

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.019.html>

◇临床医学研究◇

转录因子 Twist 与 Snail 在胎盘植入孕产妇胎盘中的表达及其与上皮间质转化关系

陈先侠, 王海霞, 卢晓倩, 蒋晓敏, 李兵, 吕红梅

摘要 目的 观察转录因子 Twist 及 Snail 在胎盘植入孕产妇胎盘中的表达, 探讨胎盘滋养细胞侵袭与胎盘植入发病的联系, 以及上皮间质转化(EMT) 在其中的作用。方法 收集 136 例胎盘植入孕产妇胎盘组织, 按照植入程度, 分轻度 47 例、中度 45 例、重度 44 例, 随机选取同期正常对照者 42 例(对照组)。采用免疫组织化学 SP 和 Western blot 法检测各组胎盘中 Twist、Snail 表达, 免疫组织化学 SP 法检测胎盘中 EMT 的 Vimentin 蛋白表达, 并进行相关性分析。结果 与对照组比较, 胎盘植入组胎盘中 Twist、Snail 蛋白表达水平显著增强, 且随着植入程度加重, 表达升高($P < 0.05, P < 0.01$)。胎盘植入组的胎盘中 Vimentin 阳性表达明显升高, 与 Twist、Snail 的蛋白表达呈正相关性($P < 0.05, P < 0.01$)。结论 胎盘植入孕产妇胎盘组织中 Twist、Snail 蛋白表达明显升高, 两者可能共同参与胎盘滋养细胞向子宫内膜的侵袭过程, 并介导 EMT 发生。

关键词 滋养细胞; 胎盘植入; 转录因子; 上皮间质转化

中图分类号 R 714.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1580-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.019

胎盘植入(placenta accreta) 是一种较为严重的妊娠并发症, 指胎盘的绒毛滋养层细胞不同程度的侵入子宫肌层。近年来, 随着孕妇剖宫产次数和人工流产次数的增加, 胎盘植入的发病率显著增高^[1]。胎盘植入可引起严重不良妊娠结局, 危及孕产妇和胎儿的生命。目前, 子宫因素(子宫蜕膜、肌间血管重塑障碍) 和滋养细胞侵袭能力增强是影响胎盘植入发病的主要因素^[2]。在某些生理和病理情况下, 上皮细胞可以向间充质细胞转化, 即上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 是肿瘤形成、肿瘤浸润转移和恶性发展的关键环节^[3]。转录因子 Twist 和 Snail 基因最先在果蝇中被发现, 与胚胎生长发育中细胞迁移调控相关, 是

EMT 最基本的转录因子, 具有癌基因的特征, 在恶性肿瘤中呈现高表达, 早期参与调控 EMT, 影响肿瘤细胞的迁移和侵袭^[4]。Twist 和 Snail 基因参与 EMT 调控, 对胚胎发育和肿瘤的转移发挥重要调控作用, 而胎盘植入发病中, 滋养细胞向子宫内膜的侵袭类似于肿瘤细胞具有的迁移和侵袭特点, 同时在 EMT 中, 波形蛋白(Vimentin) 是最为重要的一种基质形成的弹性蛋白^[5]。该研究通过检测 Twist、Snail 在正常胎盘和绒毛植入胎盘组织中的表达, 探讨 Twist、Snail 与滋养细胞侵袭性的关系, 以及 EMT 在胎盘植入中联系, 旨在进一步认识胎盘植入发病机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 178 例胎盘组织为 2013 年 1 月~2017 年 12 月在医院定期产前检查和分娩的孕产妇, 其中正常对照者 42 例(对照组), 136 例胎盘植入孕产妇(胎盘植入组) 分娩后均经两名病理科医师独立阅片确诊, 参照文献^[6] 中华医学会《胎盘植入诊治指南(2015)》的植入程度分组: 分轻度组(47 例), 即胎盘粘连, 胎盘绒毛植入侵及子宫肌层; 中度组(45 例), 胎盘绒毛植入深层 \geq 子宫肌层 1/2, 但未侵及子宫浆膜层; 重度组(44 例), 即穿透性胎盘植入, 胎盘绒毛植入穿透至子宫浆膜层, 可侵及子宫外膀胱或直肠等邻近组织。两组一般情况见表 1。与对照组比较, 胎盘植入组孕产妇的年龄增大, 妊娠次数和流产次数增多, 分娩孕周较小($P < 0.05, P < 0.01$)。纳入该项研究的孕产妇均排除围产期心肌病、妊娠期高血压、糖尿病和胎膜早破等病史。对照组和胎盘植入组孕产妇对本次研究胎盘标本收集处理均知情, 并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本和试剂 胎盘娩出后, 迅速取胎盘母体面的胎盘组织 2 块(约 1.0 cm \times 1.0 cm \times 1.0 cm), 取材时, 正常组选取母体面胎盘中间带部位, 胎盘植入组选取粘连或植入部位, 注意避开出血、坏死、钙化处。用于 Western blot 检测的一块组织迅速置于

