

· 临床研究 ·

妊娠期糖尿病患者胎盘 PGC-1 α 和 PDX1 表达水平及甲基化状态与胎儿血糖水平的相关性

陈 超¹, 施莉英¹, 龚明霞^{2*}¹江苏大学附属武进医院妇产科, 江苏 常州 213000; ²张家港市妇幼保健院妇科, 江苏 张家港 215600

[摘要] 目的:探讨妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)对胎盘中 PGC-1 α 和 PDX1 表达水平及甲基化状态的影响,以及与胎儿血糖的相关性。方法:收集 30 例 GDM 孕妇的新生儿出生体重、胎盘重量等数据,同时收集 30 例无妊娠并发症和脐带异常的足月新生儿相应数据作为对照组。在分娩后立即从胎盘滋养层组织收集样品,使用亚硫酸氢钠测序法定量检测 PGC-1 α 和 PDX1 基因的 DNA 甲基化水平,逆转录定量 PCR 测量 PGC-1 α 和 PDX1 mRNA 水平。同时,测定胎盘组织的胰岛素、血糖和糖化血红蛋白(HbA1c)水平。结果:GDM 组胎儿出生体重和胎盘重量均显著高于对照组($P < 0.05$)。GDM 组胎盘组织胰岛素、HbA1c 和血糖水平显著高于对照组($P < 0.01$)。脐带血胰岛素水平与新生儿出生体重、胎盘重量、血糖和 HbA1c 呈正相关(r 值分别为 0.648、0.795、0.862、0.927, P 均 < 0.001)。与对照组比较, GDM 组中 PGC-1 α 和 PDX1 mRNA 的水平较低, PGC-1 α 基因甲基化水平较高($P < 0.05$)。胎盘组织中血糖水平与 PGC-1 α 和 PDX1 mRNA 的表达呈负相关($r = -0.438$, $P = 0.002$; $r = -0.373$, $P = 0.007$)。结论:GDM 孕妇 PGC-1 α 基因表观遗传修饰的变化可能是其后代糖代谢异常的原因之一。

[关键词] 妊娠期糖尿病;表观遗传学;PGC-1 α ;PDX1**[中图分类号]** R714.256**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)01-072-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200114

Correlation between expression levels and methylation status in placental tissues of PGC-1 α and PDX1 and fetal blood glucose in patients with gestational diabetes mellitus

CHEN Chao¹, SHI Liying¹, GONG Mingxia^{2*}¹Department of Obstetrics and Gynecology, Wujin Hospital Affiliated to Jiangsu University, Changzhou 213000;²Department of Gynecology, Zhangjiagang Maternal and Child Health Hospital, Zhangjiagang 215600, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of gestational diabetes mellitus (GDM) on the expression and methylation status of PGC-1 α and PDX1 in placenta, and to explore the correlation between PGC-1 α , PDX1 and fetal blood glucose. **Methods:** The birth weight and placental weight of 30 pregnant women with GDM were collected. The corresponding data of 30 full-term neonates without pregnancy complications and umbilical cord abnormalities were collected as control group. DNA and RNA were isolated from placental trophoblast tissue immediately after delivery. The DNA methylation levels of the PGC-1 α and PDX1 genes were quantitatively detected using sodium bisulfite sequencing. PGC-1 α and PDX1 mRNA levels were measured by reverse transcription quantitative PCR (qRT-PCR). At the same time, placental insulin, blood glucose and HbA1c levels were detected. **Results:** Fetal birth weight and placental weight were significantly higher in the GDM group than those in the control group ($P < 0.05$). Insulin, HbA1c and blood glucose levels were significantly higher in the GDM group than those in the control group ($P < 0.01$). Cord blood insulin levels were positively correlated with birth weight ($r = 0.648$, $P < 0.001$), placental weight ($r = 0.795$, $P < 0.001$), blood glucose ($r = 0.862$, $P < 0.001$), and HbA1c ($r = 0.927$, $P < 0.001$). The levels of PGC-1 α and PDX1 mRNA were lower in the GDM group compared with the control group, and the PGC-1 α gene methylation level was higher in the GDM group than that in the control group ($P < 0.05$). There was a negative correlation between blood glucose and mRNA expression of PGC-1 α ($r = -0.438$, $P = 0.002$) and PDX1 ($r = -0.373$, $P = 0.007$) in the placenta. **Conclusion:** The changes of epigenetic modification of PGC-1 α gene in pregnant women with GDM may be one

