

凋亡调控因子在早期自然流产患者绒毛滋养层细胞中的表达

郑宇¹, 胡继芬², 李励军¹

摘要 **目的** 比较凋亡调控因子 Survivin 及 caspase-3 在自然流产及反复自然流产组患者绒毛中的表达, 探讨两者在早期自然流产发生中的作用及相关性。 **方法** 随机抽取正常早孕组、首次自然流产组及反复自然流产组患者各 30 例, 应用免疫组织化学 SP 法检测 Survivin 与 caspase-3 在绒毛滋养层细胞中的定位和表达。 **结果** 首次自然流产组及反复自然流产组患者绒毛中 Survivin 的表达均低于正常早孕组, 而 caspase-3 则高于正常早孕组, 差异均有显著性统计学意义 ($P < 0.05$)。两流产组间患者绒毛中这两者的表达则无统计学意义 ($P > 0.05$)。流产组患者绒毛中 Survivin 与 caspase-3 呈负相关。 **结论** 早期自然流产的发生可能与 Survivin 表达减少, caspase-3 表达增加引起滋养层细胞过度凋亡有关。

关键词 绒毛; 凋亡; 早期自然流产; Survivin; caspase-3

中图分类号 R714.21 **文献标识码** B **文章编号** 1009-9727(2011)11-1394-02

Study on the correlation and the expression of apoptosis regulatory factors such as survivin and caspase-3 in the villi of the early spontaneous abortion. ZHENG Yu, HU Ji-fen, LI Li-jun. (Affiliated Hospital of Putian College, Putian 351100, Fujian P. R. China)

Abstract Objective To investigate the expression of survivin and caspase-3 in the villous trophocytes of normal early pregnancy women and the first spontaneous abortion and recurrent spontaneous abortion in patients. **Methods** The 90 first and repeated spontaneous abortion patients were randomly divided into normal early pregnancy group, first spontaneous abortion group and repeated abortion group, each consisted of 30 cases. With the method of immunohistochemical SP to examine the cell's position and expression of survivin and caspase-3 in the villous trophocytes. **Results** The expression of survivin on the villi from the two abortion groups were lower than the normal pregnancy group, but caspase-3 were higher than those of normal pregnancy group. The above differences were of statistical significance ($P < 0.05$). The expression of these two on the villi had no statistical significance ($P > 0.05$) between the two abortion groups. Among the villi of the two abortion groups, survivin have a negative correlation with caspase-3. **Conclusion** The pathogenesis of early spontaneous abortion may be related to excessive apoptosis of trophoblast cells caused by reduced expression of survivin and increased expression of caspase-3, leading to villous angiogenesis obstacles.

Key words Villi; Apoptosis; Early spontaneous abortion; Survivin; Caspase-3;

早期自然流产的发生率占全部妊娠的 10%~15% 左右^[1], 其中复发性自然流产的发生率约 1%~2%。近年来, 人们发现自然流产妊娠组织中存在着过度凋亡, 其发生与促凋亡基因的高表达有关, 但是否与机体抑制凋亡的能力下降有关, 目前研究较少。本研究比较细胞凋亡抑制蛋白 Survivin 与半胱氨酸天冬氨酸酶 caspase-3 在正常早孕妇女和首次自然流产及反复自然流产患者绒毛中的表达, 分析这两者的关联性, 来探讨两者在早期自然流产发生中的作用及相关性, 以寻找早期自然流产的发病机制, 为其临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 对象 随机选择 2007 年 9 月~2008 年 12 月在莆田学院附属医院妇产科门诊早孕人工流产的健康妇女 30 例 (正常早孕组)、首次早期难免流产患者 30 例 (首次自然流产组) 及连续两次或两次以上的早期难免流产患者 30 例 (反复自然流产组)。所有对象月经规律, 无内外科合并症、内分泌失调、遗传疾病, 内生殖器官发育正常, 无避孕史, 无外伤、射线毒物接触史,

无吸烟史, 无感染性疾病。各组年龄、停经天数、身高、体重、孕次、产次差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法 取各组负压吸引出的绒毛及蜕膜等组织, 经过滤、漂洗分离后, 甲醛固定, 取材, 脱水, 石蜡包埋。每标本超薄切片各 5 张, 同一条件下进行免疫组化染色。

