

• 临床论著 •

子痫前期患者胎盘组织及血浆中 TGF- β 1 的表达及临床意义

解长银 臧晓娟 魏红 武荣 范广来 吕艳关

【摘要】 目的 探讨子痫前期患者胎盘组织及血清中转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 表达及其意义。**方法** 采用免疫组化 SABC 法和 Western blot 法检测 30 例正常晚期妊娠孕妇(对照组)和 40 例子痫前期患者(子痫前期组, 其中轻度 22 例、重度 18 例)胎盘组织中 TGF- β 1 的蛋白定位和表达; 采用酶联免疫吸附实验的方法检测其血清 TGF- β 1 水平。**结果** (1) TGF- β 1 蛋白主要定位于胎盘绒毛滋养细胞和蜕膜细胞, 主要表达部位为细胞质。(2) 轻、重度子痫前期组胎盘组织中 TGF- β 1 的表达均高于对照组 ($P < 0.01$), 其中重度子痫前患者均高于轻度组 ($P < 0.05$)。(3) 轻、重度子痫前期患者血浆 TGF- β 1 水平显著高于对照组 ($P < 0.01$), 其中重度显著高于轻度组 ($P < 0.05$)。(4) 子痫前期患者胎盘组织中 TGF- β 1 的表达与血清 TGF- β 1 水平呈正相关 ($P < 0.01$)。**结论** TGF- β 1 可能参与子痫前期的发生、发展并与病情严重程度密切相关。

【关键词】 子痫; 转化生长因子 β 1; 胎盘

Expression and clinical significance of TGF- β 1 in placenta and plasma of preeclampsia XIE Chang-yin*, ZANG Xiao-juan, WEI Hong, WU Rong, FAN Guang-lai, LV Yan-guan. *Laboratory of Clinical Medicine, First Branch Hospital of Huaian First People's Hospital, Huaian 223302, China
Corresponding author: LV Yan-guan, Email: bjkjxx@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of TGF- β 1 in placenta and serum from normal pregnant women and preeclampsia, so as to probe the possible mechanism of preeclampsia. **Methods** Placentas and serum were collected from 40 preeclampsia women including 22 mild preeclampsia and 18 severe preeclampsia as study group and 30 normal pregnant women as control group. The levels of TGF- β 1 in placenta were detected by Western blot. Cellular location was determined by immunohistochemistry. The levels of TGF- β 1 in serum were detected by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** (1)The expressions of TGF- β 1 protein was located in the trophoblast cell and also can be found in exuviate membrane organization. in placental villous syncytiontrophoblast of preeclampsia group were significantly higher than that of control group. (2)The results of Western Blot showed the expressions of TGF- β 1 in severe and mild preeclampsia group were both significantly higher than that of control group ($P < 0.01$), and was higher in severe group than that in mild one. ($P < 0.05$). (3) The level of TGF- β 1 in serum of the the mild preeclampsia group and the sever group were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). and was higher in severe group than that in mild one. ($P < 0.05$). (4) There were positively correlation between the expressions of TGF- β 1 in placental and the level of TGF- β 1 in serum of preeclampsia group. **Conclusion** TGF- β 1 not only participated in pathogenic process of preeclampsia but also were related to its degree.

【Key words】 Eclampsia; Transforming growth factor beta1; Placenta

子痫前期是妊娠期特有的疾病, 在世界范围内发病率为 4%~8%^[1], 该病与围产期母婴患病率和死亡率

密切相关, 严重影响母婴健康, 其发病机制至今仍未阐明, 缺乏有效的预防和治疗措施。越来越多的研究证实, 滋养细胞的增殖、分化和浸润障碍, 胎盘浅着床是其发病的关键环节^[2-3]。TGF- β 1 及其受体是多功能的细胞生长增殖调节肽, 在调节胎盘成长、分化及功能上起重要作用。近年来研究表明其主要表达于胎盘滋养细胞和侵入子宫内膜的滋养层细胞, 对滋养细胞的增殖、分化和浸润具有调节作用, 可能与子痫前

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.24.079

基金项目: 淮安市科技局立项课题资助项目 (HAS2012023)

作者单位: 223302 江苏省, 淮安市第一人民医院一分院医学检验科(解长银); 扬州大学附属淮安市妇幼保健院医学检验科(魏红、范广来、吕艳关), 新生儿医学中心实验室(臧晓娟、武荣)

通讯作者: 吕艳关, Email: bjkjxx@126.com

期的发生、发展密切相关^[4]。本研究旨在通过检测子痫前期患者和正常妊娠胎盘组织和血浆中的 TGF- β 1 水平变化,初步探讨其在子痫前期发病过程中可能发挥的作用。

