

• 临床研究 •

正常产妇胎盘绒毛膜淋巴管发育状况^{*}

王沛靓, 盛红珊

(新疆医科大学第五附属医院妇科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的** 了解正常分娩产妇胎盘绒毛膜淋巴管发育状况。**方法** 收集 2024 年 7 月至 2025 年 1 月在该院足月剖宫产分娩的 10 例正常产妇胎盘绒毛膜组织, 采用荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹检测淋巴管内皮细胞透明质酸受体 1 (LYVE-1) mRNA 和蛋白表达, 免疫组织化学染色检测 LYVE-1、Prospero 相关同源盒-1, 甲基化特异性聚合酶链反应法检测血管生成素酪氨酸激酶-2 受体、血管内皮细胞生长因子受体-3 基因启动子区甲基化状态。**结果** 正常产妇胎盘绒毛膜组织有 LYVE-1 mRNA 和蛋白表达, 可见 LYVE-1 染色, 但从染色区域形态判断不是淋巴管; 未见 Prospero 相关同源盒-1 染色; 血管内皮细胞生长因子受体-3 基因启动子区呈半甲基化状态, 血管生成素酪氨酸激酶-2 受体呈全甲基化状态。**结论** 正常产妇胎盘绒毛膜无淋巴管发育。

[关键词] 正常产妇; 胎盘; 淋巴管; 发育状况

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2025.09.028

中图法分类号: R714.3

文章编号: 1009-5519(2025)09-2149-04

文献标识码: A

Development status of chorionic lymphatic vessels in the placenta
of normal parturients^{*}

WANG Peiliang, SHENG Hongshan

(Department of Gynaecology, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical
University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the development of chorionic lymphatic vessels in the placenta of parturients with normal delivery. **Methods** Placental chorionic tissue was collected from 10 normal parturients who delivered by full-term cesarean section in this hospital from July 2024 to January 2025. The mRNA and protein expressions of hyaluronic acid receptor 1 (LYVE-1) in lymphatic endothelial cells were detected by fluorescence quantitative polymerase chain reaction and Western blotting. LYVE-1 and Prospero related homeobox 1 were detected by immunohistochemical staining. The promoter methylation status of angiopoietin-tyrosine kinase-2 receptor and vascular endothelial growth factor receptor-3 was detected by methylation-specific polymerase chain reaction. **Results** LYVE-1 mRNA and protein were expressed in the chorionic tissue of the placenta of normal parturients, and LYVE-1 staining could be observed. However, judging from the morphology of the stained area, it was not lymphatic vessels. No Prospero-related homeobox-1 staining was observed; The promoter region of the vascular endothelial growth factor receptor-3 gene was in a semi-methylated state, and the angiopoietin-tyrosine kinase-2 receptor was in a fully methylated state. **Conclusion** There is no lymphatic vessel development in placental chorion of normal parturient.

[Key words] Normal parturient; Placenta; Lymphatic vessels; Developmental status

淋巴系统作为除血管系统外人体第二套循环系统, 对淋巴液的生成、转运、信息传递、免疫、机体微环境的稳定具有重要意义^[1]。近年来, 随着淋巴管内皮细胞标志物发现的增多与肿瘤淋巴转移研究的进展,

对其研究越来越多, 认识到淋巴系统在全身各器官中广泛分布^[2]。但胎盘中是否存在淋巴管却一直存在争议。有文献报道, 足月胎盘中不存在淋巴管^[3-5]; 也有文献报道, 胎盘中存在淋巴管, 并且在缺血缺氧条

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2021D01C423)。

作者简介: 王沛靓(1976—), 硕士研究生, 副主任医师, 主要从事妇科肿瘤及淋巴系统相关疾病诊治研究。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250801.1119.002\(2025-08-01\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1129.R.20250801.1119.002(2025-08-01))

