

米非司酮对早孕绒毛滋养细胞 TSP 表达及 绒毛间质血管生成的影响

楼湘莹¹, 王自能¹, 耿 菁²

(1. 暨南大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510632; 2. 广州邮电医院妇产科, 广东 广州 510630)

[摘要] 目的: 通过观察米非司酮对人早孕绒毛滋养细胞血小板凝血酶致敏蛋白(TSP)表达及绒毛间质血管生成的影响, 探讨 TSP 在绒毛间质血管生成的作用。方法: 采用免疫组化 S-P 法与图像分析技术对绒毛血管行体视学研究。结果: 米非司酮药流组微血管长度密度较对照组减少($P < 0.05$), 微血管体积密度显著减少($P < 0.01$); 药流组绒毛滋养细胞层 TSP 表达显著高于对照组($P < 0.01$)。结论: 药流组绒毛滋养细胞 TSP 高表达与间质血管生成抑制相关。药流时绒毛间质血管形成发生障碍, 不利于胚胎生存。

[关键词] 米非司酮; 血小板凝血酶致敏蛋白; CD34; 绒毛滋养细胞; 血管生成

[中图分类号] R714 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)02-0139-04

Effects of mifepristone on expression of TSP in human villous trophoblasts and angiogenesis during the early pregnancy

LOU Xiang-ying¹, WANG Zi-neng¹, GEN Qiang²

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Department of Gynecology and Obstetrics, Guang Zhou You Dian Hospital, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the effect of mifepristone on expression of TSP in human villous trophoblasts during the early pregnancy and its role in regulating villous angiogenesis. **Methods:** The expression of TSP and vascular distribution in the villous trophoblasts were examined by immunohistochemistry and stereomorphometry. **Results:** In comparison with control group, both the length density and the volume density of villous capillaries in the mifepristone group were significantly lower ($P < 0.05$); while the content of TSP of the mifepristone group were evidently higher ($P < 0.01$). **Conclusion:** The higher expression of TSP in villous trophoblasts may have relation with the inhibition of the villous angiogenesis. The disturbance of blood development of mifepristone group may be harmful to the embryo's survival.

[Key words] mifepristone; thrombospondin; CD34; villous trophoblast; angiogenesis

血管生成在胚胎发育中至关重要, 其调节失控将导致一系列妊娠相关性疾病, 如早期流产, 中晚期胎儿宫内生长受限、妊娠期高血压疾病等^[1-2]。妊娠时, 胎儿生长发育所需的营养物质主要来自母体,

胎盘是母胎间物质交换的重要器官, 从母血摄取的营养经绒毛间质血管转运到胎儿体内, 反之, 胎儿体内代谢物主要经胎盘的绒毛间质血管由母体排泄。本研究通过免疫组化方法, 用 CD34 标记绒毛血管,

观察药流时绒毛间质微血管变化,并检测绒毛组织中血小板凝血酶致敏蛋白(thrombospondin, TSP)的表达强度,进一步探讨其在绒毛间质血管生成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

30 例人绒毛标本取自暨南大学附属第一医院妇产科,符合计划生育规定,要求人工流产或药物流产的健康早孕妇女。纳入标准:①经妊娠试验、B 超确诊为宫内早孕;②平素月经周期规律;③半年内未曾服用激素类药物及抗前列腺素药物,孕期末使用治理阴道炎类药物;④无生殖系统肿瘤;⑤未曾放置宫内节育器。

1.2 用药与分组

收集符合上述条件的病例随机分为 2 组, A 组(人流对照组, $n=15$), 停经 ≤ 8 周, 常规负压吸引流产, 收集绒毛。 B 组(药流实验组, $n=15$) 停经 ≤ 7 周, 于第 1 天晚 7:00、第 2 天早晨 7:00、晚 7:00 分别给予口服米非司酮 50 mg(共 150 mg), 第 3 天早晨 8:00 来我院服米索前列醇 600 μg , 观察 6 h, 孕囊排出后即刻收集绒毛。

