

# 产程中胎盘胎膜细胞凋亡的变化

李小毛, 沈慧敏, 谌小卫, 林国翘, 陶淑芸

(中山医科大学附属第三医院妇产科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨胎盘、胎膜细胞凋亡与分娩动因的关系。【方法】采用 TUNEL 法和电镜法检测妊娠晚期不同产程的胎盘、胎膜组织中的细胞凋亡情况。【结果】羊膜上皮细胞凋亡指数(AI)、绒毛膜滋养细胞 AI、胎盘绒毛滋养细胞 AI 与蜕膜细胞 AI 在未临产组、潜伏期组、活跃期组与顺产组之间差异均有极显著性( $P < 0.01$ ), 且羊膜上皮细胞 AI、绒毛膜滋养细胞 AI、胎盘绒毛滋养细胞 AI 与蜕膜细胞 AI 均随未临产组、潜伏期组、活跃期组、顺产组的顺序增大。【结论】胎盘、胎膜组织中细胞凋亡的变化与分娩发动和产程进展有关。

**关键词:** 胎盘; 胎膜; 细胞凋亡; 分娩发动

中图分类号: R714.251

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)05-0337-04

## The Change of Cellular Apoptosis in Placentas and Fetal Membranes in Labor

LI Xiao-mao, SHEN Hui-min, CHEN Xiao-wei, LIN Guo-qiao, TAO Shu-yun

(Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study the relationship between the initiation of labor and the cellular apoptosis in placentas and fetal membranes. 【Methods】 The TUNEL method and the electron microscopy was used to detect apoptosis in placentas and fetal membranes, which were taken from the third trimester pregnant women in different stage of labor. 【Result】 There were very significant differences among the non-labor group, the latent stage group, the active stage group and the vaginal delivery group in apoptotic index AI of amnion epithelial, AI of chorion trophoblast, AI of placental trophoblast and AI of decidual cellular layer ( $P < 0.01$ ). And the AI of amnion epithelial, AI of chorion trophoblast, AI of placental trophoblast and AI of decidual cellular layer all increased sequence from the non-labor group, the latent stage group, the active stage group to the vaginal delivery group. 【Conclusion】 The initiation and evolution of labor has something to do with the change of cellular apoptosis in placentas and fetal membranes.

**Key words:** placenta; fetal membranes; cell apoptosis; labor onset

目前关于分娩动因方面的研究逐渐受到重视, 提出了较多的学说, 包括: 内分泌、胎儿作用、宫颈成熟、免疫学、一氧化氮、机械作用及神经调节等学说<sup>[1]</sup>。近来, 有文献报道人类早孕绒毛、蜕膜和晚孕胎盘、胎膜中均存在细胞凋亡, 而且早孕与晚孕时期细胞凋亡状况有显著差别。本实验通过研究妊娠晚期与产时不同产程的胎盘与胎膜中的细胞

凋亡情况, 探讨细胞凋亡与分娩动因的关系, 为早产诊治及计划分娩提供依据。

### 1 研究对象和方法

#### 1.1 研究对象

收集 1998 年 10 月~2000 年 3 月在本院分娩

收稿日期: 2000-05-11

基金项目: 广东省科委科研基金资助项目(1998-04)

