

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)09-0801-03

## 胰岛素样生长因子对早期胚胎发育的保护作用

张米娜<sup>1</sup>, 于月成<sup>2</sup>, 黄侃<sup>2</sup>, 宋晖<sup>2</sup>, 张红菊<sup>2</sup>, 王晓红<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 解放军第17医院, 新疆库车 842000; <sup>2</sup> 第四军医大学西京医院妇产科, 陕西西安 710033 )

### Protective effect of insulin-like growth factors on early pregnancy

ZHANG Mi-Na<sup>1</sup>, YU Yue-Cheng<sup>2</sup>, HUANG Kan<sup>2</sup>, SONG Hui<sup>2</sup>, ZHANG Hong-Ju<sup>2</sup>, WANG Xiao-Hong<sup>2</sup><sup>1</sup>PLA 17 Hospital, Kuche 842000, China, <sup>2</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To detect the expressions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in villus and IGF-II in decidua and the levels in mother serum, and to explore their relationship with the embryogenesis of early pregnancy. **METHODS:** Expressions of IGF-I and IGF-II were examined by immunohistochemical SP method; the mRNA expressions of IGF-I and IGF-II were detected by *in situ* hybridization (ISH); serum IGF-I and IGF-II levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **RESULTS:** The expressions of IGF-I and IGF-II both protein and mRNA were lower in the abnormal villus and decidua of pregnancy termination than those of normal villus and decidua of normal pregnancy ( $P < 0.01$ ). Serum levels of IGF-I and IGF-II in normal pregnancy women were much higher than those of abnormal pregnancy women ( $P < 0.01$ ). **CONCLUSION:** IGF-I and IGF-II may play important roles in the regulation of fetal growth, the decrease of IGF-I and IGF-II levels in villus, decidua and serum may be the key factor contributing to the embryogenesis termination of early pregnancy. So IGF-I and IGF-II can serve as 2 parameters in examining the fetal safety.

**【Keywords】** insulin-like growth factor I; insulin-like growth factor II; early pregnancy; villus termination; deciduas

**【摘要】**目的 探讨胰岛素样生长因子-I和II(IGF-I和-II)在正常胚胎发育及早期胚胎发育终止绒毛及蜕膜组织中的表达及其在母体血中水平的改变与胚胎发育的关系。方法:分别采用免疫组织化学SP法和原位杂交法检测正常胚胎发育绒毛及早期胚胎发育终止绒毛中IGF-I和蜕膜中IGF-II蛋白的表达以及IGF-I mRNA和蜕膜中IGF-II mRNA的表达。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测正常妊娠及早期胚胎发育终

止孕妇血中IGF-I和II水平的变化。结果:免疫组化结果显示,正常妊娠绒毛中IGF-I和蜕膜中IGF-II的表达明显高于胚胎发育终止组( $P < 0.01$ )。原位杂交结果显示,正常妊娠组绒毛中IGF-I和蜕膜中IGF-II mRNA的表达明显高于胚胎发育终止组( $P < 0.01$ )。正常妊娠组母血中IGF-I和II水平显著高于胚胎发育终止组( $P < 0.01$ )。结论:IGF-I和II在绒毛组织中的表达及母血中的水平的升高对早期胚胎发育有重要的保护作用,其含量的减少可能是导致胚胎死亡的重要原因之一。IGF-I和II可能成为预测胎儿安危的指标之一。

**【关键词】** 胰岛素样生长因子 I; 胰岛素样生长因子 II; 早孕; 绒毛 蜕膜

**【中图分类号】** R714.2 **【文献标识码】** A

## 0 引言

近年来已有大量研究表明胚胎在宫内的生长发育是一个多因素调节的过程。Guidice等<sup>[1]</sup>证实胰岛素样生长因子-I(IGF-I)具有调节胎儿生长发育的作用,但是有关具体作用途径和作用机制尚不清,而子宫内中胰岛素样生长因子-II(IGF-II)的含量随月经周期而改变,并与卵巢激素的作用密切相关<sup>[2-3]</sup>,因此,推测IGFs在早期胚胎发育过程中可能起着重要作用。我们通过检测正常胚胎发育孕妇及胚胎发育终止孕妇血中的IGF-I水平和绒毛中的IGF-I及蜕膜中IGF-II表达的变化,探讨IGF-I和IGF-II对早期胚胎发育的保护作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 选取2003-09/2004-10西京医院妇产科门诊48例经B超证实胚胎发育终止而行清宫术者的绒毛组织和蜕膜组织为实验组,56例因避孕失败而实施人工流产的绒毛组织和蜕膜组织为对照组。两者妊娠天数均小于84 d。入选对象均为健康女性,年龄(24±2.8)岁。兔抗人IGF-I和II多克隆抗体及通用型超敏SP试剂盒(北京百灵克试剂公司),IGF-I和II检测试剂盒(DSL公司),IGF-I和II原位杂交试剂盒(武汉博士德试剂公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 母血中IGF-I和IGF-II含量的检测** 术前均空腹抽取静脉血3 mL,不抗凝,离心后取血清,

