

· 论 著 ·

未足月胎膜早破患者胎盘胎膜组织 Toll 样受体 2 的表达及其意义

郭琳琼, 刘俊利, 吉婷, 刘星

西北妇女儿童医院产科, 陕西 西安 710000

摘要: **目的** 探讨 Toll 样受体 2 (TLR-2) 在未足月胎膜早破 (PPROM) 患者胎盘胎膜组织中的表达及其意义。**方法** 选取 2015 年 2 月至 2016 年 12 月诊治的 PPROM 患者 60 例作为 PPROM 组, 及同期正常分娩孕妇 60 例作为对照组, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 法检测两组对象胎膜组织 TLR-2 mRNA 表达, 免疫组化法检测两组胎盘胎膜组织 TLR-2 蛋白表达。**结果** PPROM 组胎膜组织中 TLR-2 mRNA 相对表达量为 0.612 ± 0.130 , 明显高于对照组的 0.324 ± 0.122 ($P < 0.01$); PPROM 组胎盘组织和胎膜组织 TLR-2 蛋白表达的平均光密度值分别为 0.152 ± 0.011 和 0.443 ± 0.009 , 均明显高于对照组的 0.080 ± 0.006 和 0.276 ± 0.005 (P 均 < 0.01); 在 PPROM 组, 胎膜 TLR-2 蛋白平均光密度值依破膜时间 < 16 h \rightarrow 破膜时间 $16 \sim 24$ h \rightarrow 破膜时间 > 24 h 之序递升, 总体比较及两两比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.01); PPROM 组绒毛膜羊膜炎发生率为 23.33%, 明显高于对照组的 3.33% ($P < 0.01$); PPROM 组发生绒毛膜羊膜炎患者胎膜 TLR-2 蛋白平均光密度值明显高于非绒毛膜羊膜炎患者 ($P < 0.01$)。**结论** PPROM 患者胎盘胎膜组织 TLR2 表达上调, 可能在胎膜破裂过程中有一定的作用。

关键词: 未足月胎膜早破; Toll 样受体 2; 胎盘; 胎膜; 破膜时间; 绒毛膜羊膜炎

中图分类号: R 714.43⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)10-1311-04

Expression and significance of Toll like receptor 2 in placenta and fetal membrane tissue in patients with preterm premature rupture of membranes

GUO Lin-qiong, LIU Jun-li, JI Ting, LIU Xing

Obstetrical Department, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710000, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Toll like receptor 2 (TLR-2) in placenta and fetal membrane tissue in patients with preterm premature rupture of membranes (PPROM) and its significance. **Methods** Sixty cases of PPROM patients who received treatment from February 2015 to December 2016 were selected as PPROM group, and 60 cases of normal pregnant women at the same period were selected as control group. Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of TLR-2 mRNA in fetal membrane tissue, and immunohistochemistry was used to detect the expression of TLR-2 protein in placenta and fetal membrane tissue respectively. **Results** The relative expression level of TLR-2 mRNA in PPROM group fetal membrane tissue was higher than that in control group (0.612 ± 0.130 vs 0.324 ± 0.122 , $P < 0.01$). The average optical density (AOD) values of TLR-2 protein in placenta and fetal membrane tissue of PPROM group were all higher than those of control group (0.152 ± 0.011 vs 0.080 ± 0.006 , 0.443 ± 0.009 vs 0.276 ± 0.005 , all $P < 0.01$). In PPROM group, the AOD value of TLR-2 protein in fetal membrane tissue was increased according to the rupture < 16 h, $16 \sim 24$ h, > 24 h ascending order, and there were statistically differences in overall comparison and paired comparison (all $P < 0.01$). The incidence of chorioamnionitis in PPROM group was higher than that in control group (23.33% vs 3.33%, $P < 0.01$). In PPROM group, the AOD value of TLR-2 protein was higher in fetal membrane tissue patients with chorioamnionitis than that with non-chorioamnionitis ($P < 0.01$). **Conclusion** The increase of TLR-2 expression in placenta and fetal membrane tissue of PPROM patients may play a role in the progress of rupture of membranes.

