

PPAR γ 在绒毛组织中的表达与早期自然流产的关系

陈 果^{1,2} 程玲慧¹ 刘 波² 周曙光²

摘要 目的 研究过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 蛋白在正常早孕及早期自然流产患者绒毛组织中的差异表达,探讨 PPAR γ 与早期自然流产的关系。方法 应用免疫组化 PV 两步法、Western blot 法检测 PPAR γ 蛋白在正常早孕妇女(对照组 $n=40$) 和早期自然流产患者(实验组 $n=40$) 绒毛组织中的表达。结果 免疫组化显示 PPAR γ 蛋白主要在两组绒毛组织中细胞滋养层细胞及绒毛外滋养层细胞中表达; Western blot 法显示 PPAR γ 蛋白在实验组绒毛组织中的表达较对照组高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 PPAR γ 对妊娠早期滋养细胞浸润起负性调节作用,PPAR γ 蛋白表达水平增高,可能与自然流产的发生有关。

关键词 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 绒毛组织; 早期; 自然流产

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0214-03

自然流产是妊娠最常见的疾病,育龄女性发病率为 25%~50%^[1]。在研究其病因时发现,滋养细胞的侵袭能力下降等一系列生物学行为的异常可能导致流产。因此,深入探讨滋养细胞侵袭力下降的机制可能为自然流产的防治提供新的思路。过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator activated receptors, PPARs)是核内受体转录因子超家族成员,具有调节目标基因表达的功能^[2],分为 3 个亚型:PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ ,其中 PPAR γ 生物学功能最复杂,国内外对其研究也最多。Asami et al^[3]在啮齿动物中的实验数据显示,PPAR γ 在胎盘发育尤其是滋养细胞侵袭及分化中必不可少,表明 PPAR γ 在妊娠中扮演着重要的角色。然而在人类滋养细胞分化及侵袭能力中的确切作用及影响机制尚未准确阐明。该实验通过免疫组化 PV 两步法和 Western blot 法检测 PPAR γ 蛋白在早孕和早期自然

流产患者绒毛组织中的表达变化,为研究 PPAR γ 与自然流产的关系提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选择 2012 年 6 月~12 月于安徽医科大学妇幼保健临床学院(安徽省合肥市妇幼保健院)妇科门诊就诊的 40 例早期自然流产患者作为实验组,孕龄 6.8~9.8 周,年龄 20~41(28.2 \pm 5.2)岁,B 超显示无胚芽或无胎心搏动。同期就诊的正常早孕妇女,自愿要求终止妊娠者 40 例作为对照组,孕龄 6.5~9.6 周,年龄 19~39(28.1 \pm 5.2)岁,B 超证实胚胎发育正常。两组研究对象均无妊娠并发症,无不良孕产史,术前 1 个月未服用激素类药物,签署终止妊娠同意书。经负压吸引流产术获得两组新鲜绒毛组织,无菌条件下剪取一部分组织放于液氮中快速冻存用于提取 PPAR γ 蛋白,剩余另一部分经 4% 多聚甲醛固定后用于免疫组化。

1.1.2 主要试剂 PPAR γ 、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司);两步法免疫组化试剂盒、DAB 显色剂、山羊抗鼠 IgG(北京中杉金桥生物制剂公司);RIPA 蛋白裂解液(北京普里奥基因公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化方法 仔细阅读抗体说明书,严格控制操作步骤、实验条件,检测两组绒毛组织中 PPAR γ 蛋白表达情况,应用免疫组化 PV 两步法(抗体稀释浓度 1:150),各组显微照片的拍摄和冲洗均在相同条件下进行。

1.2.2 Western blot 法检测 分别定量检测对照组和实验组绒毛组织中 PPAR γ 蛋白表达水平,绒毛组织剪碎后加入 RIPA 裂解缓冲液 1 ml(含 10% PMSF),冰上充分裂解,将上清液中的可溶性蛋白转移至 PVDF 膜上(采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳方法)。转移后的 PVDF 膜用抗 PPAR γ (1:400) 和 β -actin (1:500) 行 Western blot 法检测,实验重复 3 次。Western blot 法进行灰度扫描,用 Image-Pro Plus 图像处理系统分析光密度值,有效值为特异性条带平均光密度值与面积的乘积,反映蛋白表达水平。

2014-09-28 接收

基金项目:安徽省年度科研计划(编号:10021303020)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院妇科,合肥 230022

²安徽省妇幼保健院(安徽医科大学妇幼保健临床学院),合肥 230032

作者简介:陈 果,女,硕士研究生;

程玲慧,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:chenglinghui71@163.com

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2 结果

2.1 实验样本比较 观察对照组和实验组年龄、孕龄、孕次、产次等临床特征, 结果显示差异无统计学意义。见表 1。

表 1 临床特征 ($n=40$ $\bar{x} \pm s$)

