

HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 在稽留流产患者绒毛组织中的表达

王玲^{1,2} 赵卫东¹

摘要 目的 探讨低氧诱导因子(HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)及 VEGF 受体(VEGFR-1、VEGFR-2)在稽留流产(MA)绒毛组织中的表达及临床意义,探究 MA 发生中低氧对脑血管生成的影响。方法 免疫组化 SP 法检测 35 例 MA 患者(研究组)以及 32 例正常早孕行人工流产者(对照组)绒毛组织的 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 的表达水平,并对结果进行统计分析。结果 研究组与对照组绒毛组织中 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 均有表达。研究组中 HIF-1 α 表达高于对照组($P < 0.05$),VEGF、VEGFR-2 表达明显低于对照组($P < 0.05$)。对照组中 HIF-1 α 与 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 表达呈正相关性($P < 0.05$),研究组中 HIF-1 α 与 VEGF、VEGFR-2 表达呈负相关性($P < 0.05$),与 VEGFR-1 表达无相关性。结论 HIF-1 α 在 MA 绒毛组织中表达上升,通过调节 VEGF、VEGFR-2 基因的转录,胎盘绒毛血管的生成减少,可能是 MA 发生的重要原因。

关键词 稽留流产;低氧诱导因子;血管内皮生长因子;血管内皮生长因子受体

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0227-05

稽留流产(missed abortion, MA)也称过期流产,是指妊娠 20 周之前胚胎或胎儿已死亡滞留宫腔内未能及时自然排出,是自然流产的一种特殊类型。引起 MA 的原因众多,但确切机制尚不明确。在早期妊娠中绒毛膜的绒毛血管化与胚胎发育密切相关,在此过程中血管的缺陷会导致一些并发症。在妊娠早期,胚胎的发育和胎盘的形成本是在一个相对低氧的情况下完成的,低氧对滋养层细胞相关的侵袭和分化过程起重要的调节作用^[1]。许多调节因子如低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、VEGF 受体(vascular endotheli-

al growth factor receptor-1、2, VEGFR-1、VEGFR-2)与早孕胎盘血管的生成和发展关系密切。本研究检测 MA 患者绒毛组织中 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 分子的表达情况及相互关系,从血管生成的角度对 MA 的发生进行研究。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 6 月~2013 年 12 月在安徽省妇幼保健院妇科住院的 MA 患者 35 例为研究组,孕妇年龄 20~35(29.40 \pm 4.52)岁,孕周 7~10(8.40 \pm 2.34)周。筛选标准:①年龄 20~35 岁,胚胎停止发育的时间在停经 7~10 周;② TORCH 检测、抗心磷脂抗体(anticardiolipin antibody, ACA)、抗核抗体(antinuclear antibody, ANA)、抗子宫内膜抗体(endometrial antibody, ENA)检测均为阴性;③本次妊娠期间未服用保胎药物,无毒物接触史;④无原发性高血压、糖尿病、慢性肾炎、甲状腺功能亢进等病史;⑤宫颈分泌物检查支原体、衣原体为阴性。纳入标准:经 B 超及 β -hCG 动态监测证实为 MA。选取因非意愿妊娠在本院门诊要求行人工流产的早孕妇女 32 例为对照组,孕妇年龄 21~36(28.30 \pm 5.53)岁,孕周 7~10(7.90 \pm 2.16)周。筛选标准:月经规律,获取标本前 3 个月未使用过甾体类激素,无异常孕育史,无原发性高血压、糖尿病、慢性肾炎、甲状腺功能亢进等病史。纳入标准:经 B 超检查提示其为宫内妊娠,可见胚胎心血管搏动,但其要求行“人工流产”的健康孕妇。两组患者的年龄、孕产次差异无统计学意义。本研究经研究对象知情同意并签字。

1.2 标本的采集及处理 在无菌条件下采用负压(53.3~66.7 kPa)抽吸方法吸出的绒毛组织,迅速在生理盐水中漂洗后,放入 10% 甲醛固定液固定 24 h,石蜡包埋,制成 4 μ m 厚连续切片,黏附于防脱腊的载玻片。按试剂盒说明书检测 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 的表达。常规 HE 染色法观察两组绒毛及血管形态。

