

复发性流产与夫妻双方绒毛血管内皮生长因子 基因多态性的关系

李珠玉¹, 游泽山¹, 苏秀梅¹, 张秀明², 李再仪¹, 吴再归¹, 江 丽³

(中山大学 1.附属第一医院妇产科, 2.干细胞与组织工程中心研究所, 3.附属第一医院骨科研究所, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨复发性自然流产(RSA)与中国南方夫妻双方及绒毛血管内皮生长因子基因多态性(-1154G>A)的关系。【方法】采用等位基因特异性扩增-聚合酶链反应方法,检测 271 对 RSA 夫妇和 250 名女性对照、200 名男性对照、60 例复发性自然流产绒毛及人工流产绒毛的 VEGF 基因-1154G>A 多态位点基因型频率分布情况。【结果】在女方 RSA 组和对照组,VEGF 基因-1154G/A 的三种基因型频率(G/G、G/A、A/A)分布不相同,差异有统计学意义($P=0.012$);女方 RSA 组和对照组等位基因频率(G、A)分别是 74.7%、25.3%和 82.2%、17.8%,女方携带 A 等位基因发生 RSA 的风险大于携带 G 等位基因($P=0.003$,OR = 1.562,95% CI = 1.157-2.109)。在男方 RSA 组和对照组,VEGF 基因-1154G/A 的三种基因型频率及等位基因频率分布差异均无统计学意义(P 分别为 0.837、0.572)。在留取的绒毛 RSA 组和人工流产组,VEGF 基因-1154G/A 的三种基因型频率及等位基因频率分布差异均无统计学意义(P 分别为 0.708、0.757)。【结论】女方 VEGF 基因-1154G/A 多态与中国南方复发性自然流产的发病风险相关,携带 A 等位基因增加复发性自然流产的发生,男方及绒毛 VEGF 基因-1154G/A 多态与中国南方复发性自然流产的无相关性。由此推测,与胎儿 VEGF-1154G/A 多态性相比,母方 VEGF-1154G/A 多态性与 RSA 的关系可能更密切。

关键词:血管内皮生长因子;基因多态性;复发性自然流产

中图分类号: R714.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)01-0085-05

Association of Recurrent Spontaneous Abortion with Parental and Chorionic Villi's Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphism in Southern Chinese Population

LI Zhu-yu¹, YOU Ze-shan¹, SU Xiu-mei¹, ZHANG Xiu-ming², LI Zai-yi¹, WU Zai-gui¹, JIANG Li³

(1.Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3.Orthopedic Institute, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510700, China)

Abstract: 【Objective】To explore the association of parental and chorionic villi's polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene (-1154G>A) with recurrent spontaneous abortion (RSA) in southern Chinese population. 【Methods】DNA was extracted from blood samples and chorionic villi, and analyzed by allele-specific PCR. A total of 271 couples with a history of idiopathic RSA, together with 250 age-matched control women and 200 age-matched control men were recruited. The specimens of chorionic villi were collected from 60 cases of spontaneous abortion at early stage and 60 normal early pregnancies. Allele-specific amplification Polymerase chain reaction (ASA-PCR) was applied to analyze the -1154G>A genotype. 【Results】Statistically significant differences in the GA, AA, and GG genotype frequencies were observed between female patients with RSA and the controls ($P=0.012$). The risk of RSA was higher in the carriers of the A allele than in women carrying the G allele ($P=0.003$,OR = 1.562, 95% CI = 1.157-2.109). The frequencies of three genotypes of VEGF -1154G>A polymorphism had no difference between male patients or chorionic villi with RSA and the controls ($P=0.837$ and 0.708). The allelic frequencies were similar between male patients or chorionic villi with RSA and the controls ($P=0.572$ and 0.757). 【Conclusion】VEGF-1154G/A polymorphism of female is associated with susceptibility to RSA; carrying A allele may increase the risk of RSA in southern Chinese women, whereas VEGF-

收稿日期:2010-09-05

基金项目:广东省科技计划项目(2008B030301096);广州市黄埔区科技计划项目(0931)

作者简介:李珠玉,硕士生,E-mail:zhuyulee@hotmail.com; *通信作者:游泽山,教授,E-mail:youzeshan888@21cn.com

1154G/A polymorphism of male and chorionic villi are not associated with RSA. These results may imply that maternal VEGF-1154G/A polymorphism may be more closely related to RSA than embryo-fetal VEGF-1154G/A polymorphism.

