

子痫前期孕妇血清和胎盘中神经生长因子水平及意义^{*}

郑媛媛, 黄 林, 肖子文^{**}

(贵阳医学院附院 妇科, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 检测神经生长因子(NGF)在子痫前期孕妇血清及胎盘组织中的表达, 探讨其与妊娠期高血压疾病的关系。方法: 收集42例子痫前期孕妇作为实验组, 其中轻度子痫前期(MP)10例, 重度子痫前期(SP)32例, 将30例正常晚期孕妇作为对照组; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定产前及产后血清及产后胎盘组织匀浆中NGF浓度, 免疫组织化学方法测定胎盘组织中NGF表达。结果: 实验组产前血清NGF浓度(ng/L)高于对照组(356.34 ± 81.76 vs 229.23 ± 72.04 , $P=0.000$), SP患者高于MP患者(374.97 ± 81.01 vs 296.73 ± 51.65 , $P=0.005$); 实验组产后血清NGF浓度(ng/L)高于对照组(419.78 ± 100.52 vs 279.44 ± 70.15 , $P=0.000$), SP患者高于MP患者(442.38 ± 104.58 vs 347.45 ± 27.08 , $P=0.007$); 实验组和对照组产后血清NGF浓度均高于产前(419.78 ± 100.52 vs 356.34 ± 81.76 , $P=0.002$; 279.44 ± 70.15 vs 229.23 ± 72.04 , $P=0.008$); 实验组胎盘组织匀浆液中NGF浓度高于对照组(166.46 ± 16.91 vs 134.93 ± 17.84 , $P=0.000$), SP患者高于MP患者(170.82 ± 16.71 vs 152.50 ± 7.55 , $P=0.003$); 胎盘组织免疫组织化学结果显示, NGF在对照组呈低表达或阴性, MP呈中高表达, SP呈高表达, 差异有统计学意义。结论: 子痫前期患者血清和胎盘组织中NGF表达增高, 重度子痫前期患者NGF增高更明显, 提示NGF在子痫前期病情发展过程中可能起到一定作用, 其表达水平与病情严重程度有关。

[关键词] 子痫; 孕妇; 神经生长因子; 血清; 胎盘

[中图分类号] R714.245 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)03-0324-04

Determination of Nerve Growth Factor in Serum and Placenta of Preeclampsia Women and Its Significance

ZHENG Yuanyuan, HUANG Lin, XIAO Ziwen

(Department of Obstetrics and Gynecology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To detect the expression of nerve growth factor (NGF) in serum and placenta of preeclampsia patients, and to reveal the relationship between NGF and hypertensive disorder complicating pregnancy (HDCP). **Methods:** Forty-two cases of preeclampsia served as experimental group including 32 cases with severe preeclampsia (SP) and 10 cases with mild preeclampsia (MP), and 30 normal pregnant women served as control group. The NGF levels in serum and placental tissue homogenate were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) before and after delivery. The expression of NGF in placenta tissue was detected by immunohistochemistry. **Results:** The serum NGF levels in the experimental group were significantly higher than those of control group before and after delivery, and those of SP were significantly higher than MP; The serum NGF levels after delivery were notably higher than those before delivery in the two groups; The NGF levels in placental tissue homogenate in the experimental group were significantly higher than those of control group, NGF levels of SP

^{*} [基金项目] 贵州省科学技术基金项目[黔科合J字(2007)20107]

^{**} 通信作者 E-mail: xzwe@hotmail.com

网络出版时间: 2014-06-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140623.0011.023.html>

were significantly higher than those of MP; Immunohistochemistry showed that the control group lowly or negatively expressed NGF, MP patients moderately or highly expressed NGF, SP patients highly expressed NGF, the differences were significant. **Conclusion:** NGF levels in serum and placenta of pre-eclampsia patients are increased, and the increase is more obvious in SP patient, which suggest that NGF may be related to the development of HDCP. NGF level is correlated with severity of the disease.