1.3 结果判断 采用双人双盲法对结果进行半定量评分。判定方法: 滋养细胞胞浆或胞核中出现棕黄色颗粒为阳性表达。高分辨显微镜随机取不重叠的五个高倍视野, 以染色强度和阳性细胞比例评定阳性表达。染色强度分级: 无染色、弱染色、中等染色、强染色分别记 0 分、1 分、2 分、3 分; 阳性细胞: 阳性细胞数 $\leq 5\%$ 、 $\leq 25\%$ 、 $\leq 50\%$ 、 $\leq 75\%$ 和 $> 75\%$ 分别记 0、1、2、3 和 4 分。上述两种计分相乘, 0~3 分为阴性, 4~6 分为弱阳性, 7~9 分为中等阳性, > 9 分为强阳性。弱阳性、中等阳性和强阳性皆视为阳性表达。

1.4 统计学分析 应用 SPSS11.5 统计学软件进行数据处理。免疫组化半定量结果阳性率表示, 采用完全随机设计多样本比

较的 Kruskal- Wallis H 检验 , 组间比较采用多个独立样本两两比较的 Nemenyi 法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析采用等级相关分析法 (Spearman 法)。

2 结果

2.1 绒毛细胞 Survivin 表达 Survivin 在滋养层细胞中阳性表达定位于胞浆或胞核中出现棕黄色颗粒 , 其中合体滋养细胞以及细胞滋养细胞均有表达 , 在间质细胞和绒毛内皮细胞也有少许染色。三组绒毛合体滋养层细胞 Survivin 的表达情况见表 1 , 其表达强度的差异有统计学意义 ($H=23.948$ $P<0.01$)。经两两比较 , 两组流产组合体滋养细胞 Survivin 表达强度均弱于正常早孕组 ($\chi^2=14.959$ 20.523 均 $P<0.01$) , 两组流产组间合体滋养细胞 Survivin 表达强度的差异无统计学意义 ($\chi^2=0.439$ $P>0.05$)。

表 1 三组绒毛合体滋养层细胞 Survivin 的表达

组别	例数	合体滋养层细胞阳性数			
		-	+	++	+++
正常早孕组	30	0	5	15	10
首次流产组	30	9	10	8	3
反复流产组	30	10	12	6	2

2.2 绒毛滋养层细胞 Caspase-3 的表达 本实验研究结果显示 , Caspase-3 主要表达于合体滋养细胞及细胞滋养细胞的胞浆中 , 阳性细胞呈粗细不一的棕黄色颗粒。三组绒毛合体滋养层细胞 Caspase-3 的表达情况见表 2 , 其表达强度的差异有统计学意义 ($H=17.230$ $P<0.01$)。经两两比较 , 两流产组合体滋养细胞 Caspase-3 表达强度均强于正常早孕组 ($\chi^2=12.570$ 13.256 , 均 $P<0.01$) , 两流产组间合体滋养细胞 Caspase-3 表达强度的差异无统计学意义 ($\chi^2=0.009$ $P>0.05$)。

表 2 三组绒毛合体滋养层细胞 Caspase-3 的表达

组别	例数	合体滋养层细胞阳性数			
		-	+	++	+++
正常早孕组	30	11	10	7	2
首次流产组	30	3	6	10	11
反复流产组	30	2	6	12	10

2.3 绒毛滋养细胞 Survivin 与 caspase-3 的相关性分析 首次自然流产组中合体滋养细胞和细胞滋养细胞 Survivin 表达与 caspase-3 呈负相关 ($r=-0.881$ $r=-0.947$ $P<0.01$)。反复自然流产组中合体滋养细胞和细胞滋养细胞 Survivin 表达与 caspase-3 呈负相关 ($r=-0.960$ $r=-0.997$ $P<0.01$)。

3 讨论

3.1 Survivin 与自然流产 有关研究显示 , 正常妊娠小鼠 Survivin 可以抑制滋养细胞的凋亡 , 以维持妊娠的发展^[2-3]。韦枝红等^[4]研究表明 , RSA 组绒毛及蜕膜细胞 survivin 染色强度均明显弱于正常早孕组。本实验研究结果显示 : 两流产组中合体滋养层细胞中 Survivin 阳性表达率 , 均显著低于正常早孕组 ($P<0.01$) ; 而两组流产组间比较无显著差异性 ($P>0.05$)。说明适度的 Survivin 能抑制细胞凋亡、促进细胞的增殖 , 对胎盘形成和妊娠维持有重要的作用^[5]。而流产组中 Survivin 表达下降 , 则抑制凋

