

GM-CSF 及其受体与早期自然流产的关系研究

柏青¹⁾, 李寅¹⁾, 杨一敏¹⁾, 姚伟林¹⁾, 孙建军²⁾, 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)

[摘要] **目的** 探讨母胎界面局部细胞因子 GM-CSF 及其受体与早期自然流产的发生的关系. **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脱膜组织各 30 例, 用放射免疫法检测 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 检测绒毛及脱膜组织中巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 及其受体 (GM-CSFR) 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 ($P < 0.05$). 绒毛及脱膜组织中 GM-CSF 和 GM-CSFR 2 组均有表达. 与人工流产组相比, 绒毛组织中, 自然流产组的 GM-CSFR 增加 ($P < 0.05$), GM-CSF 的表达上调, 但无统计学意义 ($P > 0.05$). 脱膜组织中, 自然流产组的 GM-CSF 和 GM-CSFR 均增加 ($P < 0.05$). **结论** 在脱膜组织中, 适量的 GM-CSF 和 GM-CSFR 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] GM-CSF; GM-CSFR; 自然流产; 人工流产

[中图分类号] R714.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 02 - 0048 - 04

Study of Relationship of GM-CSF and Its Receptor with Early Spontaneous Abortion

BAI Qin¹⁾, LI Yin¹⁾, YANG Yi-min¹⁾, YAO Wei-lin¹⁾, SUN Jian-jun²⁾, YUE Hong-ping¹⁾

(1) Dept. of Gynecology and Obstetrics, The Third People's Hospital of Yunnan Province; 2) The Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of Maternal-fetal interface local cytokine GM-CSF and its receptor with the occurrence of 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 every group. The expressions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor (GM-CSFR) were detected by Immunohistochemical staining and Western Blot in the villi tissue and decidua tissue in every group. **Results** The concentration of HCG in the spontaneous abortion group was lower than that in the artificial abortion group ($P < 0.05$). The protein expressions of GM-CSF and GM-CSFR were found in villus and deciduas tissues in both groups. The protein expression levels of GM-CSFR in the villus tissues were higher in spontaneous abortion group than those in artificial abortion group ($P < 0.05$), the protein expression of GM-CSF was upregulated, but there was no statistically significant difference between two groups. In deciduas tissues, the protein expressions of GM-CSF and GM-CSFR were upregulated in spontaneous abortion group ($P < 0.05$). **Conclusions** The suitable concentrations of GM-CSF and GM-CSFR in decidua tissue maintain the pregnancy continued. However, the higher concentrations of GM-CSF and GM-CSFR in the decidua tissue may be one of

[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] 柏青 (1969~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事妇产科临床工作.

[通讯作者] 孙建军. E-mail:sjj031146@qq.com; 岳红萍. E-mail:yhp22951@sina.com

reasons of spontaneous abortion.

[Key words] Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor; Spontaneous abortion; Artificial abortion

自然流产是一种常见的妊娠期疾病,其发生率高达10%~15%,早期妊娠间发生率在80%,母体的感染、免疫、环境及内分泌,还有胚胎异常等常是其发生的因素.粒-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)可通过其在滋养层细胞上的受体,促进滋养叶细胞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,产生人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)及人胎盘生乳素(human placental lactogen, HPL)使胚胎植入加速,GM-CSF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^[1],但GM-CSF在人类子宫局部的精确作用机理尚未清楚,有关GM-CSF及其受体在早期自然流产妊娠组织中的表达报道较少见.通过检测外周血中绒毛膜促性腺激素(HCG)水平,研究人工流产与自然流产患者母胎界面GM-CSF及其受体表达水平,探讨绒毛和蜕膜组织中GM-CSF及其受体表达与流产的关系.

1 资料与方法

1.1 临床资料

取2009年8月至2011年12月间来云南省第三人民医院妇产科就诊的怀孕均在60d以内人工流产病例30例,年龄在20~45岁,平均(28.85±6.43)岁;怀孕60d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.每例各取绒毛组织和蜕膜组织,部分组织10%甲醛固定后,石蜡包埋;部分组织-80℃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GM-CSF和GM-CSFR购自北京博螯生物公司;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 用放射免疫法测定2组外周血中绒毛膜促性腺激素(HCG)水平.

1.3.2 免疫组织化学检测 GM-CSF 和 GM-CSFR 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GM-CSF和GM-CSFR,4℃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 GM-CSF 和 GM-CSFR 的蛋白质水平 取绒毛组织或者蜕膜组织,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 μ g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1:1000稀释的兔抗鼠多克隆一抗GM-CSF和GM-CSFR.4℃过夜,洗膜后加入1:3000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,曝光洗片,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

与人工流产组相比,自然流产组的血中HCG值明显下降($P < 0.05$),见图1.