1.3 免疫组织化学检测方法 采用免疫组化 SP 法,按照试剂盒说明书操作。采用辣根酶标记链酶

2014-11-13 接收

基金项目:安徽省科技攻关计划项目(编号:08010302101)

作者单位:¹安徽医科大学附属省立医院妇产科,合肥 230001

²安徽省妇幼保健院产科,合肥 230001

作者简介:王玲,女,硕士研究生;

赵卫东,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: vic-

torzhao@163.com

卵白素免疫组化法。4 μm 厚切片, 60 °C 烤箱过夜后脱蜡至水, 酒精梯度脱水后蒸馏水洗; 加入柠檬酸抗原高压修复, 高压锅冒汽后 2 min, 室温冷却, 3% 的过氧化氢溶液封闭 10 min; 加一抗抗体 4 °C 冰箱过夜, PBS 冲洗; 加生物素标记的二抗, PBS 冲洗; 加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, PBS 冲洗。DAB 显色, 苏木精复染, 脱水透明, 中性树脂封片。用 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.4 实验试剂 兔抗人单克隆抗体 HIF-1α、兔抗人单克隆抗体 VEGF、兔抗人单克隆抗体 VEGFR-2 原液、三步法免疫组化试剂均购自北京中杉金桥公司; 兔多克隆抗体 VEGFR-1 原液购自武汉博士德公司。

1.5 结果判定 每张切片随机选取 5 个视野(× 400), 镜下见黄色颗粒为阳性细胞, 阳性产物应分布于细胞质。依照细胞阳性着色程度(抗原含量) 可分为: 无着色(0 分), 淡黄色颗粒(1 分), 浅褐色颗粒(2 分), 深褐色颗粒(3 分)。着色细胞数以每张切片阳性细胞占细胞总数的百分比表示: 没有阳性细胞(0 分), <10% (1 分), 11% ~ 50% (2 分), 51% ~ 80% (3 分), >80% (4 分)。采用积分综合计量, 计算公式为: 总数值 = 着色强度 × 着色细胞数; 整个得分从 0 ~ 12 分, 根据最终得分结果分为 3 个等级: 0 分, 无反应; 1 ~ 4 分, 低表达; >4 分, 高表达。至少随机观察 5 ~ 10 个高倍镜视野^[2]。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法分析, 计量资料同一因子组间的比较采用两组独立样本的 *t* 检验分析, 蛋白表达相关性分析采用 Spearman 秩相关方法, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制相关统计图。

2 结果

2.1 研究组与对照组临床特征 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法分析两组患者年龄、孕周差异无统计学意义。研究组阴道流血明显多于对照组, 组间比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。研究组既往有妊娠史多于对照组, 组间比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 临床特征

项目	研究组	对照组
年龄(岁 $\bar{x} \pm s$)	29.40 ± 4.52	28.30 ± 5.53
孕周(周 $\bar{x} \pm s$)	8.40 ± 2.34	7.90 ± 2.16
阴道流血[<i>n</i> (%)]	28(80)	5(15.63)
既往妊娠 ≥ 1 次[<i>n</i> (%)]	28(80.0)	20(62.5)

2.2 两组绒毛组织中 HIF-1α 与 VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达情况 采用 *t* 检验分析表达情况, HIF-1α 在两组绒毛细胞滋养细胞、合体滋养细胞的细胞质和细胞核、血管内皮细胞周围的间质细胞质中均有表达, 在研究组表达升高, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。VEGF、VEGFR-2 在两组绒毛细胞滋养细胞、合体滋养细胞、血管内皮细胞及周围间质细胞质中均有表达, 在研究组中明显下降, 差异有统计学意义(*P* < 0.05)。VEGFR-1 在两组绒毛细胞滋养细胞、合体滋养细胞质中均有表达, 两组中表达差异无统计学意义。见图 1、2 表 2。

2.3 HIF-1α 与 VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 表达的相关性 采用 Spearman 秩相关方法分析相关性, 对照组中 HIF-1α 与 VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达呈正相关性(*P* < 0.05)。研究组中 HIF-1α 与 VEGFR-2 呈负相关性(*P* < 0.05), 与 VEGFR-1 无明显相关性。见表 3、4。

