

妊娠早期蜕膜甲状腺激素受体信号异常对蜕膜化进程的影响及其与流产发生的关联

翟沐鑫^{1,2,3},李莹^{1,2,3},余涛^{1,2,3},赵丽^{1,2,3},于震^{1,2,3},杨媛媛^{1,2,3}

摘要 目的 评估自然流产患者蜕膜血管生成情况,并探讨自然流产患者蜕膜中甲状腺激素受体信号的表达改变。方法 收集行人流术的孕妇蜕膜。以自然流产患者作为实验组,以社会因素行人流术的健康孕妇作为对照组,收集两组人群蜕膜组织。采用 Western blot 方法,检测蜕膜组织中甲状腺激素受体- α (THR- α) 和 THR- β 的核转位情况,同时使用免疫组化法定位蜕膜组织中 THR- α 和 THR- β 的分布。Western blot 测定蜕膜组织中 II 型脱碘酶 (DIO2) 的蛋白表达水平,免疫荧光法定位 DIO2 在蜕膜组织分布并测定荧光强度。使用免疫组化,以 CD34 作为内皮标志物测定蜕膜血管密度。Western blot 检测血管内皮生长因子受体 (VEGFR-1) 的蛋白表达水平。结果 对照组与流产组在年龄、妊娠天数、TSH、T3、T4 等基本资料中,差异均无统计学意义。Western blot 结果提示 THR- α 和 THR- β 蛋白核转位下降,同时蜕膜组织免疫组化染色结果表明自然流产患者蜕膜甲状腺激素受体核转位减少 ($P < 0.05$)。Western blot 结果表明流产组 DIO2 蛋白表达较对照组下降,提示自然流产孕妇蜕膜中,甲状腺激素代谢受到影响;免疫荧光实验结果显示流产组 DIO2 的荧光强度较对照组减弱 ($P < 0.05$)。免疫组化法 CD34 标记蜕膜小血管的结果显示,在流产组中,CD34⁺ 血管数量下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Western blot 结果提示流产组和对照组中 VEGFR-1 无明显变化,差异无统计学意义。结论 蜕膜局部甲状腺激素受体信号异常可能导致蜕膜血管生成减少,从而参与自然流产的发生。

关键词 流产;蜕膜化;甲状腺激素受体

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1076-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.025

自然流产是早期妊娠最常见的并发症之一。据统计分析,大约 15% 的妊娠以流产为结局,且 80%

发生于妊娠 12 周前^[1]。造成自然流产的病因包括母体因素、胚胎因素等,早期自然流产以胚胎染色体异常最常见,约占 60%,而内分泌因素、免疫因素、易栓状态、生殖道感染和孕妇基础疾病等因素亦为常见因素^[2-3]。蜕膜化异常是发生自然流产的重要原因之一^[4]。作为最先与胚胎建立物质交换的母体组织,蜕膜参与母胎界面形成,为胚胎的正常生长发育提供了能量物质,也可防止母体自身免疫系统攻击胚胎^[5]。目前已有研究^[6]显示甲状腺激素可调节蜕膜化进程,在蜕膜化的最初阶段起到诱导和维持蜕膜细胞形态和内分泌功能的作用。但甲状腺激素对蜕膜化影响的潜在机制,尚需进一步探索。该研究探究了自然流产与蜕膜甲状腺激素受体信号功能不足的潜在可能因素,为自然流产防治工作提供理论依据,预防自然流产的发生。

1 材料与方法

1.1 样本收集 选择 2020 年 9 月至 2021 年 6 月于安徽医科大学第一附属医院超声及临床诊断胚胎停,自然流产的妇女作为流产组,选择年龄相匹配因社会因素行人工流产术的妇女作为对照组。自然流产纳入标准参考自然流产诊治中国专家共识(2020 年版),是指一定妊娠孕周前的妊娠过程失败,包括生化妊娠、空孕囊、胚胎发育逐渐停止、胚胎或胎儿死亡以及胚胎及其附属物排出等表现。排除标准:患有基础疾病的孕妇及孕期有并发症的孕妇,包括糖尿病、高血压、心脑血管病、病毒性肝炎、自身免疫疾病(系统性红斑狼疮等)、妊娠期胆汁淤积症等内外科疾病;因胚胎染色体异常而发生的自然流产;孕前及孕期有甲状腺病史;双胞胎及多胎妊娠。所有参与签署书面知情同意,所有程序和流程经安徽医科大学第一附属医院(中国·合肥)伦理委员会的批准(S20200021)。于人流术后立即使用生理盐水清理刮出的宫腔内组织,选取其中的蜕膜组织,采用不同方法保存,供后续实验使用。检测蛋白表达的组织放入冻存管后使用液氮迅速冷冻,后转移至 -80℃ 冰箱保存;组织学检测的组织采用 4% 多聚甲醛

