

论著·基础研究

重组脂联素对自然流产模型小鼠妊娠结局的影响

李维宏, 漆洪波

重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016

[摘要] **目的**·探讨重组脂联素对自然流产 (spontaneous abortion, SA) 模型小鼠妊娠结局及 Th17/调节性 T 细胞 (Treg) 平衡的影响。**方法**·将 CBA/J 雌鼠与 DBA/2 雄鼠交配建立 SA 模型, CBA/J 雌鼠与 BALB/c 雄鼠交配建立正常妊娠模型, 于妊娠第 5 日起脂联素组连续腹腔注射重组脂联素 $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d}) \times 9 \text{ d}$, 对照组注射等量 PBS。于妊娠第 14 日处死孕鼠, 计算胚胎吸收率; ELISA 检测血清脂联素、白细胞介素 17 (IL-17) 和转化生长因子 β (TGF- β); 分离脾脏淋巴细胞, 流式细胞术检测 Th17/Treg 细胞分群。**结果**·重组脂联素对正常妊娠模型小鼠胚胎吸收率无明显影响, 但可使 SA 模型小鼠胚胎吸收率由 32.2% 降至 13.3% ($P=0.039$); ELISA 结果显示, SA 模型小鼠腹腔注射脂联素后血清脂联素水平显著升高, IL-17 水平降低, TGF- β 水平升高 (均 $P<0.01$); 流式细胞术结果显示, 脂联素可降低 SA 模型小鼠 Th17/CD4⁺ T 细胞比例, 升高 Treg/CD4⁺ T 细胞比例, 逆转 Th17/Treg 比值。**结论**·在孕早期腹腔注射重组脂联素可改善 SA 模型孕鼠的妊娠结局, 可能与其对 Th17/Treg 平衡的调控有关。

[关键词] 脂联素; 妊娠; 自然流产模型; 小鼠; Th17; 调节性 T 细胞

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.02.005 **[中图分类号]** R714.21 **[文献标志码]** A

Effect of recombinant adiponectin on pregnancy outcome in spontaneous abortion model mice

LI Wei-hong, QI Hong-bo

Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of recombinant adiponectin on the pregnancy outcome and the balance of Th17/regulatory T cell (Treg) in spontaneous abortion murine model. **Methods**·CBA/J(♀)×DBA/2(♂) mating was used as a spontaneous abortion model, while CBA/J(♀)×BALB/c(♂) mating as a normal pregnancy model. CBA/J female mice were intraperitoneal injected with $10 \mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ recombinant adiponectin for 9 d from day 5 of gestation. The control group received equal volumes of PBS each day. On day 14 of gestation, the mice were killed. The embryo resorption rate was calculated. The levels of serum adiponectin, IL-17 and TGF- β were detected by ELISA. Spleen lymphocytes were isolated. The ratios of Th17/Treg were counted by flow cytometry(FCM). **Results**·Recombinant adiponectin administration had no obvious effect on the embryo resorption rate of the normal pregnancy model, while it significantly reduced the embryo resorption rate from 32.2% to 13.3% ($P=0.039$) of the spontaneous abortion model. ELISA showed that recombinant adiponectin increased the serum adiponectin and TGF- β levels, and reduced the IL-17 level of the spontaneous abortion model ($P<0.01$). FCM showed that adiponectin administration could reduce the ratio of Th17/CD4⁺ T cells, increase the ratio of Treg/CD4⁺ T cells and reverse the ratio of Th17/Treg in abortion mice. **Conclusion**·Intraperitoneal administration of recombinant adiponectin in early gestation can improve pregnancy outcome in a murine model of abortion maybe through regulating the balance of Th17/Treg.

[Key words] adiponectin; gestation; spontaneous abortion model; mouse; Th17; regulatory T cell

成功妊娠的建立依赖母胎之间正常的免疫耐受。妊娠存在复杂精细的免疫调节, 其中有多种免疫细胞和细胞因子参与。Th17 细胞和 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 是 2 类重要的免疫细胞。近年来研究^[1]发现, Th17/Treg 失衡与不明原因复发性流产 (unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA) 关系密切。脂联素 (adiponectin) 作为重要的脂肪因子, 参与

整个妊娠过程, 其不仅在孕期能量代谢中担任重要的角色, 也与多种妊娠并发症如妊娠糖尿病、先兆子痫的发生密切相关^[2-3]。研究^[4]发现, 在试管婴儿反复胚胎种植失败者中存在子宫内膜脂联素受体表达下降, 提示脂联素信号缺乏可能导致反复妊娠丢失。本课题组前期研究^[5]也证实, 脂联素体外处理可改善 URSA 患者外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的 Th17/

