

NLRP1 在胎膜早破患者胎膜及胎盘组织中的表达及其临床意义

李娟^{1,2}, 朱锦明^{2*}

(1. 徐州医科大学研究生学院 2013 级, 江苏 徐州 221004;
2. 徐州医科大学附属徐州妇幼保健院产科, 江苏 徐州 221009)

摘要:目的 通过研究胎膜早破患者胎膜及胎盘组织中 NOD 样受体蛋白 1 (NOD-like receptor protein-1, NLRP1) 的表达情况, 探讨其在胎膜早破发病中可能发挥的作用。方法 选取 2015 年 10 月—2016 年 9 月住院分娩的胎膜早破患者共 60 例, 其中未足月胎膜早破患者 30 例(28 周 ≤ 发病孕周 < 37 周), 足月胎膜早破患者 30 例(发病孕周 ≥ 37 周)。另随机选择同时期无胎膜早破孕妇共 60 例, 根据孕周不同分为未足月对照组(28 周 ≤ 孕周 < 37 周)30 例和足月对照组(孕周 ≥ 37 周)30 例。利用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SP)法检测胎膜及胎盘组织中 NLRP1 的表达情况; 利用反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测胎膜及胎盘组织中 NLRP1 mRNA 的表达水平。结果 NLRP1 主要存在于胎膜上皮细胞和分化程度很低的间充质细胞及胎盘的滋养细胞和合体滋养细胞。足月胎膜早破组胎膜和胎盘组织中 NLRP1 表达强度显著高于其他 3 组($P < 0.05$); 未足月胎膜早破组与未足月对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$); 未足月对照组与足月对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。足月胎膜早破组胎膜及胎盘组织中 NLRP1 mRNA 的表达水平显著高于其他 3 组($P < 0.05$); 未足月胎膜早破组显著高于未足月对照组($P < 0.05$); 未足月对照组与足月对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 NLRP1 在胎盘和胎膜中的表达升高可能与胎膜早破的发生有关; 足月和未足月胎膜早破的发生机制可能不同。

关键词:胎膜早破; NOD 样受体蛋白 1; 胎膜; 胎盘

中图分类号: R714.44 文献标志码: A 文章编号: 2096-3882(2017)10-0648-05

Expression of NLRP1 in the fetal membranes and placenta of patients with premature rupture of membranes and its clinical significance

LI Juan^{1,2}, ZHU Jinming^{2*}

(1. Graduate School, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China;
2. Department of Obstetrics, Xuzhou Maternity and Child Health Care Hospital
Affiliated to Xuzhou Medical Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221009)

Abstract: Objective To investigate the levels of NOD-like receptor protein-1 (NLRP1) in the fetal membrane and placenta of patients with premature rupture of membranes (PROM), and to find out the role of NLRP1 in PROM. **Methods** A total of 60 PROM patients who delivered in our hospital from October 2015 to September 2016 selected, including 30 patients with preterm premature rupture of the membrane (PPROM) (gestational age: 28 to 36 weeks) and 30 patients with term premature rupture of membranes (TPROM) (more than 37 weeks). Meanwhile, another 60 patients without PROM were selected and divided into two groups ($n = 30$): a preterm control group (28 to 36 weeks) and a term control group (more than 37 weeks). The levels of NLRP1 in the placenta and fetal membrane were measured by immunohistochemistry-streptavidin peroxidase method. The amount of NLRP1 mRNA in the placenta and fetal membrane were examined by RT-PCR. **Results** NLRP1 mainly existed in the epithelial cells and mesenchymal cells with little differentiation of the fetal membrane. The TPROM group showed a positive rate of NLRP1 which was higher than those in other groups ($P < 0.05$). The PPRM group and the preterm control group were statistical different ($P < 0.05$). No statistical difference was found between the PPRM group and the term control group ($P < 0.05$). The TPROM group showed a remarkably higher level of NLRP1 mRNA than other groups ($P < 0.05$). The level of NLRP1 mRNA was higher in the PPRM group than that in the preterm control group ($P < 0.05$). No statistical difference was found between

* 通信作者, E-mail: yanchengstudent@163.com

the PPROM group and the term control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The increase of NLRP1 expression in the placenta and fetal membrane may be related to PROM. The mechanisms of PPROM and TPROM might be different.

