

· 论 著 ·

## 小鼠合体滋养细胞微绒毛膜制备方法的研究\*

李怡琳, 韩 健, 刘晓洁, 韩 磊, 俞丽丽, 李红梅, 周丽娟, 张 欣, 郑英如, 郭建新, 李 力<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所妇产科中心, 重庆 400042)

**摘要:**目的 建立一种制备小鼠合体滋养细胞微绒毛膜(STBM)的方法。方法 收集足月孕小鼠的胎盘,利用机械分离法剪碎胎盘进行差速离心,分离小鼠 STBM。用 Lowry 法测定制备的小鼠 STBM 蛋白水平,用组织多肽抗原作为小鼠 STBM 的标记物,采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 STBM 的水平,利用电镜观察并分析小鼠 STBM 的形态结构。结果 实验获得的小鼠 STBM 制剂的蛋白水平为(0.69±0.12)mg/mL,TPA 水平为(61.49±9.78)ng/mL。电镜下小鼠 STBM 的直径为(228.52±90.06)nm 的囊泡状结构。结论 制备的小鼠 STBM 与人 STBM 高度相似,可为子痫前期致病机制的探索提供在体研究的实验基础。

**关键词:**合体滋养细胞微绒毛膜;胎盘;C57BL/6 小鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)12-1330-02

## The study on a method for preparation of syncytiotrophoblast microvillous membrane of mice\*

Li Yilin, Han Jian, Liu Xiaojie, Han Lei, Yu Lili, Li Hongmei, Zhou Lijuan, Zhang Xin, Zheng Yingru, Guo Jianxin, Li Li<sup>△</sup>

(Obstetrics and Gynecology Center, Daping Hospital, Research Institute of Surgery,  
the Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To construct a method to prepare syncytiotrophoblast microvillous membrane(STBM) of mice. **Methods** STBM were prepared from placentas which were collected sterilely, immediately from full term mice. After breaking up the placenta mechanically, STBMs were separated by differential centrifugation. Lowry's method was used to detect total protein concentration of STBM. ELISA was applied to detect STBM. Scanning electron microscope was used to observe the morphological characteristics of STBM. **Results** Total protein level of the STBM prepared from mice in this study was (0.69±0.12)mg/mL. TPA level of STBM preparation was (61.49±9.78)ng/mL. Under the scanning electron microscope, the diameter of STBM micro-particles was (228.52±90.06)nm. **Conclusion** The protein marker and morphological characteristics of STBM preparation of mice from our study were similar to the STBM preparation of human.

**Key words:** syncytiotrophoblast microvillous membrane; placenta; C57BL/6 mice

合体滋养细胞微绒毛膜(syncytiotrophoblast microvillous membrane, STBM)是合体滋养细胞凋亡或被激活时形成的带膜囊泡状结构<sup>[1]</sup>,目前认为可能与多种妊娠并发症的发生相关。脱落至母体血液循环的 STBM 可作用于外周血管,导致血管内皮细胞功能障碍<sup>[2-3]</sup>,同时通过调节机体炎症因子释放和调控细胞免疫等多种途径影响母体免疫系统<sup>[4]</sup>。基于医学研究的伦理学要求和妊娠过程的特殊性质,尚无法通过临床试验研究 STBM 在体内的功能特点。而迄今为止,鲜见以 STBM 为研究靶点的动物体内试验的报道。本研究建立了一种体外制备、富集 C57 小鼠 STBM 的方法,并使用 TPA 作为 STBM 的定量标记<sup>[4]</sup>,为基于小鼠的 STBM 相关动物实验提供了前期实验基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与试剂** 2 个月龄 C57BL/6 小鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心),青-链霉素溶液(GIBCO Invitrogen Life Technologies),Improved-lowry 蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司),小鼠组织多肽抗原酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海卢尚生物有限公司)。

## 1.2 方 法

**1.2.1 主要仪器** 超速冷冻离心机(Beckman 公司),电子天

平,酶标仪(Labsystems Multiskan MS),扫描电子显微镜(Hatchi S-3400N II)等。

**1.2.2 STBM 的制备和富集** 2 个月龄雌性 C57BL/6 小鼠,于妊娠 18 d 以 2.5%戊巴比妥麻醉(腹腔注射,20 mL/kg),无菌条件下剖宫取出胎盘,冰磷酸盐缓冲液(PBS)洗去残留血液,无菌纱布吸干表面水分后称质量,以无菌眼科剪将胎盘剪碎(约 1 mm<sup>3</sup>),称取 2 g 胎盘组织放入 100 mL NaCl 溶液中(0.15 mol/L,1%青-链霉素),4 ℃振荡过夜,取上清离心:1 200 r/min,10 min,弃沉淀;37 000 r/min,90 min,弃上清液,得到 STBM 富集沉淀。以 4 ℃的 PBS 洗涤沉淀,并以 4 ℃的 PBS(5%蔗糖)重悬,保存于-20 ℃备用。

