

Expression of Interleukin-15 in Placentas of Patients with Hypertensive Disorders Complicating Pregnancy

Yaqing Sun Xianjiang Wei Xiaoqin Fang

Zhejiang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hangzhou, Zhejiang, 310004, China

Abstract

Objective: To investigate the expression of interleukin-15 (IL-15) in placenta tissue and its relationship with the pathogenesis of pregnancy induced hypertension. **Methods:** From January 2016 to June 2019, 85 pregnant women with gestational hypertension who were hospitalized and delivered in Zhejiang Integrated Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine were selected as the gestational hypertension disease group, and 85 normal pregnant women as the healthy control group. Immunohistochemical SP method was used to detect the location expression of IL-15 in placenta and Western blot was used to detect the expression level of IL-15 in placenta. **Results:** The expression of IL-15 protein was found in placenta of pregnant women with pregnancy hypertension and healthy control group. The expression level of IL-15 protein in placenta of pregnant women with pregnancy hypertension and healthy control group was 0.82 ± 0.19 and 0.56 ± 0.23 , respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of IL-15 in placenta of pregnant women with pregnancy induced hypertension is significantly increased, which may play a role in promoting the pathogenesis of pregnancy induced hypertension.

Keywords

hypertensive pregnancy; interleukin-15; placenta

胎盘组织中白细胞介素 15 的表达及其与妊娠期高血压疾病的关系研究

孙亚青 危先江 方小勤

浙江省中西医结合医院, 中国·浙江 杭州 310004

摘要

目的: 探讨胎盘组织中白细胞介素 15 (IL-15) 的表达及其与妊娠期高血压疾病患者发病的关系。**方法:** 选取 2016 年 1 月至 2019 年 6 月在浙江省中西医结合医院住院分娩的妊娠期高血压孕妇 85 例为妊娠期高血压疾病组, 同时选取正常妊娠孕妇 85 例作为健康对照组。免疫组化 SP 法检测两组胎盘组织中 IL-15 的定位表达, 蛋白印迹法检测两组胎盘组织中 IL-15 的蛋白的表达水平。**结果:** 妊娠期高血压孕妇和健康对照组孕妇胎盘组织中均有 IL-15 蛋白的表达, 妊娠期高血压组和健康对照组孕妇胎盘组织中 IL-15 蛋白的表达水平分别 0.82 ± 0.19 及 0.56 ± 0.23 , 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** IL-15 在妊娠期高血压疾病孕妇的胎盘组织中表达明显升高, 可能对妊娠期高血压疾病的发病过程起到一定的促进作用。

关键词

妊娠期高血压疾病; 白细胞介素 15; 胎盘组织

1 引言

妊娠期高血压病是产科常见疾病, 发生于妊娠期, 发病率约为 5%~8%, 所致孕产妇死亡率约占妊娠相关死亡总数的 10%~16%^[1]。该病以高血压、水肿及蛋白尿为主要症状, 严

【基金项目】杭州市科技局项目 (项目编号: 20170533 B67)。

【作者简介】孙亚青 (1982-), 女, 中国浙江杭州人, 硕士, 主治医师, 从事妇产科临床研究。

重者可引起全身抽搐、多脏器功能衰竭, 是导致孕妇及胎儿死亡的主要原因。迄今妊娠期高血压病的病因学仍不甚清楚, 目前很多研究发现妊娠期高血压病患者体内多种炎症因子的表达水平与正常孕妇比较有显著差异, 可能是妊娠期高血压病重要的发病机制之一。IL-15 是新近发现的一种白细胞介素。是一种促炎性细胞因子, 其可作为免疫佐剂, 在 NK 细胞的成长、增殖、分化中有着重要的作用^[2]。而 NK 细胞的过度激活, 表达异常又是导致妊娠期高血压疾病发病的重要因素^[1]。因此, 本研究拟从临床出发, 研究妊娠期高血压疾病患者胎盘中 IL-15 的表达与正常妊娠患者胎

盘中的表达情况,发现 IL-15 与妊娠期高血压疾病的发病关系。以期为妊娠期高血压的病因研究及靶向治疗提供一定依据。

2 资料与方法

2.1 一般资料

选择 2016 年 01 月至 2019 年 6 月在浙江省中西医结合医院分娩的孕妇。根据八版教科书妊娠期高血压疾病诊断依据,选择 85 例妊高症孕妇及 85 例正常分娩孕妇作为对照组。妊娠期高血压疾病孕妇年龄及分娩孕周分别为 (29.5 ± 5) 岁及 (34.7 ± 3.1) 周,收缩压和舒张压分别为 (165.6 ± 15.5) 及 (102.3 ± 12) mmHg,健康对照组的年龄及分娩孕周分别为 (28.5 ± 4.5) 岁及 (38.6 ± 2.3) 周,收缩压和舒张压分别为 (115.2 ± 9.7) 及 (73.8 ± 8.9) mmHg。两组孕妇分娩孕周及血压比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。两组孕妇既往无心、肝、肾等主要脏器功能损伤,无糖尿病,慢性高血压及自身免疫性疾病,无感染及近期服药史。本研究方案经过浙江省中西医结合医院伦理委员会批准,研究对象知情同意并签署知情同意书。