Key words: premature rupture of membranes; NOD-like receptor protein-1; fetal membrane; placenta

胎膜早破 (premature rupture of membranes, PROM) 是产科常见的并发症, 发生率约占总妊娠人数的 2% ~ 3%^[1], 是引起早产、胎盘早剥、绒毛膜羊膜炎、新生儿呼吸窘迫综合征的主要原因之一, 严重威胁母婴健康和生命安全。据统计, 胎膜早破患者中约 1/3 羊膜腔被微生物感染, 超过半数的胎膜早破患者在分娩时有被感染的组织学征象^[2]。因此, 绝大多数学者认为生殖道感染是导致胎膜早破的重要原因之一^[3]。妊娠期母体激素水平的改变也可导致生殖道感染。目前对于胎膜早破仍缺乏有效的防治手段。

NOD 样受体家族 (NOD-like receptors, NLR) 是一类位于细胞内的模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRR), 能够识别胞内包括细菌在内的“危险信号”分子, 通过识别“危险信号”分子, NLRs 与受体结合后可以激活 caspase-1 等信号通路, 参与免疫应答^[4]。NOD 样受体蛋白 1 (NOD-like receptor protein-1, NLRP1) 是 NLR 家族的一员, 也是最早被发现的炎性体。NLRP1 在炎症反应和抗感染中发挥重要作用, 可以识别病原体后释放 NLRP1 炎性体 (白细胞介素, IL), 后者可以与凋亡相关斑点样蛋白 (ASC) 和 caspase-1、caspase-5 前体分子结合, 形成多蛋白复合物, 从而促进 IL-1 β 、IL-18、IL-33 等炎症因子的成熟和释放^[5]。

已有研究证实: IL-18 与胎膜早破及绒毛膜羊膜炎有关^[6]; 胎膜早破患者血清、羊水中 IL-1 β 的表达量高^[7]。本研究通过检测胎盘和胎膜组织中 NLRP1 的表达情况, 研究其与胎膜早破发生发展的关系, 以期对胎膜早破的防治提供新思路。

1 资料和方法

1.1 一般资料 选择 2015 年 10 月—2016 年 9 月在徐州医科大学附属徐州妇幼保健院产科住院分娩的胎膜早破患者 60 例。其中, 未足月胎膜早破患者 30 例 (28 周 \leq 发病孕周 $<$ 37 周), 年龄 (27.33 \pm 3.49) 岁, 分娩孕周 (34.95 \pm 1.44) 周; 足月胎膜早破患者 30 例 (发病孕周 \geq 37 周), 年龄 (27.32 \pm 4.06) 岁, 分娩孕周 (39.10 \pm 0.89) 周。同期选择无胎膜早破孕妇 60 例, 根据分娩孕周不同分为未足月

对照组 (28 周 \leq 孕周 $<$ 37 周) 30 例和足月对照组 (孕周 \geq 37 周) 30 例。未足月对照组为因宫颈功能不全、子宫或阴道发育异常的早产者, 通过白细胞计数和胎膜的病理检查排除宫腔感染, 平均年龄 (27.46 \pm 3.89) 岁, 平均分娩孕周 (35.13 \pm 1.34) 周; 足月对照组平均年龄 (28.34 \pm 3.68) 岁, 平均分娩孕周 (39.52 \pm 1.08) 周。研究方案获得研究对象本人书面同意, 并经院医学伦理委员会批准。4 组均为单胎妊娠, 剖宫产, 4 组间平均年龄的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 未足月胎膜早破组分娩孕周与未足月对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 足月胎膜早破组分娩孕周与足月对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。4 组孕妇均无妊娠合并症及并发症。胎膜早破组孕妇孕期均存在生殖道感染, 入院时阴道分泌物培养为阳性。

