

孕酮和米非司酮对蒙古绵羊输卵管上皮细胞 α -防御素 mRNA 表达的影响

唐博 杜晨光 付本懂 锡林高娃 曹贵方*

(吉林大学生物兽医学院 长春 130062; 内蒙古农业大学动物科学与医学学院 呼和浩特 010018)

摘要: α -防御素(α -defensin)在雌性动物生殖道广泛存在,起免疫防御作用。为了研究孕酮与雌性生殖道 α -防御素 mRNA 表达的关系,本实验建立绵羊(*Ovis aries*)输卵管上皮细胞培养体系,添加不同浓度孕酮(10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} 和 10^{-10} mol/L)和孕酮拮抗剂米非司酮后提取细胞总 RNA,利用实时定量 PCR 测定 α -防御素 mRNA 的相对表达量。结果显示,一定浓度的孕酮(10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L)对培养的输卵管上皮细胞 α -defensin mRNA 的表达有促进作用,且不同浓度的孕酮对 α -defensin mRNA 的表达的影响程度不同。米非司酮极显著抑制了孕酮诱导的 α -defensin mRNA 的表达。结果表明,孕酮通过与孕酮受体结合促进 α -defensin mRNA 的表达,推断雌性生理周期下孕酮可能通过作用于 α -defensin 等影响自身免疫。

关键词: α -防御素; 实时定量 PCR; 17 β -雌二醇; 米非司酮

中图分类号: Q492.1, S852.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)06-151-05

Impact of Progesterone and Mifepristone on α -Defensin mRNA Expression in Epithelial Cells of the Fallopian Tubes in Sheep

TANG Bo DU Chen-Guang FU Ben-Dong XILIN Gao-Wa CAO Gui-Fang*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062;

College of Veterinary Medicine and Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China)

Abstract: α -defensin is widely detected in female reproductive tracts and is regarded to play an important role in the immune defence. This study aimed to investigate the regulation of α -defensin mRNA expression by progesterone in female reproductive tract. The epithelial cells of the Fallopian tube of Mongolian sheep was cultured *in vitro*. Cells were treated with different concentrations of progesterone (10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} and 10^{-10} mol/L) with or without mifepristone (the antagonist of progesterone), total RNA was extracted from cells, and the relative expression of α -defensin mRNA was detected using real time RT-PCR. The results showed that different concentrations of progesterone variously enhanced the expression of α -defensin mRNA in the epithelial cells of the Fallopian tube, while mifepristone significantly inhibited the expression of α -defensin mRNA induced by progesterone. These results illuminate that progesterone promotes the expression of α -defensin and that progesterone may affect the autoimmunity of the female animals via α -defensin pathway.

Key words: α -defensin; Real time PCR; 17 β -estradiol; Mifepristone

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30460093), 内蒙古自治区自然科学基金项目(No. 20080404MS0503);

*通讯作者, E-mail: guifangcao@yahoo.com;

第一作者介绍 唐博,女,讲师,博士;研究方向:分子生物学、细胞生物学、发育生物学; E-mail: Tangbo78@sohu.com.

收稿日期: 2009-03-28, **修回日期:** 2009-09-23

抗微生物肽是生物体内先天性免疫的重要组成部分^[1,2],在动植物界广泛存在,具有广谱抗菌活性^[3],防御素是其中一大家族。-防御素(-defensin)主要存在于哺乳动物和鸟类的上皮组织中^[4]。据报道,鼠(*Mus musculus*)-defensin存在于雌性生殖道的上皮细胞内,并且起抗菌作用^[5];人(*Homo sapiens*)子宫颈黏膜能分泌抗菌多肽,-defensin在子宫颈抗菌机理中发挥重要作用^[6]。由此提示,-defensin是雌性生殖道天然免疫的重要组成部分。Quayle等^[7]研究发现雌性生殖道-defensin受雌、孕激素的影响,在不同生理周期呈现不同的表达量。关于生殖道防御素的研究主要涉及人类、小鼠^[5,6],对于家畜,尤其反刍动物的研究较少^[5]。