2018-05-22 接收

基金项目: 安徽省公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 17040804043)

作者单位: 安徽省妇幼保健院危急重产科, 合肥 230001

作者简介: 陈先侠, 女, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chenxx391@sohu.com

-80℃冰箱保存备用;另一块标本常规处理制备石蜡切片,进行免疫组织化学检测,标本固定于10%福尔马林溶液。主要试剂包括:兔抗人Vimentin多克隆抗体、羊抗人Twist多克隆抗体、羊抗人Snail多克隆抗体、羊抗人 β -actin多克隆抗体均购自美国Santa Cruz生物技术有限公司;即用型SP免疫组化和二氨基联苯(DAB)显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

表1 两组孕产妇的一般临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

| 项目 | 对照组 (n=42) | 胎盘植入组 (n=136) | t值 | P值 |
|----------|---------------|------------------|-------|--------|
| 年龄(岁) | 29.5±3.6 | 31.8±5.2 | 2.986 | 0.039 |
| 妊娠次数(次) | 2.6±0.8 | 3.7±1.3 | 4.623 | 0.006 |
| 产次(次) | 0.8±0.4 | 1.2±0.7 | 3.524 | 0.016 |
| 流产次数(次) | 0.9±0.6 | 1.4±0.9 | 3.276 | 0.012 |
| 剖宫产次数(次) | 0.3±0.3 | 0.8±0.4 | 6.257 | <0.001 |
| 分娩孕周(周) | 38.7±2.9 | 35.1±3.8 | 3.329 | 0.014 |

1.2.2 免疫组化检测Twist、Snail蛋白表达和结果数量判定 采用免疫组织化学SP法检测蛋白表达,操作步骤严格按照使用说明书进行。胎盘组织常规脱水、石蜡包埋,厚4 μ m连续切片,烤片、脱蜡、微波抗原修复,山羊血清封闭,滴加一抗(Twist,抗体稀释度为1:100; Snail,抗体稀释度为1:150)50 μ l,4℃孵育过夜,冲洗后滴加生物素标记的二抗(1:200稀释)50 μ l,滴加DAB工作液显色,苏木精复染,中性树胶封固。以PBS代替一抗为阴性对照。利用Nikon 4500显微镜摄片,Twist、Snail表达阳性结果为细胞质或胞核染成棕黄色,每张切片随机选取5个 $\times 200$ 倍视野,计数阳性染色细胞数。

