儿童臀肌挛缩症[J]. 中华小儿外科杂志, 2007, 28(8): 426-428.
[6] 杨景帆, 常敏. 关节镜下手术与传统开放手术治疗臀肌挛缩症的疗效比较[J]. 云南医药, 2009, 30(3): 356-359.
[7] 卢浩浩, 刘国辉, 杨述华. 臀肌挛缩症病因及诊断的研究发展[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(3): 207-209.
[8] 夏榕圻, 楼跃, 范毓华, 等. 儿童臀肌挛缩症的手术治疗[J]. 临床骨科杂志, 2002, 5(3): 217-218.
[9] 陆裕朴, 胥少汀, 葛宝丰, 等. 实用骨科学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2006: 1938-1839.
[10] 俞辉国, 童学波, 刘红兵, 等. 臀肌挛缩症的手术治疗探讨[J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(6): 375-377.
[11] 徐世民, 胡均平, 曹知贫. 臀肌筋膜挛缩症的手术治疗(附87例报告)[J]. 广西医学, 2003, 25(6): 914-916.
[12] 平国兴, 黄建凯, 丘德赞, 等. 重型臀肌挛缩症的诊断及手术治疗[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(7): 418-422.
[13] 叶斌, 孙宏伟, 陈友燕, 等. 臀肌挛缩症体征与解剖及病理改变的关系[J]. 伤残医学杂志, 2004, 12(3): 9-11.
[14] 郝鹏, 李连亭, 程华. 小切口治疗臀肌挛缩症26例报告[J]. 中国微创外科杂志, 2009, 9(9): 853-854.

(收稿: 2010-03-24 修回: 2010-04-15)
(编辑 吴培红)

短篇论著

文章编号: 1000-5404(2010)19-2144-03

早产产妇外周血 Toll 样受体 4 及协同分子表达的意义

易水晶, 周昌菊 (410013 长沙, 中南大学湘雅三医院妇产科)

【摘要】 目的 探讨早产产妇外周血 Toll 样受体 4(TLR4)及协同分子 MD2、CD14 mRNA 的表达水平及与亚临床绒毛膜羊膜炎的关系。方法 选择早产自然分娩组 20 例, 足月妊娠自然分娩组 28 例, 足月要求剖宫产 10 例。RT-PCR 检测母血中 TLR4、MD2、CD14 mRNA 的表达。并通过同一产妇胎盘 HE 染色, 观察 TLR4、MD2、CD14 与亚临床绒毛膜羊膜炎的表达变化。结果 早产自然分娩组 TLR4、MD2 mRNA 明显高于足月自然分娩组($P<0.05$), CD14 mRNA 在两组均高表达, 但无统计学差异($P>0.05$); 早产及足月自然分娩组 TLR4、MD2、CD14 mRNA 表达均高于足月剖宫产组, 早产自然分娩组与足月剖宫产组比较有统计学差异($P<0.05$), 但足月自然分娩组 TLR4、MD2 mRNA 与足月剖宫产组比较无统计学差异($P>0.05$)。妊娠合并亚临床绒毛膜羊膜炎患者 TLR4、MD2、CD14 mRNA 表达水平较无亚临床绒毛膜羊膜炎患者高, 且存在正相关性(r 分别为 0.635、0.467、0.404, $P<0.05$)。产妇外周血单个核细胞 TLR4 与 MD2、CD14 mRNA 表达两两正相关。结论 孕妇外周血表达 TLR4、MD2 及 CD14, 与孕周、分娩方式及感染情况有关, 可能参与了分娩发动, 尤其是早产分娩发动。

【关键词】 早产; 炎症; Toll 样受体 4; 髓样分化蛋白-2; CD14; 亚临床绒毛膜羊膜炎
【中图法分类号】 R714.21; R446.11 **【文献标志码】** A

早产与感染、炎症反应密切相关, 早产患者外周血中促炎因子表达明显增加, 可能预测并参与早产的分娩发动[1,2]。Toll 样受体 4(Toll-like receptor4, TLR4)是一种关键的先天性免疫识别受体, 特异的识别 LPS, 并通过在细胞表面与髓样分化蛋白-2(myeloid differential protein-2, MD2)及 CD14 协同, 形成 TLR4/MD-2/CD14 聚合体, 将信号传导到细胞内, 介导炎症反应, TLR4 表达水平反映感染和炎症程度[3-5]。但早产患者外周血中能否检测到 TLR4、MD2 及 CD14, 目前还不清楚。本实验通过研究早产及足月自然分娩和足月剖宫产产妇外周血单个核细胞 TLR4、MD2 及 CD14 mRNA 表达情况, 并结合胎盘病理检查情况, 探讨其与早产及亚临床绒毛膜羊膜炎的关系。

