文章编号:1000-5404(2005)01-0063-04

论著

胰岛素样生长因子-Ⅱ在妊振高血压综合征胎盘滋养细胞浅浸润中的影响

李 真,胡 燕,林桂兰,王 智,成 娅 (第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

提 要:目的 检测胎盘滋养细胞中胰岛素样生长因子-Ⅱ(insulin-like growth factor-Ⅱ, IGF-Ⅱ)及其mRNA的表达,研究IGF-Ⅱ对细胞滋养细胞浸润能力的影响,评估IGF-Ⅱ在妊娠高血压综合征(妊高征)中的作用。**方法** ①用免疫组化法检测正常及妊高征孕妇的胎盘组织中IGF-Ⅱ的表达,并用计算机图像分析系统进行定量分析比较。②用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测正常妊娠及妊高征胎盘滋养细胞中IGF-Ⅱ mRNA表达水平,并通过紫外凝胶图像分析进行定量分析比较。③用滋养细胞体外侵袭试验研究IGF-Ⅱ对正常及妊高征胎盘细胞滋养细胞浸润能力的影响。**结果** ①IGF-Ⅱ主要位于绒毛小叶的合体滋养细胞及细胞滋养细胞。此外,也存在于羊膜绒毛层,但染色较以上两种细胞明显减弱。经图像分析检测证实妊高征组胎盘IGF-Ⅱ的平均光密度显著低于正常妊娠组($P<0.05$)。②妊高征胎盘滋养细胞IGF-Ⅱ mRNA的表达亦显著低于正常妊娠者($P<0.05$)。③妊高征滋养细胞较正常滋养细胞的浸润能力显著降低。④IGF-Ⅱ能明显促进正常妊娠滋养细胞的侵袭能力;但对妊高征滋养细胞侵袭能力的影响不显著。**结论** IGF-Ⅱ可能在妊高征胎盘滋养细胞浅浸润过程中起重要作用。

关键词: 胰岛素样生长因子-Ⅱ;滋养细胞;浸润;妊娠高血压综合征

中图法分类号: R329; R714.246; R977.9 **文献标识码:** A

Roles of insulin-like growth factor-Ⅱ in shallow trophoblast invasion in PIH

LI Zhen, HU Yan, LIN Gui-lan, WANG Zhi, CHEN Ya (Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China).

Abstract: Objective To investigate the expression of insulin-like growth factor-Ⅱ (IGF-Ⅱ) and its mRNA in human placenta and to evaluate the roles of IGF-Ⅱ in pregnancy induced hypertension syndrome (PIH). **Methods** The cellular distribution of IGF-Ⅱ in the normal and PIH placenta was determined by immunohistochemistry. The mean density was determined by image analysis technique. Trophoblasts were digested, separated, and purified from placenta. IGF-Ⅱ mRNA expression in placental trophoblasts was detected by RT-PCR. The mean density was determined by image analysis technique. The effects of IGF-Ⅱ on the invasive activity of placental trophoblasts was measured by *in vitro* invasion assay. **Results** ① IGF-Ⅱ was found in the syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, and amnio-chorion. The strongest immunoreactivity was observed in the syncytiotrophoblast and cytotrophoblast. The mean density of IGF-Ⅱ in PIH placenta was significantly lower than that of the normal placenta. ② The expression level of IGF-Ⅱ mRNA in PIH placental trophoblasts was significantly lower than that of the control group. ③ The invasive ability of cytotrophoblasts in PIH was significantly decreased. ④ In the normal group, the invasive ability of placental trophoblasts was enhanced by IGF-Ⅱ significantly, but IGF-Ⅱ couldn't change the invasive ability of placental trophoblasts in PIH. **Conclusion** IGF-Ⅱ may play an important role in the shallow invasion of placental trophoblasts in PIH.