件下胎盘绒毛中淋巴管生成增多^[6-7];甚至有学者认为,胎盘绒毛水肿是淋巴水肿^[8]。故本研究观察了正常产妇产盘是否有淋巴管发育。DNA 甲基化是表观遗传学的重要内容,在机体器官发育过程中必不可少,故本研究同时检测了与淋巴系统生成相关的血管内皮细胞生长因子受体-3(VEGFR-3)、血管生成素酪氨酸激酶-2 受体(Tie2)基因启动子区甲基化状态,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本收集 收集 2024 年 7 月至 2025 年 1 月在本院足月剖宫产分娩的 10 例正常产妇产盘绒毛膜组织,以冷生理盐水冲洗干净,去除血液,纱布吸干水分,置入-80℃冰箱中保存备用,部分实验采用新鲜的标本组织。本研究获本院伦理委员会审批(XYD-WFYLSK-2024-122)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学(免疫组化)染色 将正常产妇产盘绒毛膜组织蜡块经切片、脱蜡水化,部分苏木精-伊红(HE)常规染色,部分继续进行抗原修复、灭活、封闭;分别将兔抗人单克隆一抗淋巴管内皮细胞透明质酸受体-1(LYVE-1)、Prospero 相关同源盒-1(Prox-1)进行稀释,滴加适当稀释后的一抗,置于 4℃冰箱中过夜孵育;滴加 50~100 μL 山羊抗兔辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃恒温箱孵育 30 min,在电子显微镜下进行观察。

1.2.2 免疫组织荧光双重染色 石蜡包埋切片经脱蜡、抗原修复、封闭,加入第 1 种 LYVE-1 一抗,4℃孵育过夜后加入对应的辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 50 min 分别加入第 2 种一抗增殖细胞核抗原(PCNA),切片平放于湿盒内 4℃孵育过夜,加入对应的荧光二抗,避光室温孵育 50 min,4',6-二脒基-2-苯基喹啉(DAPI)复染细胞核,正置荧光显微镜采集图像。

1.2.3 荧光定量聚合酶链反应(PCR) 胎盘组织总 RNA 抽提后进行反转录。LYVE-1 引物为 CAGC-CTGGTGTGCTTCTCA-S, GGCTGTTTCAACT-TGGTCCTT-A。反转录产物于荧光定量 PCR 仪完成扩增:95℃、30 s 预变性,95℃、15 s 变性,60℃、30 s 退火/延伸,40 个循环。采用 $\Delta\Delta$ CT 法进行结果处理。

1.2.4 蛋白质印迹(Western blot) 按说明书操作提取胎盘组织总蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳,转膜,免疫反应中加入稀释的 LYVE-1 一抗,4℃孵育摇床过夜,加入稀释的二抗室温下孵育 30 min,采用化学发光法。

1.2.5 甲基化特异性 PCR 提取所采集标本组织

DNA,重亚硫酸盐处理后进行 PCR 扩增。Tie2 基因甲基化引物为 TTTTTTTGTTAGAGATTTTAGTAGTTT -CG-F, AAACAATAAAAATATCCTCTCATAAACG -R;非甲基化引物为 TTTTTTTGTTAGAGATTTTAGT -AGTTTTG-F, AAAACAATAAAAATATCCTCTCATAAACA-R。VEGFR-3 基因甲基化引物为 GATTTTATCGATGGAAAGAAAGGAC-F, CCCCTCCTAAACGACTCCG-R;非甲基化引物为 GATTTTATTGATGGAAAGAAAGGATG-F, ACCCCCTCCTAAACAACCTCCA-R。对扩增产物进行电泳并紫外成像。

