

反复自然流产患者滋养细胞凋亡相关基因表达谱

丁裕斌 付利娟^{1*}(重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400016; ¹重庆医科大学中医药学院, 重庆 400016)

摘要 采用全基因组表达芯片技术研究反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)患者与正常早孕妇女滋养细胞(trophoblast, TB)中凋亡相关基因表达差异, 探寻RSA发病机制。收集正常妊娠和RSA妇女胚胎绒毛, 分离滋养层细胞并进行原代培养, 提取细胞总RNA, 逆转录为双链cDNA后制备生物素标记的cRNA探针, 探针与Affymetrix U133 plus2.0基因芯片杂交后, 经Affymetrix GeneChip Scanner 3000读取荧光图象、GeneChip Operating software (GCOS)软件分析后, 将数据导入GeneSpringGX软件分析, 获得了差异表达(≥ 2)凋亡相关基因75个, 其中表达上调23个, 下调52个。层次聚类结果显示, 凋亡相关基因在两类细胞中表现出明显的差异: RSA患者分离的TB细胞中, 促凋亡基因多表现为表达上调, 而凋亡抑制基因则多表现为表达下调。差异表达的凋亡相关基因涉及两条重要的信号转导通路, 即Foxo家族信号通路和IL6介导的信号转导通路。这些研究结果为不明原因反复自然流产的病因研究打下了实验基础。

关键词 反复自然流产; 滋养细胞; 基因芯片; 基因表达谱; 凋亡

细胞凋亡(亦称细胞程序化死亡)是生命体的重要特征之一, 它不仅可以通过清除肌体受损的组织细胞, 同时也是正常组织器官发育和生存所必需的生理过程。几乎在所有生物中, 细胞凋亡在维系肌体平衡方面发挥着重要功能。研究发现, 细胞凋亡可能在胎盘绒毛组织结构分化及功能完善等方面起重要的作用^[1]。由绒毛组织分化而来的功能细胞——滋养细胞(trophoblast, TB)在胚胎植入子宫内膜、成功建立母胎间联系这一生理过程中发挥着重要的作用^[2]。TB细胞在增殖和凋亡这两个不同生理过程作用下维系其平衡状态。细胞凋亡过度, 可能与部分原因不明的反复自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)相关^[3]。

RSA患者约占育龄妇女的1%~2%, 该病原因复杂。其中40%~80%的RSA与多种自身免疫性抗体、封闭抗体、细胞因子、人类白细胞抗原、滋养叶淋巴细胞交叉抗原、血型抗原、细胞生长因子以及细胞黏附分子等多种免疫因素有关^[4]。除此之外, 导致RSA的另一个主要因素即可能是执行侵入功能的滋养细胞发生过度的凋亡^[5-7]。但是, 在RSA患者TB细胞中, 诸多凋亡相关基因表现如何, 它们参与了哪些信号通路, 目前都不明了。本文利用全基因组表达芯片技术研究了RSA患者与正常早孕妇女TB细胞中凋亡相关基因表达差异, 这将有助于我们更全面地探寻RSA的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料

研究得到重庆医科大学健康与伦理委员会批准, 所有临床病理及正常对照材料的收集均得到病人知情同意。21名被确诊为原因不明的RSA患者和40名正常对照早孕妇女绒毛及子宫内膜均收集自重庆医科大学附属第一医院, 对照材料取自年龄及孕周与RSA患者相匹配的自愿终止妊娠妇女。反复自然流产妇女平均年龄为 28.5 ± 3.65 岁, 对照组为 27.6 ± 2.13 岁; 反复自然流产组妇女孕周为 9.1 ± 2.36 周, 对照组为 8.5 ± 2.10 周。不明原因反复自然流产和正常早孕判断标准如下:

不明原因早期自然流产组 女方无全身性疾病; 患者有3次或3次以上自然流产史, 而无活产、死产、死胎史; 经检查未发现任何导致流产的常见病因; 3个月内及出现流产征兆后未使用任何激素类药物; 男方精液检查正常范围; 近期无急、慢性传染病; 排除生殖道各种感染; 抗磷脂抗体、抗核抗体、抗精子抗体等均在正常范围; 无宫内节育器; RSA诊断标准参见《中华妇产科学》^[8]。