2024-03-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:2008085MH243)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230032

² 国家卫生健康委配子及生殖道异常研究重点实验室,合肥 230032

³ 生殖健康与遗传安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:翟沐鑫,男,硕士研究生;

杨媛媛,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:wlj69513@sina.com

固定组织后,使用石蜡包埋。

1.2 免疫组化 将 5 μm 石蜡切片经二甲苯脱蜡处理,梯度乙醇水化,通透处理后使用柠檬酸钠缓冲液经高压热修复,封闭抗原后,使用 1:200 稀释的 CD34 一抗孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜后,经二抗和辣根过氧化物酶标记后。采用 DAB 染液染色,控制每张切片染色时间相同,使用 PBS 缓冲液冲洗终止染色。苏木精染核后,经梯度乙醇脱水并用二甲苯透化,中性树脂封片后使用显微镜拍摄图像。

1.3 核蛋白提取 根据细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒(碧云天 P0028,上海)说明书进行操作:组织切碎后使用试剂盒中胞浆裂解液冰浴裂解,15 min 后,在 4 $^{\circ}\text{C}$,2 500r/min 条件下离心 10 min,取其沉淀,使用 PBS 缓冲液冲洗后,按剂量分次加入细胞核裂解液,多次震荡离心后取上清液,加入上样缓冲液后加热变性保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

1.4 组织总蛋白提取 根据比例将 RIPA 裂解液(碧云天 P0013B,上海)、苯甲磺酰氟(碧云天 ST505,上海)、磷酸酶抑制剂(碧云天 P1045,上海)配置成蛋白提取液,剪取一定质量组织后,加入相应比例的蛋白提取液,使用组织震荡器打碎组织后,冰浴放置 15 min,使用离心机在 4 $^{\circ}\text{C}$,13 000 r/min 条件下离心 10 min 后取上清液加入上样缓冲液后加热变性。

1.5 Western blot 配制聚丙烯酰胺凝胶,将加热变性的蛋白样品加入上样孔,经过电泳、转膜、封闭和一抗抗体孵育。以 β -tubulin、甲状腺激素受体 α (thyroid hormone receptor- α , THR- α)、甲状腺激素受体 β (thyroid hormone receptor- β , THR- β)、II 型脱碘酶(deiodinase II, DIO2)和血管内皮生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor-1, VEGFR-1)1:2 000 稀释后为孵育的一抗。TBST 洗膜 3 次后,根据一抗来源种属,使用山羊抗兔或小鼠 IgG 为孵育二抗,采用通用型 ECL 化学发光显影试剂盒进行显影,获取蛋白条带,依据条带灰度值以 β -Tubulin(总蛋白),Lamin B(核蛋白)为内参对蛋白含量进行定量分析。

1.6 免疫荧光 切片经脱蜡水化处理后,用 0.1% TritonX-100 通透液通透 10 min,5% BSA 封闭液 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴封闭 1 h,将切片与兔抗人一抗 DIO2 一起 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,次日用二抗标记,用 DAPI 标记细胞核,使用荧光显微镜采集图像。使用 ImageJ 软件对每张切片的 6 个随机视野进行统计。

1.7 统计学处理 将实验数据录入 GraphPad Prism6 统计学软件进行分析,所有定量数据分析采用独立样本 t 检验,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为数据有统计学意义。