Key words: insulin-like growth factor-Ⅱ; trophoblast; invasion; pregnancy-induced hypertension syndrome

妊娠高血压综合征(妊高征)是产科常见的妊娠并发症之一,其发病原因不明。妊高征病理特征是胎盘滋养细胞侵入子宫壁过浅,导致胎盘缺血缺氧。许多因素影响滋养细胞的浸润,其中IGF-Ⅱ在正常胎盘组织中的表达及其在滋养细胞浸润中的作用研究较多,Chakraborty等[1]发现IGF-Ⅱ促进滋养细胞的侵入、分化及胎盘形成,而IGF-Ⅱ在妊高征胎盘组织中的表达情况国内外均少有研究,其在妊高征滋养细胞入侵过浅中的作用机制尚不清楚。本研究用免疫组化的方法对正常和妊高征胎盘组织中IGF-Ⅱ定位,并通过图像分析对其表达量与正常胎盘进行比较;从正常及妊高

作者简介:李 真(1963-),女,云南省昆明市人,副主任医师,副教授,主要从事生殖医学方面的研究。电话:(023)68774612

收稿日期:2004-07-15;修回日期:2004-10-08

征胎盘中分离出滋养细胞，用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 IGF-Ⅱ mRNA 的表达，并通过紫外凝胶图像分析进行定量分析比较；用滋养细胞体外侵袭试验研究 IGF-Ⅱ对正常及妊高征胎盘细胞滋养细胞侵袭能力的影响，以探讨 IGF-Ⅱ在妊高征滋养细胞浅浸润中的作用。

1 资料和方法

1.1 研究对象

妊高征组：选择 2002 年 5－12 月在我院产科住院的妊高征患者 25 例，诊断和分类标准参见文献[2]。其中轻度 11 例，中度 7 例，重度 7 例，平均年龄(26.5 ± 2.8)岁，平均孕周(38.7 ± 1.6)周。正常组：选择同期分娩的健康孕妇 30 例，无明显的妊娠合并症及并发症，平均年龄(27.8 ± 3.3)岁，平均孕周(38.2 ± 1.6)周。两组孕妇妊娠前均无高血压、糖尿病或肾炎等疾患。

胎盘组织标本：两试验组均在分娩或剖宫产时于胎盘娩出后，从母面中央取胎盘组织块约 1 cm^3，10% 甲醛固定，供免疫组化测定 IGF-Ⅱ；从上述病例中任选择正常组 7 例及重度妊高征 7 例，取胎盘组织块约 50 g，将其浸泡于含 DMEM 的盐水瓶中，放置于 4 ℃冰桶中，供分离、培养滋养细胞用。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 10% 甲醛固定 12～24 h 的胎盘组织经脱水机脱水，42 ℃过夜，第 2 天包埋，切片。免疫组化操作步骤按 SP-9000 免疫组化试剂盒说明进行。阴性对照为省略一抗，以 PBS 代替。阳性细胞必须符合下列要求：镜下组织细胞结构清晰；阳性颗粒定位好；染色明显高于背景。阳性结果判断标准为标本组织细胞浆或基质中有黄色染色。采用美国 Medical cybernetics 公司生产的生物医学图像分析系统和 Imag-pro-plus 软件。由显微摄像机将切片图像输入计算机，每张切片随机测定 5 个区域的阳性细胞平均光密度。平均光密度代表染色强度，反映 IGF-Ⅱ的相对含量。

1.2.2 滋养细胞的分离培养及鉴定 取重度妊高征及正常妊娠各 7 例的胎盘组织，PBS 漂洗去除血污，剪去蜕膜、血管等物质，组织块剪成 1 mm^3 大小，0.25% 胰蛋白酶、DNase Ⅰ混合液消化。制备 5%～70% 梯度的 Percoll 密度梯度溶液，浓度梯度的间隔为 5% 。将消化所得细胞悬液加于 Percoll 密度梯度离心管的液体表面，离心。离心管中部的细胞带为比较均一的滋养细胞，吸出并收集该细胞带，稀释至 3×10^5/ml 的密度接种于培养瓶和含盖玻片的 24 孔培养板，置 37 ℃，5% CO_2 培养箱中培养。第 5 天取出培养板内长有细胞的盖玻片，免疫细胞化学法测定 Cytokeratin，鉴定滋养细胞。

