

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2012.02.012

早孕及稽留流产绒毛组织中 LIF MMP-9 TIMP-1 的表达

朱永宁 李宝来

(山东省肿瘤医院 山东医学科学院, 山东 济南 250117)

摘要 目的 探讨早孕和稽留流产妇女绒毛组织中白血病抑制因子(LIF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶组织抑制物-1(TIMP-1)的表达,分析其与稽留流产的关系及其临床意义。**方法** 应用免疫组织化学 S-P 法,检测早孕和稽留流产行清宫术的妇女各 30 例的绒毛组织中 LIF、MMP-9 及 TIMP-1 的表达。**结果** 1)两组妇女绒毛组织中 LIF 均呈现阳性表达,阳性染色主要位于滋养细胞细胞质中,细胞核无明显着色,稽留流产组与其对照组比较,染色强度及范围显著减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$);2)稽留流产妇女绒毛组织中 MMP-9 表达水平高于对照组($P < 0.05$);3)TIMP-1 的水平无明显差异($P > 0.05$)。**结论** LIF 与 MMP-9 呈负相关。LIF、MMP-9 对妊娠的正常维持有一定的保护作用,LIF 在早孕绒毛组织中的低表达,可能与 MMP-9 水平升高有关,二者失衡是导致稽留流产的原因之一。

关键词 白血病抑制因子;基质金属蛋白酶-9;基质金属蛋白酶组织抑制物-1;早孕、稽留流产;绒毛

中图分类号:R711.7 **文献标志码**:B **文章编号**:1000-9760(2012)04-119-03

越来越多的研究发现白血病抑制因子(LIF)在女性生殖系统中发挥着重要作用^[1],被认为是胚胎植入过程的标志物^[2]。Robertson 等也通过实验得出 LIF 在母胎界面表达的异常可能是导致流产的一个重要原因^[3]。基质金属蛋白酶(MMPs)是一组能水解细胞外间质中多种成分的蛋白酶。MMPs 在体内的主要抑制物是金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs)。MMPs 在生殖过程中参与了多种生物学功能,如月经的产生、胚胎的植入和胎盘形成等。基质金属蛋白酶(MMP-9)可能在胚胎入侵中起主要作用^[4]。小鼠胚胎植入的体外模型研究表明,白血病抑制因子(LIF)可以调节早期胚胎 MMPs 的活性^[5]。LIF 在自然流产的发生中起的作用尚未明确。本研究通过探讨 LIF MMP-9 及 TIMP-1 在绒毛膜中的表达,从病因角度为寻找稽留流产的发病机制提供新的理论依据和思路。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2008 年 7 月至 2009 年 3 月在哈尔滨医科大学附属第一医院计划生育科终止妊娠的早孕妇女 60 例,根据诊断分为正常早孕组、稽留流产组,每组 30 例。两组妇女均自愿采用人工流产术终止妊娠。所有纳入标准对象妇科检查均排除阴道炎症、宫颈炎。超声提示无子宫内息肉,无子宫黏膜下肌瘤,无卵巢囊肿。既往史排除高血压,

滋养细胞疾病,恶性肿瘤,内分泌及免疫性疾病等。孕前 2 个月及孕期末服用药物,未接触毒物及放射线。B 超提示孕囊与停经天数相符,均显示胎囊及胎心搏动,行负压吸宫术的正常早期妊娠妇女的绒毛为对照组。妇科检查宫颈口未开,B 超示所有胎囊大小小于停经天数或与停经天数大致相符,胎囊未见胎心搏动,提示胚胎停育,血液学检查无凝血机制障碍后行负压吸宫术者为稽留流产组。正常早孕组孕妇平均年龄(23.5 ± 4.5)岁,平均孕周(7.2 ± 0.6)周,平均体重指数(22.5 ± 1.6) kg/m^2 ;稽留流产组患者平均年龄(24.6 ± 4.0)岁,平均孕周(9.0 ± 1.5)周,平均体重指数(23.6 ± 2.0) kg/m^2 ,两组妇女年龄、体重指数比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),孕周比较有统计学意义($P < 0.05$)。

1.2 方法

标本来源:两组妇女均于人工流产术时收集绒毛组织,生理盐水冲洗后,即刻置于 10%福尔马林溶液 12~36h 后石蜡包埋(用于免疫组化)。

主要试剂:鼠抗人 LIF(J-14F):sc-80159 多克隆抗体(稀释浓度 1:50)、购自美国 Santa 公司;兔抗人 MMP-9(ZA-0336)多克隆抗体(稀释浓度 1:80)购自北京中杉公司;兔抗人 TIMP-1(RAB-0280)多克隆抗体(稀释浓度 1:80)购自福州迈新公司;PV-9000 及 DAB 购于北京中杉公司。