【基金项目】 湖南省科学技术厅科技计划(2008FJ3161)
【通信作者】 周昌菊, 电话: (0731)88618223, E-mail: zhouchanju8816@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2008 年 8 月至 2009 年 5 月本科住院的早产自然分娩组 20 例, 足月妊娠自然分娩组 28 例, 足月要求剖宫产组 10 例。收集产妇外周血(自然分娩组进入活跃期后采集标本, 剖宫产组术前采血)及胎盘组织, 按《妇产科学》第 7 版标准纳入。其中早产自然分娩组年龄为 24~33 岁, 孕(33±2)周。足月自然分娩组年龄为 23~37 岁, 孕(38±1)周。足月要求剖宫产组年龄为 21~40 岁, 孕(39±1)周。各组孕妇均无烟、酒史, 均无明显生殖系统及其他系统感染症状, 无妊娠并发症及内、外科合并症, 无特殊用药史, 均为单胎初次妊娠, 要求剖宫产组在宫缩前, 因社会因素、胎位不正行剖宫产。孕龄根据末次月经及早孕时 B 超估计。研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 自然分娩组于活跃期内, 足月要求剖宫产组于术前 30 min, 抽肘静脉血 2 ml, 立即注入抗凝管中, 混匀

4 ℃保存,12 h 内进行 RT-PCR。胎盘娩出后,立即取胎盘中心 1 cm×1 cm 大小全层组织 1 块;无菌生理盐水清洗组织 3 遍后置入 4% 的戊二醛固定。4 ℃固定 24 ~ 48 h 后予常规脱水,透明,石蜡包埋待用。切片厚 5 μm,37 ℃烘干过夜,4 ℃ 冰箱保存待测。

1.2.2 外周血 mRNA 检测 用 Ficoll 离心法提取外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)。采用Trizol 法提取总 RNA,行 RT-PCR,采用 Primer Premier 5 设计引物(表 1)。退火温度分别为 57 ℃、60 ℃和 60 ℃。用 1% 琼脂糖电泳所得结果,凝胶成像系统拍摄并测定其灰度值,与内参 GAPDH 的灰度比值进行比较。

表 1 TLR4、MD2 及 CD14 引物序列

基因	引物序列	目的片段长度(bp)
TLR4	上游 5′-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3′	506
	下游 5′-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3′	
MD2	上游 5′-GAAGCTCAGAAGCAGTATTGGGTC-3′	402
	下游 5′-GGTTGGTGTAGGATGACAAACTCC-3′	
CD14	上游 5′-ACTCCCTCAATCTGTCGTTCGCTG-3′	338
	下游 5′-CTGAAGCCAAGGCAGTTTCAGTCC-3′	
GAPDH	上游 5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′	220
	下游 5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′	

1.2.3 HE 染色 常规 HE 染色,组织学绒毛膜羊膜炎判断标准:绒毛膜及羊膜组织中炎性细胞浸润,每高倍视野 5 ~ 10 个为轻度,每高倍视野 11 ~ 30 个为中度,每高倍视野 > 30 个为重度[6]。光镜下观察胎盘绒毛结构、血管合体膜厚度、合体小结、纤维素分布等情况。

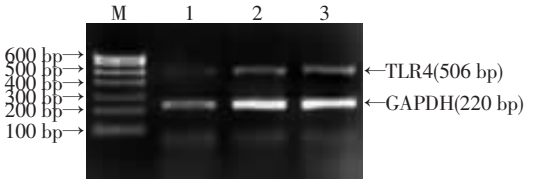
1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,多个样本均数间的多重比较采用 SNK-q 检验,相关性分析行 Pearman 相关分析。

2 结果

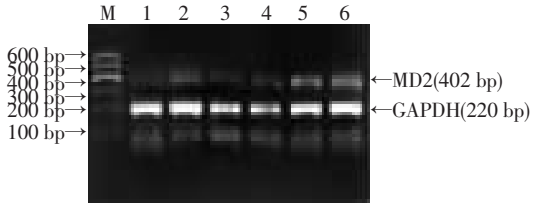
2.1 RT-PCR 法检测各组产妇外周血单个核细胞 TLR4、MD2、CD14 mRNA 的表达情况

早产自然分娩组 TLR4、MD2 mRNA 表达水平明显高于足月自然分娩组($P < 0.05$);CD14 mRNA 在两组均高表达,但无统计学差异($P > 0.05$)。早产及足月自然分娩组 TLR4、MD2、CD14 mRNA 表达均高于足月剖宫产组,早产自然分娩组与足月剖宫产组比较均有统计学差异($P < 0.05$),但 TLR4、MD2 mRNA 在足月自然分娩组与足月剖宫产组比较无明显差异($P > 0.05$)。见图 1 ~ 3。



