

妊娠期高血压患者外周血中的脂代谢基因差异表达

徐丽南, 王子莲, 何科, 张颖, 蔡坚, 杨建波, 周灿权
(中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究妊娠期高血压疾病患者在孕 16~20 周外周血白细胞的基因表达谱,寻找妊娠期高血压疾病患者中孕早期外周血白细胞的差异表达基因,并选取异常脂代谢基因进行认证。【方法】我院 2008 年 8 月至 2008 年 12 月间在我院产检且经 B 超确定孕期为 16~20 周的初产妇共 800 例,随访至妊娠结束,将最终发展为子痫前期的 6 例患者为研究组,40 例正常妊娠妇女为对照组,应用人类全基因组 cDNA 单荧光芯片检测两组孕妇在妊娠 16~20 周时外周血白细胞差异基因表达谱;在差异表达基因中选取氧化修饰低密度脂蛋白(oxLDL)使用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血浆浓度;血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)及载脂蛋白 A5(APOA5)进行 RT-PCR 测定。【结果】研究组和对照组存在差异表达基因,筛选得到 983 个差异表达基因,其中 719 个基因表达上调,264 个基因表达下调;研究组 oxLDL 水平、LOX-1 水平较正常组明显升高($P < 0.05$);研究组 APOA5 水平较正常组明显降低($P < 0.05$);oxLDL 水平与 LOX-1 mRNA 表达水平呈正相关(r 为 0.91, $P < 0.05$)。【结论】妊娠期高血压疾病患者外周血白细胞的脂代谢基因 oxLDL、LOX-1 及 APOA5 基因表达在妊娠 16~20 周时与正常妊娠存在明显差异。

关键词: 妊娠期高血压疾病; 子痫前期; 基因芯片; oxLDL; LOX-1; APOA5

中图分类号: R714.246 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)04-0467-05

Differential Lipid Metabolism-related Genes in Patients with Hypertensive Disorder Complicating Pregnancy

XU Li-nan, WANG Zi-lian, HE Ke, ZHANG Ying, CAI Jian, YANG Jian-bo, ZHOU Can-quan
(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated of Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 The detection of peripheral leucocytes expression profile between normal pregnancy and preeclampsia at 16-20 gestation weeks, and compare the gene expression difference between them with using DNA microarray technique and human genome cDNA chip. And to seek the factors inducing disorders of lipid metabolism in preeclampsia by testing the difference of lipid metabolism-related genes expression. 【Methods】 A cohort of nulliparous women was recruited. Preeclampsia developed in 6 patients with severe preeclampsia (research group) were diagnosed according to the criteria (Obstetrics and Gynecology, the Sixth Edition), without complications of internal medicine and other complications of pregnancy), 40 normotensive controls women were matched (control group). To get detection of peripheral leucocytes expression profile at 16-20 gestation weeks, and compare the gene expression difference between two groups using DNA microarray technique and human genome cDNA chip. To detect the plasma levels of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) by ELISA and the deposition of Lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and apolipoproteins A5 (APOA5) by RT-PCR. 【Results】 The results of microarray analysis of mRNA in peripheral leucocytes between two groups: there were 983 differentially expressed genes in gene chip, in which 719 up-regulating genes and 264 down-regulating genes. The plasma levels of ox-LDL and LOX-1 were significant higher in study group than that in control group ($P < 0.05$), the level of APOA5 were significant lower in study group than that in control group ($P < 0.05$), the level of LOX-1 was positively correlated with the plasma concentration ox-LDL ($R = 0.91, P < 0.05$). 【Conclusion】 oxLDL, LOX-1, and APOA5 gene expression of peripheral leucocytes in pre-eclampsia patients is significantly different from that of normal pregnancy.

Key words: hypertensive disorder complicating pregnancy; preeclampsia; gene-chip; oxLDL; LOX-1; APOA5

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(4):467-471]

收稿日期:2011-02-25

基金项目:广东省科技计划项目(2010B031600313)

作者简介:徐丽南,博士,主治医师,研究方向:围产医学,E-mail:dxulinan@gmail.com

妊娠期高血压疾病 (hypertensive disorder complicating pregnancy, HDPC) 是最常见的妊娠期并发症, 严重威胁母婴的健康, 是导致孕产妇死亡、围生儿发病及死亡的主要原因之一。近年来的研究表明, 该病的发生与基因异常表达有关^[1], 早期发现与预测该病的发生已经成为当前研究的热点。本研究首次应用具有高通量的人类全基因组 cDNA 单荧光芯片检测孕妇妊娠 16 ~ 20 周外周白细胞差异表达基因, 并选取异常脂代谢基因进行认证。