收稿日期: 2008-11-05 接受日期: 2009-02-25

重庆医科大学校办基金(No.XBYB2007111)、重庆市科委自然科学基金(No.CSTC, 2007BB5286)资助

* 通讯作者。Tel: 023-60999358, Fax: 023-68485008, E-mail: fulijuan7101@yahoo.com.cn

正常早孕组 无全身性疾病;末次月经时间准确,孕12周以内;停经后无腹痛、阴道流血等;无自然流产、难产、早产、死胎、死产等异常孕史;3个月内未使用任何激素类药物;生殖道无急、慢性炎症;无宫内节育器,B超检查确诊为宫内活胎妊娠;自愿要求行人工流产终止妊娠的妇女。

1.2 滋养细胞的分离与原代培养

正常早孕 TB 原代培养细胞由翁亚光等^[9]提供。滋养细胞原代培养采用胰酶消化法。方法如下:将绒毛组织剪碎,瓶内加入适量含 0.25 g 胰酶、0.1 g 胶原酶 III (Sigma)、100 ml PBS 的消化液,消化 10 min,200 目筛网过滤后离心(800 r/min, 5 min),用含 80 ml DMEM 培养基(Sigma)、20 ml PBS 的细胞培养液重悬,将终浓度为 1×10^5 个/ml 细胞接种,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。培养 7~10 d 进行第 1 次传代,每隔 3~4 d 根据细胞生长情况进行再传代。RSA 患者 TB 细胞的分离与原代培养参照此方法进行。原代培养细胞培养至第五代,收获细胞备用。

1.3 RNA 抽提与基因芯片杂交

分别取 RSA 患者及正常对照的原代培养 TB 细胞各 3 瓶,培养至第五代后收集并混合。根据试剂盒说明书,采用 RNeasy kit (Invitrogen)抽提总 RNA, RNeasy kit (Qiagen)纯化。提取的总 RNA 和纯化后的 RNA 采用 A_{280}/A_{260} 比值确定其纯度,2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 片段完整性。采用 Super Script Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)将纯化后的 RNA 逆转录为双链 cDNA; RNeasy Mini Kit (Qiagen)纯化 cDNA 后,在 Enzo BioArray High Yield RNA T7 Transcript Labeling Kits (Enzo)作用下体外合成互补 cRNA。cRNA 的纯化采用 RNeasy spin columns (QIAGEN);随后在片段化试剂(200 mmol/L Tris, pH 8.1; 500 mmol/L KOAc; 150 mmol/L MgOAc)作用下,将 cRNA 切割为 50~200 核苷酸大小的片段。将每组 10 mg cRNA 的 200 ml 杂交混合液,与 HG U133 Plus 2.0 表达谱芯片(Affymetrix)各进行一次杂交。杂交芯片洗涤后,采用 streptavidin phycoerythrin 染色,再次洗涤后,与生物素标记的 anti-streptavidin phycoerythrin 抗体进行杂交,并采用 Affymetrix GeneChip Fluidics (Affymetrix)对芯片进行再次染色。荧光图象扫描采用 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix),芯片数据读取及处理采用 GeneChip Operating software (GCOS) (Affymetrix)。

1.4 芯片数据归一化及探针过滤

Affymetrix GCOS 获取 RSA 组和对照组探针杂交信号强度信息的数据(CEL 格式)后,导入分析软件 GeneSpring GX 9.0.6 版(Agilent Technologies),采用 Robust Multichip Average (RMA)和基线中位数转换进行数据归一化。随后,根据探针杂交信号强度值,并通过设定表达信号百分位数限定值(低位20.0%,高位100.0%),在 95% 可信限下去除无关基因探针,完成探针过滤。

1.5 生物信息学分析

基于差异信号表达数据 \log_2 转化值,选择过滤后的探针进行基因表达差异数据分析(fold change analysis)。选择差异表达基因的标准为表达差异值 ≥ 2.0 (表达上调 ≥ 2.0 ; 表达下调 ≤ -2.0)。选择全部差异基因进行基因功能分类(Gene Ontology, GO),获取凋亡相关基因亚类,同时进行层次聚类(hierarchical clustering)。不同样本组基因差异表达模式相似性采用欧几里德距离法(Euclidean distance)进行计算。凋亡相关差异表达基因信号通路分析采用 Genespring GX,即从相关网站(<http://pid.nci.nih.gov/>; <http://www.inoh.org/>; <ftp://ftp.genome.jp/pub/db/community/biopax/>)下载 OWL 格式的信号通路数据,导入 Genespring GX,然后根据说明书操作,完成凋亡相关基因信号通路分析。

