

GATAD1 在子痫前期中的表达及其意义

马小玲,刘锦辉,程文俊*

(南京医科大学第一附属医院妇产科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究 GATAD1 在子痫前期患者胎盘组织中的表达及其意义。方法:29 例由美国 Mayo Clinic 妇产科临床医师收集的胎盘组织,其中早孕正常胎盘 8 例(分娩孕周为 7~12 周,平均为 10.2 周),晚孕正常胎盘 14 例(分娩孕周为 35~41 周,平均为 39.5 周),晚孕子痫前期胎盘 7 例(分娩孕周为 31~41 周,平均为 34.6 周)。采用 RT-PCR 技术、蛋白印迹(Western blot)法和免疫组化检测 3 组孕妇胎盘组织中 GATAD1 的 mRNA 与蛋白表达水平差异。结果:晚孕正常胎盘组织中 GATAD1 的 mRNA 与蛋白表达水平均显著高于早孕正常胎盘组织。子痫前期组患者胎盘组织中 GATAD1 的 mRNA 与蛋白表达水平均显著低于相应孕周正常妊娠组。结论:GATAD1 表达的下降与子痫前期的发病相关。

[关键词] 子痫前期;syncytin-1;GATAD1;合体滋养层细胞

[中图分类号] R714.245

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)12-1622-03

doi: 10.7655/NYDXBNS20171221

近期的研究报导遗传因素、免疫、血管内皮损伤等可能是子痫前期的致病原因^[1],但其发病机制,尤其是子痫前期发生发展过程中的细胞及分子机制仍不清楚。近年来许多研究发现 syncytin-1 在子痫前期胎盘中的表达下调^[2]。但 syncytin 基因的邻近基因,GATAD1 在子痫前期胎盘中的表达尚未见有报道。本研究对 GATAD1 mRNA 及蛋白水平进行了检测,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 29 例由美国 Mayo Clinic 妇产科临床医师收集的胎盘组织,其中早孕正常胎盘 8 例(分娩孕周为 7~12 周,平均为 11.2 周),晚孕正常胎盘 14 例(分娩孕周为 35~41 周,平均为 39.5 周),晚孕子痫前期胎盘 7 例(分娩孕周为 31~41 周,平均为 34.6 周)。早孕正常胎盘来自于合法的人工流产,晚孕胎盘来自于剖宫产。子痫前期的诊断以美国妇产科协会(ACOG)推荐的指南为标准,并且排除了患者严重的并发症及怀有畸形胎儿的母体胎盘。胎盘娩出后剪取母体面的胎盘组织,分成数份,并小心地去除胎盘表面蜕膜组织。将组织置于预冷的磷酸盐缓冲液中反复漂洗,尽量除去血液。部分组织在液氮中保存 2~24 h 后,转移至-80℃保存,这部分组织用

来提取 DNA、RNA 及蛋白。另外一部分组织用 4% 的多聚甲醛固定,并用石蜡包埋,后制作石蜡切片进行免疫组化实验。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 技术检测胎盘组织中 GATAD1 mRNA 的表达

目的基因 GATAD1 上游引物 5'-CGGGGGCGG CAAGCAGAGTAA-3',下游引物 3'-TTTCAGCAGCC GGAGCAGATTTGT-5'。内参照 β 肌动蛋白(β -actin)引物序列,上游 5'-CGCGAGAAGATGACCCAGAT-3',下游 3'-ACAGCCTGGATAGCAACGTA-3'。

总 RNA 提取及逆转录严格按照说明书进行。在由总 RNA 逆转录为 cDNA 后,进行 PCR 扩增,PCR 的终反应体积为 20 μ L,反应条件为:94℃预变性 3 min,94℃变性 30 s,61℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,35 个循环。最后 72℃延伸 5 min。取 PCR 产物 5 μ L,加入溴酚蓝 2 μ L,在 1%琼脂糖凝胶电泳上电泳,紫外线凝胶成像系统检测,图片采集。测定每个样本 GATAD1 与内参照 β -actin 的 PCR 扩增产物的吸光度值,以两者的比值作为待测样本 mRNA 表达水平。

1.2.2 蛋白印迹方法检测胎盘组织中 GATAD1 蛋白的表达

按蛋白裂解液说明书抽提、浓缩得到蛋白样本,蛋白样本电泳后,转到蛋白转印膜上,加入 BSA 封闭液,室温下孵育 2 h,加入 GATAD1 多克隆抗体 TBST 稀释至 1:500 (Bioss 公司,美国),4℃封闭过

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81472442)

* 通信作者 (Corresponding author),E-mail:wenjuncheng-doc@163.com

夜。弃一抗, TBST 洗 3 遍。加入 1:1 000 的二抗(羊抗兔), 室温孵育 2 h 后, 弃去二抗, TBST 洗涤 3 遍, 增强化学荧光发光法(ECL)显影, 曝光。结果以灰度扫描, 并进行定量分析。

