

CSF-1 及其受体与早期自然流产关系的研究

胡继林¹⁾, 孙建军²⁾, 李树德³⁾, 柏青¹⁾, 罗芳¹⁾, 岳红萍¹⁾

(1) 云南省第三人民医院妇产科; 2) 云南省第三人民医院, 云南昆明 650011; 3) 昆明医科大学生物化学与分子生物学系, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨母胎界面局部细胞因子 CSF-1 及其受体与早期自然流产的关系。**方法** 采集 2009 年 8 月至 2011 年 12 月间来云南省第三人民医院进行人工流产及自然流产病例的绒毛及蜕膜组织各 30 例, 采用放射免疫法测定 2 组外周血中绒毛膜促性腺激素 (HCG) 含量, 利用免疫组织化学和 Western blot 检测嗜细胞集落刺激因子 (CSF-1) 及其受体 (CSF-1R) 表达情况。**结果** 自然流产组 HCG 值与人工流产组相比明显下降 ($P < 0.05$)。绒毛及蜕膜组织中 CSF-1 和 CSF-1R 2 组均有表达, 与人工流产组相比, 自然流产组均增加 ($P < 0.05$)。**结论** 适量的 CSF-1 和 CSF-1R 浓度维持妊娠的继续, 浓度过高则不利于妊娠, 可能是自然流产的原因之一。

[关键词] CSF-1; CSF-1 受体; 自然流产; 人工流产; HCG

[中图分类号] 714.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0114-05

The Relationship of CSF-1 and Its Receptor with Early Spontaneous Abortion

HU Ji-lin¹⁾, SUN Jian-jun²⁾, LI Shu-de³⁾, BAI Qin¹⁾, LUO Fang¹⁾, YUE Hong-ping¹⁾

(1) Dept. of Gynecology and Obstetrics, The Third Hospital of Yunnan Province; 2) The Third Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650511; 3) Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of Maternal-fetal interface local cytokine CSF-1 and its receptors with the occurrence of the early spontaneous abortion. **Methods** From August 2009 to December 2011, we collected 30 villi tissue samples with artificial abortion and 30 villi tissue samples with spontaneous abortion. At the same time, we collected 30 villi tissue samples with artificial abortion and 30 decidua tissue samples with spontaneous abortion, and 30 decidua tissue samples with spontaneous abortion. The human chorionic gonadotropin (HCG) was detected by radioimmunoassay in each group. The expressions of colony Stimulating Factor 1 (CSF-1) and colony Stimulating Factor 1 receptor (CSF-1R) were detected by Immunohistochemical staining and Western Blot in the villi tissue and decidua tissue in every group. **Results** The levels of HCG in the spontaneous abortion group were lower than those in the artificial abortion group ($P < 0.05$). The protein expression of CSF-1 and CSF-1R about the artificial abortion and spontaneous abortion in the the spontaneous abortion group were found. The protein expression levels of CSF-1 and CSF-1R about the artificial abortion and spontaneous abortion in the the spontaneous abortion group were higher than the artificial abortion group by immunohistochemical staining and Western Blot ($P < 0.05$). **Conclusions** The right concentrations of CSF-1 and CSF-1R maintain the pregnancy continued. However, The higher concentrations of CSF-1 and CSF-1R may be one of the factors leading to spontaneous abortion.

[基金项目] 云南省科技厅应用基础研究基金资助项目 (2008ZC089M)

[作者简介] 胡继林 (1982~), 男, 云南呈贡县人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事妇产科临床工作。

[通讯作者] 岳红萍. E-mail: yhp22951@sina.com

[Key words] Colony Stimulating Factor 1; Colony Stimulating Factor 1 receptor; Spontaneous abortion; Artificial abortion; Human chorionic gonadotropin

巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 又称为集落刺激因子-1 (colony stimulating factor 1, CSF-1), 主要调节单核-巨噬细胞系细胞的分化、增殖和生长。多种细胞均可产生 CSF-1, 包括骨髓基质细胞、子宫内膜中分泌型上皮细胞、成纤维细胞、脑星状细胞、成骨细胞。国内外许多研究发现 CSF-1 在胎盘、胎膜、种膜、子宫内膜、子宫肌层等组织中大量表达, 但 CSF-1 在人类子宫作用机制尚未清楚, 有关 CSF-1 及其受体在早期自然流产妊娠组织中的表达报道较少见。本文通过检测人工流产和自然流产的外周血中讨毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, HCG) 水平, 研究人工流产和自然流产的讨毛组织和脱膜组织的 CSF-1 及其受体的表达, 探讨 CSF-1 及其受体与自然流产的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2009 年 8 月至 2011 年 12 月间在云南省第三人民医院就诊孕 60 d 以内人工流产病例 30 例, 年龄在 20~45 岁, 平均 (28.85 ± 6.43) 岁; 孕 60 d 以内自然流产的病例 30 例, 年龄在 19~46 岁, 平均 (29.55 ± 6.43) 岁。有糖尿病、肿瘤、甲状腺疾病等家族史或既往史或合并相应疾病者除外, 有生殖器异常、不良习惯引起的流产者除外, 查 TORCH 均为阴性, 所有病例均通过患者知情同意。每例各取讨毛组织和种膜组织, 部分组织 10% 甲醛固定后, 石蜡包埋; 部分组织 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 主要试剂