1 材料与方法

1.1 病例选择及分组

本文采用巢式病例对照研究, 选取 2008 年 8 月至 2008 年 12 月间在中山大学附属第一医院院产检且经 B 超确定孕期为 16 ~ 20 周的所有初产妇 800 例, 随访整个妊娠过程。其中选取 40 例单胎妊娠, 无产科合并症和并发症且 37 周后分娩正常体质量婴儿者为对照组, 6 例最终发生重度妊娠期高血压疾病者为研究组。

妊娠期高血压疾病系采用《妇产科学》第七版(乐杰主编)标准: 妊娠 20 周后出现血压持续升高, 血压 $\geq 140/90$ mmHg。轻度子痫前期定义为妊娠期高血压疾病并有蛋白尿 ≥ 300 mg/24 h, 或者随机尿蛋白+。重度子痫前期定义为 $\geq 160/110$ mmHg, 蛋白尿 ≥ 2 g/24 h, 随机尿蛋白++。

1.2 标本采集及保存

所有病例在妊娠 16 ~ 20 周在早上 9 点空腹抽肘静脉血 10 mL。在新鲜全血中加入抗凝剂 (EDTA), 充分混匀后离心回收白细胞。加入 Trizol 试剂, 使之充分溶解形成清亮不粘稠的液体。放入 -80 °C 冰箱中保存。

1.3 人类全基因组 cDNA 单荧光芯片检测

Trizol 法抽提细胞总 RNA, 经紫外定量和检测和变性胶电泳质检鉴定样品质量符合表达谱芯片的实验要求。然后进行总 RNA 纯化。以总 RNA 为模板合成与纯化双链 cDNA, 并进行生物素标记。将标记的 DNA 溶于杂交液中 45 °C 杂交 16 h, 洗脱后用于扫描。各芯片结果符合质控标准, 背景值 (Avg Background) < 100 , 管家基因 (housekeeping controls) 3' 端信号与 5' 端信号比值至少有一个不大于 3。本实验结果显示各项指标均符合实验指南

指标, 其它指标如信号强度及芯片均一性等都正常。芯片用 Gene array Scanner 3000 扫描仪进行扫描。应用 Affymetrix 公司的 Microarray Suite 5.0 软件进行数据处理, 最后以差异为两倍的标准来确定差异表达基因。比值 > 2.0 表示子痫前期外周血基因表达水平高于正常妊娠, 比值 < 0.5 则显示子痫前期外周血基因表达水平低于正常妊娠。以上均由上海生物芯片有限公司完成。

1.4 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

在差异表达基因中选取氧化修饰低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 检测血浆浓度。ELISA 试剂盒购自美国 DR 公司, 操作按说明书进行。标本均为同批测定, 批内变异 $< 5.7\%$ 。

1.5 RT-PCR

在差异表达基因中选取血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 及载脂蛋白 A5 (apolipoproteins A5, APOA5) 进行 RT-PCR 测定。LOX-1 引物根据文献, 合成引物序列如下。LOX-1 (127 bp): 上游序列, 5'-TGATAGAAACCCTTGCTCGGA-3', 下游序列, 5'-TTGCGGACAAGGAGCTGAAC-3'; 内参 β -actin (146 bp): 上游序列, 5'-CTTAGCACCCCTGGCCAAG-3', 下游序列, 5'-GATGTTCTGGAGAGCCCCG-3'。APOA5 (162 bp) 引物序列如下: 上游序列, 5'-GTG CCT GTC ACCACC GTT TGG-3', 下游序列, 5'-ATG CAT TAG CCTCTG CTG TTC-3'; 内参 β -actin (162 bp): 上游序列, 5'-GTG CCT GTC ACCACC GTT TGG-3', 下游序列, 5'-ATG CAT TAG CCTCTG CTG TTC-3'。引物序列由上海生物芯片有限公司完成。

提取总 RNA 后, 合成 cDNA, -20 °C 保存, 进行 PCR 扩增。反应条件: 预变性 94 °C, 5 min-热循环 94 °C 30 s, 65 °C 30 s 72 °C 30 s (共 30 个循环), 终末延伸 72 °C 10 min。20 g/L 琼脂糖凝胶 (含溴化乙啶 0.5 μ g/mL) 电泳检测扩增产物。凝胶图像分析系统扫描各电泳带的灰度值, 以 UVP 凝胶密度扫描仪及其分析软件 (UVP, Inc) 进行相对表达量分析。重复实验 $n = 3$ 。

1.6 统计学处理

实验结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。进行方差齐性检验后进行单因素方差分析, 相关分析采用线性相关分析。

