

# STAT4、STAT6 在子痫前期胎盘组织中的表达及意义

吕艳关<sup>1</sup>, 臧晓娟<sup>2</sup>, 武 荣<sup>2</sup>, 范广来<sup>1</sup>, 刘 石<sup>2</sup>, 魏 红<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:**探讨子痫前期患者胎盘组织中信号转导和转录激活因子(STAT)4 以及 STAT6 的表达及意义。**方法:**采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接(SABC)法和 Western blot 法检测 30 名正常妊娠晚期孕妇(对照组)和 50 例子痫前期患者(子痫前期组,其中轻度 22 例、重度 28 例)胎盘组织中 STAT4、STAT6 的蛋白定位和表达。**结果:**STAT4 主要表达于绒毛滋养细胞的胞质,胞核多数无明显着色;轻、重度子痫前期组胎盘组织中 STAT4 的表达均明显高于对照组( $P < 0.01$ );STAT6 主要表达于绒毛滋养细胞的胞质,胞核多数无明显着色;轻度、重度子痫前期组均显著低于对照组( $P < 0.01$ ),且轻、重度子痫前期组 STAT4 和 STAT6 表达水平差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。子痫前期组和正常妊娠组绒毛组织中 STAT4 与 STAT6 的表达水平均呈负相关关系( $r = -0.509, r = -0.617; P < 0.01$ )。**结论:**STAT4、STAT6 共同参与子痫前期的病理生理改变,并与病情严重程度有一定关系。

**[关键词]** 子痫前期;滋养细胞;信号转录与传导因子

**[中图分类号]** R 714.244 **[文献标志码]** A **DOI:**10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.12.004

## The expressions of STAT4 and STAT6 in placenta of preeclampsia patients and its significance

LÜ Yan-guan<sup>1</sup>, ZANG Xiao-juan<sup>2</sup>, WU Rong<sup>2</sup>, FAN Guang-lai<sup>1</sup>, LIU Shi<sup>2</sup>, WEI Hong<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Clinical Medicine, 2. Laboratory of Neonatal Medical Center, Huai'an Women & Children Hospital Affiliated to Yangzhou University, Huai'an Jiangsu 223002, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the signal transduction and expression of STAT4 and STAT6 in placenta of preeclampsia patients and its significance. **Methods:** The expressions and location of STAT4 and STAT6 in placenta of 30 normal late pregnant women (control group) and 50 preeclampsia patients (including 22 mild cases and 28 severe cases) were observed using Western blot and immunohistochemistry, respectively. **Results:** The expressions of STAT4 and STAT6 located mainly in the cytoplasm of villous trophoblast cell, the most nucleus were no clear coloring. The expressions of STAT4 and STAT6 were significantly higher and lower than those of control group, respectively ( $P < 0.01$ ). The differences of the expressions between STAT4 and STAT6 in placenta of mild and severe preeclampsia patients were statistically significant ( $P < 0.01$ ). The expressions of STAT4 in the cytoplasm of villous trophoblast cell in two groups were negative correlation with the level of STAT6 ( $r = -0.509, r = -0.617; P < 0.01$ ). **Conclusions:** Both STAT4 and STAT6 participate the pathogenic process of preeclampsia, and are related to the severe degree of disease. The high expression of STAT4 and low expression of STAT6 in the villous trophoblast cell of preeclampsia patients can lead to Th1/Th2 imbalance, which may lead to the preeclampsia.