1.2 方法 未足月胎膜早破组在胎膜破裂后 12 h 内注射抗生素以防感染, 足月胎膜早破组未予抗生素处理。剖宫产手术后及时在靠近胎盘中央区域剪取 2 块约为一元硬币大小的胎盘组织和一块指甲大小的胎膜组织, 用 DEPC 水冲洗后迅速投于液氮中, 10 min 后置于超低温冰箱 (-80°C) 保存, 用于提取组织总 RNA。在提取组织总 RNA 时, 以 mRNA 为模板反转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。本实验选择 β -actin 基因作为内参照, NLRP1 和 β -actin 引物由苏州金唯智生物科技有限公司设计合成。同时取硬币大小的胎盘组织 2 块和一块 10 cm \times 5 cm 的胎膜组织, 低温生理盐水 (4°C) 清洗后, 放于 10% 浓度的中性甲醛溶液中固定 24 h, 切片厚度为 4 μm , 用于 SP 法检测。组织中 NLRP1 采用上海康朗生物科技有限公司生产的 SP 试剂盒测量, 参照刘新民等^[8-9] 描述的综合计分法进行半定量分析, 经过 DAB 染色后, 在 400 倍目镜下随机选取 10 个不同的视野, 每个视野计数 100 个细胞, 以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 无着色或与背景颜色一致为阴性细胞。阳性细胞和染色强度的得分见表 1, 最后将阳性细胞率和染色强度所得分相加, 0 ~ 1 分为阴性“-”, 2 分为阳性“+”, 3 ~ 4 分为阳性“++”, 5 ~ 6 分为阳性“+++”。

表1 不同阳性细胞率和染色强度的得分

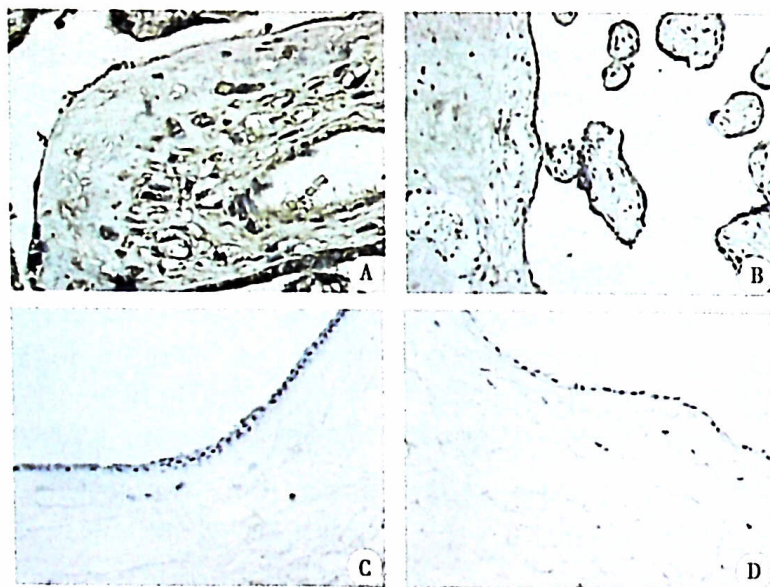
阳性细胞率	染色强度	得分
<5%	无色	0
5%~20%	淡黄色	1
21%~50%	黄色	2
>50%	棕黄色	3

1.3 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,检验数据正态性及方差齐性后,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用独立样本 *t* 检验,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验;多组等级资料比较采用 *H* 检验,组间两两比较采用扩展的 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 4 组胎膜组织 NLRP1 的染色结果 由图 1 可知,NLRP1 蛋白主要存在于胎膜上皮细胞和分化程度很低的间充质细胞。由表 2 可知,4 个组别中,足月胎膜早破组的 NLRP1 表达强度最高,未足月对照组、足月对照组表达强度最低,足月胎膜早破组的表达强度显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$);未足月胎膜早破组同样显著高于未足月对照组、足月对照组 ($P < 0.05$);未足月对照组、足月对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



