

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.09.016

◇临床医学◇

基质金属蛋白酶9和凝血酶敏感蛋白1在亚临床甲状腺功能减退症稽留流产病人绒毛和蜕膜组织中表达的意义

文丽, 杨小燕, 张桂丽, 张汉英

作者单位: 深圳市龙华区人民医院妇科, 广东 深圳 518109

基金项目: 深圳市龙华区科技计划医疗卫生项目(1030240)

摘要:目的 探讨基质金属蛋白酶9(MMP-9)和凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)在亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产病人绒毛和蜕膜组织中表达的意义。方法 选择2017年9月至2018年6月在深圳市龙华区人民医院确诊的SCH稽留流产病人25例,收集同期在该院就诊的正常妊娠并自愿行人工流产的25例SCH早孕病人作为对照。分析病人的一般资料;采用免疫组织化学SP法检测绒毛和蜕膜组织中MMP-9和TSP-1的表达;采用受试者工作特征曲线(ROC)分析MMP-9和TSP-1对SCH稽留流产病人的诊断价值,曲线下面积(AUC)表示预测价值。结果 与SCH早孕组相比,SCH稽留流产组病人绒毛和蜕膜组织中MMP-9的表达水平明显下调[(149.69±17.46)比(180.36±20.58), $t=5.682, P<0.001$;(128.27±16.40)比(154.72±17.43), $t=5.526, P<0.001$],TSP-1的表达水平明显上调[(152.71±18.83)比(127.76±15.62), $t=5.099, P<0.001$;(160.25±17.44)比(138.54±14.78), $t=4.748, P<0.001$];绒毛组织中MMP-9、TSP-1以及MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC依次为0.824、0.794和0.912,MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC明显高于MMP-9或者TSP-1单独检测($P<0.05$);蜕膜组织中MMP-9、TSP-1以及MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC依次为0.814、0.806和0.915,MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC明显高于MMP-9或者TSP-1单独检测($P<0.05$)。结论 绒毛和蜕膜组织中MMP-9联合TSP-1检测对SCH早孕病人稽留流产具有较高的诊断价值。

关键词: 流产,稽留; 甲状腺功能减退症; 基质金属蛋白酶9; 凝血酶敏感蛋白1

Expression significance of MMP-9 and TSP-1 in chorion and decidua tissue of patients with subclinical hypothyroidism and missed abortion

WEN Li, YANG Xiaoyan, ZHANG Guili, ZHANG Hanying

Author Affiliation: Department of Gynecology, Longhua District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518109, China

Abstract: Objective To explore expression significance of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and thrombospondin 1 (TSP-1) in chorion and decidua tissue of missed abortion patients with subclinical hypothyroidism (SCH). **Methods** A total of 25 missed abortion patients with SCH who were diagnosed in Longhua District People's Hospital from September 2017 to June 2018 were enrolled. 25 early pregnancy SCH patients who had normal pregnancy and voluntarily undergone artificial abortion were enrolled as control group during the same period. The general data of patients were analyzed. The expression of MMP-9 and TSP-1 in chorion and decidua tissues was detected by immunohistochemical SP method. The diagnostic value of MMP-9 and TSP-1 for patients with SCH and missed abortion was analyzed by receiver operating characteristic curve (ROC), and the area under the curve (AUC) represented predicted value. **Results** Compared with SCH early pregnancy group, the expression level of MMP-9 in chorion and decidua tissues of SCH and missed abortion group was significantly down-regulated [(149.69±17.46) vs. (180.36±20.58), $t=5.682, P<0.001$; (128.27±16.40) vs. (154.72±17.43), $t=5.526, P<0.001$], while expression level of TSP-1 was significantly up-regulated [(152.71±18.83) vs. (127.76±15.62), $t=5.099, P<0.001$; (160.25±17.44) vs. (138.54±14.78), $t=4.748, P<0.001$]. AUC of MMP-9, TSP-1 and MMP-9 combined with TSP-1 in chorion tissue for predicting missed abortion of SCH patients were 0.824, 0.794 and 0.912, respectively. AUC of MMP-9 combined with TSP-1 predicting missed abortion in SCH patients was significantly higher than that of MMP-9 or TSP-1 alone ($P<0.05$). AUC of MMP-9, TSP-1 and MMP-9 combined with TSP-1 in decidua tissue for predicting missed abortion of SCH patients were 0.814, 0.806 and 0.915, respectively. AUC of MMP-9 combined with TSP-1 for predicting missed abortion in SCH patients was significantly higher than that of MMP-9 or TSP-1 alone ($P<0.05$). **Conclusion** MMP-9 combined with TSP-1 in chorion and decidua tissues is of higher diagnostic value for missed abortion in SCH patients with early pregnancy.

