

PD-1、PD-L1 在子痫前期孕妇外周血及胎盘组织中的表达及意义

姜艳艳, 缪丽琳, 刘慧贞, 尹丽明 (东莞市厚街医院, 广东东莞 523000)

摘要: **目的** 分析子痫前期患者外周血及胎盘组织中程序性死亡受体-1 (PD-1)、PD-配体 1 (PD-L1) 的表达及其意义。**方法** 用流式细胞法和免疫组化法测定子痫前期孕妇(观察组, $n=30$)和正常孕妇(对照组, $n=30$)外周血 T 淋巴细胞表面及胎盘组织中的 PD-1、PD-L1 表达, 并分析其与孕妇平均动脉压、24 h 尿蛋白等指标的相关性。**结果** 观察组孕妇外周血 T 细胞表面及胎盘组织中的 PD-1、PD-L1 表达水平均明显低于对照组 ($P<0.05$), PD-1、PD-L1 在外周血的表达水平与胎盘组织中的表达呈正相关 ($r=0.432, 0.377$, 均 $P<0.05$)。PD-1、PD-L1 水平与孕妇平均动脉压、24 h 尿蛋白呈负相关 ($P<0.05$)。**结论** PD-1、PD-L1 在子痫前期孕妇外周血的表达可反映其在胎盘组织中的表达, 且其表达水平可反映病情的严重程度。

关键词: 子痫前期; 程序性死亡受体-1; 程序性死亡受体-配体 1; 发病机制

中图分类号: R 714.24

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2023) 06-0628-03

Expressions of PD-1 and PD-L1 in peripheral blood and placental tissues of preeclampsia pregnant women and their significance

JIANG Yan-yan, MIAO Li-lin, LIU Hui-zhen, YIN Li-ming (Houjie Hospital of Dongguan, Dongguan 523000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the expression of PD-1 and PD-L1 in peripheral blood and placental tissues of patients with preeclampsia and their significance. **Methods** The expressions of PD-1 and PD-L1 on the surface of peripheral blood T lymphocytes and in placental tissues in 30 preeclampsia pregnant women (Observation Group, $n=30$) and 30 normal pregnant women (Control Group, $n=30$) were determined by flow cytometry and immunohistochemistry, and their correlation with the mean arterial pressure, 24 h urine protein and other indicators of the pregnant women were analyzed. **Results** The expressions of PD-1 and PD-L1 on the surface of peripheral blood T lymphocytes and in placental tissues in the Observation Group were significantly lower than those in the Control Group ($P<0.05$). The expressions of PD-1 and PD-L1 in peripheral blood were positively correlated with those in placental tissue ($r=0.432$ and 0.377 , $P<0.05$ for all). The expressions of PD-1 and PD-L1 were negatively correlated with mean arterial pressure and 24-hour urine protein of the pregnant women ($P<0.05$). **Conclusion** The expressions of PD-1 and PD-L1 in the peripheral blood of pregnant women with preeclampsia can reflect the expressions of PD-1 and PD-L1 in placenta tissues, and also reflect the severity of preeclampsia.

Key words: preeclampsia; programmed death receptor-1; programmed death receptor-ligand 1; pathogenesis

子痫前期是妊娠期特发疾病,其发生发展是导致母婴患病率、死亡率增高的重要原因。多项研究发现程序性死亡受体-1 (PD-1) 以及程序性死亡受体-配体 1 (PD-L1) 通路在子痫前期的免疫炎症调节中发挥重要作用。本研究拟通过检测子痫前期孕妇外周血及胎盘组织中 PD-1、PD-L1 的表达情况,分析 PD-1、PD-L1 在外周血的表达与胎盘组织中表达的相关性,以及其与孕妇平均动脉压、24 h 尿蛋白等指标的关系。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选择我院 2022 年 1 月至 2023 年 2 月收治的子痫前期孕妇作为观察组。诊断均符合第 9 版妇产科学子痫前期诊断标准且排除既往有高血压病史者。入选 30 例为观察组,年龄 20~38 岁,平均 (27.8 ± 4.1) 岁,终止妊娠周数 34~39 周,平均 (34.3 ± 3.5) 周,产次 (1.9 ± 0.6) 次,新生儿出生身体质量 (3.1 ± 0.5) kg,新生儿窒息 2

收稿日期: 2023-04-20

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (B2022160)