[基金项目] 国家自然科学基金 (81501335); 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目 (2017MSXM015) (National Natural Science Foundation of China, 81501335; Medical Scientific Research Project of Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission, 2017MSXM015)。

[作者简介] 李维宏 (1977—), 女, 副主任医师, 博士; 电子信箱: liweihong_1211@yahoo.com。

[通信作者] 同上。



Treg 失衡;但在体实验中,脂联素给药是否会对流产模型动物的妊娠结局和 Th17/Treg 免疫细胞失衡造成影响,尚未见文献报道。本研究拟通过在体实验观察脂联素对流产模型小鼠妊娠结局和 Th17/Treg 细胞分群的影响,探讨在 URSA 的发生中脂联素与 Th17/Treg 平衡的关系,为 URSA 发病机制及防治措施的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 CBA/J 雌鼠 (6 ~ 8 周龄)、DBA/2 和 BALB/c 雄鼠 (8 ~ 10 周龄),平均体质量约 25 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。实验动物生产许可证编号为 SCXK (京) 2014-0004,使用许可证编号为 SYXK (渝) 2012-0012。本研究课题已通过重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审核。

1.1.2 主要试剂和仪器 脂联素重组蛋白购自武汉优尔生商贸有限公司;EZ-Sep™ 1×小鼠淋巴细胞分离液购自深圳达科为生物技术有限公司;小鼠脂联素、白细胞介素 (IL-17)、转化生长因子 β (TGF- β) ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司;兔抗鼠 FITC-IL-17A、PE-Cy7-CD4、FITC-CD25、PE-FoxP3 流式抗体及相应同型对照抗体购自美国 eBioscience 公司;佛波酯 (PMA)、布雷菲德菌素 A (BFA) 和伊诺霉素 (ionomycin) 购自美国 Sigma 公司。Multiskan Spectrum 全波长酶标仪为美国 Thermo 公司产品,FACS Calibur 型流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 小鼠模型及给药方式 将雌性 CBA/J 小鼠分别与雄性 DBA/2 或 BALB/c 小鼠合笼交配,分别建立自然流产 (spontaneous abortion, SA) 模型 (CBA/J×DBA/2, 16 只) 与正常妊娠模型 (CBA/J×BALB/c, 16 只),于合笼后次日清晨观察阴栓,如发现阴栓则计为妊娠第 0 日,并将雌鼠隔离饲养。将 2 种模型的小鼠分别随机分为脂联素组和磷酸盐缓冲液 (PBS) 组,每组 8 只。于妊娠第 5 日 (种植窗期) 开始分别给 2 种模型的脂联素组 CBA/J 孕鼠连续腹腔注射重组脂联素 $10\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})\times 9\text{d}$,PBS 组注射等量 PBS。

1.2.2 胚胎吸收率的计算 于妊娠第 14 日将 CBA/J 孕鼠以颈椎离断术处死,置于 75% 乙醇中浸泡消毒 3 min。在超净台内无菌状态下打开腹腔,沿子宫壁纵向切开子宫,分离胚胎、胎盘和蜕膜组织,观察胚胎大小及出血、坏死

和吸收情况,并和正常胚胎进行比较。计数吸收胚胎数和存活胚胎数,胚胎吸收率计算公式:胚胎吸收率 = 吸收胚胎数 / (吸收胚胎数 + 存活胚胎数) $\times 100\%$ 。

1.2.3 ELISA 检测孕鼠血清脂联素、IL-17 和 TGF- β 水平 CBA/J 孕鼠处死前眼眶静脉取血,收集于 1.5 mL 无菌 EP 管内, $2419\times g$ 离心 10 min 分离血清,按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测各组孕鼠血清中脂联素、Th17 细胞因子 IL-17、Treg 细胞因子 TGF- β 水平。

1.2.4 流式细胞术检测脾脏淋巴细胞中 Th17、Treg 的比例 无菌操作分离上述 CBA/J 孕鼠脾脏,筛网研磨,按说明书操作步骤分离获得小鼠脾脏淋巴细胞,并调整细胞悬液浓度为 $1\times 10^7/\text{mL}$ 。参照本实验室前期研究方法^[6]:取 200 μL 细胞悬液加入 48 孔细胞培养板内,首先加入 PMA、BFA 和伊诺霉素 (终浓度分别为 0.05 ng/L、10 ng/L 和 1 $\mu\text{mol/L}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 h, PBS 洗涤后,再加入 PE-Cy7-CD4 单克隆抗体 10 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 洗涤、固定、破膜后,再加入 FITC-IL-17A 单克隆抗体 10 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 洗涤、重悬后样品置流式细胞仪检测 CD4⁺IL-17A⁺ 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例;同法,取各组小鼠脾脏淋巴细胞悬液 200 μL , 先加入 PE-Cy7-CD4、FITC-CD25 单克隆抗体各 10 μL , 混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 洗涤、固定、破膜后加入 PE-FoxP3 单克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 20 min, 反复洗涤后重悬,流式细胞仪检测 CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 细胞占 CD4⁺ T 淋巴细胞的比例。阴性对照采用相应荧光标记的同型对照 IgG₁ 染色细胞进行。

