

海岛妇女早期复发性流产HO-1、MCP-1、NF-κB的表达及意义

孙琼琪 邬贤凤 罗慧琴

[摘要] 目的 探讨海岛妇女早期复发性流产(ERSA)血红素加氧酶-1(HO-1)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、核转录因子(NF-κB)的表达及意义。方法 选取30例ERSA患者与30例正常妊娠期因非计划妊娠要求终止而就诊的患者作为研究对象,分别作为ERSA组和对照组。分别采用qPCR、Western blot法检测,比较两组患者绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB的表达及含量变化,采用ROC曲线分析各指标预测ERSA发病的价值。结果 ERSA组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB mRNA水平均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=43.22、43.43、8.28, P 均 <0.05);ERSA组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB蛋白的表达均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=28.35、13.37、9.54, P 均 <0.05)。绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB mRNA水平联合检测ERSA的灵敏度和特异度最高,分别为72.41%和90.00%,AUC为0.84;绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB蛋白水平联合检测ERSA的灵敏度和特异度最高,分别为86.67%和86.66%,AUC为0.85。结论 ERSA患者绒毛蜕膜组织中的HO-1、MCP-1、NF-κB表达与正常妊娠妇女存在明显差异,其可作为预测ERSA发生的重要因子,且联合三者检测诊断效能更高。

[关键词] 早期复发性流产; 血红素加氧酶-1; 单核细胞趋化因子-1; 绒毛蜕膜组织

Expressions and significance of HO-1, MCP-1 and NF-κB in early recurrent abortion of island women

SUN Qiongying, WU Xianfeng, LUO Huiqin. Department of Gynecology, Zhoushan Hospital, Zhoushan 316000, China.

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and significance of heme oxygenase -1 (HO-1), monocyte chemoattractant -1 (MCP-1) and nuclear factor kappa B (NF-κB) in early recurrent abortion spontaneous (ERSA) of island women. **Methods** Thirty patients with ERSAs and 30 patients with unplanned pregnancy termination in normal pregnancy were selected as the research objects, respectively as ERSAs group and control group. qPCR and Western blot were used to detect and compare the expression and content changes of HO-1, MCP-1 and NF-κB in decidua tissue of two groups, and ROC curve was used to analyze the value of each index in predicting the onset of ERSAs. **Results** The mRNA levels of HO-1, MCP-1 and NF-κB in chorionic decidua tissue in ERSAs group were higher than those in control group ($t=43.22, 43.43, 8.28, P<0.05$). The protein expressions of HO-1, MCP-1 and NF-κB in chorionic decidua tissue in ERSAs group were higher than those in control group ($t=28.35, 13.37, 9.54, P<0.05$). The sensitivity and specificity of HO-1, MCP-1 and NF-κB mRNA in chorionic decidua tissue were 72.41% and 90.00%, respectively, and the AUC was 0.84. The sensitivity and specificity of HO-1, MCP-1 and NF-κB protein in chorionic decidua tissue were 86.67% and 86.66%, respectively, and the AUC was 0.85. **Conclusion** The expression of HO-1, MCP-1 and NF-κB in chorionic decidua tissue of patients with ERSAs is significantly different from that of normal pregnant women, which can be used as an important factor to predict the occurrence of ERSAs, and the combined detection and diagnosis of these three factors is more effective.

[Key words] early recurrent spontaneous abortion; heme oxygenase-1; monocyte chemoattractant-1; chorionic decidua tissue

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2023.009.006

基金项目:舟山市科技计划项目(2019C31099)

作者单位:316000 浙江舟山,浙江省舟山医院妇科

早期复发性流产(early recurrent spontaneous abortion, ERSAs)病因非常复杂,目前的主流研究认

为自身免疫失衡导致母体对胎盘产生排斥反应是关键因素,因此母胎界面的某些免疫因子与ERSA的关系引发关注^[1,2]。血红素加氧酶-1(heme oxygenase, HO-1)属微粒体酶,其产生是机体对非正常状态刺激的一种反应^[3]。研究发现从胚胎植入到分娩整个妊娠过程中单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)均发挥重要作用,而核转录因子(nuclear factor-kappa B, NF-κB)则是TLR下游信号通路里的一种核转录因子,参与胚胎早期发育及着床过程^[4,5]。本次研究对HO-1、MCP-1和NF-κB在ERSA患者中的表达进行分析,探讨它们在ERSA发生过程中的作用。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2019年5月至2021年5月浙江省舟山医院收治的30例ERSA患者纳入ERSA组,30例正常妊娠期因非计划妊娠要求终止而就诊的患者纳入对照组。ERSA组患者需满足ERSA诊断标准,即既往有两次或以上无诱因自然流产史,就诊时B超确诊胚胎停育^[6];同时子宫解剖结构正常,抗心磷脂抗体阴性,无TORCH感染和生殖道感染,甲状腺功能、凝血功能无异常,近期生活中未发生重大事件^[7]。对照组需要满足子宫及附件的检查正常,入组前已有一次或以上正常妊娠史,且既往无病理学流产史。所有患者均签署知情同意书,本次研究已获得医院伦理委员会批准,ERSA组和对照组年龄、体重指数、流产孕周、孕次、产次、收缩压和舒张压等一般资料见表1。两组比较,差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。