HCG 检测试剂盒购自雅培生物公司; 兔抗鼠多克隆抗体 CSF-1 和 CSF-1R 购自北京博鳌生物公司; ECL 发光试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司, 生物素标记的山羊抗兔多克隆抗体购自北京中杉金桥公司。

1.3 方法

1.3.1 HCG 的检测 用血清经放射免疫法测定 2 组外周血中讨毛膜促性腺激素 (HCG) 水平。

1.3.2 免疫组织化学检测 CSF-1 和 CSF-1R 的表达 各组常规石蜡切片, 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶后, 正常血清封闭, 分别滴加 1:200 稀释

的兔抗鼠多克隆一抗 CSF-1 和 CSF-1R, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下过夜后, 滴加生物素标记的二抗 (山羊抗兔) 和辣根酶标记的链霉卵白素工作液, 常温条件下孵育 10 min, 采用 DAB 显色, 苏木精复染, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 用 PBS 代替一抗, 做阴性对照, 棕色为阳性着色, 各随机选取 5 个 400 倍的显微镜视野, MiPrd 免疫组化分析软件分析平均灰度值。

1.3.3 Western blot 检测 CSF-1 和 CSF-1R 的蛋白质水平 取讨毛组织或者脱膜组织, 按照 100 mg 组织:1 mL 组织裂解液, 电动匀浆器制作匀浆液, 采用 BCA 法测定匀浆液的蛋白质含量, 取各样本 70 μg 进行 SDS-PAGE 电泳, 半干转法将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶封闭 2 h 后分别加入 1:1 000 稀释的兔抗鼠多克隆一抗 CSF-1 和 CSF-1R, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗膜后加入 1:3 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗 (山羊抗兔) 孵育, 洗涤后与 ECL 发光试剂反应, 合光洗片, 扫描图像后用 Image J 软件计算各条带的灰度值, 以 β -actin 作为内参进行标准对照。每组实验至少重复 3 次。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绒毛膜促性腺激素 (HCG) 水平

人工流产组 HCG 值 (7248.87 ± 415.85) U, 自然流产组 (1923.83 ± 158.75) U, 自然流产组 HCG 值与人工流产组相比明显下降 ($P < 0.05$), 2 组比较有明显差异性。结果提示, 自然流产发生后 HCG 的含量减少。

2.2 CSF-1 和 CSF-1R 在细胞的表达 采用免疫组织化学的方法检测讨毛及种膜组织细胞中 CSF-1 和 CSF-1R 的表达。结果显示, 2 组细胞中均有表达, 与人工流产组相比, 自然流产组 CSF-1 和 CSF-1R 的表达增加, 平均灰度值下降 ($P < 0.05$) 结果提示, CSF-1 和 CSF-1R 的表达增加可能与自然流产有关, 见图 1、表 1。

2.3 CSF-1 和 CSF-1R 的蛋白质水平

Western Blot 发现, 讨毛及种膜组织中 CSF-1

和 CSF-1R 两组均有明显表达, 与人工流产组相比, 自然流产组绒毛及种膜组织均增加 ($P < 0.05$)。结果进一步提示, CSF-1 和 CSF-1R 在讨