作者简介: 李小毛(1962-), 男, 湖南郴州人, 硕士, 副教授, 专长围产医学, 从事妇产科工作。

的足月妊娠初产妇共 73 例, 依其妊娠终止时所处的时期分为未临产组(Non-labor group)、潜伏期组(Latent stage group)、活跃期组(Active stage group)和顺产组(Vaginal delivery group)。其中, 未临产组 19 例, 孕妇平均年龄 27.6 岁(24~33 岁), 平均孕龄 39 周+3d(37 周+1d~41 周+6d), 新生儿平均体质量 3.34 kg(2.9~3.9 kg), 其中, 男婴 10 例、女婴 9 例。潜伏期组 18 例, 孕妇平均年龄 27.5 岁(26~31 岁), 平均孕龄 39 周+4d(37 周+3d~41 周+6d), 新生儿平均体质量 3.30 kg(3.0~3.7 kg), 其中, 男婴 9 例、女婴 9 例。活跃期组 14 例, 宫口开张平均 6.2 cm(4.0~9.0 cm), 平均年龄 28.5 岁(26~32 岁), 平均孕龄 40 周(39 周+2d~40 周+6d), 新生儿平均体质量 3.52 kg(2.9~3.9 kg), 其中, 男婴 7 例、女婴 7 例。顺产组 22 例, 孕妇平均年龄 26.8 岁(23~33 岁), 平均孕龄 39 周+6d(37 周+1d~41 周+1d), 新生儿平均体质量 3.21 kg(2.8~3.7 kg), 其中, 男婴 11 例、女婴 11 例。全部病例均为胎盘自然剥离, 产程中无特殊用药。所有病例均无妊娠高血压症、前置胎盘、胎盘早剥、羊水过多或过少、胎儿宫内生长迟缓和胎膜早破等病理妊娠及糖尿病、肝炎、甲状腺功能亢进、心脏病和肺结核等妊娠合并症, 所有病例均无合并其它急、慢性器质性病变。

## 1.2 方法

### 1.2.1 TUNEL 法检测细胞凋亡

① 标本制备: 顺产胎盘自然娩出后、剖宫产胎盘自然剥离后即留取标本→生理盐水中洗净血液→置入 10 倍于其体积的 10% 中性甲醛液固定后送病检→病检排除绒毛膜羊膜炎→取石蜡包埋组织切取 5 μm 厚切片→贴附于硅化玻片→60 °C 烤片 2 h→备用。② 主要试剂: 原位细胞凋亡检测试剂盒(Kit, AP)系德国 BOEHRINGER MANNHEIM 公司产品, 参照试剂盒设立对照组。蛋白酶 K 系 Sigma 公司产品。BCIP/NBT 底物液系 DAKO 公司产品。③ 末端脱氧核苷酸转移酶介导脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记(TdT-mediated dUTP nick end labelling, TUNEL): 石蜡包埋组织切片常规脱蜡至水→20 mg/L 蛋白酶 K 于 37 °C 消化 20 min→PBS 洗涤 3 次→参照试剂盒加 50 μL TUNEL 反应液, 于 37 °C 孵育 60 min→PBS 洗涤 3 次→加 50 μL 转换-AP 液, 于 37 °C 孵育 30 min→PBS 洗涤 3 次→加 50 μL NBT/BCIP 底物液, 于室温下显色 8 min→PBS 洗

去底物液→加 50 μL 甲基绿液, 或 2~3 滴核快红液, 复染色 5 min→洗去染色液→常规封片, 备镜检。④ 镜检: 高倍镜下于标本羊膜上皮层(Amion epithelial)观察 3~10 个不同视野, 共观察 200~600 个细胞核, 计数 TUNEL 染色阳性, 即细胞核染成深蓝色或紫黑色的细胞数和细胞总数, 并计算出羊膜上皮细胞凋亡指数(Apoptotic Index, AI)。AI 是以每 100 个细胞中的阳性细胞数表示(%)。同法分别计算出绒毛膜滋养细胞(Chorion trophoblast)、胎盘绒毛滋养细胞(Placental trophoblast)及蜕膜细胞层(Decidual cell layer)凋亡指数。

### 1.2.2 电子显微镜检测细胞凋亡

① 主要试剂和仪器: 前固定液(2.5%戊二醛+2.0%多聚甲醛+PBS 液配制而成)、后固定液(1%锇酸)、苯二甲酸二丙烯脂(PDAP)、包埋剂(LR. White)、70%饱和醋酸铀溶液、1:3 枸橼酸铅溶液及 EX 透射电镜均由中山医科大学肿瘤防治中心电镜室提供。② 电镜检测标本的制备: 将胎盘、胎膜组织切成长约 5.0 mm, 宽约 1.0 mm 大小→置入 40 倍于其体积的前固定液中固定 24 h, 4 °C 冰箱保存→0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次(15 min/次)→1%锇酸后固定液固定 1 h→0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次(15 min/次)→常规脱水→PDAP 渗透 24 h→LR. White 包埋 4 h→置入包埋板中, 65 °C 烤箱中聚合 24 h→半薄切片定位一切超薄切片→70%饱和醋酸铀溶液染色 5 min→1:3 枸橼酸铅复染 15 min→镜检。③ 电镜检查: 可观察到胎盘胎膜细胞特征性形态学的改变, 从而了解其细胞凋亡情况。