**[Key words]** reeclampsia; trophoblast; signal transducers and activators of transcription

子痫前期是妊娠晚期特有的并发症,主要临床表现为妊娠 20 周后出现进行性加重的高血压、水肿、蛋白尿等临床症状。在世界范围内发病率为 4% ~ 8%<sup>[1-2]</sup>。该病与围生期母婴患病率和死亡率密切相关,发病原因至今仍未阐明,国内外学者<sup>[3-4]</sup>研究发现,子痫前期的发生可能与 Th1 型细胞因子介导的细胞免疫功能增强和 Th2 型细胞因子介导的体液

免疫功能减弱有关。信号转导和转录激活因子(STAT)4 和 STAT6 作为特异性的转录因子可诱生成相应的细胞因子,从而促进 Th 细胞分化,使 Th1/Th2 比例失衡,是众多免疫性疾病的重要发病机制<sup>[5-6]</sup>。STAT4 和 STAT6 的表达变化是否与子痫前期的发病有关?二者是否存在相关性?国内鲜有报道。本研究通过测定子痫前期患者和正常妊娠孕妇胎盘组织 STAT4、STAT6 的表达,探讨其在子痫前期发病过程中可能发挥的作用。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2012 年 2 月至 2013 年 2 月淮安市妇幼保健院产科监护病房收治的子痫前期患者 50 例(轻度 22 例,重度 28 例),诊断标准参照

[收稿日期] 2015-04-18

[基金项目] 江苏省淮安市科技局立项项目(HAS2012023)

[作者单位] 扬州大学附属淮安市妇幼保健院 1. 医学检验科, 2. 新生儿医学中心实验室, 江苏 淮安 223003

[作者简介] 吕艳关(1981-),男,硕士,主管检验师。

[通信作者] 魏 红,副主任技师。E-mail: Weihong\_3@126.com

《妇产科学》第 7 版<sup>[7]</sup>。选择同期住院的正常妊娠晚期孕妇 30 名作为对照组。2 组孕妇均为初产、单胎,均排除内科合并症和其他产科并发症,2 组孕妇均以剖宫产终止妊娠。子痫组孕妇年龄 26~38 岁,孕 36~40 周。对照组年龄 26~37 岁,孕 36~40 周。2 组年龄和孕周均具有可比性。

## 1.2 研究方法

1.2.1 标本采集与处理 分娩后立即收集入选者胎盘组织,避开胎盘梗死、钙化和血管瘤部分,从脐带植入点旁开 5 cm 处纵向切开胎盘组织。参照 Sood 等<sup>[8]</sup>报道,将胎盘组织纵向分为 3 部分,即母体面部分、中间部分和胎儿面部分,本研究采集中间部分绒毛体积约 1 cm × 1 cm × 1 cm。在冰预冷的磷酸盐缓冲液中充分漂洗后,保存于 4% 多聚甲醛和液氮中备用。

1.2.2 实验试剂和方法 (1)主要试剂:STAT4 多克隆抗体(Bioworld 公司),STAT6 兔抗人多克隆抗体(Sigma-Aldrich 公司),GAPDH 抗体(Abcam 公司),联苯二胺(DAB)底物显色试剂盒(武汉博士德公司)。(2)采用免疫组织化学(免疫组化)SABC 法检测胎盘组织中 STAT4 和 STAT6 蛋白定位。一抗工作浓度分别 1:200、1:150。(3)采用 Western blot 印记杂交法检测胎盘组织中 STAT4 和 STAT6

的蛋白表达,一抗工作浓度均为 1:500,GAPDH 为内参,以各标本目的条带和与内参实际灰度值的比值表示各组抗体蛋白表达水平。

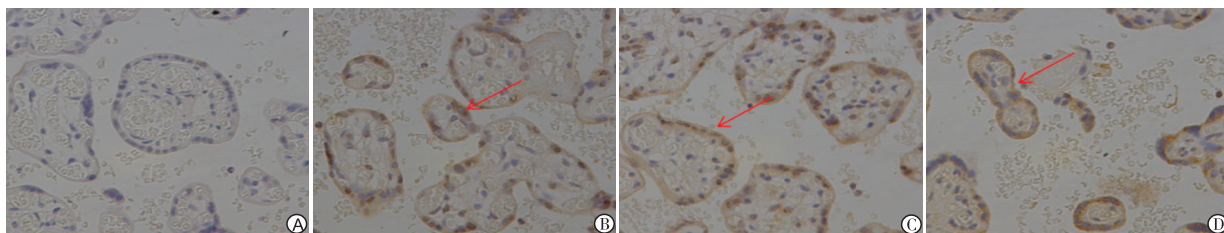
1.3 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验及直线相关分析。

