

## APN、MMP-9、PLGF 的表达水平与重度子痫前期发病的关系研究

蒋 韬, 潘建海<sup>△</sup>

(湖北医药学院附属随州医院妇产科, 湖北随州 441300)

**摘要:**目的 探讨胎盘组织脂联素(APN)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、胎盘生长因子(PLGF)表达水平与重度子痫前期发病的关系。方法 选取 2016 年 4 月至 2017 年 3 月在该院住院分娩的重度子痫前期孕妇 110 例为观察组,同期在该院住院分娩 110 例血压正常孕妇为对照组。比较两组 APN、MMP-9 以及 PLGF 表达水平,分析三者之间关系以及与孕妇体质量指数(BMI)和新生儿体质量的关系。结果 观察组 APN mRNA 和蛋白表达量均显著高于对照组( $P<0.05$ ),观察组 MMP-9、PLGF 的 mRNA 和蛋白表达量均显著低于对照组( $P<0.05$ );APN mRNA 与 MMP-9 mRNA、PLGF mRNA 呈负相关( $r=-0.663$ 、 $-0.872$ ,均  $P<0.05$ ),与孕妇 BMI 呈正相关( $r=0.260$ ,  $P<0.05$ ),与新生儿体质量呈负相关( $r=-0.581$ ,  $P<0.05$ )。MMP-9 mRNA 与 PLGF mRNA 呈正相关( $r=0.592$ ,  $P<0.05$ ),与孕妇 BMI 呈负相关( $r=-0.267$ ,  $P<0.05$ ),与新生儿体质量呈正相关( $r=0.564$ ,  $P<0.05$ )。PLGF mRNA 与孕妇 BMI 呈负相关( $r=-0.365$ ,  $P<0.05$ ),与新生儿体质量呈正相关( $r=0.641$ ,  $P<0.05$ )。结论 重度子痫前期孕妇胎盘组织 APN 表达升高, MMP-9 以及 PLGF 表达降低,可能与重度子痫前期发病有关,且三者可能通过胎盘屏障调控胎儿生长发育。

**关键词:**胎盘组织; 脂联素; 基质金属蛋白酶; 胎盘生长因子; 重度子痫前期

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.009

中图法分类号:R714.24+5;R446.1

文章编号:1673-4130(2019)05-0546-04

文献标识码:A

Relationship between expression levels of APN, MMP-9, PLGF in placental tissue and severe preeclampsia incidence

JIANG Tao, PAN Jianhai<sup>△</sup>

(Department of Obstetrics and Gynecology, Suizhou Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Suizhou, Hubei 441300, China)

**Abstract: Objective** To explore the relationship between expression levels of placental tissue adiponectin (APN), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), placenta growth factor (PLGF) and the incidence of severe preeclampsia. **Methods** Totally 110 cases of severe preeclampsia pregnant women hospitalized in our hospital for delivery from April 2016 to March 2017 were selected as the observation group, and another 110 cases of pregnant women with normal blood pressure hospitalized in the same period were enrolled in the control group. The expression levels of APN, MMP-9 and PLGF were compared between the two groups, and the relationship of the three expression levels and the relationship between pregnant women body weight index (BMI) and fetal weight were analyzed. **Results** The mRNA and protein expression levels of APN in the observation group were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ), while the mRNA and protein expression levels of MMP-9 and PLGF were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The APN mRNA expression was negatively correlated with the mRNA expressions of MMP-9 and PLGF ( $r=-0.663$ ,  $-0.872$ , all  $P<0.05$ ), and positively correlated with BMI index of pregnant women ( $r=0.260$ ,  $P<0.05$ ), and negatively correlated with neonatal weight ( $r=-0.581$ ,  $P<0.05$ ). The MMP-9 mRNA expression was positively correlated with the PLGF mRNA expression ( $r=0.592$ ,  $P<0.05$ ), and negatively correlated with BMI index of pregnant women ( $r=-0.267$ ,  $P<0.05$ ), and positively correlated with neonatal weight ( $r=0.564$ ,  $P<0.05$ ). The PLGF mRNA expression was negatively correlated with BMI index of pregnant women ( $r=-0.365$ ,  $P<0.05$ ), and positively correlated with neonatal weight ( $r=0.641$ ,  $P<0.05$ ). **Conclusion** The expression level of APN is increased but the expression levels of MMP-9 and PLGF are decreased in placenta tis-

作者简介:蒋韬,女,主治医师,主要从事产科、围产医学、重症产科疾病研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:panjianhai@126.com。

本文引用格式:蒋韬,潘建海. APN、MMP-9、PLGF 的表达水平与重度子痫前期发病的关系研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5): 546-549.

sue of severe preeclampsia pregnant women, which may be related to the onset of severe preeclampsia, and the three expressions may regulate fetal growth and development through placental barrier.

