

正常妊娠和子痫前期胎盘 Syncytin 表达差异探讨

赵 杨¹, 韩凤珍¹, 刘益芬², 陈敦金²

(1. 广东省人民医院妇产科//广东省医学科学院, 广东 广州 510080;

2. 广州医学院附属第三医院妇产科, 广东 广州 510150)

摘要:【目的】探讨 syncytin 及其受体 ASCT2 在子痫前期(PE)和正常妊娠胎盘组织中的表达改变。【方法】纳入研究病人共 37 例,分为 2 组,PE 组 21 例,正常对照组 16 例,采用定量 RT-PCR 方法检测 syncytin 及 ASCT2 mRNA 的转录水平,Western blot 法测定 syncytin 蛋白表达强度,比较两组较检测结果。【结果】两组均检测到 syncytin mRNA、syncytin 蛋白及 ASCT2 mRNA,PE 组胎盘 syncytin mRNA 水平(1.5 ± 1.4)和蛋白表达强度(55.7 ± 26.1)明显低于正常对照组(6.2 ± 3.0 , 92.2 ± 36.4 , $P < 0.01$), ASCT2 mRNA 水平无明显差异($P > 0.05$)。【结论】胎盘组织 syncytin 表达下调与 PE 发病密切相关,其受体 ASCT2 与 PE 发生无相关性。

关键词: 子痫前期; syncytin; ASCT2

中图分类号: R71

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2009)02-0211-04

Differential Expression of Syncytin in Placenta between Normal Pregnancy and Preeclampsia

ZHAO Yang¹, HAN Feng-zhen¹, LIU Yi-fen², CHEN Dun-jin²

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510150, China)

Abstract:【Objective】To explore the expression changes of syncytin and its receptor ASCT2 in placenta between preeclampsia (PE) and normal pregnancy.【Methods】Thirty-seven pregnant women were enrolled to the retrospective study and were divided into two groups. PE group was 21 placental specimens from PE; normal control group was 16 placental specimens from normal pregnancy. Real time PCR was adopted to detect the transcription level of syncytin and ASCT2 mRNA and Western blot was used to detect the protein expression of syncytin. Detection results of the two groups were compared.【Results】Syncytin mRNA, syncytin protein, and ASCT2 mRNA were detected in both groups. Syncytin mRNA level (1.5 ± 1.4) and protein expression (55.7 ± 26.1) of placenta in PE group were significantly lower than those in normal control group (6.2 ± 3.0 , 92.2 ± 36.4 , $P < 0.01$), but ASCT2 mRNA levels showed no significant difference in the two groups ($P > 0.05$).【Conclusion】Down-regulated expression of syncytin in placenta is closely related to the occurrence of PE, but the receptor ASCT2 mRNA has no association with PE.

Key words: preeclampsia; syncytin; ASCT2

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2):211-214]

子痫前期(preeclampsia, PE)是产科常见妊娠合并症,其发病原因尚无定论,目前认为胎盘细胞滋养细胞(cytotrophoblast, CT)生长分化异常是重要原因之一。Sha 等^[1]首次报道,人内源性逆转录缺陷病毒(human endogeneous retrovirus, HERV)家

族一员 HERV-W 的包膜蛋白 syncytin 具有促进胎盘 CT 生长分化的功能,诱导合体滋养细胞(syncytiotrophoblast, ST)形成。随后有研究发现 PE 胎盘组织内 syncytin 基因表达下调^[2],但缺乏临床病例的深入研究。本课题应用病例对照研究,采用

收稿日期:2008-09-23

基金项目:广东省人民医院科研项目(Y200537)

作者简介:赵杨,博士,主治医师, E-mail: yzsj@yahoo.com.cn

实时 PCR 方法和 Western blot 法分别检测 PE 及正常妊娠胎盘组织 syncytin mRNA 和蛋白水平,同时测定其受体 ASCT2 mRNA,从转录和翻译水平探讨 syncytin 表达改变与 PE 发病的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择广东省人民医院和广州医学院附属第三医院 2007 年 3 月 ~ 2007 年 12 月住院分娩孕妇共 37 人,依孕周匹配,分为 PE 组和正常对照组,PE 诊断标准依乐杰主编《妇产科学》教材第 6 版,其中 PE 组 21 例,排除妊娠合并原发性高血压、肾炎等,平均年龄 31.43 (S = 4.64) 岁,平均孕周 36.54(S = 3.38)周;正常妊娠组 16 例,排除胎膜早破、早产等病理妊娠,平均年龄 30.28(S = 3.96)岁,平均孕周 37.98(S = 1.21)周。各组间年龄、孕周无统计学差异。