[**Key words**] eclampsia; pregnant women; nerve growth factor; serum; placenta

妊娠期高血压疾病(hypertensive disorder complicating pregnancy, HDCP)是妊娠期孕产妇和围生儿死亡的主要原因,其并发症多、发病率及死亡率高,对患者、家属的身心和社会所造成的影响已引起广泛关注。子痫前期是该病的常见类型和重要发病阶段,占所有孕妇的3%~5%,其病因和发病机制仍不清楚。近年来,通过对多种细胞因子与HDCP关系的研究发现,胎盘形成不良(胎盘绒毛浅着床)与母体基础病变是HDCP的临床病理基础,由此引起的母体血管内皮损害是其中心环节,而胎盘血管重铸障碍致胎盘灌注不足是导致缺氧的关键环节^[1-2]。NGF可调节机体免疫应答,促进血管形成及血管内皮细胞的增殖,在妊娠的子宫内膜中,NGF发挥着促内皮细胞血管生成和对母体自身免疫应答的调节作用,其含量与交感神经分布呈正相关^[3]。邢艳霞等^[4]发现HDCP患者体内的交感神经活性较正常妊娠者增强。本实验通过酶联免疫吸附试验、免疫组织化学方法检测NGF在子痫前期患者产前、产后血清以及胎盘组织中的表达,探讨其与HDCP的关系。

1 资料与方法

1.1 对象 收集2010年6月~2010年11月产科剖宫产分娩的子痫前期孕妇42例为实验组,子痫前期诊断标准参照《妇产科学》(第7版)。轻度子痫前期(MP)10例、重度子痫前期(SP)32例,年龄19~43岁,平均 (30.38 ± 5.49) 岁;妊娠34.7~42.3周,平均 (37.83 ± 1.71) 周。以同期因社会因素行剖宫产分娩的正常晚期妊娠妇女30例为对照组,年龄23~35岁,平均 (29.33 ± 2.86) 岁;妊娠37.2~41.1周,平均 (38.39 ± 1.12) 周。实验组与对照组、SP与MP组患者年龄差异无统计学意义,所有对象均为单胎初产妇,既往无原发性高血压、糖尿病、慢性肾炎、心脏病、甲状腺功能亢进等病史,无吸烟史及其他妊娠合并症及并发症。所有操作均取得孕妇知情同意。

1.2 取材 采集两组产妇分娩前1周内、产后48 h空腹时外周静脉血各3 mL,4℃ 3 000 r/min

离心20 min,取血清于-80℃低温冰箱保存,用于检测NGF含量。胎盘娩出后30 min内,直视下于胎盘中央带(脐带附着部的对侧母体面,避开出血、梗死、钙化区)取1 cm×1 cm×1 cm胎盘组织2块,1块置于10%中性福尔马林液中固定48 h,常规石蜡包埋3~4 μm切片HE染色,镜下观察组织结构 and 细胞形态;1块置于盛有已预冷的PBS的容器中,漂洗、滤纸吸干,称重、剪碎,按1:10(质量:体积)加入匀浆液(50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% Triton X-100, pH 8.0)、PMSF(100 mmol/L),4℃ 3 000 r/min离心20 min,取上清液于-80℃低温冰箱保存,用于检测NGF含量。

1.3 血清及胎盘组织中NGF测定 采用酶联免疫吸附法检测血清及组织匀浆液的NGF浓度(敏感度1.0 ng/L),实验步骤严格按照试剂盒(美国GBD公司)说明进行。以标准品的OD值为纵坐标(Y轴),标准品的浓度为横坐标(X轴),绘制标准曲线,进行曲线拟合,得出标准曲线方程,然后根据此方程计算样品的NGF含量。