1.3 试剂与方法

鼠抗人 TSP Ab-4 单克隆抗体购自美国 NeoMarkers 公司, 鼠抗人 CD34 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。采用免疫组织化学 SP 法进行免疫组化染色, DAB 显色。切片均在同一条件下进行免疫组化染色; 每次实验均设阳性和阴性对照。

1.4 微血管体视学测定

凡染成棕色, 与周围组织明显分开的内皮细胞或内皮细胞簇均可视为单个微血管。采用微血管长度密度(L_L)和微血管体积密度(V_v)参数。计算公式分别为: $L_L = 2 \sum qi / \sum Ai$ (q 为视野组织内微血管数目, A 视野内组织面积), $V_v = 100 \sum ai / \sum Ai$ (a 为视野内微血管腔面积), 每张切片随机测试 10 个视野, 取视野内所有 CD34 阳性部位。

1.5 染色结果观察和图像分析

胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性染色。使用 Leica QW550 图像分析系统, 按申洪等^[3]提出的阳性单位(positive unit, PU)概念定量分析免疫组化阳性反应程度。每张切片在 200 倍视野下随机选取 8 个视野, 测定绒毛滋养层细胞中棕黄色颗粒的平均灰度, 以定量组织中 TSP 的表达情况。 $PU = |G_\alpha - G_\beta| /$

$G_{\max} \times 100$, G_α 、 G_β 分别为待测结构和背景的平均灰度, G_{\max} 等于 256。每张免疫组化片随机测试 20 个视场。

1.6 统计学分析

图像分析测试结果用均数 \pm 标准差表示, 采用 SPSS11.5 软件进行 t 检验及 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 CD34 微血管体视学分析

CD34 在两组绒毛间质血管内皮细胞及其前期细胞中均呈阳性表达。在绒毛间质, CD34 阳性细胞聚集形成管腔处为绒毛血管; 未形成明显管腔处, 可能为血管芽, 微血管多位于绒毛周边(见图 1-2)。检测微血管长度密度和体积密度指标, 比较两组绒毛微血管的变化, 结果显示: 药流组微血管长度密度较人流组降低($P=0.032, P<0.05$); 微血管体积密度显著降低($P=0.002, P<0.01$)(见表 1)。

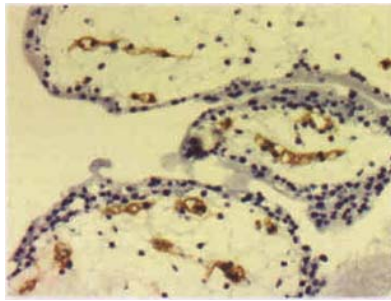


图 1 人流组 CD34 标记的绒毛微血管阳性表达 $\times 200$



图 2 药流组 CD34 标记的绒毛微血管阳性表达 $\times 200$

表 1 人流组和药流组绒毛微血管长度密度和体积密度值 ($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | L_L | $V_v/\%$ |
|-----|-----|--------------------------------|----------------------|
| 人流组 | 15 | $0.003\ 19 \pm 0.000\ 51$ | 6.57 ± 1.55 |
| 药流组 | 15 | $0.002\ 77 \pm 0.000\ 49^{1)}$ | $4.90 \pm 1.04^{2)}$ |

1) 人流组与药流组比较 $P<0.05$; 2) 人流组与药流组比较 $P<0.01$

2.2 绒毛中 TSP 的表达

TSP 主要表达于绒毛滋养层细胞胞浆,绒毛间质血管内皮和间质细胞略有着色(见图 3,4)。在绒毛滋养层,药流组 TSP 的表达显著高于对照组($P=0.000, P<0.01$)。通过对 CD34 阳性染色细胞与滋养层部位观察发现:绒毛间质微血管多聚集在滋养层细胞周边。