**1.2.3 蛋白及 TPA 水平的测定** 使用 Improved-lowry 蛋白定量试剂盒,按照说明书严格操作测定 STBM 总蛋白的水平。以 TPA 为标记,使用小鼠组织多肽抗原 ELISA 试剂盒,按说明书严格操作测定 STBM 的水平。

**1.2.4 扫描电子显微镜观察** 0.2 mL STBM 制剂中加入等体积的 2.5%戊二醛固定 4 h 后滴到直径约 1 cm×1 cm 的云母片上,自然风干,镀金,上机观察。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 STBM 制剂中总蛋白水平及 TPA 水平** STBM 的 TPA 水平为 45.33~77.53 ng/mL, 平均值(61.49±9.78)ng/mL (n=22); 总蛋白水平为 0.46~0.91 mg/mL, 平均值为(0.69±0.12)mg/mL(n=20), 见图 1。

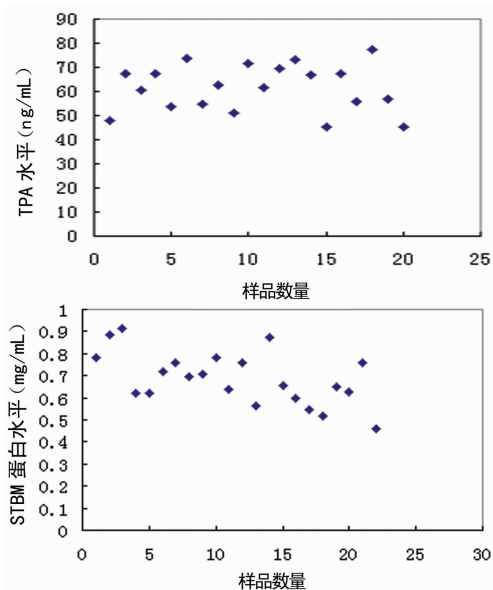


图 1 STBM 制剂 TPA 水平及蛋白水平

**2.2 电镜观察** 在扫描电镜下(SEM×20 000)可见 STBM 为囊泡状的亚细胞结构, 有聚集成团的趋势, 此特性与机械法制备的人类来源的 STBM 有相似的特性<sup>[5]</sup>。Image-Pro Plus 6.0 软件测得 STBM 囊泡的直径为 104.47~472.71 nm, 平均(228.52±90.06)nm, 与文献报道的体外制备的人 STBM 高度相似, 见图 2。

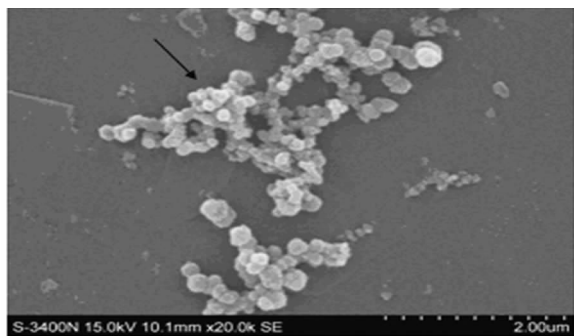


图 2 扫描电镜下 STBM 的结构

## 3 讨 论

正常妊娠时, 胎盘持续释放少量的 STBM 和炎症介质到母体血循环中, STBM 在体内的过多存在导致过度的炎症反应, 引起母体生理功能紊乱<sup>[6]</sup>。Chen 等<sup>[3]</sup>发现早发型子痫前期的孕妇体内 STBM 的水平较晚发型子痫前期高。Aly 等<sup>[7]</sup>发现 STBM 可以刺激白细胞产生过氧化物自由基导致内皮细胞功能紊乱。Gardiner 等<sup>[8]</sup>发现 STBM 可以具有组织因子的活性。本课题组前期的研究表明, 重度子痫前期患者胎盘 STBM 的释放明显强于正常妊娠组胎盘 STBM 的释放<sup>[9]</sup>。在孕妇体内外周血单核细胞存在一个过度激活状态, 有文献报道这一现象与妊娠过程中胎盘释放的 STBM 有密切关系, 来自于低氧培养的 STBM 能导致外周血单核细胞更强烈的激活<sup>[10-11]</sup>。

由于伦理学的限制, 当前展开的对 STBM 功能的研究均

局限于体外实验, 其对体内主要脏器、各功能系统的影响也不明确。因此要进一步对 STBM 进行体内研究, 必然要通过动物实验。但是由于免疫等条件的限制, 来源于人的 STBM 无法使用到动物实验中, 而目前尚没有来源于动物的 STBM 的制备方法。

