

早孕母胎界面固有模式识别受体 NOD1/NOD2 的表达

聂晓露, 孟丽丽, 张媛媛, 陈慧, 王墨华, 陈欣, 张建平*

(中山大学孙逸仙纪念医院产科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】明确早期妊娠母胎界面中固有模式识别受体 NOD1/NOD2 的表达情况。【方法】分别用免疫组织化学法及 Real-Time PCR 法检测 12 例早孕期绒毛及蜕膜组织中 NOD1/NOD2 表达。【结果】免疫组织化学结果显示绒毛组织中 NOD1/NOD2 主要定位于绒毛滋养细胞胞质中, 蜕膜组织也检测到 NOD1/NOD2 分子的表达。在 mRNA 水平上, 绒毛组织中 NOD1/NOD2 的表达量高于蜕膜基质细胞 (DSC), 分别为 $P = 0.03$ 和 $P = 0.009$; DSC 中 NOD1 的表达量高于 NOD2, $P = 0.029$, 差异具有显著性。绒毛组织中 NOD2 的表达高于 NOD1, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。【结论】NOD1/NOD2 在早孕母胎界面中绒毛组织有表达, 可能参与胚泡的着床。

关键词:母胎界面; 固有免疫; NOD1; NOD2

中图分类号: R71

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)01-0011-05

Expression of Innate Pattern Recognition Receptors NOD1/NOD2 at Materno-Fetal Interface of Early Pregnancy

NIE Xiao-lu, MENG Li-li, ZHANG Yuan-yuan, CHEN Hui, WANG Zhao-hua, CHEN Xin, ZHANG Jian-ping*

(Department of Obstetrics, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To characterize the expression of NOD1/NOD2 at materno-fetal interface. 【Methods】NOD1 and NOD2 expression by villi and decidua were evaluated by immunohistochemistry and real-time PCR ($n = 12$). 【Results】Immunohistochemistry result showed both NOD1 and NOD2 were expressed by villi and decidua at materno-fetal interface, and localized to cytoplasm of trophoblast cells and DSC. On the mRNA level, villi expressed more NOD1/NOD2 than decidual stromal cells (DSC, $P = 0.03$ and $P = 0.009$). DSC expressed more NOD1 than NOD2, $P = 0.029$. The differences were significant. Villi expressed more NOD2 than NOD1, but the difference was not significant ($P > 0.05$). 【Conclusion】Villi and DSC express NOD1/NOD2 at materno-fetal interface of early pregnancy. NOD1/NOD2 maybe participate in plantation of embryo.

Key words: materno-fetal interface; innate immunity; NOD1; NOD2

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2013, 34(1): 11-15]

核苷酸结合寡聚化结构域 (nucleotide-binding oligomerization domain, NOD) 是继 TOLL 家族后发现的又一固有免疫模式识别受体, 是 NLR (NACHT-LRR, NLR) 家族系统的重要成员, 现已发现 NOD 蛋白家族有 20 多个成员, 其中最具代表性的是 NOD1 和 NOD2 蛋白^[1], 是机体固有免疫系统针对非己物质的重要感受器, 可参与机体固有免疫反

应以抵抗外来病原微生物的侵害, 并辅助适应性免疫应答^[1]。2009 年 Tian 等^[2]进一步研究证实, Nod 基因对生殖功能有重要作用。近年来, 研究证实在宫腔内存在着一定数量的, 来自下生殖道的共生菌群。NOD1/NOD2 模式识别受体在共生菌群进入母体蜕膜时, 能够特异性识别细菌细胞壁肽聚糖 (peptidoglycan, PGN) 的降解产物, 促进前炎

收稿日期: 2012-10-18

基金项目: 国家自然科学基金 (81270754, 81170625, 81000259, 30973207, 81070746); 广东省自然科学基金 (10151008901000007, 10451008901004246), 教育部博士点新教师基金 (20090171120075)

作者简介: 聂晓露, 在读硕士研究生, 研究方向: 围产医学, E-mail: niexiaolu1986@163.com; * 通信作者, 张建平, 教授, 博士生导师, E-mail: zjp2570@163.com