1.3 统计学分析

全部数据分析使用 SPSS 19.0 软件进行。组间胚胎吸收率的差异采用 χ^2 检验。细胞因子水平和细胞分群数据如果符合正态分布,则用 t 检验分析 2 组间差异;如果不符合正态分布,则使用 Mann-Whitney 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组脂联素对不同妊娠模型小鼠胚胎吸收率的影响

正常妊娠模型 + PBS 组小鼠胚胎吸收率为 12.9%,重组脂联素处理对正常妊娠小鼠胚胎吸收率无影响;SA 模型 + PBS 组小鼠胚胎吸收率为 32.2%,与正常妊娠模型 + PBS 组比较显著升高 ($P=0.018$),提示 SA 模型建立成功;而 SA 模型 + 脂联素组小鼠胚胎吸收率显著低于 SA 模型 + PBS 组 ($P=0.039$) (表 1)。

表 1 重组脂联素对小鼠妊娠结局的影响 (N=8)
Tab 1 Effect of recombinant adiponectin on pregnancy outcome of mice (N=8)

组别	存活胚胎数 /n	吸收胚胎数 /n	胚胎吸收率 /%	χ^2 值	P 值
正常妊娠模型 +PBS 组	54	8	12.9		
正常妊娠模型 + 脂联素组	55	6	9.8	0.063	0.801 ^①
SA 模型 +PBS 组	40	19	32.2	5.550	0.018 ^②
SA 模型 + 脂联素组	52	8	13.3	4.231	0.039 ^②

注: ^①与正常妊娠模型 +PBS 组比较, ^②与 SA 模型 +PBS 组比较。

2.2 重组脂联素对不同妊娠模型小鼠血清脂联素、IL-17、TGF-β 及 IL-17/TGF-β 的影响

在正常妊娠模型中, 重组脂联素可小幅升高小鼠血清

脂联素水平 (升高 0.27 倍); 而在 SA 模型中, 注射 PBS 小鼠的脂联素水平较正常妊娠模型显著降低 ($P=0.000$), 而注射重组脂联素后, 小鼠血清脂联素水平较 SA 模型 +PBS 组升高 2.55 倍 ($P=0.000$)。SA 模型 +PBS 组小鼠血清 IL-17 水平显著高于正常妊娠模型 +PBS 组小鼠, TGF-β 水平则显著降低 (均 $P=0.000$); 脂联素对正常妊娠模型小鼠血清 IL-17 和 TGF-β 水平无明显影响, 但可显著降低 SA 模型小鼠血清 IL-17 水平, 并升高其血清 TGF-β 水平 (均 $P<0.01$)。在正常妊娠模型中, 重组脂联素不能改变 IL-17/TGF-β 比值; 而在 SA 模型中, 脂联素组的 IL-17/TGF-β 比值显著低于 PBS 组 ($P=0.001$) (表 2)。

表 2 重组脂联素对孕鼠血清脂联素及细胞因子的影响 (N=8)
Tab 2 Effect of recombinant adiponectin on serum adiponectin and cytokine production in pregnant mice (N=8)

组别	脂联素 / (ng/mL)	P 值	IL-17/ (pg/mL)	P 值	TGF-β/ (pg/mL)	P 值	IL-17/TGF-β	P 值
正常妊娠模型 +PBS 组	12.83 ± 0.60		33.59 ± 2.52		72.38 ± 2.13		0.46 ± 0.12	
正常妊娠模型 + 脂联素组	16.31 ± 0.58	0.011 ^①	35.38 ± 3.16	0.362 ^②	75.14 ± 5.37	0.190 ^③	0.47 ± 0.11	0.807 ^④
SA 模型 +PBS 组	3.35 ± 0.24	0.000 ^①	137.52 ± 11.33	0.000 ^②	32.29 ± 5.46	0.000 ^③	4.26 ± 0.06	0.000 ^④
SA 模型 + 脂联素组	11.89 ± 1.03	0.000 ^②	48.18 ± 6.74	0.000 ^③	68.26 ± 7.32	0.001 ^④	0.71 ± 0.26	0.001 ^⑤