1.2.3 Western blot分析Twist、Snail蛋白表达 取出低温保存的胎盘组织,在玻璃匀浆器中加入1%体积分数的RIPA裂解液进行匀浆,冰中超声破碎,4℃、12 000 r/min离心5 min,取上清提取蛋白,应用BCA法进行蛋白质定量,蛋白样品煮沸变性,SDS-PAGE电泳,分别加入羊抗人Twist、Snail一抗(均为1:1 500稀释),蛋白质湿法转移至硝酸纤维素膜,生物素化兔抗羊二抗(1:2 000稀释),室温孵育2 h,ECL化学发光法显色,Image J凝胶成像分析系统扫描成像,测定目标条带的光密度值,以 β -actin为内参,比较同一胎盘组织目标条带与 β -actin的光密度值,进行半定量分析。

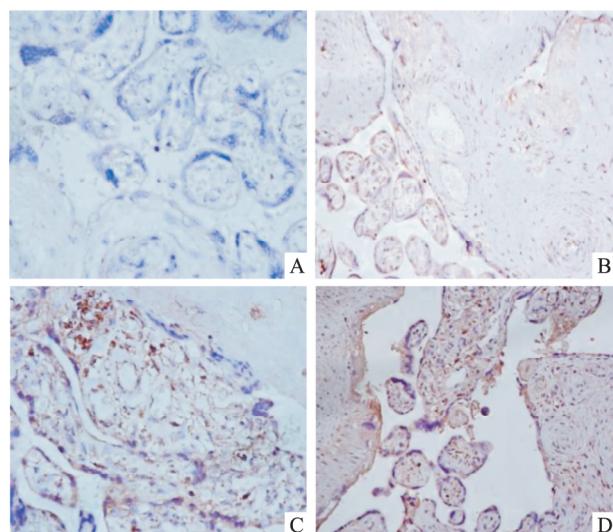
1.2.4 EMT检测和相关性分析 采用免疫组化染色SP法显示胎盘组织中Vimentin蛋白表达,并与转录因子Twist、Snail蛋白表达结果进行相关性分

析。免疫组化染色方法和结果判断与1.2.2步骤相同。组织为前述两种转录因子连续切片的邻片,观察并分析各组免疫组化染色切片结果图像。

1.3 统计学处理 应用SPSS 18.0软件进行分析,临床资料和实验结果的计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用t检验比较组间数值,相关性研究采用 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 胎盘组织中Twist、Snail蛋白的表达情况 免疫组化SP染色结果显示,Twist、Snail阳性染色结果显示胎盘的绒毛细胞或平滑肌细胞等细胞质或细胞核有棕黄色颗粒沉着,对照组胎盘组织中Twist(图1A)、Snail(图2A)表达较弱,胎盘植入组织中Twist、Snail表达明显增强,且随着胎盘植入程度的加重,即Twist、Snail表达由胎盘粘连的轻度组(图1B、2B)到胎盘植入的中度组(图1C、2C)再到穿透性胎盘植入重度组(图1D、2D)呈逐渐增强趋势。采取南京大学捷达80i软件计数阳性细胞数,结果见图3,与对照组阳性染色细胞数比较,胎盘植入组阳性细胞数显著增多,且随着胎盘植入程度的加重,增多趋势有显著性($P < 0.05$ $P < 0.01$)。

图1 胎盘母体面组织中Twist蛋白表达 $\times 200$

A:对照组;B:轻度组;C:中度组;D:重度组

2.2 Western blot法检测Twist、Snail蛋白表达

Western blot法检测各组胎盘组织中Twist、Snail蛋白与对照组胎盘组织比较,随着绒毛植入程度的增加,即由轻度胎盘粘连到中度胎盘植入,再到穿透性胎盘植入,胎盘组织中Twist、Snail蛋白灰度呈升高

趋势。灰度比值 Image J 软件半定量分析显示 胎盘植入组胎盘组织中 Twist / β -actin、Snail / β -actin 显著高于对照组胎盘组织中 Twist / β -actin、Snail / β -actin。见图 4。