1.2.3 免疫组化检测胎盘组织中 GATAD1 蛋白的表达

大体步骤为: 固定, 包埋, 切片, 脱蜡, 抗原修复, 封闭抗原 30 min, 加抗 GATAD1 抗体过夜(鼠抗人 1:300, Bioss 公司, 美国), 加酶标二抗 30 min(羊抗兔 IgG, 1:400), 滴加 DAB 染色, 苏木素染色, 分化, 梯度脱水, 封片显微镜下读片。胎盘标本做阴性对照, 一抗用 PBS 代替。阳性结果表现为核内出现棕黄色颗粒。

1.3 统计学方法

数据使用 SPSS 17.0 处理, 各测定值以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 统计分析使用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测 GATAD1 mRNA 表达水平

早孕组、晚孕组、子痫前期组胎盘组织中均可检测到 GATAD1 mRNA 的表达, 但晚孕组 GATAD1 mRNA 表达水平显著高于正常妊娠组, 且差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图 1)。而与晚孕组相比, 子痫前期组的 GATAD1 mRNA 表达水平明显下降, 差异具有统计学意义($P < 0.01$, 图 1)。

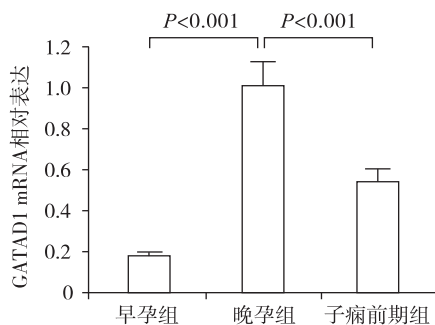


图 1 RT-PCR 检测 3 组组织中 GATAD1 mRNA 表达水平

2.2 Western blot 和免疫组化法检测 GATAD1 蛋白表达水平

晚孕组 GATAD1 蛋白表达水平显著高于正常妊娠组; 而与晚孕组相比, 子痫前期组的 GATAD1 蛋白表达水平明显下降($P < 0.001$, 图 2)。

免疫组化检测 3 组胎盘组织中 GATAD1 蛋白表达情况, 结果与 Western blot 一致, 晚孕组 GATAD1 蛋白表达高于早孕组和子痫前期组, 且 GATAD1 主要表达于合体滋养层细胞的胞浆中(图 3)。

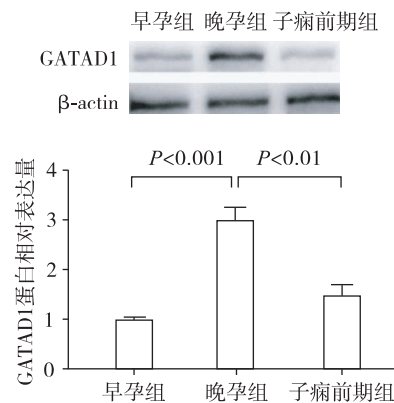


图 2 Western blot 检测 GATAD1 蛋白在 3 组胎盘组织中的表达情况

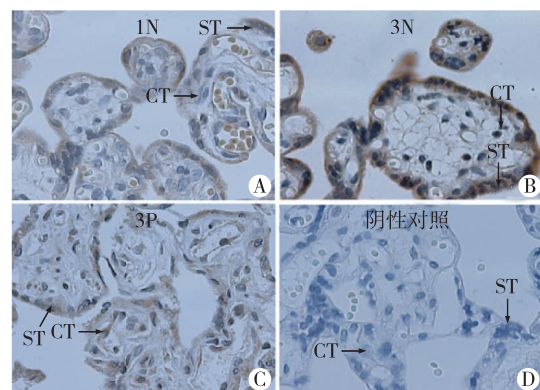


图 3 免疫组织化学法检测 GATAD1 蛋白表达水平($\times 400$)
A: 早孕组; B: 晚孕组; C: 子痫前期组; D: 阴性对照组。CT: 细胞滋养细胞; ST: 合体滋养细胞。阳性表达为棕黄色, 棕黄色区域越大、颜色越深表示阳性表达越多、表达越强烈。

3 讨论

膜糖蛋白 Syncytin-1 是人内源性逆转录缺陷病毒(HERV)的产物, 近年来的研究发现, syncytin-1 能够介导细胞滋养层细胞融合成多核的合体滋养细胞^[3], 而在子痫前期胎盘中, syncytin-1 的表达水平降低, 合体滋养细胞层的结构和功能也有一定的缺失^[4], 提示 syncytin-1 的表达与保持胎盘结构的完整性有一定的关系。通过检测多种正常人体组织中 syncytin-1 的表达, 发现 syncytin-1 只有在胎盘中具有特异性的高表达, 在人类睾丸和胎儿的肝脾细胞中有较弱的表达, 而在其他组织或器官中未发现明显的表达, 因此, 可以说 syncytin-1 是胎盘特异性表达蛋白^[5]。研究表明, syncytin-1 不仅仅具有促进细胞滋养细胞融合的作用, 其还具有某些非融合作用, 包括调节滋养层细胞增殖和凋亡^[6], 以及抑制母体对作为同种半异体移植物的胎儿的免疫反应^[7]。有人用绒癌细胞系 BeWo 细胞作为胎盘的体外实验对象来研究 syncytin-1 的表达及其与