1.2.3 IGF-Ⅱ mRNA 的检测 用 primer premier 软件，根据人 IGFⅡ mRNA 基因序列，设计引物。正义 primer 5-′GCC AGC AAT CGG AAG TG-3′，反义 5′-GAG GGT ATG TGA AGG GTG TTT-3′，扩增产物长 274 bp。按总 RNA 提取试剂盒的说明书提取细胞总 RNA，并测定 RNA 样品在波长为 260、280 nm 时的紫外吸收度 A_{260}、A_{280}，用 A_{260}/A_{280} 来衡量 RNA 样品纯度。甲醛变性凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。RT-PCR 操作参考一步法 RT-PCR 试剂盒的说明书，将 mRNA 逆转录为 cDNA，再将所得的 cDNA 进行 PCR 扩增。RT-PCR 反应程序为：94 ℃ 5 min，1 个循环，94 ℃ 30 s，55 ℃ 50 s，72 ℃ 2 min，35 个循环，72 ℃ 10 min，4 ℃ 保存。RT-PCR 产物经过电泳后采用美国 Alpha Innotech 公司生产的 ChemiImagerTM5500 紫外凝胶图像分析系统进行凝胶摄像和图像分析。可见出现两个扩增带反应，分别为 274 bp 的 IGFⅡ和 500 bp 的 β-actin。经图像分析系统处理，得到各条带的实际灰度值，据此求出各泳道 274 和 500 带的实际灰度值的比值，作为 IGF-Ⅱ mRNA 表达量。

1.2.4 滋养细胞体外侵袭试验 将分离所得的滋养细胞按 5×10^4/ml 浓度置于覆有 Martrigel 的 Transwell 上室进行培养，滋养细胞首先粘附于 Matrigel 表面，进而分泌蛋白酶消化降解 Matrigel，并通过迁移运动而穿过多孔滤膜，而后附着在滤膜另一面。计数附着在滤膜下室面的滋养细胞数作为滋养细胞浸润能力的指标。将试验分为 4 组：正常妊娠组、正常妊娠 + IGF-Ⅱ组(在 Transwell 上室中加入 125 μg/ml IGF-Ⅱ)、重度妊高征组、重度妊高征 + IGF-Ⅱ组(在 Transwell 上室中加入 125 μg/ml IGF-Ⅱ)，培养 24 h 后计数各组附着在滤膜下室面的滋养细胞数。

1.3 统计学分析

所得各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS11.0 统计软件作方差分析和组间多重比较。

2 结果

2.1 胎盘组织中 IGF-Ⅱ的细胞定位及定量分析

妊高征胎盘组织中 IGF-Ⅱ的分布与正常胎盘相似，主要位于绒毛小叶的合体滋养细胞及细胞滋养细胞。此外，羊膜绒毛层亦存在 IGF-Ⅱ，但染色较以上两种细胞明显减弱。妊高征胎盘中 IGF-Ⅱ染色明显弱于正常胎盘。正常组胎盘组织中 IGF-Ⅱ的平均光密度为 0.360 ± 0.072。妊高征各组 IGF-Ⅱ的平均光密度均显著低于正常组($P < 0.05$)。轻、中、重度妊高征中 IGF-Ⅱ含量随病情进展而逐渐下降，重度妊高征明显低于轻、中度者($P < 0.05$)，但轻度与中度比较差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 正常和妊高征各组胎盘组织 IGF-Ⅱ定量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Analysis of the mean density of IGF-II in the normal and PIH groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number	Mean density
Normal	30	0.360 ± 0.072
PIH	25	0.324 ± 0.042
Mild PIH	11	0.345 ± 0.030
Medium PID	7	0.336 ± 0.021
Severe PID	7	0.281 ± 0.044

