DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.047
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
216 2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)02-0216-04

自然流产病例的绒毛与蜕膜细胞增殖和细胞凋亡的研究

郭玉萍[1],张 静[1],袁 瑞[2] ([1]重庆医科大学生物学教研室,重庆 400016;[2]重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400015)

提 要:目的 从细胞增殖与细胞凋亡的角度探讨自然流产的发生机制。方法 对30例正常早孕吸宫流产病例和30例自然流产病例的绒毛与蜕膜组织进行研究。常规光镜观察细胞形态学变化;免疫组织化学S-P法检测增殖细胞核抗原(PCNA)在细胞中的表达;用DNA缺口原位末端标记技术(TUNEL)检测细胞凋亡;免疫组化S-P法检测bcl-2/bax基因蛋白表达率比值。结果 自然流产绒毛组织形态学结构均出现程度不同的退行性改变,绒毛的细胞滋养细胞及蜕膜中增殖指数(PI)较正常早孕时明显减少($P<0.01$),而合体滋养细胞中从未发生过增殖,PI为0;与此相反自然流产绒毛的细胞滋养细胞、合体滋养细胞及蜕膜中凋亡指数(AI)较正常早孕时明显增多($P<0.05$, $P<0.01$),同时,早孕流产的绒毛及蜕膜中促/抑凋亡基因bcl-2/bax表达率的比值也较正常早孕时下降($P<0.05$, $P<0.01$),结果与细胞凋亡的发生一致。结论 细胞增殖和凋亡可能在孕卵发育过程中起着重要作用,绒毛和蜕膜组织中大量的细胞凋亡是其形态学退变的根本,并进而阻碍了孕卵的发育。

关键词:早孕;流产;细胞增殖;细胞凋亡;绒毛;蜕膜
中图法分类号:R329.28;R714.21 文献标识码:A

Apoptosis and proliferation in human chorionic villi and deciduae during spontaneous abortion

GUO Yu-ping, ZHANG Jing, YUAN Rui (Department of Biology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of spontaneous abortion in early pregnancy from apoptosis and proliferation. Methods Apoptosis and proliferation in early pregnant chorionic villi and deciduae from surgical aspiration and spontaneous abortion were studied. Histological changes were observed with light microscopy. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was assayed by immunohistochemical staining; apoptosis cell death was detected by using DNA *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferas-mediated dUTP-biotin nick ending labeling(TUNEL); both bcl-2 and bax gene protein were detected by using immunohistochemistyry. Results In chorionic villi after spontaneous abortion, there were extensive pathological changes in cell morphology. In spontaneous abortion, proliferating indexes of cytotrophoblasts and deciduas decreased in comparison with their counterparts in surgical aspiration ($P<0.01$), and proliferating indexes of syncytiotrophoblasts were 0. While apoptosis indexes of cytotrophoblasts, syncytiotrophoblasts and deciduas were increased in spontaneous abortion by comparision with their counterpants in surgical aspiration ($P<0.05$, $P<0.01$), and both villi and decidua bcl-2/bax ratios were decreased compared with their counterparts in surgical aspiratio ($P<0.05$, $P<0.01$), which was in consist with apoptosis. Conclusion Proliferation and apoptosis might play crucial roles in embryonic development and wastage during the first trimester of normal pregnancy. Apoptisis of a large population of cells in villi and deciduae might be the ultimate cause of morphelegical changes, and then prevent the development of human conceptus.

Key words: early pregnancy; abortion; apoptosis; proliferationvilli; decidua

人类早孕自然流产是早期妊娠期间由于各种病理因素所致孕卵死亡的一种常见疾病,是妊娠期常见并发症之一,其发生率高于临床已证实妊娠的10%。引起自然流产的病因多种多样[1],我们曾报道过染色体异常是自然流产的重要原因之一,另据文献报道母体内分泌失调、免疫功能异常、生殖器官异常及疾病、全身性疾病及感染等因素也是自然流产的重要原因,但其肯定的机制并不明确。本研究在常规光镜观察形态学变化的基础上,应用免疫组织化学(S-P法)和DNA缺口原位末端标记技术(TUNEL法)来检测正常早孕和早孕自然流产绒毛与蜕膜中细胞增殖和凋亡的情况,以期揭示早孕自然流产与其之间的关系,从细胞水平探讨早孕自然流产的机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象