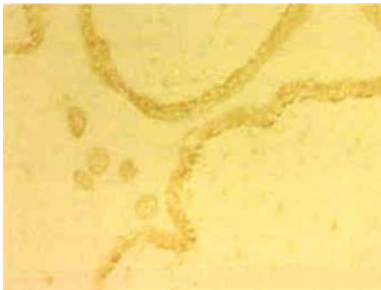


图3 人流组 TSP 绒毛滋养细胞的阳性表达 ×200

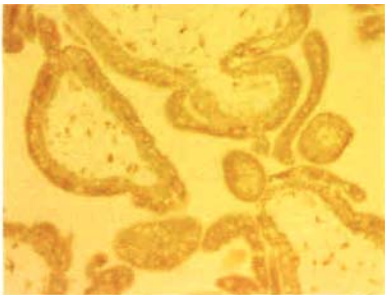


图4 药流组 TSP 绒毛滋养细胞的阳性表达 ×200

表 2 人流组和药流组绒毛滋养细胞 TSP 的 PU 值
($\bar{x} \pm s$)

| 分组 | n | TSP |
|-----|----|----------------------------|
| 人流组 | 15 | 7.05 ± 1.56 |
| 药流组 | 15 | 12.08 ± 3.15 ¹⁾ |

1) 人流组与药流组比较 $P<0.01$

3 讨论

TSP 是重要的血管生长抑制因子,可直接结合血管内皮细胞(EC)糖蛋白上的 CD36,使局部粘附激酶失活,抑制 EC 运动^[4]。Nor 等^[5]研究认为,TSP-1 通过上调凋亡蛋白 BAX,下调抗凋亡蛋白 BCL2,来促进内皮细胞凋亡;另外,TSP 可通过拮抗 VEGF 的生物活性来发挥其抑制血管新生的功能^[6]。

目前,关于 TSP 在女性生殖领域的研究较少。O'Shea 等^[7]研究小鼠囊胚分裂时发现,TSP 在受精卵分裂的 4-细胞、8-细胞期强表达,囊胚期滋养细胞

外胚层也强表达,推测在哺乳动物胎盘形成中发挥作用。在本研究中,TSP 表达于人绒毛滋养细胞层,与上述结果一致,但它在药流组表达显著增高,则尚未见报道。

目前,缺氧是否上调 TSP 存在分歧。Michael 等^[8]在对人脐血管 EC 的研究中发现缺氧直接上调 TSP 的转录水平。而 Mirra 等^[9]在对人恶性胶质瘤细胞的研究中得到相反结果,推测不同组织、不同细胞在相同应激条件下表达 TSP 量不同,TSP 所发挥的功能亦不相同,在人脐血管 EC 中高表达是为了拮抗生理条件下血管的过度生长;而在恶性胶质瘤细胞中低表达则可促进肿瘤细胞增生和转移。在孕 6-10 周,绒毛间质逐渐出现血管新生,绒毛间隙与蜕膜氧分压较小,组织缺氧,TSP 的分泌可拮抗血管的过度生长。药物流产时,米非司酮直接作用于子宫蜕膜,使子宫动脉血管收缩^[10],并造成胎盘氧分压较正常时降低,组织缺氧加重;同时米索前列醇顿服后引起子宫强烈收缩,组织缺氧进一步加剧,TSP 表达被上调。因此,药流组绒毛滋养细胞高表达 TSP。

血管生成是一个十分复杂的过程,受多种因素的精细调控。本实验利用体视学参数分析显示,药流组微血管长度密度和体积密度较人流组明显减少,与 TSP 抑制血管新生的结果相符。但是,为何囊胚分裂时会强表达 TSP? 而同样的缺氧条件下,不同细胞中 TSP 表达为何不同? 药物流产时,绒毛间质微血管究竟是数目减少还是管径收缩,尚待进一步研究。

【参考文献】

[1] RERSTER F, KINGDOM J C, RUCK P, et al. Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR[J]. J Perinat Med, 2006, 34(4): 272-279.

[2] KAUFMANN P, BLACK S, HUPPERTZ B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia[J]. Biol Reprod, 2003, 69(1): 1-7.

[3] 申 洪. 免疫组织化学染色定量方法研究(Ⅲ)[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,1995,4(1):89-90.

[4] SHEIBANI N, NEWMAN P J, FRAZIER W A. Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, regulates platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 expression and endothelial cell morphogenesis[J]. Mol Biol Cell, 1997, 8(7):1329-1341.