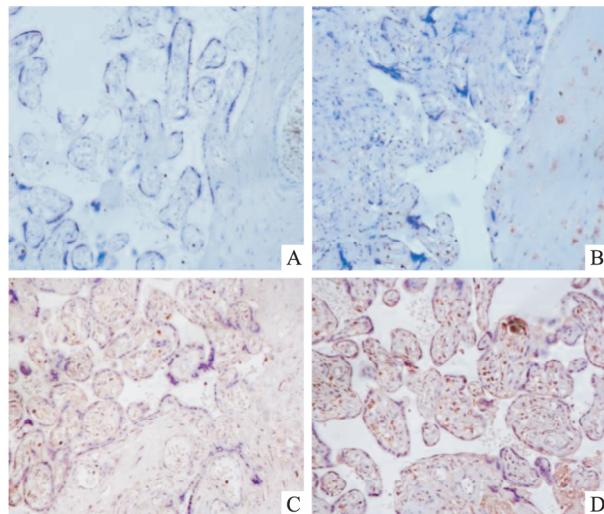


图 2 胎盘母体面组织中 Snail 蛋白表达 $\times 200$

A: 对照组; B: 轻度组; C: 中度组; D: 重度组

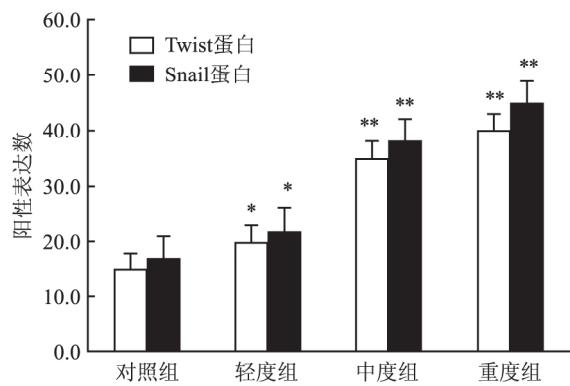


图 3 胎盘母体面组织中 Twist、Snail 蛋白阳性细胞表达情况

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 胎盘组织中 Vimentin 蛋白表达及其与 Twist、Snail 蛋白表达的相关性 免疫组化 SP 染色结果显示, Vimentin 蛋白阳性染色结果显示胎盘细胞间质中有棕黄色物质沉着, 对照组表达较弱(图 5)。胎盘植入组 136 例中, 102 例 Twist 表达阳性, 其中 91 例 Vimentin 阳性表达, 与 Twist 蛋白呈正相关性($r = 0.180$, $\chi^2 = 7.682$, $P = 0.006$)。Snail 蛋白 Vimentin 蛋白表达随着胎盘植入程度的加重呈逐渐增强趋势, 97 例 Snail 蛋白表达阳性中, 有 82 例 Vimentin 阳性表达, 与 Snail 蛋白呈正相关性($r = 0.154$, $\chi^2 = 5.551$, $P = 0.018$)。

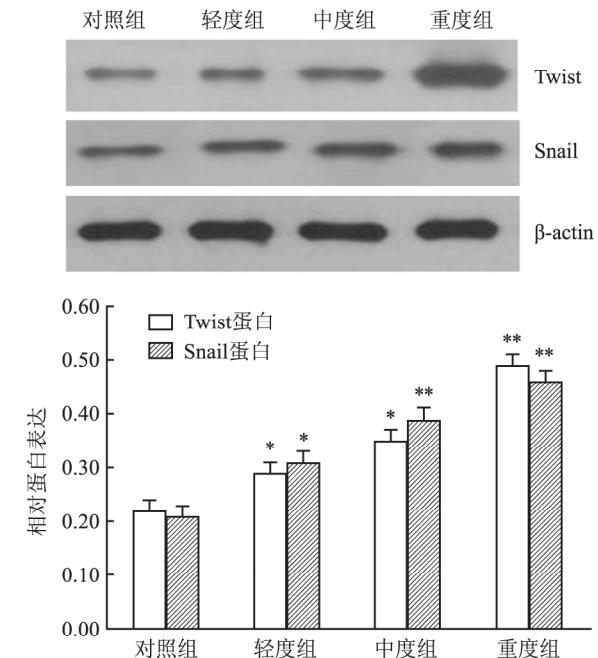


图 4 Western blot 检测胎盘组织中 Twist、Snail 蛋白表达
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

