

## 自然流产小鼠绒毛滋养细胞 PCNA 和 OPN 的表达与相关研究

秦 晨<sup>1</sup> 米亚英<sup>1</sup> 杨维斌<sup>2</sup> 刘丽华<sup>1</sup>

**摘 要** 目的 比较正常妊娠和自然流产小鼠绒毛滋养细胞增殖细胞核抗原 (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) 和骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 的表达, 探讨自然流产的发病机制。方法 建立正常妊娠模型 CBA × BALB/c 和自然流产模型 CBA × DBA/2。采用免疫组化 SP 法测定两组孕 13 d 绒毛滋养细胞 PCNA 和 OPN 的表达。结果 与正常妊娠相比, 自然流产绒毛滋养细胞 PCNA 和 OPN 的表达均明显降低 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。结论 绒毛滋养细胞 PCNA 和 OPN 的表达低下与自然流产的发生有统计学意义。

**关键词** 自然流产 绒毛滋养细胞 增殖细胞核抗原 骨桥蛋白

### Expressions of PCNA and OPN in trophoblasts of spontaneous abortion mouse model and the relevant research

QIN Chen MI Ya-ying YANG Wei-bing LIU Li-hua

**ABSTRACT Objective** To investigate the relationship of spontaneous abortion and the expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and osteopontin (OPN) in trophoblasts of spontaneous abortion mouse models. **Methods** The nonabortion-prone CBA × BALB/c matings were established as the models of normal pregnancy and the abortion-prone (CBA × DBA/2) matings were used as the models of spontaneous abortion. Immunohistochemistry method (SP) was employed to detect the expressions of PCNA and OPN in trophoblasts at the day 13 of gestation. **Results** Compared with normal pregnancy models, both of the expressions of PCNA and OPN in trophoblasts of spontaneous abortion mouse models were significantly decreased ( $P < 0.01, P < 0.05$ ). **Conclusion** The weakening of PCNA and OPN in trophoblastic cells may be related to the occurrence of spontaneous abortion.

**KEY WORDS** Spontaneous abortion Trophoblasts Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) Osteopontin (OPN)

近年来, 胎盘免疫学和胎盘病理学研究表明: 胎盘的免疫保护是妊娠得以建立和维持的机制之一, 这种机制的形成是以胎盘滋养细胞的正常发育为基础<sup>[1]</sup>。在胎盘形成与发育过程中, 滋养细胞的增殖能力下降、侵蚀与黏附能力缺陷影响胎盘的发育和功能<sup>[2]</sup>, 从而导致病理妊娠。本文利用免疫组织化学 SP 法检测 PCNA、OPN 在正常妊娠模型 CBA × BALB/c 和自然流产模型 CBA × DBA/2 孕鼠胎盘滋养细胞中的表达, 旨在探讨其与自然流产中的关系, 为进一步揭示自然流产的发生机制, 进而更有效地防治自然流产提供依据。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物及主要试剂** 雌性 CBA、雄性 DBA/2 和 BALB/c 小鼠, 清洁级, 9 ~ 11 周龄, 均购于中国科学院上海实验动物中心。OPN 兔抗鼠多克隆抗体、即用型 SP 试剂盒购于北京博奥森公司; 鼠抗鼠 PCNA 单克隆抗体、DAB 显色试剂盒购于武汉博士德公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 孕鼠模型建立** 将雌性 CBA 小鼠分别与雄性 DBA/2 和 BALB/c 小鼠 1: 1 合笼交配, 建立自然流产模型 CBA × DBA/2 和正常妊娠模型 CBA × BALB/c 孕鼠各 12 只, 检出阴栓者计为妊娠第 0 天。

**1.2.2 标本收集** 于妊娠第 13 天处死两组 CBA 孕鼠, 取胎盘并计算胚胎吸收率 (R), 以评价模型建立成功与否。  $R = Re / (Re + F)$ , Re 为吸收胎盘数, F 为存活胎盘数。采集绒毛膜组织 (采集的组织均来自吸收胚胎邻近的正常存活胚胎), 将标本用生理盐水清洗干净, 10% 福尔马林固定 24 h, 石蜡包埋、连续切片, 每张约厚 5 μm。置于 60℃ 烤箱, 6 h 烘干后备用。

**1.2.3 免疫组化 SP 法** 严格按试剂盒说明书操作。PCNA 和 OPN 一抗工作液浓度分别为 1: 100 和 1: 200, DAB 显色, 苏木素复染。用已知 PCNA、OPN 阳性切片作为阳性对照, PBS 代一抗作为阴性对照。结果判定: 每张切片随机选取 10 个视野, 每视野计数 100 个细胞。胞浆或胞核呈棕黄色为阳性细胞。按阳性细胞所占百分比分为 4 级: 无阳性细胞时表示为阴性 (-); 阳性细胞数 < 10% 时为弱阳性 (+); 阳性细胞数在 10% ~ 60% 之间为中度阳性 (++) ; 阳性细胞数 > 60% 时为强阳性 (+++)。