毛及种膜组织中的表达增加, 可能是导致自然流产的因素之一, 见图 2、图 3。

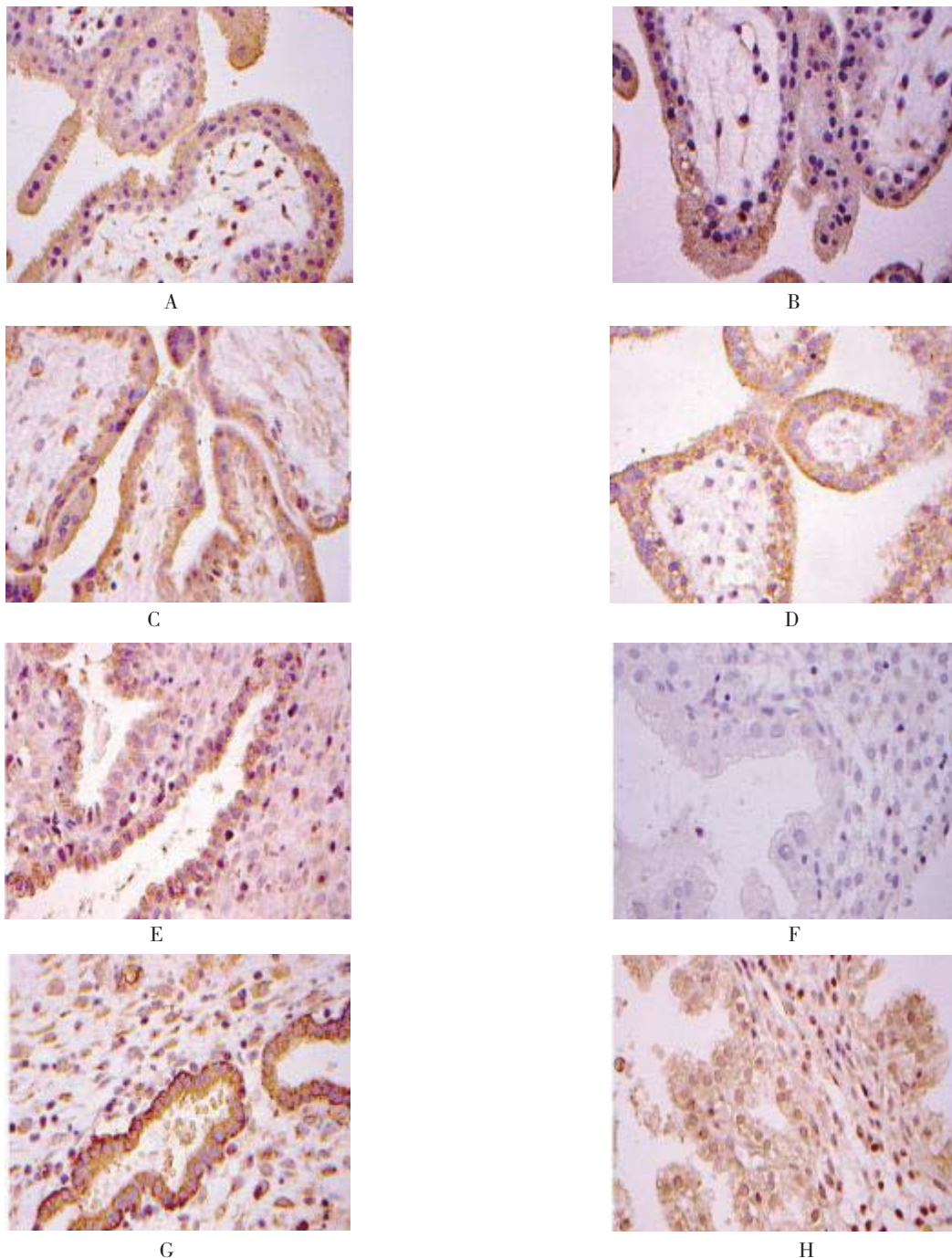


图 1 CSF-1 和 CSF-1R 在绒毛组织和脱膜组织内的表达 ($\times 400$)

Fig. 1 The expression of CSF-1 and CSF-1R in the villi tissue and decidua tissue ($\times 400$)

A:人工流产组讨毛组织 CSF-1 免疫组织化学染色; B:自然流产组讨毛组织 CSF-1 免疫组织化学染色; C:人工流产组讨毛组织 CSF-1R 免疫组织化学染色; D:自然流产组讨毛组织 CSF-1R 免疫组织化学染色; E:人工流产组脱膜组织 CSF-1 免疫组织化学染色; F:自然流产组脱膜组织 CSF-1 免疫组织化学染色; G:人工流产组脱膜组织 CSF-1R 免疫组织化学染色; H:自然流产组脱膜组织 CSF-1R 免疫组织化学染色

表 1 CSF-1、CSF-1R 的平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the average gray values of CSF-1 and CSF-1R ($\bar{x} \pm s$)

组 别	CSF-1	CSF-1R
人工流产组		
讨毛组织	182.54 ± 11.24	188.79 ± 10.86
脱膜组织	193.57 ± 11.67	183.11 ± 13.65
自然流产组		
讨毛组织	151.54 ± 7.31*	158.93 ± 9.15*
脱膜组织	161.57 ± 12.42*	152.58 ± 10.32*

与人工流产组比较, *P < 0.05.