2.2 滋养细胞的分离、培养及鉴定

在相差显微镜下观察，分离所得细胞形态近似圆形，核大，呈卵圆形，胞浆丰富，透明。HE 染色细胞呈多角形，胞质为粉红色，胞核为紫色。Cytokeratin 染色显示 92% 的细胞胞浆着色，为滋养细胞。

2.3 IGF-Ⅱ mRNA 表达水平

正常组 IGF-ⅡmRNA 的相对表达量为 0.96 ± 0.30，重度妊高征

组为0.72±0.72。两组比较差异有显著性($t=2.40, P<0.05$)。

2.4　滋养细胞体外侵袭试验结果

各组跨膜细胞数见表2。结果显示,与正常妊娠组相比,正常妊娠+IGF-Ⅱ组浸润细胞数显著增多($P<0.05$),重度妊高征组浸润细胞数显著低于正常妊娠组($P<0.05$),妊高征组加入IGF-Ⅱ后浸润细胞数无显著改变($P>0.05$)。

表2　各组浸润细胞数比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Number of invaded cells in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	Number of invaded cells
Normal pregnancy	20.5±2.9
Normal pregnancy + IGF-Ⅱ	23.9±2.0*
Severe PIH	5.3±1.3*
Severe PIH + IGF-Ⅱ	5.6±1.2

*: $P<0.05$, *vs* normal pregnancy

3　讨论

3.1　胎盘IGF-Ⅱ的来源及作用

本研究免疫组化结果显示,胎盘IGF-Ⅱ主要定位于绒毛小叶的合体滋养细胞、细胞滋养细胞及羊膜绒毛上;RT-PCR法检测发现分离培养的胎盘滋养细胞有IGF-Ⅱ mRNA表达,说明胎盘滋养细胞合成并分泌IGF-Ⅱ。这与文献[3]的结果相同。Constancia等[4]进一步发现胎盘滋养细胞有IGF-II基因(Igf2)表达,且该基因的表达参予调控胎盘的发育及生存。

许多研究发现IGF-Ⅱ促进滋养细胞的侵入、分化、胎盘形成。滋养细胞呈上皮样附着于绒毛膜绒毛的基底膜,在与子宫壁接触的绒毛顶端,滋养细胞突破基底膜,形成多层非极性排列的细胞柱状结构,柱状结构中的滋养细胞获得浸润性,侵入蜕膜、肌层及血管,接近子宫壁的细胞柱顶端的滋养细胞侵袭能力更强。原位杂交结果显示IGF-Ⅱ mRNA在锚着绒毛滋养细胞柱呈梯度表达,在侵袭能力强的滋养细胞柱顶端表达水平最高。体外细胞迁移试验说明IGF-Ⅱ促进滋养细胞迁移侵入Matrigel[5~7]。我们的试验证实在体外培养时,培养液中加入IGF-Ⅱ能显著促进滋养细胞的浸润能力,说明IGF-Ⅱ由滋养细胞合成,并具有促进滋养细胞浸润、利于胚胎着床等作用。

IGF-Ⅱ促进滋养细胞侵入的机制研究较多。Chakraborty等[1]发现IGF-Ⅱ结合到滋养细胞的Ⅱ型IGF受体(IGT-R)并发挥其促进滋养细胞入侵的作用。Irwin等[6]发现IGF-Ⅱ促进滋养细胞分泌基质金属蛋白酶,而基质金属蛋白酶能降解蜕膜细胞外基质,促进滋养细胞侵入子宫内膜基质。在胚胎着床后胰岛素样生长因子结合蛋白-1(IGFBP-1)由蜕膜化子宫内膜基质细胞大量表达。IGFBP-1与IGF-Ⅱ结合,使结合到滋养细胞的IGF-Ⅱ减少,IGF-Ⅱ促进滋养细胞入侵的作用受到抑制,使得侵入到子宫内膜基质的滋养细胞减少。IGF-Ⅱ结合到蜕膜化子宫内膜基质细胞的Ⅱ型IGF-R,抑制基质细胞产生IGFBP-1,间接促进滋养细胞入侵。总之IGF-Ⅱ促进滋养细胞入侵,IGFBP-1抑制滋养细胞入侵,两者共同调控着滋养细胞侵入子宫内膜的过程。