收稿日期 2005-11-21; 接受日期 2006-01-10

作者简介 张米娜,住院医师。Tel (029)81927099

-20℃ 冷冻冰箱保存。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定, 操作方法严格按照试剂盒说明进行。反应终止后在 EL312e 型酶标仪测吸光度值, 每份标本均测双份, 取平均值, 根据标准曲线算出 IGF-I 和 II 含量。

1.2.2 绒毛组织中 IGF-I 和蜕膜组织中 IGF-II 的表达 采用免疫组织化学 SP 染色法检测。将绒毛组织和蜕膜组织经 40 g/L 多聚甲醛固定后, 常规制作 4 μm 石蜡切片, 一抗为兔抗人 IGF-I 和 II 抗体 (1:100), 二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 以 DAB 显色。具体步骤按说明书进行。对照设置: 免疫组化染色中分别以已知 IGF-I 阳性的肝癌和 IGF-II 阳性的乳腺癌作为阳性对照, 用 PBS 代替一抗作为阴性对照。检测结果的判定: 以胞质中出现黄色和棕黄色颗粒为阳性信号。

1.2.3 绒毛组织中 IGF-I mRNA 和蜕膜组织中 IGF-II mRNA 水平的表达 采用原位杂交法检测。将石蜡切片常规脱蜡至水, 加 30 mL/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 10 min, 用 DEPC 水洗 2 × 5 min。加胃蛋白酶于 37℃ 消化 30 min, 以 0.5 mol/L PBS 洗 3 × 5 min, 于 40℃ 预杂交 3 h。用滤纸吸去预杂交液, 然后杂交过夜, 最后用 DAB 显色。IGF-I 和 II mRNA 探针为地高辛标记的原位杂交液, 一抗为 HRP 标记的鼠抗地高辛 IgG。对照设置: 以试剂盒内配置的阳性切片 (肝癌) 作为阳性对照, 以不加含有标记探针的原位杂交液作为阴性对照。检测结果的判定: 以胞浆中出现黄色和棕黄色颗粒为阳性信号。

1.2.4 图像分析 用 MIAS-300 型图像分析仪, 输入装置为 Olympus BH-2 显微镜和台湾产 MTV-180 型 CCD 摄像头, 显微放大倍数 400 倍, 普通光源照明。将免疫组化染色和原位杂交染色切片显微镜下观察视野输入图像分析仪的高分辨图像监视器上, 对阳性产物相对含量进行测定。在光镜下 (×100) 每例随机取样测 5 个蜕膜断面, 10 个单位面积, 每组共测 50 个单位面积, 计算每个单位面积阳性产物的相对含量。取其平均值代表该切片阳性物质的相对含量。

统计学处理: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件, 组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 表示有统计学意义。

## 2 结果

2.1 母血中 IGF-I 和 IGF-II 的含量 ELISA 检测结果表明, 对照组 (正常妊娠) 母血中 IGF-I 含量为 (194 ± 145) μg/L, IGF-II 含量为 (184 ± 15) μg/L, 而实验组母血中 IGF-I 含量为 (125 ± 13) μg/L, IGF-II

含量为 (125 ± 13) μg/L; 二者之间差异显著 (*P* < 0.01)。

2.2 绒毛组织中 IGF-I 和蜕膜组织中 IGF-II 的表达 免疫组化检测结果表明, IGF-I 在对照组的绒毛组织中的表达以阳性及强阳性为主, 而在实验组中的表现阴性和弱阳性为主。IGF-II 在对照组中的表达以阳性和强阳性为主, 而在实验中的表达则以阴性和弱阳性为主。两组之间差异显著 (*P* < 0.01, 表 1, 图 1)。

表 1 绒毛组织中 IGF-I, IGF-I mRNA 和蜕膜组织中 IGF-II, IGF-II mRNA 的表达 (相对含量/单位面积)

组别	IGF-I	IGF-II	IGF-I mRNA	IGF-II mRNA
对照	0.196 ± 0.0073	0.201 ± 0.0081	0.214 ± 0.0146	0.313 ± 0.0164
实验	0.043 ± 0.0035 <sup>b</sup>	0.039 ± 0.0029 <sup>b</sup>	0.054 ± 0.0076 <sup>b</sup>	0.043 ± 0.0096 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 对照。