[基金项目] 江苏省妇幼保健科研课题(F201326)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 2163582353@qq.com

of the causes of abnormal glucose metabolism in their offspring.

[Key words] gestational diabetes mellitus; epigenetic; PGC-1 α ; PDX1

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(01): 072-076]

妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)是指既往没有糖尿病的女性在妊娠期间发生高血糖。研究表明,母体GDM可能与胎盘基因调控的改变有关,并且可能存在表观遗传机制^[1-2]。由于营养不平衡和母体糖尿病/肥胖导致的表观遗传变化可能导致后代发生代谢性疾病,从而将不良的环境暴露传递给下一代^[3],但潜在的分子机制尚未确定。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ -共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ -coactivator 1 α , PGC-1 α)是转录共激活因子,有研究表明PGC-1 α 遗传变异与糖尿病及胰岛素抵抗的发生相关^[4],但很少有研究报道GDM与PGC-1 α 甲基化状态之间的关系。

胰腺和十二指肠同源框1(pancreatic and duodenal homeobox 1, PDX1)是特异性转录因子,可以调节胰腺的生长、发育以及 β 细胞特异性基因的表达。人和动物模型中的研究表明,遗传和获得性PDX1的表达衰退可导致糖尿病和 β 细胞功能障碍^[5-7],但PDX1是否参与GDM发生以及其潜在的代谢和分子机制尚不清楚。

胎盘作为母胎之间的桥梁,具有多种功能,在GDM的发展和进展中具有重要作用。但是PDX1和PGC-1 α 在GDM胎盘中的表达和甲基化状态尚不清楚。因此,本研究旨在探讨PDX1和PGC-1 α 在胎盘中的表达及其甲基化状态,评估GDM胎盘中的血糖和胰岛素水平,以确定它们与胎盘中PGC-1 α /PDX1表达或甲基化的关联。

1 对象和方法

1.1 对象

于2017年2—11月在江苏大学附属武进医院妇产科收集60例足月新生儿的出生体重、胎盘重量等临床数据。其中对照组30例,为无高血压、糖尿病和心脏病等妊娠相关并发症孕妇的新生儿;实验组30例,为GDM孕妇的新生儿。GDM的诊断符合我国2014年妊娠期糖尿病诊治指南^[8],即在妊娠24~28周以及28周后首次就诊时行75 g口服葡萄糖耐量试验(oral glucose tolerance test, OGTT),服糖前及服糖后1、2 h血糖分别有1项达到或超过5.1、

10.0、8.5 mmol/L(92、180、153 mg/dL)则被诊断为GDM。本研究经医院伦理委员会批准,新生儿家属签署书面知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 标本收集

在产妇分娩后立即对胎儿进行准确称重,新鲜胎盘组织称重,同时取约1 cm \times 1 cm \times 1 cm的滋养层组织(在无菌条件下从脐带附着到胎盘另一侧的中央区域),放入用焦磷酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)处理的低温管,液氮速冻后储存于-70 $^{\circ}$ C的冰箱。取10 mL脐静脉血并立即送至实验室,静置10 min后,以3 000 r/min离心10 min,收集上清液并储存在-30 $^{\circ}$ C的冰箱中。

1.2.2 生化指标检测

用放射免疫法检测胰岛素水平,使用日立7600-110自动生化分析仪采用葡萄糖氧化酶法测定血糖水平,使用日本TOSOHHL-723G7自动糖基化血红蛋白分析仪通过琼脂糖凝胶电泳检测糖化血红蛋白(HbA1c)。试剂由北京利德曼公司提供。