**Key words:**placental tissue; adiponectin; matrix metalloproteinase; placental growth factor; expression; severe preeclampsia

子痫前期是指妊娠期对母婴均造成危害的特发疾病,孕妇在妊娠 20 周后,表现出血压升高、尿蛋白增加、水肿以及器官损伤<sup>[1]</sup>。子痫前期发病机制复杂,目前研究认为其发病原因可能与异常血管重铸、血管内皮细胞功能异常、脂代谢紊乱等有关<sup>[2]</sup>。脂联素(APN)是由成熟脂肪细胞分泌的蛋白,具有抗炎,改善胰岛素抵抗,保护血管内皮等作用<sup>[3]</sup>。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)是一种可消化细胞外基质的蛋白水解酶,与滋养细胞侵袭力、重建螺旋动脉有关<sup>[4]</sup>。胎盘生长因子(PLGF)具有促进滋养细胞和内皮细胞增殖作用<sup>[5]</sup>。结合子痫前期发病机制,认为 APN、MMP-9 和 PLGF 可能参与子痫前期发病。本研究旨在分析胎盘组织中 APN、MMP-9 和 PLGF 表达水

平,探讨其与重度子痫前期发病的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 4 月至 2017 年 3 月在本院住院分娩的重度子痫前期孕妇 110 例为观察组,观察组患者均符合重度子痫前期诊断标准<sup>[6]</sup>,排除伴有产科其他并发证以及有原发病患者。另选取同期在本院住院分娩 110 例血压正常孕妇为对照组。两组孕妇在年龄、孕次以及产次方面,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),孕妇体质质量指数(BMI)以及新生儿体质量方面差异有统计学意义( $P<0.05$ ),一般资料见表 1。两组患者均知情同意,本研究经本院伦理委员会批准同意。

表 1 两组一般资料比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | <i>n</i> | 年龄(岁)      | 孕次(次)     | 产次(次)     | BMI(kg/m <sup>2</sup> ) | 新生儿体质量(g)       |
|----------|----------|------------|-----------|-----------|-------------------------|-----------------|
| 观察组      | 110      | 29.83±5.12 | 2.47±1.18 | 0.44±0.92 | 26.52±2.81              | 2 135.54±673.46 |
| 对照组      | 110      | 30.11±5.36 | 2.77±1.52 | 0.23±0.76 | 23.76±2.13              | 3 527.62±378.28 |
| <i>t</i> |          | 0.40       | 1.64      | 1.85      | 8.21                    | 18.90           |
| <i>P</i> |          | >0.05      | >0.05     | >0.05     | <0.05                   | <0.05           |

1.2 标本收集 胎盘娩出后,立刻在胎盘中心取一小块胎盘组织,注意避开肉眼可见坏死处和钙化处。生理盐水洗净后,将其分为两部分,一部分迅速采用 10%甲醛溶液浸泡,然后石蜡包埋,待行免疫组化检测;另一部分迅速置入液氮罐内,随后转入-80℃冰箱,待行荧光定量 PCR 检测。

1.3 荧光定量 PCR 检测方法 胎盘组织经 Trizol 溶液(北京康为世纪生物科技有限公司)裂解后,采用总 RNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取胎盘组织 RNA,提取步骤参照试剂盒说明书。

然后参照 SuperRT cDNA 试剂盒(北京华夏远洋科技有限公司)说明书步骤进行反转录。荧光定量 PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 2。荧光定量 PCR 反应体系 20.0 μL:2×Ultra-SYBR Mixture 10.0 μL,上游引物 0.4 μL,下游引物 0.4 μL,DNA 模板 0.8 μL,RNase-Free Water 补足 20.0 μL。荧光定量 PCR 反应条件:95℃ 10 min,随后 95℃ 15 s,55℃ 60 s 重复 40 个循环,最后升温至 95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s,60℃ 15 s。每个样本至少设置 3 个重复孔。

