sHLA-G 对复发性流产患者滋养细胞侵袭功能的影响

王英兰[1]，苏放明[1*]，陈德珩[2]，周雅莹[2]
（暨南大学附属第二临床医学院//深圳市人民医院 1.妇产科；2.临床医学研究中心，广东 深圳 518020）

摘 要：【目的】探讨外源性可溶性人类白细胞相关抗原 G(sHLA-G)对不明原因复发性流产(RSA)患者滋养细胞侵袭功能的影响，为探索 RSA 的有效治疗措施提供依据.【方法】正常组 30 例，为正常早孕人流患者，无自然流产史，孕周 8-10 周；RSA 组 20 例，相应孕周 RSA 患者，绒毛组织 20 例。滋养细胞原代培养，分离绒毛外滋养细胞，正常组患者每例滋养细胞接种 1 瓶、RSA 患者每例 3 瓶备实验用。正常组及 RSA 对照组、研究 1 组、研究 2 组分别以生理盐水、生理盐水、5×10^{-4}/L% 终浓度 sHLA-G、0.1%终浓度 sHLA-G 干预培养 16 h，取悬浮细胞获得绒毛外滋养层细胞(EVCT)团，加入 CD146 单克隆抗体，采用流式细胞仪检测各组滋养细胞 CD146 阳性率。【结果】①正常组 EVCT CD146 阳性率为(63.29 ± 6.76)%，明显高于 RSA 对照组(10.61 ± 3.34)%，$P < 0.01$。②研究 1 组 EVCT 的 CD146 的阳性率为(30.61 ± 7.52)%，较 RSA 对照组显著升高，$P < 0.01$；研究 2 组 EVCT 的 CD146 的阳性率为(64.15 ± 9.54)%，显著高于研究 1 组及 RSA 对照组，P 均<0.01，与正常组比较差异无统计学意义，$P > 0.05$。【结论】外源性 sHLA-G 干预可显著提高 RSA 患者 EVCT 侵袭功能，可望成为 RSA 的有效治疗措施之一。

关键词：复发性流产，人类白细胞相关抗原-G，滋养细胞，侵袭
中图分类号：R714.21 **文献标志码**：A **文章编号**：1672-3554(2012)04-0524-04

Effect and Significance of Exogenous Soluble HLA-G Intervention on Trophoblast Invasion in Patients of Recurrent Spontaneous Abortion

WANG Ying-lan, SU Fang-ming*, CHEN De-heng, ZHOU Ya-ying
(1. Department of Gynecology and Obstetrics, 2.Department of Clinical Research Laboratory, The Second Hospital of Jinan University // People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518020, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of extrogenous soluble human leukocyte antigen-G (sHLA-G)on trophoblast invasion in chronic villi of unexplained recurrent spontaneous abortion and then provide scientific evidence for treatment strategies.【Methods】The villi of 8-10 weeks gestation were collected from 50 women, 30 cases of normal induced abortion, and 20 cases of unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA). Trophoblast cells were primary cultured, 1 bottle for each normal case (normal group) and 3 bottles for each RSA case (control group, group 1, group 2). 0.9% NS, 0.9% NS, and 0.05%, 0.1% ultimate concentration sHLA-G was added to each group respectively, and continued to cultured for 16 hours. The EVCT were collected from suspension cells and stained by CD146 monoclonal antibody. The expression of CD146 was detected by flow cytometry. 【Results】 The rate of CD146+ EVCT in normal pregnant group was (63.29 ± 6.76)%, significantly higher than the control group (10.61 ± 3.34)%, $P < 0.01$. (2) The rate of CD146+ EVCT was (64.15 ± 9.54)% in group 2 (0.1% sHLA-G intervention), significantly higher than that of gruop1 (0.05% sHLA-G intervention)(30.61 ± 7.52)%, $P < 0.01$. The rate of CD146+ EVCT in group 1 and group 2 was both higher than the control group, $P < 0.01$. There was no significant difference between the normal group and group 2.【Conclusion】Exogeneous sHLA-G intervention can significantly improve the invasion of trophoblast cells from RSA patients. It may be one of the effective treatment strategies for RSA.