2 结果

2.1 LYVE-1 mRNA 表达 正常分娩者胎盘可检测到 LYVE-1 mRNA 扩增表达。见图 1。循环阈值平均值为 28.79, Δ CT 值为 4.30。

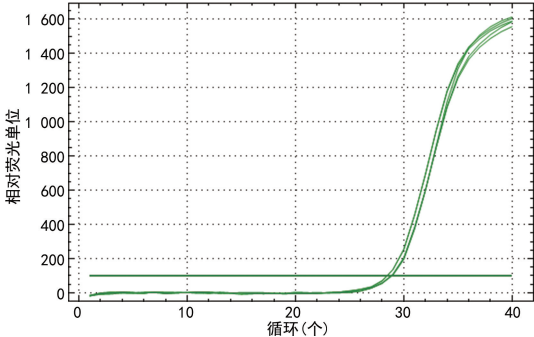


图 1 荧光定量 PCR LYVE-1 扩增曲线

2.2 LYVE-1 蛋白表达 正常分娩者胎盘可检测到 LYVE-1 蛋白表达。见图 2。

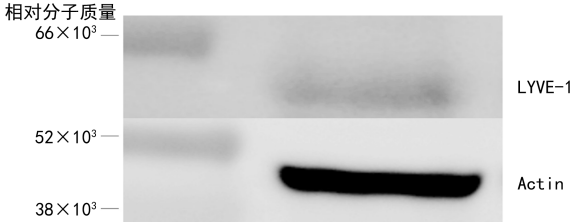


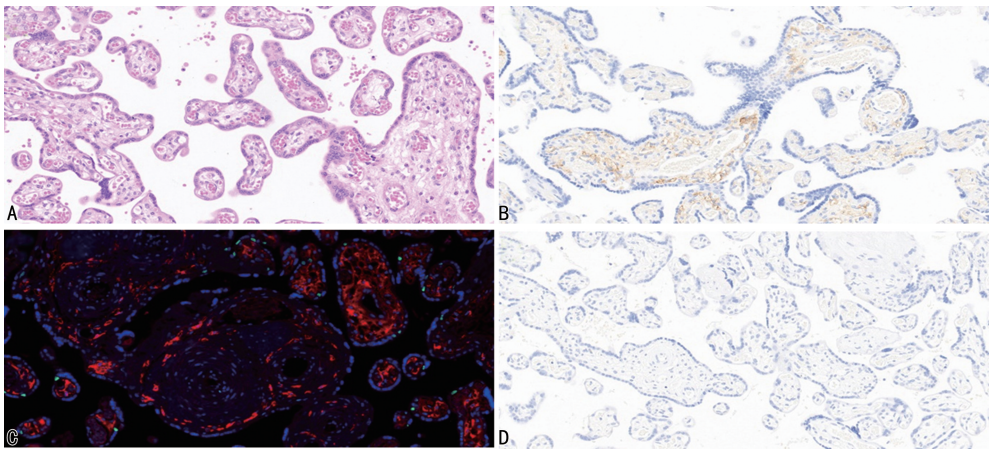
图 2 LYVE-1 蛋白表达情况

2.3 HE 染色及免疫组化观察 正常分娩胎盘 HE 染色可见绒毛组织,绒毛边缘可见密集的胞核排列。免疫组化可见 LYVE-1 呈棕黄染色,多围绕在小血管周围,可见管腔内的血细胞,从形态看并不像典型的淋巴管。LYVE-1、PCNA 免疫荧光双重染色可见 LYVE-1 染色,但 LYVE-1 标记的位置位于管壁中外层,不是淋巴管内皮细胞所在的内层,观察整个切片,考虑 LYVE-1 虽染色阳性但所标记的不是淋巴管。PCNA 染色与 LYVE-1 染色未见明显交集。正常分娩胎盘绒毛膜组织标本 Prox-1 染色均为阴性。见图 3。

2.4 Tie2、VEGFR-3 基因启动子区甲基化状态 正常产妇产盘绒毛膜组织提取 DNA 质量浓度为 288.277

ng/ μ L, A_{260}/A_{280} 比值为 1.862。Tie2 基因启动子区呈全甲基化状态,VEGFR-3 基因启动子区呈半甲基

化状态。见图 4。



注:A. HE 染色(100 $\times$);B. LYVE-1 免疫组化染色(100 $\times$);C. LYVE-1(红色)和 PCNA(绿色)免疫荧光双重染色(200 $\times$);D. Prox-1 免疫组化染色(100 $\times$)。