**作者单位** 1. 山西医科大学大同学院免疫与病原生物研究所  
2. 大同市红十字会中心血站

**通信作者** 米亚英, E-mail: dtyammy@163.com

**基金项目** 国家人口计生委资助项目 [2005] 11 号 (1-4),  
大同市科技成果推广项目 [2005] 第 61 号-2-79

1.2.4 统计学方法 应用 SPSS 11.5 软件, 胚胎吸收率结果采用  $\chi^2$  检验, SP 半定量结果采用两样本等级资料比较的秩和检验。

## 2 结果

2.1 胚胎吸收率的比较 CBA × DBA/2 组胚胎吸收率(18.6%)明显高于 CBA × BALB/c 组(6.25%), 具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见表 1。

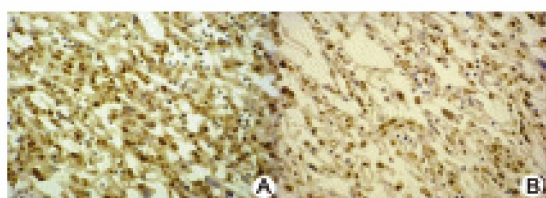
表 1 两组模型胚胎吸收率的比较

组别	例数	着床胎盘数	[n(%)]
			吸收胎盘数
CBA × BALB/c	12	96	6(6.25)
CBA × DBA/2	12	102	5(18.6)

2.2 两组模型妊娠组织中 PCNA 的表达 PCNA 表达于细胞核内。两组模型蜕膜和滋养细胞的 PCNA 均有表达, 自然流产组滋养细胞 PCNA 的表达强度低于正常妊娠组( $P < 0.01$ ), 见表 2, 图 1。

表 2 两组模型滋养细胞 PCNA 的表达

组别	例数	[n(%)]		
		+	++	+++
CBA × BALB/c	12	0	5	7
CBA × DBA/2	12	5	4	3



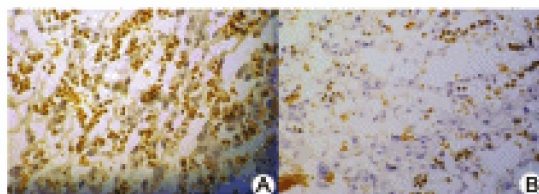
A: PCNA protein of normal pregnancy model  
B: PCNA protein of spontaneous abortion model

图 1 孕 13 d 滋养细胞的 PCNA 表达 (SP 法, ×400)

2.3 两组模型妊娠组织中 OPN 的表达 OPN 表达于细胞浆内。两组模型滋养细胞 OPN 均有检出。自然流产组滋养细胞 OPN 表达明显低于正常妊娠组( $P < 0.05$ ), 见表 3, 图 2。

表 3 两组模型滋养细胞 OPN 的表达

组别	例数	[n(%)]		
		+	++	+++
CBA × BALB/c	12	2	2	8
CBA × DBA/2	12	4	5	3



A: OPN protein of normal pregnancy model  
B: OPN protein of spontaneous abortion model

图 2 孕 13 d 滋养细胞的 OPN 表达 (SP 法, ×400)

## 3 讨论

在胚胎发育过程中, 组织和器官的发生是通过细胞的形态变化和运动、细胞的识别和黏着、细胞增殖和死亡等过程实现的。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。研究发现早期胚胎滋养细胞具有较高侵袭性, 其黏附分子表达的改变等生物学行为与恶性肿瘤形成有相似之处<sup>[3]</sup>。通过启动黏附、基质降解、迁移及新血管形成等, 在植入窗口期和胎盘形成期与子宫内膜和周围靶组织黏着, 继而侵袭、增殖、分化形成新的组织。若在胎盘形成与发育期间, 滋养细胞增殖能力下降、侵蚀与黏附能力缺陷, 必将影响胚胎的生长发育和功能。

增殖细胞核抗原 PCNA 是分子量为 36KD 的真核细胞 DNA 复制所必须的一种核蛋白, 在细胞增殖过程中呈周期性表达<sup>[4]</sup>, 于 S 期达到高峰, 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。Mochizuki 等<sup>[5]</sup>报道, 在正常早孕的绒毛细胞滋养细胞中检测到大量的 PCNA, 其表达水平可反映滋养细胞的增殖能力。Aysun Kale 等<sup>[6]</sup>在他们的研究中发现, 妊娠滋养细胞疾病(不完全性葡萄胎、完全性葡萄胎和侵袭性葡萄胎)细胞滋养层细胞中 PCNA 的表达远高于自然流产组。本实验结果显示, 自然流产小鼠模型绒毛滋养细胞 PCNA 表达较正常妊娠小鼠模型明显减弱。由此推测, 绒毛滋养细胞增殖减弱可能与自然流产的发生有关。