Key words: Preterm premature rupture of membranes; Toll like receptor 2; Placenta; Fetal membrane; Rupture time; Chorioamnionitis

未足月胎膜早破 (preterm premature rupture of membranes, PPRM) 主要是指临产前发生的胎膜破裂,并继发感染、产后出血、早产、胎盘早剥等疾病,严重影响产妇和新生儿的健康,甚至危及生命^[1-2]。PPROM 发生的因素有很多,但一般认为均与炎症和胎膜本身结构的缺陷有关,而机械外力、免疫和感染因素也是导致 PPRM 发生的重要原因^[3-4]。Toll 样受体 2 (Toll like receptor 2, TLR-2) 属于 Toll 样受体家族成员,也是表达范围最广和识别病原微生物最多的分子之一,其在细胞信号转导过程中发挥着重要的作用^[5]。也有研究表明,TLR-2 与 PPRM 的发生有一定的关系^[6],但具体机制尚不明确。为进一步探讨 PPRM 患者体内 TLR2 的表达及其意义,本研究对我院 PPRM 患者和正常分娩孕妇的胎膜胎盘组织中 TLR-2 mRNA 和 TLR-2 蛋白表达水平进行检测和比较,以期临床诊治提供一定的理论参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 2 月至 2016 年 12 月在我院治疗的 PPRM 患者 60 例,纳入标准:(1) 诊断符合乐杰主编的 7 版《妇产科学》中的标准;(2) 均为单胎初产妇;(3) 患者及家属知情同意并签署同意书。排除标准:(1) 有其他妊娠合并症;(2) 胎儿胎位异常者。选取同期正常分娩孕妇 60 例作为对照组,两组产妇产龄、孕期体质指数 (BMI) 比较差异无统计学意义 (P 均 >0.05)。见表 1。

表 1 两组产妇一般情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	孕期 BMI
PPROM 组	60	26.43 ± 2.82	29.03 ± 3.93
对照组	60	26.10 ± 3.06	30.01 ± 4.10
t 值		0.614	1.337
P 值		>0.05	>0.05

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 二甲苯、苏木精、伊红购自美国 Sigma 公司,兔抗人 TLR-2 免疫球蛋白 G、生物素化山羊抗兔 IgG/亲和素抗体、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司。Trizol 提取试剂盒、逆转录试剂盒和荧光定量检测试剂盒均购自美国 TaKaRa 公司。显微镜购自日本奥林巴斯公司,7900 型荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 仪购自美国应用生物系统公司。

1.2.2 免疫组化法 所有受试者均取分娩后的胎膜破口处组织作为检测样本,大小约为 2 cm × 2 cm × 1 cm,共剪取 2 块。取其中一块利用生理盐水清除表面血迹和羊水,4% 多聚甲醛中固定后常规石蜡包埋,

作连续切片,厚度约为 10 μm。将切片用冷丙酮固定,利用二甲苯和酒精依次进行脱蜡和水化,随后利用羊血清封闭。滴入 1:50 稀释的一抗 (兔抗人 TLR-2 免疫球蛋白 G),4 °C 条件下培养过夜。次日以 PBS 洗掉一抗,再滴入二抗 (生物素化山羊抗兔 IgG/亲和素抗体),37 °C 条件下孵育 30 min, PBS 冲洗 DAB 染色,苏木精-伊红进行复染,显微镜下观察胎膜组织中 TLR-2 蛋白表达情况。另取受试者分娩后胎盘组织 1 块,大小约为 2 cm × 2 cm × 1 cm,按同样方法处理,观察胎盘组织中 TLR-2 蛋白表达情况,采用 Image. Pro Plus 5.0 图像分析软件测定 TLR-2 平均光密度值,对图像的 5 个阳性区积分光密度分析,取其平均值即为平均光密度值,用此值代表 TLR-2 在孕妇胎盘和胎膜组织中的表达水平。

