

• 论 著 •

早期自然流产患者绒毛组织中 HO-1、MCP-1 的表达及复发性自然流产的危险因素分析

龚国忠¹,程家亮¹,张孝廉¹,刘友迎²,王昌明¹

1. 遂宁市第一人民医院检验科,四川遂宁 629000;2. 遂宁市中心医院输血科,四川遂宁 629000

摘要:目的 检测早期自然流产(ESA)患者绒毛组织中血红素氧合酶-1(HO-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达,并探讨复发性自然流产(RSA)的危险因素。**方法** 选取2018年6月至2021年5月遂宁市第一人民医院收治的164例ESA患者作为ESA组,另同期选取164例行人工流产的正常妊娠孕妇作为对照组。采用免疫组化法检测两组绒毛组织HO-1、MCP-1表达。ESA组均随访12个月,根据患者自然流产(SA)次数将其分为RSA组和非RSA组,比较RSA组和非RSA组患者的临床资料,采用多因素Logistic回归分析RSA的危险因素。**结果** ESA组绒毛组织HO-1阳性率及表达水平均低于对照组($P < 0.05$),ESA组绒毛组织MCP-1阳性率及表达水平均高于对照组($P < 0.05$);ESA组患者12个月随访期间有23例发生RSA,发生率为14.02%;RSA组绒毛组织HO-1表达水平低于非RSA组($P < 0.05$),既往有自然流产史患者占比和MCP-1表达水平高于非RSA组($P < 0.05$);既往有自然流产史、绒毛组织HO-1低表达和MCP-1高表达均为RSA的危险因素($P < 0.05$)。**结论** ESA患者绒毛组织HO-1表达水平降低、MCP-1表达水平升高,HO-1低表达和MCP-1高表达均为RSA的危险因素。

关键词:早期自然流产; 血红素氧合酶-1; 单核细胞趋化蛋白-1; 绒毛组织; 复发性自然流产

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.20.019 **中图分类号:**R714.21

文章编号:1673-4130(2023)20-2532-04

文献标志码:A

Expression of HO-1 and MCP-1 protein in villi tissue of early spontaneous abortion and analysis of risk factors for recurrent spontaneous abortion

GONG Guozhong¹, CHENG Jialiang¹, ZHANG Xiaolian¹, LIU Youying², WANG Changming¹

1. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Suining, Suining, Sichuan 629000, China; 2. Department of Blood Transfusion, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629000

Abstract: Objective To detect the expression of heme oxygenase-1 (HO-1) and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) protein in villi tissue of patients with early spontaneous abortion (ESA), and to explore the risk factors of recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods** A total of 164 patients with ESA admitted to this hospital from June 2018 to May 2021 were selected as the ESA group, while 164 normal pregnant women who underwent induced abortion were selected as the control group during the same period. The expression of HO-1 and MCP-1 in villus tissues of the two groups were detected by immunohistochemical method. The ESA group was followed up for 12 months, and the patients were divided into the RSA group and the non-RSA group according to the number of spontaneous abortion (SA). The clinical data of RSA group and non-RSA group was compared, and the risk factors of RSA were analyzed by multivariate Logistic regression. **Results** The positive rate and expression level of HO-1 in villi tissues of ESA group were lower than those of control group ($P < 0.05$), and the positive rate and expression level of MCP-1 in villi tissues of ESA group were higher than those of control group ($P < 0.05$). During the 12-month follow-up, RSA occurred in 23 patients in ESA group, with an incidence of 14.02%. The expression level of HO-1 in villi tissues of RSA group was lower than that of non-RSA group ($P < 0.05$), and the proportion of patients with previous spontaneous abortion and the expression level of MCP-1 were higher than those of non-RSA group ($P < 0.05$). Previous history of spontaneous abortion, low level of HO-1 and high level of MCP-1 in villi were risk factors for RSA ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression level of HO-1 in villi tissue of ESA patients decreases and the expression level of MCP-1 protein increases. Low expression of HO-1 and high expression of MCP-1 are both risk factors for RSA.