作者简介: 姜艳艳 (1979-) 女,硕士,副主任医师, E-mail: 296646369@qq.com

例。选择30例同期孕周相近无其他妊娠并发症(除早产外)的孕妇作为对照组,平均年龄(28.3 ± 3.4)岁,孕周(35.8 ± 3.7)周,产次(1.8 ± 0.5)次,新生儿出生身体质量(3.3 ± 0.4) kg,新生儿窒息1例。两组观察对象的年龄、孕周、产次、新生儿出生体质量及新生儿窒息情况的差异无统计学意义($P>0.05$)。观察组、孕妇平均动脉压(109.7 ± 6.7) mmHg,平均24 h尿蛋白(0.94 ± 0.22) g;对照组平均动脉压(89.7 ± 5.9) mmHg,平均24 h尿蛋白(0.16 ± 0.01) g,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。本研究通过我院伦理委员会审核批准(厚医伦审第2021-031号),孕妇均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 外周血检测方法 入院当天抽取静脉血5 mL于肝素钠抗凝管中,4℃保存,在24 h内送检。采用Ficoll法分离外周血单个核细胞,严格按照抗体说明书操作步骤,配置细胞悬液,并且将细胞浓度调整为 1×10^7 个/mL。加入适量的荧光标记抗体,4℃避光孵育30 min,调整流式细胞仪各项参数,将样本上机分析。进行T细胞亚群细胞中PD-1、PD-L1的表达水平检测。

1.2.2 胎盘检测方法 胎儿娩出后留取3 cm×3 cm胎盘块,进行蜡块固定,切片后进行脱蜡、水化等处理,采用免疫组织化学染色标准流程,进行PD-1、PD-L1蛋白检测。通用评定方法:每例切片200倍下观察20个互不重叠视野,根据染色程度和范围进行评分:基本不着色为0分,着色淡为1分,着色明显为2分,着色深为3分;着色范围阴性为0分,着色范围 $\leq 25\%$ 为1分, $>25\%\sim\leq 50\%$ 为2分, $>50\%\sim\leq 75\%$ 为3分, $>75\%$ 为4分。将每张切片的染色程度和范围得分相乘即为其最后得分: ≤ 1 分为阴性(-), $>1\sim\leq 3$ 分为弱阳性(+), $>3\sim\leq 5$ 分为阳性(++), >5 分为强阳性(+++)。

1.2.3 主要试剂 PE标记的鼠抗人CD279抗体(PD-1)、PE标记的鼠抗人CD274抗体(PD-L1)、二抗、三抗试剂盒(PV-9001、PV-9102)、鼠抗人CD3抗体、鼠抗人CD4抗体、鼠抗人CD8抗体均购自美国BD公司。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件,采用 t 检验、卡方检验、秩和检验以及Spearman秩相关分析。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PD-1、PD-L1在孕妇外周T细胞表面的表达

观察组孕妇外周血CD4⁺、CD8⁺T细胞表面PD-1、

PD-L1的表达量明显低于对照组($P<0.05$),见表1。

表1 PD-1、PD-L1在外周血T细胞表面的表达 (%)

组别	n	PD1 表达		PD-L1 表达	
		CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞
观察组	30	19.8±1.2 ^a	17.6±1.7 ^a	17.3±1.5 ^a	14.6±1.6 ^a
对照组	30	23.3±1.2	20.3±2.2	19.6±1.6	16.8±1.6

与对照组比较:^a $P<0.05$

2.2 PD-1、PD-L1在胎盘组织中的表达情况

观察组胎盘组织中PD-1、PD-L1表达明显弱于对照组($P<0.05$),见表2。

表2 PD-1、PD-L1在胎盘组织中的表达 (例)

组别	n	PD1				PD-L1			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
观察组	30	2	18	10	0	1	20	9	0
对照组	30	1	11	17	1	0	13	16	1

两组比较均 $P<0.05$

2.3 观察组外周血与胎盘组织中PD-1、PD-L1表达的相关性

观察组孕妇外周血与胎盘组织中PD-1、PD-L1的表达呈正相关($r=0.432$ 、 0.377 ,均 $P<0.05$)。

2.4 观察组孕妇外周血PD-1、PD-L1表达与临床指标的相关性

观察组孕妇外周血T细胞表面PD-1、PD-L1表达与平均动脉压、24 h尿蛋白呈负相关($P<0.05$),与孕周、新生儿出生身体质量无明显相关性($P>0.05$),见表3。

表3 外周血T细胞表面PD-1、PD-L1表达与临床指标的相关性

指标	PD-1		PD-L1	
	r 值	P 值	r 值	P 值
孕周	0.155	0.442	0.223	0.237
平均动脉压	0.432	0.015	0.386	0.024
24 h尿蛋白	0.377	0.026	0.359	0.030
新生儿身体质量	0.112	0.554	0.212	0.260

3 讨论

妊娠是一种半同种移植现象,维系母体与胎儿间的免疫平衡、建立良好的免疫耐受对妊娠的成功至关重要。有研究发现,Th1表达增加和Th2表达降低、Th1与Th2表达失衡可能是子痫前期发病的原因^[1],Treg亚群比例失调可能是导致子痫前期发生的重要因素^[2-3]。