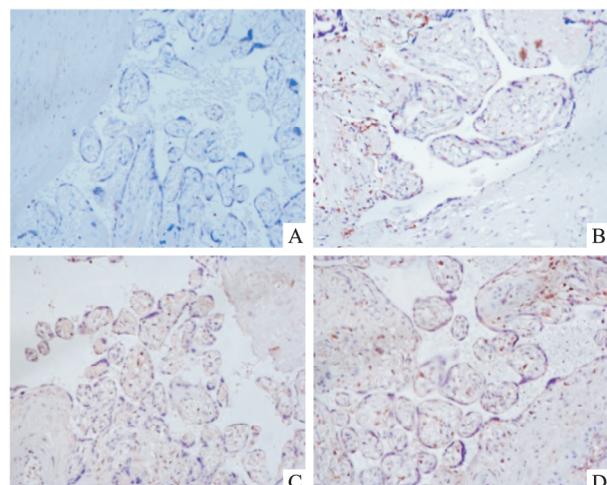


图 5 胎盘母体面组织中 Vimentin 蛋白阳性表达 $\times 200$

A: 对照组; B: 轻度组; C: 中度组; D: 重度组

3 讨论

高血压和产科性出血是孕产妇最为严重的不良妊娠, 导致严重产科性出血的主要因素是胎盘植入^[1]。研究^[7]显示, 孕产妇胎盘植入是发生严重不良妊娠结局的独立危险因素。胎盘植入是指部分或全部绒毛侵及子宫肌层, 根据植入的不同程度, 可分为胎盘粘连、胎盘植入和穿透性胎盘植入 3 种类型; 妊娠期间, 滋养层细胞增殖、迁移进入绒毛间质中, 类似于肿瘤细胞的侵袭性。本组研究和以往研究类似, 与正常孕产妇比较, 胎盘植入组孕产妇存在年龄增大、妊娠次数和流产次数增多、分娩孕周减小的特

点。

转录因子 Twist 具有癌基因作用,在多种恶性肿瘤中高表达,引起肿瘤细胞早期转移;而转录因子 Snail 不仅调控肿瘤细胞迁移,而且与肿瘤细胞侵袭性密切相关^[8]。在正常孕妇胎盘形成过程中,胎儿的丛密绒毛膜进入母体的基蜕膜,从基蜕膜的毛细血管间隙获取营养,进行母胎间的物质交换;而胎盘植入孕妇胎盘形成过程中,滋养细胞向子宫平滑肌间结缔组织和浆膜下浸润,细胞间连接作用降低甚至缺失,侵袭能力增强是导致胎盘植入发病的主要因素^[9]。本研究通过免疫组化 SP 法和 Western blot 实验均证实,与正常对照组胎盘组织比较,胎盘植入组胎盘组织中 Twist、Snail 蛋白表达明显增强,且随着绒毛植入程度的增加,Twist、Snail 蛋白表达呈上升趋势,表明转录因子 Twist、Snail 参与胎盘植入的发生和发展过程,故两种蛋白的表达升高可能参与胎盘植入发病。