对1999-08—2000-08在重医附一院门诊接受自然流产清宫的妇女30例进行研究,并选同期在该院进行正常早孕吸宫流产的妇女30例为对照,两组均无急慢性器质性和感染性病变。无一例染色体异常(包括流产者男女双方和绒毛染色体均正常)。实验组有5例弓形虫IgM(+)或IgG(+),2例巨细胞病毒IgM(+)或IgG(+);对照组无一例阳性发现。月经周期和超声检查

作者简介:郭玉萍(1965—),女,重庆市人,讲师,主要从事医学细胞生物学和遗传学方面的研究。电话:(023)68803806

收稿日期:2001-07-25;修回日期:2001-09-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用于决定孕周, 实验组停经(47.2±3.5)d, 孕卵直径约(2.1±0.4)cm; 对照组停经(48.2±5.7)d, 孕卵直径约(2.3±0.5)cm。

1.2　方法

1.2.1　绒毛的处理　　选择流产者男女双方及绒毛染色体均正常的孕卵。孕囊排出后, 分离绒毛和蜕膜组织各 0.5 g(约 1.0 cm×1.0 cm 大小), 立即用生理盐水洗净后置 10%福尔马林液中固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片 4 张, 60 ℃烤箱 3 h 后置37 ℃恒温箱过夜备用。2 张分别检测细胞增殖和凋亡, 1 张检测 bcl-2、bax 基因蛋白表达用于计算 bcl-2/bax 比值。另 1 张备用。

1.2.2　细胞增殖状态检测　　以增殖细胞核抗原(Proliferatung cell nucler antigen, PCNA)表达情况作为细胞增殖状态指标, 采用免疫组化 S-P 法。PCNA 检测试剂盒购自福州迈新试剂公司, 即用型。

1.2.3　细胞凋亡状态检测　　采用 Gavrieli 等[2] 的 DNA 缺口原位末端标记法(TDT-mediated dUTP biotin nick ending labeling, TUNEL), 略加修改。石蜡切片脱蜡入水, 微波修复抗原, 3%H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶活性, 1∶10 小牛血清阻断非特异性反应, 按 1∶10 或 1∶15 配制反应液(管 1: 脱氧核苷酸末端转移酶, 管 2: 荧光素连接的核苷酸混合缓冲液), 37 ℃孵育 1 h, PBS 冲洗, 加入酶标抗体 POD(管 3: 辣根过氧化物酶 HRP 连接的荧光素抗体), 37 ℃孵育 30 min, 冲洗, DAB 显色, 苏木精复染(严格掌握时间在 30~60 s 内), 中性树胶封片, 镜下观察。同时, 选常规小牛胸腺细胞为 TUNEL 阳性对照, 用蒸馏水代替一抗为阴性对照。

1.2.4　bcl-2/bax 检测　　采用免疫组化 S-P 法检测 bcl-2 和 bax 基因蛋白表达情况。检测试剂盒购自福州迈新试剂公司, 即用型。

1.2.5　结果判定　　以细胞核成分中出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 每例选取 10 个视野, 分别计数增殖指数(Proliferating indexes, PI)和凋亡指数(Apoptosis indexes, AI); 以及通过计数 bcl-2 阳性率和 bax 阳性率, 计算出 bcl-2/bax 比值。

1.3　统计学方法

全部统计学分析均采用 SAS 软件包进行, 组内比较用方差分析(ANOVA 过程), 组间比较用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　形态学结果

2.1.1　对照组　　在光镜下无一例有形态学改变。早期绒毛较少, 表面被覆两层形态不同的滋养细胞——细胞滋养细胞和合体滋养细胞, 绒毛内可见星芒状的间充质细胞和粘液样基质、Hafbauer 细胞等正常结构, 血管充血扩张。

2.1.2　实验组　　光镜下均出现程度不同的退行性改变, 增殖与退变并存: 细胞滋养细胞增生、合体滋养细胞明显减少甚至断裂消失, 合体结节形成, 间充质纤维素样变性、结构破坏呈一片均质状, 基质纤维素样甚至粘液样变性, 可见炎性反应, 淋巴细胞和中性粒细胞多见, 血管更加扩张充血, 绒毛滋养细胞基底膜及毛细血管基底膜轻度增厚。

2.2　早孕绒毛与蜕膜细胞增殖情况

2.2.1　对照组　　增殖以细胞滋养细胞和蜕膜细胞为主, PI 分别为(70.74±1.34)%、(90.35±2.18)%, 合体滋养细胞无增殖; PCNA 着色仅见于细胞核内, 胞浆内未见着色反应。