A. 未足月胎膜早破组;B. 足月胎膜早破组;C. 未足月对照组;D. 足月对照组

图1 NLRP1 蛋白在胎膜组织中的表达(DAB 染色, $\times 400$)

表2 各组胎膜组织 NLRP1 的表达($n=30$,例(%))

组别	-	+	++	+++
未足月胎膜早破组	4(13.33)	7(23.33)	6(20.00)	13(43.34)*
足月胎膜早破组	2(6.67)	4(13.33)	5(16.67)	19(63.33)
未足月对照组	18(60.00)	8(26.67)	3(10.00)	1(3.33)**
足月对照组	17(56.67)	9(30.00)	3(10.00)	1(3.33)**

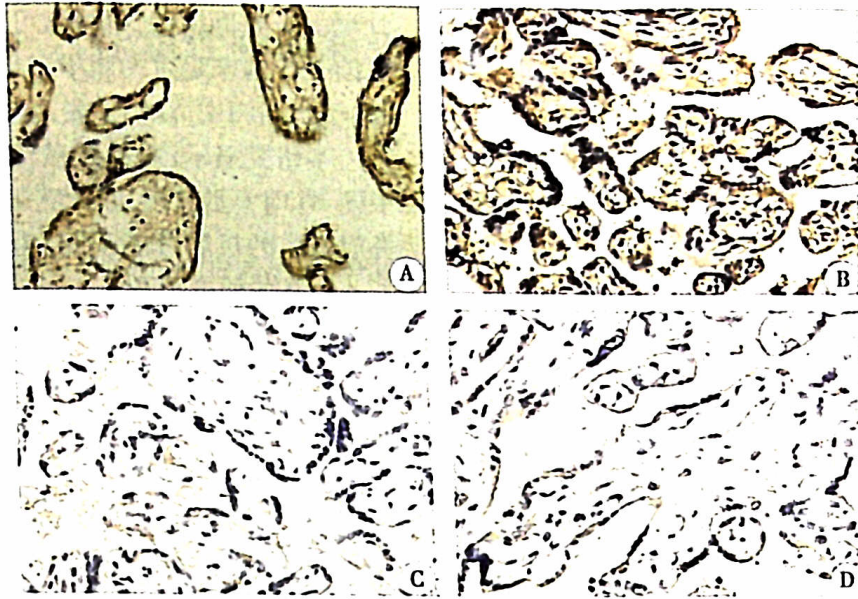
与足月胎膜早破组比较: * $P < 0.05$;与未足月胎膜早破组比较: # $P < 0.05$

2.2 NLRP1 蛋白在胎盘组织中的染色结果 NLRP1 主要定位于胎盘的滋养细胞和合体滋养细胞。与胎盘组织中,足月胎膜早破组 NLRP1 表达强度显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$);未足月胎膜早破组高于未足月对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);未足月对照组与足月对照组差异无统计学意义 ($P >$

0.05)。见图 2、表 3。

2.3 NLRP1 mRNA 在胎膜组织中的表达 见图 3、表 4,NLRP1 mRNA 扩增位点在 152 bp 附近。足月胎膜早破组 NLRP1 mRNA 的表达量显著高于其余 3 组 ($P < 0.05$);未足月胎膜早破组高于未足月对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);未足月对照组与

足月对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

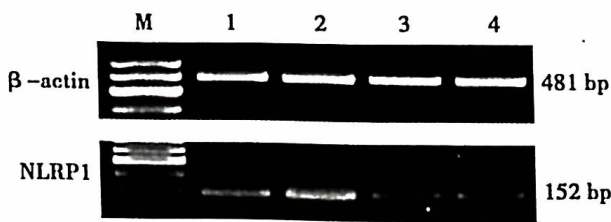


A. 未足月胎膜早破组; B. 足月胎膜早破组; C. 未足月对照组; D. 足月对照组
图2 NLRP1在胎盘组织中的表达(DAB染色, $\times 400$)

表3 各组胎盘组织 NLRP1 的表达($n = 30$, 例(%))