作者简介:龚国忠,男,副主任技师,主要从事临床检验方向研究。

Key words: early spontaneous abortion; heme oxygenase-1; monocyte chemotactic protein-1; villi tissue; recurrent spontaneous abortion

自然流产是指在妊娠 28 周以前非人为目的导致的终止妊娠,在妊娠 12 周前发生 SA 称为早期自然流产(ESA)。研究显示,自然流产发生率为 12%,其中 80%以上为 ESA^[1],多表现为停经一段时间后出现早孕反应,伴有阴道出血,轻微下腹疼痛。我国将 3 次及以上在妊娠 28 周前发生胎儿丧失定义为复发性自然流产(RSA)^[2]。RSA 病因复杂,除了目前临床上已知的遗传基因缺陷、内分泌失调、子宫解剖结构异常、感染、生殖免疫等常见因素外,仍有部分患者流产原因未明^[3]。相关研究显示,RSA 风险随流产次数增加而升高,每流产一次,再次流产风险将增加 11%左右,3 次及以上流产可将再次流产风险增加至 40%,RSA 不仅会损害育龄女性的身心健康,还对其家庭造成较大影响^[4],故探讨 RSA 的危险因素以指导临床干预对保障育龄女性的生育健康需求有重要意义。有研究发现,血红素氧合酶-1(HO-1)可能在母胎界面水平影响 RSA 的发生^[5];单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)具有趋化性,能够激活体内中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞的活性,产生大量细胞因子^[6],也可能影响 RSA 的发生。鉴于此,本研究通过分析 ESA 患者绒毛组织中的 HO-1、MCP-1 表达情况,并探讨 RSA 的危险因素,为临床诊疗提供指导。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6 月至 2021 年 5 月遂宁市第一人民医院(以下简称本院)收治的 164 例 ESA 患者作为 ESA 组,另选取同期在本院行人工流产的 164 例正常妊娠孕妇作为对照组。纳入标准:(1)ESA 组均符合《妇产科学》^[7]中对 ESA 的诊断标准,既往自然流产史 ≤ 1 次;(2)对照组术前 B 超可见胚芽及胎心搏动,月经规律,既往无流产史。排除标准:(1)因生殖细胞染色体异常、子宫发育异常、内分泌异常、感染及自身免疫性疾病而导致的流产者;(2)伴心脏病、高血压等内外科疾病史者;(3)伴凝血功能异常者;(4)伴传染性疾病者;(5)合并恶性肿瘤者;(6)因滥用药物而导致流产者;(7)因腹部受到外因性的刺激和损害而致流产者;(8)放置宫内节育器者。

ESA 组年龄 24~35 岁,平均(28.52±3.16)岁,孕周 5~12 周,平均(7.68±1.82)周,体重指数(BMI)20~28 kg/m²,平均(23.92±3.51)kg/m²,既往有自然流产史 75 例;对照组年龄 23~36 岁,平均(27.90±3.43)岁,孕周 6~12 周,平均(8.24±1.36)周,BMI 21~28 kg/m²,平均(23.80±3.14)kg/m²。两组一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究经本院伦理委员会审核批准(审批号:201805-004)。所有受试者均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与处理 清宫术或人工流产后,在无菌条件下,采集自然流产和正常妊娠女性的流产绒毛组织,洗净血液后,放入冷冻管中,-80℃保存,用于石蜡切片制备。

1.2.2 绒毛组织 HO-1、MCP-1 蛋白表达检测 取绒毛组织石蜡切片。常规脱蜡入水,枸橼酸盐缓冲液热抗原修复,山羊血清封闭液封闭后滴加一抗、二抗(生物素标记)、链霉卵白素(碱性磷酸酶标记)各 50 μ L,37℃孵育 25 min;DAB 显色 15 min,冲洗,复染,脱水,封片。相关试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。根据染色强度记为 0~3 分,无染色为 0 分,棕黄色为 3 分;根据染色细胞阳性率记为 0~4 分,临界值分别为 25%、50%、75%。将两项结果相乘,乘积 <2 分为阴性, ≥ 2 分为阳性。

1.2.3 图像分析 将免疫组化切片放置于 Olympus 显微镜下,对所测视野进行精准定位后由摄像系统提取数字化细胞图像输入 CMIAS 真彩色图像分析系统,每张切片随机选择 5 个完整而不重叠的视野进行定量分析,根据免疫组化结果进行积分光密度(IOD)测定,计算平均 IOD,以阳性染色细胞平均 IOD 作为 HO-1、MCP-1 表达水平。

1.2.4 随访 采用电话或门诊复诊等方式对 ESA 组患者进行 12 个月的随访,随访期间连续发生 3 次及以上妊娠 28 周之前的自然流产判定为 RSA。观察统计 ESA 组患者发生 RSA 情况,将发生 RSA 的患者纳入 RSA 组,未发生 RSA 的患者纳入非 RSA 组。

