

细胞焦亡在胎盘植入患者外周血和胎盘组织中表达及临床意义

唐雨帆, 宋鹏书, 李 英, 谭媛媛, 龙俊青

(广西壮族自治区妇幼保健院新阳产二科, 广西 南宁 530000)

摘要:目的 探究胎盘植入患者外周血中炎症因子的表达及胎盘组织中细胞焦亡因子的表达情况和临床意义。方法 收集 2021 年 6 月-2023 年 1 月在我院产科入院诊断为胎盘植入 30 例孕妇作为胎盘植入组, 妊娠期正常孕妇 60 例作为正常组, 分析两组孕妇的临床资料信息。通过 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-18 表达情况, HE 染色观察胎盘植入的胎盘组织病理学, IHC 和 qPCR 实验检测 Caspase-1、GSDMD 和 NLRP3 蛋白和 mRNA 在两组孕妇胎盘组织中表达差异。结果 胎盘植入组孕妇外周血中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 表达量高于正常组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 胎盘植入患者的子宫基层组织没有蜕膜, 绒毛膜绒毛直接毗邻肌层纤维。胎盘植入组胎盘组织中细胞焦亡分子 Caspase-1 和 NLRP3 蛋白和 mRNA 表达高于正常组, GSDMD 蛋白和 mRNA 表达低于正常组 ($P < 0.05$)。结论 细胞焦亡在胎盘植入发病机制过程中表达增加。

关键词: 细胞焦亡; 胎盘植入; 炎症因子

中图分类号: R714.252; Q291

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2024.10.016

文章编号: 1006-1959(2024)10-0083-05

Expression and Clinical Significance of Pyroptosis in Peripheral Blood and Placental Tissues of Patients with Placenta Implantation

TANG Yu-fan, SONG Peng-shu, LI Ying, TAN Yuan-yuan, LONG Jun-qing

(Xinyang Second Department of Obstetrics, Guangxi Zhuang Autonomous Region maternal and Child Health Hospital, Nanning 530003, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of inflammatory factors in peripheral blood of patients with placenta implantation and the expression of pyroptosis factors in placental tissues and their clinical significance. **Methods** From June 2021 to January 2023, 30 pregnant women diagnosed with placenta implantation in the obstetrics department of our hospital were collected as the placenta implantation group, and 60 normal pregnant women during pregnancy were collected as the normal group. The clinical data of the two groups were analyzed. The expression of TNF- α , IL-1 β and IL-18 was detected by ELISA. The histopathology of placenta implantation was observed by HE staining. The expression of Caspase-1, GSDMD and NLRP3 protein and mRNA in placenta of two groups was detected by IHC and qPCR. **Results** The expression levels of TNF- α , IL-1 β and IL-18 in peripheral blood of pregnant women in the placenta implantation group were higher than those in the normal group, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). There was no decidua in the uterine basal tissue of patients with placenta implantation, and the chorionic villi were directly adjacent to the myometrium fibers. The expression of Caspase-1 and NLRP3 protein and mRNA in placenta tissue of placenta implantation group was higher than that of normal group, and the expression of GSDMD protein and mRNA was lower than that of normal group ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of pyroptosis is increased in the pathogenesis of placental implantation.

Key words: Pyroptosis; Placenta implantation; Inflammatory factor

胎盘植入(placenta implantation)是导致产后出血、围产期紧急子宫切除及孕产妇死亡重要原因, 孕产妇病死率为 1%~7%^[1]。在妊娠期间, 胎盘膜外滋养层细胞(extravillous trophoblast cells, EVT)的迁移和侵入母体子宫是胎盘和胎儿正常发育的必要条件。胎盘植入是异常 EVT 细胞不同程度侵入子宫及以

上的肌层^[2], 以炎症反应为特征受各种信号通路协调激活, 这些信号通路调节胎盘组织细胞和从血液中富集白细胞中促炎性介质和抗炎介质的表达^[3,4]。细胞焦亡(pyroptosis)是由某些炎性小体引发的细胞死亡的一种炎症形式, 导致 GSDMD 的裂解和 IL-18 和 IL-1 β 等非活性细胞因子的激活^[5]。近年来, 细胞焦亡在妇科复发性流产、妊娠高血压和妊娠期糖尿病都有相关性研究^[6,7]。本研究通过研究细胞焦亡及其相关因子, 探讨胎盘植入机理, 旨在为胎盘植入早期的预警诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2021 年 6 月-2023 年 1 月在广西壮族自治区妇幼保健院定期检查的孕妇为研究对