## 1.3 数据处理

利用 SPSS 8.0 For Windows 软件包进行统计分析。采用双变量 Spearman 相关分析分别对孕产妇年龄、孕龄、胎儿体质量与各标本 AI 的相关性进行检测; 采用独立样本 *t* 检验比较未临产组、潜伏期组、活跃期组、顺产组中男、女婴的各类细胞 AI 之间有无差异; 不同组间孕产妇年龄、孕龄、胎儿体质量、男女婴比例之间的差异和不同组间各类细胞 AI 之间的差异采用方差分析进行检测。

## 2 结果

### 2.1 各组病例临床情况及婴儿性别和 AI 的关系

经方差分析显示未临产组、潜伏期组、活跃期

组、顺产组之间在孕产妇的年龄、孕龄、新生儿体质量、新生儿男女比例上差异均无显著性 ( $P > 0.05$ ), 4 组病例男婴与女婴在羊膜上皮细胞 AI、绒毛膜滋养细胞 AI、胎盘绒毛滋养细胞 AI、蜕膜细胞 AI 之间差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 病例临床情况与 AI 的关系

采用双变量 Spearman 相关分析显示未临产组、潜伏期组、活跃期组、顺产组孕产妇的年龄、孕

龄、胎儿体质量与各组的羊膜上皮细胞 AI、绒毛膜滋养细胞 AI、胎盘绒毛滋养细胞 AI、蜕膜细胞 AI 之间无相关性。

### 2.3 胎盘胎膜组织的细胞凋亡情况

未临产组、潜伏期组、活跃期组和顺产组中的胎盘胎膜细胞凋亡指数各组间均有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 4 组病例胎盘胎膜细胞凋亡指数

Table 1 The AIs of placentas and fetal membranes among 4 groups

( $\bar{x} \pm s$ )

Apoptotic index(%)	Non-labor group	Latent stage group	Active stage group	Vaginal delivery group
Amnion epithelial	24.46 ± 1.76 <sup>2)3)4)</sup>	27.34 ± 1.41 <sup>1)3)4)</sup>	31.58 ± 1.36 <sup>1)2)4)</sup>	33.92 ± 1.30 <sup>1)2)3)</sup>
Chorion trophoblast	26.61 ± 2.07 <sup>2)3)4)</sup>	29.21 ± 1.23 <sup>1)3)4)</sup>	32.65 ± 1.13 <sup>1)2)4)</sup>	36.43 ± 1.89 <sup>1)2)3)</sup>
Placental trophoblast	41.48 ± 1.97 <sup>2)3)4)</sup>	44.17 ± 2.04 <sup>1)3)4)</sup>	45.66 ± 1.67 <sup>1)2)4)</sup>	49.21 ± 2.39 <sup>1)2)3)</sup>
Decidual cell layer	32.56 ± 2.28 <sup>2)3)4)</sup>	35.13 ± 2.14 <sup>1)3)4)</sup>	36.99 ± 1.95 <sup>1)2)4)</sup>	38.84 ± 2.24 <sup>1)2)3)</sup>

1) Compared to Non-labor group  $P < 0.01$ ; 2) Compared to Latent stage group,  $P < 0.01$ ; 3) Compared to Active stage group,  $P < 0.01$ ; 4) Compared to Vaginal delivery group,  $P < 0.01$

### 2.4 胎盘胎膜组织细胞凋亡的形态学观察

光镜下在羊膜上皮细胞、绒毛膜滋养细胞、胎盘绒毛滋养细胞、蜕膜细胞中均可见细胞核被染成深蓝色或紫黑色的凋亡细胞; 在核快红复染中非凋亡细胞的细胞核染成红色, 细胞浆染成粉红色; 在甲基绿复染中非凋亡细胞的细胞核染成绿色, 细胞浆染成浅绿色, 见图 1、2。电镜下观察羊膜上皮细胞、绒毛膜滋养细胞、胎盘绒毛滋养细胞、蜕膜细胞中的凋亡细胞, 主要表现为: 胞质空泡化现象明显, 胞核偏移, 染色质固缩, 常浓集于核膜下, 呈境界分明的块状小体, 细胞浆浓缩或裂解成质膜包绕的碎片, 内质网扩张形成膨胀小泡, 细胞质内可见完整的细胞器, 见图 3。