对象与方法

1. 研究对象:在知情同意下选择 2010 年 11 月至 2012 年 6 月淮安市妇幼保健院产科重症监护室收治的子痫前期患者 40 例(子痫前期组,轻度 22 例,重度 18 例),诊断标准参照妇产科学第七版^[4]。在剖宫产指证下实行剖宫产终止妊娠,选择同期住院行选择性剖宫产的正常妊娠者 30 例为对照组。两组孕妇均为单胎,均排除内科并发症和其他产科并发症。年龄、孕周差异无显著性($P>0.05$)。

2. 方法:(1)标本采集:所有研究对象均在住院未经任何治疗前清晨空腹时抽取外周静脉血 3 ml,分离血清,置于 -70°C 冰箱冻存待检。待分娩后立即收集入选者胎盘组织,参照 Sood 等^[5]报道避开胎盘梗死、钙化和血管瘤部分,从脐带植入点旁开 5 cm 处将胎盘组织纵向分为 3 部分,即母体面部分、中间部分和胎儿面部分,本研究采集中间部分绒毛体积, $2\text{ cm}\times 2\text{ cm}\times 2\text{ cm}$ 。在冰预冷的 PBS 中充分漂洗后,保存于 4%多聚甲醛和液氮中,用于 Western blot 实验和免疫组化染色实验。(2)主要试剂:TGF- β 1 多克隆抗体(Bioworld 公司), GAPDH 单克隆抗体(武汉博士德公司), TGF- β 1 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(深圳晶美生物科技有限公司)。(3)采用免疫组织化学 SABC 法检测各组胎盘组织中 TGF- β 1 蛋白定位:一抗为兔抗人 TGF- β 1 多克隆抗体,工作浓度 1:250;细胞中出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。(4)采用 Western blot 印记杂交法检测胎盘组织中 TGF- β 1 的蛋白表达:一抗为兔抗人 TGF- β 1 多克隆抗体(1:500),二抗为羊抗兔单克隆抗体(1:1000)。以各标本 TGF- β 1 与 GAPDH 实际灰度值的比值表示 TGF- β 1 蛋白表达水平。(5)采用 ELISA 法检测血清 TGF- β 1 水平,实验步骤严格按操作说明书进行。

3. 统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据比较数采用 t 检验和单因素方差分析。指标相关性采用 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

结果

一、TGF- β 1 在各组胎盘组织中的表达

1. 免疫组化结果显示:TGF- β 1 阳性细胞主要定位于胎盘绒毛滋养细胞和蜕膜细胞,偶见于胎盘间

质和绒毛血管内皮细胞主要表达部位为细胞质(图 1)。

2. Western blot 检测 TGF- β 1 蛋白的表达结果:提取各组胎盘组织中的蛋白,分别用 TGF- β 1 和 GAPDH 抗体行 Western blot 检测,分别在 44 kDa 和 35 kDa 位置出现目的条带,对目的条带扫描密度进行定量。结果显示,子痫前期重度组和轻度组中 TGF- β 1 蛋白表达显著高于正常妊娠组,差别均具有统计学意义($P<0.01$)。其中重度组显著高于轻度组,统计检验显示二者之间差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

二、TGF- β 1 在各组血浆中表达水平

子痫前期患者组血浆 TGF- β 1 含量高于对照组($t=3.396$, $P<0.01$)。与对照组相比,轻、重度子痫前期组 TGF- β 1 含量均升高,差异有统计学意义($t=2.756$, $P<0.05$; $t=4.383$, $P<0.01$)。轻、重度子痫前期组之间比较差异具有统计学意义($t=2.512$, $P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组血浆中 TGF- β 1 浓度检测结果 (ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	TGF- β 1
对照组	30	9.03 \pm 3.27
子痫前期组	40	14.13 \pm 4.27 ^a
轻度子痫前期组	22	11.19 \pm 2.48 ^{b,c}
重度子痫前期组	18	15.61 \pm 4.56 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与重度组比较,^c $P<0.05$