基金项目: 广西卫生健康委员会自筹经费科研课题(编号: Z-A20220253)

作者简介: 唐雨帆(1975.11-), 女, 广西南宁人, 本科, 副主任医师, 主要从事产科医学研究

通讯作者: 龙俊青(1970.6-), 女, 广西玉林人, 本科, 主任医师, 主要从事产科医学研究

象。将妊娠期正常健康孕妇60例设为正常组,胎盘植入患者30例设为胎盘植入组。胎盘植入患者的纳入标准:①在产检中通过核磁共振和彩色多普勒超声检测评分(5~10分)确诊为胎盘植入;②单胎;③剖宫产分娩。胎盘植入患者的排除标准:①多胎妊娠;②合并妊娠期高血压(包括子痫前期);③妊娠期糖尿病;④胎儿宫内受限及其他妊娠期并发症;⑤临床数据资料不全。所有研究对象均知情同意,并签署书面知情同意书。本研究已获广西壮族自治区妇幼保健院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 外周血采集和炎症因子检测 两组孕妇入院分娩之前抽取3 ml外周血,采血管在4℃,3000 r/min,离心10 min。收集上层血浆转移到1.5 ml冻存管保存于-80℃。等所有样本收集完毕之后,通过酶联免疫吸附试剂盒(ELISA)检测细胞焦亡因子TNF- α 、IL-1 β 和IL-18表达情况。检测仪器为安捷伦紫外可见分光光度计Cary 100,ELISA试剂盒TNF- α (JM-5141H2)、IL-1 β (JL13662)和IL-18(JM-1152H1)采购于深圳市优里生物科技有限公司。

1.2.2 胎盘病理学形态分析 剪取娩出胎盘母体面组织块,放置于福尔马林固定液中。组织经过脱水和石蜡包埋,切片机切成2 μ m膜片。高温烘片之后依次浸泡二甲苯I~V和梯度乙醇,流水冲洗,苏木素液染色5 min,流水清洗片子,1%盐酸酒精1 s,流水冲洗返蓝,0.5%伊红液染色5 min,80%乙醇,95%乙醇,无水乙醇I,无水乙醇II,各浸泡1 s,晾干片子用中性树胶封片。

1.2.3 免疫组织化学实验检测胎盘组织中焦亡蛋白的表达情况 剪取娩出胎盘母体面组织块,放置于福尔马林固定液中。组织经过脱水和石蜡包埋,切片机切成2 μ m膜片。高温烘片之后依次浸泡二甲苯I~V和梯度乙醇;流水冲洗,切片在高温EDTA

中孵育20 min;自然冷却后滴加3% H₂O₂溶液室温封闭10 min;PBS冲洗3次,加一抗(Caspase-1、GSDMD和NLRP3)4℃过夜;PBS冲洗3次,滴加二抗室温孵育30 min,PBS冲洗3次,加DAB显色剂,流水冲洗,苏木素染色,碳酸锂分化返蓝,流水冲洗,梯度乙醇脱水,晾干片子用中性树胶封片。

1.2.4 荧光定量PCR实验检测两组胎盘组织中焦亡因子mRNA的表达水平 收集胎盘样本,100 μ g胎盘组织碎块加入800 μ l TRIzol提取RNA,采用Nandrop NOE仪器测定RNA浓度;按照cDNA反转录试剂盒将RNA逆转录成cDNA;参照赛默飞公司设计的反应程序加入cDNA,设计好的上下游引物,反应酶和水进行实时定量PCR实验。反应程序设置为:85℃预变性3 min;95℃变性20 s;65℃退火40 s;75℃延伸35 s;40个循环,GAPDH基因作为管家基因进行PCR反应。根据PCR扩增曲线,得到两组样本的循环周期数(Ct值),使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算两组胎盘组织中Caspase-1、GSDMD和NLRP3基因的表达值。

1.3 统计学方法 采用Image-Pro Plus图像分析程序对免疫组织化学染色区所占面积进行定量分析,免疫组织化学染色面积的百分比表示在显微镜下黄棕色染色面积占整个面积的百分比,所有实验数据均采用SPSS 20.0统计包程序进行统计分析,数据以($\bar{x}\pm s$)表示,两组样本之间采用独立样本t检验和 χ^2 检验进行统计学差异分析,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

2 结果

2.1 两组一般资料比较 两组的身高、体重、BMI、妊娠期糖尿病、妊娠期高血压的发生率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。胎盘植入组年龄、孕周、孕产史、前置胎盘占比及疤痕子宫占比比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表1。