2 结果

2.1 患者基本情况 人工流产术前准备已检测每位患者血清 TSH、T3、T4 水平,均在正常范围内,排除甲状腺疾病患者。对照组与流产组在年龄、妊娠天数、TSH、T3、T4 等基本资料比较,差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 患者基本情况及血清甲状腺激素水平($n = 40, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	流产组
妊娠天数(d)	54.83 \pm 7.13	60.65 \pm 11.41
年龄(岁)	27.60 \pm 5.57	29.90 \pm 5.0.5
TSH($\mu\text{IU/ml}$)	1.48 \pm 0.69	1.75 \pm 0.79
T3(nmol/L)	1.79 \pm 0.35	1.92 \pm 0.43
T4(nmol/L)	115.02 \pm 13.86	122.09 \pm 18.19

2.2 甲状腺激素受体的表达与定位 提取蜕膜组织细胞核蛋白,Western blot 结果显示,与对照组相比,流产组蜕膜组织核蛋白中两种甲状腺激素受体蛋白表达量均下降。同时,对两组蜕膜组织进行免疫组化染色,使用 THR- α 及 THR- β 抗体标记,结果显示自然流产患者蜕膜甲状腺激素受体核转位减少($P < 0.05$),提示流产组甲状腺激素对蜕膜组织细胞的调控能力下降。见图 1。

2.3 蜕膜组织的 DIO2 的表达与定位 提取两组蜕膜组织蛋白后,Western blot 实验结果显示流产组 DIO2 蛋白表达较对照组下降,表明自然流产孕妇蜕膜中,甲状腺激素代谢受到影响。免疫荧光实验结果显示流产组 DIO2 的荧光强度较对照组减弱。见图 2。

2.4 蜕膜中血管生成 对两组蜕膜组织进行连续切片并行免疫组化染色,使用 CD34 标记蜕膜小血管。结果显示,流产组血管较对照组细,且 CD34⁺ 血管数量下降,差异有统计学意义。在 Western blot 结果中,流产组和对照组中 VEGFR-1 无明显变化,两组差异无统计学意义。见图 3。

