

Tim-3 在不明原因复发性流产患者绒毛和蜕膜组织中的表达

贾秋桦^{1,2}, 于斐³

(1. 山东大学医学院, 山东 济南 250012; 2. 临沂市妇幼保健院, 山东 临沂 276000;
3. 山东医学高等专科学校附属医院, 山东 临沂 276000)

摘要:目的 探讨 Tim-3 在不明原因复发性流产患者绒毛和蜕膜组织中的表达。方法 选取 2012 年 3 月至 2013 年 6 月在临沂市妇幼保健院就诊的不明原因复发性流产患者 30 例(病例组), 同期正常妊娠(孕周 6~12 w) 进行人工流产者 30 例(对照组), 应用免疫组织化学染色技术观察 Tim-3 在两组绒毛和蜕膜组织中的表达。结果 两组 Tim-3 蛋白主要表达于绒毛的滋养层细胞、合体滋养层细胞的细胞质和绒毛间质内, 以及蜕膜组织腺体上皮细胞的细胞质和蜕膜间质内, 且病例组绒毛和蜕膜组织中的 Tim-3 蛋白表达强度明显高于对照组($P < 0.001$)。Tim-3 在病例组的绒毛组织中呈弱阳性表达 2 例, 阳性表达 5 例, 强阳性表达 23 例; 在对照组的绒毛组织中呈弱阳性表达 22 例, 阳性表达 6 例, 强阳性表达 2 例。Tim-3 在病例组的蜕膜组织中呈弱阳性表达 4 例, 阳性表达 5 例, 强阳性表达 21 例; 在对照组的蜕膜组织中呈弱阳性表达 26 例, 阳性表达 2 例, 强阳性表达 2 例。结论 Tim-3 可能参与了不明原因复发性流产的发生发展过程。

关键词: Tim-3; 不明原因复发性流产; 绒毛; 蜕膜; 免疫组织化学

中图分类号: R714.2

文献标志码: A

Expression of T cell immunoglobulin mucin-3 in villous and decidual tissues of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion

JIA Qiuhua^{1,2}, YU Fei³

(1. School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;
2. Maternal and Children Health Hospital of Linyi City, Linyi 276000, Shandong, China;
3. Affiliated Hospital of Shandong Medical College, Linyi 276000, Shandong, China)

Abstract: Objective To explore the expression of T cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3) in villous and decidual tissues of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion (URSA). **Methods** A total of 30 pregnant women with URSA treated in Maternal and Children Health Hospital of Linyi City during March 2012 to June 2014 were involved as the case group, and 30 normal pregnant women who had undergone selective abortion (gestational age 6 to 12 weeks) in the same period were chosen as the control group. The location and protein level of Tim-3 in villous and decidual tissues of the two groups were measured with immunohistochemistry technique. **Results** Immunohistochemical staining results showed that in the two groups, Tim-3 protein was mainly located in the cytoplasm of villi trophoblast cells and form-fitting trophoblastic cells, villi interstitial, cytoplasm of glandular epithelial cells of the decidual tissue, and decidual stromal. The expression of Tim-3 in the villous tissues and glands of decidual tissues of the case group was stronger than that of the control group ($P < 0.001$). In the villous tissues of the case group, 2 cases had weak expression of Tim-3, 5 had positive expression, and 23 had strong positive expression. In the villous tissues of the control group, 22 cases had weak expression of Tim-3, 6 had positive expression, and 2 had strong positive expression. In the decidual

tissues of the case group, 4 cases had weak expression of Tim-3, 5 had positive expression, and 21 had strong positive expression. In the decidual tissues of the control group, 26 cases had weak expression of Tim-3, 2 had positive expression, and 2 had strong positive expression. **Conclusion** Tim-3 might take part in the genesis and development of URSA.