Key words: vascular endothelial growth factor; recurrent spontaneous abortion; gene polymorphism

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(1): 85-89]

复发性自然流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA)是指连续发生 3 次或 3 次以上流产者,亦有学者将 RSA 定义为连续 2 次及以上流产者,这使其发生率从前者 1%提高到 5%。该病病因比较复杂,临床上排除染色体因素、解剖因素、感染、内分泌因素、抗磷脂综合征及血管栓塞性疾病外,仍有 40%~55%的患者病因至今未明^[1]。正常的绒毛血管化状态对正常妊娠至关重要。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)是胚胎发生过程中生理血管形成的重要调节因子,它可直接而特异地作用于血管内皮细胞,导致新生血管形成^[2-3]。人类 VEGF 基因启动子区存在一些多态性位点,这些多态性位点可能通过改变基因的转录活性而影响蛋白的表达,导致了人类对疾病易感性的个体差异^[4]。国外三个学者^[5-7]研究 VEGF 基因多态性与复发性自然流产的关系,发现妇女携带 VEGF 基因启动子区-1154A 等位基因增加复发性自然流产的发病风险,但尚无关于男方及绒毛的 VEGF-1154G > A 多态性与复发性自然流产的关系的研究。本研究旨在探讨夫妻双方与绒毛 VEGF-1154G > A 单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与中国南方 RSA 的关系,进一步阐明复发性自然流产的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择于 2009 年 4 月-2010 年 1 月在中山大学干细胞与组织工程中心研究所进行主动免疫治疗的 271 对复发性自然流产夫妇,女方年龄 22 ~ 40 岁 (平均年龄 29.1 岁),男方年龄 24 ~ 43 岁 (平均年龄 31 岁),流产均发生在孕 20 周以前,并满足以下条件:双方染色体正常,B 超排除女方生殖道畸形,妇科内分泌检查正常,抗磷脂综合征抗体阴性。平均流产次数为 3.1 次 (范围为 2 ~ 5 次)。250 名女性对照和 200 名男性对照,来源于 2009 年 4 月-12 月在中山大学附属第一医院黄埔院区体检

中心进行体检的人群,女性年龄 23 ~ 42 岁 (平均年龄 30.2 岁),男性年龄 23 ~ 44 岁 (平均年龄 32 岁),询问病史,保证纳入研究者至少有 1 次成功生育史,否认有自然流产史或死胎史。2008 年 3 月至 2010 年 1 月在该院黄埔院区共无菌收集绒毛标本 120 例,其中自然流产标本 60 例,病例要求:平素月经规则,有 2 次或以上自然流产史,临床结合 B 超诊断胚胎停育;60 例为人工流产的标本,孕周 ≤ 10 周,均 B 超证实宫内胚胎存活并与停经周数相符,无自然流产史或死胎史。

无菌收集外周血标本约 2 mL,置于 EP 管内,-80 °C 保存;无菌收集新鲜绒毛组织约 50 ~ 100 mg,无菌生理盐水漂洗去除母体血污染,置于 EP 管内,-80 °C 保存。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取 根据 AXYGEN DNA 提取试剂盒说明按步骤提取 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 溶液的纯度及浓度。

1.2.2 VEGF-1154G/A 基因多态性检测 采用等位基因特异性扩增-聚合酶链反应 (Allele-Specific Amplification-Polymerase Chain Reaction, ASA-PCR) 方法进行基因型检测。引物序列在文献^[5]的基础上进行了一点改动,即在离多态位点的第三位碱基人为增加 1 个突变点 (G → T) 以提高引物的特异性。引物序列如下:上游引物:5'-GCCCCGAGC CGCGTGTGTA-3' 或者 5'-GCCCCGAGCCCGTGT GTAG-3';下游引物:5'-CCCCGCTACCAGCCGACT T-3'。每个样本进行两管 PCR,每管各进行上述一对引物的扩增。PCR 反应体积为 30 μL,其中耐热 DNA 聚合酶混合物 (广州东盛生物科技有限公司) 15 μL,包括 0.1 U/μL 耐热 DNA 聚合酶,400 mmol/L dNTPs,3 mmol/L MgSO₄,200 ng/μL 模板 DNA 1.5 μL,10 μmol/L 上下游引物 (大连宝生物工程公司) 各 1 μL。PCR 反应条件如下:95 °C 预变性 5 min,95 °C 60 s,67 °C 60 s,74 °C 60 s 循环 35 个周期,74 °C 延伸 7 min,终止反应。PCR 产物于 1.5% 的 EB 染色的琼脂糖凝胶电泳并照片。随机选择 10% 的样本进行重复实验。

1.2.3 统计学分析 Hardy-Weinberg 平衡检验 (以下简称 H-W 平衡检验)、VEGF 基因型及基因频率分析均采用卡方检验。以非条件 Logistic 回归方法计算表示相对风险度的比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 置信区间 (confidence interval, CI)。卡方检验及 Logistic 回归分析采用 SPSS 13.0 软件。以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ASA-PCR 结果判读