1.2 主要试剂

引物和探针由上海闪晶生物技术有限责任公司设计并合成(表 1),QuantiTectProbe RT-PCR 试剂盒购于 Qiagen 公司。SV Total RNA 提取试剂盒购于 Promega 公司,羊抗 syncytin 抗体购自 SANTA CRUI 生物技术公司,兔抗羊二抗购自

Sigma 公司。荧光定量 PCR 仪为 Mxpro 3000 型,产自美国 Stratagene 公司。

1.3 胎盘取材和处理

胎盘娩出后 30 min 内取脐带附着点至胎盘边缘范围的中间区域(避开钙化灶及出血点),剔除外部的母体面组织至少 1.0 cm,取胎盘组织总质量约 50 ~ 100 mg,生理盐水洗净后液氮冻存储备用。

1.4 总 RNA 和蛋白提取

称取约胎盘组织 40 mg,充分研磨后依 SV Total RNA 提取试剂盒说明书操作,提取总 RNA 后紫外分光光度计测定其纯度并计算浓度后,2% 琼脂糖凝胶电泳确定 RNA 完整性,-80 °C 保存备用;胎盘组织剪碎后加入 1 mL 裂解液,充分匀浆后胶乳蛋白抽提液,离心后吸除液相,干燥沉淀蛋白,-20 °C 保存备用。

1.5 实时 PCR 检测

Mxpro 3000 型荧光定量 PCR 仪检测 syncytin 和 ASCT2 mRNA 的相对转录水平,引物和探针序列见表 1,反应体系 50 μ L:50 °C 逆转录 30 s,再 95 °C 激活 15 s 后,按 94 °C 变性 15 s 后 60 °C 延伸 60 s 进行 45 个循环。每次反应均设由 DEPC 水作模板的阴性对照,以 β -actin 为内参照,计算机软件分析各管反应物的荧光强度,标准曲线法半定量计算各目的基因相对反应起始拷贝数。

表 1 引物和探针序列

Table 1 Primer and probe sequences

Gene	Primer	Probe	Length(bp)
Syncytin	sense 5'-ATCTCAAGAACTAAATGGGGACA-3'	5'-CGCCGACTCCCTGCTGGTCACCTT-3'	125
	antisense 5'-CAGCGGTTAAGTCTAAGTCTAAAAGC-3'		
ASCT2	sense 5'-CCGCTTCTTCAACTCCTTCAA-3', Antisen 5'-ACCCACATCCTCCATCTCCA-3'	5'-TGGATCATGTGGTACGCCCTGT-3'	121
β -actin	sense 5'-ACCGAGCGCGGTACAG-3'	5'-TTCACCACCACGGCCGAGC-3'	102
	antisense 5'-CTTAATGTACGCACGATTTCC-3'		

1.6 Western blot

生物分光光度比色分析测定蛋白质含量后,各取 50 μ g 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上,1:500 一抗孵育过夜,1:3 000 二抗标记,ECL 液显色,然后依次曝光、显影、定影,凝胶图像处理系统分析目标带的分子质量和净光密度值,灰度分析软件对图像峰面积值进行标准化处理(β -actin 蛋白为内参照)。

1.7 统计学分析

计量资料两组间比较采用 *t* 检验,计算机 SPSS 13.0 软件系统进行统计学处理。

2 结果

PE 和正常妊娠组胎盘均检测到 syncytin mRNA、syncytin 蛋白和 ASCT2 mRNA,PE 组

表2 PE患者胎盘 syncytin 和 ASCT2 mRNA 水平测定结果

Table 2 Detection results of syncytin and ASCT2 mRNA level in placenta of PE

Group	n	Syncytin mRNA	Syncytin Protein	ASCT2 mRNA
PE	21	1.5 ± 1.4 ¹⁾	55.7 ± 26.1 ¹⁾	4.0 ± 3.3 ²⁾
Normal pregnancy	16	6.2 ± 3.0	92.2 ± 36.4	5.3 ± 3.2
t		6.498	3.550	1.216