2.2 GM-CSF 和 GM-CSFR 在细胞的表达

采用免疫组织化学的方法检测绒毛及蜕膜组织细胞中GM-CSF和GM-CSFR的表达.结果显示,2组细胞中均有表达.与人工流产组相比,绒毛组织细胞中,自然流产组GM-CSFR的表达增加,平均灰度值下降($P < 0.05$).GM-CSFR的表

达上调, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。在蜕膜组织细胞中, GM-CSF 和 GM-CSFR 的表达在 2 组中均增加 ($P < 0.05$)。结果提示, 蜕膜组织细胞中 GM-CSF 和 GM-CSFR 的表达增加可能与自然流产有关 (图 2、表 1)。

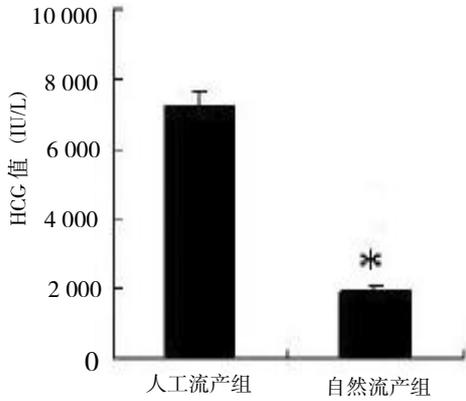


图 1 血液中 HCG 的浓度
Fig. 1 The concentrations of HCG
与人工流产组比较, * $P < 0.05$. n = 30.

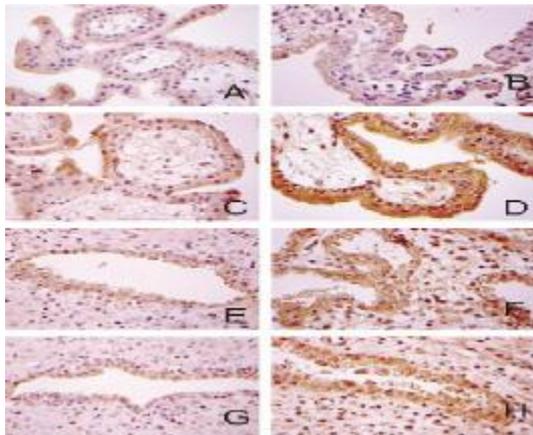


图 2 GM-CSF 和 GM-CSFR 在绒毛组织和蜕膜组织内的表达 ($\times 400$)

Fig. 2 The expression of GM-CSF and GM-CSFR in the villi tissue and decidua tissue ($\times 400$)

A: 人工流产组绒毛组织 GM-CSF 免疫组织化学染色 B: 自然流产组绒毛组织 GM-CSF 免疫组织化学染色; C: 人工流产组绒毛组织 GM-CSFR 免疫组织化学染色 D: 自然流产组绒毛组织 GM-CSFR 免疫组织化学染色; E: 人工流产组蜕膜组织 GM-CSF 免疫组织化学染色 F: 自然流产组蜕膜组织 GM-CSF 免疫组织化学染色; G: 人工流产组蜕膜组织 GM-CSFR 免疫组织化学染色; H: 自然流产组蜕膜组织 GM-CSFR 免疫组织化学染色。

表 1 GM-CSF、GM-CSFR 的平均灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Comparison of the average gray values of GM-CSF and GM-CSFR

组别	GM-CSF	GM-CSFR
人工流产组		
绒毛组织	186.52 \pm 11.64	152.93 \pm 10.11
蜕膜组织	190.41 \pm 13.72	179.76 \pm 11.53
自然流产组		
绒毛组织	155.31 \pm 12.55*	151.54 \pm 7.31*
蜕膜组织	154.11 \pm 11.43*	150.83 \pm 11.68*

与人工流产组比较, * $P < 0.05$.

2.3 GM-CSF 和 GM-CSFR 的蛋白质水平

Western Blot 检测发现, 绒毛及蜕膜组织中 GM-CSF 和 GM-CSFR 两组均有明显表达, 与人工流产组相比, 自然流产组绒毛及蜕膜组织均增加 ($P < 0.05$)。结果进一步提示, GM-CSF 和 GM-CSFR 在绒毛及蜕膜组织中的表达增加, 可能是导致自然流产的因素之一 (图 3、图 4)。

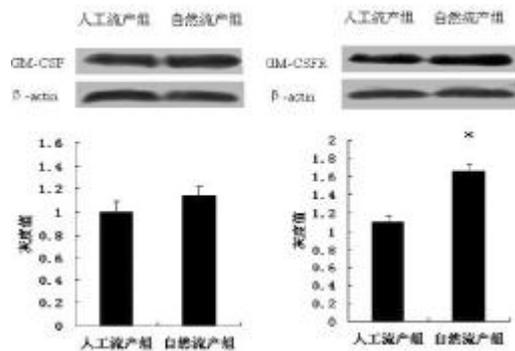


图 3 GM-CSF 绒毛组织内的表达
Fig. 3 The expression of GM-CSF in the villi tissue
与人工流产组比较, * $P < 0.05$.