1.2.3 DNA甲基化分析

随机选择每组样品,通过基因组DNA直接测序确定PGC-1 α 和PDX1的甲基化水平。根据DNA提取试剂盒(GK0122,上海捷瑞公司)说明,从2 mL抗凝脐带血中提取基因组DNA。通过电泳和紫外分光光度计定性和定量检查DNA,储存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中。严格按照试剂盒提供的说明书(Qiagen公司,德国)进行DNA亚硫酸氢盐修饰处理。PCR扩增时使用PGC-1 α 的特异性引物(正向:5'-GGGTATTAGG-GTTGGAATTTAATGT-3';反向5'-CTTCCTTCTAAT-TATTTCCATTTCTCTCA-3',片段长度为265 bp)和PDX1的特异性引物(正向:5'-GGCACAGCGGAGC-CTAT-3';反向:5'-GCCACCC-CTGCAGCTT-3',片段长度为354 bp)。扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,40 $^{\circ}$ C 40 s,40个循环。PCR反应体系(GK8015,上海捷瑞公司)由2 μ L模板DNA(1 ng/ μ L),1 μ L正向引物,1 μ L反向引物,25 μ L 2 \times PCR混合物和50 μ L水组成。20 μ L该混合物用于反应。切下靶片段并用于连接。将pTG19-T(GV6021,上海捷瑞公司)用作载体并在活化的

XL10-Gold感受态细胞(Zymo Research公司,美国)中转化。将阳性菌落送至上海捷瑞生物技术公司进行测序,并使用BIQ分析仪软件(XL3730, Applied Biosystems公司,美国)分析甲基化数据。

1.2.4 相对表达分析

实时定量PCR用于检测胎盘中PGC-1 α 和PDX1 mRNA的相对表达。根据RNA提取试剂盒(GK3006,上海捷瑞公司)说明提取总RNA,使用2 μ g总RNA作为逆转录的模板。实时定量PCR仪器(ABI7500, Applied Biosystems公司,美国)用于相对定量分析。PGC-1 α 引物(正向:5'-CTACAATGAATGCAGCGGTCTT-3';反向:5'-TGCTCCATGAATTCCTCGGTCTT-3'),PDX1引物(正向:5'-GGNCTGGCTTCTTAAGGC-3';反向:5'-TATGGTTTAGTNCGACTCT-3')和内部参考基因GAPDH引物(正向:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3';反向:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3')由美国Invitrogen公司合成。在37 $^{\circ}$ C条件下向15 μ L逆转录反应系统中加入1 μ L RNA进行实时PCR。PCR扩增反应系统由10 μ L SYBR Premix Ex TapTM(2份)(Q112-02,南京诺唯赞公司),2 μ L cDNA,1 μ L正向和反向引物和6 μ L去离子水组成。PDX1扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共40个循环。PGC-1 α 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 34 s,9 $^{\circ}$ C,共40个循环。2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算目的基因的相对表达。所有实验均独立重复3次。

1.3 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件进行分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组独立样本比较采用 t 检验,变量之间的相关性分析采用Pearson线性相关。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

两组产妇的年龄和孕周差异无统计学意义($P > 0.05$)。GDM组体重指数(body mass index,

BMI)显著高于对照组[(24.02 \pm 1.21) kg/m² vs. (22.31 \pm 1.37) kg/m², $t=4.62$, $P < 0.001$]。所有新生儿都足月。GDM组新生儿出生体重和产妇胎盘重量均显著高于对照组($P < 0.05$,表1)。

2.2 GDM对胎儿糖代谢的影响

GDM组脐血胰岛素、血糖和HbA1c水平显著高于对照组($P < 0.001$,表1)。相关性分析结果显示,脐血胰岛素水平与新生儿出生体重、胎盘重量呈正相关(r 值分别为0.648、0.795, P 均 <0.001 ,图1A、B),随着脐带血胰岛素水平的增加,新生儿出生体重和产妇的胎盘重量增加。脐带血胰岛素水平与血糖和HbA1c亦呈正相关(r 值分别为0.862、0.927, P 均 <0.001 ,图1C、D)。