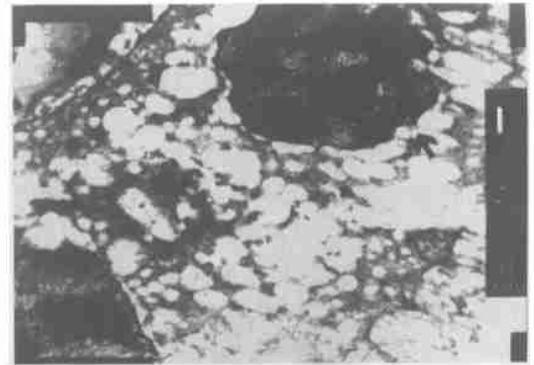


图 3 孕晚期绒毛膜滋养细胞中的凋亡细胞核(↑), 见染色质固缩, 聚集于核膜下, 胞质空泡化。透射电镜× 10 000

Fig. 3 The apoptotic nuclei(↑) in chorion trophoblasts in late pregnancy. chromatin condensed and surrounded nuclear membrane. cytoplasm vacuolated were seen. Transmission electron microscopy× 10 000

## 3 讨论

### 3.1 细胞凋亡的检测

细胞凋亡于 1972 年由英国病理学家 Kerr 等<sup>[2]</sup>发现之后, 人们对其进行了较多的研究。细胞凋亡是细胞受局部环境的生理或病理刺激引起的一种受基因调控的具有特征性形态学和生化的改变其细胞主动的、生理性的死亡。细胞凋亡在维持各组织和器官的细胞数目恒定与生长平衡乃至机体衰老方面起着重要的作用。

生化检测与基因检测等方面。本实验中利用 TUNEL 法检测凋亡细胞, 因为细胞发生凋亡时由内源性核酸内切酶所致的 DNA 断裂, 其断端 3' 端羟基 (3'-OH) 暴露, 这是细胞凋亡的特征之一。这样在末端脱氧核苷酸转移酶 (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 的作用下进行 3'-OH 端的脱氧核苷酸合成, 使被标记的脱氧核苷酸在位

目前检测凋亡细胞的常用方法有形态学检测

结合到凋亡细胞的 3'-OH 端, 再通过检测标记物即可检测出凋亡的细胞。TUNEL 法标记 DNA 断裂点 3'-OH 可较精确的检测凋亡细胞中的片段化 DNA, 由于细胞在标记前已被固定, 故小分子量的 DNA 不会迁移出细胞而丢失, TUNEL 法可以标记 DNA 单链和双链断裂末端, 由凋亡引起的 DNA 损伤均可被标记和检测。另外, TUNEL 法可直接标记 DNA, 非特异背景低, 在实验不同阶段还可分别用荧光显微镜和光学显微镜立即观察, 较其它观察标记 DNA 的方法耗时更少、更简单, 是目前常用的原位细胞凋亡检测方法<sup>[3~9]</sup>。而凋亡研究始于形态学观察, 形态学表现是凋亡研究的出发点, 是经典的也是最权威的标准, 但形态学检测方法只能定性, 不能定量。因此, 本实验中选择了用 TUNEL 法检测细胞凋亡并进行定量分析, 为进一步验证 TUNEL 法的研究结论, 我们又进行了电镜观察。光镜下我们发现在羊膜上皮细胞、绒毛膜滋养细胞、胎盘绒毛滋养细胞、蜕膜细胞层中均可见细胞核被染成深蓝色或紫黑色的凋亡细胞, 进一步电镜下观察均可见到凋亡的典型表现。