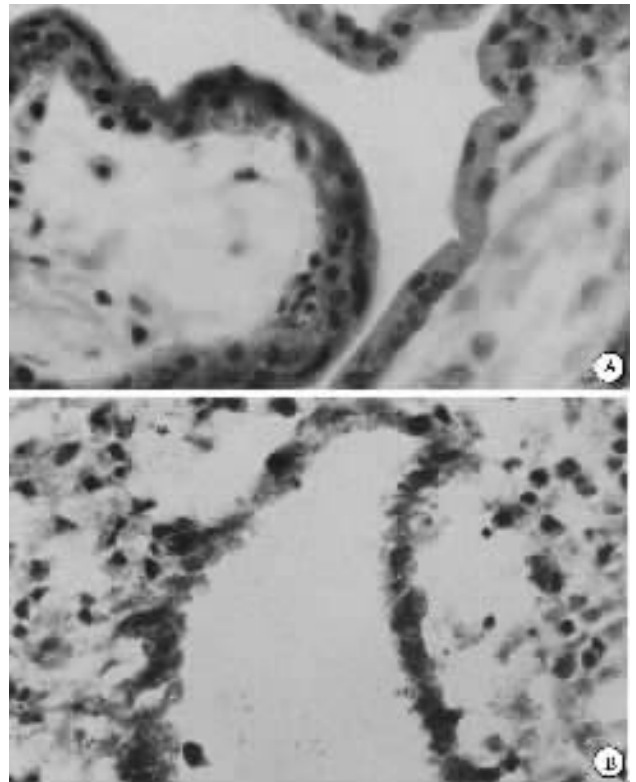


图 1 绒毛组织 IGF-I (A) 和蜕膜组织 IGF-II (B) 的阳性表达 (表达在胞质和胞膜上) SP × 400

2.3 绒毛组织 IGF-I mRNA 和蜕膜组织 IGF-II mRNA 的表达 原位杂交检测结果表明, IGF-I mRNA 在对照组的绒毛中表现为强阳性, 而在实验组中表现为阴性和弱阳性; IGF-II mRNA 在对照组的蜕膜中表现为强阳性, 而在实验组中表达为阴性和弱阳性。IGF-I 和 II mRNA 在对照组的阳性产物含量明显高于实验组 (*P* < 0.01, 表 1, 图 2)。

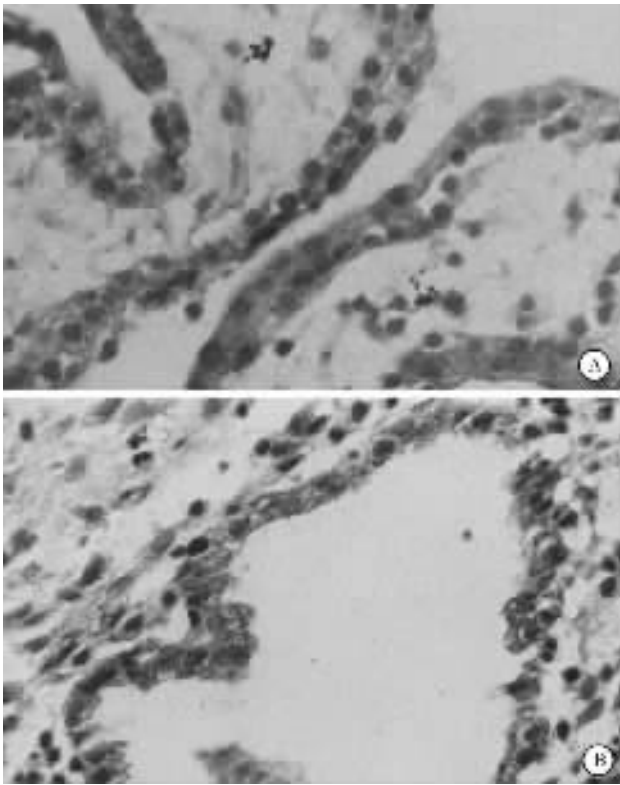


图2 绒毛组织 IGF-I Mrna (A)和蜕膜组织 IGF-II mRNA (B)的阳性表达(表达在胞质和胞膜上) ISH  $\times 400$

### 3 讨论

胚胎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过程中起了重要的调控作用,其中 IGFs 被证明是胎儿生长过程中重要的调节因子<sup>[4]</sup>。IGFs 是 1957 年发现的具有类似胰岛素原代谢活性和结构特征的低分子肽类物质,它是一种具有同化作用的生长因子,能增加葡萄糖和氨基酸的吸收,抑制蛋白质降解,刺激各种细胞的增殖和分化<sup>[5]</sup>。