1.2.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 法

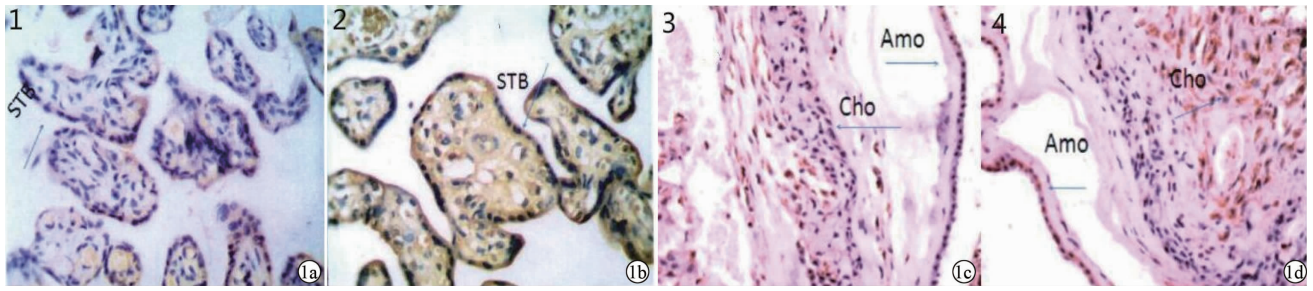
取另外一块胎膜组织利用 Trizol 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录试剂盒逆转成 c-DNA,聚合酶作用下进行,TLR-2 mRNA 引物如下。TLR-2 上游:5'-GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG-3',下游:5'-TTG AAG TTG TTC TCC AGC TCT G-3'。扩增条件如下:95 °C 10 min 后以 60 °C、15 s 进行变性,60 °C、60 s 进行退火,72 °C 5 min 后 30 s 进行延伸,此为 1 个循环,共进行 40 个循环。利用荧光定量 PCR 仪定量检测 TLR-2 mRNA 水平,具体检测步骤严格按照定量检测试剂盒说明书进行操作。每个小试管内的荧光信号到达设定的阈值经历的循环次数被称为 CT 值。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因在各组标本中的相对表达量。

1.3 统计学处理 统计分析采用 SPSS 19.0 软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。计数资料比较采用 χ^2 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组 TLR-2 mRNA 在胎膜组织中的表达 PPRM 组胎膜组织中 TLR-2 mRNA 相对表达量明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.2 两组 TLR-2 蛋白在胎盘、胎膜组织中的表达 TLR-2 在胎盘组织中主要表达于合体滋养细胞的胞膜和胞质,在胎膜组织中表达于羊膜上皮细胞和绒毛膜的滋养细胞,呈棕黄色颗粒沉着者,见图 1。PPROM 组胎盘组织和胎膜组织 TLR-2 蛋白表达的平均光密度值均明显高于对照组 (P 均 < 0.01)。见表 2。



注:1a:对照组胎盘组织;1b:PPROM 组胎盘组织;1c:对照组胎膜组织;1d:PPROM 组胎膜组织;STB 代表合体滋养层细胞;Amo 代表羊膜;Cho 代表绒毛膜。

图 1 TLR-2 蛋白在胎盘及胎膜组织中的表达(SP 染色, ×400)

2.3 PPROM 组不同破膜时间胎膜 TLR-2 蛋白表达比较 在 PPROM 组,胎膜 TLR-2 蛋白平均光密度值依破膜时间 < 16 h → 破膜时间 16 ~ 24 h → 破膜时间 > 24 h 之序递升,总体比较及两两比较,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。见表 3。

2.4 PPROM 组绒毛膜羊膜炎发生情况及 TLR-2 蛋白表达 PPROM 组发生绒毛膜羊膜炎 14 例,发生率为 23.33%,对照组发生绒毛膜羊膜炎 2 例,发生率为 3.33%,PPROM 组绒毛膜羊膜炎发生率明显高于对照组($\chi^2 = 10.385, P < 0.01$)。PPROM 组发生绒毛膜羊膜炎患者胎膜 TLR-2 蛋白平均光密度值明显高于非绒毛膜羊膜炎患者($P < 0.01$)。见表 3。

表 2 两组 TLR-2 mRNA 在胎膜组织及 TLR-2 蛋白在胎盘、胎膜组织中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	胎膜组织	胎盘组织	胎膜组织
		TLR-2 mRNA	TLR-2 蛋白	TLR-2 蛋白
PPROM 组	60	0.612 ± 0.130	0.152 ± 0.011	0.443 ± 0.009
对照组	60	0.324 ± 0.122	0.080 ± 0.006	0.276 ± 0.005
t 值		12.513	44.510	125.643
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