三、子痫前期患者胎盘组织和血浆中 TGF- β 1 水平相关性分析

子痫前期患者胎盘组织 TGF- β 1 蛋白表达水平与血浆 TGF- β 1 呈正相关($r=0.789$, $t=3.021$, $P<0.01$)。

讨论

研究证实滋养细胞的浸润和子宫螺旋动脉的重铸是胎盘形成过程中的重要环节^[6]。胚胎的植入是个极其复杂的过程,需要胎盘滋养细胞对子宫基质的足够浸润,建立一个直径、低阻力的动脉血液循环系统,以保证母体血液持续供应胎儿生长发育需要,这一过程伴随着子宫内膜的基质层新生血管的生成和细胞外基质结构的重建,是一个复杂的多步骤过程,其中,滋养细胞的增殖、分化和对母体组织的浸润是至关重要的,多年来大量的临床研究证实,胎盘滋养细胞侵袭功能障碍导致的胎盘浅着床和血管重塑障碍与子痫前期密切相关^[7]。

TGF- β 1 是一种具有广泛生物学作用的同源二聚体多肽,它可在细胞增殖、细胞外基质沉积、血管生成及免疫反应等生理病理过程中起作用。其基因定位于染色体 19q3、含有 7 个外显子,主要通过第 I、II 型受体的侧突二聚体进行信号传递。有研究表明, TGF- β 1

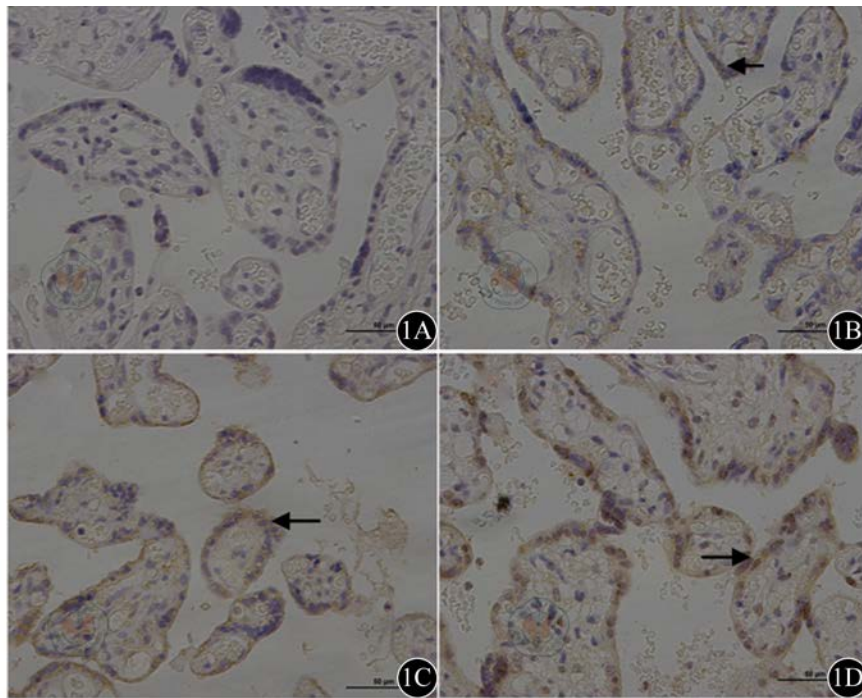


图1 TGF-β1在胎盘组织中的表达(×500)。1A: 阴性对照; 1B: 对照组; 1C: 轻度组; 1D: 重度组(黑色箭头代表阳性表达)

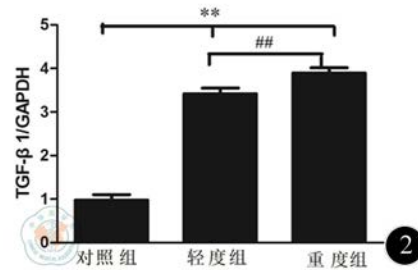
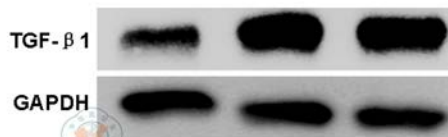


图2 Western blot比较TGF-β1/GAPDH蛋白灰度值。子痫重度组和子痫轻度组与对照比较, ** $P < 0.01$; 子痫重度组与轻度组, ## $P < 0.05$

与其受体结合后,启动 TGF-β/Smads 信号通路而发挥调节滋养细胞、增殖、分化、免疫与内分泌功能^[8]。TGF-β1 定位于妊娠早、中、晚期绒毛滋养层胞质以及附近区域,在人类胎盘组织中以自分泌和旁分泌形式调节子宫内膜-滋养细胞的功能、控制滋养细胞的浸润^[9]。本研究结果显示胎盘组织 TGF-β1 阳性细胞主要定位于胎盘绒毛滋养细胞和蜕膜细胞,偶见于胎盘间质和绒毛血管内皮细胞,主要表达部位为细胞质,且在子痫前期中患者中显著高于正常妊娠孕妇,表明胎盘组织中 TGF-β1 的异常表达与子痫前期的发生、发展密切相关。研究证实, TGF-β1 在孕早期通过调节血管内皮生长因子(VEGF)的表达变化来调节胎盘血管通透性及新生血管的形成,有利于子宫接受胚泡并促进滋养细胞的增殖^[10],而在孕中晚期 TGF-β1 表达下降,有利于控制滋养细胞浸润和血管重塑。这些功能在维护滋养细胞增殖与分化平衡中具有重要意义。邹丽等^[11]通过构建一个腹腔局部高浓度 TGF-β1 的动物