Key words: Tim-3; Unexplained recurrent spontaneous abortion; Villous tissues; Decidual tissues; Immunohistochemistry

复发性自然流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续3次或以上发生的反复早期流产(孕3个月以内),近2次反复自然流产也被纳入了RSA定义中^[1],其发生率为1%~5%。RSA病因及发病机制十分复杂,除了染色体异常、子宫解剖结构异常、血栓形成倾向、生殖道病原体感染和内分泌紊乱等因素外^[2],约50%患者原因不明,称为不明原因复发性流产(unexplained recurrent spontaneous abortion, URSA)。其中大多与Th1/Th2平衡失调、HLA-G表达异常、封闭抗体、自身免疫性抗体、NK细胞杀伤活性增强等免疫因素密切相关^[3]。

T细胞免疫球蛋白黏蛋白-3(T cell immunoglobulin mucin-3, Tim-3)是一种I型跨膜蛋白,属Tim基因家族成员,表达于活化的Th1细胞上。Tim-3与其配体galectin-9结合后负向调控Th1细胞功能,可介导Th1细胞凋亡^[4]。研究表明, Tim-3在多种固有免疫细胞上也有表达,包括单核/巨噬细胞^[5-6]、树突状细胞^[7]、NK细胞^[8]等。近年研究报道显示, Tim-3同时表达于活化的Th17和Tc1细胞上,且其在CD4⁺T和CD8⁺T细胞上的表达异常与许多自身免疫性疾病、病毒感染和癌症等密切相关^[9-11],但有关其在母胎免疫中的调节作用研究较少。本研究采用免疫组化法检测30例不明原因复发性流产患者和30例正常对照组的绒毛和蜕膜组织中Tim-3的表达情况,探讨Tim-3分子参与URSA发生发展的可能性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 研究对象 选取2012年3月至2013年6月在临沂市妇幼保健院就诊的复发性流产患者30例(病例组),25~37岁,平均(29.5±3.7)岁。病例选择条件:①自然流产次数≥2次;②夫妻双方染色体核型无异常;③妇科超声、宫腔镜等排除生殖器官畸形;④孕妇性激素、甲状腺功能、血糖、胰岛素等内分泌指标均正常;⑤孕妇TORCH(风疹病毒、巨细胞病毒、弓形体和单纯疱疹病毒)、沙眼衣原体、解脲支原体均阴性,抗磷脂抗体、抗核抗体、抗双链

DNA抗体、抗可抽提的核抗原抗体、抗精子抗体均阴性;⑥妊娠早期无服药史,无接触放射线、有害化学物质史,无吸烟、酗酒不良习惯,非近亲婚配;⑦男方精液常规检查正常。选取同期正常妊娠(孕周6~12w)进行人工流产者30例(对照组),24~36岁,平均(27.5±3.6)岁,均无自然流产史,B超检查提示胚胎发育正常。两组均于清宫术毕,生理盐水冲洗新鲜绒毛及蜕膜组织,Bouin液固定,常规石蜡包埋。

1.1.2 主要试剂与仪器 羊抗人Tim-3多克隆抗体购自美国R&D公司,即用型SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。全自动石蜡切片机为德国LEICA公司生产,全自动免疫组化染色仪为瑞士罗氏公司生产。

1.2 方法

1.2.1 常规制备石蜡切片 两组绒毛蜕膜组织经脱水、透明、浸蜡、包埋后制成5μm石蜡切片。

1.2.2 采用SABC法对石蜡切片进行化学染色 切片常规脱蜡水化;用EDTA(pH9.0)进行抗原修复20min;滴加3% H₂O₂阻断溶液,37℃孵育15min,阻断内源性过氧化物酶;滴加10%兔血清孵育30min,封闭非特异性抗原;去血清,滴加羊抗人Tim-3多克隆抗体工作液(1:100),37℃孵育2h;滴加聚合物辅助剂,37℃孵育30min;加第二抗体,37℃孵育30min;以上各步骤之间用0.01mol/L PBS缓冲液(pH7.5)冲洗3次,5min/次。最后,滴加DAB显色剂显色,苏木素进行复染、脱水、透明、封片,显微镜下观察结果。阴性对照用抗体稀释液代替一抗,阳性对照用宫颈癌组织切片代替,其他步骤同上。