在恶性肿瘤发展过程中,EMT 是指上皮细胞转化为间充质细胞,表现为细胞表型改变,上皮细胞间黏附功能降低,细胞极性消失,运动和迁移功能上升。诱导 EMT 的转录因子如 Twist 与 Snail 表达上调,结缔组织间充质中表型标志物波形蛋白 (Vimentin) 表达上调,Vimentin 是组成细胞骨架的中间丝蛋白家族成员,表达于各种间充质细胞来源的细胞中,为间充质细胞及其来源肿瘤的特异性标志物^[10]。转录因子 Twist、Snail 是 EMT 中关键的调控因子,两者的表达升高引起细胞间连接作用下降,上皮特性减弱,间充质细胞表型增强,促进 EMT 发展,最终细胞迁移侵袭能力增强。本研究采用免疫组化检测显示,Vimentin 蛋白阳性在正常组表达较弱,而胎盘植入组织表达升高,且有随着胎盘植入程度的加重而逐渐增强趋势。采用 Spearman 相关性分析显示,胎盘组织中 Vimentin 阳性表达与 Twist 蛋白、Snail 蛋白呈正相关性,表明 Twist、Snail 蛋白表达升

高可能会促进 EMT 转化,参与胎盘植入发病,抑制 Twist、Snail 蛋白表达可能会降低因胎盘植入导致的严重不良妊娠结局。

参考文献

- [1] Lim G, Horowitz J M, Berggruen S, et al. Correlation of probability scores of placenta accreta on magnetic resonance imaging with hemorrhagic morbidity [J]. *J Clin Anesth*, 2016, 34: 261–9.
- [2] Farquhar C M, Li Z, Lensen S, et al. Incidence, risk factors and perinatal outcomes for placenta accreta in Australia and New Zealand: a case-control study [J]. *BMJ Open*, 2017, 7 (10): e017713.
- [3] Wallesch M, Pachow D, Blücher C, et al. Altered expression of E-Cadherin-related transcription factors indicates partial epithelial-mesenchymal transition in aggressive meningiomas [J]. *J Neurol Sci*, 2017, 380: 112–21.
- [4] Zhang P, Hu P, Shen H, et al. Prognostic role of Twist or Snail in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Clin Invest* 2014, 44(11): 1072–94.
- [5] Niknami Z, Eslamifar A, Emamirazavi A, et al. The association of vimentin and fibronectin gene expression with epithelial-mesenchymal transition and tumor malignancy in colorectal carcinoma [J]. *EXCLI J* 2017, 16(9): 1009–17.
- [6] 中华医学会围产医学分会,中华医学会妇产科学分会产科学组. 胎盘植入诊治指南(2015) [J]. *中华妇产科杂志* 2015, 50(12): 970–2.
- [7] 李秀英,李晓梅,潘燕梅,等.胎盘植入严重不良妊娠结局相关危险因素分析 [J]. *中国妇产科临床杂志* 2016, 17(6): 519–22.
- [8] Yang M H, Chen C L, Chau G Y, et al. Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2009, 50(5): 1464–74.
- [9] 朱颖,曹云霞. 子宫发育异常患者妊娠结局分析 [J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(7): 1042–5.
- [10] Luo T, Wang L, Wu P, et al. Downregulated vimentin and upregulated E-cadherin in T1 stage non-small-cell lung cancer: does it suggest a mesenchymal–epithelial transition [J]. *Neoplasma*, 2017, 64(5): 693–9.

The expression of transcription factor of Twist and Snail proteins in the maternal placenta accreta and its relationship with epithelium-mesenchymal transformation

Chen Xianxia, Wang Haixia, Lu Xiaoqian, et al

(Dept of Critical Obstetrics, Anhui Women and Child Health Care Hospital, Hefei 230001)

Abstract Objective To observe the expression of transcription factor of Twist and Snail in maternal placenta accreta, and to explore the relations of placenta trophocyte invasive and incidence of placenta accreta, as well as the

网络出版时间: 2018-8-10 15:55 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.020.html>