3.2　IGF-Ⅱ在妊娠高血压综合征浅浸润中的影响

滋养细胞的正常的分化、增殖、迁移、浸润是胚胎着床及胎盘形成的关键[8],正常滋养细胞侵入蜕膜、肌层及血管,逐步取代螺旋动脉血管内皮细胞,深入血管壁,降解血管平滑肌及弹力纤维,致血管腔扩大,血流阻力下降,血流量增加,这一过程称之为"血管重铸"。滋养细胞浸润过程调控失常将导致不孕、流产、妊高征、滋养细胞疾病等一系列病理过程。对胎盘的病理研究表明,妊高征时滋养细胞侵入子宫壁过浅,几乎没有血管内浸润[9]。本研究显示重度妊高征胎盘滋养细胞浸润能力显著低于正常妊娠者,导致其侵入子宫壁过浅,血管重铸异常,血管管腔狭窄,胎盘缺血缺氧,影响母体血流对胎儿的供应,损害胎盘功能,导致胎儿发育迟缓,胎盘绒毛退行性变、出血和梗死,严重时发生螺旋动脉栓塞,蜕膜坏死出血,导致胎盘早剥。胎盘缺氧通过反馈作用削弱滋养细胞的浸润能力,进一步促进妊高征的发生。本研究对胎盘滋养细胞IGF-Ⅱ及其mRNA的表达进行定量分析,结果显示与正常组比较,妊高征组胎盘IGF-Ⅱ含量明显减少,且在轻、中、重度妊高征组中递减;重度妊高征胎盘滋养细胞IGF-Ⅱ mRNA表达显著少于正常妊娠者;说明胎盘合成和分泌的IGF-Ⅱ量的减少与妊高征的发生相关。如前所述IGF-Ⅱ促进滋养细胞入侵,妊高征病理特征是滋养细胞浸润过浅,重度妊高征组胎盘组织IGF-Ⅱ含量明显减少,我们推测IGF-Ⅱ与妊高征中滋养细胞浅浸润有关,对妊高征的发生可能起重要作用。

妊高征发病率高,是孕产妇和围生儿死亡的重要原因之一,其发病机制的研究备受关注。目前已有较多研究显示,IGF-Ⅱ在正常胎盘组织由滋养细胞合成并分泌,具有促进滋养细胞浸润的作用,但对IGF-Ⅱ在妊高征胎盘组织中的表达情况的研究尚不多。我们的研究发现妊高征胎盘滋养细胞合成IGF-Ⅱ显著减少,妊高征胎盘滋养细胞浸润能力显著低于正常妊娠者,IGF-Ⅱ能显著促进正常胎盘滋养细胞的浸润能力,表明IGF-Ⅱ与妊高征滋养细胞浅浸润有关。但培养液中加入IGF-Ⅱ对改善妊高征滋养细胞浸润能力效果不显著,其原因尚需进一步深入研究。

参考文献：

[1] Chakraborty C, Gleeson L M, McKinnon T, *et al*. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2002, 80(2): 116 - 124.

[2] 乐 杰. 妇产科学[M]. 第5版. 北京：人民卫生出版社, 2001. 114 - 123.