2.2 仪器与试剂

采用中国上海康朗生物科技有限公司白介素 15 单抗。

2.3 方法

2.3.1 标本采集及处理

胎盘娩出 10min 内取胎盘组织母体面中央无钙化及出血部位胎盘组织 2 块。大小约 $1 \times 1 \times 1$ cm,经磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,去除血液并吸干水分,其中一块放入无 RNA 酶的 EP 管中,置于 -80°C 冰箱中保存备用,另一块置于 4% 甲醛溶液中,固定 24h 后常规石蜡包埋,切片,常温下储存待行免疫组化检测。

2.3.2 免疫组化 SP 法

免疫组化 SP 法检测胎盘组织中 IL-15 蛋白定位表达:石蜡切片常规二甲苯、乙醇脱蜡;微波修复抗原;3% H_2O_2 阻断内源性的 H_2O_2 酶;正常山羊血清封闭;加一抗于 4°C 湿盒中过夜,加二抗 37°C 孵育;二氨基联苯胺(DAB)显色;HE 复染;盐酸乙醇分化;脱水;中性树胶封片。阴性对照组以 PBS 代替一抗。

2.3.3 蛋白印迹法

检测胎盘组织中 IL-15 蛋白的表达水平:组织标本经过蛋白样品制备、蛋白定量、蛋白电泳、转膜、抗体杂交、发光检测。

2.4 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件分析数据。结果以 $\text{SP} \times \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);

用 LSD 法进行组间均数两两比较;相关性分析采用 Pearson 线性相关分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 两组孕妇胎盘组织中 IL-15 蛋白的定位表达

妊娠期高血压疾病组和健康对照组孕妇胎盘组织中均有 IL-15 蛋白的表达,见图 1~图 3。

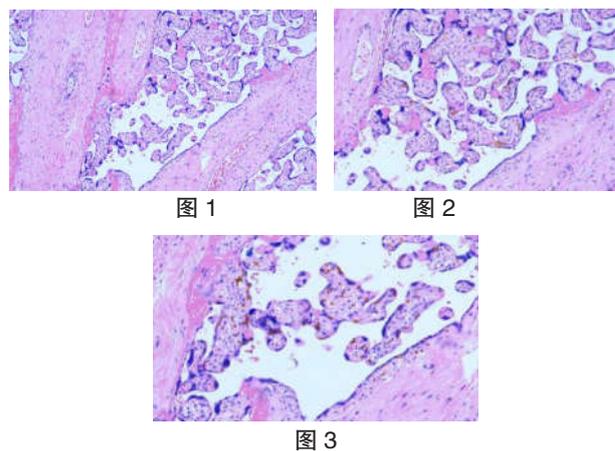


图 1 免疫组化 SP 法检测 IL-15 蛋白时的阴性对照结果,以磷酸盐缓冲液代替一抗作为阴性对照,未见胎盘组织细胞中有棕黄色的颗粒。图 2 健康对照组孕妇胎盘组织细胞中有 IL-15 蛋白的棕黄色染色颗粒。图 3 妊娠期高血压患者孕妇胎盘组织细胞中有 IL-15 蛋白的棕黄色染色颗粒,且量较图 2 多。

3.2 两组孕妇胎盘组织中 IL-15 蛋白的表达水平

妊娠期高血压疾病组和健康对照组孕妇胎盘组织中 IL-15 蛋白的表达水平分别为 0.82 ± 0.19 及 0.56 ± 0.23 ,妊娠期高血压疾病组胎盘组织中 IL-15 蛋白的表达水平明显高于健康对照组,两组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