2 结果

2.1 样本及芯片杂交质量控制

原代培养细胞抽提的总 RNA,经分光光度计检测 A_{280} 、 A_{260} 的吸光度,确定样品的浓度和纯度,测得 A_{280}/A_{260} 值均 >1.9 ,表明所提取总 RNA 纯度较高,且没有蛋白质和 DNA 残留。2% 琼脂糖凝胶电泳分析,不同病理状态下组织分离培养的滋养细胞 28 S rRNA 和 18 S rRNA 电泳条带清晰,28 S 条带无明显降解(图 1),说明总 RNA 质量完好,结果合格,可进行下一步实验。体外合成的 cRNA 电泳结果显示,片段大小较为集中,符合进一步片段化、探针标记和杂交的要求(图 2)。

将正常早孕组织和 RSA 患者组织分离原代培养 TB 细胞的 cRNA 标记后,分别与含有 54 756 条转录本的芯片杂交,杂交信号强度的散点图显示杂交结果符合质量控制标准,信号强度达到要求(图 3)。图中 X 轴表示正常组织分离原代培养 TB 信号值, Y 轴表示 RSA 患者组织分离原代培养 TB 细胞信号值,红色的点表示两组中该均被检出,蓝色点表示两组中有一



Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from primarily cultured trophoblast cells isolated from normal pregnant women (lane 1) and patients with RSA (lane 2)



Fig.2 Agarose gel electrophoresis of cRNA fragmentation of primarily cultured trophoblast cells isolated from normal pregnant women (lane 1) and patients with RSA (lane 2)

个值未被检出,黄色点表示该基因在两组均未被检出。

2.2 凋亡相关差异表达基因

芯片数据归一化后,根据探针杂交信号强度值,设定表达信号百分位数限定值,在95%可信限下去除无关基因探针,共获得45 108个转录本(蓝色)。以常用的表达差异大于2倍作为判别基因差异表达的标准,获得2 108个差异表达基因(绿色),其中75个为凋亡相关基因(红色)(图4)。

2.3 凋亡相关差异表达基因聚类

选择表达差异在2倍以上的基因进行基因功能分类后,将获得的75个凋亡相关基因亚类进行层次聚类,不同样本组基因差异表达模式相似性采用欧几里德距离法进行计算,获得层次聚类图(图5)。图中可明显看出,原代培养的滋养层细胞差异表达的凋亡相关基因在RSA组和正常早孕组间表现出明显的差异。促凋亡基因多表现为表达上调,而凋亡抑制基因则多表现为表达下调。

2.4 凋亡相关差异表达基因

基于差异信号表达数据 \log_2 转化值,以表达差异值大于2.0(表达上调 ≥ 2.0 和表达下调 ≤ -2.0)为标准,2 108条显著表达基因中,凋亡相关基因75个,占所有差异表达基因的3.56%,其中表达上调23个,下调52个。表1列出了差异表达的凋亡相关基因,其中*KRT18*为表达上调变化最大的凋亡相关基因,表达下调最大的转录本是一个功能未完全阐明的EST序列。所有差异表达凋亡相关基因中,诱导细胞凋亡的基因多表现为表达上调,例如*RASA1*(上调28.49倍)、*CD24*(上调4.85倍)、*CDC2*(上调5.03倍)、*PRDX2*(上调6.56倍)和*TOP2A*(上调4.22倍)等,这与我们的实验预期基本一致,即RSA患者TB细胞在促凋亡因子过高表达作用下呈过度凋亡状态;另外,抗凋亡基因多表现为下调,如*VEGFA*(下调24.44倍)、*SOD2*(下调19.09倍)、*MMP9*(下调14.77倍)、*IL2RB*(下调9.38倍)、*TNFAIP3*(下调6.81倍)和*ESR1*(下调5.29倍)等。其中*MMP9*^[10]和*VEGF*^[11]已被证实RSA中表达下调。上述差异表达基因数据有待实验进一步验证。