1.2.3 免疫反应积分(IHS) 封片后高倍显微镜(×40)下观察结果,每例标本选取一张切片,每张切片至少随机选取5个视野,以细胞质或胞膜中出现棕黄色颗粒为阳性判断标准。判断标准:①按平均每个视野阳性细胞的染色程度分为:弱阳性(+)细胞轻度着色,呈淡黄色,记1分;中等阳性(++)细胞着色呈深黄色,记2分;强阳性(+++)细胞明显着色,呈棕黄色,记3分。②按平均每个视野阳性

细胞所占百分比分为:25% 以下为弱阳性(+),记1分;25%~49%为中等阳性(++),记2分; $\geq 50\%$ 为强阳性(+++),记3分。应用免疫反应积分(IRS)系统,将上述两者相乘, ≤ 3 分为阴性,4分为弱阳性(+),6分为阳性(++),9分为强阳性(+++)。结果判断在双盲下进行,每张切片均由两名有经验的病理科医生分别计数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,两组免疫组化的结果均采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

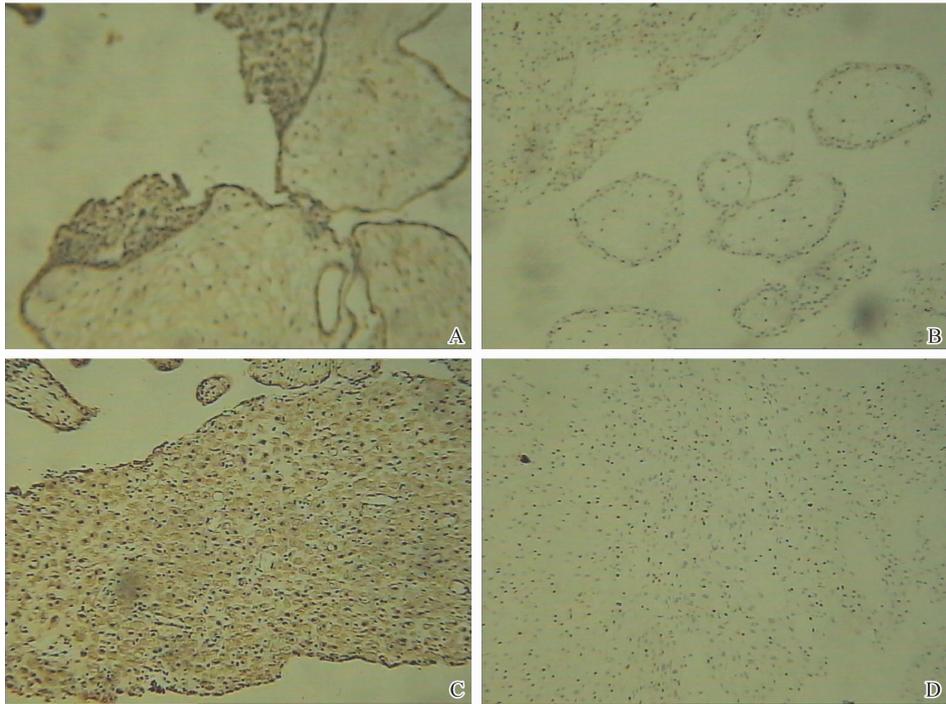


图1 Tim-3 在绒毛和蜕膜中的表达(免疫组化,2×100倍)

A: 病例组绒毛组织; B: 对照组绒毛组织; C: 病例组蜕膜组织; D: 对照组蜕膜组织。

Fig. 1 The expression of Tim-3 in villous and decidual tissues (immunohistochemical staining, 2×100 times)

A: The villous tissues of the case group; B: The villous tissues of the control group; C: The decidual tissues of the case group; D: The decidual tissues of the control group.