血清 TNF- α 及 MGP 水平与维持性血液透析患者心脏瓣膜钙化的关系

王 琪 韩林子 张 森 王德光

摘要 目的 探讨血清肿瘤坏死因子 (TNF- α) 及基质 Gla 蛋白 (MGP) 水平与维持性血液透析 (MHD) 患者心脏瓣膜钙化 (CVC) 的关系。方法 纳入 MHD 患者 66 例及年龄、性别相匹配的健康人群 31 例, 采用 ELISA 法检测血清 TNF- α 及 MGP 水平。超声心动图检测受试者是否伴有 CVC。结果 与对照组比较, MHD 患者血清 TNF- α 升高, MGP 降低, 且 CVC 发生率明显增高 (P 均 < 0.001); 在 MHD 患者中, CVC 组血清 TNF- α 明显较高 ($P < 0.05$) 而 MGP 较低 ($P < 0.01$); 另外 血清 MGP 水平与年龄、血清碱性磷酸酶、TNF- α 均呈负相关性 (P 均 < 0.05); 多因素 Logistic 回归分析显示, 透析龄和高血清 TNF- α 是 CVC 的独立危险因素 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 高血清 MGP 是 CVC 的保护因素 ($P < 0.05$)。结论 血清 TNF- α 及 MGP 水平与 MHD 患者心脏瓣膜钙化密切相关, TNF- α 同透析龄一样, 为 CVC 发生的独立危险因素, MGP 为其保护因素。

关键词 血液透析; TNF- α ; MGP; 心脏瓣膜钙化

中图分类号 R 692.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)10-1584-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.020

2018-05-23 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085MH148)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院肾脏内科, 合肥 230601

作者简介: 王 琪, 女, 硕士研究生;

王德光, 男, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangdeguang@ahmu.edu.cn

维持性血液透析 (maintenance hemodialysis, MHD) 患者常出现骨以外的软组织钙化, 包括血管钙化和心脏瓣膜钙化 (cardiac valve calcification, CVC)。心脏瓣膜钙化是新发心血管事件和心血管死亡的独立危险因素, 也是动脉粥样硬化、左心室肥厚、动脉钙化等心血管疾病发病率和死亡率的强烈预测因子^[1]。

研究^[2]表明, MHD 患者体内存在微炎症状态并可能参与血管钙化的形成。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 是一种具有多种生物学效应的细胞因子, 也是被证实的在体内外可促进血管钙化的炎症因子。但 TNF- α 与心脏瓣膜钙化的关系尚无相关研究; 基质 Gla 蛋白 (matrix Gla protein, MGP) 是血管平滑肌细胞分泌合成的蛋白, 具有抑制血管钙化的作用, 参与多种血管病理生理过程。该研究测定 MHD 患者血清中 TNF- α 和 MGP 水平, 并探讨其与心脏瓣膜钙化的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 病例组选自 2016 年 7 月 ~ 2016 年 10 月在安徽医科大学第二附属医院肾脏内科病房住院的 MHD 患者 66 例。入选标准: ① 年龄 ≥ 18 岁; ② 充分透析, 每周 3 次, 每次至少 4 h; ③ 规律血液透析 3 个月或以上。排除标准: ① 急性期感染;

epithelium-mesenchymal transformation (EMT). **Methods** A total of 136 cases of placental tissue were collected during the childbirth, according to the degree of placenta accreta, mild 47 cases, moderate 45 cases and severe 44 cases, 42 cases of normal control group. The expression of Twist and Snail proteins in the placenta was detected by immunohistochemical SP and Western blot methods. Immunohistochemical SP method was used to detect the expression of Vimentin protein in EMT in placenta and the correlation analysis was performed. **Results** Compared with the control group, the expression levels of Twist and Snail proteins in placenta were significantly increased in the placenta and the expression level was positively correlated with the degree of implantation ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Vimentin positive in placental accrete group was obviously higher, and Twist and Snail proteins expression were positively correlated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The expressions of Twist and Snail proteins in placenta of placenta accrete are significantly increased, which may be involved in the invasive process of placental trophoblast cells toward the endometrium, and the occurrence of EMT.

key words trophoblast cells; placenta accrete; transcription factor; epithelium-mesenchymal transition