2.5 凋亡相关差异表达基因信号通路

Genespring GX分析结果显示,差异表达的凋亡相关基因主要涉及两条重要的信号转导通路,即Foxo家族信号通路和IL6介导的信号转导通路。Foxo家族信号通路共48个节点,其中有5个节点基因与实验中差异表达凋亡相关基因匹配,*P*值为0.02;IL6介导的信号通路共有56个节点,其中5个与差异表达凋亡相匹配,*P*值为 8.22×10^{-5} (表2)。

3 讨论

RSA是一种常见的妊娠并发症,病因极其复杂,其中不明原因者约占40%~80%。目前,已有部分试验证实TB细胞凋亡量的异常与部分原因不明的RSA相关。凋亡相关基因的功能是呈网络调控形式存在的,众多凋亡相关基因的异常表达可能最终导致了部分原因不明的RSA。Kokawa等^[12]发现早孕自然流产者的绒毛组织中可见到特征性的细胞凋亡,且其凋亡量较正常妊娠有明显增加。Vadallo等^[13]报道,随着RAS的发生,孕3月内的绒毛组织中的细胞凋亡较正常早孕明显增强。这都可能是由于凋亡明显增加时,胎盘屏障的完整性受到破坏,从而导致流产的发生,两者互相促进,形成恶性循环。刘玉昆等^[14]发现不明原因RSA患者的绒毛TB细胞*FasL*表达弱于正常者,提

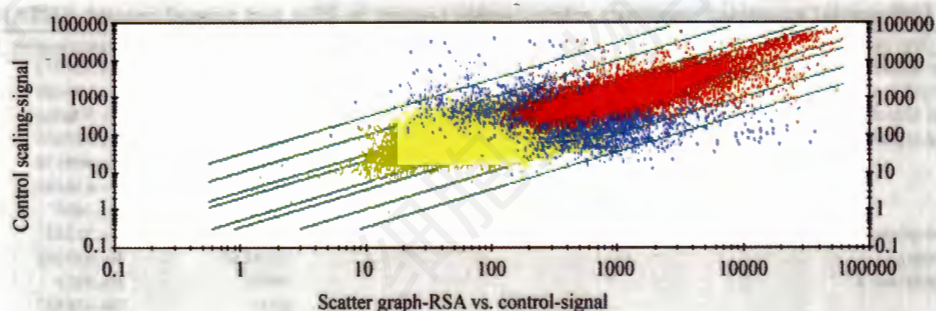


Fig.3 Scatter plots comparing RSA vs. control



Fig.4 Venn diagram demonstrating the distribution of filtered and significant regulated genes

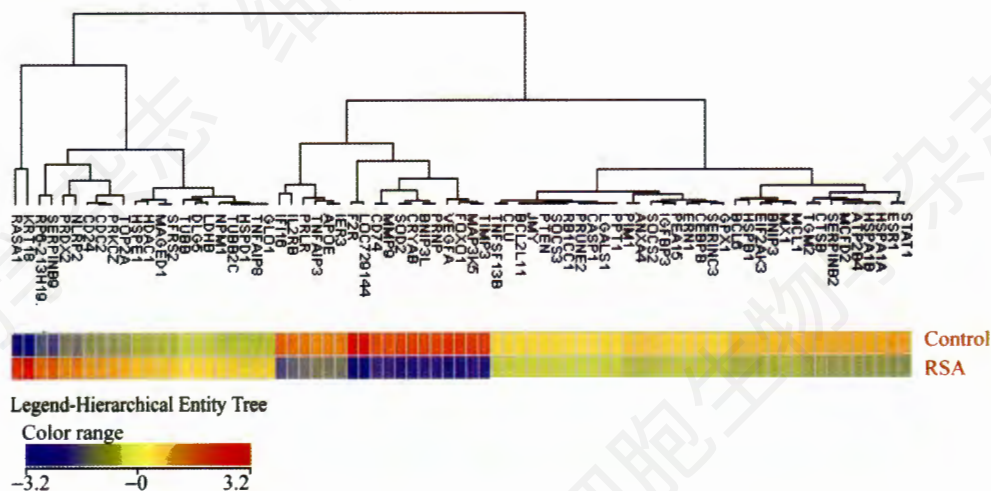


Fig.5 Heat map of differentially expressed apoptosis related genes (red denotes up-regulated, yellow denotes intermediate, and blue denotes down-regulated expression levels)