1.2.5 ESA 患者 RSA 的影响因素分析 以 ESA 组患者年龄、孕周、BMI 及 HO-1、MCP-1 表达水平等为自变量,对自变量进行赋值:年龄(实测值),孕周(实测值),BMI(<25 kg/m²=0, ≥ 25 kg/m²=1),既往自然流产史(无=0,有=1),HO-1 表达水平(实测值),MCP-1 表达水平(实测值)。将 RSA 发生与否作为因变量(发生=0,未发生=1)。分析自变量与因变量的关系,记录比值比(OR)。

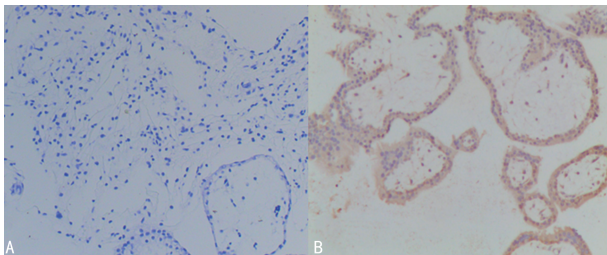
1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计学软件进行数据分析,计量资料经检验符合正态分布,用 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间比较采用 t 检验;计数资料以率描述,组间比较采用 χ^2 检验。采用多因素 Logistic 回归分析 RSA 的影响因素。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 HO-1、MCP-1 阳性率及表达水平比较 ESA 组 HO-1 阳性率及表达水平均低于对照组($P<0.05$),ESA 组 MCP-1 阳性率及表达水平均高于对照组($P<0.05$)。见表 1 和图 1、2。

表 1 HO-1、MCP-1 阳性率及表达水平
[n(%)或 $\bar{x} \pm s$]

组别	n	蛋白阳性率		表达水平	
		HO-1	MCP-1	HO-1	MCP-1
ESA 组	164	58(35.37)	86(52.44)	7.60±2.46	14.64±4.13
对照组	164	78(47.56)	64(39.02)	12.48±3.72	9.21±2.85
χ^2/t		5.025	5.946	14.013	13.858
P		0.025	0.015	<0.001	<0.001



注:A 为对照组绒毛组织中 HO-1 阴性表达;B 为 ESA 组绒毛组织中 HO-1 阳性表达。

图 1 绒毛组织 HO-1 表达情况(SP 法, ×100)

2.2 RSA 组和非 RSA 组患者临床资料比较 ESA 组患者在 12 个月的随访期间,有 23 例患者发生 RSA,发生率为 14.02%(23/164)。RSA 组和非 RSA 组患者年龄、孕周、BMI 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);RSA 组的 HO-1 表达水平低于非 RSA 组($P<0.05$),既往有自然流产史患者占比和 MCP-1 表达水平高于非 RSA 组($P<0.05$)。见表 2。

表 3 ESA 患者 RSA 发生的影响因素分析

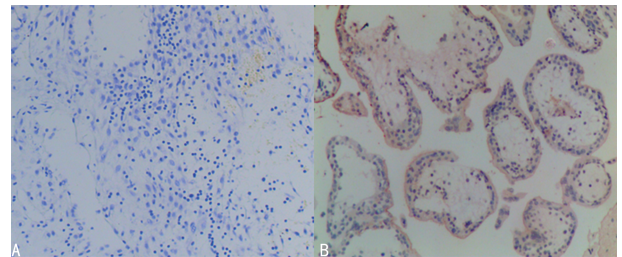
因素	β	SE	Wald χ^2	P	OR	95%CI
既往有自然流产史	0.884	0.294	9.041	0.003	2.420	1.076~3.932
HO-1 低表达	1.242	0.395	9.886	0.002	3.463	1.681~5.048
MCP-1 高表达	1.007	0.363	7.695	0.011	2.737	1.277~4.295

3 讨 论

妊娠是成功的半同种移植过程,胚胎能够完全被母体接受并存活,说明母胎之间一定存在着免疫耐受^[8]。ESA 在临床上较为常见,孕妇在孕早期多次发生自然流产后有发生 RSA 的风险,给育龄期孕妇身心及家庭带来负担。本研究结果显示,ESA 患者随访 12 个月内 RSA 的发生率为 14.02%,稍低于既往葛怡琳^[9]研究结果中的 17%,可能与样本量差异、个体差异等有关,但均表明 ESA 患者有发生 RSA 的风险。因此,需积极探讨影响 ESA 患者发生 RSA 的影响因素,为临床诊治提供指导。