Key words: Abortion, missed; Hypothyroidism; Matrix metalloproteinase 9; Thrombospondin 1

亚临床甲状腺功能减退症(Subclinical hypothyroidism, SCH)是由多种原因而引起的甲状腺激素正常而促甲状腺激素(Thyroid Stimulating Hormone, TSH)升高^[1]。临床研究显示,妊娠期间异常升高的TSH会抑制腺垂体的功能,影响性腺轴,减少促性腺激素的分泌,从而影响胎盘的代谢,最终会导致稽留流产等^[2]。稽留流产是流产疾病中的一种特殊类型,指胚胎停止发育后2个月尚未能排出体外的现象^[3]。研究表明,基质金属蛋白酶9(Matrix metalloproteinase 9, MMP-9)及凝血酶敏感蛋白1(Thrombospondin 1, TSP-1)的表达与流产密切相关^[4-5]。MMP-9是一种细胞外蛋白水解酶,可以降解细胞外基质,研究显示,MMP-9可以促进滋养细胞的侵袭,其高表达有利于胚胎着床^[6]。TSP-1是一种血管生成抑制剂,在血管完整性和血栓形成中具有重要意义,其表达增加可以抑制血管形成,影响胚胎种植,从而导致稽留流产发生^[7]。目前,MMP-9和TSP-1的表达与SCH病人早期稽留流产之间的关系尚不十分清楚,因此,本研究分析了SCH稽留流产病人绒毛和蜕膜组织中MMP-9和TSP-1的表达水平,旨在明确其在SCH稽留流产诊断和预后中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择2017年9月至2018年6月在深圳市龙华区人民医院确诊的SCH稽留流产病人25例,年龄(28.44 ± 4.57)岁,范围为18~37岁。纳入标准:符合SCH的诊断标准^[8];符合第9版《妇产科学》中稽留流产的诊断标准^[9];均为单胎妊娠病人;孕周 ≤ 10 周;均获得病人及其近亲属知情同意,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。排除标准:由遗传、支原体或衣原体感染等因素引起的稽留流产病人;连续自然流产 > 2 次者;合并明显肝肾功能不全、心、脑血管疾病者;合并恶性肿瘤者;合并血液或免疫系统疾病者;合并精神系统疾病者。收集同期在该院就诊的正常妊娠并自愿行人工流产的25例早孕SCH病人作为对照,年龄(28.15 ± 4.43)岁,范围为18~35岁。

1.2 检测指标 标本采集:两组病人均在其人工流产的同时留取每例病人的绒毛组织及蜕膜组织制备标本,采用0.9%氯化钠溶液冲洗后放入10%甲醛中固定,制作切片。采用免疫组织化学SP法检测绒毛和蜕膜组织中MMP-9和TSP-1的表达,依次经二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水后,加3%过氧化氢室温孵育10 min,进行抗原修复TSP-1,滴加一抗,4℃孵育过夜,滴加二抗37℃孵育20 min,二氨基联苯胺显色,苏木素复染,常规脱水、透明,中性树脂胶封片。

结果判定:细胞质或细胞膜有明显棕黄色颗粒沉着为阳性表达,显微镜下采用随机数字表法选取10个视野,采用图像分析系统分析其灰度值。

1.3 统计学方法 采用SPSS 19.0软件进行分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对计量资料首先进行正态性检验,如果两组均满足正态性且两组间方差齐,采用成组 t 检验分析。计数资料均以率(%)表示,采用 χ^2 检验进行组间比较。此外,采用受试者工作特征曲线(ROC)分析MMP-9和TSP-1对SCH稽留流产病人的诊断价值,以曲线下面积(AUC)描述之。联合检测先采用logistic分析,再进行ROC分析。均以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCH稽留流产病人的一般资料 SCH稽留流产病人和SCH早孕病人的年龄、体质量指数、学历等一般资料差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

2.2 SCH稽留流产病人绒毛和蜕膜组织中MMP-9和TSP-1的表达 与SCH早孕组相比,SCH稽留流产病人绒毛和蜕膜组织中MMP-9的表达水平明显下调($P < 0.05$),TSP-1的表达水平明显上调($P < 0.05$),见图1、表2。