Key words: recurrent spontaneous abortion; HLA-G; trophoblast; invasion
[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(4): 524-527]

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续 2 次或 2 次以上的自然流产，其发生率占妊娠的 1% ~ 2%，其中 40% ~ 60%经各种临床检查未发现明确病因称不明原因复发性流

收稿日期：2011-11-18
基金项目：深圳市自然科学基金(200902010)；深圳科工贸信委重点课题(21001007)
作者简介：王英兰，博士，副主任医师；E-mail：yinglan2003@sohu.com；*通信作者：苏放明，教授，硕士导师，E-mail：sfmlxq@163.com

产，对家庭和社会造成重大影响。目前的主要治疗方案包括免疫治疗，其疗效各家报道不一。探索 RSA 新的治疗方案并提高疗效是目前 RSA 研究工作的重点之一。HLA-G 属于机体自身表达的免疫抑制因子，其在器官移植及生殖免疫耐受中的作用日益受到关注[1]。众多的研究证明，HLA-G 的表达水平与器官移植及妊娠的成功率呈明显正相关[2-3]。绒毛外滋养层细胞（extravillous cytotrophoblasts，EVCT）HLA-G 表达下降、侵袭功能不足与 RSA 的发生密切相关[4]，而内源性 HLA-G 表达强的胚胎妊娠成功率明显高于表达相对较弱的胚胎[5]。采用外源性 HLA-G 干预能否补充 RSA 患者胚胎自身 HLA-G 抗原表达不足的缺陷，发挥对母-胎间免疫耐受的调控，提高胚胎种植的活力，最终提高妊娠成功率？目前国内外尚未见报道。本研究采用可溶性 HLA-G（soluble Human Leukocyte Antigen-G，sHLA-G）体外干预，对 RSA 患者滋养细胞侵袭能力的影响进行了研究，旨在探讨 sHLA-G 治疗 RSA 的可行性，为探索 RSA 的治疗方案提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　病例来源及分组

为我院 2010 年 1 月至 2010 年 8 月于我院人流室行人工流产患者。研究分为正常组及 RSA 组。正常组 30 例，随机选自正常早孕人流患者，孕 8 ~ 10 周，无自然流产史；RSA 组 20 例，有 2 次或 2 次以上的连续自然流产史，排除染色体、解剖、感染、内分泌及血栓性、自身免疫性疾病等疾病，本次妊娠因安胎失败而终止妊娠。于人流术中收集两组患者绒毛，收集过程中尽量保持无菌。绒毛组织收集后，立即置于培养液中快速送往实验室。RSA 组每例绒毛滋养细胞接种 3 份，根据干预措施不同，又分为 RSA 对照组及研究 1 组（RSA+0.05%终浓度 sHLA-G 干预）、研究 2 组（RSA+0.1%终浓度 sHLA-G 干预）。【组别表述不清，可表述为对照组、研究 1 组（RSA+0.5 ug/mlsHLA-G 干预）、研究 2 组（RSA+1.0 μg/mL sHLA-G 干预）】。

1.2　主要试剂及仪器

人源性 sHLA-G（浓度为 1g/l）购于 EXBIO 公司，抗人 CD146 单克隆抗体购于 AbD serotec 公司。流式细胞仪由美国贝克曼公司提供。

1.3　滋养细胞的原代培养及干预

将绒毛组织置于无菌培养皿中，用含 100 U/mL 青霉素、10%FCS 的 DMEM 高糖培养液快速、充分洗涤 1 次，仔细剪去膜状物，将绒毛剪碎约 1 mm^3 大小，似糊状，加入 0.25%胰酶 15 mL 消化混合均匀，置于 37℃恒温箱中消化 30 min，消化完立即用等体积 15 mL 10%FCS DMEM 中和，经 200 目不锈钢滤网过滤。将滤液 1 000 r/min（r = 14 cm）离心 10 min，所得细胞团在用 10%FCS DMEM 洗涤一次后接种于含 10 mL 10%FCS DMEM 培养液的培养瓶中，RSA 组患者滋养细胞每例接种 3 瓶，置于体积分数 5% CO_2 培养箱内培养。接种 24 h 更换培养液。正常组及 RSA 对照组：于培养瓶中均加入生理盐水 10 μL，研究 1 组、研究 2 组于培养瓶中分别加入 1 g/L sHLA-G 5 μL、10 μL 进行干预，培养 16 h。