症细胞因子及趋化因子等的转录和合成,因此推测其有可能参与胚泡的着床和植入过程,影响早期妊娠的继续和维持^[3]。NOD 分子介导的固有免疫反应亢进,可能影响母胎间的免疫耐受,从而导致一些自身免疫性疾病包括妊娠失败的发生。本研究旨在,明确早期妊娠母胎界面 NOD1/NOD2 的表达情况,以便进一步探索 NOD1/NOD2 参与早期妊娠胚胎着床和发育的调节机制,并为研究其在不明原因复发性流产中的作用提供基础。

1 材料与方 法

1.1 组织标本

2012 年 2 月至 2012 年 6 月,收集复旦大学附属妇产科医院门诊手术室 5~12 周正常妊娠行人工流产的绒毛和蜕膜组织 12 例,年龄 25~35 周岁,既往无自然流产、死胎、死产史、排除染色体、内分泌系统异常、生殖道畸形及感染等相关疾病,B 超提示胚胎发育良好。绒毛组织置于 DMEM-HG 培养液,蜕膜组织置于 DMEM-F12 培养液,取样 1h 内运回实验室进行组织固定及/或细胞分离。

1.2 主要试剂

DMEM-HG,DMEM-F12 培养基,胎牛血清及 0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco 公司),real-time PCR 试剂盒及相关试剂(日本 TaKaRa 公司),小鼠抗人角蛋白 7(CK7)、小鼠抗人波形蛋白单克隆抗体(vimentin)、兔抗鼠 ABC 免疫组化试剂盒、山羊抗兔链霉卵白素试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),小鼠抗人 NOD1 单克隆抗体(美国 R&D 公司),小鼠抗人 NOD2 抗体(美国 Abcam 公司),IV 型胶原酶(美国 Sigma 公司)及 Trizol(美国 Invitrogen 公司)淋巴细胞分离液 Percoll(瑞典 Amersham 公司),目的基因 NOD1/NOD2 引物及内参照 GAPDH 引物委托上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 免疫组织化学染色

清宫时留取绒毛及蜕膜组织,甲醛固定,石蜡包埋,组织切片行免疫组化检测,检测步骤按试剂盒说明书进行。绒毛及蜕膜组织中出现棕黄色染色为 NOD1/NOD2 免疫组化反应阳性。

1.4 早孕期蜕膜基质细胞分离和原代培养

蜕膜基质细胞(decidual stromal cells,DSC)的分离培养参照 Montes 等的方法并进行适当改良,

蜕膜组织经清洗去除血块后剪成约 1 mm³ 的碎块,加入 IV 型胶原酶及 DNA 酶消化 20 min,消化上清液分别过 80 目、300 目、400 目筛网,1 200 r/min($r = 9.5$ cm)离心 8 min,6~10 mL PBS 液重悬,小心铺于不连续 Percoll 液上(20%,40%,60%),2 000 $\times g$ 离心 20 min 吸取 20%、40%密度范围的细胞即为蜕膜基质细胞,PBS 液冲洗,1 000 r/min ($r = 9.5$ cm)离心 10 min,调节细胞密度为 5×10^5 个/mL 种植于培养皿 37 °C 体积分数 5% CO₂ 培养过夜,去除未贴壁的细胞即为纯化的蜕膜基质细胞。

1.5 Real-Time PCR

提取早孕期绒毛组织的总 RNA 及原代培养蜕膜基质细胞 RNA,取 1 μ g RNA 逆转录得到 cDNA,按照 ABI Prism 7000 Fast Real-time PCR System 使用说明操作进行实时定量 PCR 反应条件为 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 34 s 扩增 40 个循环,95 °C 5 s,60 °C 1 min,95 °C 5 s。NOD1 上游引物序列:tactgaaaagcaatcgggaact,下游引物序列:gtagaggaagaactcggacacc; NOD2 上游引物序列:tgccgactctactctttgagc,下游引物序列:ccgtgaacctgaacttgaact;GAPDH 上游引物序列:gcaccgtcaaggctga gaac,下游引物序列:tgggtgaagacgccagtgga。应用相对定量的方法对数据进行分析,通过 Ct 值计算出 Ct 以及 Ct 值,以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 标示不同组织 mRNA 转录水平的高低,实验重复 3 次。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17 进行数据统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 母胎界面 NOD1/NOD2 的定位

