· 实验研究 ·

HPSE 和 Syndecan - 1 与人类早期复发性自然流产关系*

穆雅琴, 刘润花, 朱壮彦, 王健, 刘丽华, 王喜英, 赵富玺

摘　要: 目的　探讨乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)和蛋白聚糖 1(syndecan-1)在人类早期复发性自然流产绒毛组织中的表达及两者与复发性自然流产的关系。**方法**　采用实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)分别检测山西大同地区非意愿性正常妊娠者(35 例)和早期复发性自然流产者(28 例)绒毛组织中 HPSE 和 syndecan-1 的 mRNA 表达水平, 分析探讨两者与自然流产关系。**结果**　HPSE mRNA 在正常妊娠组表达的阳性率为 85.71% (30/35), 明显高于复发性自然流产组的 57.14% (16/28), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而在正常妊娠组 syndecan-1 mRNA 的阳性表达率为 54.28% (19/35), 明显低于复发性自然流产组的 82.14% (23/28), 差异亦有统计学意义($P < 0.05$); HPSE 和 syndecan-1 蛋白表达呈负相关($r = -0.386$, $P < 0.01$)。**结论**　在复发性自然流产中 HPSE 的表达降低, 导致降解细胞外基质能力下降, syndecan-1 表达增高, 影响胚泡植入, 导致自然流产的发生。

关键词: 复发性自然流产; 乙酰肝素酶(HPSE); 蛋白聚糖 1(syndecan-1); 实时荧光定量反转录聚合酶链反应(RT - PCR)

中图分类号: R 714.21　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)05-0606-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-05-19

Association of heparanse and syndecan-1 with human recurrent spontaneous abortion

MU Ya-qin, LIU Run-hua, ZHU Zhuang-yan, et al (*Institution of Immunology, Medical College, Datong University, Datong, Shanxi Province* 037009, China)

Abstract: Objective　To explore the expressions of heparanase (HPSE) and syndecan-1 in the patients with recurrent spontaneous abortion and their relationships with recurrent spontaneous abortion. **Methods**　Real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reation (RT-PCR) was used to detect mRNA of HPSE and syndecan-1 in 35 normal pregnant women and 28 patients with recurrent spontaneous abortion in Datong municipality. Then we analyzed the relationship between the expressions of HPSE and syndecan-1 and recurrent spontaneous abortion. **Results**　The HPSE expression rate (85.71%, 30/35) increased significantly in the normal pregnant group compared to that in the spontaneous abortion group (57.14%, 16/28) ($P < 0.05$); but syndecan-1 mRNA expression was significantly lower in normal group (54.28%, 19/35) than that in spontaneous abortion group (82.14%, 23/28) ($P < 0.05$). The upregulation of HPSE was correlated with the downregulation of syndecan-1 ($r = -0.386$, $P < 0.01$). **Conclusion**　Lower expression of HPSE in human recurrent spontaneous abortion influences the degradation of extracellular matrix, results in the overexpression of syndecan-1 and restraint of the implantion of embryo, and leads to spontaneous abortion.

Key words: recurrent spontaneous abortion; heparanase; syndecan-1; real-time fluorescent quantitative reverse transcription PCR

在早期胚胎的发育过程中, 发生早期自然流产是临床上常见的妊娠并发症。在怀孕早期, 胚泡成功植入子宫是妊娠建立的关键, 其过程中的任何异常均可能影响妊娠而最终导致流产[1]。而子宫细胞外基质的重要组成部分是硫酸乙酰肝素蛋白聚糖, 蛋白聚糖 1(syndecan-1)为其成员之一, 可通过其硫酸乙酰肝素侧链共价结合多种胞外配体, 将细胞微环境成分与细胞骨架结合起来, 调控组织细胞生长、分化、粘附和迁移等行为[2]。目前发现乙酰肝素酶(heparanase, HPSE)是体内唯一可以降解硫酸类肝素蛋白聚糖的酶[3]。目前关于 syndecan-1 和 HPSE 在自然流产中的关系报道较少。本研究采用实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法, 检测大同地区正常妊娠和复发性自然流产妇女流产绒毛组织中 HPSE 和 syndecan-1 mRNA 的表达水平, 研究两者在人类复发性自然流产中作用。

