

妊娠期糖尿病产妇胎盘组织中 TLR4/MyD88/NF- κ B 的表达及其与胰岛素抵抗的相关性

马宗丽¹, 秦智娟¹, 肖黎明¹, 李亚琴¹, 刘姝², 朱东兵², 沙红兰¹, 李美琴¹

1. 如皋市人民医院妇产科, 江苏 南通 226500; 2. 如皋市人民医院病理科, 江苏 南通 226500

摘要: **目的** 探讨妊娠期糖尿病(GDM)产妇胎盘组织中 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、核因子- κ B(NF- κ B)的表达及 TLR4 与胰岛素抵抗(IR)的相关性。**方法** 选择如皋市人民医院 2017 年 12 月至 2018 年 12 月收治的 32 例 GDM 患者为 GDM 组,同期 30 例正常孕妇为对照组,测定其分娩前外周血中 IR 相关指标水平,采用实时定量 PCR 和免疫组化法测定两组产后胎盘组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达水平。采用 Spearman 秩相关分析 GDM 产妇胎盘组织中 TLR4 表达水平与 IR 的相关关系。**结果** GDM 组分娩前外周血中 FBG、FINS、HOMA-IR 水平均明显高于对照组($P < 0.01$),两组 HOMA- β 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。GDM 组产妇胎盘母体面和胎盘胎儿面 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 蛋白表达水平及 mRNA 相对表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。Spearman 秩相关分析发现,GDM 组胎盘组织母体面及胎儿面 TLR4 的蛋白表达水平与 HOMA-IR 呈正相关($r = 0.596, P < 0.01; r = 0.326, P < 0.01$)。**结论** TLR4、MyD88、NF- κ B 在 GDM 产妇胎盘组织中表达增高,且 TLR4 蛋白表达水平与 IR 程度直接相关。

关键词: 妊娠期糖尿病; 胰岛素抵抗; Toll 样受体 4; 髓样分化因子 88; 核因子- κ B

中图分类号: R 714.256 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)12-1620-04

Expression of TLR4/MyD88/NF- κ B in placenta of pregnant women with gestational diabetes mellitus and its correlation with insulin resistance

MA Zong-li*, QIN Zhi-juan, XIAO Li-ming, LI Ya-qin, LIU Shu,

ZHU Dong-bing, SHA Hong-lan, LI Mei-qin

* Department of Gynecology and Obstetrics, Rugao People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226500, China

Abstract: Objective To investigate the expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and NF- κ B in placental tissues of women with gestational diabetes mellitus(GDM) and the relationship between TLR4 and insulin resistance(IR). **Methods** Thirty-two patients with GDM admitted to Rugao People's Hospital from December 2017 to December 2018 were selected as GDM group, and 30 normal pregnant women were served as control group at the same time. The levels of IR related indices in the peripheral blood were measured before delivery, and the mRNA and protein expressions of TLR4/MyD88/NF- κ B in placental tissue were determined by real-time quantitative PCR and immunohistochemistry in two groups. Spearman rank correlation analysis was used to determine the relationship between TLR4 expression level and IR in GDM women. **Results** The levels of fasting blood glucose(FBG), fasting insulin (FINS) and Homeostasis model assessment-insulin resistance (HOMA-IR) index in GDM group were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$), but HOMA- β levels were similar between two groups($P > 0.05$). The relative mRNA expressions and protein levels of TLR4/MyD88/NF- κ B in maternal and fetal surfaces of the placenta in GDM group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). Spearman test showed that the expression level of TLR4 in maternal and fetal surfaces of placenta was positively correlated with HOMA-IR in GDM group ($r = 0.596, P < 0.01; r = 0.326, P < 0.01$). **Conclusion** The expression of TLR4/MyD88/NF- κ B is increased in placenta of GDM women, and the protein expression level of TLR4 is directly related to the degree of IR.

