

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.019

PEDF 蛋白在子痫前期患者胎盘上的表达及意义

顾培君¹ 古航^{2△} 赵慧娜¹ 唐秀芬¹

(1 上海第七人民医院妇产科 上海 200137; 2 长海医院妇产科 上海 200433)

摘要 目的:研究子痫前期患者胎盘组织中色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)的表达,探讨 PEDF 在子痫前期发病中的作用。**方法:**选取 2012 年 3 月至 2013 年 3 月在我院产科住院剖宫产的 20 例子痫前期孕妇作为研究对象,另选取同期正常分娩的孕妇 20 例作为对照组。采用 Western blot、免疫荧光组织化学方法检测子痫前期患者和正常对照组妇女胎盘组织中 PEDF 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达,并通过免疫荧光方法计数胎盘微血管密度(MVD)。**结果:**同正常对照组相比,子痫前期患者胎盘组织中 PEDF 表达升高,而 VEGF 表达则减少。PEDF 与 VEGF 组织表达位置大致相同。子痫前期患者胎盘组织中 PEDF 表达与 24h 尿蛋白定量呈正相关,与 VEGF 表达及 MVD 计数呈负相关;VEGF 表达与 MVD 计数呈正相关。**结论:**PEDF 与子痫前期疾病发生发展及病情轻重程度有关;PEDF 可能是通过影响胎盘血管的重铸,而参与子痫前期疾病的发生发展。

关键词:色素上皮衍生因子;子痫前期;血管内皮生长因子;微血管密度

中图分类号:R714.244 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6874-03

Expression and Significance of PEDF Protein in Placenta of Patients with Preeclampsia

GU Pei-jun¹, GU Hang^{2△}, ZHAO Hui-na¹, TANG Xiu-fen¹

(1 Obstetrics and Gynecology, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai, 200137, China;

2 Department of Obstetrics and Gynecology, Changhai Hospital, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) placenta in of patients with preeclampsia, and to explore the role of PEDF in the pathogenesis of preeclampsia. **Methods:** 20 cases of patients with preeclampsia who had elective cesarean deliveries in our hospital from March 2012 to March 2013 were studied, and 30 women with normal term pregnancy were studied as the control group. The expression of PEDF, vascular endothelial growth factor (VEGF) and MVD in placentas were assayed using western blot and immuno fluorescence methods. **Results:** Compared with the normal control group, PEDF expression in placenta of preeclampsia patients increased, while the expression of VEGF decreased. PEDF and VEGF expression was roughly in the same position. The expression of PEDF in placenta of preeclampsia patients was positively correlated with 24h quantitative urinary protein, and negatively correlated with VEGF expression and MVD count. The expression of VEGF was positively correlated with MVD count. **Conclusions:** The expression of PEDF in placenta has correlation with the development and the severity of preeclampsia disease. PEDF may participate the occurrence and development of preeclampsia disease by influencing the blood vessels recasting in placenta.

Key words: PEDF; Preeclampsia; VEGF; MVD

Chinese Library Classification: R714.244 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6874-03

前言

怀孕前血压正常的孕妇在妊娠 20 周以后出现高血压、蛋白尿,称子痫前期,是导致孕产妇和围生儿死亡的主要原因之一^[1-5]。目前公认的子痫前期发病原因假说包括滋养细胞侵袭异常、免疫调节功能异常、血管内皮损伤、遗传因素和营养因素等^[6-8]。然而目前为止没有一种假说可以全面地解释子痫前期的发病原因和机制。其中有的假说认为血管重铸参与了子痫前期的发病。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor,

