引用本文:冯冰霜.微小RNA-29a和内皮联蛋白在子痫前期107例胎盘组织中的表达及临床意义[J].安徽医药,2022,26(9):1870-1873.**DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.09.041.**

◇临床医学◇

微小RNA-29a和内皮联蛋白在子痫前期107例胎盘组织中的表达及临床意义

冯冰霜

作者单位:宜昌市妇幼保健院病理产科,湖北 宜昌 443000

摘要: 目的 探究微小RNA(miR)-29a和内皮联蛋白在不同程度子痫前期孕妇胎盘组织中的表达水平和临床意义。**方法** 抽签选取2017年7月至2019年7月宜昌市妇幼保健院收治的行剖宫产的子痫前期病人107例,其中轻度子痫前期组48例,重度子痫前期组59例。另选取同期行剖宫产分娩的健康孕妇56例作为对照组。分别用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)和免疫组织化学检测胎盘中miR-29a和内皮联蛋白表达水平,并通过Pearson相关性分析检验miR-29a和内皮联蛋白在子痫前期胎盘组织中的相关性,采用logistic回归分析影响子痫前期的危险因素。**结果** 对照组收缩压、舒张压、平均动脉压、24 h尿蛋白比轻度子痫前期组和重度子痫前期组低,轻度子痫前期组比重度子痫前期组低(P<0.05)。对照组、轻度子痫前期组、重度子痫前期组胎盘组织miR-29a(1.09±0.21、3.18±1.19、6.04±1.91)和内皮联蛋白(0.22±0.10、0.37±0.14、0.49±0.22)表达水平依次升高(P<0.05)。胎盘组织miR-29a表达水平与内皮联蛋白表达水平呈正相关(r=0.52,P<0.001)。重度子痫前期组胎儿窘迫、产后大出血、胎盘早剥等并发症发生率均高于轻度子痫前期组和对照组(P<0.05)。二元logistic回归分析显示,miR-29a、内皮联蛋白水平偏高是孕妇发生子痫前期的独立危险因素(P<0.05)。**结论** 子痫前期孕妇胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白随着病情的加重而不断升高,miR-29a和内皮联蛋白水平呈正相关,是孕妇发生子痫前期的独立危险因素。二者可作为子痫前期病情的参考指标。

关键词: 子痫前期; 微小RNA-29a; 内皮联蛋白; 胎盘组织; 妊娠结局

Expressions and clinical significance of microRNA-29a and endoglin in placental tissue of 107 cases of preeclampsia

FENG Bingshuang

Author Affiliation:Department of Pathology and Obstetrics, Yichang Maternal and Child Health Hospital, Yichang, Hubei 443000*, China*

Abstract: Objective To explore the expression levels and clinical significance of microRNA (miR)-29a and endoglin in placenta tissue of pregnant women with different degrees of preeclampsia.**Methods** A total of 107 patients with preeclampsia who underwent cesarean section in Yichang Maternal and Child Health Hospital from July 2017 to July 2019 were selected by simple random lot, including 48 cases in mild preeclampsia group and 59 cases in severe preeclampsia group. Another 56 healthy pregnant women who had caesarean section at the same time were selected as the control group. The expression levels of miR-29a and endoglin in placenta were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and immunohistochemistry, and the correlation between miR-29a and endoglin in preeclampsia placenta was analyzed by Pearson method, logistic regression analysis was used to analyze the risk factors of preeclampsia.**Results** The systolic blood pressure, diastolic blood pressure, mean arterial pressure and 24-hour urine protein in the control group were lower than those in the mild preeclampsia group and the severe preeclampsia group, and the those in the mild preeclampsia group were lower than those in the severe preeclampsia group (P<0.05). The expression levels of miR-29a (1.09±0.21, 3.18±1.19, 6.04±1.91) and endoglin (0.22±0.10, 0.37±0.14, 0.49±0.22) in placenta tissue of control group, mild preeclampsia group and severe preeclampsia group increased in turn, and the differences were statistically significant (P<0.05). The expression level of miR-29a in placenta tissue was positively correlated with that of endoglin (r=0.52, P<0.001). The incidence rates of fetal distress, postpartum hemorrhage, placental abruption and other complications in severe preeclampsia group were higher than those in mild preeclampsia group and control group (P<0.05). Binary logistic regression analysis showed that high levels of miR-29a and endoglin were independent risk factors for preeclampsia in pregnant women (P<0.05).**Conclusions** The levels of miR-29a and endoglin in placenta tissue of pregnant women with preeclampsia increase with the aggravation of the disease. The levels of miR-29a and endoglin are positively correlated, which are independent risk factors of preeclampsia in pregnant women. Both of them can be used as reference indexes of preeclampsia.