3 讨论

本研究探究了甲状腺激素功能通过影响蜕膜化进程,可能参与自然流产发生的过程机制。本研究

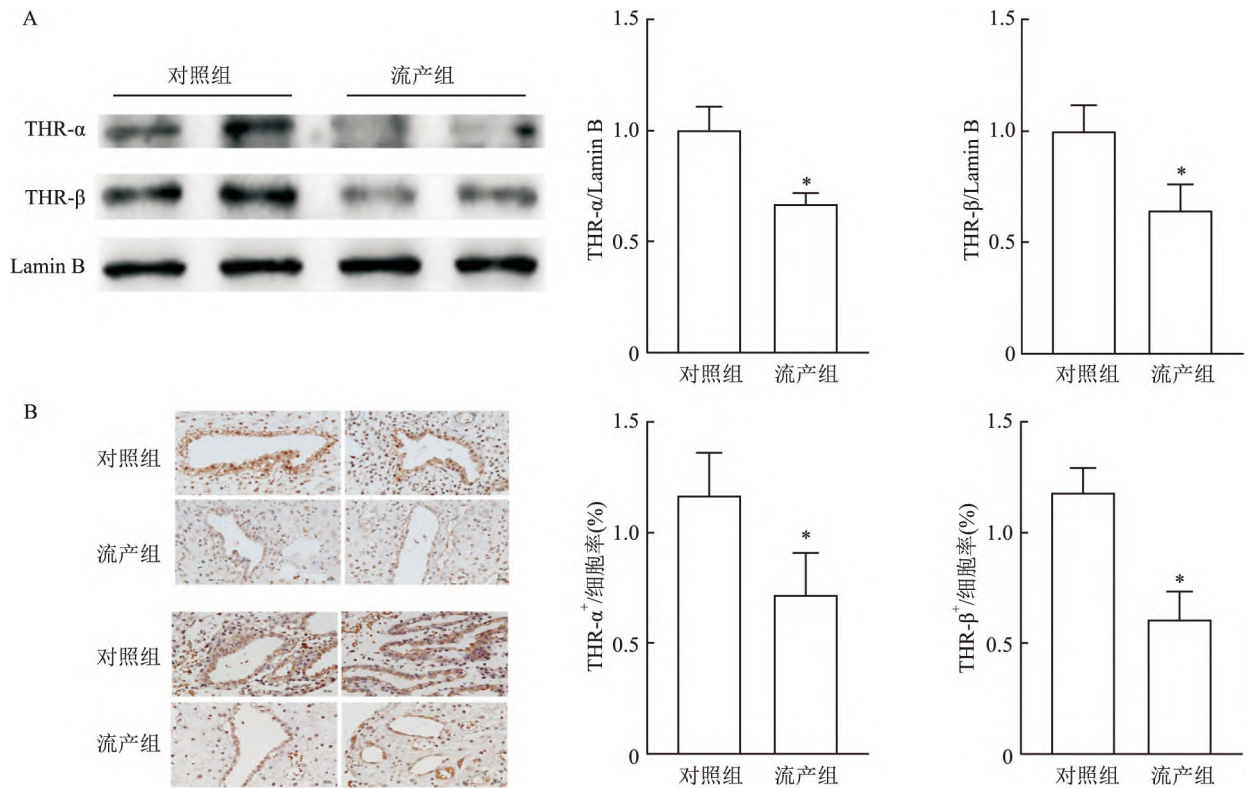


图1 蜕膜组织甲状腺激素受体表达与定位

A: THR-α 和 THR-β Western blot 结果; B: THR-α 和 THR-β 免疫组化结果 ×500; 与对照组比较: * P < 0.05