绒毛组织中 NOD1/NOD2 主要定位于滋养细胞层,且定位于细胞质中,免疫组化结果可见 NOD1/NOD2 均呈阳性反应,这两种固有模式识别受体的定位无明显差异(图 1)。

2.2 蜕膜基质细胞培养状况

蜕膜基质细胞为 CK7 染色阴性 vimentin 染色阳性的细胞。原代培养纯度达 99%(图 2)。

2.3 母胎界面 NOD1/NOD2 mRNA 表达

Real-Time PCR 法检测蜕膜基质细胞中 NOD1/NOD2 的 mRNA 表达水平低于绒毛组织,

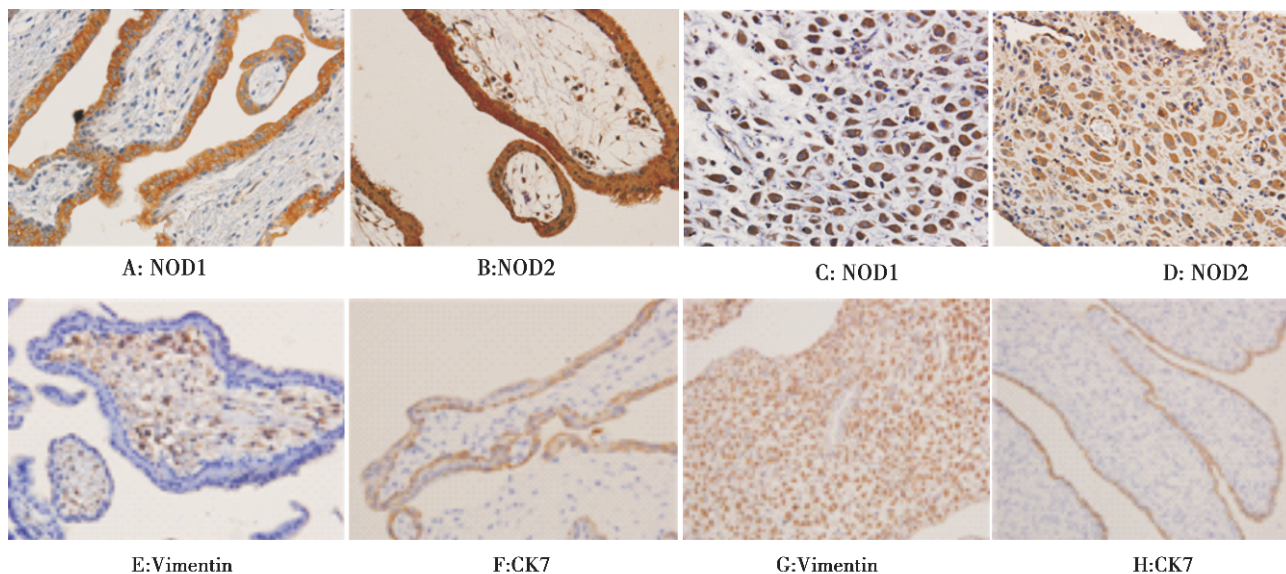


图 1 绒毛及蜕膜组织 NOD1、NOD2 表达情况

Fig.1 Expression of NOD1/NOD2 in villi and decidual tissues

A and B: Positive immunoreactivity was observed for NOD1 and NOD2 in first trimester villi ($\times 40$); C and D: Positive immunoreactivity was observed for NOD1 and NOD2 in first trimester decidua ($\times 40$); E and F: immunohistochemical stains for vimentin and CK7 of villi ($\times 40$); G and H: immunohistochemical stains for vimentin and CK7 of decidua ($\times 40$).

