

TLR2 和 TLR4 在原因不明复发性流产绒毛和蜕膜中的表达及其意义

翟洪波 徐 键

摘 要 **目的** 本实验通过检测原因不明复发性流产(URSA)患者和健康早孕者 TLR2 和 TLR4 在子宫绒毛和蜕膜中的表达,及外周血清中 TNF- α 及 IL-10 的水平,初步探讨 TLR2 和 TLR4 与 URSA 存在相关性,以及在 URSA 发生发展中的可能途径。**方法** 前瞻性研究 2008~2009 年在浙江大学医学院附属妇产科医院和杭州市第一人民医院门诊患者。年龄在 25~35 周岁,孕龄<12 周。将有 ≥ 3 次自然流产的 URSA 患者作为研究组;将曾有正常生育史,本次要求行人工流产终止妊娠的早孕健康妇女作为对照组,分别选择 20 例。免疫组化检测 TLR2 和 TLR4 在两组绒毛和蜕膜中的表达;用 ELISA 法检测血清 TNF- α 及 IL-10 的水平,比较是否存在差异性。**结果** ①TLR2 在两组绒毛、蜕膜中表达差异无统计学意义($P>0.05$);②TLR4 在研究组绒毛、蜕膜表达明显增强,有显著统计学意义($P<0.05$);③TNF- α 在研究组中的水平明显增高,有显著统计学意义($P<0.05$);IL-10 在两组中的差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** TLR4 可能是通过释放过量的 Th1 型细胞因子,导致 Th1/Th2 失衡,从而极可能参与 URSA 的发病。

关键词 不明原因复发性流产 TLR2 TLR4

Expression of TLR2 and TLR4 on Decidual and Villi in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion and Its Significance. Zhai Hongbo, Xu Jian. Women's Hospital School of Medicine Zhejiang University, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective In this study, by detecting the TLR2, TLR4 in the expression of villi and decidua of unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA) and early pregnancy, we can preliminarily study the role of TLR2 and TLR4 in the genesis and development of URSA. Meantime, by detecting serum level of TNF- α and IL-10, we can preliminarily learn the available ways of TLR2 and TLR4 in the occurrence of URSA. **Methods** Prospective study on outpatients of Obstetrics and Gynecology at the Medical College of Zhejiang University and Hangzhou First People's Hospital in 2008-2009 was carried out. Those women whose age were between 25-35 years old, and gestational age <12 weeks were put together as a study group. For those URSA patients who have been spontaneously aborted for ≥ 3 times, we regarded then as study group. While for those healthy patients who had normal reproductive history, and demanded induced abortion in early pregnancy termination of pregnancy, we distinguished them as a control group. We selected both URSA patients (study group) and healthy pregnant patients (control group) with 20 cases. By immunohistochemical staining, we detected the expression of TLR2 and TLR4 in villi and decidua to compare the different expression of TLR2 and TLR4 in villi and decidua of URSA and early pregnancy. At the same time, we detected serum concentration of TNF- α and IL-10 with ELISA to compare the concentration differences of serum TNF- α and IL-10 between URSA and early pregnancy. **Results** ①No significant difference in expression of TLR2 in the cytoplasm and the membrane of villous trophoblast cells and glandular epithelial cells was found between two groups ($P>0.05$). ②Compared with contrast group, expression of TLR4 in the cytoplasm and the membrane of trophoblast cells and glandular epithelial cells in study group was significantly increased, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). ③Compared with the control group, concentration of TNF- α in the study group was significantly higher, and the difference was statistically significant ($P<0.05$); while the concentration of IL-10 had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** TLR4 causes URSA through releasing of excessive levels of Th1 type cytokines, and thus leading to Th1/Th2 imbalance.