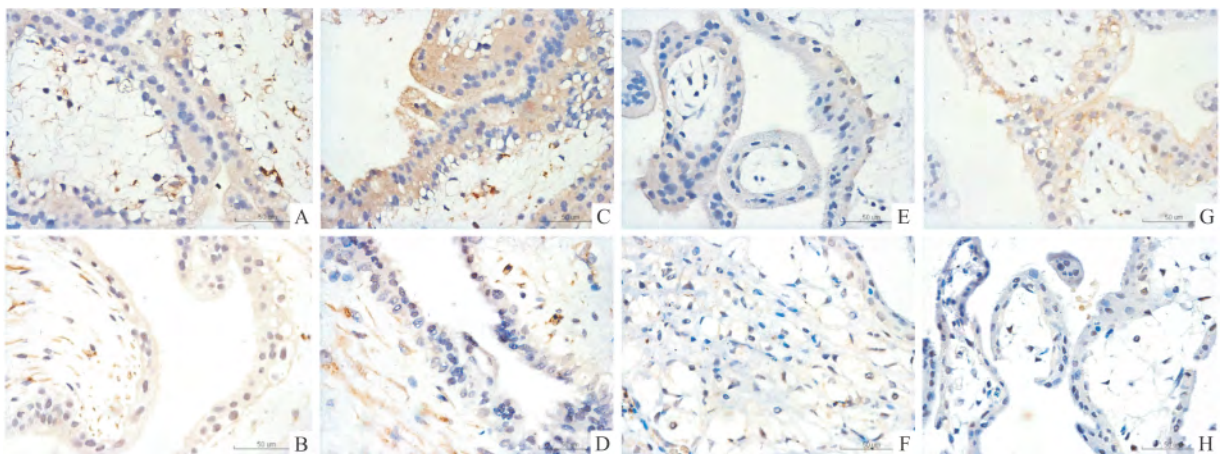


图 1 正常早孕以及 MA 组绒毛组织中 HIF-1α、VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达 SP × 400

A、C、E、G: HIF-1α、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 在对照组中的表达; B、D、F、H: HIF-1α、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 在研究组中的表达