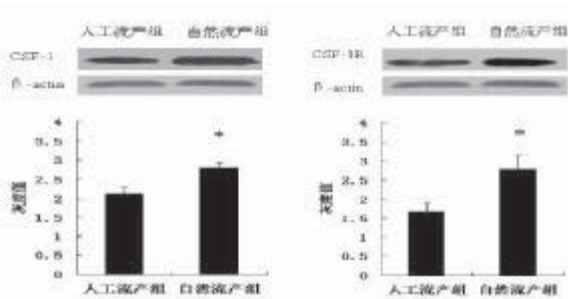


图 2 CSF-1 和 CSF-1R 绒毛组织内的表达

Fig. 2 The expression of CSF-1 and CSF-1R in the villi tissue

与人工流产组比较, *P < 0.05.

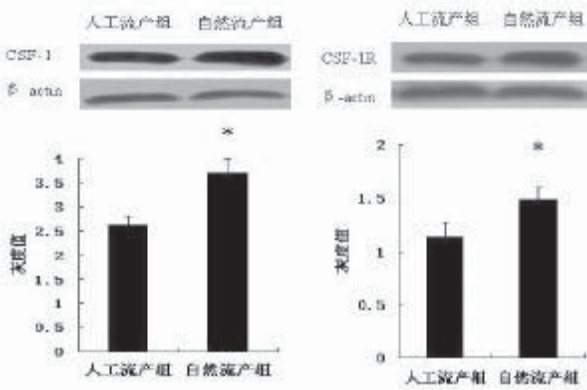


图 3 CSF-1 和 CSF-1R 绒毛组织和脱膜组织内的表达

Fig. 3 The expression of CSF-1 and CSF-1R in the decidua tissue

与人工流产组比较, *P < 0.05.

3 讨论

CSF-1 主要调节单核 - 巨噬细胞系细胞的分化、增殖和生长. 多种细胞均可产生 CSF-1, 包括骨髓基质细胞、子宫内膜中分泌型上皮细胞等.

自然流产是妊娠期最常见并发症之一^[1]. 许多病因引起流产, 但其发生的分子机制不完全明确. HCG 和孕酮是维持妊娠的几种内分泌激素之一,

对妊娠的维持作用已得到公认. 妊娠的成功依赖于母一胎之间的相互作用, 既要避免胎儿被母体排斥, 又要防止滋养细胞过度侵入. 有大量单核及淋巴细胞浸润在胚胎着床部位, 提示细胞因子可能参与母一胎之间的相互作用^[2]. 同时, 在怀孕期子宫与胎盘之间的免疫细胞发挥着重要的角色, 最新研究表明这些细胞的组成和功能是在植入的胎体周围由子宫基质 (种膜) 局部控制^[3].

胎盘是母胎界面的一个重要器官, 由胎儿丛密绒毛膜和母体底种膜共同组成, 内含成纤维细胞、巨噬细胞和血管等^[4]. 滋养层细胞产生大量的激素和因子, 如孕酮、神经递质、人胎盘泌乳素、hCG、抑制素和激活素等^[5,6]. 胚泡着床后的早期绒毛和种膜的形态功能发生很大变化. 外层多核的合体滋养细胞是由内层单核的细胞滋养细胞发育分化而形成的. 滋养细胞迅速增殖分化产生大量 hCG 和胎盘泌乳素等激素. 同时产生多种生长因子及细胞因子如胰岛素生长因子、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、CSF-1 等. 有学者认为 CSF-1 可通过滋养层细胞上的受体, 引起滋养叶细胞迅速增殖为细胞滋养叶细胞, 细胞滋养层细胞转化为合体滋养叶细胞, 释放 HCG 及人胎盘泌乳素, 加速胚胎的植入, CSF-1 还可刺激胎盘滋养层细胞产生和分泌 IL-10, 从而能够阻断母胎界面的淋巴细胞的激活, 为滋养层细胞在子宫中的侵入和生长创造条件.