1.7 医学伦理学

本研究经本院伦理委员会批准,获得所有患者知情同意。

2 结果

2.1 两组临床基本资料

最终发生重度子痫前期的患者列为研究组6例,正常妊娠者列为对照组40例。对照组平均年龄27.8(S=2.0)岁,平均体质量指数23.4±3.1(16~20孕周),平均分娩孕周38⁺¹周,新生儿平

均出生体质量(3 005 ± 105) g,均为阴道分娩。病史是指妊娠期高血压疾病病史、慢性高血压史、肾病史、糖尿病史,家族史指母亲及姐妹妊娠期高血压疾病病史。研究组与对照组的抽血孕周、年龄、体质量指数没有显著性差异(P>0.05;表1)。

检测标本10例:研究组6例编号A~F(见表1),将40例对照组16~20周外周血每10例纯化RNA混合为1例作为对照,减少个体差异带来的假性差异^[2],编号为G~J,年龄(27.8±2.0)岁,体质量指数23.4±3.1新生儿出生体质量(3 005 ± 105) g。

表1 研究组临床基本资料

Table 1 The clinical data of the research group

No.	Age/years	Body mass index	Motherhood times	Gestation /weeks	Birth mass/g	Blood type	History	Family history
A	29	24.6	G1P0	31 ⁺²	1 300	O	-	-
B	32	28.3	G3P0	26 ⁺¹	780	B	-	+
C	30	25.1	G2P0	29 ⁺⁴	1 000	B	-	-
D	33	24.5	G2P0	32 ⁺³	1 400	A	-	-
E	31	24.9	G1P0	28 ⁺²	900	O	-	+
F	34	25.0	G3P0	32 ⁺⁶	1 500	O	-	-

2.2 基因芯片筛选结果

用高通量基因表达谱芯片筛选研究组和对照组外周血白细胞差异表达的基因,对两组数据进行分析比较,筛选差异表达基因。

利用t-检验分析出两组间存在显著差异基因后,得出火山图(图1)。图1中红色表示筛选出的差异基因。利用层次聚类分析cluster得出热图(图2)红色表示基因表达上调,绿色表示基因表达下调,黑色表示基因表达无变化。其中重复2次差异表达的基因共983个,研究期组差异表达上调基因719个,下调基因264个。

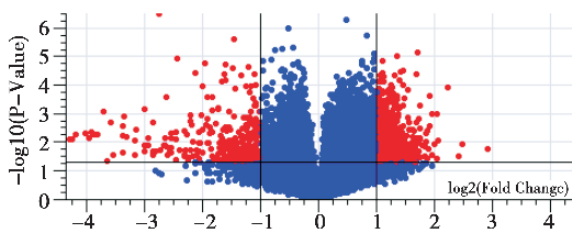


图1 外周血白细胞差异表达基因分析火山图

Fig.1 Volcano plot of peripheral leucocytes gene expression analysis

Red points mean differential genes;blue points mean no differential genes

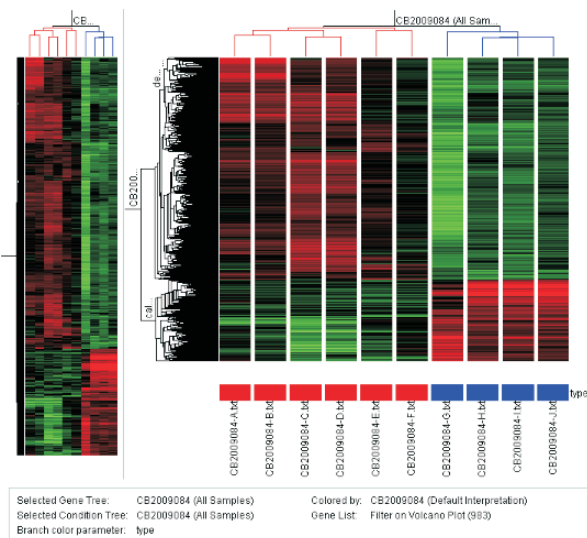


图2 外周血白细胞差异表达基因层次聚类分析群集热图

Fig.2 Cluster heatmap of peripheral leucocytes gene expression analysis

red means up-regulated differential genes;green means down-regulated genes; black means no change genes

脂代谢相关基因共78个,占(7.94%):上调基因包括脂肪分化相关蛋白基因(ADRP)、氧化修饰低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,oxLDL)、

表 2 oxLDL 浓度、LOX-1、APOA5 的 mRNA 水平
Table 2 Serum level of oxLDL, LOX-1, and APOA5 on mRNA expression level