表1 两组一般资料比较

资料	ERSA组($n=30$)	对照组($n=30$)
年龄/岁	30.39±4.25	30.65±4.36
体重指数/kg/m ²	22.13±2.67	22.65±2.23
流产孕周/周	9.76±2.49	9.81±2.36
孕次/次	3.16±1.30	3.25±1.47
产次/次	1.53±0.92	1.59±0.54
收缩压/mmHg	115.32±9.54	116.21±9.63
舒张压/mmHg	76.41±8.23	79.85±8.54

1.2 方法 人工流产术后,分离孕囊的绒毛和蜕膜组织,生理盐水清洗后浸泡在10%福尔马林中。石蜡包埋,切片备用。

1.2.1 绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB mRNA的表达 采用qPCR法检测,从组织中抽提总

RNA,取适量组织样本加入1 ml Trizol(由Takara生产),分离核酸蛋白复合物,加入250 μl氯仿,剧烈震荡EP管,静置3~5 min后离心(12 000 r/min, 15 min),将上层RNA移至新的EP管沉淀RNA,再次离心10 min。收集RNA沉淀,去除上清,用5%乙醇洗涤两次,离心5 min风干,加入适量DEPC水,溶解沉淀,将RNA反转录为cDNA。设计RT-qPCR引物(见表2)。调配合适的引物退火温度和模板量进行预实验。使用2×SYBR Green Mix配制qPCR Mix,按照实际检测的样品数和重复量,调配适当的qPCR Mix。分装至AXYGEN qPCR8连管,微型离心机瞬时离心混匀qPCR体系。将上述样品放入IQ5荧光定量qPCR仪,SYBR Green法荧光定量qPCR以分析各基因的表达。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行各基因表达的相对定量。

表2 RT-qPCR检测引物信息

引物名称	引物序列(5'-3')
NF-κB	正向 GCTGGGATGAAGCATGGAAC
	反向 TGTCACCGCGTAGTCGAAAA
HO-1	正向 CCAGCAACAAAGTGCAAGATTC
	反向 GTGTAAGGACCCATCGGAGA
MCP-1	正向 CCCAAAGAAGCTGTGATCTTCA
	反向 GGTTCGCTGTCCAGGTGGT

1.2.2 绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF-κB蛋白的表达 采用Western blot检测:将组织称重后粉碎,加入RIPA缓冲液和PMSF,4℃下1 500 r/min匀浆,加入PMSF,冰上孵育,离心。取上清液保存,进行Bradford比色法进行蛋白质定量检测。SDS-PAGE电泳,将蛋白凝胶中的蛋白通过电流作用转移到转印膜上。转膜结束后,先用笔标记marker,再将NC膜置于立春红染色液中,室温5~10 min即可见红色条带,用洗涤缓冲液洗数次后洗掉红色条带,拍照,根据marker剪膜。封闭杂交膜,首先孵育一抗,4℃孵育过夜或(22℃~25℃)摇动孵育2 h。用1×PBST/TBST液洗膜3次×10 min,孵育二抗,4℃孵育2 h或室温(22℃~25℃)摇动孵育1 h。显影,以目的蛋白与β-actin的积分吸光度比值检测结果。

1.3 统计学方法 采用SPSS 18.0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;计数资料比较采用 χ^2 检验。诊断效能以受试者工作特征(receiver operat-

ing characteristic, ROC)曲线研究。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B mRNA水平见表3

表3 两组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B mRNA比较

组别	HO-1mRNA	MCP-1mRNA	NF- κ BmRNA
ERSA组	6.78±0.54*	5.37±0.53*	1.22±0.12*
对照组	1.98±0.28	1.12±0.08	1.01±0.07

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表3可见,ERSA组绒毛蜕膜组织中HO-1 mRNA、MCP-1 mRNA、NF- κ B mRNA水平均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=43.22、43.43、8.28, P 均 < 0.05)。

2.2 两组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B蛋白表达比较见表4

表4 两组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B蛋白表达比较

组别	HO-1蛋白	MCP-1蛋白	NF- κ B蛋白
ERSA组	1.23±0.15*	1.01±0.17*	0.98±0.14*
对照组	0.35±0.08	0.57±0.06	0.67±0.11