1　对象与方法

1.1　对象　研究病例选自大同市医院 2011—2013 年符合研究条件的门诊及住院患者。纳入标准: (1)正常妊娠组: 自然受孕, 孕周 < 12 周, 非意愿性妊娠。(2)复发性自然流产组: 与同一配偶连续发

* **基金项目**: 陕西省青年科学基金(2010021036 - 4); 国家人口计生委项目(C - 73); 国家自然基金(81170621/H0425); 大同大学大学生创新创业项目(XDC2014119)

作者单位: 山西大同大学医学院免疫研究所, 山西 大同 037009

作者简介: 穆雅琴(1980 -), 女, 山西原平人, 讲师, 硕士, 主要从事生殖免疫研究。

通讯作者: 赵富玺, E-mail: dtyzfx@163.com

数字出版日期: 2015 - 3 - 26 15:06

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150326.1506.001.html

生≥2 次的在妊娠 20 周之前丢失妊娠产物或胎儿(体重≤500 g)的对象。所有对象平素月经规则,近期未服用过激素类药物,夫妇双方染色体检查正常,宫颈分泌物沙眼衣原体、解脲支原体检查阴性,生殖内分泌激素测定正常,抗磷脂抗体和抗核抗体等自身免疫抗体阴性,男方精液常规检查正常或治疗后恢复正常[4]。排除标准:(1)心、肝、肾、脑、盆腔等各种急慢性疾病等。(2)遗传性疾病。(3)免疫性疾病、血液病和内分泌疾病。(4)恶性肿瘤。(5)妇科器质性病变和宫颈解剖结构异常者。(6)癫痫等神经性疾病。(7)年龄 >40 岁者。最终入选非意愿性正常妊娠者流产绒毛组织 35 例(正常妊娠组),早期复发性自然流产者流产绒毛组织 28 例。正常组孕妇平均年龄(28.1 ±4.3)岁,平均孕周为(8.6 ±2.3)周,B 超证实胎儿发育正常,既往无不良妊娠史。自然流产组孕妇平均年龄(29.6 ±3.7)岁,平均孕周(9.1 ±3.5)周。2 组年龄、孕周等一般资料差异无统计学意义。本研究所有对象均签署知情同意书。

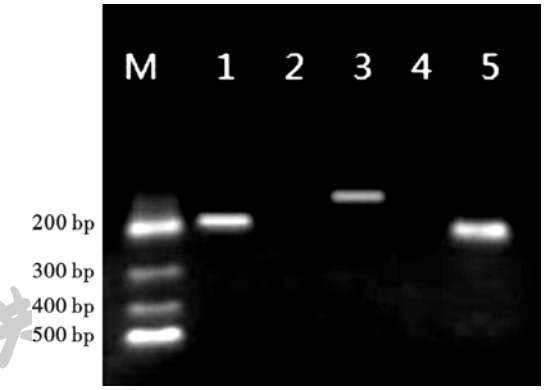
1.2　*主要试剂与仪器*　RNA 提取试剂 Trizol Reagent(美国 Invitrogen 公司),M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒、热启动荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Green Ⅰ染料法)(上海生工生物工程有限公司),引物(上海生工生物工程有限公司),FTC -3000 实时荧光定量 PCR 仪(加拿大 FUNGLYN 公司),IQ300 凝胶成像系统(美国 GE 公司)。

