

· 临床研究 ·

复发性自然流产患者绒毛中滋养层细胞的变化

钱利强 潘熠斌 王佩欣 竺海燕 金晓莹 张松英

[摘要] 目的 研究复发性自然流产(RSA)患者早期绒毛中细胞滋养层细胞中尾侧型同源转录因子2(CDX2)、GATA结合蛋白3(GATA3)、转录因子活化蛋白2C(TFAP2C)与肿瘤增殖抗原67(Ki67)表达的变化。方法 选择RSA患者8例为RSA组,选择同期非意愿早期妊娠,要求行人工流产术的正常早孕者8例为正常流产组。应用免疫组化法检测两组绒毛组织中CDX2、GATA3、TFAP2C与Ki67蛋白的表达。结果 RSA组免疫组化结果显示,CDX2和Ki67特异性表达于细胞滋养层细胞中,GATA3、TFAP2C主要表达于细胞滋养层细胞,部分合体滋养层细胞也有表达。与正常流产组比较,CDX2、GATA3与Ki67在RSA组的滋养层细胞中表达均明显减少(t 分别=10.49、11.59、10.71, P 均 <0.05),而TFAP2C在两组滋养层细胞中的表达无明显差异($t=0.50$, $P>0.05$)。结论 RSA滋养细胞中的CDX2、GATA3与Ki67表达异常下调,滋养层细胞增殖和分化功能异常,可能是导致复发性自然流产的重要原因。**[关键词]** 复发性自然流产; 绒毛; 滋养细胞; 尾侧型同源转录因子2

Alterations of trophoblast in early villus in patients with recurrent spontaneous abortion QIAN Liqiang, PAN Yibin, WANG Peixin, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, Sir Run Run Shaw Hospital, Key Laboratory of the diagnosis and treatment research of reproductive disorders of Zhejiang Province, Hangzhou 310016, China.

[Abstract] **Objective** To study the expression of caudal type homeobox 2 (CDX2), GATA binding protein 3 (GATA3), transcription factor activated protein 2C (TFAP2C) and tumor proliferation antigen 67 (Ki67) in trophoblast cells of patients with recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods** Eight patients with RSA were selected as the RSA group, and 8 normal pregnancy women under induced abortion were selected as the normal abortion group at the same time. The expressions levels of CDX2, GATA3, TFAP2C and Ki67 proteins in villous tissues were determined by immunohistochemistry. **Results** Immunohistochemical results of RSA group showed that, CDX2 and Ki67 were exclusively expressed in villous cytotrophoblast (vCTB). Both GATA3 and TFAP2C were mainly expressed in vCTB and syncytiotrophoblasts (STB). The expressions levels of CDX2, GATA3 and Ki67 in the RSA group were lower than those of women in the normal group ($t=10.49, 11.59, 10.71, P<0.05$), whereas no significant difference was observed in TFAP2C expression levels between the two groups ($t=0.50, P>0.05$). **Conclusion** The aberrant expressions of CDX2, GATA3 and Ki67, and dysfunction of trophoblasts may be the important factors for the occurrence of RSA.

[Key words] recurrent spontaneous abortion; villus; trophoblast; caudal type homeobox 2

复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion,

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.005.009

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2021KY179);
浙江省自然科学基金(LY22H04001、LY20C080002)

作者单位:310016 浙江杭州,浙江大学医学院附属邵逸夫医院妇产科生殖中心、浙江省生殖障碍诊治研究重点实验室(钱利强、潘熠斌、王佩欣、竺海燕、金晓莹、张松英);
湖州市妇幼保健院妇产科(钱利强)

RSA)是指3次及3次以上的连续发生的自然流产,是普遍的妊娠并发症,发病率约为1%~2%^[1]。尽管RSA的病理生理过程仍不是很清楚,但是绒毛中的滋养细胞在其中起着重要作用^[2]。目前,有研究表明转录因子尾侧型同源转录因子2(caudal type homeobox 2, CDX2)、GATA结合蛋白3(GATA binding protein 3, GATA3)与转录因子活化蛋白2C(transcription factor activator protein 2C, TFAP2C)参与囊