Key words: Preeclampsia; MicroRNA-29a; Endoglin; Placenta tissue; Pregnancy outcome

子痫前期是妊娠特有的多系统受累的疾病,是妊娠20周后出现的以高血压、蛋白尿为主要临床表现的一组临床症候群[1]。在全球范围内,每年因子痫前期死亡的大约有50多万新生儿和胎儿以及7万多孕产妇,发病率约为2%~8%[2]。而重度子痫前期可引起肝酶升高、溶血、血小板减少等,导致全身多个系统器官损害[3]。微小RNA(miRNA,miR)是近年来发现的一种单链非编码小RNA,在基因表达过程中充当着关键的调节因子,可通过与靶mRNA的3'非翻译区的特异性序列结合,抑制靶mRNA翻译或使其降解,进而调控细胞生物学功能。有研究表明,在子痫前期孕妇胎盘组织中miR-29a表达水平较高[4]。内皮联蛋白是一种存在于细胞表面的由二硫键相连的同型二聚体膜结合的糖蛋白,是转化生长因子-β(TGF-β)受体家族的共同受体,是影响血管生成的重要因素[5]。本研究对子痫前期胎盘组织中的miR-29a和内皮联蛋白表达水平进行检测,探讨两者在不同程度子痫前期孕妇胎盘组织中的表达水平和临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 抽签选取2017年7月至2019年7月宜昌市妇幼保健院收治的行剖宫产的子痫前期病人107例,根据病情程度[6]分为轻度子痫前期组48例,年龄(29.05±2.52)岁;重度子痫前期组59例,年龄(28.91±1.44)岁。另选取同期行剖宫产分娩的健康孕妇56例作为对照组,年龄(28.66±3.05)岁。三组孕妇年龄差异无统计学意义(P>0.05)。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

子痫前期纳入标准:被确诊为子痫前期者[6];病人或其近亲属知情同意;选择接受剖宫术分娩;均为单胎初次妊娠。排除标准:辅助生殖技术受孕者;孕前患有高血压者;严重肝肾疾病、自身免疫病者;妊娠期糖尿病、胎盘早剥等其他产科并发症。

1.2 主要试剂与仪器 磷酸缓冲盐溶液(货号R22127),上海恒斐生物科技公司;Trizol试剂(型号CD-102523GM),武汉纯度生物科技公司;miRNA逆转录试剂盒(货号AOPR),上海伯易生物科技公司;紫外分光仪(型号SPCC),东莞市标普实验器材科技公司;SP试剂盒(货号1533661828),上海江莱生物科技公司;抗人内皮联蛋白单克隆抗体(货号HM2140),厦门慧嘉生物科技公司;聚甲醛(货号YKS-10010),厦门研科生物技术公司;光学显微镜(型号CKX53OLYMPUS),上海土森视觉科技公司。

1.3 实验方法

1.3.1 *采集标本* 胎盘娩出后10 min内取胎盘母体面中央区绒毛组织大小约1 cm×1 cm×1 cm无钙化、无机化的组织,磷酸缓冲盐溶液漂洗,4%聚甲醛固定24 h,常规石蜡包埋切片。

1.3.2 *免疫组织化学检测胎盘中内皮联蛋白水平* 免疫组织化学SP法测定三组孕妇胎盘组织中内皮联蛋白表达水平,严格按照试剂盒说明书操作。光学显微镜下观察,内皮联蛋白免疫组织化学染色阳性为细胞膜或细胞质中有棕黄色颗粒,应用每张切片随机选取不重叠的10个高倍镜视野(×400),用Image-Pro Plus6.0(IPP)彩色图像分析系统分别计算每个高倍镜视野下内皮联蛋白的平均光密度值(MOD)。取平均值作为每张切片内皮联蛋白阳性表达的MOD值。