1.3　*方法*　新鲜组织标本经液氮速冻后 -80 ℃保存。反转录实时 PCR 实验参照文献[5],扩增 50 个循环。Syndecan-1 产物大小为 128 bp,上游引物为 5′-GGGACTCAGCCTTCAGACAG-3′,下游引物为 5′-CTCGTCAATT TCCAGGAGGA-3′。HPSE 扩增产物为 180 bp,上游引物为 5′-CACAAAC ACTGACAATCCAAGG-3′,下游引物为 5′-CCATTGAGTTGGACAGATTTGG-3′。β-actin 扩增片段为 218 bp,上游引物为 5′-CAAAGACCTGTACGCCAACAC-3′,下游引物为 5′-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3′。HPSE 和 syndecan-1 mRNA 表达阳性的标本荧光定量扩增曲线呈 S 型,电泳时分别在 128 bp 和 180 bp 处出现条带;HPSE 和 syndecan-1mRNA 表达阴性的标本荧光定量曲线呈不规则波浪状,电泳时未见特异性条带。

1.4　*统计分析*　实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 或率(%)表示,采用 SPSS 17.0 软件进行分析,组间比较采用 χ^2 检验和 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　*绒毛组织中 HPSE 和 syndecan-1 实时荧光定量 PCR 实验结果(图 1)*　RT-PCR 发现,在正常妊娠的绒毛组织中 HPSE 阳性表达率为 85.71%(30/35),明显高于自然流产组的 57.14%(16/28),差异有统计学意义($\chi^2=6.445$,$P=0.011$)。在正常妊娠的绒毛组织中 syndecan-1 的阳性表达例数为 19 例,阳性率为 54.28%,而自然流产组的阳性例数为 23 例,阳性率为 82.14%,2 者之间差异有统计学意义($\chi^2=5.432$,$P=0.020$)。



注:M:Marker(500bp);1:HPSE DNA(180 bp)在正常妊娠绒毛组织中的阳性表达;2:HPSE DNA(180 bp)在自然流产绒毛组织中的阴性表达;3:syndecan-1 DNA(128 bp)在自然流产绒毛组织中的阳性表达;4:syndecan-1 DNA(128 bp)在正常妊娠绒毛组织中的阴性表达;5:β-actin(218 bp)在正常妊娠中的阳性表达。

图 1　不同绒毛组织中 HPSE 和 syndecan-1 RT-PCR 扩增产物电泳图

2.2　*绒毛组织中 HPSE 和 syndecan-1 相关性分析*　经 Spearman相关性分析发现,HPSE 和 syndecan-1 相关系数 $r=-0.386$,$P=0.000$,2 者呈负相关关系。

3　讨　论

复发性自然流产是一种妊娠期常见的并发症,占全部妊娠的 0.4% ~0.8%[6],其病因复杂多样,与患者自身的遗传、解剖、内分泌、免疫、感染等因素有关,但仍有部分原因不明[7]。胚泡在子宫内膜的植入开始于滋养层细胞和子宫内膜之间直接的细胞接触,这一过程与细胞外基质重建有密切关系。syndecan-1 为跨膜硫酸乙酰肝素聚糖蛋白家族的成员,可以通过促进细胞 - 基质和细胞 - 细胞黏附来阻止细胞脱落和侵袭[8]。HPSE 是新近发现的哺乳动物体内唯一能降解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的一种 β-D-葡萄糖醛酸内切酶,已被证实在许多组织和细胞中发现[3,9]。本研究结果表明,在正常妊娠组的绒毛组织中有大量 HPSE 表达,而复发性自然流产组的绒毛中 HPSE 表达较弱。而在正常妊娠组中的 syndecan-1 表达率明显低于自然流产组,两者呈负相关。实验结果表明,在正常妊娠过程中,HPSE 在绒毛组织中大量表达,可以破坏细胞外基质和基底膜的结构和完整性,降解细胞外基质的组成部