结果如图 1 所示。随机选择 10% 的样本进行重复实验, 结果与原结果完全吻合。

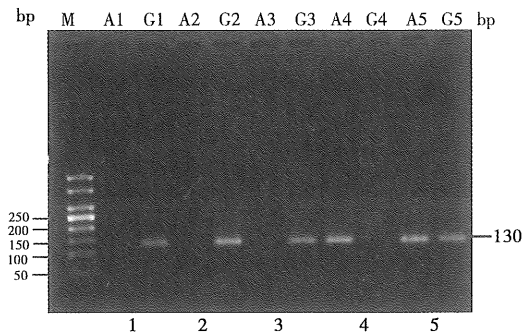


图 1 VEGF-1154G/A 三种基因型 ASA-PCR 的 1.5% 琼脂糖电泳凝胶成像结果

Fig.1 Typical band patterns in electrophoresis of ASA-PCR products on a 1.5% agarose gel

M: Marker; Patient 1-3: G/G genotype; Patient 4: A/A genotype; Patient 5: G/A genotype

2.2 女方 VEGF 基因-1154G/A 多态性的分析

2.2.1 H-W 平衡检验 统计学处理显示女方 RSA 组和对照组 VEGF 基因-1154G/A 多态位点的基因型频率分布均符合 H-W 平衡 (P 值分别为 0.46 和 0.69, 均 > 0.05)。

2.2.2 女方 VEGF 基因-1154G/A 多态性与 RSA 的关系 VEGF 基因-1154G/A SNP 的 GA、GG、AA 三种基因型频率在女方 RSA 组和对照组分别为 39.5%、55%、5.5% 和 30%、67.2%、2.8%, 两组的三种基因型分布不相同, 差异有统计学意义 ($P = 0.012$); VEGF 基因-1154G/A SNP 的 A、G 等位基因频率在 RSA 组和对照组分别为 25.3%、74.7% 和 17.8%、82.2%, 两组相比差异有统计学意义 ($P = 0.003$), 携带 A 等位基因发生 RSA 的风险大于携带 G 等位基因 (OR = 1.562, 95% CI = 1.157 ~

2.109; 表 1)。

表 1 中国南方女方流产组和对照组 VEGF-1154G/A 基因型频率和基因频率比较

VEGF-1154	RSA	Controls	OR (95%CI)
Genotypes	271(100)	250(100)	
GA	107(39.5)	75(30.0)	
GG	149(55)	168(67.2) ¹⁾	
AA	15(5.5)	7(2.8)	
Alleles	542(100)	500(100)	
A	137(25.3)	89(17.8) ²⁾	1.562 (1.157-2.109)
G	405(74.7)	411(82.2)	

1) Distribution of three genotypes $P = 0.12$; 2) Compared with two groups $P = 0.003$

RSA: recurrent spontaneous abortion

2.3 男方 VEGF 基因-1154G/A 多态性分析

2.3.1 H-W 平衡检验 统计学处理显示男方 RSA 组和对照组 VEGF 基因-1154G/A 多态位点的基因型频率分布均符合 H-W 平衡 (P 值分别为 0.31 和 0.34, 均 > 0.05)。

2.3.2 男方 VEGF 基因-1154G/A 多态性与 RSA 的关系 VEGF 基因-1154G/A 的 GA、GG、AA 三种基因型频率在 RSA 组和对照组分别为 36.2%、60.1%、3.7% 和 34.5%、62.5%、3.0%, 两组的三种基因型分布差异无统计学意义 ($P = 0.837$); VEGF 基因-1154G/A SNP 的 A、G 等位基因频率在 RSA 组和对照组分别为 21.8%、78.2% 和 20.3%、79.7%, 两组相比差异无统计学意义 ($P = 0.572$), 携带 A 等位基因与携带 G 等位基因发生 RSA 的风险相近 (OR = 0.912, 95% CI = 0.664 ~ 1.254; 见表 2)。

2.4 女方 RSA 组和其他人群 VEGF 基因-1154G/A 多态性的比较

女方 RSA 组和其他所有参与者的 VEGF 基因-1154G/A 的 GA、GG、AA 三种基因型频率分别为 39.5%、55%、5.5% 和 33.6%、63.2%、3.2%, 两组的三种基因型分布差异有统计学意义 ($P = 0.03$), 两组的 A、G 等位基因频率分别为 25.3%、74.7% 和 20%、80%, 两组相比差异有统计学意义 ($P = 0.01$; 表 3)。