目前已报道的人类 STBM 的制备方法主要有 3 种: 绒毛组织培养法、机械法及胎盘小叶灌注法。机械法制备的 STBM 能诱导人脐静脉内皮细胞的凋亡<sup>[12]</sup>。目前认为机械法制备的 STBM 最接近合体滋养细胞在病理状态下凋亡和坏死释放的 STBM。

因此, 本研究采用了机械法结合差速离心法提取并富集小鼠 STBM, 第一步离心去掉样品当中的细胞、细胞碎片及部分大分子聚合物, 第二步离心去掉细胞器及小细胞碎片, 第三步离心即可富集提纯 STBM。本方法制得的小鼠 STBM 制剂蛋白水平为 0.46~0.91 mg/mL, 平均值为(0.69±0.12)mg/mL, 其标记物 TPA 水平明显高于文献报道的人血清及人胎盘匀浆液中 STBM 的表面标志物 TPA 水平<sup>[13]</sup>, 这表明本方法能够浓缩制得高水平的 STBM, 为各种动物实验的开展提供了有利的条件。从形态学上观察, 本次制得的 STBM 与人类来源的体外制备的 STBM 相似<sup>[5]</sup>, 因此可以认为本方法制得的小鼠 STBM 制剂形态学及蛋白表达上与人 STBM 均具有高度的相似性, 其生理学功能和致病性尚需进一步的研究, 这也是本课题组下一步的研究重点。采用本方法可以成功制备高水平的小鼠 STBM 制剂, 为以 STBM 为研究靶点的动物实验的开展初步建立了实验基础, 提供了新的研究思路。

## 参考文献:

- [1] Hung TH, Skepper JN, Charnock-Jones DS, et al. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in pre-eclampsia[J]. *Circ Res*, 2002, 90(12): 1274-1281.
- [2] Meziani F, Tesse A, David E, et al. Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(4): 1473-1483.
- [3] Chen Y, Huang Y, Jiang R, et al. Syncytiotrophoblast-derived microparticle shedding in early-onset and late-onset severe pre-eclampsia[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2012, 119(3): 234-238.
- [4] Southcombe J, Tannetta D, Redman C, et al. The immunomodulatory role of syncytiotrophoblast microvesicles[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20245.
- [5] Gupta AK, Rusterholz C, Huppertz B, et al. A comparative study of the effect of three different syncytiotrophoblast micro-particles preparations on endothelial cells[J]. *Placenta*, 2005, 26(1): 59-66.
- [6] Hellgren M. Hemostasis during normal pregnancy and puerperium[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2003, 29(2): 125-130.
- [7] Aly AS, Khandelwal M, Zhao J, et al. Neutrophils are stimulated by syncytiotrophoblast microvillous membranes to generate superoxide radicals in women with preeclampsia[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2004, 190(1): 252-258.

训练伤作为抑郁的危险因素之一,体现在躯体症状这一因子上得分上,因此要降低第 2 年军人的抑郁症状应重点关注其军事训练的安全性。

本研究发现,高寒地区军人抑郁发生的首要危险因素为环境因素和遗传因素。经历了 3 次以上不幸事件的军人,其抑郁发生风险增大 10 倍以上;同时遗传增加了抑郁易感性,高寒地区军人中若父母兄弟患有抑郁症的其抑郁发生风险增大 4 倍,这与 Sullivan 等<sup>[12]</sup>的研究相一致。其次,吸烟、饮酒、少运动这 3 种不良行为习惯也大大增加了高寒地区军人抑郁发生几率。因此,抽烟、体能活动不足和过度饮酒为引发高寒地区军人抑郁发生的 3 种主要危险行为,这与美国 2006 年危险行为因素监控系统(BRFSS)<sup>[13]</sup>数据基本一致。本研究还发现长期服用药物及患有慢性疾病的高寒地区军人抑郁发生风险为未服药及未患有慢性病军人 2~3 倍,WHO 的一项研究也证明有两个或两个以上慢性病的患者抑郁症的发生率更高<sup>[14]</sup>。最后,对高寒地区军人而言,训练伤是导致抑郁的一个重要因素,特别在治疗期间抑郁发生风险比平时高接近 3 倍。本次研究发现参加军队特殊任务本身并不促进抑郁症状发生,反而多次参加(超过 3 次以上)军事特殊任务者的抑郁发生率更低。军人在复杂军事任务时,可以充分调动其完成任务的积极性,提高军事责任感,增强军事任务执行能力,促进思维和认知能力的发展,提高适应能力等,有助于最终提升总体军人心理素质水平,帮助军人自我成长。

