

TGF- β 1、MMP-9、VEGF在输卵管妊娠中的表达和意义

金力荣¹,杨麦青^{2,3},徐洪波⁴,魏燕妮⁵

(1.昌邑市人民医院产科,山东 昌邑 261300;

2.昌邑市人民医院病理科,山东 昌邑 261300;

3.潍坊市人民医院病理科,山东 潍坊 261041;

4.昌邑市人民医院输血科,山东 昌邑 261300;

5.潍坊护理职业学院健康管理系,山东 潍坊 261041)

摘要:目的 通过检测输卵管妊娠患者绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 的表达变化,探讨其在输卵管妊娠中的临床意义。方法 选取 2017 年 1 月-2020 年 12 月在本医院确诊输卵管妊娠并行手术治疗的患者 40 例作为观察组,另选取同期因非意愿妊娠正常早孕要求人工流产的 40 例患者作为对照组。采用免疫组织化学方法检测两组绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 蛋白的表达,分析 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 与临床指标的关系及 TGF- β 1 与 MMP-9、VEGF 的相关性。结果 观察组 TGF- β 1、VEGF 蛋白表达低于对照组,MMP-9 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);观察组 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 蛋白的表达与年龄、停经天数、孕次、体质指数均无关($P>0.05$);观察组 TGF- β 1 的表达与 VEGF 呈正相关($r=0.326, P<0.05$),与 MMP-9 的表达呈负相关($r=-0.353, P<0.05$)。结论 输卵管妊娠患者绒毛组织中 TGF- β 1、VEGF 蛋白的表达减少,而 MMP-9 的表达增多;TGF- β 1 的表达与 VEGF 的表达呈正相关,与 MMP-9 的表达呈负相关;绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 蛋白表达异常可能参与了输卵管妊娠的发生。

关键词:输卵管妊娠;TGF- β 1;MMP-9;VEGF

中图分类号:R714.22

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2022.12.029

文章编号:1006-1959(2022)12-0122-04

The Expression and Significance of TGF- β 1, MMP-9, VEGF in Tubal Pregnancy

JIN Li-rong¹, YANG Mai-qing^{2,3}, XU Hong-bo⁴, WEI Yan-ni⁵

(1.Department of Obstetrics, Changyi People's Hospital, Changyi 261300, Shandong, China;

2.Department of Pathology, Changyi People's Hospital, Changyi 261300, Shandong, China;

3.Department of Pathology, Weifang People's Hospital, Weifang 261041, Shandong, China;

4.Department of Blood Transfusion, Changyi People's Hospital, Changyi 261300, Shandong, China;

5.Department of Health Management, Weifang Nursing Vocational College, Weifang 261041, Shandong, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical significance of TGF- β 1, MMP-9 and VEGF in tubal pregnancy by detecting the expression of TGF- β 1, MMP-9 and VEGF in the villi of tubal pregnancy patients. **Methods** Forty patients with tubal pregnancy diagnosed in our hospital from January 2017 to December 2020 were selected as the observation group, and 40 patients with normal early pregnancy requiring artificial abortion during the same period were selected as the control group. Immunohistochemical method was used to detect the expression of TGF- β 1, MMP-9 and VEGF protein in the villi of the two groups, and the relationship between TGF- β 1, MMP-9, VEGF and clinical indicators was analyzed. **Results** The expression of TGF- β 1 and VEGF protein in the observation group was lower than that in the control group, and the expression of MMP-9 protein was higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P<0.05$). The expression of TGF- β 1, MMP-9 and VEGF protein in the observation group was not correlated with age, menopause days, pregnancy times and body mass index ($P>0.05$). The expression of TGF- β 1 in the observation group was positively correlated with VEGF ($r=0.326, P<0.05$), and negatively correlated with the expression of MMP-9 ($r=-0.353, P<0.05$). **Conclusion** The expression of TGF- β 1 and VEGF protein in villi of patients with tubal pregnancy is decreased, while the expression of MMP-9 is increased. The expression of TGF- β 1 is positively correlated with the expression of VEGF, and negatively correlated with the expression of MMP-9; abnormal expression of TGF- β 1, MMP-9 and VEGF proteins in villi may be involved in the occurrence of tubal pregnancy.