PEDF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管重铸过程中两个重要的拮抗因子^[9]。VEGF 在子痫前期发病中的作用已基本明确,然而关于 PEDF 在子痫前期发病中的作用目前国内外相关研究还很少。为探讨 PEDF 在子痫前期发病中的作用及相关机制,本研究观察了子痫前期胎盘组织中 PEDF 和 VEGF 的表达情况,并分析 PEDF 和 VEGF 及胎盘微血管密度(MVD)的相关性。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选择 2012 年 3 月至 2013 年 3 月在我院产科住院剖宫产的 20 例子痫前期孕妇作为研究对象,另选取同期正常分娩的孕妇 20 例作为对照组,所有患者均签署知情同意书。排除标准:既往高血压、心脏病、肾脏病及甲状腺功能异常、输血史、免

作者简介:顾培君(1977-),男,主治医师,本科,主要研究方向:围产医学、子痫前期

△通讯作者:古航,男,电话:13795358199

(收稿日期:2014-05-27 接受日期:2014-06-23)

疫治疗及胎儿巨大儿等。所有病例均为单胎妊娠,未进入产程。子痫前期组年龄(28.7 ± 4.1)岁,正常对照组年龄(27.9 ± 3.6)岁,两组孕妇年龄比较差别不具有统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 胎盘娩出后 5 min 内,无菌条件下剪取胎盘母面正中部位约 1 cm^2 大小组织(无钙化及出血点部位),弃除胎盘底蜕膜,用 PBS 冲洗干净^[10],部分标本放入冻存管内于液氮中冻存,部分标本以 4%多聚甲醛固定。

1.2.2 免疫荧光组织化学检测 胎盘组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 后,以石蜡包埋并进行切片。常规脱蜡和脱水。抗原修复采用柠檬酸钠微波修复(第一次,煮沸 5 min 40 s,间隔 8 min 后,再煮沸 1 min)。一抗以 PBS:封闭液=1:1 按照说明书推荐浓度进行稀释(PEDF 1:200,VEGF 1:150,CD34 1:200),以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 Western blot 等量的胎盘组织蛋白经 8%~10% SDS-PAGE 分离胶和 5%浓缩胶分离后,半干转印至硝酸纤维素膜上,以含 5% BSA 的 TBST 室温封闭 1 h,加入一抗 4℃ 过夜孵育。第二天用 0.1% TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入相应的 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h。0.1% TBST 洗膜后,硝酸纤维素膜以 Supersignal West Femto/Pico HRP 敏感化学发光底物对条带进行显色。Actin 作为内参对照。所有实验至少重复 3 次。

1.2.4 结果分析方法 荧光显微镜拍照,绿色为 PEDF,红色为 VEGF,蓝色 DAPI 为核。每张切片随机选择 5 个高倍镜实像,计算扫描面积、累计光密度值,平均光密度值即为阳性表达强度。以 CD34 标记血管内皮细胞并计数微血管密度(MVD)。CD34 染色阳性的单个或一簇内皮细胞作为 1 个微血管,每个标本计数 5 个不重复的高倍视野,取平均值,即为胎盘组织 MVD。

1.2.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。多组间比较采用 Oneway-Anova 方法,组间比较采用 t 检验方法,相关性分析采用 Pearson 相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 子痫前期组和对照组一般资料比较

与正常对照组相比,子痫前期组年龄、孕周和舒张压差异不具有统计学意义($P > 0.05$);子痫前期组胎儿体重小于正常组($P < 0.05$),收缩压和蛋白尿高于正常组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 患者一般资料

Table 1 Clinical Data

Clinical Data	Preeclampsia (n=20)	Control (n=20)
Age(y)	28.7 ± 4.1	27.9 ± 3.6
Gestational age(wk)	37.8 ± 2.2	38.9 ± 1.9
Birth weight(g)	2589 ± 357	3281 ± 355
Systolic blood pressure(mmHg)	146.8 ± 10.9	108.9 ± 8.9
Diastolic blood pressure(mmHg)	70.4 ± 6.8	70.5 ± 6.2
Urinary protein(+)	2 ± 1	0