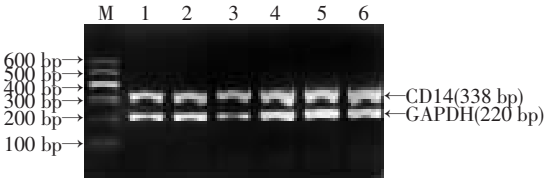
M:标准;1:足月要求剖宫产组;2:足月自然分娩组;3:早产自然分娩组

图 1 产妇外周血单个核细胞 TLR4 mRNA 的表达



M:标准;1、2:足月要求剖宫产组;3、4:足月自然分娩组;5、6:早产自然分娩组

图 2 产妇外周血单个核细胞 MD2 mRNA 的表达

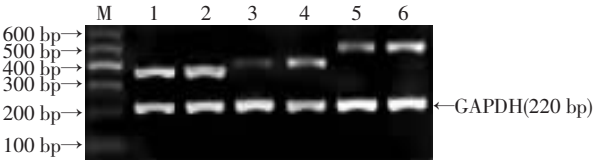


M:标准;1、2:足月要求剖宫产组;3、4:足月自然分娩组;5、6:早产自然分娩组

图 3 产妇外周血单个核细胞 CD14 mRNA 的表达

2.2 产妇外周血单个核细胞 TLR4、MD2、CD14 mRNA 与亚临床绒毛膜羊膜炎的关系

早产自然分娩组有 14 例(70.00%)为亚绒毛膜羊膜炎患者,足月自然分娩组有 9 例(32.14%)为亚绒毛膜羊膜炎患者,足月要求剖宫产组有 2 例(20.00%)为亚绒毛膜羊膜炎患者。产妇外周血 TLR4、MD2、CD14 表达在妊娠合并亚临床绒毛膜羊膜炎患者明显高于妊娠无亚临床绒毛膜羊膜炎患者($P < 0.05$)。产妇外周血单个核细胞 TLR4、MD2、CD14 mRNA 与亚临床绒毛膜羊膜炎存在正相关性(r 分别为 0.635、0.467、0.404,$P < 0.05$)。见图 4。



1、3、5:妊娠无亚临床绒毛膜羊膜炎;2、4、6:妊娠合并亚临床绒毛膜羊膜炎;1、2:CD14(338 bp);3、4:MD2(402 bp);5、6:TLR4(506 bp)

图 4 产妇外周血单个核细胞 TLR4、MD2、CD14 mRNA 的表达

2.3 产妇外周血单个核细胞 TLR4 与 MD2、CD14 mRNA 表达的相关性

RT-PCR 法检测产妇外周血单个核细胞 TLR4 与 MD2、CD14 mRNA 表达的相关性,发现两两均存在正相关(TLR4 与 MD2、TLR4 与 CD14、MD2 与 CD14 表达的 r 分别为 0.719、0.525、0.488,$P < 0.01$)。

3 讨论

外周血单个核细胞中可以检测到不同程度的 TLR4、MD2 和 CD14 的表达,并与炎症或免疫程度相关[7,8]。TLR4 在感染性早产患者外周血单个核细胞

中高表达,提示 TLR4 可能在感染性早产的发病机制中起重要作用[9]。Molloy 等[10]发现妊娠期 TLR4 呈低表达状态,从而抑制妊娠期间母婴之间的炎症反应,随着妊娠的发展 TLR4 表达逐渐升高至分娩发动时达到顶点,从而可能参与分娩发动。而孕妇外周血是否同时有 MD2 和 CD14 的表达,TLR4 是否通过 MD2 和 CD14 参与分娩或早产,尚不清楚。

本研究发现 TLR4、MD2 在早产自然分娩组表达水平高于足月自然分娩组及足月要求剖宫产组($P<0.05$)。这与促炎因子表达变化类似,提示 TLR4 及 MD2 可能通过其介导的天然免疫应答,诱导并活化下游的促炎因子的表达,参与早产的分娩发动。有报道 TLR4 在信号转导、组织分布和表达方式上与 MD2 具有明显的伴随现象[11],本研究也发现 TLR4 与 MD2 表达变化一致,并具有正相关($r=0.719$),考虑可能存在某种机制,使二者在转录、翻译、功能发挥等环节保持相对同步。MD2 能促进外周血单个核细胞 TLR4 表达,扩大炎症反应。而两者表达在足月自然分娩组与足月要求剖宫产组间无统计学差异。这与 Kim 等[12]的研究结果类似,可能是 TLR4 本身随着妊娠孕周增加,表达增加,在妊娠晚期尤其是足月分娩前已经达到高峰、稳定状态,为分娩发动做准备,足月自然分娩组虽经过分娩过程能使 TLR4、MD2 mRNA 表达较剖宫产组稍有增加,但增加不明显。