### 3.2 孕晚期不同产程的胎盘、胎膜组织凋亡与分娩发动

本实验中用 TUNEL 法检测, 在羊膜上皮细胞、绒毛膜滋养细胞、胎盘绒毛滋养细胞、蜕膜细胞中均见到凋亡细胞。孕晚期未临产组的细胞凋亡指数结果是: 在羊膜上皮细胞中为 24.46% ± 1.76%, 在绒毛膜滋养细胞中为 26.61% ± 2.07%, 在蜕膜细胞中为 32.56% ± 2.28%, 与 Runic-R 等<sup>[10]</sup>的研究结果相一致。

本实验结果显示羊膜上皮细胞 AI、绒毛膜滋养细胞 AI、胎盘绒毛滋养细胞 AI 与蜕膜细胞 AI 在未临产组与潜伏期组之间、未临产组与活跃期组之间、未临产组与顺产组之间、潜伏期组与活跃期组之间、潜伏期组与顺产组之间、活跃期组与顺产组之间均存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 且羊膜上皮细胞 AI、绒毛膜滋养细胞 AI、胎盘绒毛滋养细胞 AI 与蜕膜细胞 AI 均随未临产组、潜伏期组、活跃期组、顺产组的顺序增大。说明随分娩发动和产程的进展, 胎盘、胎膜组织中发生凋亡的细胞逐渐增多, 产程进展越到后期发生凋亡的细胞数目也越来越多, 说明胎盘、胎膜细胞凋亡的变化与分娩发动

和产程进展有关。

目前关于分娩动因的学说众多, 认为催产素、雌激素、孕酮、前列腺素和宫颈成熟的作用较为重要, 关于这些方面的研究相对较多见。胎盘及胎膜细胞凋亡与这些内分泌因素的相关性尚需进一步研究。

(本文图 1, 2 见插页 1)

### 参考文献:

- [1] 尚丽新. 正常分娩. 见: 李巨主编. 产科理论与手术 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1998. 147~152.
- [2] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239.
- [3] Sugamura K, Makino M, Shirai H, *et al.* Enhanced induction of apoptosis of human gastric carcinoma cells after preoperative treatment with 5-Fluorouracil [J]. Cancer, 1997, 79(1): 12.
- [4] Hasegawa W, Wilson G, Russell L D, *et al.* Radiation-induced cell death in the mouse testis: relation to apoptosis [J]. Radiat Res, 1997, 147(4): 457.
- [5] Colechia M, Frigo B, Del Boca G, *et al.* Detection of apoptosis by the TUNEL technique in clinically evident prostatic cancer before and after combined endocrine therapy [J]. J Clin Pathol, 1997, 50(5): 384.
- [6] Crader M, Mazur J, Pettersson M, *et al.* Prognostic significance of proliferative and apoptosis fractions in low grade follicle center cell-derived non-Hodgkin's lymphomas [J]. Cancer, 1996, 77(6): 1180.
- [7] Bodis S, Sizopikon K P, Schnitt S T, *et al.* Extensive apoptosis in ductal carcinoma in situ of the breast [J]. Cancer, 1996, 77(9): 1831.
- [8] Koike M. Significance of spontaneous apoptosis during colorectal tumorigenesis [J]. J Surg Oncol, 1996, 62(2): 97.
- [9] Tsujitani S, Shirai H, Tatebe S, *et al.* Apoptosis cell death and its relationship to carcinogenesis in colorectal carcinoma [J]. Cancer, 1996, 77(8 Suppl): 1711.
- [10] Runic R, Lockwood C J, Lachapelle L, *et al.* Apoptosis and Fas expression in human fetal membranes [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(2): 660.

(编辑 关淡庄)

## 产程中胎盘胎膜细胞凋亡的关系 (正文见第 337 页)

The Change of Cellular Apoptosis in Placentas and Fetal Membranes in Labor(Text in page)