[3] Shin J C, Lee J H, Yang D E, *et al*. Expression of insulin-like growth factor-Ⅱ and insulin-like growth factor binding protein-1 in the placental basal plate from pre-eclamptic pregnancies[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2003, 81(2): 273 - 280.

[4] Constancia M, Hemberger M, Hughes J, *et al*. Placental-specific IGF-Ⅱ is a major modulator of placental and fetal growth[J]. Nature, 2002, 417(6892): 945 - 948.

[5] Giudice L C, Conover C A, Bale L, *et al*. Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(6): 2359 - 2366.

[6] Irwin J C, Suen L F, Faessen G H, *et al*. Insulin-like growth factor(IGF)-Ⅱ inhibition of endometrial stromal cell tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and IGF-binding protein-1 suggests paracrine interactions at the deciduas: trophoblast interface during human implantation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(5): 2060 - 2064.

[7] Aplin J D, Lacey H, Haigh T, *et al*. Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion[J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 199 - 202.

[8] Cross J C, Hemberger M, Lu Y, *et al*. Trophoblast functions, angiogenesis, and remodeling of the maternal vasculature in the placenta[J]. Mol Cel Endocrinol, 2002, 187(1-2): 207 - 212.

[9] Matijevic R, Johnston T. *In vivo* assessment of failed trophoblastic invasion of the spiral arteries in pre-eclampsia[J]. Br J Obstet Gynecol, 1999, 106(1): 78 - 82.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)01-0066-01

西藏地区某部226名官兵立体视功能现况调查

A survey of stereoscopic vision function of 226 soldiers in high altitude areas

濮 蓉[1]，张 旭[1]，刘百臣[2]，陈昌玖[1]，易贵荣[1]（[1]西藏军区总医院五官科，拉萨 850003；[2]海军总医院眼科，北京 100037）

立体视觉简称立体视，它作为从事各类精细工作的必要条件而越来越引起人们的重视。最近我们对驻藏某部226名官兵进行了立体视觉现况调查，现报告如下。

1 资料与调查方法

1.1 调查对象

海拔3 658 m驻藏某部官兵226人，年龄为17～50岁，均为男性，进藏时间1年8个月至18年，平均3年5个月。

1.2 方法

采用颜-郑二氏《立体视觉检查图》，在良好的自然光线下进行检查。被检查者戴用图册中配备的红绿眼镜（红色在右，绿色在左），检查距离30～40 cm，双眼同时看图。首先讲解识图方法及注意事项，用第1图示教，然后按图序依次检查。项目包括立体视锐度、交叉视差、非交叉视差和红绿互补立体图4项。

1.3 标准

1.3.1 立体视锐度定量测定 正常立体视锐度阈值≤60″；≥100″或识别时间超过10′以上为异常。

1.3.2 立体视范围 交叉视差与非交叉视差定量测定：各在5′内通过，≥100′为正常，≤80′为异常。

1.3.3 判断标准 红绿互补能正确分辨动物与水果的层次顺序为正常，否则为异常。

2 结果

立体视锐度情况见表1，立体视范围情况见表2，3，立体视觉各项异常发生率见表4。

表1 立体视锐度测定

	立体视锐度(″)					
	800	600	400	200	100	≤60
通过人数	221	215	214	210	206	205
通过百分数(%)	97.82	95.06	94.47	93.02	91.30	90.71

表2 交叉视差测定

	视差级				
	30′	45′	60′	80′	≥100′
通过人数	210	202	192	185	178
通过百分数(%)	92.85	89.33	84.95	81.84	78.57

表3 非交叉视差测定

	视差级				
	30′	45′	60′	80′	≥100′
通过人数	209	202	195	189	187
通过百分数(%)	92.5	89.56	86.49	83.74	82.54

作者简介：濮 蓉(1969－)，女，四川省成都市人，医师，主要从事临床眼科学方面的研究，发表论文10余篇。电话：(0891)6253302

收稿日期：2004-05-11；修回日期：2004-09-18

（下转75页）