表 2 荧光定量 PCR 引物序列

| 基因      | 上游引物                                 | 下游引物                                 |
|---------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| APN     | 5'-GCA TTC AGT GTG GGA TTG GAG-3'    | 5'-AGA CTG TGA TGT GGT AGG CAA AG-3' |
| MMP-9   | 5'-CGT GAA CAT CTT CGA CGC CAT-3'    | 5'-TCC TCA AAG ACC GAG TCC AGC-3'    |
| PLGF    | 5'-GCA CCC GGC TCG TGT ATT TAT TA-3' | 5'-GGC TGG CTT CTC TCT TTC TCT CA-3' |
| β-actin | 5'-GTT GCG TTA CAC CCT TTC TTG AC-3' | 5'-CTC GGC CAC ATT GTG AAC TTT G-3'  |

1.4 免疫组化检测方法 将石蜡标本切片,厚度约为 5 μm,常规脱蜡水化,采用 3% 过氧化氢封闭 10

min 后,微波修复抗原。然后采用 5%牛血清清蛋白(BSA)封闭 30 min,加单克隆抗体(一抗)低温孵育过

夜。次日,用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗 3 次后,加入羊抗鼠二抗、SABC 室温孵育 30 min,PBS 清洗 3~5 次后,进行 DAB 显色。复染 1 min 后脱水、透明、封片。采用 Olympusix-71 倒置荧光显微镜(日本)观察,细胞质或者细胞核呈棕黄色视作阳性表达。在 400 倍镜下取 5 个视野,采用 MPIAS-500 计算机图像分析处理系统进行积分光密度分析。

**1.5 统计学处理** 数据差异性分析采用 SPSS20.0 软件,计量数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,采用  $t$  检验,计数数据以率表示,采用  $\chi^2$  检验,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法分析 mRNA 相对表达量,相关性分析采用 Spearman 相关分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 两组胎盘组织 APN、MMP-9 和 PLGF mRNA 表达比较** 观察组胎盘组织 APN mRNA 表达显著高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),观察组胎盘组织 MMP-9 和 PLGF mRNA 表达量显著低于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

| 表 3 两组胎盘组织 APN、MMP-9 和 PLGF mRNA 表达比较( $\bar{x}\pm s$ ) |          |           |           |           |
|---------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 组别                                                      | <i>n</i> | APN       | MMP-9     | PLGF      |
| 观察组                                                     | 110      | 4.07±1.86 | 0.56±0.21 | 1.02±0.48 |
| 对照组                                                     | 110      | 1.00±0.42 | 1.01±0.48 | 3.27±1.45 |
| <i>t</i>                                                |          | 16.89     | 9.01      | 15.45     |
| <i>P</i>                                                |          | <0.05     | <0.05     | <0.05     |

**2.2 两组胎盘组织 APN、MMP-9 和 PLGF 蛋白表达比较** 观察组胎盘组织 APN 蛋白表达显著高于对照组( $P<0.05$ ),观察组胎盘组织 MMP-9 和 PLGF 蛋白表达量显著低于对照组( $P<0.05$ ),见表 4。

| 表 4 两组胎盘组织 APN、MMP-9 和 PLGF 蛋白表达比较( $\bar{x}\pm s$ ) |          |           |           |           |
|------------------------------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 组别                                                   | <i>n</i> | APN       | MMP-9     | PLGF      |
| 观察组                                                  | 110      | 0.34±0.09 | 0.07±0.02 | 0.16±0.05 |
| 对照组                                                  | 110      | 0.13±0.04 | 0.15±0.04 | 0.45±0.13 |
| <i>t</i>                                             |          | 22.36     | 18.76     | 21.84     |
| <i>P</i>                                             |          | <0.05     | <0.05     | <0.05     |

| 表 5 胎盘组织 APN mRNA 与 MMP-9 mRNA、PLGF mRNA 等相关性分析 |          |          |  |
|-------------------------------------------------|----------|----------|--|
| 指标                                              | <i>r</i> | <i>P</i> |  |
| MMP-9 mRNA                                      | -0.663   | 0.000    |  |
| PLGF mRNA                                       | -0.872   | 0.000    |  |
| 年龄                                              | 0.246    | 0.088    |  |
| 孕妇 BMI                                          | 0.260    | 0.010    |  |
| 新生儿体质量                                          | -0.581   | 0.000    |  |