	Control Group	Research Group	P
oxLDL/(mg/L)	0.35 ± 0.13	0.42 ± 0.16 ¹⁾	0.032
LOX-1	0.58 ± 0.20	0.72 ± 0.14 ¹⁾	0.025
APOA5	0.82 ± 0.09	0.67 ± 0.06 ¹⁾	0.029

1) $P < 0.05$, compared with Control Group, $n = 3$ experiments

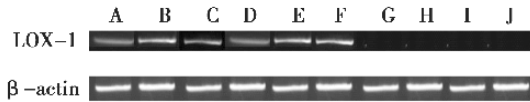


图 3 LOX-1 的 mRNA 表达

Fig.3 mRNA expression of LOX-1

RT-PCR was performed to measure the expression of LOX-1. β -actin was used as a control. $n = 3$ experiments

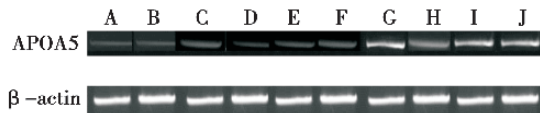


图 4 APOA5 的 mRNA 表达

Fig.4 mRNA expression of APOA5

RT-PCR was performed to measure the expression of APOA5. β -actin was used as a control. $n = 3$ experiments

血凝素样氧化低密度脂蛋白受体-1 (lectin like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1)、瘦素(leptin)、脂肪酶(LIPG)。下调基因包括:载脂蛋白 A5(APOA5)、脂蛋白酯酶(LPL)、甘油一酯脂肪酶(MGLL)、载脂蛋白 D(APOD)、脂联素基因(AdiPose most abundant gene transcript 1 apM1)等。

2.3 脂代谢基因 oxLDL、LOX-1、APOA5 的差异表达

根据芯片筛查结果,选取有差异表达的脂代谢基因 oxLDL、LOX-1、APOA5 进行验证。ELISA 法检验研究组与对照组血浆 oxLDL 浓度,研究组为 (0.42 ± 0.16) mg/L,对照组为 (0.35 ± 0.13) mg/L,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。RT-PCR 检测 LOX-1、APOA5 的 mRNA 表达水平:研究组 LOX-1 的 mRNA 表达水平较对照组明显升高($P < 0.05$);研究组 APOA5 的 mRNA 表达水平较对照组明显降低($P < 0.05$;表 2;图 3、4)。

2.4 血浆中 oxLDL 水平与 LOX-1 表达水平的相关性分析

血浆中 oxLDL 水平与 LOX-1 mRNA 表达水平

呈正相关(相关系数为 0.91, $P < 0.05$)。

3 讨论

子痫前期常存在不同程度的代谢综合症表现,其中血脂代谢紊乱在子痫前期中表现比较明显。血脂代谢紊乱可能导致妊娠期高血压疾病的发生,并且可能加重病情,引起子宫及胎盘床小动脉的急性动脉粥样硬化,导致胎盘功能下降、胎儿生长受限、胎儿宫内窘迫等不良后果^[3]。

近年来的研究发现,氧化低密度脂蛋白(oxLDL)、血凝集素样氧化低密度脂蛋白受体-1(LOX-1)、载脂蛋白 A5(APOA5)与高血压、动脉粥样硬化等脂代谢异常疾病的发生、发展关系密切。其在妊娠期高血压疾病中的作用研究较少,本研究在子痫前期临床症状出现前的妊娠 16 ~ 20 周进行外周血基差异因检测,发现它们出现变化,并经 mRNA 验证。

体外培养研究发现,oxLDL 不仅可以通过降低精氨酸的转运,减少内皮舒张因子一氧化氮的生成;同时可以激活肾素-血管紧张素系统,导致血管收缩因子表达上调;同时 oxLDL 具有细胞毒性作用,可以直接损伤内皮细胞本身。体外培养的研究还发现 oxLDL 可明显抑制滋养细胞浸润,并呈浓度依赖关系,提示 oxLDL 可能通过影响血管内皮细胞功能以及滋养细胞浸润而参与子痫前期的发病^[4]。

Sanchez 等^[5]采用病例对照研究的方法发现,孕妇血浆中 oxLDL 水平 > 73 U/L 时,发生子痫前期的危险度增加了 2.7 倍,本研究在妊娠 16 ~ 20 周的子痫前期临床症状出现前,检测到 oxLDL 基因上调,并且发现血浆中 oxLDL 水平升高,因此 oxLDL 在子痫前期早期发病中可能发挥作用。