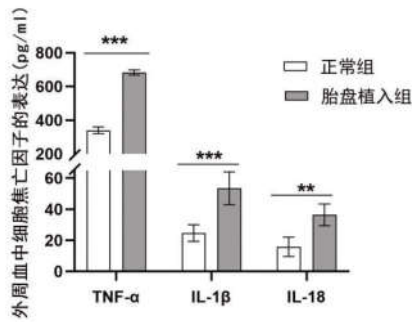
表1 两组孕妇妊娠期临床资料比较

项目	正常组 (n=60)	胎盘植入组 (n=30)	统计值	P	项目	正常组 (n=60)	胎盘植入组 (n=30)	统计值	P
身高($\bar{x}\pm s$,cm)	158.24 \pm 3.66	158.37 \pm 2.88	$t=-0.443$	1.242	分娩次数	1	1.74	$\chi^2=2.740$	0.016
体重($\bar{x}\pm s$,kg)	60.81 \pm 9.18	62.58 \pm 7.72	$t=-0.216$	2.741	妊娠期并发症[n(%)]				
BMI($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	23.99 \pm 2.73	24.05 \pm 3.14	$t=-0.573$	7.344	前置胎盘	0	24(80.00)	$\chi^2=16.627$	0.000
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	25.21 \pm 7.32	36.44 \pm 2.16	$t=-7.922$	0.000	妊娠期糖尿病	2(3.33)	2(6.66)	$\chi^2=0.533$	4.521
孕周($\bar{x}\pm s$,周)	38.45 \pm 1.52	34.2 \pm 1.75	$t=4.863$	0.037	妊娠期高血压	7(11.66)	3(10.00)	$\chi^2=1.486$	3.267
孕产史(n,次)					疤痕子宫	3(5.00)	30(100.00)	$\chi^2=10.296$	0.000
怀孕次数	1	3.67	$\chi^2=3.660$	0.021					

2.2 胎盘植入孕妇外周血中细胞焦亡因子的表达
胎盘植入组孕妇外周血中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 表达量高于正常组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2、图 1。

表 2 两组孕妇外周血中细胞焦亡因子表达值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	TNF- α (ng/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-18(pg/ml)
正常组	0.34 \pm 0.14	24.46 \pm 6.52	15.32 \pm 6.33
胎盘植入组	0.68 \pm 0.12	53.10 \pm 10.27	36.50 \pm 7.25
<i>t</i>	3.253	13.286	7.662
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

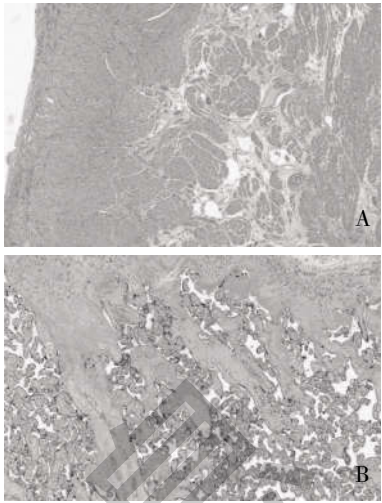


注:** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 1 ELISA 实验检测两组孕妇外周血中细胞焦亡因子表达值

2.3 胎盘植入孕妇胎盘组织的病理学检测结果 胎盘植入组胎盘组织的植入部分与非植入部分比较显示,同一胎盘的植入区域(图 2A),绒毛(右下)和肌层(左上)之间可见蜕膜。蜕膜化的子宫内膜,下面有充

血的肌层血管和肌层。植入区(图 2B)其特征是没有蜕膜和绒毛膜绒毛,可见直接毗邻肌层纤维,见图 2。



注:A:非植入区;B:胎盘植入区。

图 2 胎盘植入孕妇胎盘组织的 HE 染色病理学检测结果($\times 200$)

2.4 免疫组化实验检测胎盘植入患者的细胞焦亡蛋白表达情况 胎盘植入组胎盘组织中细胞焦亡分子 Caspase-1 和 NLRP3 蛋白表达高于正常组,GSDMD 蛋白表达低于正常组($P<0.05$),见图 3、图 4。

2.5 qPCR 实验检测胎盘植入患者的焦亡基因表达情况 胎盘植入组胎盘组织中细胞焦亡分子 Caspase-1 和 NLRP3 mRNA 表达高于正常组,GSDMD mRNA 表达低于正常组($P<0.05$),见表 3、图 5。