示TB细胞 *FasL* 的表达减少可能在RSA中起重要作用。Choi等^[5]发现凋亡相关因子基质金属蛋白酶2 (*MMP2*)、转化生长因子(*TGF-β*)、血管内皮生长因子(*VEGF*)、I型纤维蛋白溶解酶原激活因子抑制因子(*PAI-1*)、半胱天冬酶(*caspase-3, 6, 7, 8, 9, 10, 12*)、

BAD、*BAX*、*BID*、*Fas*和*FasL*在RSA患者绒毛中表达下调。这些都说明凋亡相关基因表达异常与RSA密切相关。

我们的实验结果显示,参与RSA凋亡网络调控的相关基因表达差异明显,其中包括部分与TB细胞

Table 1 Differential expressed apoptosis related genes present in RSA and normal control ([RSA] vs. [control])

Gene name	Gene symbol	Unigene number	Fold change
Suppressor of cytokine signaling 3	<i>SOCS3</i>	Hs.527973	-2.001188
RB1-inducible coiled-coil 1	<i>RB1CC1</i>	Hs.196102	-2.011261
Phosphatase and tensin homolog	<i>PTEN</i>	Hs.500466	-2.029594
Junction-mediating and regulatory protein	<i>JMY</i>	Hs.482605	-2.035858
BCL2-like 11	<i>BCL2L11</i>	Hs.469658	-2.054942
Tubulin beta	<i>TUBB</i>	Hs.636480	+2.057521
Caspase 1	<i>CASP1</i>	Hs.2490	-2.07465
Prune homolog 2 (Drosophila)	<i>PRUNE2</i>	Hs.262857	-2.08496
Lectin galactoside-binding	<i>LGALS1</i>	Hs.445351	-2.105651
Palmitoyl-protein thioesterase 1	<i>PPT1</i>	Hs.3873	-2.115255
Clusterin	<i>CLU</i>	Hs.436657	-2.153254
Tumor necrosis factor superfamily member 13b	<i>TNFSF13B</i>	Hs.525157	-2.202036
Discs large homolog 5 (Drosophila)	<i>DLG5</i>	Hs.652690	+2.20577
Lactate dehydrogenase B	<i>LDHB</i>	Hs.446149	+2.306318
Serine incorporator 3	<i>SERINC3</i>	Hs.272168	-2.358659
Glutathione peroxidase 1	<i>GPX1</i>	Hs.76686	-2.375837
Nucleophosmin	<i>NPM1</i>	Hs.557550	+2.401419
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) beta	<i>CEBPB</i>	Hs.517106	-2.43702
Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	<i>ERN1</i>	Hs.356481	-2.442647
Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin)	<i>HSPD1</i>	Hs.632539	+2.457117
Tubulin beta 2C	<i>TUBB2C</i>	Hs.433615	+2.481674
Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	<i>PEA15</i>	Hs.517216	-2.510459
Glyoxalase I	<i>GLO1</i>	Hs.268849	+2.52271
Tumor necrosis factor alpha-induced protein 8	<i>TNFAIP8</i>	Hs.656274	+2.527791
Insulin-like growth factor binding protein 3	<i>IGFBP3</i>	Hs.450230	-2.540388
Suppressor of cytokine signaling 2	<i>SOCS2</i>	Hs.485572	-2.615694
Pim-1 oncogene	<i>PIM1</i>	Hs.81170	-2.859878
Annexin A4	<i>ANXA4</i>	Hs.422986	-2.864096
Melanoma antigen family D	<i>MAGED1</i>	Hs.5258	+2.946048
Splicing factor arginine	<i>SFRS2</i>	Hs.700144	+2.992535
Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	<i>MCL1</i>	Hs.632486	-3.154447
Heat shock 10 kDa protein 1	<i>HSPE1</i>	Hs.1197	+3.173823
Myxovirus (influenza virus) resistance 1 interferon-inducible protein p78 (mouse)	<i>MX1</i>	Hs.517307	-3.222727
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	<i>BNIP3</i>	Hs.144873	-3.288045
Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3	<i>EIF2AK3</i>	Hs.591589	-3.344682
Histone deacetylase 1	<i>HDAC1</i>	Hs.88556	+3.353932
Heat shock 27 kDa protein 1	<i>HSPB1</i>	Hs.520973	-3.469742
B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	<i>BCL6</i>	Hs.478588	-3.678569
Cathepsin B	<i>CTSB</i>	Hs.520898	-4.024533
Transglutaminase 2	<i>TGM2</i>	Hs.517033	-4.073966
Topoisomerase (DNA) II alpha 170 kDa	<i>TOP2A</i>	Hs.156346	+4.22011
Heat shock 70 kDa protein 1A	<i>HSPA1A</i>	Hs.520028	-4.347172
Heat shock 70 kDa protein 1B	<i>HSPA1B</i>	Hs.274402	-4.385676
Multiple coagulation factor deficiency 2	<i>MCFD2</i>	Hs.293689	-4.456215
ATPase Ca ²⁺ transporting plasma membrane 4	<i>ATP2B4</i>	Hs.343522	-4.474476
Serpin peptidase inhibitor clade B member 2	<i>SERPINB2</i>	Hs.594481	-4.684947
CD24 molecule	<i>CD24</i>	Hs.694721	+4.845247
Cell division cycle 2 G ₁ to S and G ₂ to M	<i>CDC2</i>	Hs.334562	+5.033872
Protein kinase C zeta	<i>PRKCZ</i>	Hs.496255	+5.130804
Signal transducer and activator of transcription 1	<i>STAT1</i>	Hs.642990	-5.273061
Estrogen receptor 1	<i>ESR1</i>	Hs.208124	-5.285904
Peroxisome oxidin 2	<i>PRDX2</i>	Hs.432121	+6.564015
Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	<i>TNFAIP3</i>	Hs.591338	-6.814483
Apolipoprotein E	<i>APOE</i>	Hs.654439	-7.251988
Immediate early response 3	<i>IER3</i>	Hs.591785	-7.334005
NLR family pyrin domain containing 2	<i>NLRP2</i>	Hs.369279	+7.794869
Prolactin receptor	<i>PRLR</i>	Hs.368587	-8.049088
Interleukin 2 receptor beta	<i>IL2RB</i>	Hs.474787	-9.381486
Serine/threonine protein kinase MST4	<i>RP6</i>	Hs.444247	+10.11096
Interferon gamma-inducible protein 16	<i>IFI16</i>	Hs.380250	-11.41617
Serpin peptidase inhibitor clade B member 9	<i>SERPINB9</i>	Hs.104879	+11.75809
CD74 molecule major histocompatibility complex class II invariant chain	<i>CD74</i>	Hs.436568	-14.60389
Matrix metalloproteinase 9	<i>MMP9</i>	Hs.297413	14.77301
BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like	<i>BNIP3L</i>	Hs.131226	-18.01401
Prion protein	<i>PRNP</i>	Hs.472010	-18.22021
Superoxide dismutase 2	<i>SOD2</i>	Hs.487046	-19.08869
Crystallin alpha B	<i>CRYAB</i>	Hs.408767	-19.14167
Vascular endothelial growth factor A	<i>VEGFA</i>	Hs.73793	-24.43911
Forkhead box O1	<i>FOXO1</i>	Hs.370666	26.10318
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	<i>MAP2K5</i>	Hs.186486	-26.80612
TIMP metalloproteinase inhibitor 3	<i>TIMP3</i>	Hs.701968	-27.41766
RAS p21 protein activator 1	<i>RASA1</i>	Hs.695926	+28.48797
Coagulation factor II (thrombin) receptor	<i>F2R</i>	Hs.482562	-40.88805
LOC729144		Hs.648075	-42.93284
Keratin 18	<i>KRT18</i>	Hs.406013	+52.00769