1.3.3 *实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测胎盘中miR-29a表达水平* 用Trizol试剂从胎盘组织中提取总RNA,之后用紫外分光仪检测RNA的纯度和浓度,选取吸光度在1.8~2.1的样品,采用miRNA逆转录试剂盒对miR-29a进行逆转录,获得互补DNA(cDNA)。取miR-29a的cDNA 1 μL,加入通用后端引物1 μL,miR-29a特异前端引物1 μL,2×SYBR GREEN Master Mix 1 μL,再加入无菌蒸馏水至20 mL。反应条件设置为95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,40个循环。以U6为内参,用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算各组miR-29a表达量。

1.4 统计学方法 采用统计学软件SPSS 22.0分析数据。计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,多组之间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两独立样本t检验;计数资料以频数(%)表示;用Pearson相关性分析检验子痫前期胎盘miR-29a和内皮联蛋白表达水平的相关性。P<0.05为差异有统计学意义。

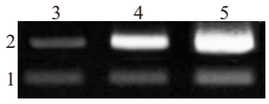
2 结果

2.1 三组孕妇临床特征的比较 三组孕妇分娩孕周比较,差异无统计学意义(P>0.05)。对照组收缩压、舒张压、平均动脉压、24 h尿蛋白比轻度子痫前期组和重度子痫前期组低,轻度子痫前期组比重度子痫前期组低(P<0.05)。见表1。

2.2 三组孕妇胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白的表达水平比较 对照组、轻度子痫前期组、重度子痫前期组胎盘组织miR-29a和内皮联蛋白表达水平依次升高,每两组间比较差异有统计学意义(P<0.05)。见图1,2;表2。

2.3 子痫前期孕妇胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白表达水平相关性分析 子痫前期孕妇胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白水平呈正相关(r=0.52,P<0.001)。

2.4 三组孕妇并发症比较 重度子痫前期组胎儿窘迫、产后大出血等并发症均高于轻度子痫前期组



注:1—U6;2—miR-29a;3—对照组;4—轻度子痫前期组;5—重度子痫前期组。

图1　三组孕妇胎盘组织miR-29a的实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)结果

表2　三组孕妇胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白的表达水平比较/$\bar{x} \pm s$

组别	例数	miR-29a	内皮联蛋白
对照组	56	1.09±0.21	0.22±0.10
轻度子痫前期组	48	3.18±1.19①	0.37±0.14①
重度子痫前期组	59	6.04±1.91①②	0.49±0.22①②
*F*值		202.68	39.25
*P*值		<0.001	<0.001

注:①与对照组比较,*P*<0.05。②与轻度子痫前期组比较,*P*<0.05。

和对照组(*P*<0.05),见表3。

2.5　二元logistic回归分析孕妇发生子痫前期的影响因素　以孕妇是否发生子痫前期为因变量,以收缩压、舒张压、平均动脉压、24 h尿蛋白、miR-29a、内皮联蛋白水平为自变量,进行二元logistic回归分析,结果显示,miR-29a、内皮联蛋白水平偏高是孕妇发生子痫前期的独立危险因素(*P*<0.05)。见表4。

3　讨论

子痫前期是一种继发于血管痉挛从而导致的内皮激活、器官灌注量减少的一种特殊妊娠综合征[7],主要临床表现为妊娠20周后,出现高血压、蛋白尿及全身器官功能损害[5]。常引起胎儿宫内缺氧和生长受限,是导致孕产妇和围产儿死亡的重要原因[8-9]。有研究表明,绒毛间隙含氧量低导致氧化应激和滋养层细胞凋亡、坏死,最终导致内皮细胞功能障碍和全身系统性炎症[10],促炎细胞因子通过抑制间质金属蛋白酶2活性,从而抑制滋养细胞侵袭能力[11],使得胎盘灌注减少和缺氧,进一步致使血管内皮细胞受损,最终发生子痫前期[12-14]。也有研究表明,免疫T细胞减少,母胎免疫耐受降低,进而引发子痫前期[15]。子痫前期发生率为2%~8%,因其危害性极大,因此成为临床研究的重点。