卵巢分泌的雌激素和孕激素共同作用形成雌性动物的生理周期。孕激素主要功能在于使哺乳动物的副性器官做好妊娠准备,是胚胎着床、维持妊娠必需的激素。它通过与靶器官上的孕激素受体结合发挥作用。孕酮是作用最强的孕激素。米非司酮(mifepristone)是炔诺酮衍生物,是目前应用最广泛的抗孕激素药物,具有抗糖皮质激素和抗雄激素的作用,是孕酮受体(progesterone receptor, PR)的竞争性抑制剂。

本研究培养蒙古绵羊(*Ovis aries*)输卵管上皮细胞,探讨绵羊-defensin的表达与孕酮的相关性,以及通过添加孕酮拮抗剂米非司酮,探讨-defensin与孕酮产生相关性的作用机制,旨在为揭示雌性生殖道的先天防御机制奠定基础。

1 材料

1.1 动物及其组织 成年蒙古绵羊输卵管组织,用37℃灭菌生理盐水带回无菌间,培养输卵管上皮细胞。

1.2 主要试剂 DMEM/F12 (Invitrogen); 胎牛血清(天津灏洋生物制品有限责任公司); 孕酮、米非司酮、丙酮酸钠、青霉素、链霉素等均购自Sigma公司; 微量RNA提取试剂盒(W6221)购自上海华舜生物工程有限公司; 荧光定量SYBR Green I反转录PCR试剂盒(Cat. NO. DRR053S)购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 蒙古绵羊-defensin引物及内参基因-actin引物的设计 运用DNAStar软件根据GenBank中绵羊的-defensin基因序列(U75250)设计引物P1(5'-GCC AAC ATG AGG CTC CAT CAC CTG CTC CT-3')和P2(5'-AAC TTT GAA CAA AAT TTA TTC TGG TTT AAA TT-3'),产物大小为300 bp左右。根据GenBank中绵羊的-actin基因序列(AF035422),设计一对产物为310 bp左右的引物P3(5'-CCC AAG GCC AAC CGT GAG AAG ATG A-3')和P4(5'-CGA AGT CCA GGG CCA CGT AGC AGA G-3')。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2 方法

2.1 输卵管上皮细胞的分离及培养 输卵管上皮组织由0.25%胰蛋白酶消化,在含20%血清的DMEM/F12培养液中,37℃,5%CO₂原代培养。1:1的0.25%胰蛋白酶0.02%EDTA37℃消化原代细胞,20%血清DMEM/F12培养液中,37℃,5%CO₂培养。传代细胞培养4d,80%汇合后待用。

2.2 上皮细胞培养体系添加孕酮 参考赵伟等^[8]文献中山羊(*Capra hircus*)的孕酮生理浓度,本实验添加孕酮的浓度分为5组10⁻⁶ mol/L,10⁻⁷ mol/L,10⁻⁸ mol/L,10⁻⁹ mol/L和10⁻¹⁰ mol/L,同时设对照组(不加孕酮)。所有处理组均提前无血清培养基饥饿10h,然后添加相应浓度的孕酮培养48h,每组5个重复,24h更换一次培养液。培养后分别提取细胞总RNA,进行实时定量PCR检测。

2.3 添加孕酮拮抗剂米非司酮 根据2.2相应结果,选取对-defensin表达影响最强组,即10⁻⁸ mol/L孕酮组。待第一代传代细胞培养4d后,更换无血清培养液培养10h,实验设3组进行,每组5个重复,24h更换一次培养液。具体组别:(1)空白对照组,不添加任何激素,仅更换无血清培养液同时处理48h。(2)孕酮组,仅添加10⁻⁸ mol/L孕酮培养48h。(3)米非司酮组,添加10⁻⁶ mol/L米非司酮培养8h后,再添加10⁻⁸ mol/L孕酮培养40h。所有组培养结

束后提取细胞总 RNA,进行实时定量 PCR 检测。

2.4 蒙古绵羊输卵管上皮细胞总 RNA 提取 按照上海华舜生物工程有限公司微量 RNA 提取试剂盒说明,提取细胞总 RNA,备用。

2.5 组织中 *-defensin* mRNA 相对含量的实时定量 PCR 检测 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法是实时定量 PCR 技术中分析基因表达相对变化的一种简便计算方法^[9]。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值可以表示组织中目的基因表达水平相对量。

