

胎盘绒毛跨膜蛋白 CD81、Ang 与复发性流产女性早孕期复发流产的关系

张晓英¹,董小敏²,赵盼盼¹,于芳²

(咸阳市中心医院,1.产科;2.检验科,陕西 咸阳 712000)

【摘要】目的:探究胎盘绒毛跨膜蛋白 CD81、血管生成素(Ang)与复发性流产(RSA)女性早孕期复发流产的关系。**方法:**选择126例RSA患者为研究对象(RSA组),另选取94例正常早孕行人工流产术者为对照组。采用RT-qPCR、Western blot法检测胎盘绒毛组织 CD81、Ang-1、Ang-2 mRNA及蛋白表达水平,采用电化学发光法检测血清人绒毛膜促性腺激素(HCG)水平,计算Ang-1/Ang-2 mRNA及蛋白比值,比较两组患者检测结果。**结果:**RSA组CD81、Ang-1、Ang-2的mRNA及蛋白表达和Ang-1/Ang-2 mRNA及蛋白表达比值均高于对照组,血清HCG水平低于对照组($P < 0.05$)。RSA组CD81 mRNA与Ang-1、Ang-2 mRNA呈正相关($P < 0.05$);RSA组CD81蛋白表达量与Ang-1、Ang-2蛋白表达量呈正相关($P < 0.05$),血清HCG水平与其他指标无相关性($P > 0.05$)。CD81、Ang-1/Ang-2的mRNA及蛋白和血清HCG均可用于预测RSA女性早孕期复发流产。**结论:**RSA女性早孕期复发流产与胎盘绒毛CD81、Ang-1、Ang-2 mRNA及蛋白表达量异常高表达有关,CD81、Ang-1、Ang-2可能影响胎盘血管形成而致流产。

【关键词】复发性流产;早孕期;胎盘绒毛;跨膜蛋白CD81;血管生成素;人绒毛膜促性腺激素

【中图分类号】R714.21 **【文献标志码】**A

Relationship between placental villi transmembrane protein CD81, Ang levels and recurrent abortion in early pregnancy of women with recurrent spontaneous abortion

ZHANG Xiao-ying¹, DONG Xiao-min², ZHAO Pan-pan¹, YU Fang²

(1. Department of Obstetrics; 2. Department of Laboratory Medicine, Xianyang Central Hospital, Xianyang 712000, Shaanxi, China)

【Abstract】Objective:To investigate the relationship between the levels of placental villi transmembrane protein CD81, angiopoietin (Ang) and recurrent abortion in early pregnancy of women with recurrent spontaneous abortion (RSA). **Methods:**126 patients with RSA (RSA group) and 94 subjects with normal early pregnancy (control group) were selected. The mRNA and protein expression levels of CD81, Ang-1 and Ang-2 in placental villi tissues were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction and Western blot, and levels of serum human chorionic gonadotropin (HCG) was detected by electrochemiluminescence method. The mRNA and protein expression ratios of Ang-1/Ang-2 were calculated, and the detection results were compared. **Results:**The mRNA and protein expression levels of CD81, Ang-1 and Ang-2 in placental villi, Ang-1/Ang-2 mRNA ratio and Ang-1/Ang-2 protein expression ratio in RSA group were higher than those in control group, while the level of serum HCG was lower than that in control group ($P < 0.05$). The CD81 mRNA in RSA group was positively correlated with the mRNA levels of Ang-1 and Ang-2 ($P < 0.05$). The protein expression of CD81 in RSA group was positively correlated with the protein expressions of Ang-1 and Ang-2 ($P < 0.05$), and serum HCG level was not correlated with the other indicators ($P > 0.05$). The mRNA and protein expression levels of CD81 and Ang-1/Ang-2 and serum HCG could be used to predict recurrent abortion in women with RSA during early pregnancy. **Conclusion:** Recurrent abortion in early pregnancy of women with RSA is related to abnormal high mRNA and protein expressions of CD81, Ang-1 and Ang-2 in placental villi. CD81, Ang-1 and Ang-2 may affect placental angiogenesis and then lead to abortion.