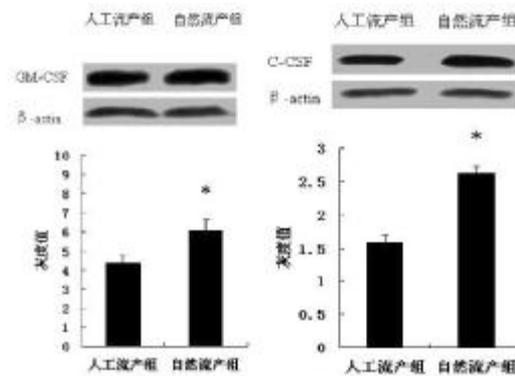


图 4 GM-CSFR 蜕膜组织内的表达
Fig. 4 The expression of GM-CSFR in the decidua tissue
与人工流产组比较, * $P < 0.05$.

3 讨论

自然流产是一种常见的妊娠期疾病,其发生率高达10%~15%,早期妊娠间发生率在80%,也是妊娠期最常见并发症^[2]。多种多样病因引起自然流产,但没有肯定明确的机制。在维持妊娠的几种内分泌激素中,HCG和孕酮对妊娠的维持作用已得到公认。妊娠成功的关键是母-胎之间的相互作用及平衡,既要避免母体排斥胎儿,又要防止滋养细胞过度侵入而伤害母体。胚胎着床后,在着床部位伴有大量单核及淋巴细胞浸润,提示母-胎之间的相互作用可能有细胞因子的参与。在怀孕期子宫与胎盘之间的免疫细胞发挥着重要的角色。最近研究表明这些细胞的组成和功能是由子宫基质(蜕膜)局部控制并在植入的胎体周围^[3]。胎盘的发展有赖于胎盘滋养层细胞分泌产生的分子以及由母体子宫蜕膜免疫细胞内的功能^[4]。

胎盘是位于母胎交界面的一个重要器官,由胎儿丛密绒毛膜和母体底蜕膜共同组成。浸在绒毛间隙母体血液中的游离绒毛是外层多核的合体滋养细胞(syncytiotrophoblast,ST)和内层单核的细胞滋养细胞(cytotrophoblasts,CT)组成,中间为中轴,内含巨噬细胞、成纤维细胞和血管等^[5]。维持妊娠所必需的激素和因子如HCG、孕酮、人胎盘泌乳素、神经递质、抑制素和激活素等均由这些细胞产生^[6,7]。目前认为ST是由CT发育分化而形成的。滋养层细胞的分化分为形态分化与功能分化两方面^[8]。

胚泡着床后,绒毛和蜕膜的形态及功能变化很大。滋养细胞增殖、分化迅速,并开始分泌大量的人绒毛膜促性腺激素(HCG)和胎盘泌乳素等激素。尚能产生多种类型的生长因子及细胞因子如表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF)、胰岛素生长因子(IGFS)、粒细胞-巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)及白细胞介素等。Savio S^[9]等认为细胞因子对细胞的生长,分化和死亡有着重要调节过程,GM-CSF可能通过TNF- α 和TGF- β 2参与胎盘生长的调节和功能,以及胚胎的早期妊娠发育与丢失发挥的作用。

本研究通过检测血中HCG值的变化,研究自然流产组与人工流产组的蜕膜及绒毛组织中

GM-CSF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($P < 0.05$)。在绒毛组织中,GM-CSFR的表达增加($P < 0.05$),但GM-CSF的表达增加不明显($P > 0.05$);在蜕膜组织中,GM-CSF及其受体的表达均增加($P < 0.05$),结果表明,HCG的含量是维持正常妊娠的主要因素,在蜕膜组织中,适量的GM-CSFR及其受体的表达维持妊娠的继续,浓度过高则不利于妊娠,这可能与自然流产发生有关。也说明了患者在妊娠过程中,出现自然流产时,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,可能为自然流产发生的促进因素。

[参考文献]

- [1] 曹泽毅主编. 中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:185-186.
- [2] 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.
- [3] ERLEBACHERA.Immunology of the maternal-fetal interface [J]. *Annu Rev Immunol*,2013,31(3):387-411.
- [4] SANGUANSERMSRI D,PONGCHAROEN S.Pregnancy immunology:decidual immune cells [J]. *Asian Pac J Allergy Immunol*,2008,26(2-3):171-181.
- [5] SOARES M J,CHAPMAN B M,RASMUSSEN C A,et al. Trophoblast cell differentiation of trophoblast endocrine cells[J]. *Placenta*,1996,17(5-6):277-289.
- [6] ATIO S.Cytokine network at the feto-maternal interface[J]. *J Reprod Immunol*,2000,47(2):7-103.
- [7] ISLAMI D,MOCK Z,BISCHOF P.Effects of human chorionic gonadotropin on trophoblast invasion [J]. *Semin Reprod Med*,2001,19(1):49-53.
- [8] BOIME I,MILLER R K,THIEDE H A. Human Placenta hormone production is linked to the stage of trophoblast differentiation [J]. In: *Trophoblast Research*,1999,1:57-60.
- [9] SAVIONS,ZELDICHE,ORENSTEIN H,SHEPSHELOVICH J,et al. Cytokine expression in the uterus of mice with pregnancy loss: effect of maternal immunopotential with GM-CSF[J]. *Reproduction*,2002,123(3):399-409.

(2014-01-12 收稿)