模型,发现 TGF-β1 可导致胚胎和胎盘发育迟缓;显示 TGF-β1 对滋养细胞的增殖及分化有明显抑制作用,促使滋养细胞衰老,因而其对子宫内膜及血管壁的侵入能力也减弱,造成胎盘局部缺血,影响胚胎和胎盘发育。Irving 等^[12]通过体外滋养细胞侵袭试验证实 TGF-β1 可以明显抑制正常滋养细胞迁移通过 Matrigel 胶,推测 TGF-β1 不适当的表达或功能缺失将可能会导致一些和滋养细胞入侵和胎盘发育有关的妊娠相关的疾病比如说子痫前期和绒毛膜癌^[13]。本研究应用免疫组化法和 Western blot 法对子痫前期患者和正常妊娠胎盘组织中的 TGF-β1 表达进行检测。结果显示, TGF-β1 表达主要定位于胎盘绒毛滋养细胞,主要表达于细胞胞质,子痫前期患者胎盘组织中的 TGF-β1 的表达水平明显高于同期正常妊娠组,与近年研究结果一致^[14]。证实了 TGF-β1 对滋养细胞侵袭功能具有负调控作用。TGF-β1 可能通过以下机制参与子痫前期的病理过程: (1) 抑制滋养细胞向浸润型细胞分化,使

细胞滋养层分化为无浸润能力的合体滋养细胞；(2)使滋养细胞表面的整合素过度表达，滋养细胞与细胞外基质黏附过牢，阻碍滋养细胞浸润；(3)使金属基质蛋白酶和纤溶酶失活，抑制滋养细胞的迁移侵入^[15]；(4)抑制浸润型滋养细胞的血管黏附分子表型的表达，使滋养细胞的浸润减少^[16]；(5) TGF- β 1 与其受体结合后，通过 Smad 信号通路，诱导细胞滋养细胞分化为合体滋养细胞，而后者无浸润功能。(6) TGF- β 1 可以以旁分泌的方式作用于胎盘的绒毛间质和细胞滋养层之间的锚定部位，使滋养细胞自身之间以及滋养细胞与基质之间形成的片状结构更加紧密稳定，滋养细胞分化能力降低，导致胎盘浅着床^[17]；(7) TGF- β 1 还可以通过降低肝细胞生长因子(HGF)诱导的诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的表达来抑制 HGF 的活性，减弱滋养细胞的侵入性和活动性^[18]。

子痫前期主要临床表现为妊娠期晚期出现进行性加重的高血压、高度水肿以及大量蛋白尿，轻度可伴有上腹部的不适，重度出现持续性头痛、恶心、呕吐或并发其他脑神经和视觉障碍或 HELLP 综合征(溶血、肝酶升高和血小板减少)，持续的高血压导致全身多种重要靶器官的受损。研究表明 TGF- β 1 作为一种多功能细胞因子，可通过自分泌和旁分泌机制调节肾脏的结构和功能。其在外周循环中高水平表达可导致肾小球系膜增生，细胞外基质的积聚，间质纤维化和肾功能减退，肾动脉血压增加。本研究结果显示子痫前期患者血浆中 TGF- β 1 显著高于正常妊娠组，且重度组高于轻度组，表明血浆 TGF- β 1 水平变化与子痫前期的发生、发展密切相关。与以往研究证实血浆 TGF- β 1 的水平与血压、蛋白尿的水平呈正相关的结论相符^[19]，国外研究表明：TGF- β 1 不仅可刺激体内最强的血管收缩因子内皮素 1(ET-1)的过度表达；还可增加肾脏近球细胞肾素的释放，有助于血管紧张素 II 生成增加，促使血压升高；而血管紧张素 II 又反过来又可刺激 TGF- β 1 的进一步分泌，逐渐形成恶性循环，加重血压升高和机体损害^[20]。本研究显示轻、重子痫前期胎盘组织中 TGF- β 1 的表达与血浆 TGF- β 1 水平呈正相关，提示我们胎盘组织中过度表达的 TGF- β 1 一方面抑制了滋养细胞的分化、子宫螺旋动脉的重塑，胎盘浅着床，另一方面由于胎盘的损伤，导致合成和分泌的大量 TGF- β 1 进入外周血循环，导致了机体出现高血压、蛋白尿等子痫前期的临床表现，并随着疾病的发展而逐步加重。