【Key words】Recurrent spontaneous abortion; Early pregnancy; Placental villi; Transmembrane protein CD81; Angiopoietin; Human chorionic gonadotropin

复发性流产 (recurrent spontaneous abortion, RSA)指育龄女性连续发生两次及以上的自然流

产^[1]。临床中 80% 以上的自然流产均出现在妊娠 12 周前,且随流产次数的增加 RSA 再发流产风险会持续上升,因此需重视 RSA 女性早孕期复发流产的发生^[2]。因胎盘绒毛正常的血管发育和血管新生是顺利妊娠的必要条件,故胎盘血管发育不良、内皮功能障碍与 RSA 的关系受到临床关注^[3-4]。CD81 为四次跨膜蛋白家族成员,已有研究^[5]证实 CD81 表达上调参与子痫的发生发展,但其与 RSA 的关系则缺少报道。血管生成素(angiotensin, Ang)/Tie2 体系是胚胎期血管发生过程中具有重要作用的血管形成信号转导通路,其成员中 Ang-1、Ang-2 被证实与不孕、子痫、RSA 等女性生殖相关疾病的发生、发展有关^[6-7]。此外,早孕期血人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)反映绒毛活性,可促进月经黄体生长发育为妊娠黄体,刺激妊娠黄体产生雌激素,确保妊娠过程完整^[8]。本研究旨在探讨胎盘绒毛跨膜蛋白 CD81、Ang 水平与 RSA 女性早孕期复发流产的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2019 年 6 月至 2022 年 6 月于咸阳市中心医院妇产科因 RSA 行清宫术的 126 例患者为研究对象(RSA 组);另选取同期 94 例正常早孕行人工流产术的患者为对照组。RSA 组纳入标准:存在 ≥ 2 次无诱因自然流产史,就诊时经超声确认胚胎停育^[9];孕周 < 12 周;拟行清宫术;20 ~ 40 岁;夫妇双方染色体核型检测均正常;对研究知情同意。纳入标准:(1)经超声检查显示胚胎发育正常;(2)孕周 < 12 周;(3)20 ~ 40 岁;(4)因非计划妊娠要求终止妊娠,行人工流产术;(5)有 ≥ 1 次正常妊娠史且无早产、死产等无不良孕产史;(6)对研究知情同意。排除标准:(1)生殖道感染或生殖器官畸形;(2)流产物染色体检查异常;(3)凝血异常;(4)合并恶性肿瘤;(5)合并免疫系统疾病;(6)合并糖尿病、甲状腺疾病等代谢性疾病;(7)有精神疾病史。本研究符合《赫尔辛基宣言》要求。

1.2 方法

1.2.1 资料收集与样本采集 由专人通过电子病历收集患者一般资料,包括年龄、孕周、孕次、体质指数(BMI)。于手术当日留取两组患者胎盘绒毛组织标本,分为两份保存至无菌冻存管中,液氮保存。于手术当日采集两组患者血液标本 2 mL,离心处理留取血清,保存至 -20 °C 冰箱待用。

1.2.2 胎盘绒毛中 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 检测 RT-qPCR 法检测。取胎盘绒毛组织,通过

TRIzol 法提取总 RNA,再通过 Prime Script RT reagent Kit 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,采用 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR 反应,引物序列:(1) CD81:上游 AGTACCTGCTCTTCGTCTTCA,下游 GAACATCATGACAGCGCCCA;(2) Ang-1:上游 TCCTGAGAGTACGACAGACCA,下游 TCTCCGACTTCATGTTTTCCAC;(3) Ang-2:上游 GATGGCAGCGTTGATTTTCA,下游 ACATGCATCAAACCACCAGC。反应条件:(1) CD81:95 °C 预变性 3 min,(94 °C 变性 30 s,64 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s)30 个循环,72 °C 延伸 10 min;(2) Ang-1:94 °C 预变性 3 min,(94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s)32 个循环,72 °C 延伸 10 min;(2) Ang-2:94 °C 预变性 3 min,(94 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 60 s)30 个循环,72 °C 延伸 10 min。取 PCR 反应产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,以 β -actin 基因为内参,2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算获得相应 mRNA 相对表达量。

1.2.3 CD81、Ang-1、Ang-2 的蛋白检测 Western blot 法检测。取胎盘绒毛组织加入蛋白酶裂解液提取蛋白,BCA 法测量总蛋白浓度,计算 50 μ g 蛋白上样量;取蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,2 h 后转至 PVDF 膜,PVDF 膜经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入 CD81、Ang-1、Ang-2 一抗,4 °C 孵育过夜;PVDA 膜经 Tris-HCl 缓冲盐溶液洗涤 3 次,10 min/次,加入封闭液稀释的 HRP 标记二抗(CD81 稀释 1:50 000,Ang-1/Ang-2 稀释 1:2 000),37 °C 摇床孵育 2 h,封闭液洗膜,ECL 显色照相并分析结果。