胚分化和滋养层干细胞形成过程中的发挥重要调节作用^[3-5]。然而有关CDX2、GATA3、TFAP2C在RSA病理状态下的表达的研究还未见报道。本次研究应用免疫组化检测RSA患者绒毛组织中CDX2、GATA3、TFAP2C与肿瘤增殖抗原67(tumor proliferation antigen 67, Ki67)的表达,探讨这些重要分子在RSA发病中的作用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2020年8月至2021年5月在湖州市妇幼保健院妇产科就诊的RSA患者8例为RSA组。纳入标准包括:①单胎妊娠;②有腹痛、阴道流血等先兆流产症状,经B超检测证实无胚胎心脏跳动;③妊娠≤12周,与同一伴侣流产≥3次。排除标准包括:①有生殖系统异常、糖尿病、甲状腺功能异常等全身性疾病患者;②有家族复发性自然流产病史、外科手术和医疗并发症患者;③有染色体、解剖、内分泌感染、免疫方面问题患者;④服用过药物患者或男方精子质量及活动度不正常。本次研究经本院伦理委员会审核并批准。所有研究对象及家属签署知情同意书。选择本院同期非意愿早期妊娠,要求行人工流产术正常早孕者8例为正常流产组,两组一般资料比较见表1。两组的年龄、孕周、孕囊大小比较,差异均无统计学意义(P 均>0.05)。

表1 两组一般资料比较

组别	n	年龄/岁	孕周/周	孕囊大小/cm
RSA组	8	27.03 ± 4.57	8.72 ± 2.34	2.65 ± 0.83
正常流产组	8	26.15 ± 3.21	9.92 ± 1.20	2.73 ± 0.63

1.2 绒毛组织采集与保存 RSA组行清宫手术后留取绒毛组织。正常流产组行人工流产术时留取胎盘绒毛组织。绒毛组织用无菌磷酸盐缓冲液反复冲洗后,放入4%的福尔马林溶液进行固定,用于

后续的石蜡包埋和切片。载玻片用多聚赖氨酸包被,组织切片厚度约为4 μm,55℃烤干,4℃冰箱保存备用。

1.3 免疫组化 常规进行石蜡包埋和切片(4 μm),二甲苯进行脱蜡后通过下行梯度酒精水化、320 W微波照射5 min进行抗原修复。漂洗后,加入山羊血清封闭液进行封闭,20 min后依次加入一抗(室温1 h)、二抗(37℃ 1 h),DAB显色(5 min),苏木精复染(2 min),乙醇梯度脱水,中性树胶封片,进行镜检采集图像。结果由专业医生采用双盲法进行计数。随机选取5个视野进行计数,每个绒毛中的阳性细胞数/滋养细胞数,取平均值。细胞核或细胞质内有棕色颗粒表示该组织细胞内有相应的抗原(多肽和蛋白质)为阳性,没有棕色表示该组织细胞内没有相应抗原为阴性。

1.4 统计学方法 采用SPSS 24.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间计量资料比较采用 t 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组绒毛组织中CDX2、GATA3、TFAP2C与Ki67蛋白表达示意图见封二图1

由封二图1可见,相较于正常流产组,RSA组免疫组化结果显示,CDX2的特异性的表达分布在绒毛组织滋养层细胞的细胞核中;TFAP2C的表达主要分布在绒毛组织滋养层细胞的细胞核中,但同时在部分合体滋养层细胞也有表达;GATA3的表达主要分布在绒毛组织滋养层细胞的细胞核中,但合体滋养层细胞也有少量表达;Ki67的表达主要分布在绒毛组织滋养层细胞的细胞核中,同时在部分绒毛柱中也有Ki67表达。

2.2 两组绒毛组织滋养层细胞中CDX2、GATA3、TFAP2C与Ki67表达比较见表2

表2 两组绒毛组织滋养层细胞中CDX2、GATA3、TFAP2C与Ki67表达比较

组别	CDX2	GATA3	TFAP2C	Ki67
RSA组	21.13 ± 2.30*	17.88 ± 2.99*	70.68 ± 8.34	14.88 ± 2.84*
正常流产组	64.38 ± 3.42	71.13 ± 4.14	75.11 ± 7.51	62.38 ± 3.41

注:*,与正常流产组比较, $P < 0.05$ 。

由表2可见,与正常流产组比较,CDX2、GATA3与Ki67在RSA组绒毛组织滋养层细胞中的表达均明显减少(t 分别=10.49、11.59、10.71, P 均<0.05),而TFAP2C在两组滋养层细胞中的表达无明显差异

($t=0.50, P > 0.05$)。

3 讨论

RSA发病原因复杂。绒毛组织中滋养细胞作为胎盘组织的主要细胞类型,其增殖、分化、侵袭和迁

移能力的异常与妊娠失败密切相关^[6]。近年来许多学者指出发现滋养细胞的功能异常与某些蛋白的表达异常相关。

CDX2属尾型同源框转录因子,目前已有研究证实其是滋养外胚层早期特化的关键调控因子之一,对滋养外胚层细胞起维持的作用^[7]。利用基因敲除技术,降低CDX2的表达,促进滋养外胚层细胞凋亡,进而导致胚胎不能着床^[8]。最近研究结果证明转录因子GATA3在促进滋养层细胞命运中与CDX2起平行作用^[3]。进一步的研究显示,下调GATA3可降低CDX2在小鼠胚胎中的表达,抑制桑葚胚向囊胚的转化^[9]。本次研究结果显示,CDX2与GATA3在RSA的绒毛组织滋养层细胞中的表达明显减少(P 均 <0.05),表明CDX2、GATA3可能是导致绒毛组织滋养层细胞侵袭能力降低,孕卵发育受阻,妊娠失败的原因。

