠PD1~PD7子宫内膜组织中的表达情况。结果显示, IK细胞因子在假孕PD1的腔上皮和腺上皮微弱表达, PD2和PD3时在腔上皮和腺上皮的表达有所增加, PD4表达明显下降, 且在PD5~PD7维持在较低水平, 整个

假孕过程中未见IK细胞因子表达高峰(图5)。

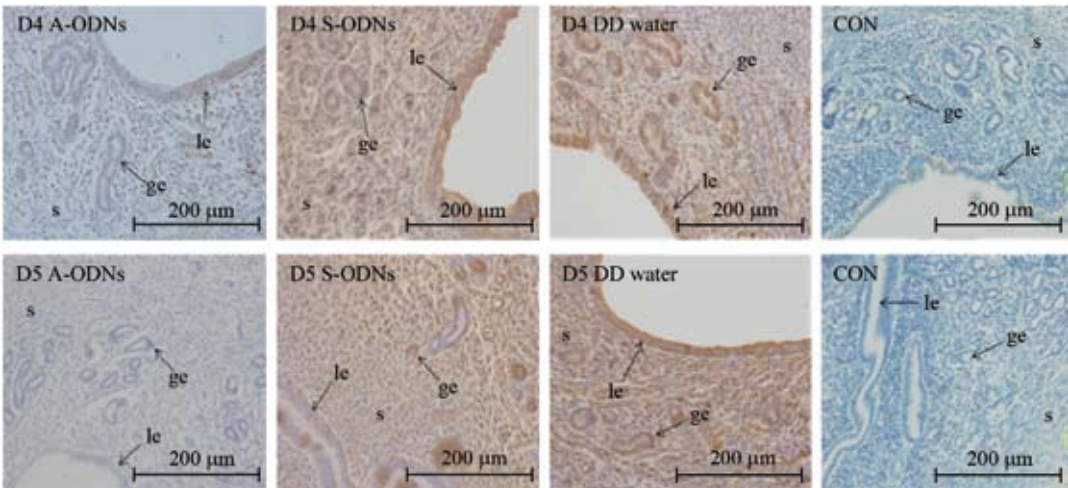
2.6 IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸对IK细胞因子表达的抑制作用

免疫组织化学结果显示, 宫角注射 IK cytokine



本实验重复3次。le: 腔上皮; ge: 腺上皮; s: 基质细胞; CON: 阴性对照。
The experiment was replicated for three times. le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; s: stroma; CON: negative control.

图5 免疫组织化学检测IK细胞因子在假孕小鼠子宫内膜中的表达
Fig.5 Immunohistochemistry of IK cytokine in mice endometria during pseudopregnancy



本实验重复3次。S-ODNs: 正义寡聚脱氧核苷酸; A-ODNs: 反义寡聚脱氧核苷酸; DD water: 双蒸水; le: 腔上皮; ge: 腺上皮; s: 基质细胞; CON: 阴性对照。
The experiment was replicated for three times. S-ODNs: sense oligodeoxynucleotides; A-ODNs: antisense oligodeoxynucleotides; DD water: double distilled water; le: luminal epithelium; ge: glandular epithelium; s: stroma; CON: negative control.

图6 免疫组织化学检测反义寡聚脱氧核苷酸作用后IK细胞因子蛋白质的表达
Fig.6 Immunohistochemistry of IK cytokine protein expression suppressed by antisense ODNs

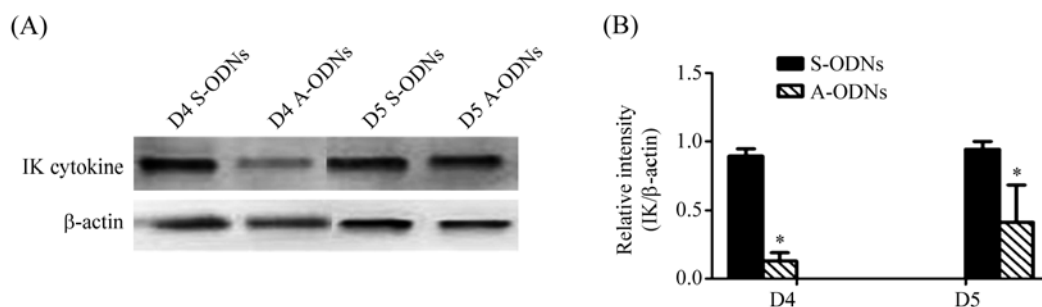
A-ODNs后24 h和48 h(即妊娠D4和D5), 子宫内膜IK细胞因子的表达明显受到抑制, 而在注射IK cytokine S-ODNs的实验组和对照组(图6)IK细胞因子的表达无明显变化。