Key words Unexplained recurrent spontaneous abortion; TLR2; TLR4

复发性流产是临床上常见的难治性不育的病因

之一,临床上 60%~70% 不明原因性复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)与免疫功能紊乱有关^[1]。研究发现,TLR2 和 TLR4 能活化母胎界面的免疫细胞(NK 细胞,巨噬细胞及 T 细胞),并释放 Th1 型细胞因子,如肿瘤坏死因子- α

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2080397)

作者单位:310006 杭州,浙江大学附属妇产科医院

通讯作者:翟洪波,电子信箱:Zhaihb@126.com

(TNF-α)、r-干扰素(IFN-r)、白介素-2(IL-2)等细胞因子,主要介导细胞免疫;Th2 细胞分泌白介素-4(IL-4)、白介素-6(IL-6)、白介素-10(IL-10)等细胞因子,主要介导体液免疫。Th1/Th2 平衡向 Th1 倾斜往往导致自然流产的发生^[2]。由 TLRs 在调节免疫反应及细胞凋亡中可能起的重要作用提示我们:TLR2、TLR4 和 URSA 之间极可能存在一定的相关性,TLR2 和 TLR4 介导的免疫反应极可能与 URSA 发病有关,而到目前为止,关于 TLR2、TLR4 和 URSA 之间的相关性研究在国内外尚无文献报道。

本研究拟通过观察比较在 URSA 及健康早孕患者子宫绒毛和蜕膜中 TLR2 和 TLR4 的表达差异性,及在外周血清中 Th1 型细胞因子 TNF-α 及 Th2 型细胞因子 IL-10 水平,来初步探讨 URSA 发生机制。

材料与方法

1. 研究对象:研究对象选自 2008 年 10 月~2009 年 6 月在浙江大学附属妇产科医院和杭州市第一人民医院门诊孕 12 周以内的流产患者。其中研究组 20 例的纳入标准:①年龄 25~35 周岁,≥3 次自然流产;②停经 8 周内监测血 hCG;停止上升;停经 8~12 周 B 超复查无胎心搏动;③有正常的排卵功能;④无全身性疾病;⑤生殖系统解剖发育正常;⑥夫妻双方染色体核型无异常;⑦抗心磷脂抗体(ACA)、抗精子抗体(AsAb)指标均阴性;⑧抗 A IgG,抗 B IgG 效价均≤1:64;⑨凝血功能,血黏度正常。剔除标准:①生殖道支原体、衣原体等感染及 TORCH 的影响;②孕期使用甾体类激素等药物;③清宫前用米非司酮等;④孕早期有阴道出血的患者。其中对照组 20 例的纳入标准:①年龄 25~35 岁,孕周<12 周;②随机选择有正常生育史,要求行人工流产的健康早孕妇女。剔除标准:①停经后有腹痛、阴道流血等;②有自然流产、早产、死胎、死产等异常妊娠史;③3 个月内曾使用任何甾体类药物;④宫内节育器(IUD)。术前患者均签署知情同意书。

2. 主要试剂:(1)兔抗鼠 TLR2、TLR4 多克隆抗体(美国 Abcam 公司)。(2)TNF-α、IL-10 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

3. 实验方法:(1)检测子宫绒毛和蜕膜组织中 TLR2、TLR4 的表达。方法:①石蜡切片的 HE 染色;②免疫组化(EnVision 二步法)。用子宫蜕膜组织切片,用 PBS 液代替 I 抗进行阴性对照;用子宫内膜组织切片,操作步骤相同,进行阳性对照。③HE 结果判读:显微镜下观察绒毛无水肿,滋养细胞无显著增生;蜕膜组织内未见灶性炎性细胞浸润。④免疫组化染色片的阅读:以细胞胞质或胞膜中出现棕黄色颗粒为判断标准。依照细胞阳性着色程度(抗原含量),分为弱阳性(+)1 分、中等阳性(++)2 分、强阳性(+++)3 分。依照阳性细胞数量,分弱阳性(+)1 分,指阳性细胞数在 25% 以下;中等阳性(++)2 分,指阳性细胞数在 25%~49%;强阳性(+++)3 分,指阳性细胞数≥50%。采用两者相加的计算

方法。≤3 分者为阴性,等于 4 分为弱阳性(+),等于 5 分为阳性(++),等于 6 分为强阳性(+++)。结果判断在双盲下进行,每张切片由两名病理科医生分别计数。统计学方法:两组结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验。若 $P<0.05$,则有统计学差异。(2)ELISA 法测定。方法手术当天抽血 3ml,离心后保存于-30℃冰箱内待测。用同一试剂盒在同一时间测定 TNF-α 及 IL-10。统计学方法:两组结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验,若 $P<0.05$,则有统计学差异。