按实时定量 PCR 试剂盒说明操作,优化条件,采用四步法^[10,11]运行程序:95 预变性 1 min;95 5 s,55 30 s,72 6 s,读板,80 1 s,读板,39 个 PCR 循环;72 6 s,70 到 95 隔 0.5、1 s 制作熔解曲线。记录各实验组 ΔCt 值。

2.6 实验数据处理 实验数据利用 SPSS 11.0 软件的单因子方差分析进行统计。

3 结果

3.1 传代细胞培养结果 传代培养 7 d 后,细胞长成漩涡状排列的致密单层细胞集落,其细胞呈多角形或蝌蚪形,边界清楚,排列紧密,胞浆呈颗粒状,核圆而大(图 1)。

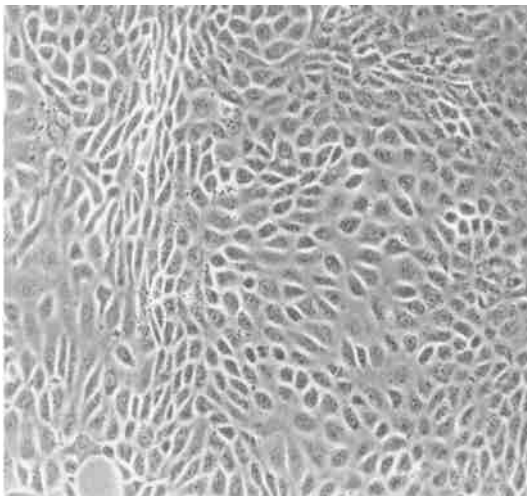


图 1 绵羊输卵管上皮细胞传代培养 7 d 形态
Fig. 1 Epithelial cells of the Fallopian tubes after 7 d passage (200 ×)

3.2 *-defensin* 基因 PCR 扩增曲线及熔解曲线 *-defensin* 和 *-actin* 的实时定量 PCR 扩增反应动力学曲线见图 2,熔解曲线见图 3。*-defensin* 及 *-actin* 基因扩增产物分别在 86.5 和 90.0 时出现单一峰,表明 PCR 扩增片段为单一特异性产物。

将 *-defensin* 和 *-actin* 的实时定量 PCR 产物,送上海生工生物工程技术有限公司测序,经过 DNASTar 软件比对,*-defensin* 和 *-actin* 的 cDNA 序列与 GenBank 公布的绵羊相应序列一致。

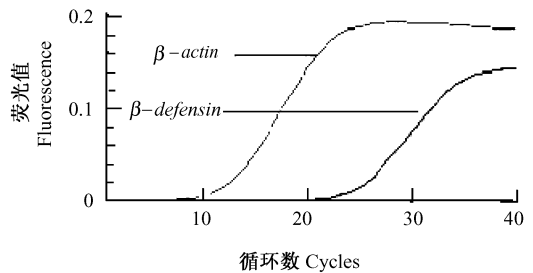


图 2 *-defensin* 基因和 *-actin* 基因的熔解曲线
Fig. 2 The real time PCR amplification curves of *-defensin* and *-actin* gene

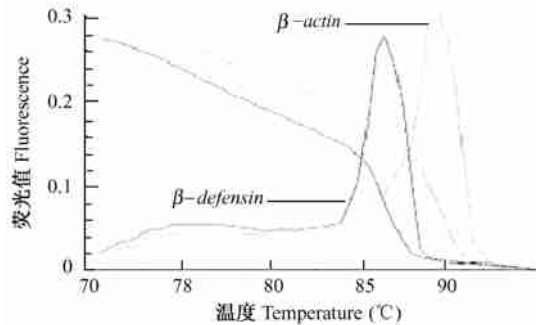


图 3 *-defensin* 基因和 *-actin* 基因的扩增曲线
Fig. 3 The real time PCR melting curves of *-defensin* and *-actin* gene

3.3 孕酮对培养的输卵管上皮细胞内 *-defensin* 基因相对表达量的影响 提取各实验组培养细胞总 RNA,进行实时定量 PCR 检测,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行统计分析,*-defensin* 的相对表达量见图 4。不添加孕酮作为对照组。由图 4