分——syndecan-1，降低其保护作用，有利于胚胎植入子宫内膜；同时还可以释放一些相关因子调节细胞生长，促进滋养层细胞侵入、血管生成和组织重建，为胚胎组织的植入、生长、滋养层细胞的浸润和胎盘血管的形成奠定物质基础，从而促进胚泡的植入和胎儿的成长。有研究表明，在转基因小鼠中，HPSE 高表达可导致胚胎植入数量的大幅度增加[10]。体外研究表明，大量 HPSE 可提高胚胎的植入数量、促进胚胎的生长[11]。本研究在人类妊娠的过程中进一步证实了 HPSE 对于胚胎植入的重要性。Reiland 等[12]通过体外化学侵袭实验证实了外源性 syndecan-1 的存在可抑制乙酰肝素酶调节的黑色素瘤细胞的侵袭性行为，进一步证明了 HPSE 与 syndecan-1 之间的负相关关系。但在复发性自然流产中，HPSE 的低表达导致细胞外基质不能充分降解，出现了 syndecan-1 高表达，子宫内膜细胞外基质结构紧密，不利于滋养层细胞植入；同时通过裂解硫酸乙酰肝素蛋白聚糖产生的细胞因子少，使得血管生长和细胞分裂受到抑制。而且胚胎作为一个半同种移植物，正常情况下会在母胎界面诱发免疫耐受，保护胎儿，而 HPSE 的减少也会影响对 *T* 细胞免疫耐受的形成，从而增强母胎界面细胞免疫的发生[13-14]，导致流产的发生。这些研究结果与本研究结论一致。

综上所述，本研究认为 HPSE 的低表达及 syndecan-1 的高表达均与自然流产的发生有关。因此联合检测 HPSE 和 syndecan-1 可以更好地了解植入与胚胎生长的有关分子机制，将有助于进一步指导早期自然流产的治疗。

参考文献

[1] 金素娟，叶平，黄斌，等. 早期自然流产的卵黄囊大小及形态变化与早孕流产关系[J]. 中国公共卫生，2012，28(7)：970－972.

[2] Teng YH, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease[J]. Matrix Biol, 2012, 31(1): 3－16.

[3] Kirn-Safran CB, D′Souza SS, Carson DD. Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2008, 19(2): 187－193.

[4] 安宏亮，江海燕，张劲丰，等. Logistic 回归联合 ROC 曲线分析对不明原因复发性自然流产的血栓前状态的诊断价值[J]. 中国妇幼保健，2013，28(20)：3303－3307.

[5] 穆雅琴，刘润花，朱壮彦，等. 乙酰肝素酶在人类自然流产中的作用研究[J]. 现代预防医学，2013，40(21)：3958－3960.

[6] Wramsby ML, Sten LS, Bremme K. Primary habitualabotion are associated with high frequency of factor V leiden mutation[J]. Fertil Steril, 2000, 74: 987－991.

[7] Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage[J]. Lancet, 2006, 368(9535): 601－611.

[8] Teng YH, Aquino RS, Park PW. Molecular functions of syndecan-1 in disease[J]. Matrix Biol, 2012, 31(1): 3－16.

[9] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrinproteoglycan and growth factor receptor[J]. Endocrinol, 2011, 209(2): 139－151.

[10] Zcharia E, Metzger S, Chajek-Shaul T, et al. Transgenic expression of mammalian heparanase uncovers physiological functions of heparan sulfate in tissue morphogenesis vascularization and feeding behavior[J]. Faseb J, 2004, 18(2): 252－263.

[11] Revel A, Helman A, Koler M, et al. Heparanase improves mouse embryo implantation[J]. Fertil Steril, 2005, 83(3): 580－586.

[12] Reiland J, Sanderson RD, Waguespack M, et al. Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion[J]. J Biol Chem, 2004, 279(9): 8047－8055.

[13] Nadir Y, Henig I, Naroditzky I, et al. Involvement of heparanase in early pregnancy losses[J]. Thromb Res, 2010, 125(5): e251－e257.

[14] Riaz A, Ilan N, Vlodavsky I, et al. Characterization of heparanase-induced phosphatidylinositol 3-kinase-AKT activation and its integrin dependence[J]. J Biol Chem, 2013, 288(17): 12366－12375.

收稿日期： 2014－04－30　　（郑新编校）