2.3 绒毛组织中MMP-9和TSP-1的表达对SCH稽留流产的预测价值 绒毛组织中MMP-9、TSP-1以及MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC依次为0.824、0.794和0.912;MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC明显高于MMP-9或者TSP-1单独检测($P < 0.05$),见图2。详细参数见表3。

表1 亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产与SCH早孕病人的一般资料/例(%)

组别	例数	年龄		体质量指数		学历		初产妇		人工流产史	
		18~30岁	> 30岁	< 24 kg/m ²	≥ 24 kg/m ²	初中及以下	高中及以上	是	否	是	否
SCH早孕组	25	16(64.00)	9(36.00)	16(64.00)	9(36.00)	4(16.00)	21(84.00)	11(44.00)	14(56.00)	9(36.00)	16(64.00)
SCH稽留流产组	25	15(60.00)	10(40.00)	18(72.00)	7(28.00)	6(24.00)	19(76.00)	13(52.00)	12(48.00)	12(48.00)	13(52.00)
χ^2 值		0.085		0.368		0.500		0.321		0.739	
P 值		0.771		0.544		0.480		0.571		0.390	

表2 亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产与SCH早孕病人绒毛和蜕膜组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)和凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)的表达 $\bar{x} \pm s$

组别	例数	MMP-9灰度值		TSP-1灰度值	
		绒毛	蜕膜	绒毛	蜕膜
SCH 早孕组	25	180.36±20.58	154.72±17.43	127.76±15.62	138.54±14.78
SCH 稽留流产组	25	149.69±17.46	128.27±16.40	152.71±18.83	160.25±17.44
<i>t</i> 值		5.682	5.526	5.099	4.748
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

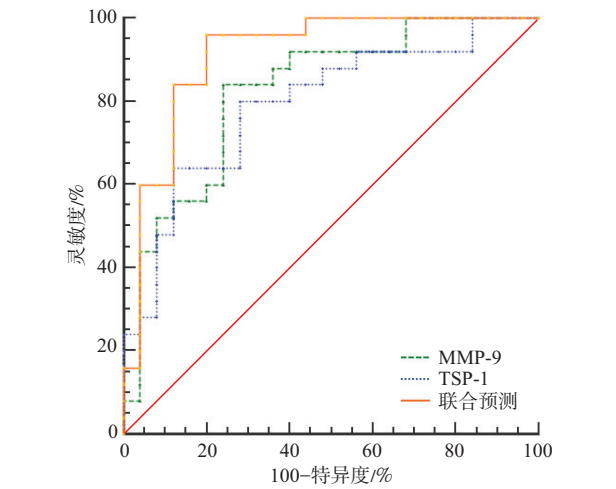


图2 绒毛组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)和凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)的表达对亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产的预测价值

表3 绒毛组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)和凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)的表达对亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产的预测价值

变量	AUC	AUC 95% 置信区间	灵敏度	特异度	独立检验 <i>P</i> 值
MMP-9	0.824 ^a	0.690~0.917	0.802	0.785	<0.001
TSP-1	0.794 ^a	0.656~0.895	0.798	0.726	<0.001
MMP-9 联合 TSP-1	0.912	0.797~0.973	0.905	0.889	<0.001

注:AUC为曲线下面积。与MMP-9联合TSP-1相比,^a*P*<0.05

2.4 蜕膜组织中MMP-9和TSP-1的表达对SCH稽留流产的预测价值 蜕膜组织中MMP-9、TSP-1以及MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC依次为0.814、0.806和0.915;MMP-9联合TSP-1预测SCH病人稽留流产的AUC明显高于MMP-9或者TSP-1单独检测(*P*<0.05),见图3。详细参数见表4。

3 讨论

稽留流产是一种妊娠失败,也称为过期流产,其病因复杂,包括染色体异常、内分泌异常、免疫功能异常、环境因素影响等^[10]。已有研究显示,妊娠期间的甲状腺功能异常(SCH、临床甲减、甲状腺自身免疫疾病等)均会影响性腺轴,引起性激素分泌异常,影响临床妊娠结局^[11]。张立岩等^[12]比较了100例稽留流产病人和100例早孕病人的甲状腺功