可知,对照组上皮细胞表达 α -defensin,添加不同浓度孕酮后 α -defensin 的相对含量增多,与对照组相比,除了添加 10^{-10} mol/L 孕酮组以外,所有实验组与对照组差异显著 ($P < 0.05$)。添加 10^{-10} mol/L 孕酮后 α -defensin 相对表达量增多,但是与对照组差异不显著;添加 10^{-9} mol/L 孕酮后, α -defensin 相对表达量继续增加;当添加 10^{-8} mol/L 孕酮后 α -defensin 相对表达量达 5 个实验组中最高;而当孕酮浓度继续增高,达到 10^{-7} 和 10^{-6} mol/L 后, α -defensin 相对表达量又开始降低,但仍高于 10^{-10} mol/L 孕酮组和对照组。

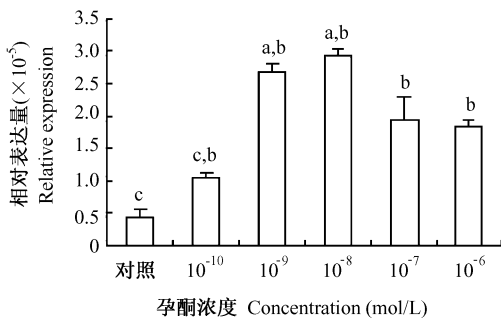


图4 不同浓度孕酮处理 48 h 后 α -defensin 相对表达量

Fig. 4 Expression of α -defensin after treatment with different concentrations of progesterone for 48 h
图中所示不同字母表示有显著性差异, $a > b > c$, $P < 0.05$ 。

Values in the figure with different letters indicating significant difference, $a > b > c$, $P < 0.05$.

3.4 孕酮拮抗剂米非司酮对培养的输卵管上皮细胞 α -defensin 基因相对表达量的影响 处理方法如 2.3 所述,培养结束后提取细胞 RNA,进行实时定量 PCR 检测,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行统计分析。不同处理组输卵管上皮细胞内 α -defensin 相对表达量见图 5。空白对照组 α -defensin 的相对表达量较低,添加 10^{-8} mol/L 孕酮组的 α -defensin 显著 ($a > b$) 增高;而添加米非司酮后显著降低了孕酮诱导的 α -defensin 的相对表达量,与空白对照组间未见显著性差异。

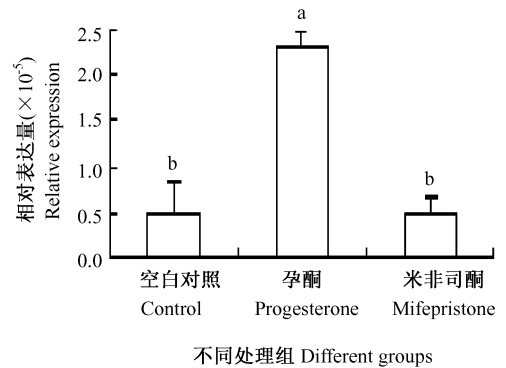


图5 不同处理组 α -defensin 相对表达量

Fig. 5 Expression of α -defensin in different groups
图中所示不同字母表示有显著性差异, $a > b$, $P < 0.05$ 。

Values in the figure with different letters indicating significant difference, $a > b$, $P < 0.05$.

4 讨论

防御素在各种动物生殖道上皮组织内广泛表达,具有广谱的抗菌活性,如人防御素-5 (HD-5) 在输卵管组织表达,且受激素和炎症因子的调节^[12],人 α -防御素-1 (HBD-1) 存在于女性输卵管组织内,有助于该组织的宿主防御^[13]。本研究结果显示,雌性绵羊输卵管组织表达 α -defensin,一定浓度的孕酮对于 α -defensin 表达有促进作用,而且孕酮浓度不同,对 α -defensin 表达的影响程度也不同,其中添加 10^{-8} mol/L 和 10^{-9} mol/L 孕酮对 α -defensin 表达影响最大;其次 10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L 组处于同一水平,促进防御素表达的力度低于 10^{-8} mol/L 和 10^{-9} mol/L 孕酮组; 10^{-10} mol/L 孕酮对防御素表达无影响。根据结果推断,孕酮促进 α -defensin 的表达以影响感染和调节自身免疫,这与 Srivastava 等认为孕酮通过作用于抗菌肽等影响感染和自身免疫一致^[14]。

