

ADM基因在正常孕妇与子痫前期孕妇妊娠晚期胎盘组织表达的研究

ADM(adrenomedullin, ADM)是近年来发现的一种通过自体分泌或旁分泌的方式进行作用的高效血管舒张肽[1]。进一步的研究发现,该52-氨基酸多肽对血管系统的深刻影响除了舒张血管外,对促进血管生成的作用也是强有力的。另外,ADM对细胞的生长与分化具有明显的调节作用。对ADM在妊娠过程中作用的认识源于对妊娠妇女及妊娠动物体内ADM含量的显著升高以及胎盘组织中ADM高表达的发现。目前认为,ADM不仅参与调节胎儿与母亲的血液循环,舒张孕妇的血管系统,还在胎盘的植入以及胎儿的成熟等过程扮演着非常重要的角色[2][3]。

多种病理状态的妊娠出现孕妇血管舒张异常以及胎儿-母亲血循环的改变,最常见的例子就是子痫前期和胎儿宫内生长受限,这些病理过程往往伴随着ADM及其信号通路分子的表达的变化[4]。但是,ADM与这些妊娠病理状态的关系目前尚处于有争议的阶段。为进一步阐明ADM基因在正常孕妇与子痫前期胎盘组织的表达差异,以期为探索ADM及其信号通路的改变在致子痫前期发生的分子病理机制中的重要性提供试验依据,本研究采用了Northern Blotting方法和免疫组化技术比较正常孕妇与子痫前期孕妇胎盘组织中ADM基因表达的差异。

1 材料与方法

1.1 病例及组织

新鲜胎盘组织来源于2004年1月至2005年3月间于我院行阴道产或剖宫产的7例血压正常的孕妇及10例子痫前期的孕妇。其中子痫前期的诊断标准为妊娠20周后血压 $>140/90$ mmHg和(或)出现蛋白尿[5]。有关孕妇生产时的孕周、血压、胎盘质量、胎儿质量和蛋白尿的情况见表1。

表1 病例的临床特征

Tab.1 Clinical characteristics of the subjects (Mean±SD)

	Normal pregnancy (n=7)	Pre-eclampsia (n=10)
Maternal age (years)	25.1±2.9	31.1±5.8
CS/VD (n)	2/5	8/2
Gestational weeks at birth	39.1±1.3	35.9±2.4*
Birth weight (g)	3068.3±381.8	1942.6±503.3*
Placental weight (g)	578.6±78.6	371.3±91.5*

* $P<0.05$ vs normal pregnancy; CS: Cesarean section; VD: Vaginal delivery

1.2 RNA的提取及cDNA探针的制备

取新鲜胎盘组织,迅速置于已盛有液氮的研钵中研碎。加入适量TRIzol (GIBCO BRL),采用TRIzol快速法提取胎盘组织的总RNA分光光度计定量, -70°C 冻存储用。cDNA探针的制备cDNA探针的制备采用RT-PCR

法。在20 μ l逆转录体系中加入1 μ g RNA, 100 pmol/L Oligo(dT), 10 U 逆转录酶(Roche), 42 $^{\circ}$ C 1 h。探针的合成采用PCR地高辛标记试剂盒(Roche)。50 μ l反应体系里, 加入1.5 μ l 上述逆转录产物, dATP, dCTP和dGTP 的终浓度为200 mol/L, dTTP为190 mol/L, DIG-11-dUTP为10 mol/L; 2.5 U Taq polymerase (Takara公司产品); 1.5 mmol/L MgCl₂; 上下游引物的终浓度均为400 pmol/L, 其中上游引物序列为: 5'-agtcgtgggaagagggaact-3' (position 274-293), 下游引物为: 5'-ggaagttgttcatgctctgg-3' (position 463- 444)。PCR的循环参数为94 $^{\circ}$ C预变性2 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s变性, 60 $^{\circ}$ C 30 s退火, 72 $^{\circ}$ C 45 s延伸, 共35个循环。

1.3 Northern Blot 分析子痫前期和正常孕妇妊娠晚期胎盘组织ADM基因的表达

每份样品各取15 μ g总RNA, 95 $^{\circ}$ C变性5 min, 用浓度为1%的含0.37 mol/L甲醛琼脂糖凝胶电泳分离约1.5 h。以20 SSC为转膜缓冲液, 采用真空泵将RNA转移至尼龙膜(Roche)上, 紫外线照射 1 min。cDNA探针95 $^{\circ}$ C变性5 min, 5 mL DIG Easy Hyb(Roche applied science)稀释至100 ng/mL, 68 $^{\circ}$ C杂交过夜。150 mU/ml Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments孵育2 min, X片曝光显影。为确保RNA量在各泳道间的一致性, 18 S RNA作为对照。