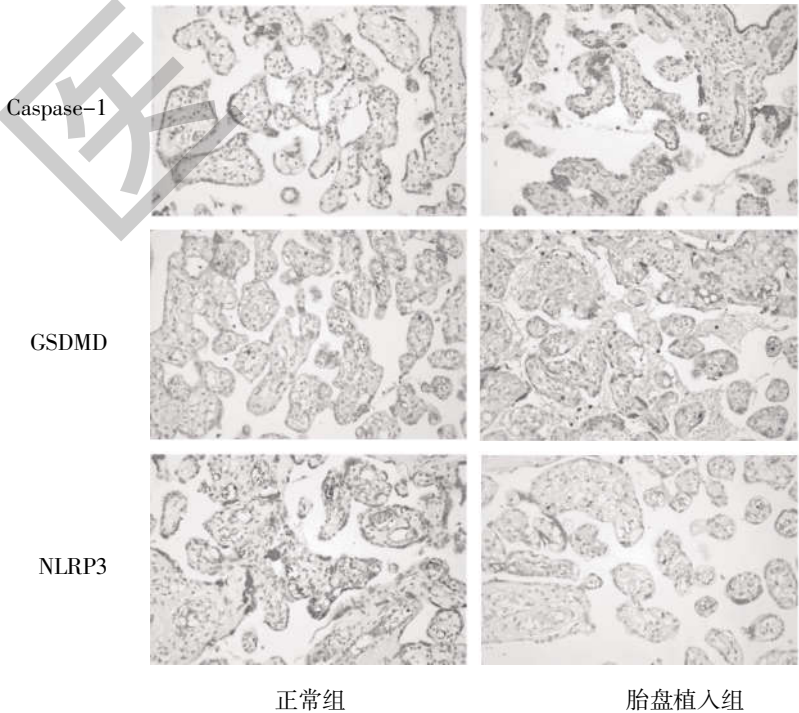
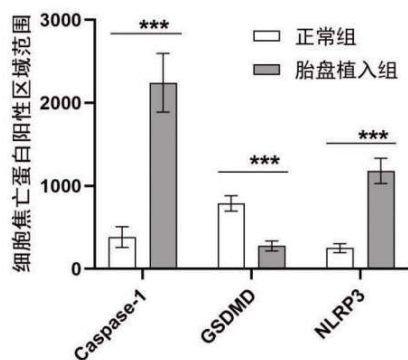


图 3 两组孕妇胎盘组织中细胞焦亡蛋白免疫组化实验结果

注:*** $P<0.001$ 。图 4 Image-Pro Plus 计算细胞焦亡蛋白阳性区域
相对表达量表 3 细胞焦亡基因在两组胎盘组织中的表达值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase-1mRNA	GSDMDmRNA	NLRP3mRNA
正常组	1.03±0.04	5.38±0.15	12.42±1.74
胎盘植入组	10.77±1.20	2.04±0.63	16.83±1.32
<i>t</i>	-16.745	5.662	-2.863
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05

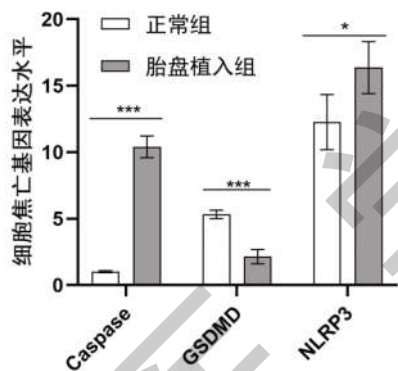
注: * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图 5 qPCR 实验检测胎盘植入患者的焦亡基因表达情况

3 讨论

胎盘植入包括胎盘黏连、胎盘植入和穿透性胎盘植入,是严重孕产妇发病和死亡的主要原因^[8]。胎盘植入胎盘的潜在分子机制尚不清楚,目前提出的假说包括蜕膜或基板原发性缺失、母体血管重构异常和滋养层过度外侵^[9]。细胞焦亡是一种独特的程序性细胞死亡,参与免疫调节。细胞焦亡是由炎症小体引起的,在炎症相关疾病中起着核心作用^[10]。越来越多的证据表明焦亡可能导致一系列疾病,包括自身免疫性疾病、糖尿病、神经系统相关疾