组别	-	+	++	+++
未足月胎膜早破组	5(16.67)	4(13.33)	7(23.33)	14(46.67)*
足月胎膜早破组	1(3.33)	2(6.67)	8(26.67)	19(63.33)
未足月对照组	16(53.33)	11(36.67)	2(6.67)	1(3.33)**
足月对照组	17(56.67)	9(30.00)	3(10.00)	1(3.33)**

与足月胎膜早破组比较: * $P < 0.05$; 与未足月胎膜早破组比较: ** $P < 0.05$



M. marker; 1. 未足月胎膜早破组; 2. 足月胎膜早破组; 3. 未足月对照组; 4. 足月对照组

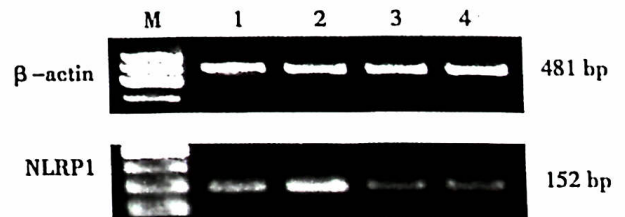
图3 各组胎膜组织中 NLRP1 mRNA 的表达

表4 各组胎膜组织 NLRP1 mRNA 的表达($n = 30, \bar{x} \pm s$)

组别	NLRP1/ β -actin
未足月胎膜早破组	$0.97 \pm 0.12^*$
足月胎膜早破组	1.15 ± 0.13
未足月对照组	$0.52 \pm 0.08^{**}$
足月对照组	$0.45 \pm 0.12^{**}$

与足月胎膜早破组比较: * $P < 0.05$; 与未足月胎膜早破组比较: ** $P < 0.05$

2.4 NLRP1 mRNA 在胎盘组织中的表达 见图4、表5, NLRP1 mRNA 扩增片段同样位于152 bp附近。NLRP1 mRNA 在足月胎膜早破组的表达量显著高于其他3组($P < 0.05$); 未足月胎膜早破组的表达量高于未足月对照组($P < 0.05$); 未足月对照组与足月对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



M. marker; 1. 未足月胎膜早破组; 2. 足月胎膜早破组; 3. 未足月对照组; 4. 足月对照组

图4 各组胎盘组织中 NLRP1 的表达

表5 各组胎盘组织 NLRP1 mRNA 的表达($n=30, \bar{x} \pm s$)

组别	NLRP1/ β -actin
未足月胎膜早破组	0.94 \pm 0.14 [*]
足月胎膜早破组	1.08 \pm 0.12
未足月对照组	0.35 \pm 0.04 ^{*#}
足月对照组	0.40 \pm 0.05 ^{*#}

与足月胎膜早破组比较:^{*} $P < 0.05$;与未足月胎膜早破组比较:[#] $P < 0.05$

3 讨论

胎膜早破是产科的一个难题,对孕产妇及围产儿的健康构成巨大威胁,目前对其缺乏有效的防治措施。已有较多文献报道感染是导致胎膜早破的一个重要原因^[10-11]。病原体感染机体后,其病原相关分子模式被机体特定的 PRR 所识别,启动非特异性免疫应答。PRR 主要分为位于细胞膜上的 Toll 样受体和细胞内的 NLR。NLRP1 是 NLR 家族的一员,其在凋亡相关斑点样蛋白和 pro-caspase-1 等蛋白质的参与下形成 NLRP1 炎性体,调节 caspase-1 的活化,促进细胞因子前体 pro-IL-1 β 、pro-IL-18 和 pro-IL-33 等的切割成熟及 caspase-1 依赖的程序性细胞死亡,诱导细胞在炎性和应激的病理条件下死亡。其参与多种疾病的发生发展,已成为近年来的研究热点。