临床特征	对照组	实验组	t 值	P 值
年龄(岁)	28.1 ± 5.2	28.2 ± 5.2	-0.021	0.98
孕龄(年)	8.0 ± 0.6	8.0 ± 0.8	-0.125	0.90
孕次(次)	2.5 ± 1.2	2.6 ± 1.0	0.412	0.68
产次(次)	0.8 ± 0.6	0.9 ± 0.8	0.795	0.43

2.2 PPAR γ 绒毛组织中免疫组化分析 免疫组化显示 PPAR γ 蛋白在对照组与实验组绒毛组织中细胞滋养层细胞及绒毛外滋养层细胞中均有表达, 且实验组 PPAR γ 染色强度高于对照组。见图 1。

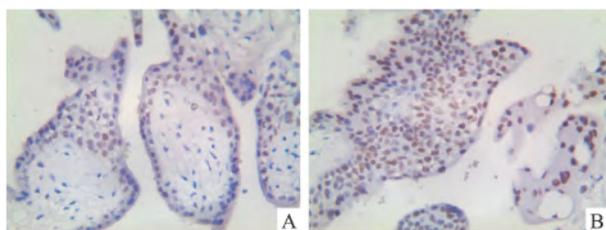


图 1 PPAR γ 在绒毛组织中表达 免疫组化 $\times 200$
A: 对照组; B: 实验组

2.3 PPAR γ 蛋白在对照组和实验组绒毛组织中的表达 PPAR γ 蛋白在实验组绒毛组织中的表达 (1.780 ± 0.120) 明显高于对照组 (1.046 ± 0.200), 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。表明 PPAR γ 蛋白可能参与了早期自然流产的病程。见图 2。

3 讨论

正常妊娠时, 滋养细胞侵入子宫蜕膜的机制虽与恶性肿瘤细胞的侵袭、浸润相似, 却受到精确的调控, 这一过程的失衡将会导致妊娠相关疾病的发生。滋养细胞浸润能力的下降, 无法形成维持正常妊娠时所需的低阻力血管可导致自然流产。因此, 深入探讨滋养细胞侵袭力下降的机制可能为提高早期妊娠成功率提供新的思路。

研究^[4]显示 PPAR γ 在妊娠期胎盘形成、发育过程中发挥着不可或缺的作用, 在人类妊娠相关性疾病(如子痫前期、妊娠期糖尿病、胎儿宫内生长受限

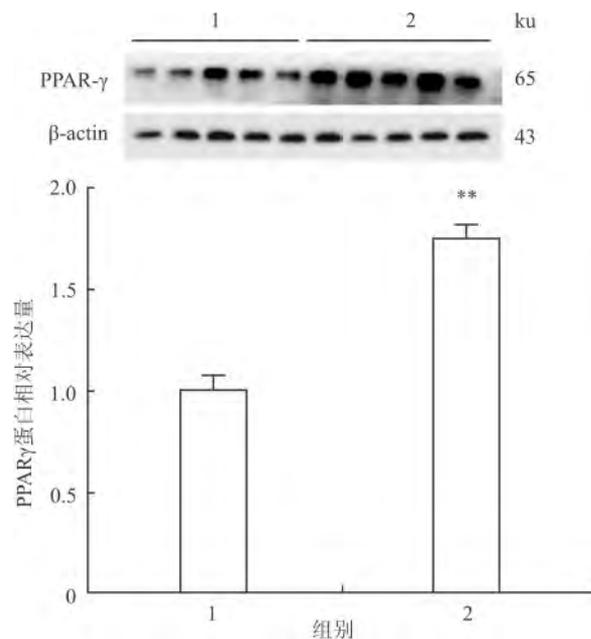


图 2 绒毛组织中 PPAR γ 蛋白相对表达量
1: 对照组; 2: 实验组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

等)的胎盘中均有异常表达。在 PPAR γ 缺失的小鼠中研究^[5]显示其终末滋养细胞分化及胎盘血管生成障碍, 最终导致胚胎死亡, 但通过嵌合体复位 PPAR γ 基因可以拯救这一状况。有研究^[6]显示 PPAR γ 激活后刺激细胞滋养层细胞, 促进其内分泌功能, 如 PPAR γ 参与了人绒毛膜促性腺激素 β 亚单位的合成, 对胎盘正常发育起重要作用。但目前对于其参与滋养细胞浸润和分化的确切机制尚未阐明, 尤其在早期自然流产中的表达变化方面, 国内对此研究甚少。本次试验通过研究实验组与对照组绒毛组织中 PPAR γ 的表达差异推测 PPAR γ 的表达异常可能是流产的病理生理因素之一。