综上所述,如果在新兵入伍前做好严格筛查,剔除抑郁症易感人群;并关注军人个体,对于遭受重大生活不幸事件的军人给予最大的关心与支持;帮助军人改变不良生活习惯,建立健康良好的生活作风,将有效降低军人抑郁的发生。其次,据调查表明,我国军人训练伤的发生率在 15%~18%左右<sup>[15]</sup>,如果能够有效降低训练伤的发生率,将大大减少军人抑郁发生。最后,适当的军事特殊任务及体能锻炼能够有效防止抑郁产生,提升高寒地区军人心理健康。

#### 参考文献:

- [1] Wehr TA, Rosenthal NE. Seasonality and affective illness [J]. *Am J Psychiatry*, 1989, 146(7): 829-839.
- [2] Woo JM, Okusaga O, Postolache TT. Seasonality of suicidal behavior[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2012, 9(2): 531-547.
- [3] 冯正直,戴琴. 中国军人心理健康状况的元分析[J]. *心理学报*, 2008, 40(3): 358-367.
- [4] 陶甲林,康辉,张旭,等. 高寒边防地区官兵心理健康水平调查与分析[J]. *人民军医*, 2010, 53(10): 727-728.
- [5] 刘阿力,崔继秀,苟娟,等. 高原高寒部队官兵心理卫生现状与对策[J]. *解放军保健医学杂志*, 2007, 9(4): 235-236.
- [6] Boyd JH, Weissman MM, Thompson WD, et al. Screening for depression in a community sample. Understanding the discrepancies between depression symptom and diagnostic scales[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 1982, 39(10): 1195-2000.
- [7] 章婕,吴振云,方格,等. 流调中心抑郁量表全国城市常模的建立[J]. *中国心理卫生杂志*, 2010, 24(2): 139-143.
- [8] Xiong H, Zhang X, Zhang Y, et al. An investigation of the prevalence of depressive symptoms in soldiers during military training[J]. *Prev Med*, 2005, 42(2): 642-645.
- [9] 武辉,冯正直,宋新涛. 中国青年军人抑郁特点及其相关因素研究[J]. *中华保健医学杂志*, 2009, 11(6): 433-436.
- [10] 冯正直,宋新涛,王智,等. 我国军人心理素质研究进展与展望[J]. *心理科学*, 2011, 34(5): 1274-1279.
- [11] 路涛. 军人认知情绪调节方式的特点及其与抑郁的关系[D]. 山东: 山东大学, 2009.
- [12] Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS. Genetic epidemiology of major depression; review and meta-analysis[J]. *Am J Psychiatry*, 2000, 157(10): 1552-1562.
- [13] Strine TW, Mokdad AH, Balluz LS, et al. Depression and anxiety in the United States: findings from the 2006 behavioral risk factor surveillance system [J]. *Psychiatr Serv*, 2008, 59(12): 1383-1390.
- [14] Moussavi S, Chatterji S, Verdes E, et al. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys[J]. *Lancet*, 2007, 370(9590): 851-858.
- [15] 黄昌林,王前进,王帅,等. 2009、2010 年全军军事训练伤流行病学抽样调查[J]. *解放军医学杂志*, 2012, 37(1): 59-61.

(收稿日期:2012-11-15 修回日期:2013-03-11)

(上接第 1331 页)

- [8] Gardiner C, Tannetta DS, Simms CA, et al. Syncytiotrophoblast microvesicles released from pre-eclampsia placentae exhibit increased tissue factor activity[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26313.
- [9] 杨博萍,韩健,韩新美,等. 重度子痫前期胎盘合体滋养细胞微绒毛膜脱落与 Rho/ROCK 分子表达的关系[J]. *解放军医学*, 2012, 37(3): 190-194.
- [10] Messlerli M, May K, Hansson SR, et al. Feto-maternal interactions in pregnancies; placental microparticles activate peripheral blood monocytes[J]. *Placenta*, 2010, 31(2): 106-112.
- [11] Lee SM, Romero R, Lee YJ, et al. Systemic inflammatory

stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast as a model for inflammatory response in pre-eclampsia[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, 207(4): e1-e8.

- [12] Gupta AK, Holzgreve W, Hahn S. Decrease in lipid levels of syncytiotrophoblast micro-particles reduced their potential to inhibit endothelial cell proliferation[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2008, 277(2): 115-119.
- [13] 李志杰,张文真,胡建秀. 胎盘及外周血中 STBM 与早发型重度子痫前期病因的研究[J]. *实用妇产科杂志*, 2008, 24(11): 677-680.

(收稿日期:2012-11-19 修回日期:2013-03-03)