综上所述，TGF- β 1 不仅通过影响胎盘滋养细胞的浸润和分化过程，使胎盘滋养细胞侵袭功能障碍，胎盘浅着床，同时合成并释放大量的 TGF- β 1 入血液循环，

导致机体血压升高、出现子痫前期的临床症状，其在子痫前期发病机制中调控机制有待进一步深入探讨。

志谢 感谢南京医科大学第一临床学院生殖医学国家重点实验室临床研究中心崔毓桂研究员对本研究的指导和支持，感谢该实验室提供的部分实验试剂和设备

参 考 文 献

- [1] Hekis J, Reddy UM, Roberts JM. Preeclampsia pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Reprod Sci*, 2009, 14: 508-523.
- [2] Fisher SJ. The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007, 23: 53-58.
- [3] Roberts JM, Lain KY. Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta*, 2002, 23: 359-372.
- [4] Lyall F, Simpson H, Bulmer JN. Transforming growth factor-beta expression in human placenta and placental bed in third trimester normal pregnancy, preeclampsia and fetal growth restriction. *Am J Pathol*, 2001, 159: 1827-1838.
- [5] Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, et al. Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 5478-5483.
- [6] Carbillon L, Ziol M, Challier JC, et al. Doppler and Immunohistochemical Evaluation of Decidual spiral vessels in Early Pregnancy. *Gyneol Obstet Invest*, 2004, 59: 24-31.
- [7] Starzyk KA, Salafia CM, Pezzullo JC. Quantitative differences in arterial morphometry define the placental bed in preeclampsia. *Hum Pathol*, 1997, 28: 353-358.
- [8] Verrechia F, Mauriel A. Transforming growth factor-beta Signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *Invest Dermatol*, 2002, 118: 211-215.
- [9] Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, et al. Some Recent Advances in the Chemistry and Biology of transforming growth factor-Beta. *Journal of Cell Biology*, 1987, 105: 1039-1045.
- [10] Chung IB, Yelian FD, Zaher FM, et al. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta*, 2000, 21: 320-334.
- [11] 邹丽, 黄瑛, 徐可树, 等. 转化生长因子在孕鼠胚胎及胎盘发育中的作用. *中华妇产科杂志*, 1999, 12: 103-108.
- [12] Irving JA, Lala PK. Function role of cel I surface intergrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- β , IGF-II, and IGFBP-1. *Exp Cell Res*, 1995, 217: 419-427.
- [13] Xuan YH, Choi YL, Shin YK, et al. Expression of TGF-beta Signaling proteins in normal placenta and gestational trophoblastic disease. *Histopathol*, 2007, 22: 227-231.
- [14] Enquobahrie DA, Williams MA, Qiu C, et al. Maternal plasma transforming growth factor-beta 1 concentrations in preeclamptic and nonotensive pregnant Zillbabwean women. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2005, 17: 343-381.
- [15] Kannakar S, Das C. Regulation of trophoblast invasion by IL-beta1 and TGF-beta1. *Am J Reprod Immunol*, 2002, 48: 210-214.
- [16] Rama S, Suresh Y, Rao AJ. TGF beta1 induces multiple independent signals to regulate human trophoblastic differentiation: mechanistic insights. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 206: 29-35.
- [17] Aplin JD, Lacey IL, Haigh Z, et al. Growth factor-extraacellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans*, 2000, 29: 199-201.
- [18] Tse WK, Whitley GS, Cartwright YE. Transforming growth factor-beta1 regulate shepatocyte growth factor-induced nbphoblast motility and invasion. *Placenta*, 2002, 23: 699.

- [19] Derhasehning U, Shehata M, Herkner H, et al. Increased levels of transforming growth factor-beta1 in essential hypertension. Am J Hypertens, 2002, 15: 207-211. of prorenin and induction of TGF- β 1 and PAI-1 expression in renal mesangial cells. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303: F11-20.
(收稿日期: 2013-10-30)
- [20] Zhang J, Wu J, Gu C, et al. Receptor-mediated nonproteolytic activation (本文编辑: 戚红丹)

解长银, 臧晓娟, 魏红, 等. 子痫前期患者胎盘组织及血浆中 TGF- β 1 的表达及临床意义[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(24): 11427-11431.



中华医学会