1.4　流式 CD146 检测

取悬浮细胞液 1 200 r/min 离心 10 min 得 EVCT 单核细胞团，对不同干预组不同的单核细胞团加入 8 μL CD146 抗体避光 10 min，加入溶血素 1 mL 避光 5 min 去除红细胞干扰，用 PBS 洗涤一次，最后加入 1 mL PBS 摇匀上流式检测 CD146 阳性率。

1.5　统计学分析

采用 SPSS11.0 统计学软件进行分析。连续性正态分布的计量资料，采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间比较采用 t 检验，多组间均数比较采用 ANOVA 方差分析，组间比较采用 LSD 检验

2　结　果

2.1　正常妊娠及 RSA 患者 EVCT　CD146 表达

正常妊娠组 EVCT CD146 阳性率为（63.29 ± 6.76）%，而 RSA 对照组为（10.61 ± 3.34）%，两者比较，差异有极显著性，$P < 0.01$。

2.2　不同浓度 sHLA-G 干预后 RSA 患者 EVCT CD146 表达变化

0.5 μg/mL 及 1 μg/mL 终浓度 sHLA-G 干预 EVCT 的 CD146 的阳性率分别为（30.61 ± 7.52）%，及（64.15 ± 9.54）%，均显著高于 RSA 对照组，P 均<0.01；而 0.5 μg/mL 及 1 μg/mL 两组之间比较，CD146 阳性率差异亦有显著意义，1 μg/mL 干预组明显高于 0.5 μg/mL 组，$P < 0.01$。1 μg/mL sHLA-G 干预组与正常组比较，差异无统计学意义，$P > 0.05$（图 1，表 1）。