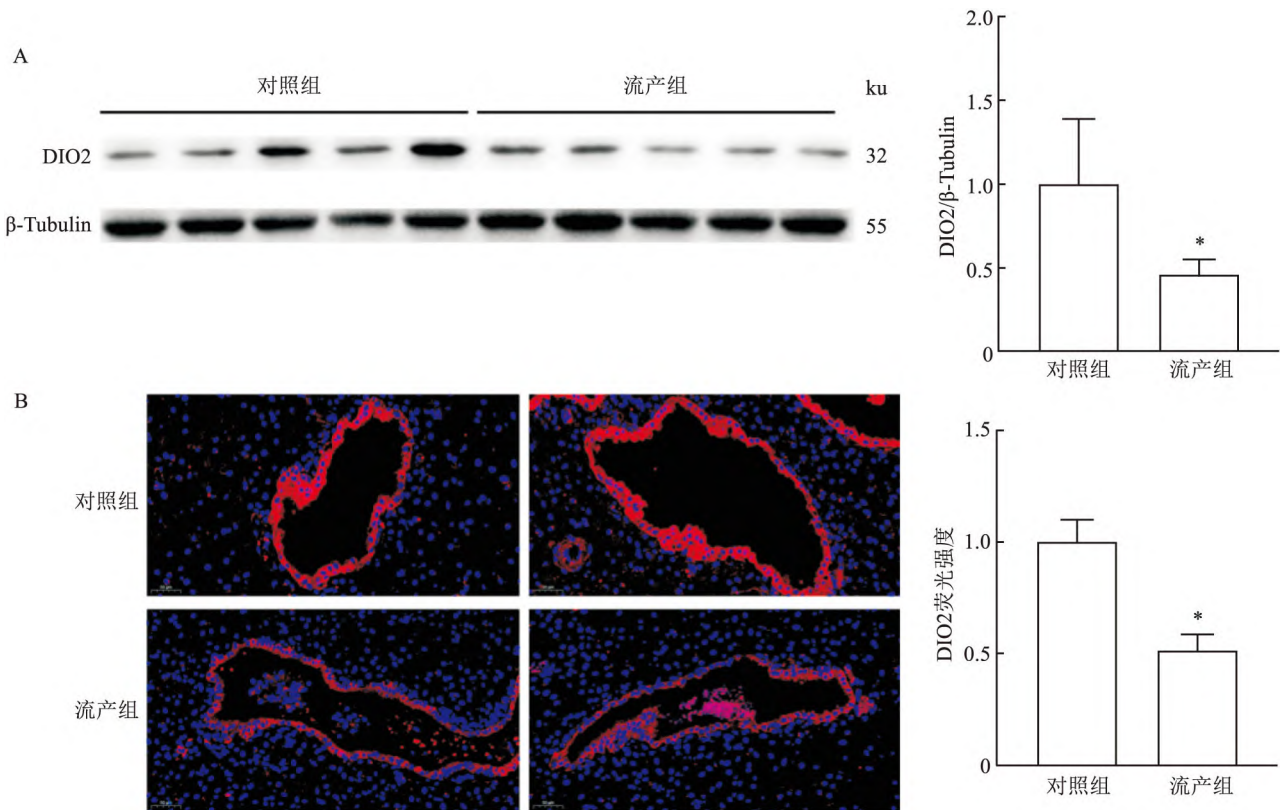


图2 两组蜕膜组织细胞 DIO2

A: DIO2 Western blot 结果; B: DIO2 免疫荧光定位 ×200; 红色: DIO2; 蓝色: DAPI (细胞核); 与对照组比较: * P < 0.05