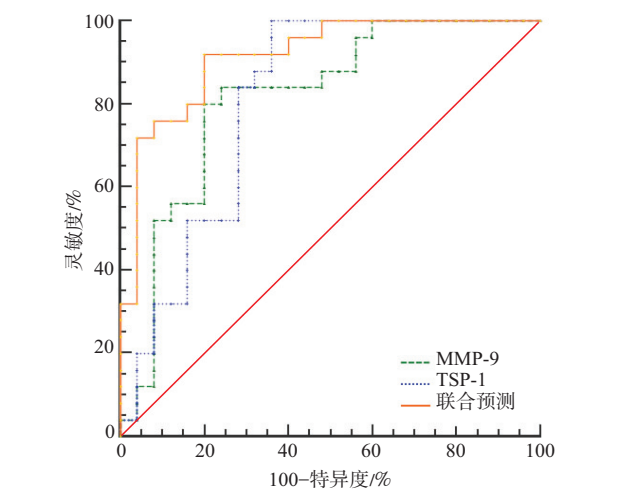


图3 蜕膜组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)和凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)的表达对亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产的预测价值

表4 蜕膜组织中基质金属蛋白酶9(MMP-9)和凝血酶敏感蛋白1(TSP-1)的表达对亚临床甲状腺功能减退症(SCH)稽留流产的预测价值

变量	AUC	AUC 95% 置信区间	灵敏度	特异度	独立检验 <i>P</i> 值
MMP-9	0.814 ^a	0.679~0.910	0.810	0.784	<0.001
TSP-1	0.806 ^a	0.670~0.904	0.779	0.802	<0.001
MMP-9 联合 TSP-1	0.915	0.801~0.975	0.909	0.902	<0.001

注:AUC为曲线下面积。与MMP-9联合TSP-1相比,^a*P*<0.05

能,发现甲状腺过氧化物酶抗体阳性为影响稽留流产的高危因素。甲状腺过氧化物酶抗体可以抑制甲状腺激素的合成,增加TSH的分泌,也是SCH发生的危险因素^[13]。因此,本研究分析了SCH病人中相关分子标志物的表达,旨在为临床诊断和治疗提供依据。本研究中,SCH稽留流产病人的绒毛组织和蜕膜组织中MMP-9的表达显著下调。MMP-9是MMP家族的一员,可以降解、重塑细胞外基质中的多种成分,还可以参与细胞基质间的信号传递^[14]。MMP-9是滋养细胞分泌的一种重要的酶,可以水解子宫内层基质成分,包括Ⅳ型和Ⅴ型胶原、明胶等,促进滋养细胞的侵袭能力^[15]。临床研究显示,在妊娠早期,MMP-9主要表达于绒毛滋养细胞、蜕膜细胞和腺上皮细胞等,可以降解子宫内层细胞的

基底膜和细胞外基质,促进滋养细胞的侵袭力,有利于胚胎种植^[16]。张吟、许小凤^[17]的研究显示, SCH 孕鼠中核因子- κ B 和 MMP-9 的表达显著下调,血清绒毛促性腺激素、孕酮等的分泌降低,提示 MMP-9 的表达可以影响 SCH 稽留流产病人的性腺激素水平。刘丽媛等^[18]比较了 20 例正常妊娠以及 20 例自然流产病人绒毛组织中 MMP-9 的表达,发现早期自然流产病人绒毛组织中 MMP-9 的表达明显下降,本研究结果与其基本一致,提示 MMP-9 可能通过促进滋养细胞的侵袭,促进胚胎着床。

本研究中, SCH 稽留流产病人的绒毛组织和蜕膜组织中 TSP-1 的表达显著上调。TSP-1 是由机体多种细胞分泌的反向血管生成调节因子,可以与细胞内相应的受体结合,诱导内皮细胞凋亡,抑制血管生成,影响细胞的迁移和黏附^[19]。在正常的子宫内膜组织中, TSP-1 主要分布于血管内皮细胞、腺上皮细胞等,可以抑制血管形成,减少新生血管,影响胚胎种植^[20]。刘梅梅等^[21]的研究显示,绒毛组织中 TSP-1 的高表达可能通过抑制血管内皮生长因子的分泌,抑制绒毛组织中血管生成,导致流产,提示 SCH 病人稽留流产可能与绒毛组织和蜕膜组织中 TSP-1 的高表达有关。本研究中,绒毛和蜕膜组织中 MMP-9 和 TSP-1 的表达均对 SCH 病人稽留流产具有一定的预测价值,且绒毛和蜕膜组织中 MMP-9 和 TSP-1 的联合检测可以显著提高其对 SCH 早孕病人稽留流产具有一定的预测价值,提示 MMP-9 和 TSP-1 在 SCH 早孕病人稽留流产的发生发展中具有重要作用,有望应用于临床预测稽留流产的发生。