Key words: Gestational diabetes mellitus; Insulin resistance; Toll-like receptor 4; Myeloid differentiation factor 88; Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

Fund program: Nantong Science and Technology Plan Guidance Project(GJZ17016); Nantong Health Commission Youth Fund Research Project(WKZD2018011); Research Project of Nantong Maternal and Child Health Specialist Alliance(TFM201801); Rugao Science and Technology Plan Project(2017-51)

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是最常见的妊娠期并发症,对母胎不良影响极大,母胎的近、远期并发症较多,是导致母胎死亡的重要原因之一^[1]。目前普遍认为机体局部和系统性胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)增加是 GDM 发生的核心问题,而免疫应答及炎症因子的释放是导致 IR 的重要原因。近年来多项研究认为, Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)下游激活的炎症因子可能与 GDM 发病相关^[2], TLR4 通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)介导的传导通路激活下游靶基因如核因子- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)、活化蛋白 1(AP-1)等,从而起到调节细胞增殖、分化等效果^[3]。胎盘是妊娠期特有的器官,也是重要的胰岛素靶器官,作为母胎界面,胎盘具有防御、合成及参与炎症免疫应答等重要功能^[4]。目前关于 GDM 胎盘中 TLR4 及其下游调控通路的研究少见报道,本研究探讨了 GDM 产妇胎盘组织中 TLR4、MyD88、NF- κ B 蛋白的表达情况及 TLR4 与 IR 的相关性,以期为临床 GDM 发病病因及治疗提供新思路、新策略。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 12 月至 2018 年 12 月在如皋市人民医院分娩的 GDM 产妇 32 例为 GDM 组,同期健康单胎孕妇 30 例为对照组。纳入标准:(1)两组均为单胎妊娠剖宫产分娩。(2)两组孕妇均于孕 24~28 周行 75 g 糖耐量检查,空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)值 5.1 mmol/L,餐后 1 h 血糖 10.0 mmol/L,餐后 2 h 血糖 8.5 mmol/L,任意一点血糖值达到或超过上述标准即可诊断为 GDM^[5]。(3)所有研究对象均既往体健,无其他特殊妊娠合并症和并发症。(4)GDM 组均为饮食控制加适当运动,孕期末用胰岛素治疗。排除标准:孕前已有糖尿病或初次孕检发现血糖异常(符合糖尿病合并妊娠的诊断标准);GDM 需使用胰岛素治疗;有多胎、多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)、妊娠期高血压疾病、胎膜早破、宫内感染、早产等妊娠并发症及吸烟饮酒等不良嗜好者。于孕晚期临分娩前根据纳入标准和排除标准进行分组,本研究经院伦理委员会批准,研究者在研究前向研究对象说明研究的意

义、内容及方法,其同意后签署知情同意书,自愿参加本研究。两组孕妇的年龄、孕周和 BMI 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 两组研究对象一般资料比较

组别	例数	年龄	孕周	体质指数
		[岁, $M(P_{25}, P_{75})$]	($\bar{x} \pm s$)	[$\text{kg}/\text{m}^2, M(P_{25}, P_{75})$]
GDM 组	32	28.00(25.25, 31.00)	39.18 \pm 0.62	28.54(25.81, 30.44)
对照组	30	26.00(24.00, 30.00)	39.08 \pm 0.50	27.89(25.66, 30.15)
Z/t 值		1.70	0.69	0.58
P 值		0.09	0.49	0.56

1.2 主要试剂 根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库上基因序列设计引物,由生工生物工程合成, Roche 公司提供逆转录试剂盒、Q-PCR 试剂盒,免疫组化抗体购自美国 Ab-cam 公司。

1.3 生化检测 分娩前清晨空腹抽取孕妇肘静脉血 8 ml,取 4 ml 采用葡萄糖氧化酶法测定 FBG,4 ml 静置后离心取上清液,采用化学发光法检测空腹胰岛素(FINS),各检测试剂盒均购自北京中杉金桥生物,具体实验步骤严格按试剂盒说明书操作。应用稳态模型评估法(HOMA)计算 IR 指数(HOMA-IR), $\text{HOMA-IR} = \text{FINS}(\text{mIU}/\text{L}) \times \text{FBG}(\text{mmol}/\text{L})/22.5$ 。胰岛 β 细胞功能指数($\text{HOMA-}\beta$) = $20 \times \text{FINS}(\text{mIU}/\text{L})/[\text{FBG}(\text{mmol}/\text{L}) - 3.5] \times 100\%$ 。