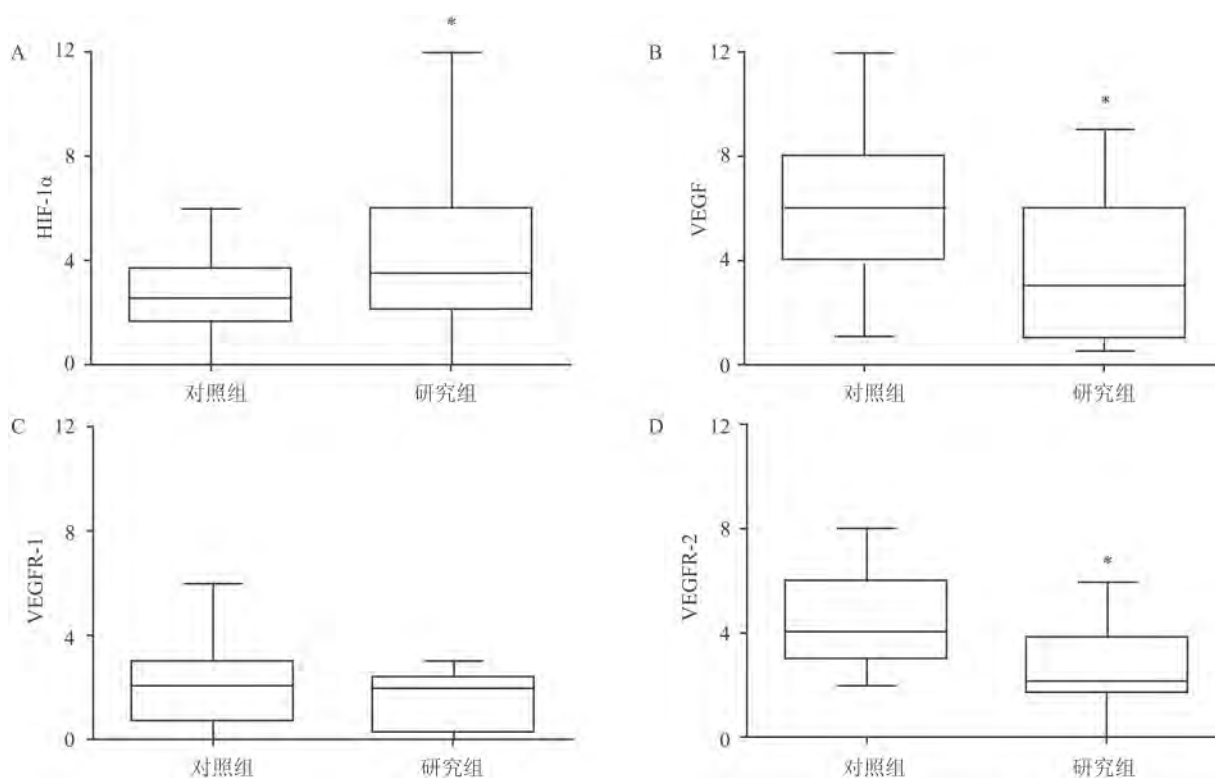


图2 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 在对照组以及研究组绒毛组织的表达统计分析

A: HIF-1 α ; B: VEGF; C: VEGFR-1; D: VEGFR-2; 与对照组比较: * $P < 0.05$

表2 两组中 HIF-1 α 、VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达比较($\bar{x} \pm s$)

因子	对照组 (n=32)	研究组 (n=35)	t 值	P 值
HIF-1 α	2.57 \pm 0.42	3.57 \pm 0.85	2.16	0.043
VEGF	6.14 \pm 0.71	3.14 \pm 1.18	2.47	0.019
VEGFR-1	2.24 \pm 0.40	2.31 \pm 0.27	0.93	0.360
VEGFR-2	4.04 \pm 0.50	1.85 \pm 0.39	3.18	0.003

表3 对照组中 HIF-1 α 与 VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达相关性分析

	HIF-1 α			r_s 值	P 值
	阴性	低表达	高表达		
VEGF					
阴性	2	0	0	0.534	0.002
低表达	3	4	1		
高表达	0	16	6		
VEGFR-1					
阴性	3	4	1	0.381	0.031
低表达	1	14	2		
高表达	1	2	4		
VEGFR-2					
阴性	0	0	0	0.402	0.023
低表达	4	17	2		
高表达	1	3	5		

表4 研究组中 HIF-1 α 与 VEGF、VEGFR-1 和 VEGFR-2 的表达相关性分析

	HIF-1 α			r_s 值	P 值
	阴性	低表达	高表达		
VEGF					
阴性	0	1	4	-0.344	0.043
低表达	2	6	12		
高表达	2	5	3		
VEGFR-1					
阴性	1	4	3	0.162	0.352
低表达	3	8	16		
高表达	0	0	0		
VEGFR-2					
阴性	0	1	5	-0.406	0.015
低表达	1	9	12		
高表达	3	2	2		

3 讨论

HIF 是一种异质二聚体蛋白,由 α 亚基和 β 亚

基构成。HIF-1 α 常氧条件下经过泛素蛋白水解途径降解,低氧环境下其降解过程受抑制,HIF-1 α 蛋白迅速累积,并与 HIF-1 β 聚合,形成有活性的 HIF-1 蛋白,调节其靶基因的转录^[3]。HIF-1 α 特异性作用于低氧反应通路,调节活性。研究^[4]表明 HIF-1 α 可以通过诱导血管生成而发挥作用。本研究显示在研究组及对照组绒毛组织中 HIF-1 α 均有表达,提示早孕低氧下 HIF-1 α 发挥了重要作用。研究^[5]表明,HIF-1 α 上升引起滋养细胞分化为侵入型受抑制,滋养细胞侵入子宫螺旋动脉变浅,胎盘血管灌注