随着对炎症小体研究^[12]的深入,NLRP1 的通路和表达机制逐渐被确认。如:固有免疫和适应性免疫通过何种机制激活炎症小体;宿主通过自噬作用、干扰素、持久性有机污染物、三结构域蛋白家族(TRIM)、缩小 RNA、NO、泛素化作用以及外源性病毒及药物等负性调控炎症小体,使机体处于促炎和抗炎平衡。

本研究结果显示:NLRP1 主要定位于胎膜上皮细胞和分化程度很低的间充质细胞及胎盘滋养细胞和合体滋养细胞。正常情况下 NLRP1 在胎膜和胎盘上存在量很少,但是在胎膜早破患者中其表达强度显著升高,可能是由于 NLRP1 蛋白参与了胎膜早破的免疫应答。

此外,本研究结果表明:NLRP1 蛋白在未足月对照组和足月对照组中的表达差异无统计学意义,在胎膜和胎盘组织中,未足月胎膜早破组 NLRP1 蛋白表达强度明显低于足月胎膜早破组患者,其在两组患者组织中表达差异可能的原因是 2 个实验组炎症反应的机制不同。

同时,未足月胎膜早破组在胎膜破裂后 12 h 内注射抗生素以防感染,足月胎膜早破组未予抗生素处理。一方面说明,抗生素可能抑制炎症发生,这也可能是导致未足月胎膜早破组和足月胎膜早破组胎膜、胎盘组织中 NLRP1 表达差异的原因之一。

本研究显示:胎膜早破可能使患者胎膜和胎盘中的 NLRP1 蛋白表达升高,未足月与足月胎膜早破炎症反应的机制可能不同,为胎膜早破的防治提供了一个新的研究方向。下一步的研究可以在现有的基础上增加妊娠期已经存在生殖道感染而未发现胎膜早破的患者,研究其胎膜和胎盘的 NLRP1 蛋白表达情况,尝试寻找发生胎膜早破的生理学界值,从而对胎膜早破进行更好的预测和防治。

参考文献:

- [1] Allen SR. Tocolytic therapy in preterm PROM [J]. Clin Obstet Gynecol, 1998,41(4):842-848.
- [2] 戴钟英. 胎膜早破的病因和发病机理[J]. 实用妇产科杂志, 2001,17(1):3-5.
- [3] Mercer BM, Arheart KL. Antibiotic therapy for preterm premature rupture of the membranes [J]. Semin Perinatol, 1996,20(5):426-438.
- [4] Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease [J]. Nat Immunol, 2006,7(12):1250-1257.
- [5] Masters SL, Gerlic M, Metcalf D, et al. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells [J]. Immunity, 2012,37(6):1009-1023.
- [6] 王楠,周昌菊. 胎膜早破孕妇母血、脐血中 IL-6、IL-18 的变化及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,(5):73-74.
- [7] 张丽园. IL-1 β 、COX-2、MMP-2 与胎膜早破的相关性研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2008.
- [8] 刘新民. 妇产科手术学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2003:.
- [9] 何苗,朱锦明,李敏,等. NLRP3 在胎膜早破患者胎膜及胎盘组织中的表达及其临床意义[J]. 徐州医学院学报,2016,36(5):316-320.
- [10] 林胜兰,夏淑琦,叶笑梅,等. 胎膜早破与感染的关系[J]. 温州医学院学报,2009,39(2):170-172.
- [11] Bendon RW, Faye-Petersen O, Pavlova Z, et al. Fetal membrane histology in preterm premature rupture of membranes: comparison to controls, and between antibiotic and placebo treatment [J]. Pediatr Dev Pathol, 1999,2(6):552-558.
- [12] 吴丹,周树生. 炎症小体调控机制的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2015,43(1):59-63.

收稿日期:2017-06-13 修回日期:2017-09-12

本文编辑:李昕