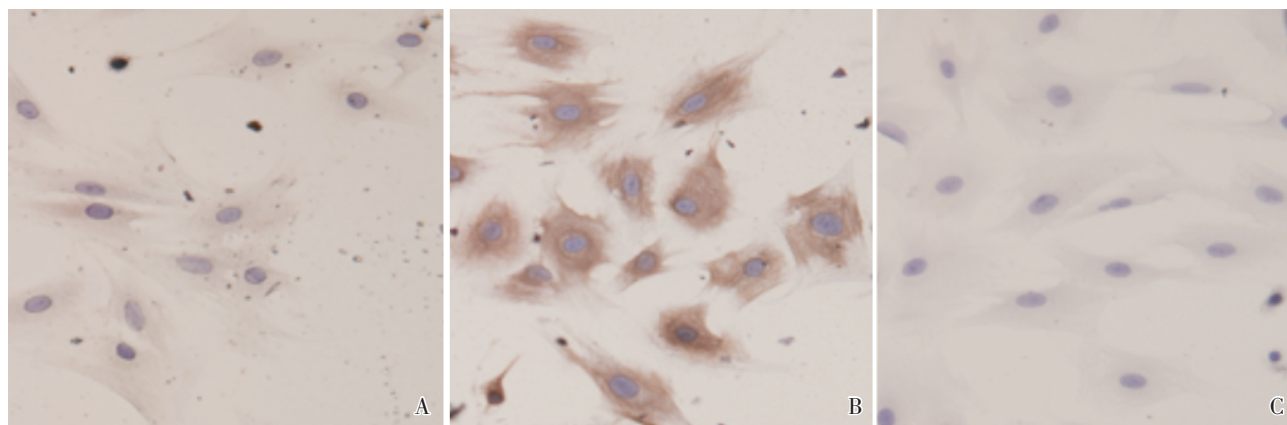


图 2 蜕膜基质细胞培养和鉴定

Fig.2 Culture and identification of DSC

A: Immunohistochemical stains for CK7 of DSC ($\times 400$); B: Immunohistochemical stains for vimentin of DSC ($\times 400$); C: Immunohistochemical stains for PBS of DSC ($\times 400$).

差异具有统计学意义, 分别为 $P = 0.03$ 和 $P = 0.009$ 。绒毛组织中 NOD1 的表达低于 NOD2, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。DSC 中 NOD1 的表达高于 NOD2, 差异有统计学意义 ($P = 0.029$; 图 3)。

3 讨论

绒毛组织中的滋养细胞和蜕膜组织中蜕膜基质细胞是早孕母胎界面上的重要组成成分。滋养

细胞有着多重功能, 能够分泌不同的激素以维持妊娠的继续, 若其功能受损则有可能导致流产的发生。蜕膜基质细胞是母-胎界面另一重要组成细胞, 主要分布于蜕膜, 是蜕膜的主要细胞成分, 成熟蜕膜基质细胞可产生大量纤维连接蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白多糖、IV型胶原及层粘连蛋白。在滋养细胞入侵到蜕膜深部后会与母体来源的蜕膜基质细胞直接接触, 蜕膜基质细胞形成的以上妊娠期特殊的细胞外基质可供滋养细胞在其中迁

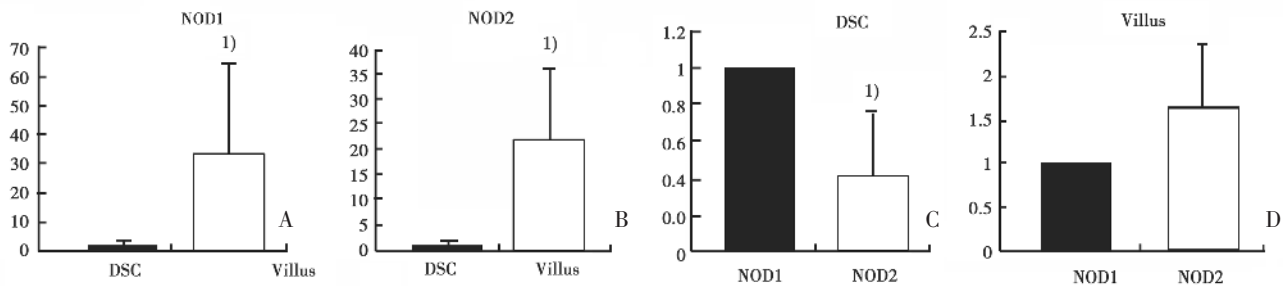


图 3 Real-Time PCR 法比较 NOD1/NOD2 在绒毛及蜕膜组织中的表达

Fig.2 Comparison of the expression level of NOD1/NOD2 in villi and decidua tissues with real-time PCR method

A: Comparison of DSC with villi of NOD1 expression; B: Comparison of DSC with villi of NOD2 expression; C: Comparison of NOD1 with NOD2 in DSC; D: Comparison of NOD1 with NOD2 in villi. 1) $P < 0.05$.