表4　二元logistic回归分析孕妇163例发生子痫前期的影响因素

自变量	*β*值	*SE*值	*Wald* χ^2值	*P*值	*OR*值	95%*CI*
收缩压	0.23	0.21	1.16	0.281	1.26	(0.83,1.91)
舒张压	0.21	0.22	0.98	0.323	1.24	(0.81,1.89)
平均动脉压	0.31	0.22	2.00	0.158	1.36	(0.89,2.07)
24 h尿蛋白	0.31	0.24	1.78	0.182	1.37	(0.86,2.17)
miR-29a	1.05	0.15	46.64	<0.001	2.84	(2.11,3.84)
内皮联蛋白	1.02	0.12	71.63	<0.001	2.67	(2.18,3.49)

miRNA是一种非编码小分子RNA,对基因表达有重要调控作用[16]。研究发现miR-29a可靶向调控胃癌细胞迁移侵袭,靶向调控肺癌细胞侵袭等[17-18]。莫玉俏等[4]在研究miR-29a对人正常滋养细胞迁移和侵袭功能的影响中发现,在子痫前期孕妇胎盘组织中miR-29a表达水平比正常孕妇高,miR-29a可能通过负调控β1整合素表达参与子痫前期的病程进展。本研究结果显示,对照组、轻度子痫前期组、重度子痫前期组胎盘组织中miR-29a表达水平依次升高,和前人研究结果一致,提示miR-29a可能参与了子痫前期的发生和发展过程,并与子痫前期的严重程度有关。

子痫前期与滋养细胞浸润功能有关,而内皮联

表1　三组孕妇临床特征比较/$\bar{x} \pm s$

组别	例数	分娩孕周/周	收缩压/mmHg	舒张压/mmHg	平均动脉压/mmHg	24 h尿蛋白/(g/24 h)
对照组	56	38.46±2.30	114.47±12.30	85.39±11.48	104.30±13.35	0.15±0.01
轻度子痫前期组	48	37.58±2.57	126.04±13.57①	100.25±9.26①	136.73±15.17①	0.74±0.19①
重度子痫前期组	59	37.44±2.85	130.38±10.85①②	119.47±12.53①②	154.51±9.34①②	5.42±1.51①②
*F*值		2.55	25.76	131.87	230.35	566.93
*P*值		0.081	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与对照组比较,*P*<0.05。②与轻度子痫前期组比较,*P*<0.05。

表3　三组孕妇并发症比较/例(%)

组别	例数	胎儿窘迫	产后大出血	胎盘早剥	胎膜早破	羊水过少	前置胎盘
对照组	56	1(1.79)	4(7.14)	3(5.36)	5(8.93)	3(5.36)	4(7.14)
轻度子痫前期组	48	23(47.92)	18(37.50)	20(41.67)	17(35.42)	24(50.00)	21(43.75)
重度子痫前期组	59	29(49.15)①②	23(38.98)①②	31(52.54)①②	29(49.15)①②	30(50.85)①②	36(61.02)①②
χ^2值		45.25	17.91	31.11	22.16	32.90	36.77
*P*值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与对照组比较,*P*<0.05。②与轻度子痫前期组比较,*P*<0.05。

蛋白是滋养细胞浸润功能相关因素之一。有研究表明胎盘组织内皮联蛋白高表达可能和代偿机制有关,即子痫前期胎盘滋养层浸润过浅,导致胎盘形成不良、缺血,内皮联蛋白过表达促进TGF-β分泌,并阻碍滋养细胞入侵和迁移[19-20]。本研究发现对照组、轻度子痫前期组、重度子痫前期组胎盘组织内皮联蛋白表达水平依次升高,各组间差异有统计学意义。提示内皮联蛋白可能与子痫前期的严重程度有关,推测在胎盘组织中内皮联蛋白表达的升高会使可溶性内皮联蛋白升高,进一步引起血管内皮细胞损伤,抑制血管生成,内皮联蛋白的表达随着子痫前期病症的发展程度而逐渐增高,内皮联蛋白表达参与子痫前期疾病进展。

分析子痫前期胎盘组织miR-29a和内皮联蛋白表达水平相关性分析发现,miR-29a和内皮联蛋白表达呈正相关。可能是因为子痫前期胎盘组织中异常表达的miR-29a,影响滋养细胞的增殖、侵袭[4],滋养层细胞侵袭能力的降低使胎盘组织内皮联蛋白表达升高,导致胎盘灌注减少和缺氧,进一步致使血管内皮细胞受损,最终出现子痫前期。对比三组孕妇并发症发生情况可知,重度子痫前期组胎儿窘迫、产后大出血、胎盘早剥、胎膜早破、羊水过少、前置胎盘发生率均高于轻度子痫前期组和对照组,说明随着子痫前期病情加重,并发症概率越高。进一步经二元logistic回归分析显示,miR-29a、内皮联蛋白水平偏高是孕妇发生子痫前期的独立危险因素。提示miR-29a、内皮联蛋白水平与子痫前期密切相关,可能影响疾病的发生和发展过程。