Key words: Tubal pregnancy; TGF- β 1; MMP-9; VEGF

输卵管妊娠(tubal pregnancy)是异位妊娠中最常见的一种,是妇产科最为常见的急腹症^[1]。输卵管妊娠在早期未破裂时,诊断难度较大,若不经及时早期的诊断和治疗,严重者会因失血致死^[2,3]。现阶段

诊断异位妊娠的方法是通过一系列彩超和持续监测血清 β -hCG 的水平,但这些指标都不具有特异性,因此探索新的特异性的标记物用以早期、及时诊断输卵管妊娠具有重要意义。正常妊娠是一个非常复杂的过程,滋养叶细胞的受控侵袭、免疫细胞和细胞因子的平衡以及滋养叶细胞和免疫细胞之间的影响都起着重要的作用。TGF- β 1 位于人染色体 19q13.1-q13.3,是一种多功能细胞因子,可以调节免疫细胞生长、分化,影响细胞外基质的形成,维持

作者简介:金力荣(1973.3-),女,山东昌邑人,硕士,副主任医师,主要从事病理妊娠的发病机制研究

通讯作者:杨麦青(1979.11-),女,山东昌邑人,博士,主治医师,主要从事基础医学研究

免疫功能和免疫稳态,促进胚胎发育等^[4-7]。以往研究表明^[8,9],TGF- β 1 参与调解妊娠过程中母体免疫耐受的过程。TGF- β 1 水平的改变参与了妊娠期相关疾病的发生发展,如自然流产、胎盘植入^[10,11]。正常的血供和氧供对于维持正常的妊娠也是必不可少的。VEGF 在促进血管生成、调节细胞耐受低氧水平的过程中意义重大^[12-14]。基质金属蛋白酶(MMPs)是一组蛋白水解酶,能够降解细胞外基质,MMPs 在妊娠过程中可以水解细胞外基质,从而调节滋养叶细胞的浸润功能^[15-17]。本实验综合以上研究结论,通过研究 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 在输卵管妊娠患者绒毛组织中的表达水平,及其与临床指标的关系,以期

明确 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 在输卵管妊娠发生发展过程中可能的作用,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月-2020 年 12 月于昌邑市人民医院妇产科就诊并经过临床诊断且手术治疗的输卵管妊娠患者 40 例作为观察组,所有患者术前未经任何治疗,临床和病理资料保存相对完整,另选取同期非意愿妊娠正常早孕自愿行人工流产患者 40 例作为对照组。两组年龄、停经天数、孕次、体质指数比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究已经医院伦理委员会审批通过,所有研究对象均知情并签署同意书。

表 1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	停经天数(d)	孕次(次)	体质指数(kg/m ²)
观察组	40	31.05 \pm 7.15	59.58 \pm 7.24	1.53 \pm 0.64	23.05 \pm 3.39
对照组	40	30.95 \pm 6.65	61.60 \pm 8.33	1.45 \pm 0.64	23.45 \pm 3.90
<i>t</i>		0.070	1.116	0.502	0.505
<i>P</i>		0.944	0.271	0.618	0.616

1.2 纳入和排除标准 纳入标准:①所有患者术前由 2 名妇产科医师结合彩超明确诊断;②均为自然受孕;③个人资料完整;④血常规、凝血功能正常;⑤血糖、血压正常。排除标准:①认知、精神功能障碍;②合并遗传疾病;③合并恶性肿瘤。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 经手术切除的输卵管妊娠标本放入 10%的中性福尔马林固定 12 h,经人工流产后后的新鲜绒毛组织用 0.9%氯化钠注射液冲洗去掉过多的血凝块,然后用 10%的中性福尔马林固定 12 h。常规取材后经脱水、透明行 HE 染色。

1.3.2 免疫组织化学染色 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 兔抗人单克隆抗体(工作液浓度 1:100)购买于武汉三鹰生物科技有限公司。所有绒毛组织标本均经 2 位病理医师独立诊断。取 3~4 μ m 切片,免疫组织组织化学方法采用 SP 法,具体步骤包括:烤箱烤片、脱蜡、脱水;柠檬酸修复,羊血清孵育;滴加一抗(TGF- β 1、MMP-9、VEGF);滴加生物素标记的二抗抗体;加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶;滴加 DAB 显色液观察显色。染色滴加一抗时用 PBS 液替代一抗当做阴性对照。