胚胎受母胎界面免疫反应的影响进入子宫内膜,改变其血管,使胚胎受到血液滋养,逐渐成熟,倘若免疫状态失衡,胚胎将会出现血液供给不足,最终导致流产^[10]。MCP-1 通过参与免疫细胞的运动、迁移机

2.3 ESA 患者 RSA 发生的影响因素分析 多因素 Logistic 回归分析结果显示,既往有自然流产史、HO-1 低表达、MCP-1 高表达均为 ESA 患者 RSA 发生的危险因素($P<0.05$)。见表 3。



注:A 为对照组绒毛组织中 MCP-1 阴性表达;B 为 ESA 组绒毛组织中 MCP-1 阳性表达。

图 2 绒毛组织 MCP-1 表达情况(SP 法, ×100)

表 2 RSA 组和非 RSA 组患者临床资料比较
[n(%)或 $\bar{x} \pm s$]

项目	RSA 组 (n=23)	非 RSA 组 (n=141)	χ^2/t	P
年龄(岁)	29.62±3.52	28.34±3.19	1.759	0.081
孕周(周)	7.31±1.64	7.74±1.56	1.217	0.225
BMI(kg/m ²)			0.013	0.908
≥25	3(13.04)	16(11.35)		
<25	20(86.96)	125(88.65)		
既往有自然流产史			6.123	0.013
有	16(69.57)	59(41.84)		
无	7(30.43)	82(58.16)		
HO-1 表达水平	6.25±2.07	7.82±1.94	3.565	<0.001
MCP-1 表达水平	16.54±3.42	14.33±3.68	2.696	0.008

制来影响胚胎期母胎界面的免疫反应^[11-12]。绒毛组织中 HO-1 主要表达于胎盘功能的执行细胞,即滋养细胞,正常妊娠主要依靠滋养细胞功能和结构的完整性,HO-1 不仅能够加快生成胆红素,还可将血红素及其相关有害物清除^[13],以减少多种应激损伤的发生。本研究结果显示,ESA 组 MCP-1 阳性率高于对照组,HO-1 阳性率低于对照组,提示 MCP-1 阳性率升高、HO-1 阳性率降低均与 ESA 的发生相关。原因可能是:母胎界面 MCP-1 表达上调可引起巨噬细胞的免疫活性异常,活跃的巨噬细胞分泌更多的 MCP-1,促使大量巨噬细胞聚集,如此反复,从而导致胚胎死亡^[14]。然而,HO-1 阴性表达可能导致绒毛间的血红蛋白和血红素聚集,从而上调黏附分子表达,使免疫细胞被吸收,发生免疫排斥反应,最终导致 ESA^[15]。

RSA 的病因较为复杂多样,大部分患者病难以

识别,对广大女性的生理、心理造成严重的影响,临床上较为难防难治。本研究结果发现,RSA 组患者的 HO-1 表达水平低于非 RSA 组,既往有自然流产史患者占比和 MCP-1 表达水平高于非 RSA 组,且多因素 Logistic 分析显示这些均为 RSA 的影响因素。分析原因:自然流产可引起子宫内膜损伤和凝血异常,增加蜕膜发育不良、胎盘年龄等风险,影响再次妊娠。既往研究也证实流产次数越多,患者妊娠丢失率越高^[16]。HO-1 水平降低可破坏局部血管的舒张功能和滋养细胞功能,影响正常妊娠,造成胚胎组织种植稳固性较低,致使其发生脱落;同时,HO-1 低表达可引起流入叶状绒毛膜血流量降低,从而使胎盘内出现血氧不足,导致局部缺血绒毛坏死,胎盘内毒素因子增多,使得抗炎作用减弱和抗氧化能力不足,最终导致 RSA 的发生^[17]。MCP-1 可趋化单核-巨噬细胞等炎性细胞向病灶部位聚集,从而进一步加重机体损伤。MCP-1 水平升高促进单核-巨噬细胞分泌前列腺素 E₂,增加宫缩,从而诱发流产。MCP-1 可诱导炎性细胞靠近母胎界面,促进胎盘滋养细胞凋亡,子宫内膜功能层发生的短而直的小动脉突发性状况,引发胎盘出血、坏死等不良事件,最终导致流产^[18]。