1.4 免疫组织化学法比较ADM蛋白在子痫前期和正常孕妇妊娠晚期胎盘组织的差异

取新鲜胎盘组织, 4%多聚甲醛-PBS固定过夜, 石蜡包埋, 切片(5 μ m厚)。兔抗人ADM 1-52 多抗(Peninsula Laboratories Inc., Belmont, CA, USA)按1: 500稀释, 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, avidin 生物素过氧化物酶染色试剂盒(Sigma)技术染色, 显微镜下观察并计数10个视野下的细胞。其中细胞未见明显金黄色染为+, 中度金黄色染为++, 重度金黄色染为+++。

1.5 Northern blot结果的统计分析

采用densitometry对大小约1.4 kb的片段和18 SRNA 密度进行定量, 计算各样品ADM/18 S RNA的比值, 再分别取正常孕妇组和子痫前期组该比值的均数, 非配对t-检验法比较分析。

2 结果

由图1可以看出, 与正常孕妇相比, 子痫前期孕妇胎盘组织中ADM基因mRNA的表达降低, ADM/18S RNA的比值的均数比正常孕妇组减少了36.2 \pm 6.3%。 t-检验表明二者差异显著(P<0.05)。

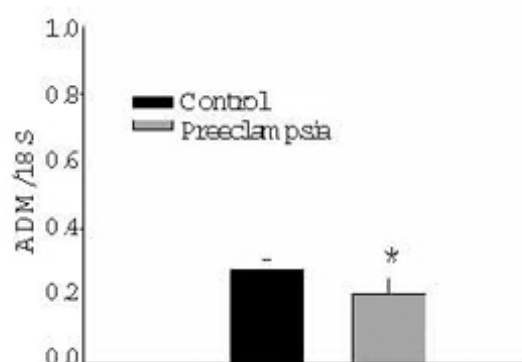
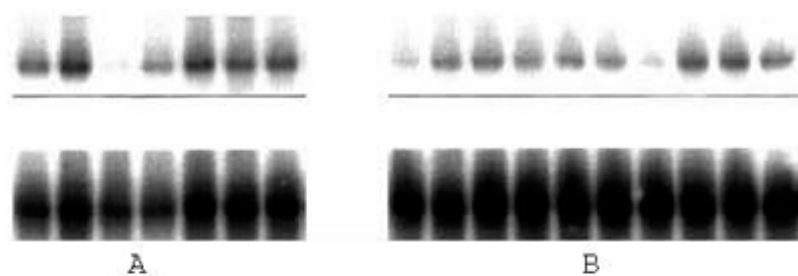


图1 ADM mRNA 在7个正常产妇和

由图2 可以看出，正常孕妇合体滋养层中ADM的免疫组化染色为+++，而子痫前期孕妇合体滋养层中ADM的免疫组化染色仅为+，这说明子痫前期孕妇合体滋养层中ADM蛋白的含量比正常孕妇明显降低。

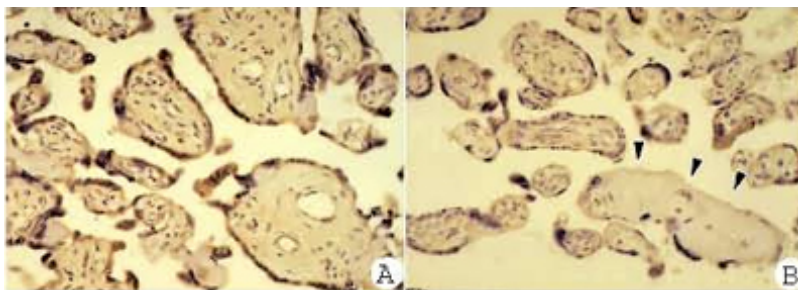


图2 ADM蛋白在正常孕妇和子痫前期孕妇合体滋养层的免疫组化染色

Fig.2 Immunohistochemical staining of adrenomedullin in (A) syncytiotrophoblast from normotensive pregnant women (+++) and (B) syncytiotrophoblast from women pre-eclamptic pregnancy (+)