1.4 TLR4/MyD88/NF- κ B 蛋白的免疫组化染色及结果判定 剖宫产术中胎盘娩出后 15 min 内,避开钙化及梗死部位,取近脐带根部直径 3 cm 内胎盘母体面及胎儿面组织 1 cm \times 1 cm \times 1 cm 大小各 1 块,生理盐水冲洗后用滤纸吸干水分,在 4% 福尔马林溶液中室温固定 24 h,并进行常规的脱水、石蜡包埋等,分别行 TLR4、MyD88、NF- κ B 免疫组化染色,严格按照免疫组化 SP 法检测试剂盒(来自美国 Abcam)说明书进行操作。两位病理科医师用双盲法进行观察,胞浆出现深棕色颗粒为阳性表达。在光学显微镜下观察选图,在全自动照相显微镜下照相, Image-pro plus 6.0 处理图片,获得 OD 值,即阳性表达区域的平均积分光密度值,此值代表两组孕妇胎盘组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B 三种蛋白的表达水平。

1.5 TLR4/MyD88/NF- κ B 蛋白的实时定量 PCR 检测 常规程序提取样本 RNA 并质检合格后进行实时荧光定量 PCR 扩增反应, GAPDH 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因在胎盘组织中的相对表达量。每个样本均重复 3 次,取其平均值以减小误差。具体操作:

94 °C 10 min;38 个 PCR 循环为 94 °C 6 s;62 °C 35 s (收集荧光)。引物序列:TLR4 上游为 5'-GAG-GCAGCTCTTGGTGAAGTTG-3',下游为 5'-CAAGCA-CACTGAGGACCCGACAC-3';MyD88 上游为 5'-CGC-CGCCTGTCTCTGTTCTTG-3',下游为 5'-GGTCCGCTT-GTGTCTCCAGTTG-3';NF-κB 上游为 5'-ACAGAAG-CAGGCTGGAGGTAAGG-3',下游为 5' GGACAATGC-CAGTGCCATACAGG-3'。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两组独立样本 *t* 检验;偏态分布的计量资料用中位数及四分位数 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,组间差异采用非参数检验。两变量的相关性采用 Spearman 秩相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 IR 相关指标比较 GDM 组分娩前外周血中 FBG、FINS、HOMA-IR 水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),两组 HOMA-β 水平比较

表 2 两组分娩前外周血中 IR 相关指标比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	FBG (mmol/L)	FINS (mIU/L)	HOMA-IR	HOMA-β (%)
GDM 组	32	5.01 (4.79, 5.12)	11.66 (9.53, 15.02)	2.57 (1.87, 3.45)	168.99 (124.11, 198.61)
对照组	30	4.49 (4.31, 4.72)	7.50 (6.26, 9.07)	1.54 (1.29, 1.77)	149.43 (125.77, 217.95)
<i>Z</i> 值		5.10	4.49	5.15	0.51
<i>P</i> 值		0.00	0.00	0.00	0.61

表 3 两组产妇胎盘母体面 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TLR4	MyD88	NF-κB
GDM 组	32	0.51 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.37 ± 0.01
对照组	30	0.29 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.25 ± 0.02
<i>t</i> 值		18.89	8.23	6.38
<i>P</i> 值		0.00	0.00	0.00

表 4 两组产妇胎盘胎儿面 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TLR4	MyD88	NF-κB
GDM 组	32	0.39 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.33 ± 0.03
对照组	30	0.19 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.19 ± 0.02
<i>t</i> 值		9.44	4.72	5.49
<i>P</i> 值		0.00	0.00	0.00

表 5 两组产妇胎盘母体面 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TLR4	MyD88	NF-κB
GDM 组	32	1.92 ± 0.36	2.21 ± 0.49	4.11 ± 0.75
对照组	30	1.01 ± 0.23	1.02 ± 0.25	0.67 ± 0.15
<i>t</i> 值		2.87	5.29	10.61
<i>P</i> 值		0.02	0.00	0.00

差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.2 两组产妇胎盘 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平比较 TLR4 在正常足月胎盘母体面和胎儿面均有表达。TLR4 在滋养细胞和蜕膜细胞都有强表达,在血管内皮细胞和羊膜上皮中也有表达。GDM 胎盘中 TLR4 的染色主要见于绒毛的滋养细胞和血管内皮细胞。GDM 组胎盘母体面和胎盘胎儿面 TLR4、MyD88 和 NF-κB 蛋白表达水平均显著高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3、表 4。