## 2 结果

2.1 各组胎盘绒毛组织 STAT4 的表达比较 免疫组化实验结果显示,STAT4 阳性细胞主要表达于合体滋养细胞胞质和蜕膜组织中间质细胞胞质,间质细胞内也可见少量表达(见图 1)。Western blot 检测 STAT4 蛋白的表达结果显示,轻、重度子痫前期组 STAT4 蛋白表达均显著高于正常妊娠组,且重度组亦明显高于轻度组( $P < 0.01$ )(见表 1)。

2.2 各组胎盘绒毛组织 STAT6 的表达比较 免疫组化实验结果显示,STAT6 主要表达于合体滋养细胞胞质和蜕膜组织中间质细胞胞质(见图 2)。Western blot 检测 STAT6 蛋白的表达结果显示,子痫前期重度组及轻度组 STAT6 蛋白表达水平均显著低于正常妊娠组( $P < 0.01$ ),且重度组亦明显低于轻度组( $P < 0.01$ )(见表 2)。

2.3 胎盘组织中 STAT4、STAT6 表达的相关性 子痫前期组和正常妊娠组妇女绒毛组织中 STAT4 与



A:阴性对照;B:对照组;C:轻度组;D:重度组(红色箭头代表阳性表达)

图1 STAT4在胎盘组织中的表达

表 1 各组胎盘组织中 STAT4 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	STAT4 表达水平	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
子痫前期轻度组	22	1.52 ± 0.36			
子痫前期重度组	28	1.78 ± 0.28**	180.11	<0.01	0.068
对照组	30	0.54 ± 0.12 $\Delta\Delta$			

$q$  检验:与子痫前期轻度组比较 \*\* $P < 0.01$ ;与子痫前期重度组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 各组胎盘组织中 STAT6 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

分组	<i>n</i>	STAT6 表达水平	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>MS</i> <sub>组内</sub>
子痫前期轻度组	22	1.19 ± 0.27			
子痫前期重度组	28	0.64 ± 0.11**	278.36	<0.01	0.036
对照组	30	1.82 ± 0.18 $\Delta\Delta$			

$q$  检验:与子痫前期轻度组比较 \*\* $P < 0.01$ ;与子痫前期重度组比较  $\Delta\Delta P < 0.01$

STAT6 蛋白的表达均呈负相关关系( $r = -0.509$ ,  $r = -0.617$ ;  $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

研究<sup>[9]</sup>发现,人类辅助性 T 细胞主要包含 Th1、Th2 2 个亚群。Th1 型细胞因子通过分泌白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等细胞因子促进巨噬细胞的活化、引起 T 淋巴细胞介导的迟发过敏反应和细胞毒作用,具有免疫杀伤作用,可抑制胚胎着床、滋养细胞生长,损害胎盘细胞分化和生长,对胚胎发育有毒性作用,其过表达不利于妊娠维持<sup>[10]</sup>。Th2 型细胞因子以分泌 IL-4、IL-6、IL-10 等细胞因子为主,主要介导 B 细胞增殖抗体生成,具有免疫营养作用,有利于妊

娠<sup>[11]</sup>。正常妊娠过程中两类细胞因子间相互协调、形成 Th1/Th2 细胞因子平衡网络,维持正常体内免疫应答及正常妊娠的顺利进行。此平衡网络的失调会导致妊娠高血压综合征等多种病理性妊娠的发生、发展<sup>[12]</sup>。

研究<sup>[13]</sup>表明,STAT4 是 Th1 细胞分化的特异性转导因子,是多种免疫调控细胞内 IL-12/STAT4/INF- $\gamma$  信号转导途径的关键组成元件,其对具有完整功能的 Th1 细胞的发育是必不可少。STAT4 途径是细胞因子调节免疫细胞向 Th1 分化的最主要的信号转导通路<sup>[14]</sup>。