免疫组化半定量分析:采用链霉菌抗生物素蛋

白-过氧化酶连接(SP)法。阴性对照用磷酸缓冲液(PBS)代替一抗,严格按试剂盒说明书进行操作。在排除非特异性着色情况下,光镜下见细胞内出现棕黄色或(和)浅黄色颗粒为 LIF MMP-9 及 TIMP-1 表达阳性。双盲法阅片。参照 Fromowitz 等^[7]免疫组化综合计分法进行半定量分析,阳性细胞百分比为 5 个高倍镜(1×400)随机视野的阳性细胞百分比平均数;着色强度为多数阳性细胞染色情况计分。见表 1。

表 1 免疫组化综合评分法

评分	定性	阳性细胞百分比		染色强度	
		百分比(%)	计分	强度	计分
0,1	—	0	0	无着色	0
2	+	1~25	1	浅黄色	1
3,4	++	26~49	2	棕黄色	2
≥ 6	+++	≥ 50	3	棕褐色	3

1.3 统计学方法

采用 SAS 9.1 系统软件,组间比较采用秩和检验和 χ^2 检验,不满足卡方检验条件的应用 Fisher 确切概率法。双向有序属性相同列联表资料,分析两个属性是否相关,采用 Spearman 等级相关。检验标准为双侧 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组免疫组化结果

早孕组与稽留流产两组绒毛组织中 LIF、MMP-9 及 TIMP-1 呈阳性表达,且阳性染色主要位于滋养细胞细胞质中,而细胞核无明显着色。

2.2 两组绒毛组织中 LIF、MMP-9、TIMP-1 的表达 见表 2。

表 2 LIF、MMP-9、TIMP-1 在稽留流产与正常早孕组绒毛中的表达

组别	n	MMP-9				TIMP-1				LIF		
		+	++	+++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
稽留流产组	30	2	8	20	1	11	14	4	22	7	1	
早孕组	30	5	18	7	0	12	12	6	9	19	2	
合计	60	7	26	27	1	23	26	11	31	26	3	
P		0.001				0.702				0.001		

1)MMP-9:秩和检验, $P=0.001$,差异具有统计学意义,可以认为两组间的表达有差异。2)TIMP-1:秩和检验, $P=0.702$,差异无统计学意义,尚不能认为两组间的表达有差异。3)LIF:秩和检验, $P=0.001$,差异具有统计学意义,可以认为两组间的表达有差异。

2.3 两组绒毛组织中 LIF、MMP-9 相关性 见表 3。

表 3 LIF 与 MMP-9 相关性

LIF	MMP-9			合计
	+	++	+++	
+	2	9	20	31
++	3	16	7	26
+++	2	1	0	3
合计	7	26	27	60

注:Fisher 确切概率法, $P=0.002$;Spearman 秩相关系数为-0.432, $P=0.001$,LIF 及 MMP-9 在人绒毛中的表达具有较好的相关性,成负相关。

3 讨论

LIF 是白细胞介素(IL)6 家族中的一种细胞因子,随着在人类生殖方面研究的逐渐深入,人们发现 LIF 的作用几乎贯穿于妊娠的全过程。大量研究结果显示,LIF 可以启动胚泡着床和促进胚泡的发育,而且其作用呈时间和剂量依赖关系^[2]。LIF 在着床后胚胎及胎儿的发育、维持正常妊娠中的作用也越来越受到关注。

MMPs 是由 20 余种相关蛋白水解酶组成的多基因家族,有共同的序列和多个结构域,但糖基位点及糖基化程度不同。人早孕滋养细胞能合成 MMPs 和尿激酶纤溶酶原激活物(uPA),用 MMP-9 的特异性抗体能完全抑制细胞滋养细胞的入侵,说明 MMP-9 在人细胞滋养细胞的入侵中具有重要作用。研究显示,滋养层对母体子宫的浸润主要限于子宫内膜和内 1/3 肌层,并且随妊娠的延长,胚胎滋养层的入侵能力减弱,其主要原因在于滋养细胞分泌 MMP-2 和 MMP-9 下降,尤其是 MMP-9^[6]。目前,已知影响 MMPs 合成和分泌的因素很多,其中以生长因子和细胞因子较为重要。其中,LIF 是哺乳动物子宫内膜产生的调节胚胎着床过程最重要的细胞因子,在小鼠的体外培养模型中,LIF 能调节 MMP-9 的表达。有研究表明,在体外 LIF 与滋养细胞培养 4 h 和 12 h 后,LIF 促进滋养细胞 MMP-9 的基因表达,并呈剂量依赖关系。说明 LIF 对 MMP-9mRNA 的表达有一定程度的促进作用^[7]。

本实验研究表明 LIF 在稽留流产绒毛中表达量较正常早孕妇女明显减弱,且与 MMP-9 的表达呈负相关。本实验两组研究对象孕周差异有统计学意义,LIF 及 MMP-9 在正常妊娠中随孕周的变化其表达量如何变化目前尚不十分清楚,LIF 在绒毛组织中调节 MMP-9 的机制尚不明确,有待进一步研究。

因此我们认为,有不明原因稽留流产史的孕妇,再次妊娠早期除给予黄体酮等目前常用药物外,可适量给予补充外源性重组 LIF 蛋白,可能有利于维持妊娠,以减少稽留流产的再次发生。由此推测将外源性 LIF 蛋白的补充应用于体外受精-胚胎移植等辅助生殖技术中,对提高其成功率可能有所帮助。LIF 及 MMP-9 为我们提供了控制稽留流产的某些可能途径,不仅有利于对各种流产发生机制的了解,也为稽留流产的防治提供了一种可能的方法,因而,对 LIF 及 MMP-9 的研究无论在基础理论还是在妇产科临床应用中都有重要意义。

参考文献:

[1] Mitchell MH, Swanson RJ, Oehninger S. In vivo effect of leukemia inhibitory factor(LIF) and an anti-LIF polyclonal antibody on murine embryo and fetal development following exposure at the time of transcervical blastocyst transfer[J]. Biol Reprod, 2002, 67(2): 460-464.