综上所述,子痫前期孕妇胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白表达水平随着病情的加重而不断升高,miR-29a和内皮联蛋白水平呈正相关,是孕妇发生子痫前期的独立危险因素,可作为子痫前期病情的参考指标。有关子痫前期胎盘组织中miR-29a和内皮联蛋白相关的调控机制尚不明确,有待进一步研究。

(本文图2见封三)

参考文献

[1] 李跃萍,闫庆峰,胡春霞. 子痫前期发病机制及其预测的研究进展[J]. 基层医学论坛,2017,21(16):2126-2129.

[2] SUTTON ALM, HARPER LM, TITA ATN. Hypertensive disorders in pregnancy[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2018, 45(2): 333-347.

[3] 漆洪波,童超. 从母胎界面着眼探究子痫前期的发病机制[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2020,36(1):61-64.

[4] 莫玉俏,卢敏,陈小菊. MicroRNA-29a对人正常滋养细胞迁移和侵袭功能的影响及其可能的机制[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(10):60-65.

[5] 陈丹,杨星宇,程蔚蔚. 环状RNA与子痫前期发病机制的研究进展[J]. 中国计划生育和妇产科,2020,12(4):11-14.

[6] 谢幸,苟文丽. 妇产科学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2013:64-73.

[7] 李冠琳,杨慧霞. 子痫前期的发病机制及亚型分类[J]. 中华围产医学杂志,2017,20(12):899-903.

[8] NGWENYA S. Severe pre-eclampsia and eclampsia: incidence, com-plications, and perinatal outcomes at a low-resource setting, Mpilo Central Hospital, Bulawayo, Zimbabwe[J]. Int J Womens Health, 2017, 9(1): 353-357.

[9] 王秋凤,林向容,郑艳,等. 血清胱抑素C水平与子痫前期发生和不良妊娠结局的关系[J]. 检验医学与临床,2017,14(20):3078-3079.

[10] KNÖFLER M, HAIDER S, SALEH L, et al. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(18): 3479-3496.

[11] LEE CL, VEERBEEK JHW, RANA TK, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in proinflammatory cytokine-mediated inhibition of trophoblast invasion in placenta-related complications of pregnancy[J]. Am J Pathol, 2019, 189(2): 467-478.

[12] 蒋艳丽,李益梅,曹含梅. 早发型子痫前期胎盘滋养细胞侵袭相关信号通路表达[J]. 临床和实验医学杂志,2020,19(10):1074-1077.

[13] RIDDER A, GIORGIONE V, KHALIL A, et al. Preeclampsia: the relationship between uterine artery blood flow and trophoblast function[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(13): 3263.

[14] LI N, FU Y, CHEN W, et al. IFI16 mediates soluble Flt-1 and endoglin production by trophoblast cells[J]. J Hypertens, 2015, 33(8): 1658-1665.

[15] ROBERTSON SA, GREEN ES, CARE AS, et al. Therapeutic potential of regulatory T cells in preeclampsia-opportunities and challenges [J/OL]. Front Immunol, 2019, 10: 478. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00478.

[16] LV Y, LU C, JI X, et al. Roles of microRNAs in preeclampsia [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1052-1061.

[17] BAI F, JIU M, YOU Y, et al. MiR-29a-3p represses proliferation and metastasis of gastric cancer cells via attenuating HAS3 levels [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 8145-8152.

[18] ZHANG Y, HE S, MEI R, et al. MiR-29a suppresses IL-13 induced cell invasion by inhibiting YY1 in the AKT pathway in lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Oncol Rep, 2018, 39(6): 2613-2623.

[19] 季燕雯,陈先侠. MMP-14、Endoglin和sEng在子痫前期患者中表达的意义及相关性分析[J]. 解放军医药杂志,2020,32(1):72-76.

[20] CRAICI IM, WAGNER SJ, WEISSGERBER TL, et al. Advances in the pathophysiology of pre-eclampsia and related podocyte injury[J]. Kidney Int, 2014, 86(2): 275-285.

(收稿日期:2020-09-16,修回日期:2020-11-15)