2.3 胎盘中PGC-1 α 和PDX1的表达和甲基化水平

GDM组PGC-1 α 和PDX1在胎盘组织中的表达显著低于对照组($P < 0.05$,表2)。与对照组比较,GDM组中PGC-1 α 的甲基化频率更高,差异有统计学意义($P=0.037$),PDX1的甲基化频率略微增加,但差异无统计学意义($P=0.085$,表2)。胎盘组织的血糖水平与PGC-1 α 和PDX1的表达呈负相关(r 值为-0.438和-0.373, P 值为0.002和0.007,图2),表明随着脐带血血糖水平升高,胎盘中PGC-1 α 和PDX1 mRNA下调。

3 讨论

GDM对胎儿的影响越来越受到关注。动物实验表明,宫内妊娠高血糖不仅导致胎鼠胰腺功能障碍,而且在成年期也会导致葡萄糖耐量降低和胰岛素抵抗^[9]。Bush等^[10]发现母亲妊娠期血糖水平升高会降低后代的胰岛素敏感性。胎盘是胎儿和母亲之间的重要桥梁,可以为胎儿提供营养,在胎儿的生长发育中起着重要作用,同时也可以诱导儿童及其母亲的多种疾病^[11]。本研究发现GDM组产妇的BMI显著高于对照组,提示肥胖的孕妇可能对GDM易感。GDM组的新生儿出生体重、胎盘重量和脐带血胰岛素以及HbA1c和血糖均高于对照组,提示宫

表1 两组新生儿及血糖相关资料比较

Table 1 Comparison of neonates and data related to blood glucose between two groups

($\bar{x} \pm s$)

指标	对照组($n=30$)	GDM组($n=30$)	t 值	P 值
出生体重(g)	3 314.46 \pm 463.35	3 678.00 \pm 458.82	-2.11	0.043
胎盘重量(g)	527.00 \pm 16.28	632.00 \pm 13.17	-17.54	<0.001
脐血胰岛素水平(mU/L)	8.27 \pm 0.72	10.92 \pm 0.97	-9.06	<0.001
脐血HbA1c(%)	5.90 \pm 0.42	7.71 \pm 0.75	-8.76	<0.001
脐血血糖(mmol/L)	3.86 \pm 0.62	4.86 \pm 0.51	-7.93	<0.001

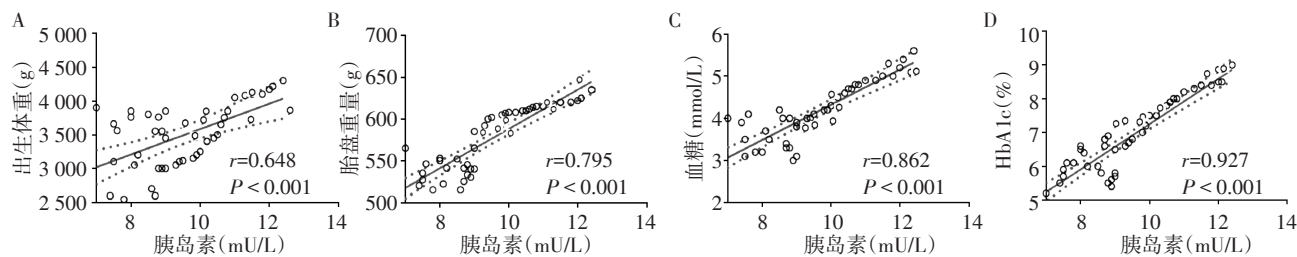


图1 脐血胰岛素与新生儿出生体重(A)、产妇胎盘重量(B)、血糖(C)及HbA1c(D)的相关性分析
Figure 1 Correlation between cord blood insulin and neonatal birth weight (A), placental weight (B), blood glucose (C), and HbA1c(D)