Table 2 Pathway analysis of differential expressed apoptotic genes

Signal pathway	No. of nodes	No. of matched genes	P value
FoxO family signaling	48	5	0.020845
IL6-mediated signaling events	56	5	8.22E-05

侵入能力相关的因子,如MMP、组织抑制因子、生长转化因子、白细胞介素家族、补体调节蛋白以及胰岛素生长因子等。MMP能够降解细胞外基质,滋养层细胞可通过分泌MMP使其具有侵入组织的能力,这种侵入能力的差异与MMP2和MMP9的表达差异密不可分。Bass等^[16]发现人类滋养层细胞表达TIMP3 (TIMP metalloproteinase inhibitor 3),且其表达变化与MMP9是同步的,当细胞滋养层细胞完全分化为侵袭性的滋养层细胞时,这两种分子的表达水平达到最高。二者的相互作用,对调节滋养层细胞在子宫组织中的侵入深度起一定作用。我们的实验在RSA中发现MMP9和TIMP3表达不同步,前者表达上调4.77倍,而后者表达下调27.42倍,说明RSA患者TB细胞中MMP表达存在异常。VEGF参与正常妊娠、胎盘血管生成的调节和TB细胞生理性的侵入,其可增加滋养层细胞的运动特性、形成吸引滋养层细胞向蜕膜迁移的起始动力,因而胎盘中VEGF及其受体表达降低,会导致血VEGF水平下降、滋养细胞分化异常,造成滋养细胞侵入缺陷^[17]。同时低的VEGF表达,可造成胎盘血管形成障碍,这是胚胎死亡的一个重要原因。本实验中VEGF表达下调24.44倍,下调非常明显,与Choi等^[15]在RSA患者绒毛中的表达检测结果一致。另有研究显示雌激素与受体结合促进VEGF分泌,我们的实验发现ESR1表达下调5.29,也证实了这一结论。人类子宫完整的IGF系统被认为与着床前胚胎发育、调节滋养细胞侵入蜕膜、促进胎盘和胚胎的生长发育等过程有关。在母胎界面上,IGFBP1可与侵蚀性滋养细胞产生的IGF II结合,抑制滋养细胞的侵蚀。IGFBP1还可作为整合素配体,直接与绒毛外细胞滋养细胞作用,促进移行和侵蚀^[18]。本实验中虽未发现上述两种因子,但检测到了其同系物IGFBP3的表达(下调2.54倍)。白细胞介素家族在TB细胞侵袭能力的改变中亦起着重要作用,实验数据显示,IL2RB在RSA的TB细胞中表达下调9.38倍,同时还发现RSA滋养细胞异常表达的凋亡相关基因涉及IL6介导的细胞信号通路。另外,补体调节蛋白可能在母胎界面参与了滋养层细胞侵入的调节。我们的实验中CD24上调4.85倍、CD74下调14.60倍,在此前的RSA相关研究中未见报道,这两种因子在RSA

中的作用有待进一步的实验确认。

实验结果还显示,参与RSA的凋亡网络调控的因子中还包括与微管形成相关的基因,如TUBB(上调2.06倍)和TUBB2C(上调2.48倍),有丝分裂相关基因CDC2(上调5.03倍)和HDAC1(上调3.35倍),这些基因都与细胞的分裂增殖相关,它们的表达上调说明细胞的增殖过程在RSA中表现较为正常,表明细胞增殖相关的凋亡基因对RSA的流产贡献极小。而热激蛋白是我们实验中出现的较一类较多的异常表达伴侣分子,这些分子包括HSPD1、HSPE1、HSPB1、HSPA1A和HSPA1B,它们与免疫应激相关,主要作用是抑制过度的免疫反应。Sotiriou等^[19]报道HSP70和HSP90在早期流产孕妇中表达上调,而我们的实验结果显示,不同HSP的表达有上调亦有下调,说明HSP基因在RSA中的表现并不一致,因此也很难判断热激蛋白的表达异常是否与RSA相关。另外,实验还发现RSA的TB细胞中凋亡相关基因表达异常涉及FoxO家族信号通路,这一信号通路在细胞凋亡中起着重要作用,而它在RSA中的相关作用如何亦有待进一步的实验进行证明。

参考文献(References)

- [1] Qumsiyeh MB, Kim KR, Ahmed MN, et al. Cytogenetics and mechanisms of spontaneous abortions: increased apoptosis and decreased cell proliferation in chromosomally abnormal villi, *Cytogenet Cell Genet*, 2000, 88(3-4): 230-235
- [2] Pang ZJ, Zhou JG, Huang LP. Interleukin-10 may participate in regulating trophoblast invasion in human placenta throughout gestation, *Am J Reprod Immunol*, 2008, 60(1): 19-25
- [3] Lee Jiae, Choi BC, Cho C, et al. Trophoblast apoptosis is increased in women with evidence of TH1 immunity, *Fertil Steril*, 2005, 83(4): 1047-1049
- [4] Jerzak M, Rechberger T, Baranowski W, et al. Immunotherapy as an effective treatment of recurrent spontaneous abortion—own experience, *Ginekol Pol*, 2003, 74(10): 1107-1111
- [5] Kajino T, Torry DS, McIntyre JA, et al. Trophoblast antigens in human seminal plasma, *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1988, 17(3): 91-95
- [6] Yamada H, Polgar K, Hill JA. Cell-mediated immunity to trophoblast antigens in women with recurrent spontaneous abortion, *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 170(5Pt1): 1339-1344
- [7] Bulla R, de Guarrini F, Pausa M, et al. Inhibition of trophoblast adhesion to endothelial cells by the sera of women with recurrent spontaneous abortions, *Am J Reprod Immunol*, 1999, 42(2):