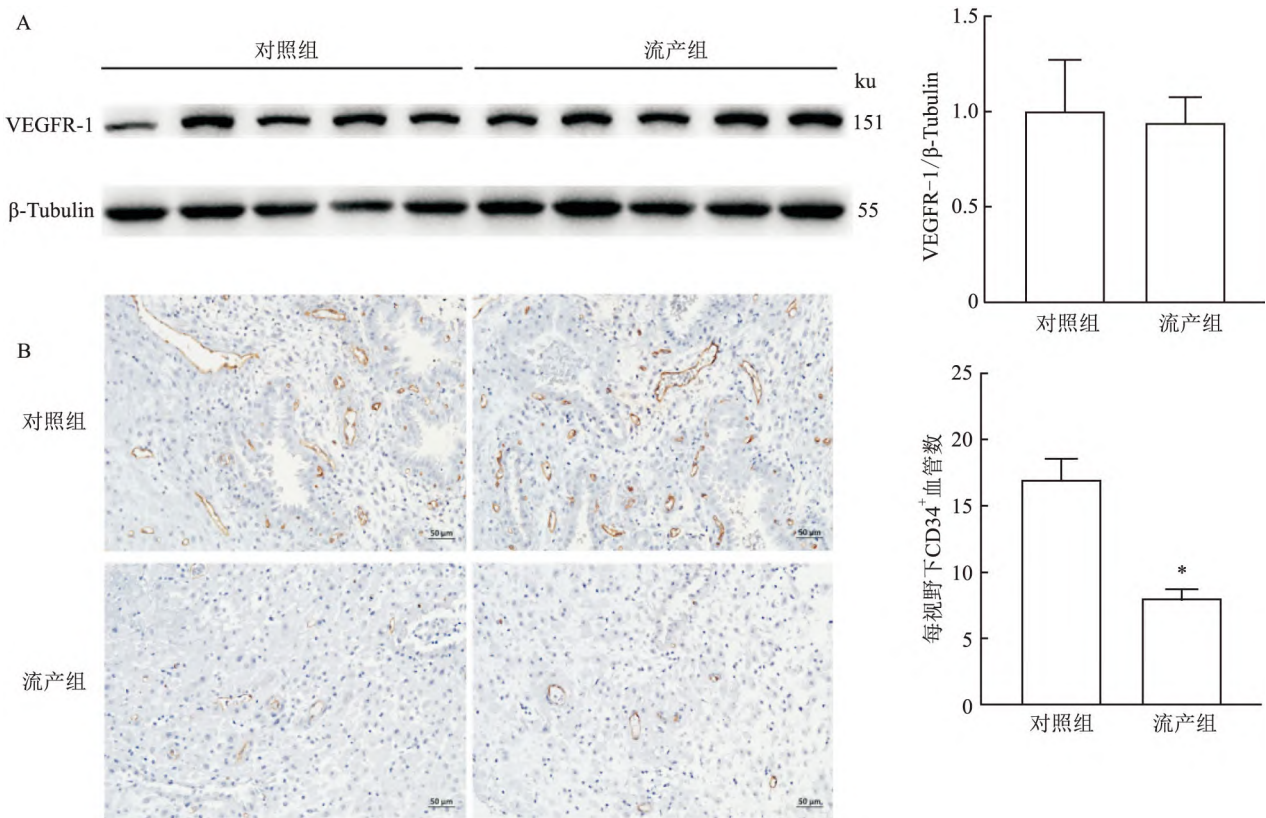


图3 蜕膜组织中血管分布比较

A: VEGFR-1 Western blot 结果; B: CD34 免疫组化结果 $\times 500$; 与对照组比较: * $P < 0.05$

使用 CD34 标记蜕膜中血管生成情况, 显示流产组 DIO2 的表达下降表明甲状腺激素在蜕膜中的代谢及转化受到抑制, THR- α 和 THR- β 的下调也表明甲状腺激素下游调控作用受到抑制。同时观察到蜕膜中血管生成减少, 血管重塑受到抑制, 蜕膜化进程可能受到影响, 从而引发自然流产的发生。

已有研究^[7]表明, 孕期甲状腺功能也同时受到冲击。妊娠期甲状腺激素分泌量较孕前增加 50%; 人绒毛膜促性腺激素与促甲状腺激素有着相似的结构, 可在孕早期使甲状腺功能在短时间内不稳定^[8]。而甲状腺功能减退会导致围生期胎儿死亡风险增加, 且新生儿出生后低体质量、智力发育迟缓、小儿多动症和注意力不集中的概率较普通新生儿升高^[9]。这些都说明甲状腺功能在妊娠期发挥重要作用。妊娠期胎盘中的 DIO2 和 DIO3 大量表达, DIO2 使胎盘中的 T4 转化为三碘甲状腺原酸, DIO3 会使 T4 转化为失活的反式三碘甲状腺原氨酸 (reverse triiodothyronine, rT3)^[10]。甲状腺激素受体经过修饰锚定于核膜, 在与甲状腺激素结合后, 将信号传导至下游通路^[11]。在蜕膜及胎盘中, 活性强且快速生效的 T3 与甲状腺激素受体结合, 发挥甲状腺

激素在蜕膜组织中的局部调节作用。在选择对照组及流产组病例时, 课题组排除了合并有甲状腺功能异常的自然流产妇女, 且两组甲状腺相关指标差异无统计学意义, 后续研究中, 自然流产孕妇的蜕膜中 DIO2 的表达下降, 这可能导致蜕膜细胞中对 T4 的转化减少, 具备活性的 T3 生成受到抑制, 在蜕膜组织中的有效甲状腺激素浓度下降。Western blot 和免疫组化等结果显示, 甲状腺激素受体在流产组中的表达量以及锚定于核膜的量下降, 这可以导致甲状腺激素在甲状腺功能并无病理性异常的情况下, 在蜕膜局部组织中发挥的调节作用减少, 甲状腺激素在蜕膜组织中发挥的作用受到限制。这一结果说明在甲状腺无功能障碍时, 蜕膜局部病变导致的甲状腺激素信号传导阻滞也可能导致蜕膜化的异常。

妊娠期子宫内膜细胞形态及功能发生显著变化, 被转化为蜕膜。蜕膜是妊娠得以继续的基础, 如果受精卵与蜕膜发育分化时间不协调则难以着床^[12]。一项研究^[6]表明甲状腺激素在蜕膜化过程中起到诱导和维持蜕膜的内分泌和特殊细胞形态的作用。此外孕酮信号通路是蜕膜化的关键通路, 而甲状腺激素可使蜕膜细胞的孕酮受体蛋白表达上

升,证实了甲状腺激素在蜕膜化过程中的关键调控作用。蜕膜的血管重塑是蜕膜化的重要过程,一项细胞生物学研究^[13]表明甲状腺素通过整合素 $\alpha v\beta 3$ /蛋白激酶 D/组蛋白脱乙酰酶-5 信号通路增加碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 的表达,促进了血管的生成。本研究将蜕膜中血管丰度作为衡量蜕膜化进展的检测指标,实验显示 VEGFR-1 的表达未受到影响,而免疫组化的结果提示,流产组中通过 CD34 标记的蜕膜血管较对照组明显减少,这一实验结果说明蜕膜化的过程受到抑制。已有研究^[14-15]表明在胎盘中,甲状腺激素受体的表达可调节胎盘血管的发生及形成,课题组推断甲状腺激素在蜕膜化的过程中可以通过非血管生成因子路径调控蜕膜血管的生成和参与螺旋动脉的重塑,在这个过程中如果甲状腺激素功能异常,可导致蜕膜局部血管生成的不足和螺旋动脉重塑异常,从而影响母胎界面的建立,导致自然流产的发生。