[2] Aghajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation[J]. Ann NY Acad Sci, 2004, 103(4): 176-183.
[3] Robertson SA, Lavranos TC, Seamark RF. In vitro models of the maternal-fetal interface. In: Wegmann TG, Gill TG III, Nisbet-Brown E. New York: Oxford University Press[M], 1998: 191-206.
[4] 张春雨. 胚胎植入与肿瘤浸润转移的相似性[J]. 生命科学, 1997, 9(3): 18-21.
[5] Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(24): 8-12.
[6] Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, et al. Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium [J]. Lab Invest, 1994, 71(6): 838-846.
[7] 宋思学, 张炜. 白血病抑制因子对人早孕滋养细胞 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 表达的调节[J]. 生殖与避孕, 2007, 27(7): 438-442.

(收稿日期 2012-03-106)

(上接第 118 页)的分泌同肺动脉压力的增高同步,以上结果与文献报道一致。

ET 是一种血管活性肽,它是由血管内皮细胞产生的,是人体内最强大的血管收缩肽,其重要的作用是调控肺部循环。伴 PH 的 CHD 患儿血浆 ET-1 浓度升高的根本原因推测与肺部循环 ET-1 清除减少和产生增加相关。Takahashi 等^[5]在野百合碱诱导大鼠 PH 模型中证明 ET-1 参加肺循环的重构,血 ET-1 浓度也与心室容量和肺动脉压力呈正相关。通过表 1 可以看到,行封堵术前,两组血浆 ET-1 水平相比无统计学差异($P > 0.05$),行封堵术后,由于封堵术后先心病的异常血流动力学得到改善,内皮细胞损伤减少,血浆 ET-1 产生减少,故术后 3d 血 ET-1 水平的浓度较术前降低,血浆 ET-1 浓度较封堵前下降有统计学差异($P < 0.05$),进一步证实血 ET-1 的浓度变化与先心病异常血流动力学有关,这种浓度的变化可准确反映先心病室壁张力及心室容量的变化,可作为预测先心病患儿经导管封堵术的预后判断有效指标。通过表 2 的研究证实,口服西地那非 1 个月后,血浆 ET-1 浓度较无药物干预组比较显著下降,有统计学差异($P < 0.05$),原因可能是伴肺动脉高压的先心病患儿双肺血流增多,高速度血流所致的高张切力和高压破坏了血管内皮细胞,导致 ET-1 浓度升高,与以往研究相符^[6],此项研究进一步证实先心病患儿肺动脉高压的形成与血浆 ET-1 的参与

有关。

综上所述,伴 PAH 的 CHD 患者经导管封堵术后的血 BNP、ET-1 浓度较封堵前降低,服用西地那非可促进血 BNP、ET-1 指标的提前改善。测定 BNP、ET-1 的浓度将有希望变成 CHD 患儿经导管封堵术治疗判断预后的重要标志物。

参考文献:

[1] Dasgupta A, Chow L, Tso G, et al. Stability of NT-proBNP in serum specimens collected in Becton Dickinson Vacutainer (SST) tubes[J]. Clin Chem, 2003, 49(6 Pt 1): 958-960.
[2] Kunii Y, Kamada M, Ohtsuki S, et al. Plasma brain natriuretic peptide and the evaluation of volume overload in infants and children with congenital heart disease[J]. Acta Med Okayama, 2003, 57(4): 191-197.
[3] Book WM, Hott BJ, McConnell M. B-type natriuretic peptide levels in adults with congenital heart disease and right ventricular failure[J]. Am J Cardiol, 2005, 95(4): 545-546.
[4] Salzberg SP, Filsoufi F, Anyanwu A, et al. High-risk mitral valve surgery: perioperative hemodynamic optimization with nesiritide(BNP)[J]. Ann Thorac Surg, 2005, 80(2): 502-506.
[5] Takahashi T, Kanda T, Sumino H, et al. Type V phosphodiesterase inhibition modulates endogenous immunoreactivities of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries in rats with monoerotaline-induced pulmonary hypertension[J]. Res Exp Med, 1998, 197(6): 319-328.
[6] 赵翠芬, 夏伟, 王玉玮, 等. 先天性心脏病肺动脉高压患儿肺组织内皮素-1 与胶原合成关系的研究[J]. 临床儿科杂志, 2006, 24(5): 374-376.

(收稿日期 2012-03-15)