表2 两组PGC-1 α 和PDX1中甲基化频率和相对基因表达的比较

组别	mRNA 表达		甲基化频率(%)	
	PGC-1 α	PDX1	PGC-1 α	PDX1
对照组	1.21 \pm 0.14	1.08 \pm 0.32	10.10 \pm 1.23	0.95 \pm 0.42
GDM组	0.76 \pm 0.18	0.83 \pm 0.28	19.30 \pm 2.68	2.26 \pm 1.07
t值	4.57	2.86	-2.21	1.74
P值	<0.001	0.008	0.037	0.085

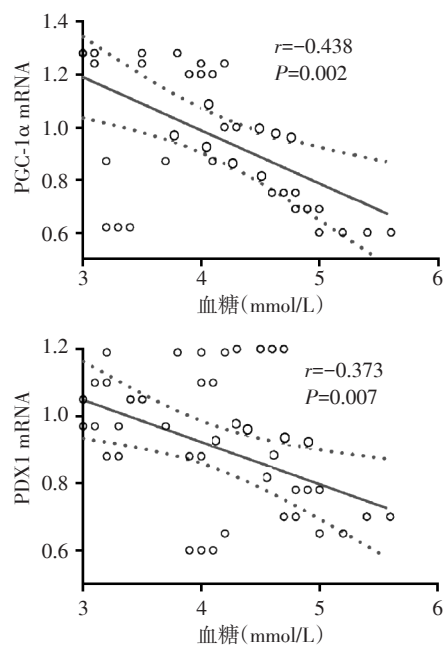


图2 血糖水平与PGC-1 α 和PDX1 mRNA的相关性分析
Figure 2 Correlation analysis between glucose levels and PGC-1 α or PDX1 mRNA

内高血糖可能引起胎儿葡萄糖代谢紊乱。HbA1c和血糖水平与胰岛素水平呈正相关,新生儿出生体重和胎盘重量随胰岛素水平成比例增加,提示孕妇血糖和胰岛素水平对胎儿的发育有一定影响。

PGC-1 α 是一种转录共激活因子,其基因位于染色体4p15.1上,由13个外显子组成。PGC-1 α 可以广泛调节能量产生和利用过程。PGC-1 α 基因启动子的DNA甲基化位点为-772 bp、-903 bp、-936 bp和-961 bp。PGC-1 α 在人胰岛分泌胰岛素的过程中发挥关键作用,并且其表达受遗传因子和表观遗传因子调节。研究表明,GDM可以影响胎盘和脐带血代谢相关基因的甲基化^[12]。与非糖尿病患者相比,糖尿病患者PGC-1 α mRNA的表达下降了90%^[13]。Ruchat等^[12]发现GDM患者胎盘和脐带血PGC-1 α 甲基化水平不一致,说明不同组织具有不同的表观遗传行为。本研究结果显示,GDM产妇足月胎盘PGC-1 α 基因呈高甲基化状态,并且PGC-1 α 基因表达与葡萄糖浓度呈负相关,提示PGC-1 α 基因的甲基化水平可能与葡萄糖代谢紊乱有关,并可能作为GDM的标志物。

PDX1基因位于人染色体13,13q12.1上,含有6284个碱基。PDX1的5'末端的近端启动子和外显子1的所有区域含有高度保守的CpG岛。成人糖尿病发病后近端启动子CpG岛的甲基化可导致PDX1表达的永久沉默,异常的宫内环境可导致调节 β 细胞发育的关键基因发生表观遗传变化,使得 β 细胞中的PDX1表达永久性降低^[14-15]。Wu等^[16]在怀孕大鼠中发现,高脂饮食可以降低糖耐量,引起胰岛素抵抗,降低胰腺PDX1基因的表达。本研究结果显示,妊娠高血糖对PDX1基因甲基化的影响不明显,这可能是由于样本量小,不足以评估两组之间的差异。相反,PDX1基因表达被高血糖下调,表明葡萄糖代谢紊乱和PDX1基因相关。因此,在GDM中PDX1甲基化可能不是关键机制,可能还有其他潜在的机制如组蛋白修饰,这需要进行进一步的研究。