1.4 结果判读 依据美国临床肿瘤学会 ASCO 分级分别对 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 的染色进行判读。染色阳性的细胞面积<5%、5%~25%、26%~50%、51%~75%、>75%,依次记为 0、1、2、3、4 分。细胞着色强度标记-、+、++、+++、依次记为 0、1、2、3 分。将染色阳性的细胞面积评分和细胞着色强度评分相乘,<4 分为低表达, ≥ 4 分为高表达。

1.5 观察指标 比较两组绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 的表达水平,分析观察组绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 表达与临床指标的关系,探讨 TGF- β 1 与 MMP-9、VEGF 的关系。

1.6 统计学处理 采用统计分析软件 SPSS 19.0 对本实验数据进行分析。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较行 *t* 检验;计数资料以[n(%)]表示,组间比较行 χ^2 检验;相关关系采用 Pearson 相关性分析; $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 表达比较 观察组 TGF- β 1、VEGF 蛋白表达低于对照组,MMP-9 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 表达比较[n(%)]

组别	<i>n</i>	TGF- β 1 低表达	MMP-9 高表达	VEGF 低表达
观察组	40	32(80.00)	29(72.50)	33(82.50)
对照组	40	22(55.00)	19(47.50)	20(50.00)
χ^2		5.700	5.208	9.448
<i>P</i>		0.017	0.022	0.002

2.2 观察组 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 的表达与临床指标的关系 观察组绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 的表达水平与年龄、停经天数、孕次、体质指数无关($P>0.05$),见表 3。

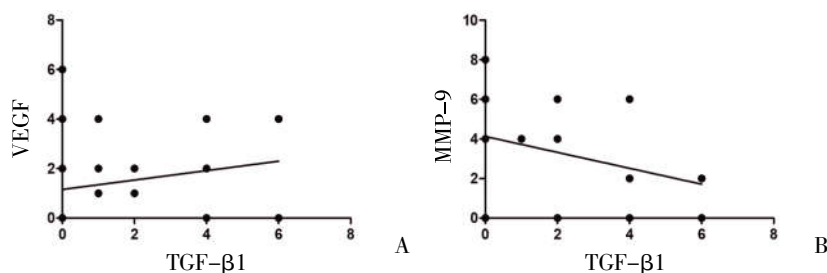
2.3 观察组 TGF- β 1 的表达与 MMP-9、VEGF 表达的关系 观察组 TGF- β 1 的表达与 VEGF 呈正相关($r=0.326, P<0.05$),与 MMP-9 的表达呈负相关($r=-0.353, P<0.05$),见表 4、图 1。

表 3 观察组 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 的表达与临床指标的关系

项目	n	TGF- β 1 低表达	χ^2	P	MMP-9 高表达	χ^2	P	VEGF 低表达	χ^2	P
年龄(岁)			0.691	0.406		1.474	0.224		1.359	0.244
<35	28	27			24			27		
≥ 35	12	5			5			6		
停经天数(d)			0.402	0.526		0.175	0.675		0.491	0.483
≥ 60	10	6			6			6		
<60	30	26			23			27		
孕次(次)			2.340	0.126		0.937	0.333		1.678	0.195
≥ 2	14	6			7			7		
<2	26	26			22			26		
体质指数(kg/m ²)			0.484	0.487		0.571	0.450		0.602	0.438
≥ 20	27	24			22			25		
<20	13	8			7			8		

表 4 观察组 TGF- β 1 表达与 MMP-9、VEGF 表达的关系

TGF- β 1	n	MMP-9 高表达	χ^2	P	VEGF 低表达	χ^2	P
低表达	32	29	6.561	0.010	32	4.818	0.028
高表达	8	0			1		



注:A:TGF- β 1 与 VEGF 呈正相关;B:TGF- β 1 与 MMP-9 呈负相关

图 1 TGF- β 1 与 VEGF、MMP-9 的相关性

3 讨论

输卵管妊娠是最常见的异位妊娠,以壶腹部妊娠最多见^[3,18]。输卵管妊娠未破裂时,临床症状不典型,较难诊断,若不及时诊断和早期治疗,严重者可危及生命。目前临床采用输卵管切除术和/或保守治疗,手术切除会影响患者的再次妊娠,保守治疗可能会再次导致输卵管妊娠^[19,20]。各治疗效果都存在差异,因此探索新的用于指导诊断和治疗的生物标志物对于改善患者预后意义重大。