结 果

1. 研究组与对照组间的年龄、孕龄和孕次:经 χ^2 检验, $P>0.05$,无统计学差异。

2. TLR2 在绒毛和蜕膜组织的表达:TLR2 在两组绒毛及蜕膜组织中均见表达。绒毛组织主要表达于合体滋养细胞的胞质和胞膜,蜕膜组织主要表达于腺体上皮细胞的胞质和胞膜。与对照组比较,TLR2 在两组绒毛及蜕膜组织中的表达经 χ^2 检验, $P>0.05$,差异无统计学意义。

3. TLR4 在绒毛和蜕膜组织的表达:TLR4 在两组绒毛蜕膜组织中均见表达。绒毛组织主要表达于合体滋养细胞的胞质和胞膜,蜕膜组织主要表达于腺体上皮细胞的胞质和胞膜。与对照组比较,TLR4 在研究组绒毛滋养细胞及蜕膜腺上皮的胞质和胞膜中表达均明显增高,差异均有显著统计学意义(表 1、表 2)。

表 1 TLR4 在研究组与对照组绒毛中的表达比较

组别	+	++	+++
研究组	7	6	7
对照组	16	2	2
合计	23	8	9

$\chi^2 = 8.300, P < 0.05$

表 2 TLR4 在研究组与对照组的蜕膜中的表达比较

组别	+	++	+++
研究组	8	5	7
对照组	17	2	1
合计	25	7	8

$\chi^2 = 9.03, P < 0.05$

4. TNF-α 及 IL-10 在血清中的水平:与对照组比较,TNF-α 在研究组中的水平明显增高,经 t 检验($t = 2.525$), $P < 0.05$,差异有显著统计学意义,而 IL-10 在研究组中的水平经 t 检验, $P > 0.05$,差异无统计学意义。

讨 论

妊娠是一种半同种移植过程,正常妊娠时携带有外来抗原的胚胎之所以能够获得“免疫逃逸”,是由于母体免疫系统对胚胎之父亲抗原识别所产生的反应是免疫营养和免疫防护而非免疫攻击,表现为一种特殊类型的妊娠免疫耐受^[3]。母胎界面的免疫活化与抑制之间的平衡调控对胚胎及胎儿的生长发育起至关重要的作用。TLRs 是近年发现的一种的细胞跨膜受体及病原模式识别受体,存在于所有的脊椎动物和无脊椎动物中^[4]。1997 年 Medzhitov 等首次克隆出来人类的第一个 Toll 样受体即 TLR4,主要识别 G^- 菌的脂多糖,而 TLR2 主要识别 G^+ 菌细胞壁成分如肽聚糖、磷壁酸等^[5]。它们主要是通过 MyD88 依赖性反应通路进行信号转导,其过程:TLRs 有 IL-1 同源的胞内信号位点,为保守的 TIR 结构。TLRs 胞外区接受相应信号后,通过 TIR 位点招募胞质内接头分子 MyD88,激活 IL-1 受体相关激酶家族 (IRAK) 的丝氨酸/苏氨酸激酶。Toll 协同蛋白 (Tollip) 在招募 IRAK 至 TLR4 的 TIR 位点中起重要作用。磷酸化的 IRAK 招募 TNF 受体相关因子 6 (TRAF-6),后者能与转移生长因子 β 活性激酶 (TAK1) 及其结合蛋白 (TAB1/2) 结合,而形成 TRAF-6-TAK1-TAB1/2 复合物,最终激活 NF- κ B^[6]。NF- κ B 是诱导单核-吞噬细胞产生炎症细胞因子的重要转录因子。母胎界面聚集着大量的抗原递呈细胞 (APC)。妊娠期间过度激活 APC,影响胚胎及胎儿的生长发育、都可能导致流产。而 TLR2 和 TLR4 就是通过激活 APC,诱发适应性免疫反应的最重要的一类参与分子。TLR4 使早孕滋养细胞分泌较高水平的炎性细胞因子如 TNF- α 。而滋养细胞对这些细胞因子非常敏感, TNF- α 在胎盘中的高表达,可能会在介导滋养层细胞的凋亡过程中起重要作用^[7]。