STAT6 是信号转导和转录激活因子家族的另一成员,它可以通过 JAK-STAT 信号转导途径介导细胞因子 IL-3、IL-4 及 IL-6 诱导等基因表达,尤其是在促进 IL-4 诱导的 MHCII 类抗原及 Th2 型辅助细胞的发育上发挥了重要的作用<sup>[15]</sup>。STAT6 是 Th2 分化的特异性转导子,可促进 Th2 增殖,产生大量细胞因子。一旦 STAT6 表达不足,会使 Th2 型细胞分化受到抑制,导致 Th2 型细胞因子分泌减少。因此表明,STAT6 是维持 Th1/Th2 平衡不可缺少的因子。STAT6 途径是细胞因子调节免疫细胞向 Th2 分化的最主要的信号转导通路<sup>[16]</sup>。

研究<sup>[17]</sup>证实,在胞内信号分子通路传导中,STAT4/STAT6 居于 JAK/STAT 信号通路级联反应的环节,STAT4、STAT6 信号通路通过调节 Th1/Th2 参与多种疾病的发生、发展过程。

本研究结果显示,STAT4、STAT6 蛋白在绒毛滋养细胞的胞质中表达,子痫前期组 STAT4 蛋白表达水平高于正常妊娠组,而 STAT6 蛋白表达水平明显低于正常妊娠组,两者的表达呈负相关关系( $P < 0.01$ );张冬丽等<sup>[18]</sup>在原因不明复发性自然流产患者绒毛组织中也发现类似结果。

本研究还发现,STAT4、STAT6 蛋白在子痫前期组和对照组的蜕膜组织中表达差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),且主要表达部位不同,在子痫前期组中,STAT4 高表达可促进 Th1 的募集、增优势表达 IL-12、INF- $\gamma$ ;提示当绒毛组织中 STAT4 蛋白表达上调时,Th1 型细胞因子过表达,通过直接或间接激活巨噬细胞、NK 细胞及细胞毒性 T 淋巴细胞等多种对着床、滋养细胞生长、胚胎发育和胎儿生存有害的毒性细胞,不利于妊娠。而 Th2 型细胞因子则使 Th1 型细胞介导激活自然杀伤细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞的应答抑制,子痫前期组 STAT6 低表达则可能抑制了 IL-4 等 Th2 型细胞因子的增殖,通过信号转导途径,调节相应的细胞因子,或者直接诱导母胎

界面 Th1/Th2 平衡向 Th1 偏移,防止对滋养细胞和胎儿的继发损伤,使 Th1/Th2 比例失衡,导致子痫前期的发生<sup>[19]</sup>。以往动物实验<sup>[20-21]</sup>发现,野生型和 STAT4 缺陷小鼠表现 Th2 免疫应答优势,STAT6 缺陷小鼠表现 Th1 免疫优势,因此 STAT4、STAT6 途径是细胞因子调节免疫细胞向 Th1 分化的最主要的信号转导通路。