2.2.2　实验组　　仍以细胞滋养细胞和蜕膜细胞为主, PI 分别为(25.27±3.21)%、(29.35±1.87)%, 明显少于对照组, 差异非常显著($P<0.01$), 合体滋养细胞不发生增殖, 见图 1。

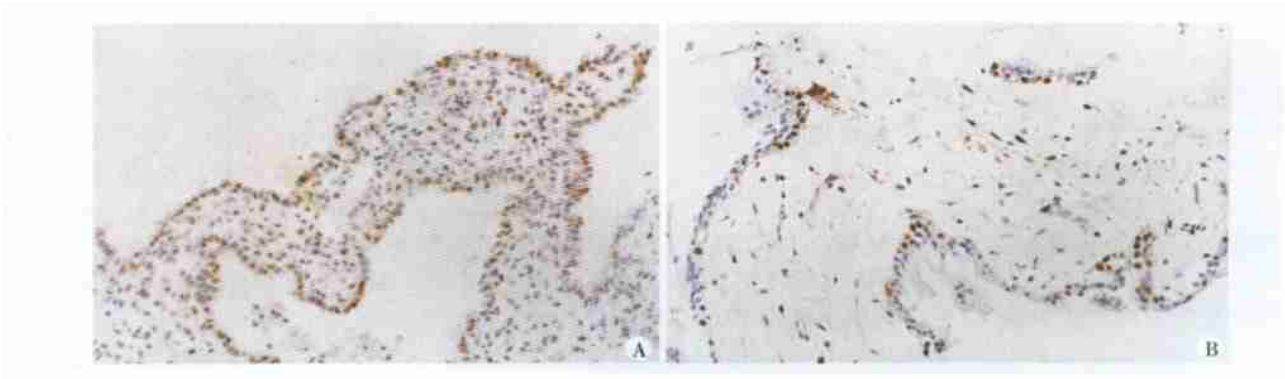


图 **1**　绒毛组织 **PCNA** 表达　(S-P×200)

A: 正常早孕; B: 自然流产

Fig 1　PCNA expression of dhorionic villi　(S-P×200)

A: Surgical aspiration; B: Spontaneous abortion

2.3　早孕绒毛与蜕膜细胞凋亡情况

2.3.1　对照组　　在绒毛组织的细胞滋养细胞、合体滋养细胞中均可检出少量的细胞凋亡, AI 分别为(10.27±0.35)%、(15.28±2.43)%; 而蜕膜组织的细胞凋亡较绒毛更少见, AI 仅为(5.75±1.27)%。但三者间细胞凋亡水平无相关关系($P>0.05$)。

2.3.2　实验组　　上述两种绒毛细胞的凋亡均比对照组明显增多, 尤以合体滋养细胞中的凋亡为主, 细胞滋养细胞和合体滋养细胞的 AI 分别为(30.29±3.24)%($P<0.05$)、(50.83±2.39)%($P<0.01$); 而蜕膜组织的凋亡较对照组更是明显增多, AI 高达(68.23%±2.65)($P<0.01$)。

2.3.3　绒毛和蜕膜间细胞凋亡水平的比较　　对照组绒毛和

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

蜕膜间细胞凋亡水平差异不显著($P>0.05$);实验组蜕膜细胞凋亡水平明显高于绒毛,二者差异显著($P<0.05$)。但两种组织细胞凋亡无直线相关关系,见图 2。

2.4 早孕绒毛与蜕膜组织 bcl-2/bax 比值情况

2.4.1 对照组 正常早孕绒毛和蜕膜组织的 bcl-2/bax 比值分别为 1.04±0.47、1.42±0.71,二者间差异不显著($P>0.05$)。

2.4.2 实验组 自然流产绒毛和蜕膜组织的 bcl-2/bax 比值分别为 0.54±0.21、0.68±0.32,二者间差异不显著($P>0.05$),但与对照组相比,差异显著($P<0.05$, $P<0.01$)。