细胞周期的关系,发现缺乏 syncytin-1 的表达可能减弱胎盘滋养层细胞 G1/S 期的过渡,从而影响细胞的增殖^[6]。因此在子痫前期胎盘中 syncytin-1 的低表达可能导致不断消耗的细胞滋养细胞“池”得不到补充,使得没有足够的细胞滋养细胞来融合形成合体滋养细胞,从而影响合体滋养细胞层的修复或更替。所以 syncytin-1 的融合和非融合作用可能与子痫前期的病理改变有着密切的关系。Syncytin-1 基因定位在染色体 7q21.2, GATAD1 直接位于 syncytin-1 基因的下游^[8]。在子痫前期胎盘中, syncytin-1 的邻近基因 GATAD1 是否也存在表达水平的改变。

GATAD1 也被称作 ODAG (ocular development-associated gene,因其参与了小鼠的眼的生长发育)^[9]。GATAD1 不同的表达于各种类型的组织^[10], GATAD1 通过 N-端的锌指结构域与 DNA 结合,可能与组蛋白 H3K4me3 相互作用,作为转录因子调控基因的转录^[11]。目前的研究表明,转录因子可以调控不同的靶基因的表达,一些转录因子在细胞周期和凋亡过程中也起重要作用。例如,Rel/NF- κ B 转录因子在控制细胞凋亡过程中起着重要作用^[12]。目前未发现任何关于 GATAD1 在胎盘滋养层细胞中表达和功能的研究报道。有研究报导,通过增加细胞凋亡、破坏细胞增殖使胎盘滋养层缺陷,可能与在子痫前期胎盘中经常发现的合体滋养细胞层退化有关^[13]。本研究中,发现 GATAD1 表达于控胎盘相关基因的表达与功能活动。此外,本研究还发现,随着胎盘越来越成熟,GATAD1 的表达水平升高;而与正常的胎盘相比,子痫前期胎盘中 GATAD1 的表达降低。这表明在人类胎盘的生理病理发展过程中,GATAD1 可能起重要作用。本研究证实 GATAD1 表达于滋养层细胞中。由于具有 DNA 结合能力,GATAD1 可能作为转录因子参与了调控胎盘相关基因的表达与功能活动。

[参考文献]

- [1] Ma Y, Lin H, Zhang H, et al., Identification of potential crucial genes associated with early-onset pre-eclampsia via a microarray analysis [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2017, 43(5): 812-819
- [2] Lee X, Keith JC, Stumm N, et al. Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia[J]. *Placenta*, 2001, 22(10): 808-812
- [3] Cornelis G, Vernochet C, Carradec Q, et al. Retroviral envelope gene captures and syncytin exaptation for placentation in marsupials[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(5): E487-496
- [4] Priscakova P, Konkolova J, Petrovic R, et al., ERVW-1 gene polymorphisms related to preeclampsia[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2016, 117(6): 340-344
- [5] Zhuang XW, Li J, Brost BC, et al. Decreased expression and altered methylation of syncytin-1 gene in human placentas associated with preeclampsia[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(11): 1796-1802
- [6] Chen B, Longtine MS, Costa ML, et al., Punicalagin promotes human villous trophoblast differentiation [J]. *Placenta*, 2016, 44(1): 80-82
- [7] Nakaya Y, Miyazawa T. The roles of syncytin-like proteins in ruminant placentation. *Viruses*, 2015, 7(6): 2928-2942
- [8] Li F, Karlsson H. Expression and regulation of human endogenous retrovirus element[J]. *AMPIS*, 2016, 124(1-2): 52-66
- [9] Tsuruga T, Kanamoto T, Kato T, et al. Ocular development-associated gene (ODAG), a novel gene highly expressed in ocular development [J]. *Gene*, 2002, 290(1-2): 125-130
- [10] Theis JL, Sharpe KM, Matsumoto ME, et al. Homozygosity mapping and exome sequencing reveal GATAD1 mutation in autosomal recessive dilated cardiomyopathy [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2011, 4(6): 585-594
- [11] Chambers M, Turki-Judeh W, Kim MW, et al., Mechanisms of Groucho-mediated repression revealed by genome-wide analysis of Groucho binding and activity[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 215
- [12] Li K, Yang W, Li Z, et al. Bitter apricot essential oil induces apoptosis of human HaCaT keratinocytes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34(2): 189-198
- [13] Naicker T, Dorsamy E, Ramsuran D, et al. The role of apoptosis on trophoblast cell invasion in the placental bed of normotensive and preeclamptic pregnancies [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2013, 32(3): 245-256

[收稿日期] 2017-05-07