注:*,与对照组比较, $P < 0.05$ 。

由表4可见,ERSA组绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B蛋白的表达均高于对照组,差异均有统计学意义(t 分别=28.35、13.37、9.54, P 均 < 0.05)。

2.3 绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B mRNA水平预测ERSA的价值分析见表5

表5 绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B mRNA水平预测ERSA的价值分析

预测因子	最佳 临界值	灵敏度/ %	特异度/ %	AUC	95%CI
HO-1mRNA	2.79	58.62	86.00	0.74	0.61~0.89
MCP-1mRNA	1.40	63.33	83.33	0.75	0.62~0.87
NF- κ BmRNA	2.63	62.07	76.67	0.56	0.41~0.71
联合检测	-	72.41	90.00	0.84	0.73~0.94

由表5可见,绒毛蜕膜组织中HO-1 mRNA、MCP-1 mRNA、NF- κ B mRNA水平联合检测ERSA的灵敏度和特异度最高,分别为72.41%和90.00%,AUC为0.84。

2.4 绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B蛋白表

达情况预测ERSA的价值分析见表6

表6 绒毛蜕膜组织中HO-1、MCP-1、NF- κ B蛋白表达情况预测ERSA的价值分析

预测因子	最佳 临界值	灵敏度/%	特异度/%	AUC	95%CI
HO-1蛋白	0.50	66.70	83.33	0.79	0.66~0.92
MCP-1蛋白	0.78	60.00	79.33	0.80	0.68~0.93
NF- κ B蛋白	0.80	70.00	76.67	0.61	0.45~0.77
联合检测	-	86.67	86.66	0.85	0.75~0.96

由表6可见,绒毛蜕膜组织中HO-1蛋白、MCP-1蛋白、NF- κ B蛋白水平联合检测ERSA的灵敏度和特异度最高,分别为86.67%和86.66%,AUC为0.85。

3 讨论

在妊娠进程中,胎儿的生长发育依赖母体与胎盘间的血液循环^[8,9]。因此血管的形成是胚胎着床与妊娠成功的基础,而研究认为胎盘血管发育不良和内皮功能障碍也是诱导ERSA发生的重要原因^[10,11]。

本次研究结果显示,ERSA组HO-1 mRNA和蛋白水平均高于对照组(P 均 < 0.05),表明HO-1与ERSA的发病间存在显著相关性。HO-1基因表达的调控主要发生在转录水平,而HO-1蛋白主要存在于胎盘滋养细胞与绒毛间质^[12]。HO-1参与胎盘血管化,并能通过调节平滑肌细胞的收缩调节血管张力,维持母体与胎盘、胎儿间的循环^[13]。同时其可阻止游离血红素参与氧化反应,具有抗氧化功能。而机体在多种因素刺激下均可诱导HO-1的表达,包括热休克、缺血、缺氧、氧化应激过氧亚硝基和细胞运转障碍等等。多项体内外研究证实,HO-1表达下调或缺失可加速脂质在血管壁的沉积,导致更多的泡沫细胞形成,造成内皮功能障碍^[14]。

本次研究结果显示,ERSA组MCP-1 mRNA和蛋白表达均高于对照组(P 均 < 0.05),表明MCP-1与ERSA的发病间存在显著相关性。与陈慧等^[15]研究结果基本一致。在妊娠期中,母体血进入绒毛间隙后绒毛组织由低灌注低氧环境向高灌注高氧环境转变,导致细胞内会形成大量活性氧。若氧化自由基剧增,即可诱发严重氧化应激反应,导致ERSA。MCP-1正是与氧化应激和炎症反应相关的因子^[16,17]。人MCP-1基因定位于17号染色体,在子宫内膜、蜕膜、绒毛膜和胎盘中均有表达,一般情况下,将在母体激素分泌调控下与其受体相结合,促进胚胎植入子宫内膜。而过高的MCP-1水平有极大可能激活单核巨噬细胞,使之分泌前列腺素E2,

引起宫缩增加,导致流产。

正常情况下,NF- κ B存在于胞浆内,由p65和p50组成,与抑制因子I κ B-a和I κ B-b相互结合,对相关的靶基因进行调控。当细胞受到氧化反应等刺激,I κ B磷酸化,NF- κ B激活并进入细胞核,与靶基因结合后产生大量的炎症介质,引起炎症反应爆发^[18]。并且基因的产物也会刺激大量NF- κ B生成,加重病变部位炎症反应。本次研究结果显示,ERSA组NF- κ B mRNA和蛋白表达均高于对照组(P 均 < 0.05),表明NF- κ B与ERSA的发病间存在显著相关性。冯晓玲等^[19]研究也证实了NF- κ B在抗心磷脂抗体阳性复发性流产患者的蜕膜、血清中表达比正常孕妇显著升高,认为其可能参与了血栓、炎症进程,并与流产发生相关。