减少引起妊娠失败。本研究表明 HIF-1 α 在 MA 中表达上升,可能与 MA 中严重低氧诱导 HIF-1 α 有关。

VEGF 被认为是最强大的血管生成启动子, VEGFR-1、VEGFR-2 是 VEGF 的两个高亲和力受体; VEGFR-2 是血管生成主要因子,与 VEGF 结合后发挥促进血管生成的作用。研究^[6]显示,敲除 VEGFR-1 基因的小鼠胚胎,内皮细胞过度增生,血管官腔阻塞,形成过多无功能血管,胚胎死亡,提示 VEGFR-1 具有负性调节作用。早孕时血管生成的正负因子处于平衡状态,这个平衡促进血管的生成并维持正常的妊娠。妊娠早期胎盘血管的形成在 VEGF 及 VEGFR-1、VEGFR-2 的指导下进行^[7],研究^[8]也表明早孕胎盘绒毛中 VEGF 及 VEGFR-1、VEGFR-2 在血管生成中起作用。本研究中研究组和对照组绒毛组织中 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 都有表达,且研究组中的 VEGF、VEGFR-2 表达明显低于对照组,提示 MA 中血管生成的正性因子受到抑制,负性因子无明显改变,导致胎盘血管生成减少引起妊娠失败。研究^[9]表明,MA 中 VEGF、VEGFR-2 表达明显下降。

本研究中对照组绒毛组织中 HIF-1 α 与 VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2 呈正相关性,表明低氧通过 HIF-1 α 上调 VEGF 表达,胎盘绒毛血管网络逐渐形成并促进妊娠的继续。研究组中 HIF-1 α 与 VEGF、VEGFR-2 呈负相关性,与 VEGFR-1 无明显的相关性。研究^[10]表明,MA 中 HIF-1 α 表达上升,VEGF 下降,HIF-1 α 与 VEGF 呈负相关性,这与本研究结果一致。为 VEGF 引起 MA 的关键作用的假设提供了支持。推测在 MA 这个严重低氧的环境下,HIF-1 α 表达上升,HIF-1 α 可能抑制了 VEGF 的表达,血管生成的平衡被打破,正性因子减少,负性因子无明显改变,胎盘绒毛血管生成减少,早期胚胎不能获得足够的氧气和营养物质,导致 MA 的发生。

综上所述,低氧程度不同造成 HIF-1 α 、VEGF、

VEGFR-1、VEGFR-2 之间关系失衡引起血管发育的异常可能是造成 MA 的重要原因。MA 中 HIF-1 α 引起 VEGF、VEGFR-2 升高的具体机制有待进一步研究,明确 MA 病因并尽早诊断治疗。

参考文献

- [1] James J L, Stone P R, Chamley L W. The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(2): 137-44.
- [2] Liu L K, Jiang X Y, Zhou X X, et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome [J]. *Mod Pathol*, 2010, 23(2): 213-24.
- [3] Spencer K, Cowans N J, Chefetz I, et al. Second-trimester uterine artery Doppler pulsatility index and maternal serum PP13 as markers of pre-eclampsia [J]. *Prenat Diagn* 2007 27(3): 258-63.
- [4] Pugh C W, Ratcliffe P J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 677-84.
- [5] Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGF β 3 [J]. *J Clin Invest*, 2000, 105(5): 577-87.
- [6] Fong G H, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium [J]. *Nature*, 1995, 376(6535): 66-70.
- [7] Demir R, Seval Y, Huppertz B, et al. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta [J]. *Acta Histochem* 2007, 109(4): 257-65.
- [8] Demir R. Expression of VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2, angiopoietin receptors Tie-1 and Tie-2 in chorionic villi tree during early pregnancy [J]. *Folia Histochem Cytobiol* 2009 47(3): 435-45.
- [9] Cöl-Madendag I, Madendag Y, Altinkaya S Ö, et al. The role of VEGF and its receptors in the etiology of early pregnancy loss [J]. *Gynecol Endocrinol* 2014, 30(2): 153-6.
- [10] Fang Y, Yu S, Ma Y, et al. Association of Dll4/Notch and HIF-1 α -VEGF signaling in the angiogenesis of missed abortion [J]. *PLoS One* 2013, 8(8): e70667.