综上所述,GDM通过诱导胎盘组织中的PGC-1 α 基因高甲基化,抑制其表达并最终导致后代葡萄糖代谢紊乱的风险增加。因此,PGC-1 α 基因甲基化可能是胎儿代谢性疾病的早期预测指标。

[参考文献]

- [1] REICHETZEDER C, DWI PUTRA S E, PFAB T, et al. Increased global placental DNA methylation levels are associated with gestational diabetes [J]. Clin Epigenetics, 2016, 8(1):82
- [2] 李伟, 胡宝春, 龚照, 等. 广东汉族妊娠期糖尿病妇女胎盘组织 microRNA 差异表达谱分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(3):298-302
- [3] EL HAJJ N, SCHNEIDER E, LEHNEN H, et al. Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment [J]. Reproduction, 2014, 148(6):R111-R120
- [4] ROWE G C, ARANY Z. Genetic models of PGC-1 and glucose metabolism and homeostasis [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2014, 15(1):21-29
- [5] RAFATI R, JALAL R, ASOODEH A, et al. Association of rs12255372(TCF7L2) and D76N(PDX-1) polymorphisms with type 2 diabetes in a population living in Northeast Iran[J]. Arch Iran Med, 2015, 18(6):376-378
- [6] SOLEIMANPOUR S A, FERRARI A M, RAUM J C, et al. Diabetes susceptibility genes Pdx1 and Clec16a function in a pathway regulating mitophagy in β -Cells[J]. Diabetes, 2015, 64(10):3475-3484
- [7] KIMMEL R A, DOBLER S, SCHMITNER N, et al. Diabetic pdx1-mutant zebrafish show conserved responses to nutrient overload and anti-glycemic treatment[J]. Sci Rep, 2015, 5:14241
- [8] 中华医学会妇产科学分会产科学组, 中华医学会围产医学分会妊娠合并糖尿病协作组. 妊娠合并糖尿病诊治指南(2014)[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(8):561-569
- [9] BORENGASSER S J, FASKE J, KANG P, et al. In utero exposure to prepregnancy maternal obesity and postweaning high-fat diet impair regulators of mitochondrial dynamics in rat placenta and offspring [J]. Physiol Genomics, 2014, 46(23):841-850
- [10] BUSH N C, CHANDLER-LANEY P C, ROUSE D J, et al. Higher maternal gestational glucose concentration is associated with lower offspring insulin sensitivity and altered β -cell function [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(5):E803-E809
- [11] GUTTMACHER A E, MADDOX Y T, SPONG C Y. The human placenta project: placental structure, development, and function in real time [J]. Placenta, 2014, 35(5):303-304
- [12] RUCHAT S M, HOUE A A, VOISIN G, et al. Gestational diabetes mellitus epigenetically affects genes predominantly involved in metabolic diseases [J]. Epigenetics, 2013, 8(9):935-943
- [13] MENSINK M, HESSELINK M K, RUSSELL A P, et al. Improved skeletal muscle oxidative enzyme activity and restoration of PGC-1 α and PPAR β / δ gene expression upon rosiglitazone treatment in obese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Int J Obes, 2007, 31(8):1302-1310
- [14] YANG B T, DAYEH T A, VOLKOV P A, et al. Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes [J]. Mol Endocrinol, 2012, 26(7):1203-1212
- [15] ABUZGAIA A M, HARDY D B, ARANY E. Regulation of postnatal pancreatic Pdx1 and downstream target genes after gestational exposure to protein restriction in rats [J]. Reproduction, 2015, 149(3):293-303
- [16] WU H, LIU Y, WANG H, et al. High-fat diet induced insulin resistance in pregnant rats through pancreatic pax6 signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):5196-5202

[收稿日期] 2018-12-06



欢迎关注本刊微博、微信公众号!