- [5] NOR J, MITRA P, POLVERINI P J, et al. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway [J]. *J Vasc Res*, 2000, 37(3): 209-218.
- [6] LAWLER J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth [J]. *Cell Mol Med*, 2002, 6(1): 1-12.
- [7] O'SHEA K S, LIU L H, KINNUNEN L H, et al. Role of the extracellular matrix protein thrombospondin in the early development of the mouse embryo [J]. *J Cell Biol*, 1990, 111(6): 2713-2723.
- [8] MICHAEL W P, LORA W F, SUSAN P P, et al. Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells [J]. *J Lab Clin Med*, 1998, 132(6): 519-529.
- [9] MIRNA T, GIULIA F, MICHELE A, et al. Thrombospondin-1 is downregulated by anoxia and suppresses tumorigenicity of human glioblastoma cells [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(10): 1789-1798.
- [10] REINSCH R C, MURPHY A A, MORALES A J, et al. The effects of RU486 and leuprolide acetate on uterine artery blood flow in the fibroid uterus: a prospective, randomized study [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 170(6): 1623-1627.

[责任编辑:李弘,朱颖娜]

(上接第133页)

制肝癌 SMMC-7721 细胞增生的作用,并通过调节 PCNA, bcl-2 的表达水平,以剂量依赖性方式协同顺铂发挥对 SMMC-7721 细胞的细胞毒性作用。为临床进一步探索肝癌的药物治疗提供了实验依据。溶菌酶能明显抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖,可能与溶菌酶协同 Cis 降低 PCNA 和 bcl-2 的表达有关,提示溶菌酶有可能成为治疗肝癌的细胞凋亡诱导剂;另一方面也为深入研究溶菌酶治疗肝癌的机制提供了途径。

[参考文献]

- [1] 刘同军,徐文琳,张玉臻,等.变溶菌素研究历史和发展前景[J].*微生物学报*, 2000, 40(32): 224-227.
- [2] 张玉臻,刘同军,宋庆训,等.球孢链霉菌溶菌酶的生产条件研究[J].*食品与发酵工业*, 1997, 23(5): 16-18.
- [3] 杨保全,许卫.溶菌酶在口腔疾病中的作用[J].*现代口腔医学杂志*, 1990, 4(1): 40-41.
- [4] 谢秩勋,刘雄,陈奉,等.热负荷对血清溶菌酶活性的影响[J].*中国免疫学杂志*, 1997, 13(3): 148-149.
- [5] 邹京宁,韩一平,陈玉林,等.溶葡萄球菌酶对烧伤小鼠吞噬细胞功能的影响[J].*中华整形烧伤外科杂志*, 1995, 11(4): 255-257.
- [6] KRUSTEVA E, HRISTOVA S, DAMYANOV D, et al. Clinical study of effect of the preparation DEODAN on Leukopenia, induced by cytostatics [J]. *Int J Immunopharmacol*, 1997, 19(9-10): 487-492.
- [7] ZHENG W, TIAN C, CHEN X. Molecular characterization of goose-type lysozyme homologue of large yellow croaker and its involvement in immune response induced by trivalent bacterial vaccine as an acute-phase protein [J]. *Immunol Lett*, 2007, 113(2): 107-116.
- [8] PÉREZ-CALDERÓN R, GONZALO-GARIJO M A, LAMILLA-YERGA A, et al. Recurrent angioedema due to lysozyme allergy [J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2007, 17(4): 264-266.
- [9] SAVA G, CESCHIA V, PACOR S. Mechanism of the antineoplastic action of lysozyme: evidence for host mediated effects [J]. *Anticancer Research*, 1989, 9(4): 1175-1178.
- [10] WARREN J S, RINE HART J J, ZILLING B S, et al. Lysozyme enhancement of tumor cell immunoprotection in a murine fibrosarcoma [J]. *Cancer Res*, 1981, 41(5): 1642-1645.
- [11] KO W G, KANG T H, KIM N Y, et al. Lavandulyl flavonoids: a new class of in vitro apoptogenic agents from *Sophora flavescens* [J]. *Toxicology in Vitro*, 2000, 14(5): 429-433.

[责任编辑:李弘,朱颖娜]