宫角注射IK cytokine A-ODNs和IK cytokine S-ODNs 24, 48 h(即妊娠D4和D5)后, Western blot结果显示, 注射IK cytokine A-ODNs后IK细胞因子的蛋白质表达量明显下降, 且具有统计学差异(* $P < 0.05$)(图7), 表明IK细胞因子的蛋白质表达受到IK cytokine A-ODNs的

抑制。

2.7 IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸对小鼠胚胎着床的影响

妊娠D3宫角注射IK cytokine A-ODNs、IK cytokine S-ODNs和对照组小鼠, 都于妊娠D7断颈处死, 取出子宫, 进行胚胎计数并观察胚胎形态。结果显示, 妊娠D7时, 对照组和注射IK cytokine S-ODNs组小鼠子宫胚胎着床数量无明显差异(图8A-D7a和图8A-D7b), 而注射IK cytokine A-ODNs的实验组子宫胚胎着床数量

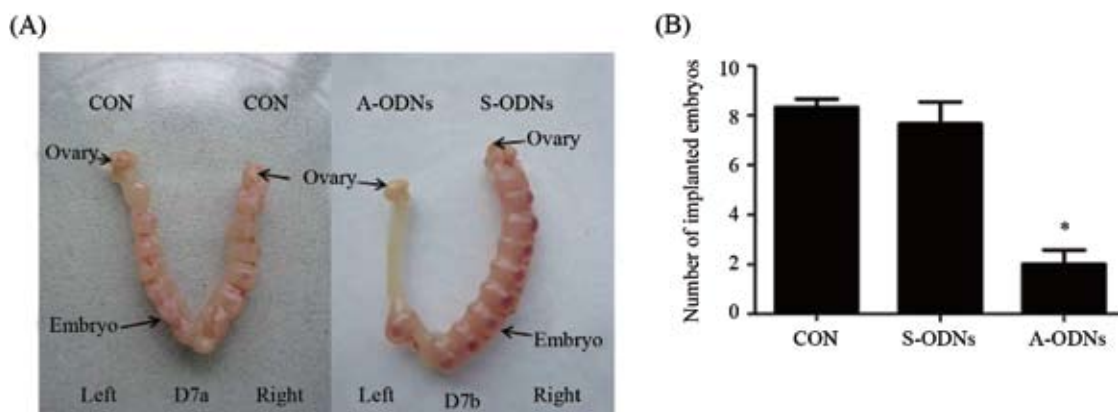


A: Western blot电泳条带; B: 宫角注射前后IK cytokine蛋白相对表达量。

A: Western blot electrophoresis graph; B: relative densitometric analysis of IK cytokine protein before and after intrauterine injection of ODNs.

图7 Western blot检测IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸对IK细胞因子蛋白质表达的抑制作用

Fig.7 Suppression of IK cytokine protein expression by antisense ODNs



A: 妊娠D7具有代表性的子宫。D7a: 对照组($n=30$), 左右两侧子宫均注射双蒸水; D7b: 实验组($n=30$), 左侧注射IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸(A-ODNs), 右侧注射IK细胞因子正义寡聚脱氧核苷酸(S-ODNs); B: 各组数据的统计学分析, * $P < 0.05$ 。

A: two representative uteri of D7. D7a: control group (CON, $n=30$), pregnant mouse was injected in both horns with DD water; D7b: treatment group ($n=30$), pregnant mouse was injected with IK cytokine A-ODNs in the left horn, with IK cytokine S-ODNs in the right horn at day 3 of pregnancy; B: statistical analysis of implanted embryo numbers in the uteri with different treatments, * $P < 0.05$.