注: ^①与正常妊娠模型 +PBS 组比较, ^②与 SA 模型 +PBS 组比较。

2.3 重组脂联素对不同妊娠模型小鼠脾脏淋巴细胞中 Th17、Treg 细胞分群的影响

SA 模型 +PBS 组与正常妊娠模型 +PBS 组比较, Th17 在 CD4⁺ T 细胞中所占的比例显著升高, 而 Treg 在 CD4⁺ T 细胞中所占的比例则显著降低, Th17/Treg 比值显著升

高 (均 $P<0.01$)。重组脂联素对正常妊娠模型小鼠 Th17 和 Treg 在 CD4⁺ T 细胞中的比例, 及 Th17/Treg 比值无显著影响; 而重组脂联素可显著降低 SA 模型小鼠的 Th17 在 CD4⁺ T 细胞中所占的比例, 升高 Treg 在 CD4⁺ T 细胞中所占的比例, Th17/Treg 比值亦显著降低 (均 $P<0.01$) (表 3)。

表 3 重组脂联素对孕鼠脾脏淋巴细胞 Th17 和 Treg 细胞分群的影响 (N=8)
Tab 3 Effect of recombinant adiponectin on Th17 and Treg populations of spleen lymphocytes in pregnant mice (N=8)

组别	Th17/CD4 ⁺ T 细胞	P 值	Treg/CD4 ⁺ T 细胞	P 值	Th17/Treg	P 值
正常妊娠模型 +PBS 组	1.75 ± 0.74		6.62 ± 1.49		0.26 ± 0.10	
正常妊娠模型 + 脂联素组	1.82 ± 0.93	0.233 ^①	6.81 ± 0.94	0.318 ^②	0.27 ± 0.14	0.948 ^③
SA 模型 +PBS 组	5.68 ± 1.26	0.000 ^④	3.83 ± 0.37	0.000 ^⑤	1.48 ± 0.33	0.000 ^⑥
SA 模型 + 脂联素组	2.02 ± 0.85	0.001 ^⑦	6.28 ± 1.03	0.000 ^⑧	0.32 ± 0.26	0.001 ^⑨

注: ^①与正常妊娠模型 +PBS 组比较, ^②与 SA 模型 +PBS 组比较。

3 讨论

妊娠类似于一种同种半异体移植, 成功妊娠的建立和维持依赖于母体对胎儿的正常免疫耐受, 这种耐受过程一旦被打破, 容易发生 URSA。母胎之间这种复杂的耐受和排斥机制, 一直是生殖领域的难点。不同研究者曾提出用各种方法治疗 URSA, 如静脉注射免疫球蛋白、利用丈夫或第三方的淋巴细胞进行淋巴细胞免疫治疗、激素治疗

等, 但治疗效果和安全性说法不一; 故进一步探讨妊娠丢失中免疫耐受失败的机制, 寻找有效的治疗方案具有重要的意义。

脂联素是脂肪细胞分泌的一类激素蛋白, 它不仅与 2 型糖尿病和冠状动脉粥样硬化性心脏病的发展有关, 而且在免疫和炎症反应中发挥重要的负调控作用, 其机制可能涉及对机体免疫细胞和免疫分子表达的影响^[7]。研究^[8]发现, 脂联素通过调节 Th1、Th2 以及 Th17 细胞亚群的分

化平衡, 在多发性硬化等炎症疾病发生过程中扮演重要角色。我们的前期研究^[5]发现, URSA 患者的血清脂联素水平显著低于正常妊娠者, URSA 患者的 Th17/Treg 比值失衡, 提示脂联素水平、Th17/Treg 细胞分群与妊娠结局关系密切。而体外脂联素处理可增加 URSA 患者外周血 PBMC 中 Treg 比例, 显著降低 Th17 比例, 使 Th17/Treg 接近正常妊娠者的水平, 由此可见在妊娠过程中脂联素可能对 Th17/Treg 平衡产生影响。故我们推测在体内脂联素对母胎免疫可能具有调节作用。

CBA/J×DBA/2 作为经典的反复自然流产动物模型, 其反复自然流产的机制可能与孕鼠对胚胎的雄性抗原识别异常, 从而产生异常的免疫应答有关^[9]。我们的实验结果显示, SA 模型小鼠胚胎吸收率较正常妊娠模型小鼠的胚胎吸收率明显增加, 结果与本实验室既往报道^[6]及国外学者报道^[10]相符。而 SA 模型孕鼠经连续腹腔注射脂联素 9 d 后, 胚胎吸收率明显降低, 与免疫抑制剂环孢素 A (CsA) 比较, 对 SA 模型孕鼠妊娠结局的保护作用相近^[11]。以上结果提示脂联素可以降低 SA 模型小鼠的胚胎吸收率, 减少自然流产的发生。