The expression and significance of HIF-1 α , VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in missed abortion patients

Wang Ling^{1,2}, Zhao Weidong¹

(¹Dept of Obstetrics and Gynaecology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Obstetrics, Anhui Province Maternity and Child Care, Hefei 230001)

Abstract Objective To study the expressions and clinical significance of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α),

组织结构声学定量分析技术评价早期肝硬化的应用价值

李晓金, 郑慧, 王迪, 姚翀, 李朝密, 万颖

摘要 目的 探讨组织结构声学定量分析技术(ASQ)在早期肝硬化(ELC)诊断中的应用价值。方法 收集60例健康志愿者(正常对照组)和40例病理诊断明确的ELC患者(ELC组)的ASQ图像,分析其肝实质的原始回波信号,记录 χ^2 直方图及ASQ相关参数,包括红线众数、红线平均值、红线标准差、蓝线众数、蓝线平均值、蓝线标准差及蓝红曲线下面积比,对各参数绘制受试者工作特征(ROC)曲线并获得界值。结果 红线众数、红线平均值、红线标准差、蓝线众数、蓝线平均值、蓝线标准差及蓝红曲线下面积比在正常对照组与ELC组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。ROC评价显示以上参数的ROC曲线偏左上角,曲线下面积(AUC)均大于0.7,且与AUC = 0.5比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中,蓝红曲线下面积比的AUC大于0.9,其界值为0.10,对应的灵敏度和特异度分别为76%和98.2%。结论

ASQ技术是非侵入性检测ELC的新技术,其相关参数,特别是蓝红曲线下面积比在ELC的定量诊断中有一定的应用价值。

关键词 组织结构声学定量分析技术;早期肝硬化;ROC曲线;超声

中图分类号 R 512.6; R 445.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0231-04

肝硬化是临床常见的慢性进行性肝病,指弥漫性肝脏纤维化伴有异常结节形成,因伴发肝功能衰竭和门脉高压症等表现而容易诊断。早期肝硬化(early liver cirrhosis, ELC)由于缺乏特异性的临床症状,不易早期发现和诊断。近年研究^[1]表明,如果能给予及时有效的病因治疗,可以逆转ELC。因此,确诊ELC对及时干预和逆转其发展具有重要的临床意义。该研究主要应用组织结构声学定量分析技术(acoustic structure quantification technology, ASQ)对肝脏的声学结构进行分析,旨在探讨其在ELC诊断中的应用价值,并结合受试者工作特征(receiver operating characteristic curve, ROC)曲线,确立能准确评价ELC的特异指标及临界值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取2013年6月~2014年7月于安徽医科大学第一附属医院感染科住院并经肝组织

2014-11-03 接收

基金项目:安徽省高校自然科学基金重点项目(编号:KJ2013A166)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院超声科,合肥 230022

作者简介:李晓金,女,硕士研究生;

郑慧,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhenghuiayfysk@163.com

vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) and vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) in the villi tissue of patients with missed abortion (MA) and early pregnant women. To explore the influence of hypoxia on placenta angiogenesis in missed abortion. **Methods** To detect the expression of HIF-1 α , VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in the villi tissue of 35 cases of MA patients (research group) and 32 early pregnant women (control group) who underwent induced abortion surgery by immunohistochemistry, and the results were statistical analysis. **Results** HIF-1 α , VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 were expressed both in the villi tissue of research group and the control group. The expression of HIF-1 α was higher in the research group than in the control group ($P < 0.05$). The expressions of VEGF, VEGFR-2 were significantly lower in the research group than in the control group ($P < 0.05$); the expression of HIF-1 α was positively correlated with VEGF, VEGFR-1 and VEGFR-2 in the control group, and the expression of HIF-1 α was negatively correlated with VEGF and VEGFR-2 in the research group ($P < 0.05$), which had no correlation with VEGFR-1. **Conclusion** The expression of HIF-1 α in the villi tissue of MA is up-regulated, the blood vessel formation of placenta decreases by adjusting the VEGF and VEGFR-2 genes transcription, which maybe is the important causes for MA.

Key words HIF-1 α ; VEGF; VEGFR-1; VEGFR-2; missed abortion