3 讨论

Adrenomedullin (ADM) 这种强效舒血管多肽在调节胎盘形成和母体血流对胎盘的血液供应起着至关重要的作用，同时对细胞的生长和分化以及血管生成来说，ADM也必不可少[1][2][3][4]。因此，ADM基因表达的变化往往与多种异常妊娠有关。子痫前期是一种最常见妊娠并发症，也是导致孕产妇和围产儿死亡的重要原因[5]。越来越多的研究表明 ADM基因及其信号通路的改变对子痫前期的发生发展十分关键，然而前者究竟如何影响且在何种程度上影响后者却备受争议。

我们通过比较7例正常产妇和10例子痫前期产妇胎盘组织ADM基因mRNA及ADM蛋白的水平，发现ADM基因在子痫前期孕妇胎盘组织中的表达却是明显降低，这也与大多数文献的报道相一致[6][7][8]。ADM基因表达的降低可通过多种途径诱发并促进子痫前期的发生和发展。在胚胎发育的早期，由于ADM的缺乏导致胚胎的着床及植入过浅，同时胚胎的分裂和分化以及新生血管的形成都受到抑制；随着妊娠的继续，ADM的缺乏还会引发孕妇血压的升高及胚胎组织内大小动脉的收缩，后者的发生严重影响了胎盘的血液供应甚至胎儿生长受限。

至于有关子痫前期孕妇胎盘及血循环中ADM的量正常甚至升高的报道，有作者认为是由于为了对抗子痫前期孕妇体内升高的endothelin-1 (ET-1) (一种强有效的血管舒张抑制剂) 而使得体内ADM基因的表达代偿性升高[9][10]。为验证这一设想，必须有实验可以区分游离、与载体蛋白结合以及总ADM的水平，因为这三者中只有与载体蛋白相结合的ADM才具有生物学活性，而相关的研究亦是我们下一步的工作计划。

ADM受体CRLR和RAMP2在子痫前期孕妇胎盘组织的表达也明显降低[11]，但与ADM基因的表达一样，目前所有有关该传导通路的研究，主要集中于该通路中各基因表达水平的检测。虽然目前ADM基因传导通路的改变与子痫前期发生的相关性已经非常明确，但其致子痫前期的分子病理机制有待阐明。无论如何，ADM基因传导通路相关蛋白的激动剂及拮抗剂的研究将为子痫前期的预防和治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1]Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery [J]? *Pol J Pharmacol*, 2004, 56(1): 5-27.
- [2]Wilson C, Nikitenko LL, Sargent IL, et al. Adrenomedullin: multiple functions in human pregnancy[J]. *Angiogenesis*, 2004, 7(3): 203-12.
- [3]Di Iorio R, Marinoni E, Letizia C, et al. Adrenomedullin in perinatal medicine[J]. *Regul Pept*, 2003, 112(1-3): 103-13.
- [4]Garayoa M, Bodegas E, Cuttitta F, et al. Adrenomedullin in mammalian embryogenesis[J]. *Microsc Res Tech*, 2002, 57(1): 40-54.
- [5]Farag K, Hassan I, Ledger WL. Prediction of preeclampsia: can it be achieved[J]? *Obstet Gynecol Surv*, 2004, 59(6): 464-82.
- [6]de Swiet M. Maternal mortality: confidential enquiries into maternal deaths in the United Kingdom[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 182(4): 760-6.
- [7]Li H, Dakour J, Kaufman S, et al. Adrenomedullin is decreased in preeclampsia because of failed response to epidermal growth factor and impaired syncytialization[J]. *Hypertension*, 2003, 42(5): 895-900.
- [8]Knerr I, Dachert C, Beinder E, et al. Adrenomedullin, calcitonin gene-related peptide and their receptors: evidence for a decreased placental mRNA content in preeclampsia and HELLP syndrome[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002, 101(1): 47-53.
- [9]Kohno M, Kano H, Horio T, et al. Inhibition of endothelin production by adrenomedullin in vascular smooth muscle cells[J]. *Hypertension*, 1995, 25(6): 1185-90.
- [10]Marinoni E, Picca A, Scucchi L, et al. Immunohistochemical localization of endothelin-1 in placenta and fetal membranes in term and preterm human pregnancy[J]. *Am J Reprod Immunol*, 1995, 34(4): 213-8.
- [11]Makino Y, Shibata K, Makino I, et al. Alteration of the adrenomedullin receptor components gene expression associated with the blood pressure in pregnancy-induced hypertension[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(10): 5079-82.