参考文献

- [1] Farren J, Jalmbant M, Falconieri N, et al. Posttraumatic stress, anxiety and depression following miscarriage and ectopic pregnancy: a multicenter, prospective, cohort study[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2020, 222(4):367 e361-22.
- [2] Kaku S, Kubo T, Kimura F, et al. Relationship of chronic endometritis with chronic deciduitis in cases of miscarriage[J]. *BMC Womens Health*, 2020, 20(1):114.
- [3] 张哲慧,薛吟霜,何英明,等.早期自然流产胚胎染色体异常的危险因素分析[J]. *安徽医科大学学报*,2022,57(3):443-8.
- [4] Dunk C, Kwan M, Hazan A, et al. Failure of decidualization and maternal immune tolerance underlies uterovascular resistance in intra uterine growth restriction[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 160.
- [5] Garrido-Gomez T, Castillo-Marco N, Cordero T, et al. Decidualization resistance in the origin of preeclampsia[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2022, 226(2S): S886-94.
- [6] Kakita-Kobayashi M, Murata H, Nishigaki A, et al. Thyroid hormone facilitates *in vitro* decidualization of human endometrial stromal cells *via* thyroid hormone receptors[J]. *Endocrinology*, 2020, 161(6): bqaa049.
- [7] Adu-Gyamfi E A, Wang Y X, Ding Y B, et al. The interplay between thyroid hormones and the placenta: a comprehensive review[J]. *Biol Reprod*, 2020, 102(1): 8-17.
- [8] Andersen S L, Knøsgaard L. Management of thyrotoxicosis during pregnancy[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2020, 34(4): 101414.
- [9] Peng C C, Maraka S, Pearce E N. Under and overtreatment with thyroid hormone replacement during pregnancy[J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2022, 29(5): 474-82.
- [10] 吕冬青,杨静.妊娠期甲状腺功能减退症研究进展与展望[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(88): 39-41.
- [11] Mancini A, Segni C D, Raimondo S, et al. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation[J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016: 6757154.
- [12] Ng S W, Norwitz G A, Pavlicev M, et al. Endometrial decidualization: the primary driver of pregnancy health[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11).
- [13] Liu X, Zheng N, Shi Y N, et al. Thyroid hormone induced angiogenesis through the integrin $\alpha v\beta 3$ /protein kinase D/histone deacetylase 5 signaling pathway[J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52(3): 245-54.
- [14] Li X, Yu T, Zhai M X, et al. Maternal cadmium exposure impairs placental angiogenesis in preeclampsia through disturbing thyroid hormone receptor signaling[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 244: 114055.
- [15] Yu Z, Han Y, Shen R, et al. Gestational di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure causes fetal intrauterine growth restriction through disturbing placental thyroid hormone receptor signaling[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 294:1-10.

The influence of abnormal thyroid hormone receptor signal of decidua on decidualization in early pregnancy and its association with the occurrence of miscarriage

Zhai Muxin^{1,2,3}, Li Xuan^{1,2,3}, Yu Tao^{1,2,3}, Zhao Li^{1,2,3}, Yu Zhen^{1,2,3}, Yang Yuanyuan^{1,2,3}

[¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032; ²NHC Key Laboratory of Study on Abnormal Gametes and Reproductive Tract (Anhui Medical University), Hefei 230032; ³Anhui Province Key Laboratory of Reproductive Health and Genetics, Hefei 230032]

Abstract Objective To evaluate the angiogenesis of decidua in spontaneous abortion patients and to investigate the change of thyroid hormone receptor signal expression in decidua in miscarriage patients. **Methods** The decidua of pregnant women was collected. Patients with miscarriage were taken as the experimental group and healthy pregnant women who underwent abortion by social factors were taken as the control group. The nuclear translocation of thyroid hormone receptor α (THR- α) and THR- β in decidua tissues was detected by Western blot method, and the distribution of THR- α and THR- β in decidua tissues was determined by immunohistochemistry. The expression

亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与阿尔茨海默病的相关性临床研究

游孟哲¹,周霞²,尹文文²,万珂²,孙中武²

摘要 **目的** 探讨阿尔茨海默病(AD)进程中,亚甲基四氢叶酸还原酶(*MTHFR*) *C677T* 多态性与疾病的相关性,以及是否受 APOE 基因影响。**方法** 共纳入 74 例 AD 患者、85 例遗忘型轻度认知障碍患者(aMCI)和 81 例健康对照者(HC),检测 3 组血清同型半胱氨酸(Hcy)、叶酸和维生素 B12 水平,以及 *MTHFR C677T* 及 *APOE* 基因型,通过 Logistic 回归分析比较 *MTHFR C677T* 不同等位基因和基因型分别与 aMCI 和 AD 风险之间的关联,以及在不同 *APOE ε4* 亚组中的表现。**结果** AD 组和 aMCI 组的血清 Hcy 水平均较对照组显著升高($P < 0.001$, $P < 0.001$),而 aMCI 组血清叶酸水平较 HC 组明显降低($P = 0.017$)。与 *MTHFR CC*、*CT* 基因型者相比,TT 基因型者的血清叶酸水平明显降低($P =$

0.038),血清 Hcy 水平明显升高($P = 0.002$)。回归分析结果显示:在 *APOE ε4* 非携带者亚组中,*MTHFR TT* 基因型可能增加 aMCI 患病风险($OR = 3.670$, $95\% CI = 1.077 - 12.509$, $P = 0.038$),在 *APOE ε4* 携带者中则无相应表现。**结论** *MTHFR C677T* 多态性可导致血清 Hcy 水平增高和叶酸水平降低。在 *APOE ε4* 非携带者中,*MTHFR TT* 基因型可能增加 aMCI 的患病风险。

关键词 阿尔茨海默病;遗忘型轻度认知障碍;亚甲基四氢叶酸还原酶;同型半胱氨酸

中图分类号 R 741

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1081-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.026

2024-04-13 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202104j07020031)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院康复医学科,合肥 230601

²安徽医科大学第一附属医院神经内科,合肥 230022

作者简介:游孟哲,女,博士,医师;

孙中武,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: sunzhwu@126.com

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的中枢神经系统退行性疾病,遗忘型轻度认知功能障碍(amnesic mild cognitive impairment, aMCI)是介于正常的老年性认知衰退和痴呆之间的一种状态,被认为是 AD 的前驱阶段^[1]。高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinaemia, HHcy)可能在 AD 的发生发展中起到一定作用。正常健康人的同

of Deiodinase 2 (DIO2) in decidua tissues was determined by Western blot. The distribution of DIO2 in decidua tissues was determined by immunofluorescence and the fluorescence intensity was measured. The decidual vessel density was determined by immunohistochemistry using CD34 as an endothelial marker. The protein expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR-1) was detected by Western blot. **Results** There was no significant difference in age, gestation days, TSH, T3, T4 and other basic data between the control group and the abortion group. The results of Western blot showed that the expression levels of THR- α and THR- β protein decreased, and the results of immunohistochemical staining of decidual tissues showed that the nuclear translocation of decidual thyroid hormone receptor in patients with spontaneous abortion decreased ($P < 0.05$). Western blotting results showed that the expression of DIO2 protein in the abortion group was lower than that in the control group, suggesting that thyroid hormone metabolism in decidua of spontaneous abortion pregnant women was affected. The results of immunofluorescence test showed that the fluorescence intensity of DIO2 in the abortion group was weaker than that in the control group ($P < 0.05$). Immunohistochemical CD34 labeling of decidual small blood vessels showed that the number of CD34⁺ blood vessels decreased in the abortion group with statistical difference ($P < 0.05$). Western blot results showed that there was no significant change in VEGFR-1 between the two groups, and the difference between the two groups was not statistically significant. **Conclusion** The abnormal signal of thyroid hormone receptors in decidua may decrease decidua angiogenesis and participate in spontaneous abortion.

Key words miscarriage; decidualization; thyroid hormone receptor