2.2 Tim-3 在绒毛和蜕膜组织的表达强度 Tim-3 在病例组和对照组绒毛组织中的表达强度有明显差异($P < 0.001$),见表1,图2;Tim-3 在病例组和对照

2 结果

2.1 Tim-3 在绒毛和蜕膜中的表达 在绒毛组织中,病例组和对照组 Tim-3 蛋白主要定位在绒毛滋养层细胞、合体滋养层细胞的细胞浆内及绒毛间质内,呈棕黄色颗粒,见图 1A、B;在蜕膜组织中,病例组和对照组 Tim-3 蛋白主要定位在蜕膜组织腺体上皮细胞的细胞浆内和蜕膜间质内,呈棕黄色颗粒,见图 1C、D。

组蜕膜组织的腺上皮细胞的胞浆及胞膜中表达强度有明显差异($P < 0.001$),见表2,图3。

表1 Tim-3 在病例组和对照组绒毛中的表达强度

组别	n	免疫组织化学积分 IHS 值(分)				Z	P
		≤ 3 (-)	4(+)	6(++)	9(+++)		
病例组	30	0	2	5	23		
对照组	30	0	22	6	2	-5.811	<0.001

表2 Tim-3 在病例组和对照组蜕膜中的表达强度比较

组别	n	免疫组织化学积分 IHS 值(分)				Z	P
		≤ 3 (-)	4(+)	6(++)	9(+++)		
病例组	30	0	4	5	21		
对照组	30	0	26	2	2	-5.658	<0.001

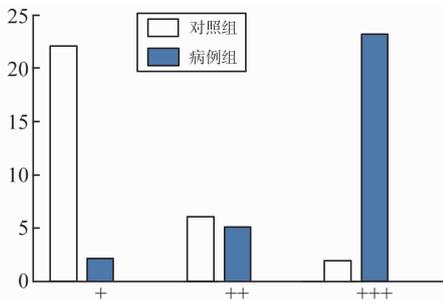


图2 Tim-3在两组绒毛中的表达强度
Fig. 2 Comparison of Tim-3 expression in villous tissues of the two groups

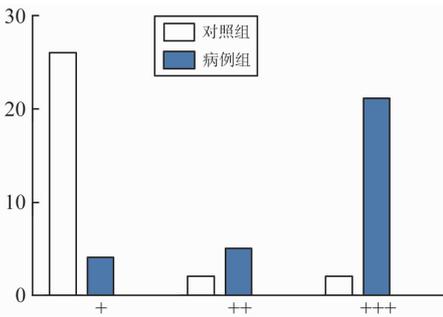


图3 Tim-3在两组蜕膜中的表达强度
Fig. 3 Comparison of Tim-3 expression in decidual tissues of the two groups

3 讨论

妊娠在免疫学上常被认为是同种半异体移植的过程,其成功与否取决于母胎之间免疫平衡的调节。母胎界面是由绒毛外滋养层细胞和蜕膜组成。滋养层细胞向子宫内膜层侵袭、迁移分化、调节胚胎植入;侵袭母体血管,启动并完成子宫胎盘循环,是为胎儿提供供应血液、营养物质,进行气体交换和排泄代谢产物的场所。滋养层细胞分泌多种细胞因子,维持Th1/Th2平衡。蜕膜是母体和胎儿直接接触面,蜕膜组织的免疫细胞成分相当复杂,蜕膜NK(decidual natural killer, dNK)细胞是妊娠早期母胎界面的优势细胞,约占蜕膜免疫活性细胞总量的70%~80%,另外还有单核巨噬细胞(约占15%)和T淋巴细胞(约占15%)等^[12]。它们的数量、表型及功能明显与外周循环不同,这些变化从而决定局部免疫应答或免疫耐受的形成,在维持母胎免疫平衡发挥着重要的作用。

Tim-3是由Tim基因家族编码的一种I型膜蛋白,它的结构包括IgV区、黏蛋白区、跨膜区及胞质尾区。目前还发现了可溶性Tim-3分子,它不包含黏蛋白区和跨膜区。Galectin-9(半乳糖凝集素-9)已被证实为Tim-3的一个配体,可与Th1、Th17细胞上的Tim-3结合,从而抑制这些T效应细胞的分