2.3 两组产妇胎盘 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 表达比较 实时定量 PCR 检测 GDM 胎盘表面 TLR4 通路关键分子的含量。GDM 组产妇胎盘母体面和胎儿面 TLR4、MyD88、NF-κB mRNA 相对表达量高于对照组($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 5、表 6。

2.4 GDM 产妇胎盘组织 TLR4 表达水平与 IR 的相关性 Spearman 秩相关分析发现,GDM 产妇胎盘组织母体面及胎儿面 TLR4 蛋白表达水平与 HOMA-IR 水平呈正相关($r = 0.596, P < 0.01; r = 0.326, P < 0.01$)。

表 6 两组产妇胎盘胎儿面 TLR4、MyD88 和 NF-κB mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TLR4	MyD88	NF-κB
GDM 组	32	8.38 ± 2.78	5.25 ± 1.32	7.41 ± 1.75
对照组	30	1.01 ± 0.27	1.22 ± 0.35	1.06 ± 0.21
<i>t</i> 值		6.48	6.49	5.57
<i>P</i> 值		0.00	0.00	0.00

3 讨论

近年研究发现,妊娠期 TLR4 介导的母体固有免疫系统增强所致 IR 程度加重是造成 GDM 发病的重要原因^[6],目前对胰岛素敏感的靶器官如肝脏、骨骼肌及脂肪组织中 TLR4 及其调控通路的研究较多见,但母胎界面 TLR4 的表达少见报道,其与 IR 的关系尚不明确。

TLR 是一类参与炎症免疫应答的蛋白质家族^[7],是先天性免疫、后天性获得性免疫应答的桥梁。其中,TLR4 是介导内毒素/脂多糖应答的最主要受体,介导炎症因子的释放,在革兰阴性菌先天免疫反应中发挥重要作用^[8]。有研究显示,TLR4 通过激

活 MyD88 信号转导通路,进一步激活下游 MAPKs、氨基末端激酶、p38 信号酶等,导致重要的核转录因子 NF- κ B、AP-1 等的激活,产生强效的级联反应^[9]。越来越多的证据表明,在炎症免疫反应复杂强大的细胞因子相互作用中,NF- κ B 的激活是非常重要的一个环节,调控着许多关键因子之间的相互作用。

有研究表明,TLR4 在糖尿病患者体内表达增加^[8]。糖尿病患者单核细胞 TLR4 mRNA 表达水平与患者糖化血红蛋白呈正相关,提示高血糖促进 TLR4 表达^[10]。Angelo 等^[11]发现 2 型糖尿病患者外周血单核细胞中 TLR4、IL-1 β 、NF- κ B 表达均增强,且与 FBG、HOMA-IR 等相关。2002 年首次在足月胎盘滋养细胞中发现 TLR4 表达。杨美霞等^[12]发现患者外周血单核细胞中 TLR4 表达水平明显高于健康组,胎盘组织绒毛滋养细胞、蜕膜细胞和羊膜上皮细胞中 TLR4 蛋白的表达也明显高于健康组。Kuzmicki 等^[13]检测发现中晚期妊娠 GDM 患者的外周血 TLR4 及 NF- κ B 的表达较正常孕妇均明显增强,推测 NF- κ B 的激活与 GDM 发病相关。本研究结果显示,TLR4、MyD88、NF- κ B 三种因子在正常妊娠和 GDM 患者的胎盘中均有表达,但在 GDM 组表达更明显,说明 GDM 患者胎盘中 TLR4 及其下游调控通路介导的固有免疫应答和炎症反应增强。GDM 患者胎盘中母体面较胎儿面表达更明显,考虑这与胎盘的母体部分与母体血液有更多交流有关,当母体受到微生物等的侵袭时可以迅速激发免疫反应保护内环境稳定。