总之,胞内信号分子 STAT4、STAT6 对 Th1/Th2 细胞及其细胞因子的调控越来越多的引起人们的重视,通过调控 STAT4、STAT6 蛋白所介导的信号转导系统来调控免疫系统,将为临床诊断、治疗子痫前期开辟新的途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ileki J, Reddy UM, Roberts JM. Preeclampsia—a pressing problem: an executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop [J]. *Reprod Sci*, 2007, 14(6): 508–523.
- [2] ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia Number 33, January 2002 [J]. *Obstet Gynecol*, 2002, 99(1): 159.
- [3] Olusi SO, Diejomaoh M, Omu A, et al. Interleukins in preeclampsia [J]. *Ann Saudi Med*, 2000, 20(1): 4–7.
- [4] 王越,叶路,付正英,等. 妊娠高血压综合征发病中免疫调节机制的研究 [J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(2): 188–202.
- [5] Lund R, Ahlfors H. Identification of genes involved in the initiation of human Th1 or Th2 cell commitment [J]. *J Immunol*, 2005, 35(11): 3307–3319.
- [6] Namjou B, Sestak AL, Armstrong DL, et al. High-density genotyping of STAT4 reveals multiple haplotypic associations with systemic lupus erythematosus in different racial groups [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(4): 1085–1095.
- [7] 乐杰. 妇产科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 137–138.
- [8] Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, et al. Gene expression patterns in human placenta [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(14): 5478–5483.
- [9] Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, et al. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy [J]. *J Reprod Immunol*, 2002, 53(1/2): 241–256.
- [10] Chaouat G. Innately moving away from the Th1/Th2 paradigm in pregnancy [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 131(3): 393–395.
- [11] Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface [J]. *J Reprod Immunol*, 2000, 47(2): 87–103.
- [12] Kaplan MH, Whitfield JR, Boros DL, et al. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced-ganulomatous response [J]. *Immunol*, 1998, 160(4): 1850–1856.
- [13] Tyler DR, Persky ME, Matthews LA, et al. Pre-assembly of STAT4 with the human IFN- $\alpha/\beta$  receptor-2 subunit is mediated by the stat4 N-domain [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(8): 1864–1867.

保肢成功 53.3% ; 近期临床疗效明显, 但观察时间较短及患者数较少, 有待积累患者数以继续观察大样本近期及远期疗效。

大剂量 MTX 对细胞周期短、增殖快的骨髓细胞、胃肠道、皮肤、口腔黏膜细胞及肝细胞影响巨大, 因而会导致骨髓抑制、胃肠道反应、黏膜炎、口腔溃疡及肝功能损害等不良反应<sup>[9]</sup>, 相关不良反应的病死率约为 6%<sup>[10]</sup>。本研究中, 中性粒细胞下降、血红蛋白下降、恶心呕吐、脱发发生率较高, 发生率为 86.7% ~ 100.0%, 但多为轻到中度, 经对症处理后多 1 周内恢复; 口腔黏膜炎的发生率为 26.7%, 恢复较快; III ~ IV 度中性粒细胞下降比例占 46.7%, 经粒细胞集落刺激因子及预防性抗生素应用后未出现严重感染及致死患者, 未出现因不良反应推迟化疗的患者。值得讨论的是本研究中肝功能损害为 13.3%, 明显低于其他报道的 50%<sup>[9-10]</sup>, 分析可能原因有以下 2 点: (1) 本研究将 PDD 80 ~ 100 mg/m<sup>2</sup>, ADR 50 mg/m<sup>2</sup>, 于 d<sub>6</sub>、d<sub>7</sub> 平均分 2 d 应用, 避免大剂量 MTX 与 ADR 2 种药物对肝功能损害的叠加效应。(2) 本研究的 CF 解救及水化碱化方案简单、安全、有效, 降低了大剂量 MTX 的不良反应。我们在大剂量 MTX 静滴结束后多次给予 CF 解救, 以及大量静脉补液并嘱患者多饮水进行充分水化, 同时给予碳酸氢钠及别嘌呤碱化尿液。因此, 即使 MTX 剂量高达 18 g, 经过 CF 解救、充分水化、碱化仍然安全、有效。本研究中我们发现 5 例患者在第 1 次化疗结束后出现白细胞升高 [(12.98 ~ 14.37) × 10<sup>9</sup>], 以中性粒细胞为主, 但并无发热及感染征象, 排除其他因素考虑可能与第 1 周期化疗后肿瘤组织坏死吸收有关, 且术后该 5 例肿瘤组织坏死率均 ≥ 90%, 并经术后病理证实。