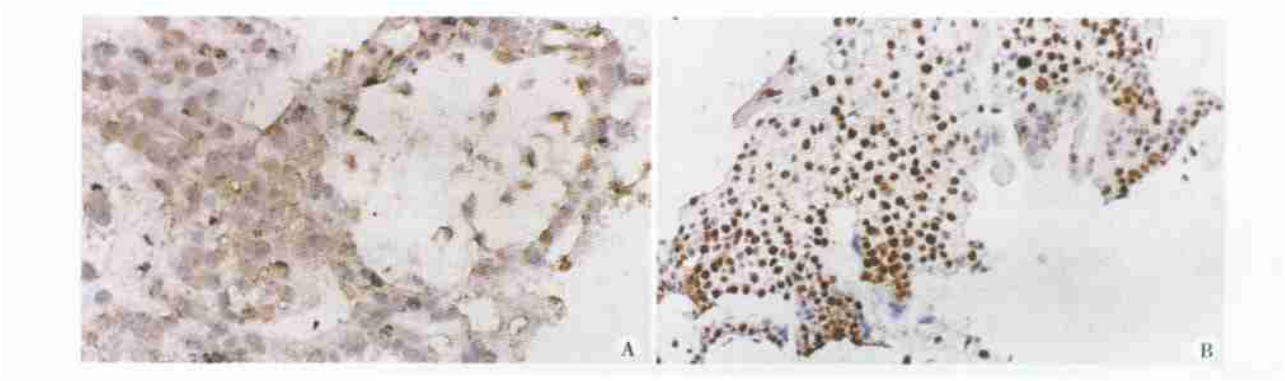


图 2 绒毛组织凋亡细胞表达

A:正常早孕 (TUNEL×400);B:自然流产(TUNEL×200)

Fig 2 Apoptosis expression of chorionic villi

A: Surgical aspiration (TUNEL×400); B: Spontaneous abortion (TUNEL×200)

3 讨论

本研究从细胞增殖和细胞凋亡的角度来探讨早孕自然流产的发生发展机制。

3.1 早孕绒毛的发育

正常早孕时,绒毛及蜕膜细胞形态正常,界限清楚,胞浆丰富,胞核深染,提示细胞功能活跃旺盛。但在异常情况下(如前所举),绒毛和蜕膜发育不良或退变,导致孕卵发育受阻,出现本实验中观察到的一系列病理表现,以及妊娠失败。

3.2 细胞增殖与早孕

PCNA 是一种分子量为 36×10^3 的核蛋白。其功能为 DNA 多聚酶 δ的辅助因子,与 S 期 DNA 复制有关,在细胞增殖过程中周期性表达[3]:于 G_1 晚期出现,S 期达高峰,G_2 期下降,而 M 期和 G_0 期则无表达,因此被视为一个能较可靠地反映细胞群体增殖活性的客观指标。

正常早孕绒毛处于功能旺盛期,增殖活跃,蜕膜腺体和蜕膜细胞为早期的孕卵发育提供营养,并保护孕卵免受侵扰。绒毛内滋养层迅速增生,细胞分化为两层,内层的细胞滋养细胞分裂活跃,核内 DNA 合成旺盛,可见大量的 PCNA 阳性细胞,平均高达(70.74±1.34)%;而外层的合体滋养细胞为分化终末细胞,无增殖能力,则从未见到阳性细胞。而在早孕自然流产绒毛病例中,由于各种细胞均呈明显退行性改变,PCNA阳性细胞均呈明显减少,减少到(25.27±3.21);而蜕膜组织的 PCNA 阳性细胞更是由正常早孕时的(90.35±2.18)%明显减少到(29.35±1.87)%,与对照组比较,差异有非常显著的统计学意义($P<0.01$),表明细胞增殖明显减少,结果与国内外学者的研究一致[3,4]。

3.3 细胞凋亡与早孕

细胞凋亡是一种受细胞内外因素调控的细胞自杀性死亡方式,是正常组织细胞存活和发育的一个重要的生理现象,因而存在于各种类型的细胞中。在人类非孕状态下,子宫内膜细胞凋亡多发生在中晚期黄体阶段的黄体,增殖早期、分泌晚期和月经期[5,6]。本实验研究结果显示:正常早孕阶段的细胞滋养细胞、合体滋养细胞和蜕膜中均有少量的细胞凋亡发生,且着色较淡,其中以合体滋养细胞较多,蜕膜组织最少,与各种文献报道的结果一致,它说明细胞凋亡的发生与某些器官的细胞动力学过程中滋养层细胞的增殖与分化的某方面有关[7],它也许是细胞正常生长发育必不可少的。合体滋养细胞是分化终末细胞,凋亡是其必然结局;而细胞滋养细胞凋亡可能与绒毛发育、DNA 修复障碍以及对邻近细胞凋亡 DNA 片段的吞噬有关;另外,在正常妊娠的蜕膜组织中较之分泌晚期的内膜组织有明显减少的凋亡细胞,本实验的研究结果显示正常早孕蜕膜的凋亡指数(AI)仅为(5.75±1.27)%,而蜕膜组织早已证实它具有给孕卵提供营养、保护孕卵免受母体的免疫排斥、并调节滋养层细胞浸入子宫内膜中发育成长的重要功能。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在某些病理情况下, 细胞凋亡明显增多, 它可以作为清除病理性受损组织的一种重要途径[8,9]。以往的某些研究表明妊娠中的某些病理现象与细胞凋亡有着密切关系, 如在感染引起的早产、妊高征及 IUGR 等妊娠并发症中都证实了细胞凋亡的作用; 有研究证明药物米非司酮的抗早孕作用也是通过诱导和促进蜕膜及绒毛细胞凋亡来实现的。本实验研究结果提示: 可能由于各种致病因子的入侵, 导致细胞滋养细胞和合体滋养细胞中发生大量的细胞凋亡, 尤以合体滋养细胞为主, AI 分别为(30.29±3.24)%($P<0.05$)、(50.83±2.34)%($P<0.01$), 最高可达 85.76%; 此外蜕膜组织的细胞凋亡水平也明显增加到(68.23±2.65)%($P<0.01$), 而细胞的大量凋亡势必影响其正常功能的发挥, 使绒毛生长受阻, 蜕膜变性坏死, 从而阻碍了人类孕卵的发育, 继而发生自然流产, 本研究结果与 KoKawa 等[10] 的研究有一致性, 它为探讨早孕自然流产的发病机制提供了一些新的线索及想法。