表 3 PPROM 组不同破膜时间和是否合并绒毛膜羊膜炎患者胎膜 TLR-2 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	例数	TLR-2 蛋白	F/t 值	P 值
不同破膜时间				
破膜时间 < 16 h	25	0.335 ± 0.013		
破膜时间 16 ~ 24 h	19	0.470 ± 0.016 ^a	174.241	<0.01
破膜时间 > 24 h	16	0.557 ± 0.015 ^{ab}		
合并绒毛膜羊膜炎与否				
绒毛膜羊膜炎	14	0.561 ± 0.013		
非绒毛膜羊膜炎	46	0.412 ± 0.011	42.527	<0.01

注:与破膜时间 < 16 h 比较,^a $P < 0.01$;与破膜时间 16 ~ 24 h 比较,^b $P < 0.01$ 。

3 讨论

胎膜早破是临床上常见的产前并发症之一,其发病率较高,发病例数可占有分娩总数的 2.7% ~

17%^[7-8]。临床一般根据破膜发生的时间将其分为 PPROM 和足月后胎膜早破两种,其中 PPROM 是造成早产的主要原因之一^[9]。研究显示,PPROM 基本上都会导致早产,并可增加宫内感染及产褥感染机会,且胎膜早破距分娩的时间愈长,宫内感染机会愈高^[10]。胎膜早破的诱发因素有很多,如胎膜病变、下生殖道感染、羊膜腔内压力升高、宫颈内口松弛、头盆不称或胎后异常以及各种机械性损伤等,但发病机制目前尚不完全清楚^[11]。也有多项研究表明,感染是导致胎膜早破的主要原因之一,而 TLR2 在这一过程中可能发挥了重要的作用^[12-13]。为此,本研究选取我院 PPROM 患者和正常分娩孕妇作为研究对象,检测并比较两组患者胎膜组织 TLR-2 mRNA 表达水平和胎盘胎膜组织 TLR-2 蛋白表达水平。

TLR 是一种模式识别受体,可识别来源于微生物病原体的相关分子模式,进而激发机体的免疫反应,在抗病原体感染过程中发挥着重要的作用。TLR-2 被认为是 TLR 中表达最为广泛、识别病原微生物及种类最多的成员,其主要存在于细胞表面,可表达于所有的细胞系^[14]。研究表明,TLR-2 在心血管系统、呼吸系统、生殖系统等广泛分布,且在多种生理和病理过程中均可发现其表达的改变^[15]。呼玲慧^[16]的研究表明,TLR-2 在胎膜早破组的表达显著升高,其可能诱导产生对机体不利的炎症和过敏反应,进而导致胎膜早破的发生,本研究的结果与其基本一致。本研究发现,PPROM 组胎膜组织中 TLR-2 mRNA 相对表达量明显高于对照组,且 PPROM 组胎盘组织和胎膜组织 TLR-2 蛋白表达的平均光密度值均明显强于对照组,提示 TLR-2 与胎膜早破的发生有着密切的关系,PPROM 患者的 TLR-2 表达明显更高,其原因可能是 TLR-2 蛋白表达的升高会激活相关细胞分泌炎症性介质,导致金属蛋白酶-2 升高^[17],促进细胞外基质降解,进而诱发胎膜破裂,但具体机制仍需作进一步探讨。

对不同破膜时间的分析发现,在 PPROM 组,胎

膜 TLR-2 蛋白平均光密度值依破膜时间 < 16 h → 破膜时间 16 ~ 24 h → 破膜时间 > 24 h 之序递升, 总体比较及两两比较, 差异有统计学意义, 提示随着患者破膜时间的延长, 其 TLR-2 蛋白表达水平明显升高, 但具体原因需要作进一步的深入探讨。