LOX-1 作为 oxLDL 的受体具有高度的配体特异性,能介导内皮细胞摄取、代谢 oxLDL 以及 oxLDL 对内皮细胞的凋亡和损伤效应。它在血管丰富的组织器官有表达,包括血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、肺以及妊娠特有的器官胎盘^[6]。LOX-1 被认为是血管性疾病的启动因素^[7]。

本研究结果表明,本研究在妊娠 16 ~ 20 周,LOX-1 基因发生上调,经证实 mRNA 明显高于正常孕妇。体外培养表明血管内皮细胞受到 oxLDL 刺激后,其 LOX-1mRNA 及蛋白表达水平升高,而

且其表达水平与 oxLDL 的浓度有相关性。本研究结果表明, LOX-1 表达水平与血浆 oxLDL 的水平呈正相关,因此推测, LOX-1 的高表达可能与血浆 oxLDL 水平升高有关, LOX-1 在子痫前期病理生理过程中发挥作用。

妊娠期高血压疾病时的脂代谢异常主要表现为对血管有保护作用的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、载脂蛋白显著降低,对血管有破坏作用的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C)、比值显著升高。载脂蛋白(apolipoproteins)是脂质结合蛋白,参与血脂转运,载脂蛋白的结构和合成异常影响脂代谢^[8]。早在1985年人们就认识到位于11号染色体上的APOA1/C3/A4基因簇与血脂有关,2001年10月Pennacchio等^[9]在APOA1/C3/A4基因簇附近新发现了一个重要载脂蛋白基因——APOA5。载脂蛋白A5基因的功能研究提示,该载脂蛋白以一种非年龄依赖的形式对血浆甘油三酯水平起决定性作用,有降低血浆甘油三酯水平的作用^[10]。Martin等^[11]通过研究APOA5基因变异对脂类代谢的影响以及对口服脂肪耐量试验和口服葡萄糖耐量试验的反应得出载脂蛋白A5在人体内具有降低血浆甘油三酯水平的功能,但具体机理尚不清楚,推测可能具有脂质转运功能。

在本研究中,最终发展为重度子痫前期孕妇在16~20周时已有载脂蛋白A5基因的下调,经mRNA水平证实明显低于正常孕妇,表明该疾病在妊娠中期已经出现体内脂代谢的紊乱,APOA5的保护作用下降,进而导致该疾病的发生和发展。

综上所述,本研究发现妊娠期高血压疾病孕妇在妊娠16~20周时已经出现一定程度的脂代谢紊乱的基因改变,为我国妇女筛查妊娠期高血压疾病易感者及研究基因治疗方法提供依据。脂代谢异常与该疾病的发生、发展关系密切,在妊娠早中期加强脂蛋白类代谢监测,并控制其在一定水平,对该疾病的预测、预防和治疗有一定的意义。

参考文献:

- [1] Mohaupt M. Molecular aspects of preeclampsia[J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28(2): 169-191.
- [2] Cristofalo VJ. A DNA chip off the aging block[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5): 507.
- [3] Saarelainen H, Laitinen T, Raitakari OT, et al. Pregnancy-related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women[J]. *Circ J*, 2006, 70(6): 768-772.
- [4] Qiu C, Phung TT, Vadachkoria S, et al. Oxidized low-density lipoprotein (Oxidized LDL) and the risk of preeclampsia[J]. *Physiol Res*, 2006, 55(5): 491-500.
- [5] Sanchez SE, Williams MA, Muiy-Rivera M, et al. A case-control study of oxidized low density lipoproteins and preeclampsia risk[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2005, 21(4): 193-199.
- [6] Sankaralingam S, Xu H, Jiang Y, et al. Evidence for increased methylglyoxal in the vasculature of women with preeclampsia: role in upregulation of LOX-1 and arginase[J]. *Hypertension*, 2009, 54(4): 897-904.
- [7] Satoh H, Kiyota E, Terasaki Y, et al. Expression and localization of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in murine and human placentas[J]. *J Histochem Cytochem*, 2008, 56(8): 773-784.
- [8] Ray JG, Diamond P, Singh G, et al. Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia[J]. *BJOG*, 2006, 113(4): 379-386.
- [9] Pennacchio LA, Olivier M, Hubacek JA, et al. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing[J]. *Science*, 2001, 294(5540): 169-173.
- [10] Dorfmeister B, Zeng WW, Dichlberger A, et al. Effects of six APOA5 variants, identified in patients with severe hypertriglyceridemia, on in vitro lipoprotein lipase activity and receptor binding [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(10): 1866-1871.
- [11] Martin S, Nicaud V, Humphries SE, et al. Contribution of APOA5 gene variants to plasma triglyceride determination and to the response to both fat and glucose tolerance challenges[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1637(3): 217-225.

(编辑 张恩健)