有学者研究证明:在妊娠前 3 个月的胎盘组织中滋养层细胞有 TLR4 的表达^[8]。实验中我们发现:TLR2 和 TLR4 在研究组和对照组的绒毛及蜕膜组织中均见表达,免疫组化未观察到阴性结果。TLR2 在研究组的绒毛和蜕膜中表达与对照组无明显差别,提示我们:TLR2 与 URSA 的发病过程可能没有相关性。有以下两种可能:①由于 TLR2 没有参与 URSA 的发病过程,也没有受到 URSA 病变的影响;② TLR2 在介导适应性免疫反应过程中不仅释放 Th1 型细胞因子,而且释放 Th2 型细胞因子,作用机制复杂,需进一步研究。

TLR4 在研究组的绒毛和蜕膜中表达与对照组相比,明显升高。这一结果证实了 TLR4 比 TLR2 更密切地参与了不明原因复发性流产发病过程中的免疫反应,TLR4 与 URSA 的关系可能更为密切。作为引发 URSA 的关键部位,绒毛及蜕膜组织中 TLR4 表达变化可能是 URSA 发生的关键环节之一。

TLR4 的配体能够有效地促进单核-吞噬细胞成熟,极大地增强了其捕获抗原、活化抗原特异性 T 细胞的能力,诱导前期炎症性反应产生众多细胞因子^[9]。随着现代生殖免疫学的发展,认为母体 Th1/Th2 细胞因子与 RSA 的发生、发展有密切关系^[10]。URSA 患者妊娠期母胎界面 Th1/Th2 细胞因子平衡失调,Th1 型细胞因子与妊娠失败密切相关,而 Th2 型细胞因子与妊娠成功相关。本实验采用 ELISA 法检测研究组和对照组血清中 Th1 型细胞因子 TNF- α 水平,结果显示 TNF- α 在研究组与对照组相比,水平明显升高;证实 TNF- α 与 URSA 关系密切。TNF- α 主要来源于巨噬细胞,它可以调节妊娠滋养细胞的生长、分化,刺激滋养细胞合成和分泌孕激素,改变滋养细胞的黏附性。在滋养细胞侵入子宫蜕膜的过程中起调节作用。母胎界面含有大量的巨噬细胞,当母体免疫功能异常或某些因素使巨噬细胞等被激活,均可造成 TNF- α 水平升高。TNF- α 是一种多肽类介质,可通过多种途径导致流产:激发 Th1 型免疫反应,排斥胚胎组织;促凝血酶原激酶 12 (Fg12) 表达上调导致胎盘滋养层血管血栓形成,影响绒毛正常发育,出现绒毛滋养细胞凋亡增加,直接破坏胎盘屏障的完整性,导致流产的发生。TNF- α 能够上调体外培养的滋养细胞 TLR2 和 TLR4 的表达,如此形成恶性循环,最终影响了母胎界面的免疫,进而引起流产。TLR4 介导的刺激途径能增强宿主对抗原的特异性免疫应答的能力,在抗感染中起重要作用,同时也加剧组织的炎性损伤。当 Th1/Th2 平衡向 Th1 倾斜时,则可能影响胚胎及胎儿的生长发育,从而引发流产。

IL-10 是由蜕膜 NK 细胞分泌的 Th2 细胞因子之一。它能选择性抑制 IL-2、IFN- γ 、TNF、GM-CSF 等细胞因子的合成,使细胞免疫下降,降低巨噬细胞、NK 细胞活性,降低淋巴毒素作用,使胚胎逃逸母体免疫,母体对胎儿免疫耐受,利于妊娠。若母胎界面缺乏 Th2 型细胞因子,则可导致流产、早产,胎盘形成差,甚至胎儿死亡。实验中 IL-10 在研究组与对照组中血清水平无显著统计学意义。可能与本次实验