2.5 绒毛 VEGF 基因-1154G/A 多态性分析

2.5.1 H-W 平衡检验 统计学处理显示绒毛

表 2 中国南方男方流产组和对照组 VEGF-1154G/A 基因型频率和基因频率比较

Table 2 Genotypic and allelic frequencies of VEGF-1154G/A gene polymorphisms of male in southern Chinese with or without a history of RSA *n*(%)

VEGF-1154	RSA	Controls	OR (95% CI)
Genotypes	271(100)	200(100)	
GA	98(36.2)	69(34.5)	
GG	163(60.1)	125(62.5) ¹⁾	
AA	10(3.7)	6(3.0)	
Alleles	542(100)	400(100)	
A	118(21.8)	81(20.3) ²⁾	0.912 (0.664-1.254)
G	424(78.2)	319(79.7)	

1) Genotype distribution of the three groups, $P = 0.837$; 2) Compared with two groups, $P = 0.572$; RSA: recurrent spontaneous abortion

表 3 女方 RSA 组和其他所有参与者 VEGF-1154G/A 基因型频率和基因频率比较

Table 3 Genotypic and allelic frequencies of VEGF-1154G/A gene polymorphisms between women with RSA and other participants *n*(%)

VEGF-1154	Female RSA	Others	OR(95% CI)
Genotypes	271(100)	721(100)	
GA	107(39.5)	242(33.6)	
GG	149(55)	456(63.2) ¹⁾	
AA	15(5.5)	23(3.2)	
Alleles	542(100)	1442(100)	
A	137(25.3)	288(20.0) ²⁾	1.355 (1.074 ~ 1.711)
G	405 (74.7)	115(80.0)	

1) Genotype distribution of the three groups, $P = 0.03$; 2) Compared with two groups, $P = 0.01$; RSA: recurrent spontaneous abortion

RSA 组和对照组 VEGF 基因-1154G/A 多态位点的基因型频率分布均符合 H-W 平衡 (P 值分别为 0.361 和 0.889, 均 > 0.05)。

2.5.2 绒毛 VEGF 基因-1154G/A 多态性与 RSA 的关系 VEGF 基因-1154G/A 的 GA、GG、AA 三种基因型频率在绒毛 RSA 组和对照组分别为 40%、56.7%、3.3% 和 33.3%、61.7%、5.0%，两组的三种基因型分布差异无统计学意义 ($P = 0.708$)；VEGF 基因-1154G/A SNP 的 A、G 等位基因频率在 RSA 组和对照组分别为 23.3%、76.7% 和 21.7%、78.3%，两组相比差异无统计学意义 ($P = 0.757$; 表 4)。

表 4 绒毛自然流产组和对照组 VEGF-1154G/A 基因型频率和基因频率比较

Table 4 Genotypic and allelic frequencies of VEGF-1154G/A gene polymorphisms of chorionic villi with or without a history of RSA *n*(%)

VEGF-1154	RSA	Controls
Genotypes	60(100)	60(100)
GA	24(40.0)	20(33.3)
GG	34(56.7)	37(61.7)
AA	2(3.3)	3(5.0)
Alleles	120(100)	120(100)
A	28(23.3)	26(21.7)
G	92(76.7)	94(78.3)

1) Genotype distribution of the three groups, $P = 0.708$; 2) Compared with two groups, $P = 0.757$; RSA: recurrent spontaneous abortion

3 讨论

血管内皮生长因子是成功妊娠的重要因子。敲除 VEGF 基因的小鼠的研究显示 VEGF 基因影响胚胎发育尤其是器官的血管化作用, 敲除 VEGF 基因小鼠严重者导致死亡^[8]; 分泌中期和早期妊娠的子宫内膜 VEGF 蛋白免疫组化显示强阳性^[9], 而发生自然流产时的子宫内膜 VEGF 蛋白含量减少^[10], 但 VEGF 低表达的机制仍不十分清楚。

已有相当多的证据提示 VEGF 基因启动子区-1154G/A 多态可能通过改变基因的转录活性导致蛋白表达的异常。Mojgan 等^[11]研究表明脂多糖刺激的人外周血单核细胞的 VEGF 蛋白高表达跟 VEGF -258C/C 和 -1154G/G 基因型相关。Koukourakis 等^[12]发现非小细胞肺癌的 VEGF 蛋白高表达跟 VEGF-1154G/G 基因型相关。