1.2.4 血清 HCG 检测 采用罗氏全自动电化学发光分析仪检测血清 HCG 水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行数据分析。计量资料用($\bar{x} \pm s$)形式描述,组间比较采用独立样本 t 检验;采用 Pearson 相关性分析各检测指标间的关系;绘制受试者工作特征曲线(ROC)评估各指标预测效能,曲线下面积(AUC)反映诊断价值。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般资料比较

两组患者的年龄、孕周、孕次及 BMI 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 两组患者胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 表达水平比较

RSA 组患者胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 表达水平及 Ang-1/Ang-2 mRNA 比值均高于对照组($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 两组患者一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	年龄(岁)	孕周(周)	孕次(次)	BMI(kg/m ²)
对照组(n=94)	30.32 ± 4.52	8.57 ± 1.88	2.67 ± 0.91	22.19 ± 2.12
RSA组(n=126)	31.59 ± 5.47	8.91 ± 1.42	2.91 ± 1.06	22.57 ± 2.24
t 值	1.832	1.528	1.807	1.273
P 值	0.068	0.128	0.072	0.204

表 2 两组患者胎盘绒毛中 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD81	Ang-1	Ang-2	Ang-1/Ang-2
对照组(n=94)	1.42 ± 0.16	0.84 ± 0.13	1.63 ± 0.11	0.52 ± 0.09
RSA组(n=126)	2.17 ± 0.18	1.92 ± 0.15	2.04 ± 0.17	0.94 ± 0.12
t 值	32.040	55.878	20.406	28.475
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.3 两组患者胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达及血清 HCG 水平比较

RSA 组患者胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达水平及 Ang-1/Ang-2 比值均高于对照组,血清 HCG 水平低于对照组 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.4 RSA 胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 mRNA 及蛋白表达与血清 HCG 间的关系

Pearson 相关性分析显示,RSA 胎盘绒毛 CD81

mRNA 水平与 Ang-1、Ang-2 的 mRNA 水平正相关 ($r = 0.421, 0.465, 0.472, P < 0.05$);RSA 胎盘绒毛 CD81 蛋白表达量与 Ang-1、Ang-2 蛋白表达量正相关 ($r = 0.413, 0.451, 0.463, P < 0.05$),胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 及蛋白表达量均与血清 HCG 水平无相关性 ($P > 0.05$)。

表 3 两组患者胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的蛋白表达及血清 HCG 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD81	Ang-1	Ang-2	Ang-1/Ang-2	HCG (IU/L)
对照组(n=94)	0.38 ± 0.11	0.73 ± 0.12	0.86 ± 0.14	0.85 ± 0.08	94.26 ± 15.24
RSA组(n=126)	0.48 ± 0.14	1.86 ± 0.18	1.61 ± 0.16	1.16 ± 0.10	77.86 ± 18.62
t 值	5.729	52.733	36.254	24.723	6.972
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.5 胎盘绒毛跨膜蛋白 CD81、Ang 和 HCG 表达对 RSA 女性早孕期复发流产的预测价值

CD81mRNA、Ang-1/Ang-2mRNA、CD81 蛋白、Ang-1/Ang-2 蛋白、HCG 均可用于预测 RSA 女性早孕期复发流产 ($AUC = 0.881, 0.864, 0.777, 0.836, 0.759$)。见表 4 及图 1。

表 4 胎盘绒毛跨膜蛋白 CD81、Ang 和 HCG 表达预测 RSA 女性早孕期复发流产的 ROC 曲线分析

因素	AUC 值	SE 值	95% CI	P 值	截断值	敏感度(%)	特异度(%)
CD81 mRNA	0.881	0.022	0.830 ~ 0.920	<0.001	1.62	87.30	70.21
Ang-1/Ang-2 mRNA	0.864	0.024	0.811 ~ 0.906	<0.001	0.71	77.78	79.79
CD81 蛋白	0.777	0.031	0.716 ~ 0.830	<0.001	0.44	70.63	75.53
Ang-1/Ang-2 蛋白	0.836	0.027	0.780 ~ 0.882	<0.001	0.92	87.30	64.89
HCG	0.759	0.032	0.697 ~ 0.814	<0.001	89.58 IU/L	76.19	67.02