化或引起其凋亡,进而下调其免疫应答,但能促进表达FoxP3的调节性T细胞(Treg细胞)的分化^[13]。有研究发现,Gal-9也可与固有免疫细胞树突细胞表面上的Tim-3结合,并通过诱导其活化而增强炎症及免疫反应^[14]。由此可见,Gal-9/Tim-3通路在适应性免疫和固有免疫中介导截然不同的作用,其具体机制尚不明确。有研究证实,Tim-3在许多自身免疫性疾病、慢性病毒感染中起着重要的调控作用^[9-11],但有关其在母胎免疫中的作用报道较少。

本研究结果表明,Tim-3在病例组和对对照组的绒毛滋养层细胞、合体滋养层细胞和蜕膜组织中腺上皮细胞的细胞浆内及间质内均有表达;但在病例组的绒毛和蜕膜上的表达强度要明显高于对照组。有研究显示,Tim-3在其构建的小鼠复发性流产模型和正常妊娠模型中小鼠的滋养层细胞上均有表达,但复发性流产模型中Tim-3表达强度明显高于正常妊娠模型,而Gal-9配体在两模型中滋养层细胞上的表达强度恰恰相反^[15]。Tim-3在小鼠蜕膜组织中均有表达,主要表达在细胞浆和细胞膜,且小鼠复发性流产模型Tim-3的表达强度高于正常妊娠模型;小鼠复发性流产模型中蜕膜的腺上皮细胞Tim-3⁺细胞百分比高于正常妊娠模型,而蜕膜淋巴细胞上Tim-3⁺细胞百分比低于正常妊娠模型,Gal-9在小鼠蜕膜腺上皮细胞和淋巴细胞上阳性百分比均低于正常妊娠模型^[16]。另有研究报道,怀孕妇女整个孕期血清中的Gal-9水平明显高于非孕妇女,且孕中期和孕晚期又明显高于孕初期^[17]。由此可见,URSA的发病机制可能与Tim-3-Gal-9通路异常相关,且Tim-3在母胎界面的表达与本研究结果相符。Tim-3-Gal-9通路异常可能导致URSA的发生发展,其具体机制如下:第一,Tim-3-Gal-9通路异常导致对Th1细胞的负向调节作用减弱,导致Th1/Th2平衡失衡,向Th1偏移,Th1细胞产生的大量细胞因子不利于胚胎的着床、植入和胎儿的生存。第二,Tim-3-Gal-9通路异常导致滋养层细胞侵袭力降低,影响胚胎的着床和植入;母体胎儿血流失调,胎盘血流不能为胎儿提供充足的营养物质和氧气,影响胚胎的发育和胎儿的生存。第三,国外学者研究显示,URSA患者蜕膜中CD4⁺CD25⁺Treg细胞比正常早孕组显著降低^[18]。Tim-3-Gal-9通路异常造成Treg细胞数量的减少,导致Treg/Th17失衡,Treg细胞抑制CD4⁺、CD8⁺细胞增殖的作用减弱,继而产生大量Th1型细胞因子,破坏母胎界面的免疫调控网络的平衡,导致胚胎的丢失。总之,Tim-3-Gal-9通路与多种免疫细胞及其产生的细胞因子通过不同