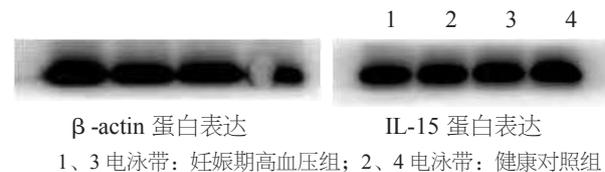


图 4 两组胎盘组织中 IL-15 蛋白的电泳图

4 讨论

妊娠期高血压疾病的发生与炎症免疫过度激活反应。妊娠期高血压病的研究一直是产科的研究热点,研究者对其病因及发病机制提出多种学说^[1]。较成熟的主要有①胎盘缺血及氧化应激学说;②血管内皮受损学说;③炎症免疫过度激活学说;④遗传学说;⑤胰岛素抵抗学说;⑥营养因素。但尚不能单独用上述某种学说来解释该病的发生发展,迄今亦未发现可预测该种疾病发生的血液指标,因此对该病的早期诊治很困难。Redman 等^[4]研究认为,正常妊娠本身就存在

炎症反应,而子痫前期是机体炎症反应过度导致血管内广泛的炎症反应所致。Weiss等^[5]研究显示,子痫前期孕妇血液中大量白细胞及炎症介质被激活,炎症反应与子痫前期具有明显的相关性。Chiapparino等^[6]应用抗炎药物干预子痫前期的研究显示,应用小剂量阿司匹林可降低高危妇女子痫前期的发生率。越来越多的证据表明,子痫前期是母亲对妊娠的一种过度性炎症反应。母胎界面局部处于主导地位的天然免疫系统在妊娠期高血压疾病发病中起重要作用,Toll样受体家族,蜕膜自然杀伤细胞(dNK)、巨噬细胞等的数量、表型和功能异常均可影响子宫螺旋小动脉重铸,造成胎盘浅着床。正常妊娠的外周及子宫蜕膜中,自然杀伤细胞对胚胎形成了一种平衡的子宫免疫微环境。当这种微环境遭到破坏,自然杀伤细胞被激活时,胎盘的功能就被破坏从而致使妊娠期高血压形成^[7]。

妊娠期高血压疾病发生与IL-15的相关性。IL-15是新近发现的一种白细胞介素,它与IL-2、IL-4、IL-7、IL-9同为细胞因子受体 γ c家族成员^[8-13]。它和IL-2共用 β 、 γ 链,因而与IL-2有许多类似的生物学功能,如刺激活化的T细胞增殖,诱导细胞毒性T细胞(CTL)和淋巴因子活化的杀伤细胞(LAK)的活性,及对自然杀伤细胞(natural kill cell, NK)的活化调节作用等^[13,14],但是IL-15有独立而且广泛分布的受体 α 链,故又有与IL-2不同的生物学效应。近年的研究证实,IL-15是一个促炎性因子,在天然免疫系统中发挥重要作用。IL-15可以影响肿瘤坏死因子和IL-1、IL-6、IL-8及粒巨噬细胞集落刺激因子的表达。IL-15还参与自身免疫性炎症性疾病,包括风湿性关节炎、多发性硬化症、溃疡性结肠炎、顽固性腹腔疾病、银屑病结节病、丙型肝炎以及人类T细胞亲淋巴病毒I型相关疾病^[15,16],IL-15及其受体广泛表达于机体各器官,参与对多种组织细胞的调节,尤其与NK细胞的分化发育和功能调节密切相关。IL-15是体内外造血前体细胞向NK细胞定向发育的决定性因子,具有促进NK细胞的增殖,上调NK的细胞毒活性,诱导NK细胞产生细胞因子,调节NK细胞与巨噬细胞间相互作用等功能。

本研究通过免疫组化SP法测定IL-15蛋白的定位表达,结果显示,健康对照组和妊娠期高血压疾病组孕妇胎盘组织中均能检测到IL-37蛋白的表达,且表达主要集中在胎盘的合体滋养细胞的胞质中,少量则表达在胎盘细胞滋养细胞胞质中,两组细胞的胞核中均有少量棕黄色颗粒。通过蛋白印迹法对胎盘组织中IL-15的表达进行定量检测,结果表明,妊娠期高血压疾病组胎盘组织中IL-15蛋白的表达水平明显高于妊娠期高血压疾病组。

5 结语

妊娠期高血压疾病是一种免疫耐受有关的炎症性疾病,IL-15作为一个促炎性因子参与妊娠期高血压疾病的发病。妊娠期高血压疾病组孕妇胎盘组织中的IL-15的表达水平明显高于健康对照组,其与疾病发生、发展有一定的相关性。提示IL-15作用于妊高症的发病过程,其作为发病中的一种强化因子,如果能控制,减少IL-15的水平,可能对防治妊娠期高血压疾病有很大作用。