图 3 正常分娩胎盘绒毛膜组织染色

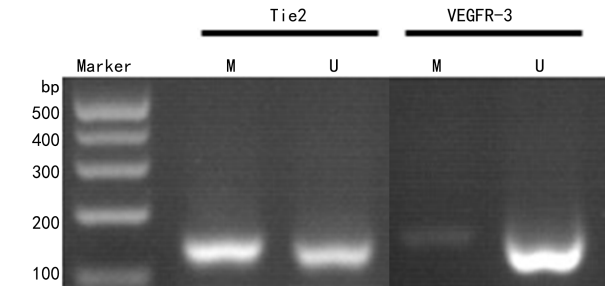


图 4 Tie2、VEGFR-3 基因启动子区甲基化状态

3 讨 论

LYVE-1 是区分血管和淋巴管的常用标志物,特异性表达于淋巴管内皮细胞。本研究结果显示,正常产妇产胎盘有 LYVE-1 表达,显示的管状或条索状结构与淋巴管形态很相似,但综合免疫组化及免疫荧光染色形态表现,更考虑 LYVE-1 标记组织为胎盘绒毛或血管,各种染色均可见胎盘绒毛周边有一层细密的胞核排列,血管管腔内可见血细胞,且管壁厚实、管腔较小,故认为本研究 LYVE-1 染色细胞为正常分娩胎盘绒毛的上皮细胞。已有文献报道,LYVE-1 除淋巴管内皮细胞外,还可表达于正常肝窦、脾窦的内皮细胞,以及肾、肾上腺、甲状腺、胰腺的上皮细胞中^[9],故单纯的 LYVE-1 阳性不能说明一定有淋巴管发育,特别是仅凭 PCR、Wetern blot 检测有表达时更不能下结论一定存在淋巴管,免疫组化或免疫荧光形态学观察更接近真实的表达或发育状态,本研究即是如此。目前,已知的包括 LYVE-1 在内的 10 余种淋巴管内皮细胞标志物多不单纯表达于淋巴系统中,仅有 Prox-1 尚未见于其他组织有表达,是正常组织和病变组织淋巴管内皮细胞可靠的标志物。本研究结果显示,正常分娩胎盘绒毛膜组织标本 Prox-1 染色均为阴性,也支持

上述分析,故认为正常产妇产胎盘无淋巴管发育。

为什么胎盘中不存在淋巴系统? 胎儿的营养供应均是从母体血液输送而来,均经母体消化后去槽存精的,这种情况下有可能不需要淋巴系统辅助。如何做到不生成淋巴系统,目前已知许多细胞因子与淋巴管形成有关,其中就包括一些淋巴管内皮细胞标志物,其不仅能将血管和淋巴管区分出来,还对淋巴管的形成具有促进作用,促进淋巴管内皮细胞增殖,参与细胞生长、分化及细胞间的通讯等,至少 LYVE-1、VEGFR-3、Prox-1 是这样的,并且这些因子之间有可能还存在协同作用^[1-2,10-11]。胎盘中有淋巴管标志物 LYVE-1 表达,甚至还有 VEGFR-3,但没有淋巴管生成,认为原因可能是淋巴管生成抑制因素的作用^[10]或促淋巴管生成因子间协调作用失调。

胚胎个体、器官的发育受多种因素影响,表观遗传学是一个重要方面,而 DNA 甲基化又是表观遗传学的重要内容,其是机体器官正常发育所必不可少的,参与一系列重要生物学过程,包括早期胚胎发育、基因组印记、X 染色体失活、重复序列的沉默,以及癌症的发生、发展、转移等。胎盘是许多印记基因存在的场所^[12]。因此。胎盘中淋巴系统的发育有可能也受 DNA 甲基化调控,有学者认为,在淋巴管的发育调节中甲基化是一个重要的参与者,在淋巴管生成早期 Tie2、VEGFE-3 均具有参与作用^[2,13]。本研究结果显示,胎盘绒毛膜组织 Tie2 基因启动子区呈全甲基化状态,VEGFR-3 基因启动子区呈半甲基化状态。一般来说,启动子区高甲基化抑制表达,半甲基化也具有使 DNA 成环的特定功能,从而影响染色质三维结构,影响基因表达^[14]。正常产妇产胎盘绒毛膜组织无淋巴管发育是否与 Tie2、VEGFR-3 基因启动子区的这

种甲基化状态有关,目前只是一种推测,明确还需进一步的实验验证。

参考文献

[1] ANGELI V, LIM H Y. Biomechanical control of lymphatic vessel physiology and functions[J]. Cell Mol Immunol, 2023, 20(9):1051-1062.

[2] MTSHALI Z, MOODLEY J, NAICKER T. An insight into the angiogenic and lymphatic interplay in pre-eclampsia comorbid with HIV infection[J]. Curr Hypertens Rep, 2020, 22(5):35.

[3] BECKER J, TCHAGOU TCHANGOU G E, SCHMIDT S, et al. Absence of lymphatic vessels in term placenta [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2020, 20(1):380.

[4] CASTRO E, TONY PARKS W, GALAMBOS C. Neither normal nor diseased placentas contain lymphatic vessels [J]. Placenta, 2011, 32(4):310-316.

[5] LIU H, LI Y, ZHANG J, et al. The defect of both angiogenesis and lymphangiogenesis is involved in preeclampsia [J]. Placenta, 2015, 36(3):279-286.

[6] ORTEGA M A, SAEZ M A, FRAILE-MARTÍNEZ O, et al. Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in the placental villi of women with chronic venous disease during pregnancy[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7):2487.

[7] 吴海艳. 妊娠期慢性静脉疾病增加胎盘绒毛血管和淋巴管生成及绒毛细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(6):538-545.