既往鲜有研究分析HO-1、MCP-1、NF- κ B表达变化在ERSA中的临床意义,在验证ERSA患者绒毛蜕膜组织中的HO-1、MCP-1、NF- κ B表达异常后,本次研究进一步利用ROC曲线分析了三者的临床意义。结果显示,三种指标联合检测灵敏度、特异度和AUC最高,表明联合检测三种指标能够提高诊断效能。

综上所述,ERSA患者绒毛蜕膜组织中的HO-1、MCP-1、NF- κ B表达与正常妊娠妇女存在明显差异,其可作为预测ERSA发生的重要因子,且三者联合检测诊断效能更高。

参考文献

- 肖润颖,肖建华,王比男,等.基于转录组学的不明原因复发性流产关键基因及机制分析[J].中南医学科学杂志,2021,49(2):162-168.
- 梁雪琼,黄彩云,严丽花,等.低分子肝素钙联合传统安胎治疗复发性流产的临床研究[J].岭南急诊医学杂志,2020,25(6):635-637.
- 李莉,王海燕,李蓉,等.不明原因复发性流产患者血清细胞因子的变化[J].中国计划生育学杂志,2020,28(12):2084-2087.
- 乔敏霞,王君,关三丽,等.早期妊娠绒毛膜隆起的妊娠结局及临床转归[J].中国妇幼健康研究,2021,32(1):102-106.
- 梁玉贞,刘杰.妊娠期高血压患者血清VEGF、IL-18、MCP-1水平及与血液流变学指标关系[J].中国计划生育学杂志,2020,28(1):60-63.
- Yin L, Li J, Wang M, et al. Dietary high protein-induced diarrhea and intestinal inflammation by activation of NF- κ B signaling in piglets[J]. Animal Nutrition, 2021, 7(4):1070-1077.
- 陈海波,陈宗存.联合应用血清CA125、IL-17及尿碘水平在先兆流产及保胎治疗中的预测价值[J].川北医学院学报,2021,36(5):596-598.
- 李琪雁,王铁英,汪田田,等.复发性流产免疫相关发病因素及研究进展[J].国际生殖健康/计划生育杂志,2020,39(6):499-503.
- 张立阳,杜宇舒,李佳钊,等.复发性流产患者妊娠早期绒毛膜下血肿的危险因素分析[J].中国实用妇科与产科杂志,2022,38(10):1013-1015.
- Yan Y, Fang L, Li Y, et al. Association of MMP2 and MMP9 gene polymorphisms with the recurrent spontaneous abortion: A meta-analysis[J]. Gene, 2021, 767(36):145173.
- Yang F, Zheng Q, Jin L. Dynamic function and composition changes of immune cells during normal and pathological pregnancy at the maternal-fetal interface[J]. Front Immunol, 2019, 10(25):2317.
- Peng Y, Yin S, Wang M. Significance of the ratio interferon- γ /interleukin-4 in early diagnosis and immune mechanism of unexplained recurrent spontaneous abortion [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2021, 154(1):39-43.
- 申思楠,牟珍妮,唐丽,等.基于Nrf2/HO-1信号通路的寿胎丸对复发性流产大鼠的影响[J].中国中医药信息杂志,2023,30(3):63-68.
- Fernández-Mendivil C, Luengo E, Trigo-Alonso P, et al. Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism[J]. Redox Biol, 2021, 38(4):101789.
- 陈慧,陈虹,吴儒佳.趋化因子RANTES和MCP-1在不明原因复发性流产早期诊断中的作用[J].贵州医科大学学报,2021,46(6):734-738.
- Daniela B, Vijay K, Vibha K, et al. Thrombin impairs the angiogenic activity of extravillous trophoblast cells via monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): A possible link with preeclampsia[J]. Reproduct Biol, 2021, 21(3):2261-2264.
- 叶棋浓,苏国富,黄翠芬.人单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)基因的qPCR扩增、克隆及序列分析[J].中华微生物和免疫学杂志,2021,27(1):29-32.
- Zamani AM, Elham H, Reza J, et al. Evaluation of Toll-like receptor 3 (TLR3) signaling pathway genes and its genetic polymorphisms in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis[J]. J Gynecol Obstet Hum, 2021, 50(9):102153.
- 冯晓玲,常卓,潘琳,等.TNF- α 、NF- κ B在抗心磷脂抗体阳性复发性流产患者蜕膜和血清中表达及相关性分析[J].世界中西医结合杂志,2020,15(6):991-994.

(收稿日期 2023-02-09)

(本文编辑 高金莲)