TFAP2C是AP2家族成员之一,存在于着床前胚胎的所有细胞中。在体外,胚胎干细胞系以未分化状态表达TCFAP2C,以及在向滋养外胚层细胞分化过程中表达TCFAP2C。进一步的研究证明TCFAP2C和CDX2协同覆盖多能性程序,并在小鼠胚胎中对胚胎外滋养层起维持作用^[10]。本次研究结果显示,TCFAP2C在两组的绒毛组织滋养层细胞中的表达无明显差异($P>0.05$),提示TCFAP2C的表达可能与RSA的发生无明显相关。值得注意的是,部分合体滋养层细胞中观察到TFAP2C和GATA3的表达,其原因有待进一步的研究。

最近研究表明,滋养层细胞增殖的过程是妊娠进展的重要调节因素,增殖过度或不足都会导致不良妊娠结局的发生。Ki67作为一个细胞增殖的标记物可准确地反映细胞增殖活性,细胞分裂活跃即可见其大量表达。Elsalam等^[11]发现Ki67的表达在自然流产的滋养层细胞中明显低于同时期选择性流产病例。本次研究结果显示,Ki67的表达主要分布在绒毛组织滋养层细胞的细胞核中,同时在部分绒毛柱中也有Ki67表达,RSA组患者的绒毛组织滋养层细胞中Ki67表达明显减少($P<0.05$),表明绒毛组织滋养层细胞增殖减弱,Ki67与RSA有一定的相关性。

综上所述,CDX2、GATA3与Ki67在RSA患者绒毛组织中的表达明显低于正常流产患者,表明CDX2、GATA3与Ki67可望成为RSA有价值的生物标记物,为RSA的发病机制提供理论依据。本次研究中也存在一定的不足之处。首先,没有评估

CDX2、GATA3与Ki67轴对绒毛滋养层细胞的调控作用。第二,临床样本较小,可能导致统计误差,需要进一步进行更多样本的研究来证实结果。

参考文献

- 1 Toth B, Jeschke U, Rogenhofer N, et al. Recurrent miscarriage: Current concepts in diagnosis and treatment[J]. J Reprod Immunol, 2010, 85(1): 25-32.
- 2 Sun Q, Zhang XL. Research on apoptotic signaling pathways of recurrent spontaneous abortion caused by dysfunction of trophoblast infiltration[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(3): 12-19.
- 3 Ralston A, Cox BJ, Nishioka N, et al. Gata3 regulates trophoblast development downstream of tead4 and in parallel to CDX2[J]. Development, 2010, 137 (3): 395-403.
- 4 Xiao L, Ma L, Wang Z, et al. Deciphering a distinct regulatory network of TEAD4, CDX2 and GATA3 in humans for trophoblast transition from embryonic stem cells[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867 (9): 118736.
- 5 Zhu M, Cornwall-Scoones J, Wang P, et al. Developmental clock and mechanism of de novo polarization of the mouse embryo[J]. Science, 2020, 370 (6522): 2703.
- 6 Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, et al. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage[J]. Hum Reprod Update, 2003, 9(2): 163-174.
- 7 Wu X, Song M, Yang X, et al. Establishment of bovine embryonic stem cells after knockdown of CDX2[J]. Sci Rep, 2016, 20(6): 28343.
- 8 Liu J, Luo X, Xu Y, et al. Single-stranded DNA binding protein SSBP3 induces differentiation of mouse embryonic stem cells into trophoblast-like cells[J]. Stem Cell Res Ther, 2016, 7(1): 79.
- 9 Home P, Ray S, Dutta D, et al. Gata3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates CDX2 gene expression[J]. J Biol Chem, 2009, 284(42): 28729-28737.
- 10 Kuckenbergh P, Buhl S, Woynecki T, et al. The transcription factor TCFAP2C / AP -2 gamma cooperates with CDX2 to maintain trophectoderm formation[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(13): 3310-3320.
- 11 Elsalam SA, Mansor AE, Sarhan MH, et al. Evaluation of apoptosis, proliferation, and adhesion molecule expression in trophoblastic tissue of women with recurrent spontaneous abortion and infected with toxoplasma gondii[J]. Int J Gynecol Pathol, 2021, 40(2): 124-133.

(收稿日期 2021-10-22)

(本文编辑 高金莲)