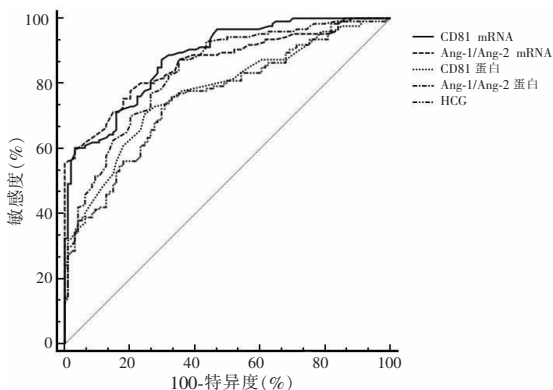


图 1 胎盘绒毛跨膜蛋白 CD81、Ang 和 HCG 表达预测 RSA 女性早孕期复发流产的 ROC 曲线

3 讨论

妊娠是一个受到精细调控的复杂生理过程,当胎盘血管发育不良、出现内皮功能障碍则可能导致胚胎血供不足,导致流产发生^[10-11]。因此,与滋养细胞功能、血管生成相关的因子表达异常可能引起 RSA

患者早孕期复发流产,深入分析相关因子的调节机制对 RSA 早孕期流产防治具有重要临床意义。

CD81 是外泌体的重要标志分子,参与信号传导、细胞融合及调控细胞迁移、血管内皮损伤等生理过程,对免疫细胞具有广泛调节作用^[12]。目前已有研究^[13]证实,CD81 可通过抑制滋养细胞侵袭、促进血管内皮细胞激活等机制影响正常妊娠胎盘形成过程,参与子痫前期的发病,但其在 RSA 中的作用则仍需探究。此外,Ang-1、Ang-2 为血管内皮细胞分泌的具有核糖核酸酶活性的促血管生成因子,二者均可与内皮特异性受体酪氨酸激酶 Tie-2 结合,在血管的重塑、成熟、出芽及生成分支中发挥着重要作用^[14-15]。国内外均有研究^[16-17]显示,血管生成素异常过表达可通过诱导妊娠期间子宫血管重塑、刺激滋养层侵袭等机制而影响正常妊娠过程。HCG 水平则与滋养细胞的数量有关,被用于临床中判断宫内妊娠、异位妊娠、妊娠失败等异常妊娠状态。

本研究发现,与对照组相比,RSA 组胎盘绒毛

CD81、Ang-1、Ang-2 mRNA 及蛋白表达水平和 Ang-1/Ang-2 mRNA 比值、Ang-1/Ang-2 蛋白比值均升高,而血清 HCG 水平降低,提示胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 及蛋白异常表达参与 RSA 患者早孕期的复发流产,且患者处于低血清 HCG 水平的妊娠异常状态。相关性分析显示,RSA 胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 间的 mRNA 水平正相关,蛋白表达量间也呈正相关,且三者 mRNA 及蛋白表达量与血清 HCG 水平无关,提示胎盘绒毛 CD81、Ang-1、Ang-2 高表达均会导致 RSA 患者早孕期复发流产,三者作用存在相关性且均与绒毛活性无关。余艳茹等^[18]研究指出胎盘绒毛 CD81 异常高表达与 RSA 的发生有关,赵骏达等^[19]研究显示绒毛组织 Ang-1、Ang-2 高度表达会导致 RSA 的发生,均支持本研究结论。由此可推测 CD 81 异常表达可能通过其对信号转导、细胞融合及调控细胞迁移的生理作用而降低滋养细胞侵袭浸润能力,影响血管生成过程和子宫螺旋动脉重塑,使胚胎浅着床而发生 RSA。Ang-1、Ang-2 的 mRNA 及蛋白异常表达使 Ang-1/Ang-2 比例失衡,可能通过促进血管内皮细胞和周细胞凋亡,引起血管内皮功能障碍,影响母-胎血液循环的建立,使胚胎缺血缺氧而发生 RSA。ROC 曲线显示,CD81 mRNA、Ang-1/Ang-2mRNA、CD81 蛋白、Ang-1/Ang-2 蛋白、HCG 均可用于预测 RSA 女性早孕期复发流产,但单一评估指标敏感性或特异性不足,且临床实际中 mRNA 及蛋白检测推广存在一定难度,因此,后续临床研究可考虑寻找与胎盘绒毛组织 CD81、Ang-1、Ang-2 水平变化相关的血清指标用于预测评估,同时还可从改善胎盘绒毛组织 CD81、Ang-1、Ang-2 水平变化方面着手探究 RSA 防治方法。

综上,胎盘绒毛组织上调 CD81、Ang-1、Ang-2 的 mRNA 及蛋白表达参与 RSA 的发病,CD81、Ang-1、Ang-2 间可能存在相互作用共同影响 RSA 发病,且三者与反映绒毛活性的 HCG 的相关机制无关,评估 CD81、Ang-1、Ang-2、HCG 表达水平在预测 RSA 女性早孕期复发流产方面具有一定诊断价值。

参考文献

[1] 张建平,林其德,李大金,等.复发性流产的诊断与治疗[J].现代妇产科进展,2006,15(7):481-492.