凋亡发生的机制十分复杂, 确切的机制并不肯定, 研究发现细胞凋亡可能与一对促/抑凋亡基因 bcl-2/bax 有关, 前者有抑制细胞凋亡的作用; 后者有促进细胞凋亡的作用, 二者功能相关, 结构上具有 21%的同源性, 通过形成二聚体而发挥调控细胞凋亡的作用: 当 bcl-2 过量表达形成 bcl-2/bax 异源二聚体较多时, 则细胞存活; 相反当 bax 过量表达形成 bax 同源二聚体较多时, 则引起细胞凋亡, 目前的研究大多认为 bcl-2/bax 的比值实际上是决定细胞接受刺激信号后存活与否的关键。本研究结果显示自然流产绒毛和蜕膜组织的 bcl-2/bax 比值均比对照组明显下降, 两组间差异有显著的统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 与细胞凋亡的发生具有一致性, 提示入侵的各种致病因子可能通过诱导绒毛与蜕膜组织 bcl-2/bax 基因蛋白表达率比值的下降, 从而诱导细胞的凋亡。综上所述细胞凋亡是一个多因素控制的过程, 关于自然流产与细胞凋亡的因果关系以及确切的机制仍有待于进一步的探讨和研究。

参考文献:

[1] 专题讨论: 反复流产的诊断与治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1998, 15(3): 131－155.

[2] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biology, 1992, 119(3): 493－501.

[3] 杨业洲, 曹泽毅. 米非司酮对人早孕绒毛细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华妇产科杂志, 1998, 33(5): 286－270.

[4] Qumsiyeh M B, Kim K R, Ahmed M N, *et al*. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation inchromosomally abnormal villi[J]. Cytogent Cell Genet, 2000, 88(3-4): 230－235.

[5] Huppertz B, Hunt J S. Trophoblast apoptosis and placental development — a workshop report[J]. Placenta, 2000, 21(Suppl): S74－76.

[6] Kokawa K, Shikone T, *et al*. Apoptosis in the human uterine endocrinology during the menstrual cycle[J]. Journal Clinical Endocrinology Metabolism, 1996(81): 4 144－4 147.

[7] 赵卫红, 寿好长 主编. 细胞凋亡[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1997. 1－48.

[8] Cernochova D, Pospisilova E, Lichnovsky V. Expression of apoptosis in the development human cephalic region during the embryonic and early fetal period[J]. Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med, 1999, 42(Suppl): 65－76.

[9] 李翠兰, 胡章和, 曹来英. 重度妊娠高血压综合征患者胎盘组织中细胞凋亡及其调控基因的研究[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(6): 335－337.

[10] Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis! in the human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester[J]. Placenta, 1998(19): 21－26.

（编辑　王　红）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是: 凡是可以使用阿拉伯数字, 而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字:

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如: 公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。表示年份要写全称, 1995 年不能写成 95 年或'95 年; 1953～1958 年不能写成 1953～58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如: 13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量(整数、小数、分数、百分数、约数)包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法, 不用"千分撇", 节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节, 也不加千分撇。5 位数以上, 尾数 0 多的数, 可以用"万""亿"作单位, 但不得以十、百、千、百万、十亿等作单位, 例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

（本刊编辑部）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net