**2.3 相关性分析** 胎盘组织 APN mRNA 与 MMP-9 mRNA、PLGF mRNA 和新生儿体质量呈负相关,与孕妇 BMI 呈正相关,见表 5。胎盘组织 MMP-9 mRNA 与 PLGF mRNA 和新生儿体质量呈正相关,与孕妇 BMI 呈负相关,见表 6。胎盘组织 PLGF mRNA 与新生儿体质量呈正相关,与孕妇 BMI 呈负相关,见表 7。APN、MMP-9、PLGF 的 mRNA 均与年龄无关。

| 表 6 胎盘组织 MMP-9 mRNA 与 PLGF mRNA 等相关性分析 |          |          |
|----------------------------------------|----------|----------|
| 指标                                     | <i>r</i> | <i>P</i> |
| PLGF mRNA                              | 0.592    | 0.000    |
| 年龄                                     | -0.144   | 0.142    |
| 孕妇 BMI                                 | -0.267   | 0.009    |
| 新生儿体质量                                 | 0.564    | 0.000    |

| 表 7 胎盘组织 PLGF mRNA 与年龄等相关性分析 |          |          |
|------------------------------|----------|----------|
| 指标                           | <i>r</i> | <i>P</i> |
| 年龄                           | -0.153   | 0.134    |
| 孕妇 BMI                       | -0.365   | 0.006    |
| 新生儿体质量                       | 0.641    | 0.000    |

## 3 讨 论

子痫前期是妊娠期女性以高血压和蛋白尿为主要特征的内科疾病,其发病是因胎盘血流灌注不足所引起。胎盘绒毛滋养细胞受损,侵袭能力减弱,子痫前期中子宫螺旋动脉被限制于子宫蜕膜层表面,导致部分血管重铸失败,胎盘灌注减少,出现缺血缺氧现象,影响胎儿发育。同时滋养细胞分泌的大量细胞因子进入母体血液循环系统,导致内皮功能损伤,从而引发子痫前期临床症状<sup>[7]</sup>。

APN 是由成熟脂肪细胞分泌的具有多种生物活性的蛋白质,通过与 AdipoR1 和 AdipoR2 两种跨膜转运受体相互作用而发挥作用,具有抗炎、抗动脉粥样硬化、抗栓、抗氧化作用,并可参与机体代谢、骨生成、抗肿瘤过程。另外,APN 可促进 NO 合成,有助于子痫前期孕妇血压调节以及血管功能保护<sup>[8-9]</sup>。MMP 是一组可将细胞外基质降解的内切酶,与胎盘形成和子宫螺旋动脉重构密切相关,MMP-9 即明胶酶 B,可选择性浸润子宫内膜,利于胎盘着床,是胎盘形成最重要的因子之一<sup>[10]</sup>。且有研究表明,MMP-9 与滋养细胞侵袭力以及血管生成有关<sup>[11]</sup>。PLGF 是血管内皮生长因子(VEGF)家族中的一员,包含 PLGF-1、PLGF-2、PLGF-3、PLGF-4 共 4 个亚型,前两者是发挥生理效应的主要亚型。PLGF 可促进滋养细胞增殖、迁移,抑制滋养细胞凋亡,同时增强 VEGF 活性,促进 NO 释放,有助于胎盘生长<sup>[12]</sup>。由于 APN、

MMP-9 和 PLGF 均与滋养细胞功能调节或血管内皮细胞功能调节相关,所以推测他们可能参与子痫前期的发生。

本研究对重度子痫前期孕妇以及健康孕妇胎盘组织中 APN、MMP-9 和 PLGF 的表达水平分别采用荧光定量 PCR 和免疫组化方法进行检测,结果发现,观察组 APN 在 mRNA 和蛋白水平上的表达均显著高于对照组,观察组 MMP-9、PLGF 在 mRNA 和蛋白水平上的表达均显著低于对照组,提示重度子痫前期孕妇胎盘组织 APN 表达量增多,而 MMP-9、PLGF 表达量降低。APN 表达量升高可能是对患者机体抗血管生成、代谢变化以及炎症反应的补偿性反馈调节,与李园园<sup>[13]</sup>研究结果一致。但另有研究结果显示,APN 表达量在重度子痫前期孕妇胎盘组织内明显降低<sup>[14]</sup>,造成结果差异的原因可能与各研究检测未区分 APN 亚型,而不同亚型间活性差异较大有关。MMP-9 表达量降低会直接影响滋养细胞侵入以及子宫螺旋动脉重铸,导致胎盘血流灌注不足,滋养细胞因缺血缺氧释放有害因子,致使血管内皮损伤,出现细小动脉痉挛等症状,与辛乐等<sup>[15]</sup>研究结果一致。PLGF 表达量降低则使滋养细胞和内皮细胞增殖分化能力降低,从而减少胎盘血管形成,进一步损伤血管内膜。同时 PLGF 表达量降低还会破坏血管舒缩因子平衡,使细小动脉发生痉挛,胎盘缺血缺氧愈发严重,与杨丽萍等<sup>[16]</sup>对血清中 PLGF 检测结果一致。