1) Compared with normal control group, $P < 0.01$; 2) Compared with normal control group, $P > 0.05$

syncytin mRNA 和蛋白水平明显低于正常妊娠组, 差异具有统计学意义; PE 组 ASCT2 mRNA 水平略低于正常妊娠组, 但两者间差异无统计学意义(图1, 表2)。

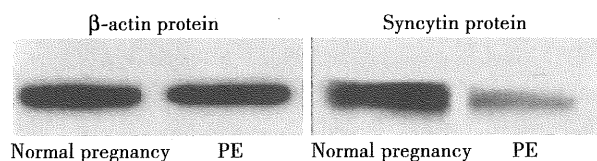


图1 Syncytin 蛋白表达情况

Fig.1 Expression of syncytin protein

3 讨论

3.1 Syncytin 表达对胎盘发育的影响

PE 患者典型的病理生理特征是局部缺血缺氧, 胎盘浅着床、血流减少, 胎盘发育和形态均受到影响, 导致胎盘功能减退、胎儿生长发育受限。Sha 等^[1]首先提出, syncytin 表达失调或功能障碍可能与诸如 PE 等的胎盘病理形成有关。Syncytin 是人内源性逆转录缺陷病毒 HERV 家族成员, 基因位于人类染色体 7q21-7q22, 片段长 2.8 kb, 在胎盘组织特异性强表达, 定位于 ST 内^[1,3], 是胎盘形态构建必需的重要调控因子。有报道哺乳动物在漫长的进化过程中捕获感染的逆转录病毒基因片段, 整合入自身基因组, 在体内加以表达, 约占人类基因组 3% ~ 8%, 这些基因片段通过不同途径调节人体多种生理活动, 其表达改变可能与特定的病理过程相关^[4]。

Syncytin mRNA 转录在孕 9 ~ 12 周开始升高, 中孕期明显高于早孕期, 至孕 37 周后水平有所下降^[5], 与妊娠期胎盘 CT 增殖分化、ST 形成由旺盛到减退的生理过程相一致; 而 syncytin 蛋白表达变化却呈相反趋势, 这与胎盘形态发育特点相符, 避免 ST 生长过旺导致其浸润失控, 引发胎盘植入^[6]。Syncytin mRNA 转录早于 hCG mRNA, 其转录水平

及 syncytin 蛋白表达量与 CT 的生长分化及 hCG 分泌量呈共线性相关^[7]。实验证明, 重组 syncytin 蛋白可诱导人体多种细胞株发生融合而形成巨大的合胞体, 是介导滋养细胞融合的关键因素^[8]。体外培养滋养叶肿瘤细胞 BeWo 株和纯化 CT 发现, 乏氧可致 syncytin 表达下调、syncytin mRNA 转录缺失, 这是 CT 分化减少、ST 形成受损的主要风险因素, 进一步加重乏氧所致的胎盘功能障碍^[9,10]。

3.2 Syncytin 表达改变与子痫前期发病的关系

临床研究显示, PE 和 HELLP 综合征患者胎盘的 syncytin 蛋白表达下降^[2], 其蛋白定位也由正常的基底部 ST 细胞质膜转移到顶部 ST 微绒毛膜, 基底部表达显著减少甚至表达缺失^[11], PE 孕妇胎盘的 syncytin 转录水平也较血压正常孕妇显著降低^[12]。体外培养结果表明, 与正常妊娠相比, PE 胎盘和 CT 中 syncytin 表达明显下调, β -HCG 水平也显著降低^[13]。本研究对正常及 PE 胎盘组织同时进行 syncytin mRNA 转录和蛋白表达测定, 结果显示, 相同孕周下 PE 组胎盘 syncytin mRNA 水平及其蛋白表达量均明显低于正常妊娠, 表明其基因活性在转录和翻译水平均受到抑制, 这势必严重影响 syncytin 生理功能的发挥, 直接引起 CT 生长分化及 ST 生成障碍, 最终干扰胎盘发育和生理功能。已有研究显示子痫前期胎盘蜕膜滋养细胞明显减少, 这必然导致滋养细胞对螺旋动脉侵入不足^[14]。可见, 在 PE 特异的胎盘病理生理过程中, syncytin 表达下调介导 ST 形成受损的病理反应。