参考文献

- [1] 曹泽毅.中华妇产科学(临床版)[M].北京:人民卫生出版社,2019.
- [2] Sato N, Patel HJ, Waldmann TA, et al. The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(2):588-593.
- [3] 刘慧妹,张红霞.子痫前期的病因学新进展[J].实用医学杂志,2006,22(23):2705-2706.
- [4] Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia[J]. Am J Reprod Immunol, 2010,63(6):534-543.
- [5] Weiss G, Goldsmith LT, Taylor RN, et al. Inflammation in reproductive disorders[J]. Reprod Sci,2009,16(2):216-229.
- [6] Chiapparino. Recurrence of hypertensive disorders of pregnancy: an individual patient data metaanalysis[J]. American Journal of Obstetrics and Gynecology,2015,10(2):261-267.
- [7] Schiessl B. Inflammatory response in preeclampsia[J]. Mol Aspects Med,2007(28):210-219.
- [8] Hahn S, Huppertz B, Holzgreve W. Fetal cells and cell free fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation[J]. Placenta,2005(26):515-526.
- [9] Moffett A, Hiby SE. How Does the maternal immune system contribute to the development of pre-eclampsia[J]. Placenta,2007(28):51-56.
- [10] Grabst ein KH, Eisenman J, Shanebeck K, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor[J]. Science,1994(264):965-968.
- [11] Di Santo JP, Kuhn R, Muller W. Common cytokine receptor gamma chain(gamma c)-dependent cytokines :understanding in vivo functions by genetargeting[J]. Immunol Rev,1995(148):19-34.
- [12] Giri JG, Ahdi eh M, Eisenman J, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15[J]. EMBO,1994(13):2822-2830 .
- [13] Bamford RN, Grant AJ, Burton JD, et al. The interleukin (IL)2

(下转第83页)

尚不适用。并且非手术疗法治疗仅仅能起到消除或减轻临床症状的作用,无法根治本病。手术疗法治疗虽然可从根本上解决问题,但手术所造成的创伤比较大,对局部软组织的损伤也比较大,严重时可出现椎间盘炎、椎管内血肿等多种并发症。相对而言,经骶裂孔硬膜囊前间隙置管注药治疗腰椎间盘突出症具有创伤小、并发症少、安全可靠、疗效显著等诸多优点,深受患者欢迎,患者普遍易于接受,现在已经逐渐成为治疗本类疾病的主流方式。本项治疗技术相比于原经骶裂孔硬膜囊前间隙置管注射胶原酶治疗也具有明显的优势,原治疗方式为盲穿,对医生的技术要求比较高,且带来的副损伤较大,失败率也相对较高。而经过改良后的本方法是在CT下精准定位穿刺,操作更简便,治疗更精准,大大避免了原方法盲穿带来的副损伤及失败率。原硬膜外导管材质较硬无弹性而且顶端四周较锐,改进为硬膜外导管具有弹性且顶端软钝置入头,大大降低了穿破硬脊膜及损伤椎管内静脉丛的风险,避免了因硬脊膜损伤注射药物后出现患者腰及双下肢麻痹等脊麻现象。总而言之,不论采用何种方法治疗,均应严格掌握其原理、适应症和禁忌症,这也是本治疗方法得

以在临床上取得广泛应用的前提和基本要求。因此更需要不断探索,不断发展和完善这项治疗技术,为临床上治疗腰椎间盘突出症作出应有的贡献。

参考文献

- [1] 周谋望,岳寿伟,何成奇,等.腰椎间盘突出症的康复治疗中国专家共识[J].中国康复医学杂志,2017,32(2):129-135.
- [2] 邓越,王世广,王桂玲,等.带脉穴透刺法治疗腰椎间盘突出症的临床效果[J].中国医药导报,2019,16(23):135-138.
- [3] 张莉莉,郑玉娇,韦宇,等.盐杜仲、独活、威灵仙治疗腰椎间盘突出症经验——全小林三味小方撮萃[J].吉林中医药,2020,40(2):148-150.
- [4] 秦晓洁,陈丽,许艳.浅谈腰椎间盘突出症的中医疗法[J].当代医药论丛,2014,12(1):164-165.
- [5] 中华医学会.临床诊疗指南—骨科分册[M].北京:人民卫生出版社,2007.
- [6] GB1994:201—202.中医病证诊断疗效标准[S].
- [7] 王希锐.椎间盘突出症的介入治疗[M].北京:人民军医出版社,2002.

(上接第66页)

receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine activated killer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994(91):4940-4944.

[14] Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, et al. Interleukin (IL)15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor[J].ExpMed,1994(180):1395-1403.

[15] Baslund B, Tvede N, et al. Targeting interleukin-15 in patients rheumatoid arthritis:a proof-of-concept study[J]. Arthritis Rheum, 2005,52(9):2686-2692.

[16] ShiY, Liu CH, Roberts AI, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)and T-cell responses:what do and don't know [J]. Cell Res,2006,16(2):126-133.