Treg 是一类重要的免疫抑制细胞, 促进母胎耐受, 维

持正常妊娠^[12]。而 Th17 细胞具有很强的促炎症作用, 参与多种自身免疫性疾病的发生和发展^[13], 在自然流产的发生中也起到了促进作用^[14]。Th17/Treg 平衡一直是生殖免疫耐受研究的热点。为了进一步阐明脂联素对 SA 模型小鼠妊娠结局的保护机制, 本研究用流式细胞术检测了在体情况下重组脂联素对 CBA/J 孕鼠脾脏淋巴细胞中 Th17/Treg 分群的影响, 与体外结果^[5]相似, 重组脂联素治疗后 SA 模型孕鼠脾脏 Treg 在 CD4⁺ T 细胞中所占的比例明显升高, Th17 所占的比例明显降低。同时, 腹腔注射脂联素后 SA 模型小鼠血清脂联素和 TGF-β 水平升高, IL-17 水平和 IL-17/TGF-β 比值降低。故推测围着床期注射重组脂联素可能是通过抑制围着床期脾脏淋巴细胞的 Th17 生成, 促进 Treg 生成, 并诱导母体对父系抗原的特异性免疫耐受, 从而改善 SA 模型小鼠的妊娠结局。

综上所述, SA 模型小鼠体内存在脂联素的缺乏和 Th17/Treg 细胞失衡, 脂联素水平与妊娠结局有关。本实验显示重组脂联素治疗可改善 SA 模型小鼠的妊娠结局, 该作用可能与纠正 Th17/Treg 细胞失衡及相关细胞因子有关。但脂联素调控 Th17/Treg 细胞平衡的具体途径如何, 及脂联素对 URSA 患者是否有保护作用, 仍需进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Zhu L, Chen H, Liu M, et al. Treg/Th17 cell imbalance and IL-6 profile in patients with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Reprod Sci, 2017, 24(6): 882-890.
- [2] Sir-Petermann T, Echiburú B, Maliqueo MM, et al. Serum adiponectin and lipid concentrations in pregnant women with polycystic ovary syndrome[J]. Hum Reprod, 2007, 22(7): 1830-1836.
- [3] Ouyang Y, Chen H, Chen H. Reduced plasma adiponectin and elevated leptin in pre-eclampsia[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2007, 98(2): 110-114.
- [4] Dos Santos E, Serazin V, Morvan C, et al. Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation[J]. Fertil Steril, 2012, 97(3): 771-778.
- [5] 李维宏, 牟晓玲. 脂联素对不明原因复发性流产患者外周血 Th17/Treg 细胞分群及细胞因子水平的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2015, 35(7): 1004-1009.
- [6] Li W, Li B, Fan W, et al. CTLA4Ig gene transfer alleviates abortion in mice by expanding CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and inducing indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. J Reprod Immunol, 2009, 80(1/2): 1-11.
- [7] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(10): 772-783.
- [8] Piccio L, Cantoni C, Henderson JG, et al. Lack of adiponectin leads to increased lymphocyte activation and increased disease severity in a mouse model of multiple sclerosis[J]. Eur J Immunol, 2013, 43(8): 2089-2100.
- [9] Tangri S, Raghupathy R. Expression of cytokines in placentas of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions[J]. Biol Reprod, 1993, 49(4): 850-856.
- [10] Clark DA, Chaouat G, Arck PC, et al. Cutting edge: cytokine-dependent abortion in CBA×DBA/2 mice is mediated by the procoagulant fgl2 prothrombinase[J]. J Immunol, 1998, 160(2): 545-549.
- [11] 闫凤亭, 杜美蓉, 李大金, 等. 环孢素 A 诱导妊娠失败模型孕鼠外周血 - 胎免疫耐受[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006, 26(2): 105-109.
- [12] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, et al. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases[J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(5): 347-353.
- [13] Wu L, Li J, Xu HL, et al. IL-7/IL-7R signaling pathway might play a role in recurrent pregnancy losses by increasing inflammatory Th17 cells and decreasing Treg cells[J]. Am J Reprod Immunol, 2016, 76(6): 454-464.
- [14] Lluís A, Ballenberger N, Illi S, et al. Regulation of TH17 markers early in life through maternal farm exposure[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 133(3): 864-871.

[收稿日期] 2017-12-14

[本文编辑] 瞿麟平