1.4 检测胎盘组织中NGF表达 取得的胎盘组织3~4 μm切片HE染色,镜下观察组织结构和细胞形态;脱蜡,梯度酒精水化,高压修复,滴加1:150的一抗NGF多克隆抗体(武汉博士德),4℃冰箱过夜。第2天按PV-6001试剂盒(北京中杉金桥)说明滴加二抗,DAB镜下显色;苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以磷酸盐缓冲液代替一抗,作为阴性对照,以神经鞘瘤为阳性对照,观察阳性反应。以细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒为其阳性判断标准,所有切片由2名观察者独立盲法阅片,按阳性细胞表达强度及阳性细胞数的百分比来计算评分。随机选择10个高倍镜视野(×400)进行判断,阳性细胞的表达强度按无表达、浅黄色、浅棕色、棕黄色、棕褐色分别计0、1、2、3、4分,阳性细胞百分比按无表达、1%~15%、16%~50%、51%~85%、86%~100%分别计0、1、2、3、4分,按公式计算阳性指数=(阳性细胞表达强度×阳性细胞百分数)/2。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 10.0 软件分析所有数据,计量资料进行正态性检验,采用($\bar{x} \pm s$)表示;计量资料两两比较采用独立样本 t 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准。

2 结果

2.1 血清 NGF 水平 实验组产前及产后血清 NGF 浓度高于对照组 ($P = 0.000$ 、 $P = 0.000$),SP 患者高于 MP 患者($P = 0.005$ 、 $P = 0.007$);实验组产后血清 NGF 浓度高于产前($P = 0.002$),对照组产后血清 NGF 浓度高于产前($P = 0.008$),见表 1。

表 1 两组孕妇血清 NGF 比较
Tab.1 Comparison of serum NGF levels between the two groups

组别	n	NGF(ng/L)	
		产前	产后
实验组	42	356.34 ± 81.76	419.78 ± 100.52
SP 组	32	374.97 ± 81.01	442.38 ± 104.58
MP 组	10	296.73 ± 51.65	347.45 ± 27.08
对照组	30	229.23 ± 72.04	279.44 ± 70.15

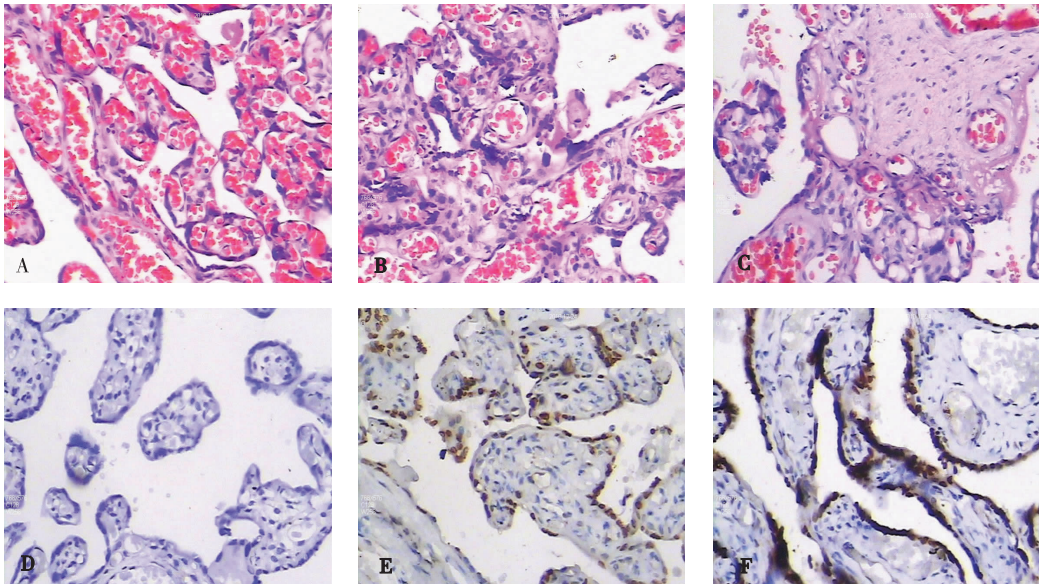
2.2 胎盘组织匀浆中 NCF 表达 实验组胎盘组织匀浆液 NGF 浓度高于对照组($P = 0.000$),SP 患者胎盘组织匀浆液 NGF 浓度高于 MP 患者($P = 0.003$),见表 2。