亡能力下降 , 使绒毛生长受阻 , 导致细胞大量凋亡 , 从而影响细胞的正常增殖 , 引起自然流产 , 特别是胚胎早期死亡的发生^[6]。本研究表明 Survivin 的表达降低参与了早期自然流产的发生。

3.2 caspase-3 与自然流产 Caspase-3 是目前发现的在胎盘组织惟一表达的 Caspase , 处于凋亡传导通路的下游 , 具有终级效应。本研究结果表明 , 两流产组中滋养层 caspase-3 表达的阳性率均明显增加 , 高于正常早孕组 , 有显著性差异 ($P<0.01$) , 而流产组间比较无显著差异性 ($P>0.05$)。因为 caspase-3 是细胞凋亡过程中的关键诱导者和执行者 , 其高表达可能启动线粒体 / 细胞色素 c 及 Fas 介导的凋亡通路 , 导致滋养层中细胞凋亡增加 , 绒毛细胞的大量凋亡 , 使绒毛生长受阻 , 从而阻碍了孕卵的发育 , 继而发生自然流产。因此认为 caspase-3 基因表达增高可能是引起自然流产的一个很重要的原因 , 这与流产次数无关。

3.3 Survivin 与 caspase-3 两者的相关性 survivin 抑制凋亡的机制 , 是通过内源性和外源性两条凋亡信号通路直接或间接抑制 caspase-3、caspase-7 而实现。本研究结果证实了在滋养层细胞中 Survivin 与 caspase-3 之间存在负相关关系 , 说明 Survivin 对 caspase-3 的表达具有抑制作用。流产组绒毛组织中 Survivin 表达下降 , 使其对 caspase-3 的抑制作用减弱 , 导致 caspase-3 表达明显增加。而 caspase-3 是诱导细胞凋亡的关键性激酶 , 也是细胞凋亡的主要效应酶 , 其表达增加提示滋养层细胞凋亡过度 , 从而导致早期自然流产的发生。

综上所述 , Survivin 和 Caspase-3 在早期自然流产滋养层细胞凋亡过程中可能起重要的作用 , Survivin 在早期自然流产滋养层细胞中表达减少 , Caspase-3 的表达增加 , 使机体抑制凋亡的能力下降 , 导致过度凋亡 , 打破了维持绒毛正常发育的平衡状态 , 使绒毛凋亡增加生长受阻 , 最终导致早期自然流产的发生 , 这可能是早期自然流产发生的一个重要病理过程。本研究在一定程度上可进一步阐明早期自然流产的机制 , 从而为将来设想通过提高抑制凋亡的能力或降低凋亡水平来为早期自然流产的治疗开辟新途径提供理论依据。

参考文献 :

[1] 乐杰 . 妇产科学 [M]. 第七版 . 北京 : 人民卫生出版社 , 2008 : 85.
[2] Fest S , Brachwitz N , Schumacher A , et al . Supporting the hypothesis of pregnancy as a tumor: survivin is upregulated in normal pregnant mice and participates in human trophoblast proliferation [J] . Am J Reprod Immunol , 2008 , 59(1) : 75-83.
[3] Shiozaki A , Kataoka K , Fujimura M , et al . Survivin inhibits apoptosis in cytotrophoblasts [J] . Placenta , 2003 , 24 (1) : 65-76.
[4] 韦枝红 , 龙淑芳 , 宁克勤 . 复发性自然流产患者妊娠组织中 survivin 的异常表达 [J] . 临床和实验医学杂志 , 2006 , 5(7) : 859-860.
[5] Baczyk D , Dunk C , Huppertz B , et al . Bi-potential behaviour of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi [J] . Placenta , 2006 , 27(4-5) : 367-374 .
[6] 宁克勤 , 艾辉 , 韦枝红 . Survivin 在反复自然流产患者妊娠组织中的表达异常 [J] . 海南医学 , 2007 , 18(7) : 42-43.

收稿日期 2011-03-02 编辑 符式刚