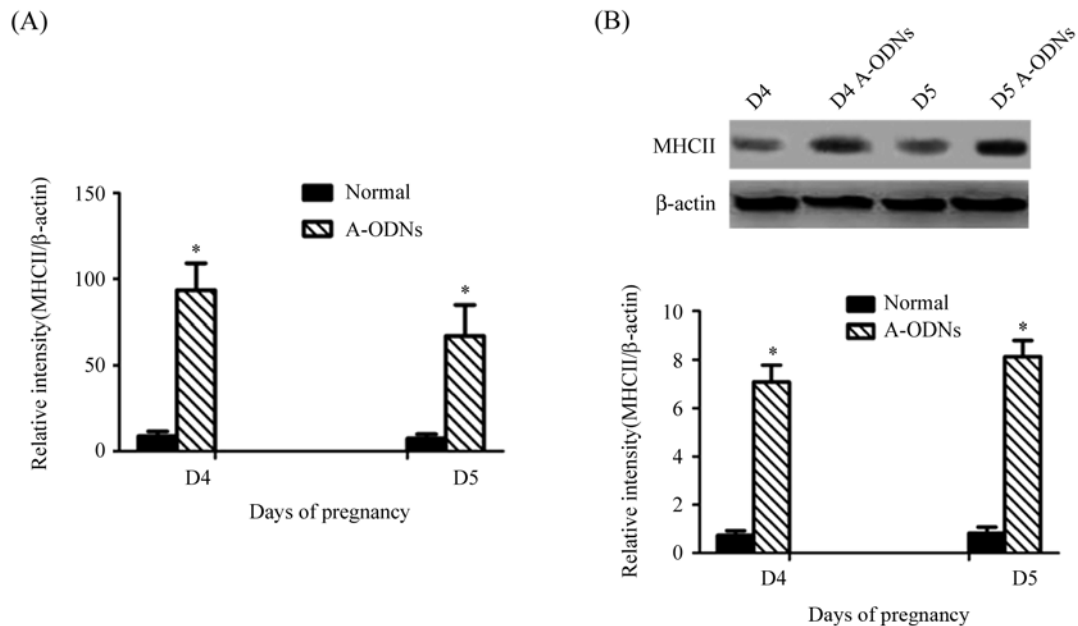
图8 IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸对小鼠胚胎着床的影响

Fig.8 Effect of antisense oligodeoxynucleotide on embryo implantation

明显减少, 具有统计学差异(* $P < 0.05$), 且未观察到胚胎形态学的异常(图8)。同时, 与实验组小鼠子宫内的胚胎相比, 注射IK cytokine S-ODNs的子宫内胚胎形态、大小均正常, 表明IK cytokine ODNs本身及本研究所用剂量对于胚胎着床是无毒性的。

2.8 IK cytokine A-ODNs对早孕小鼠子宫内膜主要组织相容性复合体II(MHCII)抗原表达的影响

为探讨早孕小鼠子宫内膜IK细胞因子的表达受到抑制后, MHCII抗原的表达是否会受到影响, 本研究比较分析了宫角注射IK cytokine A-ODNs前后



A: Real-time PCR检测早孕小鼠子宫内MHCII mRNA表达情况; B: Western blot检测早孕小鼠子宫内MHCII蛋白表达情况。
A: Real-time PCR analysis of MHCII mRNA expression in mice uterus during early pregnancy; B: Western blot detection of MHCII protein expression in mice uterus during early pregnancy.