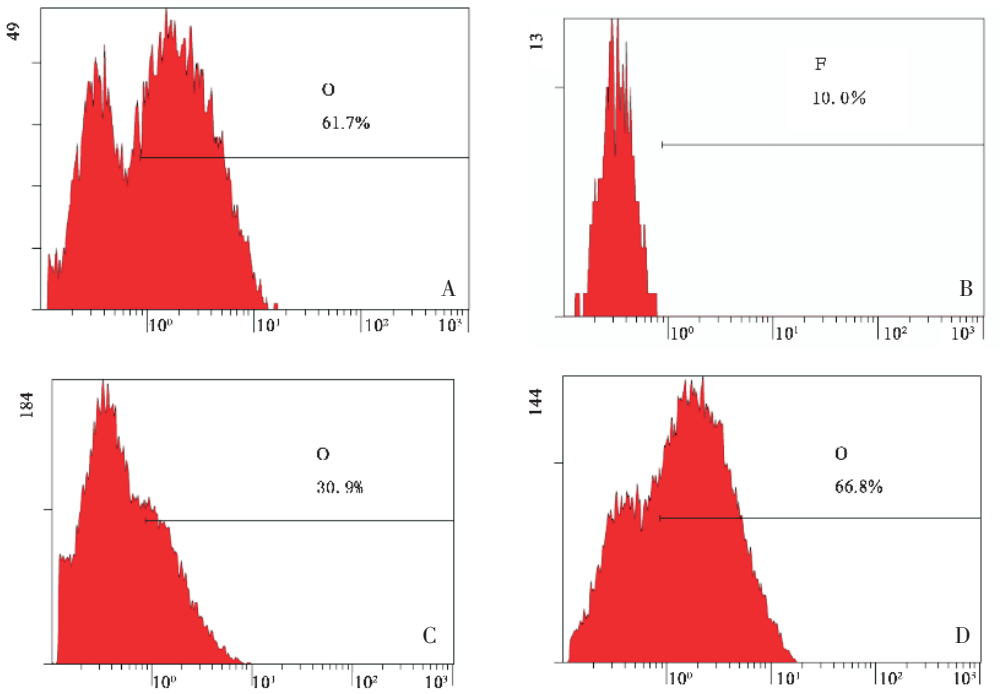


图 1 各组患者 EVCT CD146 阳性率

Fig.1 CD146+ rate of EVCT in each group

A: normal group; B: control group; C: group 1; D: group 2

表 1 正常妊娠及不同浓度 sHLA-G 干预体外培养 EVCT-CD146 表达差异

Table 1 Differentially expressed CD146 of EVCT in normal and sHLA-G intervention groups

Groups		CD146+(%)
Normal	*n*	63.29 ± 6.76
Control(RSA+0.9%NS)	30	10.61 ± 3.34
Group1(RSA+0.05%sHLA-G)	20	30.61 ± 7.52
Group2(RSA+0.1%sHLA-G)	20	64.15 ± 9.54
F	20	298.097
P		*P* < 0.01

Note: multiple comparisons: The difference between each group was statistically significant ($P < 0.01$), except the normal group and group 2 ($P > 0.05$).

3 讨 论

HLA-G 属于非经典 HLA-I 类基因，位于 6 号染色体短臂，其基因产物分为膜结合型及可溶性型(sHLA-G)。HLA-G 基因及蛋白呈低度多态性，个体间差别不大，主要表达在绒毛外滋养细胞。CDl46 是最近确定的 Ig 基因超家族成员，是一种细胞黏附分子，在绒毛植入及胚胎形成过程中发挥重要作用。主要表达在绒毛外层滋养细胞，在胚胎种植部位侵犯和代替螺旋动脉，导致血流通过螺旋动脉不受阻碍地进入胎盘绒毛间隙，从而建立母体-胎儿循环，是反映滋养细胞侵袭能力的重要指标之一[3]。

已有的研究表明 HLA-G 属于免疫抑制因子，通过多种途径产生免疫调节及保护作用，形成母胎界面特殊的免疫耐受，其机制包括：与自然杀伤(NK)细胞及杀伤性 T(Tc)细胞表面受体结合，抑制 NK 及 Tc 细胞毒效应；还可通过介导 NK 及 Tc 细胞凋亡而有效抑制 NK 及 Tc 细胞溶解靶细胞；调节 Th1/Th2 平衡，抑制外周血及蜕膜 CD4+T 细胞分泌 IL-2、IFN-γ、TNF-α 等 Th1 型细胞因子，促进 IL-4、IL-10 等 Th2 型因子分泌，使 Th1/Th2 平衡偏向于有利于胚胎种植和妊娠维持的 Th2 方向[6]，从而保护胚胎滋养细胞免受母体免疫系统的攻击[7-8]。在体外受精胚胎移植中发现，sHLA-G 阳性胚胎移植的妊娠率和植入率明显提高。Roussev 等[9]报道，当胚泡液中 sHLA-G 浓度≥2U/mL 者，妊娠成功率可达到 65%，而<2U/mL 者则无一例成功妊娠。Kotze[10]报道，选择胚胎培养液中 sHLA-G 表达阳性的胚胎移植后妊娠成功率为

49%，明显高于未检测 sHLA-G 移植的对照组 19%。在 RSA 患者中，胎盘 HLA-G 的表达明显下降。在妊娠头 3 个月，HLA-G 的表达下降，可使滋养细胞侵蚀分化过程受阻，滋养细胞不易侵入子宫蜕膜及重铸螺旋动脉，绒毛着床过浅，血管发育欠佳，不能有效供应胎盘营养，使胎盘生长发育受限，导致胎儿生长受限、自然流产[11-12]。本研究显示，复发性流产组绒毛外滋养层细胞 CD146 表达明显低于正常妊娠组，提示滋养细胞侵袭能力下降是 RSA 发生的病理生理机制之一。