PD-1是一种重要的免疫抑制分子,为免疫球蛋白超家族。PD-L1为PD-1配体。PD-1/PD-L1信号通路除参与自身免疫、慢性感染性疾病、移植排斥和肿瘤免

疫逃逸之外,还参与母胎免疫耐受的诱导和妊娠的维持。有研究表明外周血单核细胞上 Tim-3、PD-1 可能通过调节 IL-12 产生间接调节 Th1/Th2 平衡,从而参与先兆流产和复发性流产的发生^[4]。在复发性流产患者外周血 T 淋巴细胞中呈低水平表达,可能参与疾病发生发展进程,影响妊娠结局,其可作为临床治疗潜在靶点^[5]。在子痫前期发病过程中是否存在同样的现象呢?值得研究。

本研究结果显示,子痫前期孕妇外周血液胎盘组织的 PD-1、PD-L1 表达明显低于对照组,提示子痫前期发病过程中可能存在 PD-1/PD-L1 免疫失调。其作用机制可能是通过促进细胞增殖使 Th17 细胞频率升高^[6],也可能是 PD-1/PD-L1 未能下调 Th1 反应,从而导致在早发性先兆子痫的免疫激活过度^[7]。PD-1/PD-L1 通路改变在子痫前期的免疫炎症调节中起一定作用。但有学者提出相反结果,Gu 等^[8]提出,先兆子痫孕妇存在 sPD-1/sPD-L1 信号异常,与正常血压孕妇相比,先兆子痫孕妇 sPD-1 和 sPD-L1 水平显著升高。二者结果不同,可能与 PD-1 不同于 sPD-1 及胎儿性别或免疫耐受不同有关,需进一步研究。另外,有研究发现改变的 PD-1/PD-L1 途径导致先兆子痫孕妇中 Treg/Th17 失衡,用 PD-L1-Fc 治疗对先兆子痫模型产生保护作用,PD-L1 Fc 对 Treg 细胞分化具有利作用,表明 PD-1/PD-L1 途径对妊娠期高血压的治疗具有潜在的临床价值^[9-10]。

本研究结果显示子痫前期孕妇外周血 PD-1、PD-L1 表达与胎盘组织表达呈正相关,提示外周血 PD-1、PD-L1 的测定可估计胎盘中的表达情况,外周血 PD-1、PD-L1 的表达是否可作为子痫前期孕妇预测指标,它们之间具体的关系仍需进一步观察研究。

本研究结果显示,子痫前期孕妇 PD-1、PD-L1 的表达水平与孕妇平均动脉压、24 h 尿蛋白呈负相关(均 $P < 0.05$),平均动脉压和 24 h 尿蛋白水平越高表示病情越重,提示 PD-1/PD-L1 表达可一定程度反映病情严重程度。田松柏等^[11]研究结果显示重度子痫前期组患者

外周血 Th17 细胞表面的 PD-1 表达水平低于轻度子痫前期组 ($P < 0.05$),也表明 PD-1 表达与病情严重程度有密切关系。

综上所述,PD-1/PD-L1 通路可能在子痫前期发病过程中发挥作用,子痫前期孕妇外周血中 PD-1、PD-L1 的表达可以反映其在胎盘组织中的表达,可一定程度反映病情严重程度。

参考文献:

- [1] 夏琰, 赵英. 子痫前期女性胎盘及外周血中辅助细胞及其细胞因子表达研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2019, 27(1): 24-29.
- [2] 喻晴, 楼向明. 子痫前期患者 CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞亚群的变化及意义[J]. 浙江医学, 2015, 37(12): 1051-1054.
- [3] 张永红, 廖爱华. PD-1/PD-L1 信号通路在妊娠中的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 126-130.
- [4] 何泽现, 王健, 穆雅琴, 等. 原因不明复发性流产患者外周血单核细胞上 Tim-3 和 PD-1 的表达及意义[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(4): 321-326.
- [5] 朱一喜, 何树光, 陈超英, 等. 在复发性流产患者外周血淋巴细胞中的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(1): 98-102.
- [6] ZHANG Y H, LIU Z Z, TIAN M, et al. The altered PD-1/PD-L1 pathway delivers the 'one-two punch' effects to promote the Treg/Th17 imbalance in pre-eclampsia [J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15(7): 710-723.
- [7] MEGGYES M, MIKO E, LAJKO A, et al. Involvement of the PD-1/PD-L1 co-inhibitory pathway in the pathogenesis of the inflammatory stage of early-onset preeclampsia [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 583.
- [8] GU Y, MORGAN J, LEWIS D F, et al. Maternal soluble PD-1 levels are significantly increased in women with preeclampsia [J]. Am J Reprod Immunol, 2020, 83(1): e13193.
- [9] TIAN M, ZHANG Y H, LIU Z Z, et al. The PD-1/PD-L1 inhibitory pathway is altered in pre-eclampsia and regulates T cell responses in pre-eclamptic rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 27683.
- [10] JIANG L, TANG C L, GONG Y P, et al. PD-1/PD-L1 regulates Treg differentiation in pregnancy-induced hypertension [J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(8): e7334.
- [11] 田松柏, 隋珍, 赵晓琴, 等. 在子痫前期患者外周血细胞中的表达 [J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(14): 3134-3136.