IGF-I 不仅可直接刺激胎儿的神经系统、骨骼、血液系统和内分泌系统等发育,还可通过改善胎盘功能,调节胎盘血流转运,增加胎盘对营养物质的摄取,从而促进胎儿生长<sup>[6]</sup>。本研究结果表明正常妊娠组 IGF-I 的表达阳性率均明显高于胚胎发育终止组,且母血中 IGF-I 的含量在正常妊娠组也显著高于胚胎发育终止组,说明胚胎发育早期 IGF-I 蛋白保持较高的表达不但与早期胚胎的正常发育密切相关,而且还是维护正常胚胎和胎盘的发育所必需。IGF-II 在细胞滋养层细胞的侵入、分化和胎盘形成过程中以自分泌方式发挥重要作用。在妊娠的前 3 mo,IGF-II 对早期合体滋养层增殖和(或)分化起自分泌调节作用,在孕 6 wk 左右,IGF-II 即随绒毛外合体滋养层渗透和侵入到母体蜕膜,提示 IGF-II 可能在滋养层侵入中发挥调节作用<sup>[7]</sup>。Lpoez 等<sup>[8]</sup>发现缺乏 IGF-II 基因的

裸鼠胎盘海绵体滋养层糖原合成与糖原细胞数量较正常组显著下降,提示 IGF-II 在胎盘中可调控糖原合成及糖原细胞的量,是糖原合成的重要调节器;人类 IGF-II 作用与其相似,如胰岛素一样刺激葡萄糖在胎盘的转运及合成,对胎盘的形成功能有显著影响,从而进一步影响胎儿的生长发育。本研究结果表明正常妊娠组 IGF-II 的表达阳性率均明显高于胚胎发育终止组,且母血中 IGF-II 的含量在正常妊娠组也显著高于胚胎发育终止组,说明胚胎发育早期 IGF-II 蛋白保持较高的表达不但与早期胚胎的正常发育密切相关,而且是早期胚胎发育的重要调节因子之一。

Somi 等<sup>[9]</sup>学者发现整个妊娠期间胎盘组织分泌的 IGF-II 量是 IGF-I 的近 10 倍,而我们的研究与此不一致,IGF-I、IGF-II 分泌量结果相当。提示在维持胎盘生长过程中,IGF-I 和 IGF-II 作用相似。检测血中 IGF-I、IGF-II 的含量可能作为判断胚胎发育状况的一项客观生化指标,不仅可能用于胎儿在宫内发育是否正常的监测,也为应用外源性胰岛素样生长因子治疗流产、早产和胎儿宫内发育迟缓(IUGR)等妊娠疾病提供了理论依据。

### 【参考文献】

- [1] Guidice LC, Irwin JC. Roles of the insulin-like growth factor family in nonpregnant human endometrium and at the decidua: Trophoblast interface [J]. *Semin Reprod Endocrinol*, 1999, 17(1): 13-21.
- [2] Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, et al. Differential expression of messenger ribonucleic acids encoding insulin-like growth factors and their receptors in human uterine endometrium and decidua [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76(5): 1115-1122.
- [3] Gao JG, Zhu HH, Fan J, et al. Progesterone and antiprogesterone differentially regulate the expression of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells [J]. *Biol Reprod*, 1995, 53(2): 355-360.
- [4] Allan GJ, Flint DJ, Patel K. Insulin-like growth factor axis during embryonic development [J]. *Reproduction*, 2001, 122(1): 31-39.
- [5] Stewart CE, Rotwein P. Growth differentiation and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors [J]. *Physiol Rev*, 1996, 76(4): 1005-1026.
- [6] 陈其新,毛鑫智. 胰岛素样生长因子对胚胎生长发育的作用 [J]. *动物医学进展*, 2001, 22(1): 34-37.
- [7] Baker J, Liu JP, Elizabeth EJ, et al. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth [J]. *Cell*, 1993, 75(1): 73-82.
- [8] Lopez MF, Dikkes P, Zurakowski D. Insulin-like growth factor II affects the appearance and glycogen content of glycogen cells in murine placenta [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(5): 2100-2108.
- [9] Schafer-Somi S. Cytokines during early pregnancy of mammals: A review [J]. *Anim Reprod Sci*, 2003, 75(1-2): 73-94.