本研究通过相关性分析发现,胎盘组织 APN mRNA 与 MMP-9 mRNA 和 PLGF mRNA 均呈负相关,推测 APN 升高和 MMP-9、PLGF 降低对血管生成平衡造成影响,使血管内皮细胞受到损伤,共同参与重度子痫前期的发生和发展。而 MMP-9 mRNA 和 PLGF mRNA 呈正相关,提示两者在重度子痫前期发病中具有协同作用。孕妇 BMI 与 APN mRNA 呈正相关,与 MMP-9 mRNA 和 PLGF mRNA 呈负相关,说明孕妇肥胖程度会影响子痫前期的发生,这可能与炎症反应、氧化应激等有关。新生儿体质量与 APN mRNA 呈负相关,与 MMP-9 mRNA 和 PLGF mRNA 呈正相关,说明抗血管生成因子和促血管生成因子平衡失常等信号经胎盘屏障传达到胎儿,使胎儿生长发育受到影响,但具体机制还需进一步探讨。

#### 4 结 论

重度子痫前期孕妇胎盘组织中 APN 表达升高, MMP-9 和 PLGF 表达降低,三者可能通过影响血管生成平衡引起重度子痫前期发生,且新生儿体质量与 APN、MMP-9 和 PLGF 相关,三者可能通过胎盘屏障对胎儿发育进行调控。

#### 参考文献

- [1] 廖念权,江安,李小青.重度子痫前期孕妇 204 例母婴结局分析[J].医学临床研究,2015,32(5):1021-1023.
- [2] 高洪娟.子痫前期发病机制的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2015,42(6):685-688.
- [3] 李璐,高玉洁.子痫前期产妇脂联素,前列腺素 E2,孕酮,皮质醇和载脂蛋白的测定及意义[J].黑龙江医学,2015,44(4):364-367.
- [4] 赵虎,张凌,蔡一玲,等.妊娠期高血压疾病患者胎盘组织中 VEGF 与 MMP-9 表达水平与子痫前期病情的相关性[J].实用临床医药杂志,2016,20(15):63-65.
- [5] 黄凤凤,张东妹.孕妇血清 sEng、sFlt-1 及 PLGF 浓度变化对子痫前期的预测价值[J].广东医学,2015,53(4):597-598.
- [6] 石芳鑫.妇产科学[M].北京:清华大学出版社,2007:1-10.
- [7] 张展,王媛媛,李爱萍,等.子痫前期患者胎盘组织中 miR-155 及 CXCR4 的表达及意义[J].国际检验医学杂志,2017,38(9):1167-1171.
- [8] 明芳,杨洁,吕秀芳,等.脂联素与肿瘤坏死因子- $\alpha$  在子痫前期发病患者胎盘组织中的表达水平及意义[J].中国当代医药,2016,23(13):98-100.
- [9] 范静,宋迎春,孙利.脂联素(ADP)与妊娠高血压子痫前期患者及胎儿的关系探讨[J].陕西医学杂志,2015,44(9):1132-1133.
- [10] 葛新苗.胎盘组织中 VEGF 与 MMP-9 表达水平与子痫前期病情的相关性研究[J].临床和实验医学杂志,2017,16(7):651-653.
- [11] 张雅琪,吴媛媛,刘海意,等.缺氧调控滋养细胞 MMP-9/TIMP-1 表达及侵袭能力的体外研究[J].现代妇产科进展,2014,23(2):117-120.
- [12] 刘霞.子痫前期孕妇 sEng、VEGF、PLGF、sFlt-1 水平与脐动脉血流变化[J].海南医学院学报,2016,22(8):774-776.
- [13] 李园园.胎盘组织中脂联素,PLGF 的表达与重度子痫前期发病关系的研究[D].郑州:郑州大学,2016.
- [14] 单菲,曹征,槐中美.子痫前期患者血清脂联素水平和胎盘 MMP-9 表达情况及其关系[J].海南医学院学报,2013,19(12):1644-1646.
- [15] 辛乐,王翠秀.胎盘组织 MMP-9 表达与孕妇产子痫前期发病的相关性研究[J].中国妇幼保健,2017,32(4):675-677.
- [16] 杨丽萍,侯俊德,段爱红,等.胎盘生长因子及一氧化氮的表达与早发型子痫前期相关性的研究[J].中国妇幼保健,2015,30(7):1030-1032.

(收稿日期:2018-09-28 修回日期:2018-11-10)