移、游走。这两种细胞间的相互作用及相互影响形成母胎界面的对话,对妊娠的维持起至关重要的作用,两者表达或功能紊乱都有可能会导致妊娠的失败。

Costello 等^[3]的研究表明,在早期妊娠绒毛中有 NOD1/NOD2 的表达,且 NOD1/NOD2 为滋养细胞及其他缺乏细胞膜识别功能的细胞提供了胞内细菌识别路径,筑起了固有免疫的第二道屏障。在早期妊娠中,NOD1/NOD2 通过 MDP-NOD1/NOD2-RIP2-IKK-NF- κ B 信号转导通路激活靶基因,另外 NOD1/NOD2 还能够通过招募 Caspase-1 途径和激活 MAPK 途径来启动相应的靶基因,引起 IL-8、IL-6 和 IL-1 β 等细胞因子的释放。而这些细胞因子在早期妊娠的维持中都起到重要的作用,其表达的高低直接影响的妊娠的结局。有研究表明,蜕膜中存在适当的炎症刺激有利于妊娠的维持^[4],而炎症反应过度也会对胚胎有杀伤作用^[5],到底何种作用对妊娠的维持具有更重要的作用有待于深入研究。

在诸如哮喘和炎症性肠疾病中,NOD1 亚型的表达发生改变,可导致异常炎症的发生。并且 NOD1 介导的对皮肤和黏膜表面细菌产物的识别可能影响 Th2 的极化和 IgE 的浓度^[6]。而在妊娠的维持中,Th2 优势对妊娠的维持有重要作用,NOD1 是否能通过调节 Th2 的极化而在妊娠的维持中发挥作用,目前还不能明确。且 NOD1 在不同的组织中表达水平和作用不尽相同,因此需要进一步的研究。

NOD2 通过 NF- κ B 途径激活下游的炎症介质和促炎因子,从而介导炎症反应和细胞凋亡以及

影响细胞因子的表达。有研究证实,肺炎链球菌通过 NOD2 受体诱导 NF- κ B 活化,在肺组织中参与了肺炎链球菌感染的免疫防御反应^[7]。迄今为止,至少发现 58 种疾病相关性 NOD2 突变或致病性 NOD2 突变。NOD2 基因突变影响其与配体的结合,使 NOD2 不能识别胞壁酰二肽、NF- κ B 活性降低、黏膜控制细菌感染的反应丧失,从而诱发异常强烈的炎症反应。NOD2 还参与移植后排斥反应,而对于母体来说,胚胎是同种异体移植植物,NOD2 在妊娠中所起的作用是否有相似之处也未能明确。

本研究证实在早期妊娠母胎界面中均有 NOD1/NOD2 的表达,且主要表达于绒毛滋养层细胞及蜕膜基质细胞的胞质中。在 mRNA 水平上,绒毛中 NOD1/NOD2 的表达量为蜕膜的几十倍,从而说明在不同组织中 NOD1 和 NOD2 的表达量不同,此外本研究还证实即使在相同组织中 NOD1 和 NOD2 的表达量也是不同的。本研究中所采用的蜕膜基质细胞培养方法技术成熟,流程简洁,所得原代细胞纯度高,值得推广。

在影响生殖健康的各种疾病当中,复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是颇为重要的一个。据统计,RSA 的发病率约 5%^[8]。RSA 意味着不断发生的妊娠失败,它在生理和心理方面对育龄妇女及其家庭成员产生诸多不良影响,损害人类生殖健康。尤其是不孕患者通过生殖辅助技术获得妊娠后,易种难长,流产率比正常妇女更高,故 RSA 的诊疗成为生殖学研究热点。了解和分析影响自然流产的发病机制,对预防自然流产的发生,提高育龄夫妇的生殖健康水平,改善

人口质量具有重要意义。

引起 RSA 发病的因素较多,除了子宫畸形、内分泌因素、遗传因素及感染致胎儿畸形等这些能够查明原因的因素外,仍有 60%~70%病因不明,临床上称之为原因不明复发性自然流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA),目前绝大多数研究认为 URSA 的发生与免疫异常有关^[9-10]。免疫反应分为获得性免疫和固有免疫,目前研究多关注获得性免疫与 URSA 的关系,本研究中关注的是固有免疫与妊娠的关系,为进一步了解固有免疫在 URSA 中的作用奠定基础,为进一步研究 URSA 治疗的新方法带来可能。