图9 IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸对早孕小鼠子宫内MHCII表达的影响
Fig.9 Effect of antisense oligodeoxynucleotide on MHCII expression

小鼠子宫内膜MHCII抗原的表达情况。Real-time PCR和Western blot分析结果均显示,于妊娠D3宫角注射IK cytokine A-ODNs后24, 48 h(妊娠D4和D5),小鼠子宫内膜MHCII抗原的表达较对照组明显升高(* $P<0.05$)(图9)。

3 讨论

胚胎着床是一个复杂的过程,需要发育到具有植入能力的胚泡与处于容受态的子宫内膜相互协调,一系列由胚胎及母体组织产生的分子在这一过程中起着诱导和调节作用^[15-17]。子宫内膜仅在一个特定的时期(即着床窗,妊娠D4~D5)允许胚胎植入^[18-19],并在这一特定时期表达一些特定的分子,某些分子被视为子宫内膜处于容受态的标志物^[20-22]。本研究发现IK细胞因子在早孕期小鼠子宫内膜中呈现时间依赖性表达,其mRNA表达强度在妊娠D1~D4逐渐升高,于妊娠D4达到高峰;Western blot和免疫组织化学结果与Real-time PCR结果基本一致,IK细胞因子蛋白质的表达量在妊娠D1~D5逐渐升高,于妊娠D5达到高峰,而且在子宫内膜胚胎着床点的表达显著高于着床旁组织。但在假孕小鼠子宫内膜中,IK细胞因子蛋白质的表达明显低于正常妊娠,且整个假孕

过程中没有表达高峰。此外,已有研究证实,反义寡聚脱氧核苷酸在某些组织的半衰期为24~48 h^[23],本研究中,妊娠D3宫角注射IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸24 h和48 h后,能够显著抑制子宫内膜组织IK细胞因子的表达,并导致胚胎着床数量显著减少。IK细胞因子在妊娠小鼠“着床窗”和着床点的这种表达特征以及抑制IK细胞因子表达后能降低胚胎着床效率,强烈暗示了IK细胞因子参与了胚胎着床的过程。

由于胚胎带有来自父亲的抗原,早在1950s,有学者提出了“胚胎是一同种半抗原移植物”的观点,胚胎与母体之间也存在着类似于同种异体移植与受体之间存在的免疫学关系^[24]。然而,胚胎在整个正常妊娠过程中是免疫耐受的。胚胎与母体的免疫学关系一方面取决于胚胎表达的抗原,另一方面取决于母体对这些抗原的识别和反应。许多机制参与了母胎免疫耐受的调控,其中主要组织相容性复合体(MHC)的表达被认为起主要作用。MHCII抗原广泛表达在B细胞、巨噬细胞、树突细胞等抗原递呈细胞(APC)表面,在免疫反应的启动、发展和调节过程中起着重要作用^[1]。MHCII抗原的表达还可以被许多细胞因子诱导,其中诱导作用最强的

是IFN- γ ^[25]。在自身免疫性疾病的靶器官中观察到MHCII抗原的异常表达,且表达量与疾病的严重程度密切相关^[26-27]。而在滋养层细胞中,MHCII的表达受到抑制对于胚胎的免疫耐受和正常妊娠的维持是至关重要的^[28]。滋养层细胞本身不表达MHCII抗原,也不能在IFN- γ 的诱导下表达MHCII抗原^[28-29]。在自然流产胚胎组织中发现了MHCII抗原的异常表达^[30-32],这提示MHCII的表达抑制对于维持正常妊娠是至关重要的。IK细胞因子已被证实能抑制MHCII抗原的表达和由IFN- γ 诱导的MHCII抗原的表达^[10-11]。本研究显示IK细胞因子在小鼠子宫内膜“着床窗”表达最高,妊娠D3宫角注射IK细胞因子反义寡聚脱氧核苷酸24 h和48 h后(即“着床窗”)IK细胞因子蛋白质表达受到显著抑制,而MHCII抗原表达增强,胚胎着床的数量明显减少。这一结果提示,在正常妊娠中,IK细胞因子可能通过抑制MHCII抗原的表达而抑制了母体与胚胎间的免疫反应,从而使胚胎在整个妊娠过程中免疫耐受,使妊娠得以维持。但当IK细胞因子表达受到抑制,将解除IK细胞因子对MHCII抗原表达的抑制,母胎界面MHCII抗原表达增强,影响母体对胚胎的免疫耐受从而影响胚胎着床。然而,对IK细胞因子表达的抑制并没有完全导致胚胎着床失败,仍有少数胚胎着床,我们推测可能还有其他机制参与母胎免疫耐受的调控,以保护胚胎不受母体免疫系统攻击。