[2] Quenby S,Gallos ID,Dhillon-Smith RK,et al. Miscarriage matters:the epidemiological,physical,psychological,and economic costs of early pregnancy loss[J].The Lancet,2021,397(10285):1658-1667.

[3] 张清华,潘静,姚丽艳.复发性流产患者病因构成分析[J].中国全科医学,2020,23(14):1760-1764.

[4] 吴海艳.妊娠期慢性静脉疾病增加胎盘绒毛血管和淋巴管生成及绒毛细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2021,37(6):538-545.

[5] Shen L,Diao Z,Sun HX,et al. Up-regulation of CD81 inhibits cytotrophoblast invasion and mediates maternal endothelial cell dysfunction in preeclampsia[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2017,114(8):1940-1945.

[6] Heidari MM,Sheikholeslami M,Yavari M,et al. The association of renin-angiotensinogen system genes polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss[J].Human Fertility,2019,22(3):164-170.

[7] Li M,Hu J,Yao L,et al. Decreased ANGPTL4 impairs endometrial angiogenesis during peri-implantation period in patients with recurrent implantation failure[J].Journal of Cellular and Molecular Medicine,2020,24(18):10730-10743.

[8] 范宏艳,梁甜甜.早孕期超声参数联合孕酮和β-hCG对自然流产的预测价值[J].影像科学与光化学,2020,38(6):1082-1087.

[9] 中华医学会妇产科学分会产科学组.复发性流产诊治的专家共识[J].中华妇产科杂志,2016,51(1):3-9.

[10] Matsubara K,Matsubara Y,Uchikura Y,et al. HMGAI is a potential driver of preeclampsia pathogenesis by interference with extravillous trophoblasts invasion[J].Biomolecules,2021,11(6):822.

[11] 周宁,张若鹏.母胎界面免疫环境与复发性流产关系的研究进展[J].海南医学,2021,32(1):112-114.

[12] Ding H,Dai Y,Lei Y,et al. Upregulation of CD81 in trophoblasts induces an imbalance of Treg/Th17 cells by promoting IL-6 expression in preeclampsia[J].Cellular & Molecular Immunology,2019,16(3):302-312.

[13] Duan H,Hu Y. CD81, a new actor in the development of preeclampsia[J].Cellular & Molecular Immunology,2021,18(8):2061.

[14] Harel S,Sanchez-Gonzalez V,Echavarria R,et al. Roles of miR-640 and zinc finger protein 91 (ZFP91) in angiotensin-II-induced in vitro angiogenesis[J].Cells,2020,9(7):1602.

[15] Haase K,Gillrie MR,Hajal C,et al. Pericytes contribute to dysfunction in a human 3D model of placental microvasculature through VEGF-Ang-Tie2 signaling[J].Advanced Science,2019,6(23):1900878.

[16] Hou H,Ning F,Zhang JY,et al. Angiotensin 2 stimulates trophoblast invasion via a mechanism associated with JNK signaling[J].Molecular Human Reproduction,2021,27(3):gaab014.

[17] Tiozzo C,Bustoros M,Lin X,et al. Placental extracellular vesicles-associated microRNA-519c mediates endotoxin adaptation in pregnancy[J].American Journal of Obstetrics and Gynecology,2021,225(6):681.e1-681.e20.

[18] 余艳茹,许雅娟,翟闪闪,等.胎盘绒毛 CD81、HIF-1α、VEGF 在早孕期复发性流产中的表达[J].安徽医科大学学报,2019,54(4):611-616.

[19] 赵骏达,梁凌云,武欣.血管生成素和血小板反应蛋白在复发性流产(RSA)患者绒毛组织中的表达及其与血管生成的关系[J].复旦学报(医学版),2020,47(4):551-553,559.

(收稿日期:2023-09-11

修回日期:2023-11-01)