2.3 胎盘组织病理检查及 NGF 表达 HE 染色镜

下见对照组胎盘组织结构正常,绒毛发育成熟,各级绒毛结构清楚,绒毛血流灌注正常;螺旋动脉发育成熟,滋养叶细胞浸入正常。MP 患者绒毛发育基本成熟,中间绒毛轻度减少,绒毛血流灌注轻度减少,少量终极绒毛轻度纤维化,小灶性胎盘梗死,滋养叶细胞轻度增生;SP 患者中间绒毛、绒毛血流灌注明显减少,螺旋动脉发育基本成熟,滋养叶细胞浸入明显减少,部分终极绒毛纤维化明显,灶性胎盘梗死,滋养叶细胞明显增生。免疫组化标记 NGF 阳性表达定位于滋养细胞的细胞核和细胞浆,在正常组、实验组胎盘组织中均有表达,对照组呈低表达或阴性,MP 患者呈中高表达,SP 患者呈高表达,见图 1。实验组胎盘组织中 NGF 表达阳性指数高于对照组($P = 0.000$),SP 患者胎盘组织中 NGF 表达阳性指数高于 MP 患者($P = 0.004$),见表 3。

表 2 两组产妇胎盘组织匀浆液中 NGF 比较
Tab.2 Comparison of NGF levels in placental tissue homogenate between the two groups

组别	n	NGF(ng/L)
实验组	42	166.46 ± 16.91
SP 组	32	170.82 ± 16.71
MP 组	10	152.50 ± 7.55
对照组	30	134.93 ± 17.84



A 为对照组,B 为轻度子痫前期,C 为重度子痫前期,D 为对照组,E 为轻度子痫前期,F 为重度子痫前期
图 1 各组产妇胎盘组织(Envision, × 200)

Fig.1 Immunohistochemical images of placenta tissue of patients in each group

表 3 两组产妇胎盘组织中 NGF 表达
Tab. 3 Compasion of expression of NGF in
placenta tissue between the two groups

组别	n	NGF 阳性指数
实验组	42	6.02 ± 1.57
SP 组	32	6.39 ± 1.52
MP 组	10	4.85 ± 1.08
对照组	30	3.77 ± 1.39

3 讨论

HDCP 是导致母儿围产期死亡率增加的重要因素之一。研究认为,HDCP 是由血管内皮细胞受损、组织缺血缺氧或免疫抑制等多种因素共同作用引起的一种妊娠期特有疾病。机体在发生缺血缺氧、血管内皮细胞受损时,NGF 分泌反应性升高,以改善缺血组织血供、促进血管内皮细胞增殖,故 NGF 是一种具有保护性作用的神经营养因子。

本研究用两种方法检测到妊娠妇女胎盘组织中有 NGF 的表达,免疫组化标记阳性表达定位与 Toti 等^[5]的研究结果一致。正常孕妇和子痫前期孕妇的产后血清 NGF 浓度较产前明显增高,这可能与交感神经分布有关。妊娠期间孕妇的交感神经受到抑制,NGF 水平降低;分娩后交感神经抑制被解除,分布较孕期增加,NGF 水平升高。虽然胎盘也是 NGF 的一个来源,但可能 NGF 与交感神经分布变化的关系较为密切,故产后血清 NGF 水平较产前升高。陈耀星等^[6]在对家兔妊娠过程中子宫局部交感神经分布的研究中发现,妊娠组较非妊娠组交感神经分布明显减少,以降低子宫局部免疫水平,使胎儿免受母体排斥。Brauera 等^[7]研究发现,妊娠晚期豚鼠子宫局部的去甲肾上腺素水平明显降低,分娩后其交感神经表达增加,并认为是胎盘激素对宫颈旁神经节产生的短交感神经纤维的选择性影响。

本实验检测了 NGF 在子痫前期患者产前血清和胎盘组织中的表达,发现产前血清及胎盘组织中 NGF 表达均增高,且 SP 较 MP 患者增高更明显。这表明,机体在发生组织缺血缺氧、血管内皮细胞损伤时,为了改善缺血状况、促进血管内皮细胞增殖,NGF 表达应激性升高;SP 较 MP 病情严重,病理生理改变更为明显,NGF 升高则更为明显。