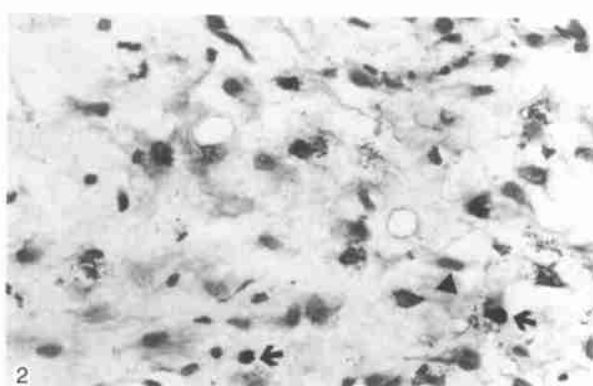
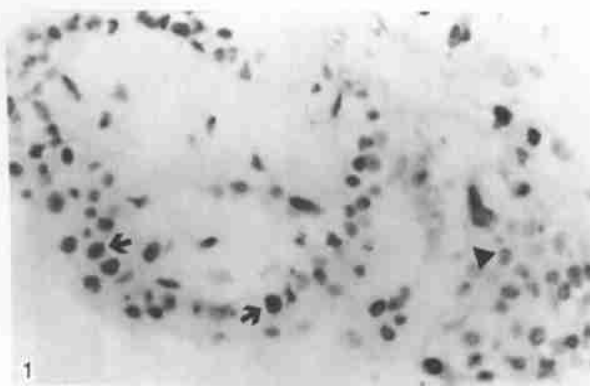


图 1 孕晚期胎盘滋养细胞中见凋亡细胞核(↑)呈紫黑色,核快红复染将非凋亡细胞核(▲)染成红色

图 2 孕晚期绒毛膜滋养细胞中见凋亡细胞核(↑)呈紫黑色,甲基绿复染将非凋亡细胞核(▲)染成浅蓝色

Fig. 1 The apoptotic nuclei(↑)were stained purple - black color in placental trophoblasts in late pregnancy, and the non - apoptotic nuclei(▲)were counter - stained into red with nuclear fast red. TUNEL × 400

Fig. 2 The apoptotic nuclei(↑) were stained purple - black color in chorion trophoblasts in late pregnancy, and the non - apoptotic nuclei(▲)were counter - stained into cambridge blue with methyl green. TUNEL × 400

## 胆囊癌组织中 CD44v6 和 nm23 表达的意义 (正文见第 358 页)

The Expression and Significance of CD44v6 and nm23 Proteins in Carcinoma of Gallbladder

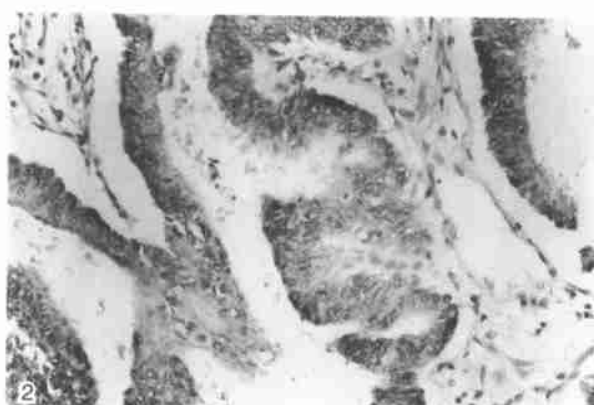
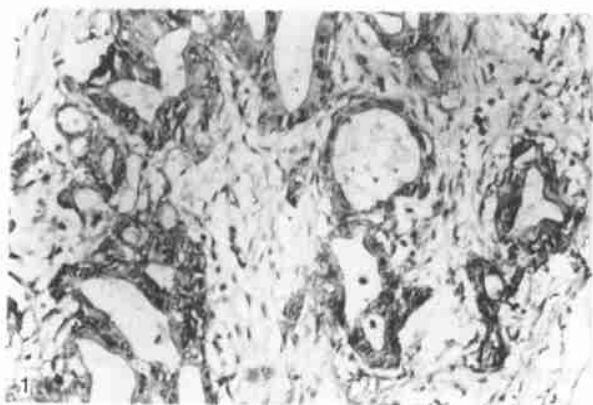


图 1 胆囊癌组织 CD44v6 表达阳性

图 2 胆囊癌组织 nm23 表达阳性

Fig. 1 Positive expression of CD44v6 of carcinoma of gallbladder ( × 200 )

Fig. 2 Positive expression of nm23 of carcinoma of gallbladder ( × 200 )