病和心血管疾病^[11]。

胎盘发育是通过严格的空间和时间调节,在妊娠期早期胎盘外滋养层细胞(EVT)迁移至子宫内膜蜕膜组织,并且侵袭在子宫肌层内大约 1/3 使得胎盘组织固定在子宫壁^[12]。子宫内膜母胎界面特殊的免疫微环境不仅保护胎儿免受母体免疫系统的攻击,也保护母亲免受病原体的侵害^[13]。胎盘植入需要细胞克服局部免疫系统、激活入侵和诱导血管生成的能力,任何成功的怀孕都依赖于胎盘介导的抑制宿主免疫反应以防止母体排斥^[14]。胎盘植入常与慢性基底炎症相关,Ernst LM 等^[15]在 101 个胎盘植入标本中发现,与因母体恶性肿瘤史而送去检查胎盘,且无临床胎盘植入的患者相比,植入部位淋巴细胞浸润增加。本研究中 5 例胎盘植入患者都有 2 次以上的剖宫产和子宫内手术史,疤痕妊娠的发生率为 100%。这类手术很容易导致母亲再次妊娠期间子宫内膜出现炎症。本研究检测胎盘植入孕妇外周血中炎症因子,结果发现 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 表达值大于正常孕妇外周血中的含量,说明孕妇妊娠期发生胎盘植入后,机体会出现炎症症状。

本研究的胎盘病理组织切片结果显示,胎盘植入会导致子宫内膜蜕膜区消失,胎盘侵袭子宫肌层导致子宫肌层血管减少。正常妊娠的胎盘组织与子宫内膜之间存在子宫内膜蜕膜区这道屏障。然而,侵入性胎盘植入和侵入局部结构的方式类似于恶性肿瘤深入子宫肌层^[16]。胎盘植入的两个主要危险因素是前置胎盘和某种形式的子宫肌层损伤,几乎总是由一次或多次下横向剖腹产留下疤痕^[17]。对于前者的危险因素,有研究认为前置胎盘宫颈周围较薄的肌层内膜更有利于滋养层的过度侵入,因为它降低了滋养层的侵入屏障^[18]。TNF- α 已被证明可诱导内皮细胞炎症和功能障碍。本研究检测结果显示, TNF- α 因子在胎盘植入孕妇外周血中的表达高于正常孕妇的表达。Yao F 等^[19]的研究表明, TNF- α 可诱导 HUVECs 中 NLRP3 的表达和下游 Caspase-1 的激活。NLRP3 炎症小体的激活是焦亡典型途径的第一步。在 pro-Caspase-1 被裂解后, GSDMD 被裂解为 GSDMD-c 和 GSDMD-n 结构域。随后在焦亡过程 IL-1 β 和 IL-18 成熟^[20,21]。GSDMD-n 在细胞膜上形成焦性孔,破坏细胞膜,将炎性细胞因子、粘附因子等细胞内容物释放到细胞外间隙。本研究检测结果发现细胞焦亡分子 NLRP3 和 Caspase-1 蛋白

和基因在胎盘植入患者胎盘组织中的表达高于正常妊娠,GSDMD 蛋白和 mRNA 表达降低。孕妇在经过剖宫产或者子宫手术史后,子宫内膜存在疤痕组织区域,子宫内膜蜕膜区变薄,再次妊娠容易导致胎盘植入的发生。此外,妊娠本身就是免疫排斥和接收过程,胎盘外滋养层细胞在不断侵入子宫肌层过程中,子宫肌层蜕膜区释放大量免疫细胞,刺激胎盘外滋养层细胞分泌 TNF- α 因子,不断累积导致胎盘外滋养层细胞发生细胞焦亡反应。

综上所述,在大多数妊娠发展情况下,胎盘正常发育是需要滋养层细胞不断增长和分化,滋养层细胞侵入母体子宫肌层时,在妊娠前期,胎盘外滋养层细胞由上皮表型过渡到间充质表型迁移和侵袭到母体蜕膜区导致蜕膜区免疫细胞聚集。胎盘组织侵入过深就会损害其他组织器官,直接引起机体炎症反应,免疫调控失衡。胎盘组织不断受到母体免疫细胞的攻击,就会发生死亡。然而,在妊娠和分娩的各个阶段都观察到免疫耐受过程的生理变化,还需要更多的数据来证明细胞焦亡在胎盘植入发生过程中有关其影响的细节。

参考文献:

- [1]Bartels HC,Postle JD,Downey P,et al.Placenta Accreta Spectrum: A Review of Pathology, Molecular Biology, and Biomarkers[J].Dis Markers,2018,2018:1507674.
- [2]葛娟,周东华,田杰,等.IMP3 表达与绒毛外滋养细胞(EVT)侵袭增殖活性的相关性分析[J].中国妇产科临床杂志,2020,21(5):511-513.
- [3]E Davies J,Pollheimer J,Yong HE,et al.Epithelial-mesenchymal transition during extravillous trophoblast differentiation[J].Cell Adh Migr,2016,10(3):310-321.
- [4]孙佳,宋学薇,刘亚梅,等.胎盘粘连、胎盘植入患者外周血 MMP-9、TGF- β 1 及 sFlt-1 水平观察[J].临床和实验医学杂志,2022,21(14):1548-1552.
- [5]Cheng SB,Nakashima A,Huber WJ,et al.Pyroptosis is a critical inflammatory pathway in the placenta from early onset preeclampsia and in human trophoblasts exposed to hypoxia and endoplasmic reticulum stressors[J].Cell Death Dis,2019,10(12):927.
- [6]Zhu D,Zou H,Liu J,et al.Inhibition of HMGB1 Ameliorates the Maternal-Fetal Interface Destruction in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion by Suppressing Pyroptosis Activation[J].Front Immunol,2021,12:782792.
- [7]武楠,周克飞,顾娟娟,等.妊娠糖尿病患者外周血细胞焦亡相关因子的表达及与胰岛素抵抗的关系[J].中华内分泌外科杂志,2022,16(6):703-6.
- [8]邵香香,潘旭红,王永英,等.Hedgehog 信号通路调控肝癌上皮间质转化的研究进展[J].吉林医学,2023,44(1):179-83.
- [9]Tantbirojn P,Crum CP,Parast MM.Pathophysiology of placenta creta: the role of decidua and extravillous trophoblast[J].Placenta,2008,29(7):639-645.
- [10]Monti P,Solazzo G,Accurti V,et al.Pyroptosis: A Promising Mechanism Linking SARS-CoV-2 Infection to Adverse Pregnancy Outcomes[J].Int J Mol Sci,2023,24(11):9278.
- [11]Zeng C,Wang R,Tan H.Role of Pyroptosis in Cardiovascular Diseases and its Therapeutic Implications[J].Int J Biol Sci,2019,15(7):1345-1357.
- [12]Capannolo G,D'Amico A,Alameddine S,et al.Placenta accreta spectrum disorders clinical practice guidelines: A systematic review[J].J Obstet Gynaecol Res,2023,49(5):1313-1321.
- [13]Liu Y,Gao S,Zhao Y,et al.Decidual Natural Killer Cells: A Good Nanny at the Maternal-Fetal Interface During Early Pregnancy[J].Front Immunol,2021,12:663660.
- [14]白桂芹,陈蔚琳,黄向华,等.剖宫产术后再次妊娠合并前置胎盘孕妇胎盘植入的风险评估及不良结局预测全国多中心回顾性研究[J].中华妇产科杂志.2023,58(1):26-36.
- [15]Ernst LM,Linn RL,Minturn L,et al.Placental Pathologic Associations With Morbidly Adherent Placenta: Potential Insights Into Pathogenesis[J].Pediatr Dev Pathol,2017,20(5):387-393.
- [16]Crosland BA,Sherman-Brown AM,Oakes MC,et al.Complicated placenta accreta spectrum: identifying a high-risk cohort[J].J Matern Fetal Neonatal Med,2022,35(25):7778-7786.
- [17]Carusi DA.The Placenta Accreta Spectrum: Epidemiology and Risk Factors[J].Clin Obstet Gynecol,2018,61(4):733-742.
- [18]Ilsley NP,DaSilva-Arnold SC,Zamudio S,et al.Trophoblast invasion: Lessons from abnormally invasive placenta (placenta accreta)[J].Placenta,2020,102:61-66.
- [19]Yao F,Jin Z,Zheng Z,et al.HDAC11 promotes both NLRP3/caspase-1/GSDMD and caspase-3/GSDME pathways causing pyroptosis via ERG in vascular endothelial cells[J].Cell Death Discov,2022,8(1):112.
- [20]He WT,Wan H,Hu L,et al.Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion[J].Cell Res,2015,25(12):1285-1298.
- [21]Li S,Sun Y,Song M,et al.NLRP3/caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis exerts a crucial role in astrocyte pathological injury in mouse model of depression[J].JCI Insight,2021,6(23):e146852.

收稿日期:2023-06-06;修回日期:2023-06-21

编辑/肖婷婷