滋养细胞浅着床、胎盘血管重铸障碍致胎盘灌注不足是 HDCP 发病的关键环节,血管内皮损伤与

HDCP 的发生也有关^[8]。Emanuelli 等^[9]用 ELISA 和免疫组化技术证实了内源性的 NGF 可促进局部缺血组织的血管形成,肌肉缺血时,若给予外源性的 NGF,肢体缺血状况明显改善,毛细血管及小动脉的密度明显增多,肌细胞及血管内皮细胞凋亡减少,肢体血运恢复速度加快。反之,若用特异性的抗体阻断 NGF,该自发性的血管生成反应消失,肌细胞凋亡增加。Tanaka 等^[10]发现大鼠主动脉内皮细胞可产生并释放 NGF,从而确认血管内皮细胞是 NGF 的又一重要来源。汤苏阳等^[11]在研究 NGF 对人血管内皮细胞增殖作用的实验中发现,NGF 对人血管内皮细胞有明显的促有丝分裂作用,提示它可能在血管生成方面起着极为重要的作用。本研究结果支持这些学说,子痫前期时,机体 NGF 表达升高可能的发挥其生物保护作用,但由于内源性 NGF 分泌量较少,尚不能阻止子痫前期病情发展。

本实验中子痫前期患者血清及胎盘组织中的 NGF 表达均增高,可能与交感神经活性增强有关。NGF 是典型的靶源性神经营养因子,主要分布在交感神经或感觉神经支配的组织。子痫前期患者由于胎盘缺血,儿茶酚胺分泌(CA)增多,以增加胎盘血流量,但滋养细胞基本病变没有改善,缺血不能纠正,反复恶性循环使交感神经活性增强,NGF 分泌量也随之增多。因此,NGF 可能通过某种机制的介导或调控交感神经元与缺血组织之间的突触传递,产生一系列生物保护效应。

此外,近年来的研究越来越支持妊娠是一种免疫调节偏移过程,即体液免疫增强而细胞免疫受到抑制,Th₁/Th₂ 平衡在这一过程中起着核心调控作用,正常妊娠是一种“Th₂ 现象”^[12]。Th₁/Th₂ 细胞平衡向 Th₁ 漂移,Th₂ 受抑制,即 Th₁/Th₂ 失衡可能是妊娠期高血压疾病发生的重要原因^[13]。研究证明,Th₁ 细胞因子如白细胞介素-1(IL-1)、α-肿瘤坏死因子(TNF-α)、γ-干扰素(IFN-γ)均能诱导 NGF 合成增加。此免疫机制可能也是 HDCP 患者 NGF 表达增高的一个原因。

本组研究发现子痫前期患者产后血清 NGF 水平仍较正常妊娠者增高。子痫前期患者分娩后随着胎盘娩出,缺血缺氧症状较产前有所缓解,但尚不能恢复到正常水平,血管内皮损伤修复也不能立即完成。分娩后其交感神经抑制被解除,因此,受损的血管内皮细胞、活性增强的交感神经均可分泌

(下转第 332 页)