综上所述, 本研究显示大剂量 MTX、PDD 联合

ADR 治疗骨肉瘤肿瘤组织坏死率高, 保肢成功率高, 近期疗效肯定; 通过 CF 解救、充分水化及碱化尿液, 未出现严重不良反应, 不良反应可耐受, 值得临床推广使用。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 万德森. 临床肿瘤学[M]. 3 版. 北京: 科学技术出版社, 2010: 549.
- [2] 陈晓东, 周新社, 李昭程, 等. STAT3 在骨肉瘤中的表达及其与肿瘤微血管密度的关系[J]. 蚌埠医学院学报, 2013, 38(10): 1260 - 1263.
- [3] Moore DD, Luu HH. Osteosarcoma[J]. Cancer Treat Res, 2014, 162: 65 - 92.
- [4] 胡蓓蓓, 汤丽娜, 郑水儿, 等. 甲氨蝶呤、顺铂、阿霉素和异环磷酰胺治疗 II B 期肢体骨肉瘤的临床观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 353 - 356.
- [5] 牛晓辉. 经典型骨肉瘤临床诊疗专家共识的解读[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(10): 934 - 945.
- [6] Paulussen M, Bielack S, Jürgens H, et al. Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up[J]. Ann Oncol, 2009, 20(Suppl 4): 140 - 142.
- [7] Li S, Sun W, Wang H, et al. Research progress on the multidrug resistance mechanisms of osteosarcoma chemotherapy and reversal[J]. Tumour Biol, 2015, 36(3): 1329 - 1338.
- [8] Berger M, Fagioli F, Abate M, et al. Unusual sites of Ewing sarcoma (ES): a retrospective multicenter 30-year experience of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) and Italian Sarcoma Group (ISG) [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(17): 3658 - 3665.
- [9] 林峰, 岳娟, 汤丽娜, 等. 大剂量甲氨蝶呤在治疗骨肉瘤中的血药浓度监测及其临床意义[J]. 肿瘤, 2012, 5(23): 440 - 442.
- [10] 王静文, 林峰, 郑水儿, 等. 大剂量甲氨蝶呤联合顺铂或联合表柔比星抑制骨肉瘤 MG-63 细胞效果的观察[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2011, 24(9): 1856 - 1859.

( 本文编辑 刘畅 )

( 上接第 1630 页 )

- [14] Kim SH, Gunst KV, Sarvetnick N. STAT4/6-dependent differential regulation of chemokine receptors [J]. Clin Immunol, 2006, 118(2/3): 250.
- [15] Sanchez-Guajardo V, Tanchot C, O'Malley JT, et al. Agonist-driven development of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells requires a second signal mediated by stat6 [J]. J Immunol, 2007, 178(12): 7550 - 7556.
- [16] Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6 [J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2577 - 2584.
- [17] Deboy CA, Xin J, Byram SC, et al. Immune-mediated neuroprotection of axotomized Mouse facial motoneurons is dependent on the IL-4/STAT6 signaling pathway in CD4(+) T

cells [J]. Exp Neurol, 2006, 201(1): 212 - 224.

- [18] 张冬丽, 杨雪峰. 原因不明复发性自然流产患者绒毛组织中 STAT4 和 STAT6 的表达 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2010, 1(45): 42 - 44.
- [19] Yang Z, Chen M, Ellett JD, et al. Autoimmune diabetes is blocked Stat4-deficient mice [J]. J Autoimmun, 2004, 223: 191 - 200.
- [20] Tyler DR, Persky ME, Matthews LA, et al. Pre-assembly of STAT4 with the human IFN- $\alpha/\beta$  receptor-2 subunit is mediated by the stat4 N-domain [J]. Mol Immunol, 2007, 44(8): 1864 - 1867.
- [21] Wang Y, Evans JT, Rodrigulz F, et al. A tale of two STAT6 knock out mice in the induction of experiment autoimmune encephalomyelitis [J]. Neuroimmunol, 2009, 206(1/2): 76 - 85.

( 本文编辑 刘璐 )