IR 作为 GDM 的主要病理特征,在 GDM 的发生发展中起着关键作用^[14]。目前临床多采用 HOMA-IR 来评价个体的 IR 水平^[15]。本研究对比两组产妇产前外周血中 IR 相关指标发现,GDM 组 FBG、FINS、HOMA-IR 的水平显著高于对照组,说明 GDM 产妇确实存在胰岛素分泌增加及严重 IR。本研究显示,GDM 产妇胎盘组织中 TLR4 蛋白表达水平与 HOMA-IR 呈正相关,提示 TLR4 及其下游因子可能在 GDM 的 IR 发展中起一定作用。另外,GDM 患者 HOMA- β 与健康孕妇比较差异无统计学意义,表明在受到葡萄糖刺激的情况下,胰岛处于代偿状态,需要及时降低 IR,来保护胰岛功能。

综上所述,TLR4、MyD88、NF- κ B 可能参与 GDM 患者慢性炎症反应,并在 IR 的发生发展中起重要作用,进一步证实炎症学说参与 GDM 发病机制,相信随着对 TLR4、MyD88、NF- κ B 通路研究的不断深入,有望为临床 GDM 的治疗提供一种新途径和新的治

疗方法。

参考文献

- [1] 翟瑶,谭淑卓. 妊娠期糖尿病对妊娠结局及新生儿的临床影响研究[J]. 中国临床研究,2016,29(5):661-663.
- [2] 宋依临,杨慧霞. Toll 样受体 4 及其调控机制对妊娠期糖尿病发病影响的研究进展[J]. 中华妇产科杂志,2016,51(4):306-309.
- [3] Mrizak I, Grissa O, Henault B, et al. Placental infiltration of inflammatory markers in gestational diabetic women[J]. Gen Physiol Biophys, 2014, 33(2):169-176.
- [4] El-Sawy NA, Iqbal MS, Alkushi AG. Histomorphological study of placenta in gestational diabetes mellitus[J]. Int J Morphol, 2018, 36(2):687-692.
- [5] 中华医学会妇产科学分会产科学组,中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J]. 中华妇产科杂志,2014,49(8):561-569.
- [6] 冯慧,马京梅,杨慧霞. 妊娠期糖尿病孕妇足月胎盘 Toll 样受体 4 的表达分布[J]. 中华围产医学杂志,2016,19(5):350-354.
- [7] 孟晓燕,张国俊,杨灿,等. TLR4 基因敲除对小鼠内脏脂肪组织免疫细胞及脂肪因子的影响[J]. 中国免疫学杂志,2017,33(5):665-667.
- [8] Li Q, Pereira TJ, Moyce BL, et al. In utero exposure to gestational diabetes mellitus conditions TLR4 and TLR2 activated IL-1beta responses in spleen cells from rat offspring[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(11):2137-2146.
- [9] Liu T, Zheng W, Wang L, et al. TLR4/NF- κ B signaling pathway participates in the protective effects of apocynin on gestational diabetes mellitus induced placental oxidative stress and inflammation[J]. Reprod Sci, 2020, 27(2):722-730.
- [10] Perry BD, Rahner JA, Xie Y, et al. Palmitate-induced ER stress and inhibition of protein synthesis in cultured myotubes does not require Toll-like receptor 4[J]. PLoS One, 2018, 13(1):e0191313.
- [11] Angelo AGS, Neves CTC, Lobo TF, et al. Monocyte profile in peripheral blood of gestational diabetes mellitus patients[J]. Cytokine, 2018, 107:79-84.
- [12] 杨美霞,贺帅,赵紫薇,等. Toll 样受体 4/髓样分化蛋白 88 在早期自然流产母-胎界面的表达[J]. 解剖学杂志,2019,42(4):342-345,330.
- [13] Kuzmicki M, Telejko B, Wawrusiewicz-Kurylonek N, et al. The expression of genes involved in NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes[J]. Eur J Endocrinol, 2013, 168(3):419-427.
- [14] 王纯. 妊娠期糖尿病患者胎盘组织中 IRS-1 和 GLUT4 的表达及其与胰岛素抵抗的关系[D]. 天津:天津医科大学,2012.
- [15] 赵丹青,雷后康,许晓晓,等. 妊娠期糖尿病妊娠早期筛查生物标志物的研究进展[J]. 中国临床研究,2019,32(1):116-120.

收稿日期:2020-02-06 修回日期:2020-04-27 编辑:王宇