的免疫机制共同介导了母胎界面的免疫耐受,其数量、表型及功能的改变直接影响到母胎之间的免疫平衡,导致复发性流产的发生。

本研究探讨了 Tim-3 在人类母胎界面滋养层细胞上的表达情况,但由于蜕膜组织中的 CD4⁺ T 淋巴细胞数量较少和方法学的限制,未能发现 Tim-3 在蜕膜淋巴细胞上的表达情况。但 Tim-3 在母胎界面的高表达,表明其可能参与了不明原因自然流产的病理过程,为不明原因自然流产发病机制的研究提供了新的临床数据,为评价以 Tim-3 为靶点来干预不明原因自然流产的发生提供了理论依据。然而,母胎界面的免疫调控网络十分精密而复杂,涉及到很多免疫细胞及细胞因子,其具体的调控机制尚不明确,仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1] American college of Obstetrician Gynecologist. ACOG practice bulletin . Management of recurrent pregnancy loss [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002, 78(2): 179-190.
- [2] Tien J C, Tan T Y. Non-surgical interventions for threatened and recurrent Miscarriages[J]. *Singapore Med J*, 2007, 48(12): 1074-1090.
- [3] 程聚玲, 马淑红. 免疫性复发性流产的病因研究及治疗进展[J]. *河北医药*, 2010, 32(16): 2265-2267.
- [4] Zhu C, Anderson A C, Schubart A, et al. The Tim -3 ligand galectin -9 negatively regulates T helper type 1 immunity[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(12): 1245-1252.
- [5] Yang X, Jiang X, Chen G, et al. T cell Ig mucin-3 promotes homeostasis of sepsis by negatively regulating the TLR response[J]. *J Immunol*, 2013, 190(5): 2068-2079.
- [6] Zhang Y, Ma C J, Wang J M, et al. Tim-3 regulates pro- and anti-inflammatory cytokine expression in human CD14⁺ monocytes[J]. *J Leukoc Biol*, 2012, 91(2): 189-196.
- [7] Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1 [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(9): 832-842.
- [8] Gleason M K, Lenvik T R, McCullar V, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9[J]. *Blood*, 2012, 119(13): 3064-3072.
- [9] Liberal R, Grant C R, Holder B S, et al. The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway [J]. *Hepatology*, 2012, 56(2): 677-686.
- [10] Wu W, Shi Y, Li S, et al. Blockade of Tim-3 signaling restores the virus-specific CD8⁺ T-cell response in patients with chronic hepatitis B [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(5): 1180-1191.
- [11] Anderson A C. Tim-3, a negative regulator of anti-tumor immunity[J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(2): 213-216.
- [12] 黄煜, 李大金, 朱影. 三色荧光标记鉴定早孕蜕膜及外周免疫细胞组成[J]. *生殖医学杂志*, 2006, 15(5): 328-332.
HUANG Yu, LI Dajin, ZHU Ying. Characterization of decidual and periphera immune cells of the first-trimester pregnancy by 3-color flow cytometry[J]. *Journal of Reproductive Medicine*, 2006, 15(5): 328-332.
- [13] Seki M, Oomizu S, Ken-mei S, et al. Galectin-9 suppresses the generation of Th17, promotes the induction of regulatory T cells, and regulates experimental autoimmune arthritis[J]. *Clin Immunol*, 2008, 127(1): 78-88.
- [14] Nagahara K, Arikawa T, Oomizu S, et al. Galectin-9 increases Tim-3 + dendritic cells and CD8 + T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions[J]. *J Immunol*, 2009, 181(11): 7660-7669.
- [15] 李静. Tim-3-Gal-9 通路在小鼠复发性流产模型中的表达及意义[D]. 武汉:华中科技大学, 2011.
LI Jing. The expression and significance of Tim-3-Gal-9 pathway in murine RSA models[D]. Huazhong University of Science and Technology, 2011.
- [16] 党静. 不明原因复发性自然流产中 Tim-3-Gal-9 通路介导的免疫失衡机制研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
DANG Jing. Tim-3-Gal-9-mediated immunity imbalance during Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion [D]. Huazhong University of Science and Technology, 2013.
- [17] Meggyes M, Miko E, Polgar B, et al. Peripheral blood TIM-3 positive NK and CD8 + T cells throughout pregnancy: TIM-3/Galectin-9 interaction and its possible role during pregnancy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 92371.
- [18] Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, et al. Decidual and peripheral blood CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases[J]. *Mol Hum Reprod*, 2004, 10(5): 347-353.

(编辑:徐苗蓁)