在胚胎植入过程中,胚囊和子宫内膜的同步增殖和发育是建立妊娠的重要因素。成功的植入过程还需要调节母体对胚胎的免疫系统,增加植入部位的血管生成,以及基质细胞的蜕膜化,滋养叶细胞的受控侵袭等。一些生长因子/细胞因子及其受体的增加意味着这些因子在植入调节中的关键作用。这一过程中可能涉及的因素之一是 TGF- β ^[21,22]。TGF- β 1 是 TGF- β 亚型中最具代表性的一种,在对促进血管的形成、调节细胞增殖分化、调节免疫稳态等有重要

作用^[9-11]。TGF- β 1 在早期自然流产和胎盘植入等妊娠相关疾病中出现异常表达^[10,11],说明 TGF- β 1 在正常妊娠过程中起着一定的作用。本研究发现,在输卵管妊娠患者绒毛组织中 TGF- β 1 的表达减少,且 TGF- β 1 的表达与年龄、停经天数、孕次、体质指数一般临床指标无关,提示 TGF- β 1 参与影响输卵管妊娠的形成。

VEGF 是调节血管生成的主要因子之一。VEGF 参与调控多种基因的表达,进一步促进内皮细胞增殖、促进新生血管形成、增加血管通透性^[12-14]。VEGF 在稽留流产患者血清中表达降低,在早期妊娠中表达降低会影响滋养叶细胞的侵袭和迁移,从而影响妊娠的正常发生^[23]。有研究指出^[24],VEGF 在输卵管妊娠患者血清中异常增多,可以用于输卵管妊娠的诊断。本研究发现,VEGF 在输卵管妊娠患者绒毛组织中减少,与前述研究结果不同,可能是实验方法和选取的实验对象不同。说明 VEGF 表达异常参与了输卵管妊娠的发展过程,同时,TGF- β 1 与 VEGF 在

输卵管妊娠绒毛中的表达呈正相关,说明 TGF- β 1 的表达与 VEGF 的表达的变化有关,TGF- β 1 对输卵管妊娠的影响可能与 VEGF 参与的血管形成过程有关。

MMPs 是锌依赖性内肽酶家族,其中 MMP-9 起关键作用,MMP-9 的活化能够促进细胞外基质的降解,有助于提高妊娠过程中滋养叶细胞的侵袭功能^[15,16]。TGF- β 1、MMP-9 的异常表达与重度子痫的发展有关。本研究发现,MMP-9 在输卵管妊娠患者绒毛组织中增多,说明滋养叶细胞的局部侵袭能力增强,并且 TGF- β 1 在输卵管妊娠绒毛组织中的表达与 MMP-9 的表达呈负相关,TGF- β 1 对输卵管妊娠的影响与 MMP-9 有关,其与 MMP-9 的作用是相反的。

综上所述,TGF- β 1 与 VEGF 在输卵管妊娠患者绒毛组织中的表达减少,而 MMP-9 的表达升高;TGF- β 1 的表达与 VEGF 的表达呈正相关,与 MMP-9 的表达呈负相关;绒毛组织中 TGF- β 1、MMP-9、VEGF 蛋白表达异常可能参与了输卵管妊娠的发生。

参考文献:

- [1]Gaskins AJ, Missmer SA, Rich-Edwards JW, et al. Demographic, lifestyle, and reproductive risk factors for ectopic pregnancy [J]. *Fertil Steril*, 2018, 110(7): 1328-1337.
- [2]Sabbioni L, Carossino E, Severi FM, et al. From β -hCG values to counseling in tubal pregnancy: what do women want? [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2019, 35(12): 1021-1026.
- [3]钟晖,王秀虹.异位妊娠相关危险因素分析[J].湖北科技学院学报(医学版),2021,35(4):309-311.
- [4]Wang B, Liu T, Wu JC, et al. STAT3 aggravates TGF- β 1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98: 214-221.
- [5]Yao Y, Chen R, Wang G, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells reverse EMT via TGF- β 1/Smad pathway and promote repair of damaged endometrium [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 225.
- [6]Nie E, Jin X, Miao F, et al. TGF- β 1 modulates temozolomide resistance in glioblastoma via altered microRNA processing and elevated MGMT [J]. *Neuro Oncol*, 2021, 23(3): 435-446.
- [7]Liu J, Zhao B, Zhu H, et al. Wnt4 negatively regulates the TGF- β 1-induced human dermal fibroblast-to-myofibroblast transition via targeting Smad3 and ERK [J]. *Cell Tissue Res*, 2020, 379(3): 537-548.
- [8]Yang D, Dai F, Yuan M, et al. Role of Transforming Growth Factor- β 1 in Regulating Fetal-Maternal Immune Tolerance in Normal and Pathological Pregnancy [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 689181.
- [9]于婉莹,苏兴,崔静,等. IL-1 β , sHLA-G、TGF- β 1 与 IVF-ET 胚胎发育潜能、胚胎质量关系及预测临床妊娠的效能 [J]. *华南国防医学杂志*, 2021, 35(6): 417-421.
- [10]Xie J, Cao Y. Expression of TGF- β 1 and miR-99a in serum of patients with early spontaneous abortion and correlation with hormone levels during pregnancy [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(6): 4593-4597.
- [11]Khamoushi T, Ahmadi M, Ali-Hassanzadeh M, et al. Evaluation of Transforming Growth Factor- β 1 and Interleukin-35 Serum Levels in Patients with Placenta Accreta [J]. *Lab Med*, 2021, 52(3): 245-249.
- [12]Chen L, Lin G, Chen K, et al. VEGF knockdown enhances radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma by inhibiting autophagy through the activation of mTOR pathway [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 16328.
- [13]Shoval A, Markus A, Zhou Z, et al. Anti-VEGF-Aptamer Modified C-Dots-A Hybrid Nanocomposite for Topical Treatment of Ocular Vascular Disorders [J]. *Small*, 2019, 15(40): e1902776.
- [14]Sarkar S, Peng CC, Tung YC. Comparison of VEGF-A secretion from tumor cells under cellular stresses in conventional monolayer culture and microfluidic three-dimensional spheroid models [J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0240833.
- [15]Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 148: 87-165.
- [16]Nissi R, Santala M, Talvensaari-Mattila A. The serum levels of circulating matrix metalloproteinase MMP-9, MMP-2/TIMP-2 complex and TIMP-1 do not change significantly during normal pregnancy: a pilot study [J]. *BMC Res Notes*, 2021, 14(1): 31.
- [17]Guo J, Wang Y, Wang N, et al. Celastrol Attenuates Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy by Inhibiting Matrix Metalloproteinases-2 and 9 [J]. *Ann Hepatol*, 2019, 18(1): 40-47.
- [18]Cai H, Mol BW, Li P, et al. Tubal factor infertility with prior ectopic pregnancy: a double whammy? A retrospective cohort study of 2,892 women [J]. *Fertil Steril*, 2020, 113(5): 1032-1038.
- [19]Hawrylyshyn K, McLeod SL, Thomas J, et al. Methotrexate for the treatment of unruptured tubal ectopic pregnancy [J]. *CJEM*, 2019, 21(3): 391-394.
- [20]陈良玉,张振文,杨雷,等.腹腔镜下患侧输卵管开窗妊娠病灶清除术治疗输卵管妊娠的效果及安全性分析[J].解放军医药杂志,2021,33(9):83-86.
- [21]Shahnazi M, Nouri M, Mohaddes G, et al. Prostaglandin E pathway in uterine tissue during window of preimplantation in female mice mated with intact and seminal vesicle-excised male [J]. *Reprod Sci*, 2018, 25: 550-558.
- [22]Liu W, Huang Y, Huang G, et al. Relationship of SOCS3 and TGF- β with IDO expression in early pregnancy chorionic villi and decidua [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4817-4824.
- [23]郑玫,谢文玲,黄峰.稽留流产患者血清中 IL-6、TNF- α 、HIF-1 α 和 VEGF 表达 [J]. *广东医科大学学报*, 2018, 36(2): 180-182.
- [24]单婉婉. TGF- β 1/Smad 蛋白/MMP-9 在早发型重度子痫前期中的表达及意义 [D]. 郑州: 郑州大学, 2020.

收稿日期: 2021-12-14; 修回日期: 2021-12-25

编辑/成森