总之,妊娠本身是极其复杂的过程,本研究通过探讨 ESA 患者绒毛组织 HO-1、MCP-1 表达情况及 RSA 发生的危险因素,证实了 ESA 患者绒毛组织 HO-1 表达水平降低、MCP-1 表达水平升高,并且 HO-1 低表达、MCP-1 高表达均会引起 RSA 的发生。因此,建议临床上针对 RSA 患者监控上述指标水平,并积极采取措施进行治疗。

参考文献

- [1] 黄霏,陈美佳,吕福通,等.早期自然流产胚胎绒毛染色体多重连接依赖式探针扩增技术分析[J].中国计划生育和妇产科,2020,12(5):39-42.
- [2] 中华医学会妇产科学分会产科学组,复发性流产诊治专家共识编写组.复发性流产诊治专家共识(2022)[J].中华妇产科杂志,2022,57(9):653-667.
- [3] QUINTERO-RONDEROS P, LAISSUE P. Genetic variants contributing to early recurrent pregnancy loss etiology identified by sequencing approaches[J]. Reprod Sci, 2020,27(8):1541-1552.
- [4] VAN DIJK M M, KOLTE A M, LIMPENS J, et al. Recurrent pregnancy loss: diagnostic workup after two or three pregnancy losses? A systematic review of the literature and meta-analysis[J]. Hum Reprod Update, 2020, 26(3):356-367.
- [5] SUTTORP C M, VAN RHEDEN R E M, VAN DIJK N W M, et al. Heme oxygenase protects against placental vascular inflammation and abortion by the alarmin heme in mice[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15):5385.
- [6] 刘学,栾晓瑾,肖正华. MCP-1 和 CD105 在稽留流产患者蜕膜组织中的表达及意义[J]. 浙江医学, 2021, 43(18): 1963-1967.
- [7] 石芳鑫. 妇产科学[M]. 北京:清华大学出版社, 2007:326-329.
- [8] ANDER S E, DIAMOND M S, COYNE C B. Immune responses at the maternal-fetal interface[J]. Sci Immunol, 2019, 4(31):6114.
- [9] 葛怡琳. 不孕合并自然流产史患者复发性流产及其危险因素分析[D]. 上海:复旦大学, 2014.
- [10] D'IPPOLITO S, TICCONI C, TERSIGNI C, et al. The pathogenic role of autoantibodies in recurrent pregnancy loss[J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 83(1):e13200.
- [11] 陆敏,施蕾,王桂,等.反复不明原因自然流产孕妇外周血单个核细胞中 lncRNA NEAT1 和 TLR2 表达[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(6):1216-1220.
- [12] 罗淑芳,尹路,吴千驹. 血红素氧合酶-1 对牙髓炎模型妊娠期雌鼠干预效果及对趋化因子、前列环素表达的影响[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(24):5762-5765.
- [13] GALLARDO V, GONZÁLEZ M, TOLEDO F, et al. Role of heme oxygenase 1 and human chorionic gonadotropin in pregnancy associated diseases[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(2):165522.
- [14] 刘学,栾晓瑾,肖正华. MCP-1 和 CD105 在稽留流产患者蜕膜组织中的表达及意义[J]. 浙江医学, 2021, 43(18): 1963-1967.
- [15] SHEN H H, WANG C J, ZHANG X Y, et al. HIF1A-induced heme oxygenase 1 promotes the survival of decidual stromal cells against excess heme-mediated oxidative stress[J]. Reproduction, 2021, 163(1):33-43.
- [16] 徐畅,陆玉莲.不同流产次数的早期复发性流产孕妇血栓弹力图表现及与妊娠丢失关系[J]. 中国计划生育学杂志, 2021, 29(4):763-766.
- [17] 杨屹,罗金维,康瑛,等.根皮苷酚联合黄体酮治疗先兆流产的效果及对患者 HO-1 的影响[J]. 河北医药, 2019, 41(16):2501-2503.
- [18] 陈慧,陈虹,吴儒佳.趋化因子 RANTES 和 MCP-1 在不明原因复发性流产早期诊断中的作用[J]. 贵州医科大学学报, 2021, 46(6):734-738.

(收稿日期:2023-01-17 修回日期:2023-06-21)