总之,在本研究中绒毛和蜕膜组织中 NOD1/NOD2 表达的差异性在妊娠的维持中起到何种作用仍不明确。但为下一步明确 NOD1/NOD2 在妊娠的维持和不明原因复发性流产中的作用奠定基础,为进一步研究 NOD1/NOD2 在调节母胎界面中的细胞因子和趋化因子等的表达起着不可或缺的重要作用。

致谢:感谢复旦大学妇产科医院研究所全体人员对本研究的支持与帮助。

参考文献:

- [1] Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease[J]. *Nat Immunol*, 2006, 7(12): 1250-1257.
- [2] Tian X, Pascal G, Monget P. Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems[J]. *BMC Evol Biol*, 2009, 9: 202.
- [3] Costello MJ, Joyce SK, Abrahams VM. NOD Protein Expression and Function in First Trimester Trophoblast Cells[J]. *Am J Reprod Immunol*, 2007, 57(1): 67-80.
- [4] Hannan NJ, Salamonsen LA. Role of chemokines in the endometrium and in embryo implantation[J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007, 19(3): 266-272.
- [5] Romero R, Espinoza J, Goncalves LF, et al. The role of inflammation and infection in preterm birth [J]. *Semin Reprod Med*, 2007, 25(1): 21-39.
- [6] 邵珺, 李明清, 沈宗姬, 等. 早孕期母-胎界面蜕膜基质细胞过表达肿瘤转移抑制基因 KAI1/CD82 导致妊娠失败[J]. *复旦大学学报: 医学版*, 2011, 9(38): 382-388.
- [7] Shao J, Li MQ, Shen ZJ, et al. Decidual stromal cells at materno-fetal interface regulate the invasion of trophoblast cells via expressing KAI1/CD82[J]. *Fudan Univ J Med Sci*, 2011, 9(38): 382-388.
- [8] Kanneganti TD, Lamkanfi M, Núñez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease [J]. *Immunity*, 2007, 27(4): 549-559.
- [9] 罗丽兰. 不孕与不育[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 286.
- [10] Luo LL. Infertility and sterility [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998: 286.
- [11] Li M, Huang SJ. Innate immunity, coagulation and placenta-related adverse pregnancy outcomes [J]. *Thromb Res*, 2009, 124(6): 656-662.
- [12] 刘玉昆, 张建平, 邝健全, 等. 复发性自然流产患者绒毛滋养细胞 FasL 的表达[J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(6): 143-146.
- [13] Liu YK, Zhang JP, Kuang JQ, et al. Expression of FasL on trophoblasts of recurrent spontaneous abortion [J]. *Immunol J*, 2004, 20(6): 143-146.
- [14] 刘玉昆, 张建平, 邝健全, 等. 复发性自然流产患者外周血淋巴细胞 Fas 表达及其与 NK 细胞毒性的相关性研究[J]. *现代妇产科进展*, 2006, 15(2): 117-120.
- [15] Liu YK, Zhang JP, Kuang JQ, et al. Expression of the Fas on the lymphocytes in the women with RSA and correlation between Fas expression and NK cytotoxicity [J]. *Progress in Obstetr Gynecol*, 2006, 15(2): 117-120.
- [16] King AE, Horne AW, Hombach-Klonisch S, et al. Differential expression and regulation of nuclear oligomerization domain proteins NOD1 and NOD2 in human endometrium: a potential role in innate immune protection and menstruation [J]. *Mole Human Reprod*, 2009, 15(5): 311-319.
- [17] Mulla MJ, Yu AG, Cardenas I, et al. Regulation of Nod1 and Nod2 in First trimester trophoblast cells [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2009, 61(4): 294-302.
- [18] Geddes K, Magalhães JG, Girardin SE. Unleashing the therapeutic potential of NOD-like receptors [J]. *Nat Rev*, 2009, 8(6): 465-479.
- [19] Opitz B, Püschel A, Schmeck B, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(35): 36426-36432.

(编辑 张恩健)