有学者认为, Syncytin 的作用发挥有赖于其受体 ASCT (animo acid transport system B°, broad substrate specificity for neutral amino acids), 后者是一种钠依赖的氨基酸通道, 分为 ASCT1 和 ASCT2 两个亚型, 表达于 ST 基底膜。Syncytin 与 ASCT 以人类胎盘滋养细胞为位点相互作用, 诱导 CT 分化融合形成 ST, 调控胎盘形态发育^[9,10]。但 Hayward 等^[5]提出胎盘滋养细胞融合并非局部 CT

产生的 ASCT2 所调控, PE 患者胎盘及体外乏氧条件下培养的 CT 中 ASCT2 mRNA 水平无明显变化, 是 syncytin 表达下降影响 CT 融合形成 ST 而非 ASCT^[2]。本研究结果为 ASCT2 mRNA 水平在正常妊娠与 PE 组无明显变化, ASCT2 基因活性在转录水平与 PE 的发病无显著相关性, 提示在 PE 发病过程中, Syncytin 与 ASCT2 的调控机制可能有所不同。

Syncytin 表达下调使胎盘 CT 分化障碍及 ST 形成减少的发现为 PE 发病机制的探索揭开新的一页, 从分子水平诠释了 PE 患者胎盘浅着床的病理机制, 但 syncytin 与受体 ASCT2 在 PE 发生过程中的相互作用关系尚需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Mi S, Lee X, Li X, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis [J]. *Nature*, 2000, 403 (6671): 785-789.
- [2] Knerr I, Beinder E, Rascher W. Syncytin, a novel human endogenous retroviral gene in human placenta: evidence for its dysregulation in preeclampsia and HELLP syndrome [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2002, 86 (2): 210-213.
- [3] Chang C, Chen PT, Chang GD, et al. Functional characterization of the placental fusogenic membrane protein syncytin [J]. *Biol Reprod*, 2004, 71 (6): 1956-1962.
- [4] de Parseval N, Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 110 (1-4): 318-332.
- [5] Chen CP, Wang KG, Chen CY, et al. Altered placental syncytin and its receptor ASCT2 expression in placental development and pre eclampsia [J]. *BJOG*, 2006, 113 (2): 152-158.
- [6] Smallwood A, Papageorgiou A, Nicolaidis K, et al. Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted PEG10 and SGCE in human placenta [J]. *Bio Reprod*, 2003, 69 (1): 286-293.
- [7] Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, et al. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23 (10): 3566-3574.
- [8] Pötgens AJ, Drewlo S, Kokozidou M, et al. Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action [J]. *Hum Reprod Update*, 2004, 10 (6): 487-496.
- [9] Knerr I, Weigel C, Linnemann K, et al. Transcriptional effects of hyposia on fusigenic syncytin and its receptor ASCT2 in human cytotrophoblast BeWo cells and in ex vivo perfused placental cotyledons [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2003, 189 (2): 583-588.
- [10] Robins JC, Heizer A, Hardiman A, et al. Oxygen tension directs the differentiation pathway of human cytotrophoblast cells [J]. *Placenta*, 2007, 28 (11-12): 1141-1146.
- [11] Lee X, Keith JC Jr, Stumm N, et al. Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia [J]. *Placenta*, 2001, 22 (10): 808-812.
- [12] Kudaka W, Oda T, Jinno Y, et al. Cellular localization of placenta-specific human endogenous retrovirus (HERV) transcripts and their possible implication in pregnancy-induced hypertension [J]. *Placenta*, 2008, 29 (3): 282-289.
- [13] Langbein M, Strick R, Strissel PL, et al. Impaired cytotrophoblast cell-cell fusion is associated with reduced Syncytin and increased apoptosis in patients with placental dysfunction [J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75 (1): 175-183.
- [14] 王冰, 黄顺英, 蔡坚. 胎盘 GM-CSF 及蜕膜基板中滋养细胞、巨噬细胞与子痫前期的关系 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2006, 27 (4): 435-437.
- [15] Hayward MD, Pötgens AJ, Drewlo S, et al. Distribution of human endogenous retrovirus type W receptor in normal human villous placenta [J]. *Pathology*, 2007, 39 (4): 406-412.

(编辑 徐杰)