- 白原 B 链基因多态性与狼疮性肾炎肾小球微血栓的关系[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002(1):1-5.
- [17] Renner W, Cichock L, Forjanics A, et al. G-455A polymorphism of the fibrinogen beta gene and deep vein thrombosis[J]. Eur J Clin Invest, 2002(10):755-758.
- [18] Camilleri RS, Cohen H. No association between pulmonary embolism or deep vein thrombosis and the -455G/A beta-fibrinogen gene polymorphism[J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2005(3):193-198.
- [19] 孙利伟, 赵艳玲, 邓琳非, 等. 小儿反复呼吸道感染与纤维蛋白原基因多态性的关系[J]. 中国实验诊断学, 2007(1):99-101.
- [20] 杨芳, 严芝强, 祝丽丽, 等. 纤维蛋白原 β -455G/A 基因多态性与大肠癌相关性研究[J]. 医学研究生学报, 2013(26):1064-1067.
- [21] De Mast MP, Kastelein JJ, Jukema JW, et al. -455G/A polymorphism of the beta-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for all acute-phase reaction pattern of fibrinogen. REGRESS group[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998(2):265-271.
- [22] Cook DG, Cappuccio FP, Atkinson RW, et al. Ethnic differences in fibrinogen levels: the role of environmental factors and the beta-fibrinogen gene. Am J Epidemiol JT American Journal of Epidemiology, 2001(5):799-806.
- [23] 李风芹, 刘国勋, 杨志刚, 等. β -纤维蛋白原 -455G/A 基因多态性对缺血性脑卒中患者血浆纤维蛋白原水平的影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2001(2):165-168.
- [24] 翟振国, 王辰, 杨媛华, 等. 纤维蛋白原 β 链启动子区域基因多态性与中国汉族人群市血栓栓塞症相关性的病例对照研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006(2):165-169.
- [25] 李丽红, 鲁继荣. 血浆 Fg BB-455G/A 的 A 基因与小兒 HSP 发病有相关性[J]. 实用儿科临床杂志, 2009(9):109-112.
- [26] 崔国方, 孟竹. 纤维蛋白原基因多态性及血浆纤维蛋白原水平与过敏性紫癜的相关性[J]. 国际脑血管病杂志, 2010(24):677-678.
- [27] 汪丽, 李力. 子痫前期及子痫患者 β -纤维蛋白原 -455G/A 基因多态性与发病的相关性[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012(1):136-138.
- (2014-02-12 收稿, 2014-04-23 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅

(上接第 327 页)

较高量的 NGF, 使其保持在一个较高的水平, 以促进产后的恢复。NGF 生物保护作用的机制、适量的外源性 NGF 是否能阻止子痫前期病情的发展, 是值得期待的下一步研究。

4 参考文献

- [1] 刘慧姝, 张红霞. 子痫前期的病因学新进展[J]. 实用医学杂志, 2006(23):2705-2706.
- [2] Semenza G. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences[J]. Biochem Pharmacol, 2000(1):47-53.
- [3] 李强, 伍亚民. 神经生长因子与血管形成的研究进展[J]. 国外医学外科学分册, 2005(3):220-221.
- [4] 邢艳霞, 余卫平, 任慕兰, 等. HPLC-FD 法检测尿儿茶酚胺[J]. 东南大学学报:医学版, 2004(3):86-89.
- [5] Toti P, Ciarmela P, Florio P, et al. Human placenta and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein[J]. Endocrinol Invest, 2006(29):337-341.
- [6] 陈耀星, 胡满, 王子旭, 等. 妊娠家兔子宫交感神经分布的变化 - HRP 法研究[J]. 中国农业大学学报, 2000(5):113-116.
- [7] Brauer MM, Shockley KP, Chavez R, et al. The role of NGF in pregnancy-induced degeneration and regeneration of sympathetic nerves in the guinea pig uterus[J]. Autonomic Nervous System, 2000(79):19-27.
- [8] 刘霞, 李力, 周元国, 等. 妊娠高血压综合征患者胎盘血管内皮生长因子的表达及意义[J]. 中华妇产科杂志, 2002(1):22.
- [9] Costanza E, Maria BS, Alessandra P, et al. Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs[J]. Circulation, 2002(17):2257-2262.
- [10] Tanaka A, Wakita U, Kambe N, et al. An autocrine function of nerve growth factor for cell cycle regulation of vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004(4):1009-1014.
- [11] 汤苏阳, 陈绍宗, 曹大勇, 等. 神经生长因子对人血管内皮细胞增殖作用的研究[J]. 中国美容医学, 2003(4):353-354.
- [12] Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy[J]. Immunology Today, 1997(10):478-482.
- [13] 王英芳, 乔玉环, 刘广芝. 妊娠期高血压疾病患者外周血和蜕膜 Th₁/Th₂ 失衡的研究[J]. 医药论坛杂志, 2006(18):7-11.
- (2014-02-12 收稿, 2014-04-15 修回)
中文编辑: 潘娅; 英文编辑: 周凌