国内外已有许多研究发现 CSF-1 等在子宫内膜、胎膜、胎盘、种膜等组织中大量表达, 这表明它在胚胎的存活, 胎盘的分化与增殖以及子宫内膜种膜化过程中发挥重要作用. Vassiliadis 等^[7]通过对妊娠 11 d 大鼠种膜细胞集落刺激因子 -1 (CSF-1) 局部含量的研究, 提示妊娠过程中单核吞噬细胞因子的作用. CSF-1 的存在揭示了其具有对胎盘上 II 级抗原的下调诱导作用, 而此类抗原的存在引起死胎. Gorivodsky 等^[8]研究流产鼠子宫胎盘中腺细胞及子宫白细胞的 CSF-1 和 CSF-1R 的 mRNAs 表达量较对照鼠均大量减少. 河北医科大学第二医院闫华^[9]研究认为原因不明 RSA 与血清 IL-10、M-CSF 水平降低有关. 但 CSF-1 在人类子宫局部的精确作用机理尚未清楚, 有关 CSF-1 及其受体在人类早期自然流产妊娠组织中的表达报道较少见. 本组通过检测血中 HCG 值的变化, 研究自然流产组与人工流产组的脱膜及绒毛组织中 CSF-1 及其受体的表达, 结果发现: 自然流产组 HCG 值较人工流产组明显下降 (P < 0.05). 而 CSF-1 及其受体在 2 组的绒毛及脱膜组织中均有明

显表达,但在自然流产组绒毛及蜕膜组织中 CSF-1 及其受体的表达均增加 ($P < 0.05$)。结果表明, HCG 是维持正常妊娠的主要因素,绒毛及蜕膜组织中适量的 CSF-1 及其受体浓度维持妊娠的继续,浓度过高则不利于妊娠,可能是自然流产的原因之一。另外,还说明了患者在妊娠过程中自然流产,在外周血 β -HCG 水平下降的同时,在母胎界面存在着细胞因子 GM-CSF、CSF-1 及其受体浓度的改变,可能促进了自然流产的发生。

[参考文献]

- [1] VAN DEN BERG M M, VAN MAARLE M C, VAN WELY M, et al. Genetics of early miscarriage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1822(12):1951-1959.
- [2] 曹泽毅主编. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:185-186.
- [3] ERLEBACHERA. Immunology of the maternal-fetal interface[J]. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31(3):387-411.
- [4] SOARES M J, CHAPMAN B M, RASMUSSEN C A, et al. Differentiation of trophoblast endocrine cells [J]. *Placenta*, 1996, 17(5-6):277-289.
- [5] SATIO S. Cytokine network at the fetomaternal interface [J]. *J Reprod Immunol*, 2000, 47(2):87-103.
- [6] ISLAMI D, MOCK BISCHOF P. Effects of human chorionic gonadotropin on trophoblast invasion [J]. *Semin Reprod Med*, 2001, 19(1):49-53.
- [7] VASSILIADIS S, ATHANASSAKIS I. Two novel colony-stimulating factor 1 (CSF-1) properties: Post-transcriptionally inhibits interferon-specific induction of class II antigens and reduces the risk of fetal abortion [J]. *Cytokine*, 1994, 6(3):295-299.
- [8] GORIVODSKY M, TORCHINSKY A, SHEPSHELOVICH J, et al. Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) expression in the uteroplacental unit of mice with spontaneous and induced pregnancy loss [J]. *Clin Exp Immunol*, 1999, 117(3):540-549.
- [9] 闫华, 刘慈, 杨素娟, 等. 原因不明反复自然流产患者主动免疫治疗前后血清白细胞介素-10、巨噬细胞集落刺激因子、白血病抑制因子浓度的变化 [J]. *生殖医学杂志*, 2006, 5(1):22-25.

(2014-04-17 收稿)

(上接第 113 页)

- [11] CAI H, SUN D, SUN Y, et al. Primary closure following laparoscopic common bile duct exploration combined with intraoperative cholangiography and choledochoscopy [J]. *World J Surg*, 2012, 36(1):164-170.
- [12] WU X, YANG Y, DONG P, et al. Primary closure versus T-tube drainage in laparoscopic common bile duct exploration: a meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2012, 397(6):909-916.
- [13] CHEN C C, WU S D, TIAN Y, et al. Sphincter of Oddi-preserving and T-tube-free laparoscopic management of extrahepatic bile duct calculi [J]. *World J Surg*, 2011, 35(10):2283-2289.
- [14] MANGLA V, CHANDER J, VINDAL A, et al. A randomized trial comparing the use of endobiliary stent and T-tube for biliary decompression after laparoscopic common bile duct exploration [J]. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*, 2012, 22(4):345-348.
- [15] EL-GEIDIE A A. Is the use of T-tube necessary after laparoscopic choledochotomy [J]. *J Gastrointest Surg*, 2010, 14(5):844-848.
- [16] VAN DIJK A H, LAMBERTS M, VAN LAARHOVEN C J, et al. Laparoscopy in cholecysto-choledocholithiasis [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, 28(1):195-209.

(2014-04-01 收稿)