Papazoglou^[5]首次报道了 VEGF 基因多态性跟复发性自然流产的关系, 研究显示希腊人的 VEGF-1154 A 等位基因跟复发性自然流产密切相关。Lee 等^[7]也发现携带 VEGF-1154A 等位基因增加韩国妇女复发性自然流产的发生率。美国的研究也表明复发性胚胎植入失败者, VEGF-1154AA 基因型频率明显高于正常对照组^[13]。这些研究都提示母亲 VEGF 基因多态性与胚胎发生发育相关。

尽管许多学者提出血管内皮生长因子基因-1154G/A 多态性跟 RSA 相关, 但究竟是母亲的

VEGF-1154G/A 多态性还是胎儿的 VEGF-1154G/A 多态性影响胚胎的发育,目前还不甚明确。

这是因为,无论是母亲的 VEGF-1154G/A 多态性还是胎儿的 VEGF-1154G/A 多态性都可通过改变基因的转录活性导致蛋白的表达异常,从而影响绒毛的血管生长而引起胚胎停止发育。

本研究探讨夫妻双方及绒毛 VEGF 基因-1154G/A 多态性与 RSA 的相关性,旨在探究母亲的 VEGF-1154G/A 多态性和胎儿的 VEGF-1154G/A 多态性两者中,哪个与 RSA 的关系更密切。我们的研究结果显示女方携带 VEGF-1154 A 等位基因增加复发性自然流产的发病风险 ($P=0.003$, $OR=1.562$),且女方 RSA 组与其他所有参与者相比,其基因型频率及基因频率分布均有统计学差异 (P 分别为 0.03 和 0.01),而男方及绒毛 VEGF 基因-1154G/A 多态性与中国南方复发性自然流产无明显相关性,这提示可能女方 VEGF-1154G/A 多态性影响子宫蜕膜局部的 VEGF 因子的表达,从而影响绒毛血管生长,导致胚胎停止发育。我们有理由推测,与胎儿的 VEGF-1154G/A 多态性相比,母亲的 VEGF-1154G/A 多态性与 RSA 的关系可能更密切。这是因为,如果是胎儿的 VEGF-1154G/A 多态性与 RSA 的关系更密切的话,得出的结果应该是男方或(和)绒毛的多态性分布有统计学差异。当然,我们的绒毛标本量较小,得出的结果欠缺一定的说服力。如果能扩大样本量,得出的数据更有说服力,但绒毛标本收集较为困难,尤其是复发性自然流产的绒毛标本收集更是有一定的难度。

总的来说,本研究进一步证实女方 VEGF-1154G/A 多态性与中国南方 RSA 的发病风险相关,女方携带 A 等位基因增加 RSA 的发生,同时揭示了男方及绒毛 VEGF-1154G/A 多态性与中国南方 RSA 无明显相关性。由此推测,与胎儿 VEGF-1154G/A 多态性相比,母方 VEGF-1154G/A 多态性与 RSA 的关系可能更密切。

参考文献:

- [1] Raj R, Lesley R. Recurrent miscarriage [J]. *Lancet*, 2006,368(8):601-611.
- [2] Burton GJ, Charnock DS, Jauniaux E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta [J]. *Reproduction*, 2009,138(6):895-902.
- [3] Arroyo JA, Winn VD. Vasculogenesis and angiogenesis in the IUGR placenta [J]. *Semin Perinatol*, 2008,32(3):172-177.
- [4] Mohammadi M, Bazrafshani MR, Day PJ, et al. Vascular endothelial growth factor production is regulated by gene polymorphisms [J]. *Iran J Immunol*, 2009,6(3):119-129.
- [5] Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss [J]. *Fertil Steril*, 2005,83(4):959-963.
- [6] Coulam CB, Jeyendran RS. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss [J]. *Am J Reprod Immunol*, 2008,59(4):301-305.
- [7] Lee HH, Hong SH, Shin SJ. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion [J]. *Fertil Steril*, 2010,93(4):1244-1247.
- [8] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele [J]. *Nature*, 1996,380(6573):435-439.
- [9] Rowe AJ, Wulff C, Fraser HM. Localization of mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietins and their receptors during the peri-implantation period and early pregnancy in marmosets (*Gallithrix jacchus*) [J]. *Reproduction*, 2003,126(2):227-238.
- [10] Plaisier M, Dennert I, Rost E, et al. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions [J]. *Hum Reprod*, 2009,24(1):185-197.
- [11] Mohammadi D, Mojgan B, Mohammadi R, et al. Vascular endothelial growth factor production is regulated by gene polymorphisms [J]. *Iran J Immunol*, 2009,6(3):119-129.
- [12] Koukourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, et al. VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cance*, 2004,46(3):293-298.
- [13] Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB. P53 tumor suppressor factor plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure [J]. *Fertil Steril*, 2009,92(2):494-498.