- 116-123
- [8] 曹泽毅主编. *中华妇产科学*, 北京: 人民卫生出版社, 1999, 368-380
- [9] 施琼, 朱旦, 王箭, 等. 原代绒毛滋养层细胞培养及转染研究, *第三军医大学学报*, 2007, 29(11): 1203-1206
- [10] Baek KH. Aberrant gene expression associated with recurrent pregnancy loss, *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(5): 291-297
- [11] Vuorela P, Carpén O, Tulppala M, *et al.* VEGF, its receptors and the Tie receptors in recurrent miscarriage, *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(3): 276-282
- [12] Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle, *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(11): 4144-4147
- [13] Vadiello Ortega F, Avila Vergara MA, Hernández Guerrero C, *et al.* Apoptosis in trophoblast of patients with recurrent spontaneous abortion of unidentified cause, *Ginecol Obstet Mex*, 2000, 68: 122-131
- [14] 刘玉昆, 张建平, 祁健全, 等. 复发性自然流产患者绒毛滋养细胞 FasL 的表达, *免疫学杂志*, 2004, 20(3): S143-S146
- [15] Choi HK, Choi BC, Lee SH, *et al.* Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients, *Mol Reprod Dev*, 2003, 66(1): 24-31
- [16] Bass KE, Li H, Hawkes SP, *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression is upregulated during human cytotrophoblast invasion *in vitro*, *Dev Genet*, 1997, 21(1): 61-67
- [17] Lash GE, Cartwright JE, Whitley CS, *et al.* The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility, *Placenta*, 1999, 20(8): 661-667
- [18] Irwin JC, Suen LF, Martina NA, *et al.* Role of the IGF system in trophoblast invasion and pre-eclampsia, *Hum Reprod*, 1999, 14 Suppl 2: 90-96
- [19] Sotiriou S, Liatsos K, Ladopoulos I, *et al.* A comparison in concentration of heat shock proteins (HSP) 70 and 90 on chorionic villi of human placenta in normal pregnancies and in missed miscarriages, *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2004, 31(3): 185-190

Apoptosis Related Gene Expression Profile of Trophoblasts Derived from Recurrent Spontaneous Abortion

Yu-Bin Ding, Li-Juan Fu^{1*}

(School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;¹School of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The whole genome expression chips were used to find differentially expressed apoptotic genes in the primarily cultured trophoblast (TB) cells from pregnant women with recurrent spontaneous abortion (RSA). The collected TB cells were isolated and primarily cultured from normal pregnant women and the patients with RSA. The total RNA was extracted and reverse transcribed into double-strand cDNA, and then transcribed into biotin-labeled cRNA target probes. The probes were hybridized with Affymetrix U133 plus2.0. Subsequently, the signal images were scanned by Affymetrix GeneChip Scanner 3000 and analyzed with GeneChip Operating software (GCOS). Gene expression profile was analyzed by using Genespring GX. Seventy-five apoptosis related genes expressed differentially were found, among which, 23 genes were up-regulated and 52 genes were down-regulated. Hierarchical cluster analysis showed apoptosis related genes expressed differently between the two groups. The genes promoting apoptosis are almost represented as up-regulated, but the anti-apoptosis genes are represented as down-regulated in the TB cells isolated from patients with RSA. Two signaling pathways, FoxO family signaling and IL6-mediated signaling events pathways, were found related to RSA. The results will contribute to find out the mechanism responsible to unexplained RSA.

Key words recurrent spontaneous abortion; trophoblastic cells; gene chip; gene expression profile; apoptosis

Received: November 5, 2008 Accepted: February 25, 2009

This work was supported by Chongqing Medical University (No.XBYB2007111) and Chongqing Natural Science Foundation (No. CSTC, 2007BB5286)

*Corresponding author. Tel: 86-23-60999358, Fax: 86-23-68485008, E-mail: fulijuan7101@yahoo.com.cn