仅仅检测血清中 IL-10 水平,尚未进一步检测子宫蜕膜中 IL-10 水平有关。对此,有待进一步研究。

本实验通过观察 TLR2 和 TLR4 在研究组和对照组的绒毛蜕膜组织中的表达、血清中 Th1 型细胞因子 TNF- α 和 Th2 型细胞因子 IL-10 水平,明确了 TLR4 与 URSA 有相关性,提出了 TLR4 可能是通过释放过量的 Th1 型细胞因子,导致 Th1/Th2 失衡、从而引发 URSA 这一假设。由此可间接说明 TLR4 作为引发 URSA 的关键部位,Th1/Th2 平衡向 Th1 倾斜是 URSA 发生的关键环节之一。我们期望 TLR4 能为 URSA 治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Croy BA, Ashkar AA, Minhas K, *et al.* Can murine uterine natural Killer cells give insights into the pathogenesis of preeclampsia? J Soc Gynecol Investig, 2000, 7 (1):12-20
- 2 Visser N, van Rijn BB, Rijkers GT, *et al.* Inflammatory changes in preeclampsia: current understanding of the maternal innate and adaptive immune response. Obstet Gynecol Surv, 2007, 62 (3):191-201
- 3 Wu X, Jin LP, Yuan MM, *et al.* Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56bright CD16- NK cells into decidua by way of ex-

- pressing and secreting of CXCL12 / stromal cell-derived factor 1. J immunol, 2005, 175:661-681
- 4 Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, *et al.* Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. Blood, 2007, 109 (4):1422-1432
- 5 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 1997, 388 (6640):394-397
- 6 Akira S. Mammalian Toll-like receptors. Curr Opin Immunol, 2003, 15:5-11
- 7 Crocker IP, Barratt S, Kaur M, *et al.* The in-vitro characterization of induce apoptosis in placental cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. Placenta, 2001, 22 (10):822-830
- 8 Abrahams V M, Bole-Aldo P, Kim Y M, *et al.* Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. J Immunol, 2004, 173 (7):4286-4296
- 9 Lee HK, Iwasaki A. Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. Sem Immunol, 2007, 1:48
- 10 Raghupathy R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. Hum Reprod, 2000, 15 (3):713-718

(收稿:2010-12-06)

贵州苗族支气管哮喘患者与 β_2 肾上腺素受体基因多态性的关系研究

叶贤伟 冯端兴 张湘燕 余红 许梅

摘要 目的 探讨贵州苗族人群 β_2 肾上腺素受体 (β_2 -AR) 基因 16、27 位点多态性与支气管哮喘的相关性。**方法** 采用等位基因特异性聚合酶链反应方法,对 31 例支气管哮喘者、37 名健康对照者进行 β_2 -AR 基因多态性分析。**结果** β_2 -AR 基因 16 位点多态性分布频率在支气管哮喘组为:精氨酸/精氨酸占 16.1%、精氨酸/甘氨酸占 61.3%、甘氨酸/甘氨酸占 22.6%;对照组为精氨酸/精氨酸占 13.5%、精氨酸/甘氨酸占 70.3%、甘氨酸/甘氨酸占 16.2%。27 位点多态性分布频率在支气管哮喘组为:谷氨酰胺/谷氨酰胺占 32.3%、谷氨酰胺/谷氨酸占 54.8%、谷氨酸/谷氨酸占 12.9%;对照组中谷氨酰胺/谷氨酰胺占 37.8%、谷氨酰胺/谷氨酸占 51.4%、谷氨酸/谷氨酸占 10.8%,两组在 β_2 -AR 基因 16、27 两位点多态性分布频率比较差异无显著性 ($P>0.05$)。**结论** 贵州苗族支气管哮喘与 β_2 -AR 基因 16、27 位点多态性无关联。

关键词 哮喘 β_2 肾上腺素受体 基因多态性

Study on the Relationship between β_2 -adrenergic Receptor Genetic Polymorphisms and Asthma in Miao Nationality. Ye Xianwei, Feng Duanxing, Zhang Xiangyan, *et al.* Department of Respiratory Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital, Guangdong 550002, China

Abstract Objective To analyze the relationship between β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) genetic polymorphism and asthma in the people of the Miao nationality of Guizhou. **Methods** Allele Specific-PCR technique was used to determine 16, 27 loci of β_2 -AR ge-

基金项目:贵州省卫生厅基金资助项目(2007 年 119-21 号)

作者单位:550002 贵阳,贵州省人民医院呼吸内科

通讯作者:叶贤伟,副主任医师,电子信箱:ywx1205@163.com