综上所述, SCH 稽留流产病人的绒毛和蜕膜组织中 MMP9 的表达显著下调, TSP-1 的表达显著上调, MMP9 联合 TSP-1 检测对 SCH 早孕病人稽留流产具有较高的诊断价值,临床有望作为其诊断与预后标志物。本研究不足之处为样本量较少,但本研究为 SCH 稽留流产病人的诊断和预防提供了一定的理论依据。

(本文图 1 见插图 9-3)

参考文献

- [1] MARAKA S, OSPINA NMS, O'KEEFE DT, et al. Subclinical hypothyroidism in pregnancy: a systematic review and meta-analysis [J]. *Thyroid*, 2016, 26(4): 580-590.
- [2] CHEN S, ZHOU X, ZHU H, et al. Preconception TSH and pregnancy outcomes: a population-based cohort study in 184 611 women [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2017, 86(6): 816-824.
- [3] YIN CS, CHEN WH, WEI RY, et al. Transcervical embryoscopic diagnosis of conjoined twins in a ten-week missed abortion [J]. *Prenat Diagn*, 1998, 18(6): 626-628.
- [4] 崔世红, 申琳娜, 职云晓, 等. 胎膜早破绒毛膜羊膜炎患者胎膜组织中 HMGB1 和 MMP-9 的表达及意义 [J]. *现代妇产科进展*, 2016, 25(8): 582-585.
- [5] 钟伟芬, 晏红锦, 杨丽君, 等. 低分子肝素治疗复发性流产患者血管相关因子表达变化观测 [J]. *广东医学*, 2019, 40(3): 358-361.
- [6] ORLOVIC M, TOMIC V, VUKOJEVIC K, et al. Decreased expression of MMP-9 in CD8⁺ cells in placenta with severe preeclampsia [J]. *Biotech Histochem*, 2017, 92(4): 288-296.
- [7] PATSOURAS MD. AB0184 thrombospondin 1, an antiangiogenic and proapoptotic factor, is elevated in the plasma of patients with antiphospholipid syndrome [J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73 Suppl 2: 863-864.
- [8] 中华医学会内分泌学分会. 成人甲状腺功能减退症诊治指南 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2017, 33(2): 167-180.
- [9] 谢幸, 孔北华, 段涛. 妇产科学 [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018: 57-60.
- [10] LI Y, LIU X, SUN Y, et al. The expression of PDCD4 in patients with missed abortion and its clinical significance [J]. *Reprod Sci*, 2017, 24(11): 1512-1519.
- [11] 纪邦群, 杨玉林, 郑丽波, 等. 甲状腺自身抗体与复发性流产的相关性分析 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(14): 1934-1935.
- [12] 张立岩, 赵秀芬, 邢伟萍. 甲状腺自身抗体与稽留流产关系的初步研究 [J]. *中国妇产科临床杂志*, 2017, 18(3): 250-251.
- [13] 初晓丽, 郭海香, 刘艳丽, 等. 血清甲状腺过氧化物酶抗体检测在诊断妊娠期甲状腺功能低下中的应用 [J]. *广东医学*, 2014, 35(19): 3044-3045.
- [14] RIA R, LOVERRO G, VACCA A, et al. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase -2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas [J]. *Eur J Clin Invest*, 2002, 32(3): 199-206.
- [15] RAHAT B, SHARMA R, BAGGA R, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases [J]. *Reproduction*, 2016, 152(1): 11-22.
- [16] 张雅琪, 吴媛媛, 刘海意, 等. 缺氧调控滋养细胞 MMP-9/TIMP-1 表达及侵袭能力的体外研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2014, 23(2): 117-120.
- [17] 张吟, 许小凤. 健脾补肾方对亚临床甲减孕鼠胎盘分泌功能及 NF- κ B/MMP-9 通路的调控作用 [J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(3): 284-288.
- [18] 刘丽媛, 何俊琳, 刘学庆, 等. PI3k / Akt 信号通路及 MMP-2、MMP-9 在正常妊娠及自然流产绒毛组织中的表达 [J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 39(11): 1511-1515.
- [19] SALVESEN HB, AKSLEN LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 1999, 84(5): 538-543.
- [20] 许晓月, 骆黎静, 卢丹, 等. 子宫内膜异位症患者血管生成相关基因 VEGF 和 TSP-1 mRNA 的表达 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 6-10.
- [21] 刘梅梅, 王珊, 李肖肖, 等. 血小板反应蛋白-1 等血管相关因子在复发性流产中的表达及临床研究 [J]. *中华生殖与避孕杂志*, 2018, 38(1): 39-43.

(收稿日期: 2019-07-18, 修回日期: 2019-09-05)