外源性 sHLA-G 干预对滋养细胞的影响。采用外源性 sHLA-G 干预，可补充 RSA 患者 HLA-G 表达不足，发挥 HLA-G 对妊娠的保护作用，有利于滋养细胞及胚胎的正常发育。本研究显示补充外源性 sHLA-G 后，RSA 患者的滋养细胞 CD146 表达明显升高，且其表达强度与培养液中 HLA-G 的浓度呈正相关。0.5 μg/mL 干预组，CD146 的表达率较生理盐水组明显升高，当培养液中浓度达到 1 μg/mL 时，则已接近正常妊娠。HLA-G 诱导宿主免疫耐受不仅在母胎免疫平衡中得到证实，而且在其他研究中亦得到充分证明[13]。

sHLA-G 治疗 RSA 的意义及展望。免疫治疗是目前不明原因 RSA 的主要治疗方案，包括丈夫淋巴细胞注射、丙种球蛋白被动免疫等方法，目前取得了良好效果，但仍有 20%～40%的失败率。研究证明外周血淋巴细胞并不表达 HLA-G 抗原[3-5]，由于治疗机制不同，对于丈夫淋巴细胞主动免疫失败的病例，sHLA-G 仍可能获得疗效。目前 sHLA-G 为基因合成产物，且个体间差异小，具有临床可获得性。另外，较之于丙种球蛋白被动免疫治疗，sHLA-G 具有纯度高、非血液制品，安全性好等优点，具有良好的临床应用前景，可作为免疫治疗失败后一种可供选择的二线治疗措施。sHLA-G 干预能否提高妊娠成功率？尚有待体内研究进一步证明。本课题的动物实验研究尚在进行中，实验数据将进一步探讨 sHLA-G 治疗 RSA 的效果，为 sHLA-G 的临床应用提供依据。

参考文献：

[1] Deschaseaux F, Delgado D, Pistoia V, et al. HLA-G in organ transplantation: towards clinical applications[J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(3): 397-404.

[2] Rebmann V, Bartsch D, Wunsch A, et al. Soluble total human leukocyte antigen class I and human leukocyte antigen -G molecules in kidney and kidney/pancreas transplantation[J]. Hum Immunol, 2009, 70(12): 995-999.

[3] Cecati M, Giannubilo SR, Emanuelli M, et al. HLA-G and pregnancy adverse outcomes[J]. Med Hypotheses, 2011, 76(6): 782-784.

[4] 张铭艳，曾杰，胡吉英，等. HLA-G 蛋白在原因不明习惯性流产中的表达 [J]. 中国优生与遗传 杂志，2011，19(1)：28-31.

[5] Rebmann V, Switala M, Eue I, et al. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study [J]. Hum Reprod, 2010, 25(7): 1691-1698.

[6] 赵延峰，张宁宁，崔澈. HLA-G 与原因不明复发性流产[J].医学综述，2010，16(14)：2173-2176.

[7] Berger DS, Hogge WA, Barmada MM, et al. Comprehensive analysis of HLA -G: implications for recurrent spontaneous abortion[J]. Reprod Sci, 2010, 17(4): 331-338.

[8] Gonen-Gross T, Goldman-Wohl D, Huppertz B, et al. Inhibitory NK receptor recognition of HLA -G: regulation by contact residues and by cell specific expression at the fetal-maternal interface [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8941.

[9] Roussev RG, Coulam CB. HLA -G and its role in implantation[J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(7): 288-295.

[10] Kotze DJ, Hansen P, Keskintepe L, et al. Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker (sHLA-G) and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome[J]. J Assist Reprod Genet, 2010, 27(6): 309-316.

[11] Peng B, Zhang L, Xing AY, et al. The expression of human leukocyte antigen G and E on human first trimester placenta and its relationship with recurrent spontaneous abortion [J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2008, 39(6): 976-979.

[12] Moser G, Orendi K, Gauster M, et al. The art of identification of extravillous trophoblast[J]. Placenta, 2011, 32(2): 197-199.

[13] Brugière O, Thabut G, Pretolani M, et al. Immunohistochemical study of HLA -G expression in lung transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2009, 9(6): 1427-1438.

（编辑　张恩健）