绒毛膜羊膜炎是指羊水和绒毛膜受感染的疾病, 其与胎膜早破有着密切的关系, 且胎膜早破合并绒毛膜羊膜炎的危害更为严重。本研究中, PPROM 组绒毛膜羊膜炎发生率为 23.33%, 而对照组仅为 3.33%, 提示 PPROM 可能会引起绒毛膜羊膜炎的发生, 其原因可能与破膜后羊水造成感染有关。同时, PPROM 组发生绒毛膜羊膜炎患者胎膜 TLR-2 蛋白平均光密度值明显高于非绒毛膜羊膜炎患者, 提示 TLR-2 蛋白表达可能与绒毛膜羊膜炎的发生有一定的关系, 但具体机制及能否通过监测 TLR-2 蛋白水平来预测胎膜早破患者绒毛膜羊膜炎的发生率, 尚需作进一步的深入研究。

综上所述, PPROM 患者胎盘、胎膜组织 TLR-2 表达上调, 可能在胎膜破裂过程中有一定的作用。

参考文献

[1] Yu H, Wang X, Gao H, et al. Perinatal outcomes of pregnancies complicated by preterm premature rupture of the membranes before 34 weeks of gestation in a tertiary center in China: A retrospective review[J]. *Biosci Trends*, 2015, 9(1): 35-41.

[2] Poletini J, Dutta EH, Behnia F, et al. Aging of intrauterine tissues in spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes: A systematic review of the literature [J]. *Placenta*, 2015, 36(9): 969-973.

[3] 朱静维, 周华, 李周. 足月胎膜早破产妇产后新生儿感染的临床研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(12): 3067-3069.

[4] 李晓霞, 帅向华, 芦惠. 未足月胎膜早破后早产儿脑损伤的发生率与危险因素分析[J]. *浙江实用医学*, 2013, 18(6): 393-395, 416.

[5] 高东, 王晓冬, 靳广毅, 等. Toll 样受体与配体复合物结构的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(4): 553-556.

[6] 薛会灵, 刘金, 梁玲, 等. 未足月胎膜早破产妇产胎膜组织中 TLR2 表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2014, 54(18): 8-9.

[7] Cohen A, Skornick-Rapaport A, Cohen Y, et al. The influence of prolonged preterm premature rupture of the membranes on neonatal outcome of the presenting and non-presenting twin [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 181: 28-31.

[8] Linehan LA, Walsh J, Morris A, et al. Neonatal and maternal outcomes following midtrimester preterm premature rupture of the membranes: a retrospective cohort study [J]. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 2016, 16: 25.

[9] 李婷婷, 黄为民. 未足月胎膜早破时间与组织学绒毛膜羊膜炎的相关性[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(11): 1831-1833.

[10] 王君莲, 孙江川, 常淑芳. 未足月胎膜早破的治疗进展[J]. *重庆医学*, 2014, 43(15): 1951-1953.

[11] 吴婷, 罗力冰. 未足月胎膜早破后羊水指数对妊娠结局的影响分析[J]. *西部医学*, 2014, 26(5): 644-645, 648.

[12] 熊正方, 李冰, 党小红. Toll 样受体 2 功能的研究进展[J]. *中华生物医学工程杂志*, 2014, 20(1): 71-74.

[13] Kacerovsky M, Andrys C, Hornychov H, et al. Amniotic fluid soluble Toll-like receptor 2 in pregnancies complicated by preterm prelabor rupture of membranes [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2015, 28(10): 1116-1122.

[14] 李慧媛, 张冬雷, 张岷, 等. Toll 样受体 2 在原发免疫性血小板减少症中的作用研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(4): 1033-1037.

[15] 李凯霞, 刘福民. TLR-2 与 TLR-4 在胎膜早破患者胎盘组织中的表达及意义 [J]. *医学综述*, 2016, 22(9): 1768-1770.

[16] 呼玲慧. TLR-2 和 MMP-2 在胎膜早破患者胎盘和胎膜组织中的表达及其意义 [D]. 郑州: 郑州大学, 2014.

[17] Tchirikov M, Schlubritsch-Loutsevitch N, Maher J, et al. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome [J]. *J Perinat Med*, 2017 Jul 15. [Epub ahead of print].

收稿日期: 2017-06-24 修回日期: 2017-08-18 编辑: 石嘉莹