输卵管是孕激素的靶器官,其形态结构与功能活动均受性激素的调节。孕激素通过与靶器官上的相应受体结合后发挥作用,而相应受体受孕激素浓度等影响因素调节^[15]。米非司酮是快诺酮衍生物,是目前在体内应用最广泛

的抗孕激素药物,与孕酮受体、糖皮质激素受体有很强的亲和力,它能取代体内孕酮与孕酮受体相结合,抑制孕酮的活性^[16]。本实验添加米非司酮后发现,米非司酮降低了由孕酮诱导升高的 α -defensin的相对表达量,说明米非司酮的存在阻断了孕酮与孕酮受体的结合,进而阻断了孕酮刺激诱导防御素生成的途径。结果表明,孕酮通过与孕酮受体结合促进 α -defensin mRNA的表达。根据孕酮与受体结合发挥作用的机理推断,适宜的孕酮浓度如 10^{-8} 和 10^{-9} mol/L可以启动一些相关基因的表达,增加孕酮受体的量,进而增加 α -defensin的表达量。 10^{-10} mol/L孕酮虽然对 α -defensin表达有增加趋势,但是并不产生差异显著性影响,推断此浓度较低,不能启动 α -defensin的表达。因此推论,孕酮是防御素表达的相关因素之一。

因此认为,生理状态下雌性动物生殖道孕酮的分泌同时影响着防御素的分泌,为生殖道这个特殊场所在不同生理周期以及妊娠期都提供了很好的防御和免疫屏障。

参 考 文 献

- [1] Boman H G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**(3) : 61 ~ 92.
- [2] Ganz T, Lehrer R I. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol*, 199, **34**(4) : 343 ~ 354.
- [3] Thouzeau C, Maho Y L, Froget G, et al. Spheniscins : avian α -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus*. *Biol Chem*, 2003, **278**(51) : 51 053 ~ 51 058.
- [4] Leher R I, Lichtenstein A K, Ganz T. Defensins : antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol*, 1993, **11**(8) : 105 ~ 128.
- [5] Bals R, Mitchell J. M β use α -defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun*, **66**(3) : 1 225 ~ 1 232.
- [6] Pardue M L, Gall J G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the cytological preparation. *PNAS*, 1969, **64** : 600 ~ 604.
- [7] Quayle A J, Porter E M, Nussbaum A A, et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 1998, **152**(5) : 1 247 ~ 1 258.
- [8] 赵伟,王公金,徐晓波.波尔山羊发情周期和妊娠期外周血浆中孕酮、雌二醇和睾酮的浓度变化. *江苏农业科学*, 2004, **20**(3) : 60 ~ 62.
- [9] Schmittgen T D, Zakrajsek B A, Mills A G, et al. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, 2000, **285**(2) : 194 ~ 204.
- [10] 张驰宇,张高红,杨敏等.四步法消除 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 中引物二聚体的影响. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20**(3) : 445 ~ 448.
- [11] 陈英剑,胡成进,赵苗青. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 技术平台的建立. *实用医药杂志*, 2004, **21**(11) : 256 ~ 258.
- [12] Quayle A J, Porter E M, Nussbaum A A, et al. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract. *Am J Pathol*, 1998, **152**(5) : 1 247 ~ 1 258.
- [13] Valore E V, Park C H, Quayle A J, et al. Human beta-defensin 1 : an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*, 1998, **101**(8) : 1 633 ~ 1 642.
- [14] Srivastava M D, Thomas A, Srivastava B I, et al. Expression and modulation of progesterone induced blocking factor (PIBF) and innate immune factors in human leukemia cell lines by progesterone and mifepristone. *Leuk Lymphoma*, 2007, **48**(8) : 1 610 ~ 1 617.
- [15] McKenna N J, Lanz R B, O Malley B W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews*, 1999, **20**(3) : 321 ~ 344.
- [16] King A E, Fleming D C, Critchley H O, et al. Expression is altered as a result of hormonal contraceptive use and this may contribute to differential infection rates in COCP users relative to non-users. *J Reprod Immunol*, 2003, **59**(1) : 1 ~ 16.