研究^[7]表明 PPAR γ 只特定在滋养细胞中表达。孕早期, PPAR γ 蛋白主要在绒毛细胞滋养层中表达, 并且早在妊娠第 7 周即可在绒毛外滋养层细胞中测到^[8], 这与本次实验结果一致。本次研究对象为孕早期妇女, 显示 PPAR γ 蛋白在早孕及自然流产患者绒毛组织中细胞滋养层细胞及绒毛外滋养层细胞中均有表达。一方面, PPAR γ 被证实在正常的血管功能和滋养层血管系统分化中扮演了重要角色, 是正常妊娠中必不可少的; 另一方面, Rauwel et al^[9]用人类巨细胞病毒作为激活物, 激活 PPAR γ , 发现阻碍了早期胎盘滋养细胞侵袭。研究^[10]表明 PPAR γ 降低了胎盘血管形成必不可少的血管内皮生长因子的产生, 而流产的发生可能存在胎盘滋养细胞浸润能力不足, 不能形成符合正常妊娠所需的

低阻力血管。研究^[11]显示,孕6~8周到11~12周,PPAR γ 呈下降表达,而早孕期滋养细胞侵袭能力随孕周增加而逐渐增强,说明PPAR γ 负性调节滋养细胞的侵袭、浸润能力,对早孕期细胞滋养细胞的浸润行为起抑制作用。研究^[12]显示PPAR γ 的过度激活损害了胚胎植入和胎盘化,从而影响胚胎发育。本次实验中检测到实验组绒毛组织中PPAR γ 的高表达可能降低滋养细胞侵袭性,引起胚胎着床障碍,导致流产的发生。由此下一步可以扩大样本量,研究是否能将PPAR γ 作为早期诊断流产的标志物质,为防治早期流产提供新思路,并作为判断疗效的一项参考指标。

参考文献

- [1] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage [J]. *Lancet*, 2006, 368 (9535): 601-11.
- [2] Liu L F, Shen W J, Zhang Z H, et al. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPAR γ and adiponectin [J]. *J Cell Physiol* 2010 225(3): 837-45.
- [3] Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, et al. Expression and function of PPARgamma in rat placental development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(2): 497-501.
- [4] Holdsworth-Carson S J, Lim R, Mitton A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia [J]. *Placenta* 2010 31(3): 222-9.
- [5] Barak Y, Liao D, He W, et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1): 303-8.
- [6] Tarrade A, Schoonjans K, Guibourdenche J, et al. PPAR gamma/RXR alpha heterodimers are involved in human CG beta synthesis and human trophoblast differentiation [J]. *Endocrinology*, 2001, 142(10): 4504-14.
- [7] Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, et al. PPARs and the placenta [J]. *Placenta*, 2007, 28(2-3): 65-76.
- [8] Rodie V A, Young A, Jordan F, et al. Human placental peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma expression in healthy pregnancy and in preeclampsia and intrauterine growth restriction [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2005, 12(5): 320-9.
- [9] Rauwel B, Mariamé B, Martin H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by human cytomegalovirus for de novo replication impairs migration and invasiveness of cytotrophoblasts from early placentas [J]. *J Virol* 2010 84(6): 2946-54.
- [10] Peeters L L, Vigne J L, Tee M K, et al. PPARgamma represses VEGF expression in human endometrial cells: implications for uterine angiogenesis [J]. *Angiogenesis*, 2005, 8(4): 373-9.
- [11] 李淑娟, 尚涛, 李秋玲 等. PPAR γ 配体对早孕期细胞滋养细胞 MMP-2, MMP-9 表达的调控 [J]. *生殖与避孕*, 2007, 27(2): 107-12.
- [12] Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, et al. PPAR γ and human trophoblast differentiation [J]. *J Reprod Immunol*, 2011, 90(1): 41-9.

PPAR γ expressed in villi in the organization and the relationship with spontaneous abortion

Chen Guo^{1,2}, Cheng Linghui¹, Liu Bo², et al

(¹Dept of Gynaecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Gynaecology, Anhui Women and Child Health Care Hospital, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the protein expression of PPAR γ in villi of first trimester spontaneous abortion. **Methods** To detect the expression of PPAR γ in villi of normal first trimester pregnant women (control group $n=40$) and first trimester spontaneous abortion (experimental group $n=40$) by immunohistochemistry and Western blot. **Results** PPAR γ localisation was researched by immunohistochemical methods; and in control and experimental group, the protein was observed in both villous and extravillous trophoblast nuclei. Western blot analysis showed that in villi of experimental group, expression of PPAR γ was significantly increased than that of control group ($P<0.01$). **Conclusion** PPAR γ may play an important role in the modulation of trophoblast invasion, a significantly enhanced expression of PPAR γ is identified in villous and extravillous trophoblast of miscarriage patients may be one factor linked to spontaneous abortion.

Key words PPAR γ ; villi; first trimester; spontaneous abortion