本研究通过实验阐明了IK细胞因子在早孕期小鼠子宫内膜组织中的时空表达规律,初步揭示了IK细胞因子在胚胎着床过程中发挥着重要作用。但IK细胞因子究竟通过什么途径参与母胎免疫耐受的调节,以什么机制调控胚胎着床,仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- Xiong J, Zeng P, Ye D. Lipoxins: A novel regulator in embryo implantation. *ScientificWorldJournal* 2011; 11: 235-41.
- Guo B, Tian Z, Han BC, Zhang XM, Yang ZM, Yue ZP. Expression and hormonal regulation of Hoxa 10 in canine uterus during the peri-implantation period. *Reprod Dom Anim* 2009; 44(4): 638-42.
- Madeja Z, Yadi H, Apps R, Boulououar S, Roper SJ, Gardner L, *et al*. Paternal MHC expression on mouse trophoblast affects uterine vascularization and fetal growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(10): 4012-7.
- Cannon JG. Inflammatory cytokines in nonpathological states. *News Physiol Sci* 2000; 15(6): 298-303.
- Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *J Reprod Immunol* 2001; 52(1/2): 15-33.
- Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: Network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol* 2011; 210(1): 5-14.
- Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000; 14(5): 815-26.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Taylor HS. The role of growth factors and cytokines during implantation: Endocrine and paracrine interactions. *Semin Reprod Med* 2009; 27(1): 62-79.
- Krief P, Augery-Bourget Y, Plaisance S, Merck MF, Assier E, Tanchou V, *et al*. A new cytokine (IK) down-regulating HLA class II: Monoclonal antibodies, cloning and chromosome localization. *Oncogene* 1994; 9(12): 3449-56.
- Vedrenne J, Assier E, Pereno R, Bouzinba-Segard H, Azzarone B, Jasmin C, *et al*. Inhibitor (IK) of IFN- γ induced HLA class II antigens expression also inhibits HLA class II constitutive expression in the human Raji B cell line. *Oncogene* 1997; 14(12): 1453-61.
- Muraoka M, Hasegawa H, Kohno M, Inoue A, Miyazaki T, Terada M, *et al*. IK cytokine ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 2006; 54(11): 3591-600.
- Cao LX, Le Bousse Kerdiles MC, Clay D, Oshevski S, Jasmin C, Krief P. Implication of a new molecule IK in CD34⁺ hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation. *Blood* 1997; 89(10): 3615-23.
- Murphy SP, Tomasi TB. Absence of MHC class II antigen expression in trophoblast cells results from a lack of class II transactivator (CIITA) gene expression. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(1): 1-12.
- Zhu LJ, Bagchi MK, Bagchi IC. Attenuation of calcitonin gene expression in pregnant rat uterus leads to a block in embryonic implantation. *Endocrinology* 1998; 139(1): 330-9.
- Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod* 1995; 10(6): 1579-602.
- Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* 2007; 1: 75-82.
- Garrido-Gómez T, Domínguez F, Simón C. Proteomics of embryonic implantation. *Handb Exp Pharmacol* 2010; (198): 67-78.
- Yoshioka S, Fujiwara H, Nakayama T, Kosaka K, Mori T, Fujii S. Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. *Hum Reprod* 2006; 21(12): 3290-4.
- Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod* 1999; 14(Suppl 2): 3-16.
- Salamonsen LA, Nie G, Dimitriadis E, Robb L, Findlay JK. Genes involved in implantation. *Reprod Fertil Dev* 2001; 13(1): 41-9.
- Tapia A, Vilos C, Marín JC, Croxatto HB, Devoto L. Bioinformatic detection of E47, E2F1 and SREBP1 transcription factors as potential regulators of genes associated to acquisition of endometrial receptivity. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 27: 9-14.
- Minas V, Loutradis D, Makrigiannakis A. Factors controlling blastocyst implantation. *Reprod Biomed Online* 2005; 10(2): 1-12.