[8] RONCATI L, BARBOLINI G, PUSIOL T, et al. New advances on placental hydrops and related villous lymphatics [J]. Lymphology, 2015, 48(1):28-37.

[9] WANG P L, CHENG Y B. Gene expression profile of lymphatic endothelial cells [J]. Cell Biol Int, 2011, 35(12):1177-1187.

[10] WONG H L X, JIN G X, CAO R H, et al. MT1-MMP sheds LYVE-1 on lymphatic endothelial cells and suppresses VEGF-C production to inhibit lymphangiogenesis [J]. Nat Commun, 2016, 7:10824.

[11] KAZENWADEL J, VENUGOPAL P, OSZMIANA A, et al. A Prox1 enhancer represses haematopoiesis in the lymphatic vasculature[J]. Nature, 2023, 614(7947):343-348.

[12] KOUKOURA O, SIFAKIS S, ZARAVINOS A, et al. Hypomethylation along with increased H19 expression in placentas from pregnancies complicated with fetal growth restriction[J]. Placenta, 2011, 32(1):51-57.

[13] MONTENEGRO-NAVARRO N, GARCÍA-BÁEZ C, GARCÍA-CABALLERO M. Molecular and metabolic orchestration of the lymphatic vasculature in physiology and pathology [J]. Nat Commun, 2023, 14(1):8389.

[14] XU C, CORCES V G. Nascent DNA methylation mapping reveals inheritance of hemimethylaton at CTGF/cohesion sites[J]. Science, 2018, 359(6380):1166-1170.

(收稿日期:2025-02-18 修回日期:2025-05-25)

(上接第 2148 页)

效率的对比也表明,苦参汤能有效改善湿热下注型外阴硬化性苔藓患者外阴瘙痒、灼热、带下及患处皮损等症状与体征,在使用复方丙酸氯倍他索软膏治疗的同时加用苦参汤熏洗可明显增加疗效,症状改善更明显,有效率更高,值得临床推广使用。

参考文献

[1] 李桂华,李灵芝,陈萍. 白斑组方治疗肝肾阴虚型外阴白色病变的临床研究[J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(2):38-40.

[2] 宋美英,李红梅. 外阴硬化性苔藓中医证治研究进展[J]. 现代中医药, 2024, 44(3):12-16.

[3] 程诗语,石洁,李艳丽,等. 外阴硬化性苔藓的临床研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2024, 43(3):261-263.

[4] 李静然,赵丽君,李明珠,等. 外阴苔藓类疾病诊治专家共识[J]. 中国妇产科临床杂志, 2023, 24(2):220-224.

[5] 马宝璋. 中医妇科学[M]. 9 版. 北京:科学出版社, 2004:243.

[6] 谢幸,孔北华,段涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社, 2018:235-236.

[7] 中国医疗保健国际交流促进会妇儿医疗保健分会外阴阴道疾病项目专家委员会. 女性外阴硬化性苔藓临床诊治专家共识(2021 年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志,

2021, 37(1):70-74.

[8] 吴少祯,吴敏. 常见疾病的诊断与疗效判定(标准)[M]. 北京:中国中医药出版社, 1999.

[9] 人民卫生出版社. 灵枢经[M]. 北京:人民卫生出版社, 2012:34.

[10] 郑洪新. 中医基础理论[M]. 10 版. 北京:中国中医药出版社, 2016:52.

[11] 李翠翠,陈艳,王世雷. 经络辨治外阴白斑[J/CD]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2019, 7(24):1.

[12] 石海银,翟婷婷. 加味五味消毒饮熏洗坐浴治疗外阴白斑病验案 2 则[J]. 中国民间疗法, 2021, 29(6):104-106.

[13] 孟君,娄晓君,夏玉清. 夏玉清教授治疗难治性外阴硬化性苔藓经验撷英[J]. 深圳中西医结合杂志, 2024, 34(8):65-68.

[14] 吴小兰. 外阴白斑熏洗方治疗外阴硬化性苔藓的临床观察[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2022:3-20.

[15] 邹勇健,谢春花,曾琦. 中药熏蒸联合氦氖激光用于外阴白色病变的临床效果研究[J]. 黑龙江中医药, 2024, 37(1):54-56.

[16] 韩学杰,沈宁,连智华. 沈邵功临证经验辑要[M]. 北京:中国中医药出版社, 2020:66.

[17] 王绪前. 本草心悟-五十年临证经验讲透中药[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2022:212.

(收稿日期:2024-09-19 修回日期:2025-03-12)