本研究发现各组孕妇 CD14 mRNA 均高表达,在早产、足月自然分娩组表达均高于足月要求剖宫产组,而前两组之间无统计学差异。这可能是与妊娠期免疫防御系统具有独特性有关,孕周不同,免疫系统防御能力不同。有研究发现羊水中 CD14 中孕阶段要高于晚孕阶段,而早产患者由于感染或炎症反应表达强于足月分娩患者[13],使得均衡孕周及感染和炎症反应的因素后,自然分娩在早产和足月组之间无明显统计学差异。但足月和早产分娩过程中产生明显的炎症反应,促炎因子表达明显高于要求剖宫产组,使得自然分娩组 CD14 水平高于足月剖宫产组。这与炎症因子的反应类似[14]。

同时我们发现妊娠合并亚临床绒毛膜羊膜炎组 TLR4、MD2 和 CD14 表达水平均高于无亚临床绒毛膜羊膜炎组,这提示胎盘胎膜炎症反应时,TLR4 及协同分子作为先天性免疫系统的受体,在免疫细胞中表达上调,迅速活化下游的 NF-κB 及一系列促炎因子,介导免疫防御反应。而这也解释合并感染的产妇更容易诱发早产,来提高胎儿存活率[15]。

综上所述,TLR4 及协同分子在早产,尤其是合并亚临床绒毛膜羊膜炎时表达上调,为早产,尤其是感染性早产的早期预测、早期干预及早期治疗提供新思路。但 TLR4 及协同分子与孕周、炎症及分娩发动的关系,以及通过下游 NF-κB 转录激活炎症反应的机制是一个复杂的网路系统,调控十分精细复杂,尚需要进一步通过扩大样本量,更加系统、全面的研究。

参考文献:

[1] Genc M R, Ford C E. The clinical use of inflammatory markers during pregnancy[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2010, 22(2): 116-121.

[2] Romero R, Espinoza J, Gotsch F, *et al*. The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome[J]. BJOG, 2006, 113 (Suppl 3): 118-135.

[3] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7): 499-511.

[4] 易水晶,薛敏,周昌菊. 外周血 Toll 样受体 2 与早产的关系[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(9): 1695-1697.

[5] 李永旺, 麻莉, 张德明,等. TLR4 及 MD2 反义基因对内毒素诱导的肺泡Ⅱ型细胞活化的影响[J]. 第三军医大学学报,2010,32(12): 1271-1274.

[6] Newton E R. Chorioamnionitis and intraamniotic infection[J]. Clin Obstet Gynecol, 1993, 36(4): 795-808.

[7] Migita K, Miyashita T, Maeda Y, *et al*. Toll-like receptor expression in lupus peripheral blood mononuclear cells[J]. J Rheumatol, 2007, 34(3): 493-500.

[8] Nita I M, Serapinas D, Janciauskiene S M. alpha1-Antitrypsin regulates CD14 expression and soluble CD14 levels in human monocytes *in vitro*[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(6): 1165-1176.

[9] 董生凤. Toll 样受体 4 在感染性早产患者外周血单个核细胞的表达及意义[D]. 遵义: 遵义医学院, 2008.

[10] Molloy E J, O'neill A J, Grantham J J, *et al*. Labor induces a maternal inflammatory response syndrome[J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 190(2): 448-455.

[11] Peng Y, Gong J P, Liu C A, *et al*. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10 (19): 2890-2893.

[12] Kim Y M, Romero R, Chaiworapongsa T, *et al*. Toll-like receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and in preterm parturition that are associated with chorioamnionitis [J]. Am J Obstet Gynecol, 2004, 191(4): 1346-1355.

[13] Gardella C, Hitti J, Martin T R, *et al*. Amniotic fluid lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 as mediators of the inflammatory response in preterm labor[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 184 (6): 1241-1248.

[14] Roos T, Martin T R, Ruzinski J T, *et al*. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 receptor protein in amniotic fluid and cord blood in patients at term[J]. Am J Obstet Gynecol, 1997, 177(5): 1230-1237.

[15] Abrahams V M, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast[J]. Placenta, 2005, 26(7): 540-547.

(收稿 2010-04-12 修回 2010-05-16)

(编辑 王小宴)