骨桥蛋白 OPN 是一种具有分泌性、黏附性糖基化的磷酸蛋白, 包含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸 (arginine-glycine-aspartic acid, RGD) 细胞结合序列, 是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 中的一种重要功能性蛋白。ECM 是由一系列生物大分子组成的动态网络结构, 能维持多细胞生物的结构完整性, 并对细胞增殖、分化、黏附和迁移具有重要的调节作用。整合素是 ECM 蛋白的受体, 不仅介导细胞与 ECM

之间的相互作用,而且还通过双向信号转导功能控制细胞黏附、迁移、分化、增殖和凋亡。OPN 作为 ECM 的一种重要的非胶原蛋白具有多种生理功能,其中最主要的就是通过细胞黏附序列 RGD 识别整合素  $\alpha v\beta 3$ ,从而与细胞相结合并发挥黏附作用<sup>[7]</sup>。因此,其表达水平可影响细胞的黏附能力。细胞识别和黏附在胚胎发育中的作用已经明确。胚胎发育时,同类或相关细胞彼此相互识别,经过迁移能按一定的模式类聚和黏着在一起,构成组织。近年来人们普遍认为,这是由于细胞膜上的糖蛋白受体与相关细胞胞衣内的糖链结合的结果。Daiter E 等<sup>[8]</sup>对妊娠妇女各时期的绒毛滋养细胞应用免疫组织化学方法发现在细胞滋养细胞中 OPN 高度表达,而在合体滋养细胞表达降低。本实验的研究结果显示,自然流产小鼠模型绒毛滋养细胞 OPN 表达低于正常妊娠小鼠,提示黏附能力的减弱可能参与了自然流产的发生。

综上所述,绒毛滋养细胞增殖和黏附能力的减弱可能与自然流产的发生有一定关系。因此,通过提高细胞增殖和黏附能力也许对自然流产的防治具有一定的价值。本研究通过检测自然流产小鼠和正常妊娠小鼠绒毛滋养细胞 PCNA 和 OPN 的表达,为临床防治自然流产提供了新的思路。

[本文编辑] 谈湧佈

### 参考文献

- [1] Weetman AP. The immunology of pregnancy. *Thyroid*, 1999, 9: 643-646.
- [2] Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Hum Reprod*, 1995, 10: 1579-1602.
- [3] Damsky CH, Librach C, Lim KH, et al. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 1994, 120 (12): 3657-3666.
- [4] Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 1987, 326 (6112): 515-516.
- [5] Mochizuki M, Maruo T, Matsuo H, et al. Biology of human trophoblast. *Int J Gynaecol Obstet*, 1998, 60 Suppl: S21-28.
- [6] Kale A, Soylemez F, Ensari A, et al. Expressions of proliferation markers (Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, and silver-staining nucleolar organizer regions) and of p53 tumor protein in gestational trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol*, 2001 Mar; 184 (4): 567-574.
- [7] 冷灵芝,李艳萍. 骨桥蛋白与生殖. *生命科学研究*, 2006, 10 (3): 189-193.
- [8] Daiter E, Omigbodun A, Wang S, et al. Cell differentiation and endogenous cyclic adenosine 35'-monophosphate regulate osteopontin expression in human trophoblasts. *Endocrinology*, 1996, 137 (5): 1785-1790.



(上接第 13 页)

常引发流产。胎盘组织中 MTHFR 活性下降,使 5-甲基四氢叶酸生成减少,嘧啶、嘌呤和核酸代谢障碍,胎儿生长发育所需 DNA 和蛋白质甲基化不足引起流产<sup>[4]</sup>。本研究通过对两组 MTHFR C677T 三种基因型进行分析,及三种基因型血浆 HCY 水平进行测定,发现 RA 流产组孕妇 MTHFR TT 基因型频率和 T 等位基因型频率均高于对照组。无论是流产组还是正常对照组 MTHFR C677T 位点的突变均可增加血浆 HCY 水平的增高,只是 RA 流产组孕妇血浆 HCY 水平明显高于对照组。可见 MTHFR C677T 位点突变及血浆 HCY 水平的增高与 RA 的发生有相关性。对于携带易感基因或测出血浆 HCY 水平增高的孕妇,应及时补充叶酸、维生素 B6、维生素 B12 来降低妊娠期妇女血中及胎盘组织中的 HCY 水平,可以预防部分复发性

流产患者,进一步提高治疗效果。

### 参考文献

- [1] Regan L, Rai R. Epidemiology and the medical causes of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2000, 14 (5): 839-854.
- [2] Fodinger M, Horl W H, Sunder G. Molecular biology of 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol*, 2000, 13 (1): 20-33.
- [3] Frosst P, Blom HJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 1995, 10 (1): 111-113.
- [14] 王苏梅,邱毅. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与妊娠相关疾病. *国外医学(妇产科学分册)*, 2004, 31 (5): 303-304.

[本文编辑] 吴超群