- 205-16.
- 23 Wagner RW. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994; 372(6504): 333-5.
- 24 Loke YW, King A. Immunology of human placental implantation: Clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 1997; 3(4): 153-9.
- 25 Steimle V, Siegrist CA, Mottet A, Lisowska-Grospierre B, Mach B. Regulation of MHC class II expression by interferon- γ mediated by the transactivator gene CIITA. *Science* 1994; 265(5168): 106-9.
- 26 Guardiola J, Maffei A. Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases. *Crit Rev Immunol* 1993; 13(3/4): 247-68.
- 27 Cheah PL, Looi LM, Chua CT, Yap SF, Fleming S. Enhanced major histocompatibility complex (MHC) class II antigen expression in lupus nephritis. *Malays J Pathol* 1997; 19(2): 115-20.
- 28 Peyman JA. Repression of major histocompatibility complex genes by a human trophoblast ribonucleic acid. *Biol Reprod* 1999; 60(1): 23-31.
- 29 Murphy SP, Tomasi TB. Absence of MHC class II antigen expression in trophoblast cells results from a lack of class II transactivator (CIITA) gene expression. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(1): 1-12.
- 30 Athanassakis I, Aifantis Y, Makrygiannakis A, Koumantakis E, Vassiliadis S. Placental tissue from human miscarriages expresses class II HLA-DR antigens. *Amer J Reprod Immunol* 1995; 34(5): 281-7.
- 31 Lata JA, Tuan RS, Shepley KJ, Mulligan MM, Jackson LG, Smith JB. Localization of major histocompatibility complex class I and II mRNA in human first-trimester chorionic villi by *in situ* hybridization. *J Exp Med* 1992; 175(4): 1027-32.
- 32 Chatterjee-Hasrouni S, Lala PK. MHC antigens on mouse trophoblast cells: Paucity of Ia antigens despite the presence of H-2K and D. *J Immunol* 1981; 127(5): 2070-3.

Expression of IK Cytokine in Mouse Uterus of Early Pregnancy and Its Significance in Embryo Implantation

Shao Ruyue, Liu Xueqing, Ding Yubin, Chen Xuemei, Gao Rufe, Wang Yingxiong, He Junlin*

(Laboratory of Reproductive Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The expression of IK cytokine was investigated in mice endometria during early pregnancy (D1~D7 of pregnancy) and pseudopregnancy using Real-time PCR, Western blot and immunohistochemical analysis, and the effect of IK cytokine on embryo implantation was observed by uterus horns injection of antisense *IK* cytokine oligodeoxynucleotides. Our data showed that the expression of IK cytokine mRNA increased gradually from D1 to D4 of pregnancy and reached a peak level at D4 of pregnancy ($P<0.05$). Western blot and immunohistochemical analysis revealed that the expression of IK cytokine protein increased gradually from D1 to D5 of pregnancy and reached a peak level at D5 of pregnancy ($P<0.05$). The expression of IK cytokine in the pseudopregnant uterus was significantly lower than that in the normal pregnant uterus and the level of the protein never showed a high peak during the whole pseudopregnancy. The expression of IK cytokine at the implantation site was much stronger than that in the inter-implantation segment at D5 of pregnancy. After 24 h and 48 h of treatment with antisense oligodeoxynucleotides of IK cytokine, the expression of IK cytokine in the uterus was remarkably inhibited, while the expression of MHCII increased and the number of implanted embryos significantly reduced ($P<0.05$). These results suggested that IK cytokine played a crucial role in implantation. The suppression of MHCII antigens by IK cytokine was likely to inhibit the fetal-maternal immune responses, contributing to the maintenance of successful pregnancy.

Key words embryo implantation; IK cytokine; MHCII; immune tolerance

Received: December 26, 2011 Accepted: February 23, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.31071278) and the Scientific Research Fund of Chongqing Science & Technology Commission (No.2009BA5082)

*Corresponding author. Tel: 86-23-68485926, E-mail: hejunlin_11@yahoo.com.cn