2.2 子痫前期组和对照组 PEDF 和 VEGF 表达情况分析

如图 1 所示,子痫前期组和正常对照组均可见 PEDF 和

VEGF 的表达,子痫前期组 PEDF 表达显著高于正常对照组($P < 0.05$);VEGF 表达情况同 PEDF 相反,其在子痫前期组表达显著低于正常对照组($P < 0.05$)。

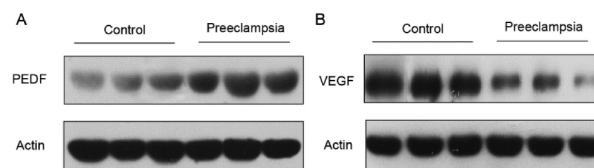


图 1 胎盘组织中 PEDF 和 VEGF 表达

Fig. 1 The expression of PEDF and VEGF in the placentas

2.3 PEDF 和 VEGF 表达位置分析

如图 2 所示,绿色荧光显示的为 PEDF 表达,红色为荧光显示的为 VEGF 表达,蓝色荧光为 DAPI 复染核,结果显示 PEDF 和 VEGF 表达部位基本一致。

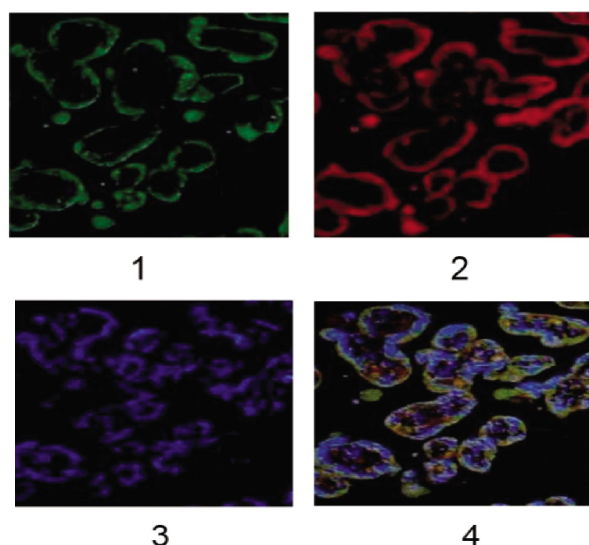


图 2 胎盘组织中 PEDF 和 VEGF 共定位情况

Fig. 2 Co-allocated expression of PEDF and VEGF in the placentas

2.4 子痫前期组和对照组 MVD 比较

与正常对照组相比,子痫前期组 MVD 计数小于正常组($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 MVD 计数结果

Table 2 The expression of MVD in the placentas

Group	MVD	t	P
Preeclampsia (n=20)	98.5 ± 7.9	23.17	< 0.05
Control (n=20)	139.1 ± 9.1		

2.5 PEDF、24 h 尿蛋白定量、VEGF 和 MVD 相关性分析

对胎盘组织中 PEDF 表达和 VEGF 表达进行半定量分析,将半定量结果同 24 h 尿蛋白定量和 MVD 进行相关性分析,结果显示子痫前期患者胎盘组织中 PEDF 的表达强度与 24 h 尿蛋白定量呈线性正相关($r = 0.449, P < 0.05$);PEDF 表达与 VEGF 表达及 MVD 计数呈线性负相关($r = -0.386, P < 0.05$; $r = -0.5484, P < 0.05$),而 VEGF 表达与 MVD 计数呈线性正相关($r = 0.457, P < 0.05$)。

3 讨论

80年代,从原代人类胎儿视网膜色素上皮细胞中分离和鉴定出色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)^[10]。PEDF是一种内源性蛋白,广泛表达于人体,如眼睛、心脏、肝脏、脂肪组织, PEDF具有多种多样的生物活性^[11,12]。PEDF最初被认为是一种神经营养因子,在视网膜母细胞瘤细胞的神经元分化中具有重要的作用^[13]。此外, PEDF还对运动神经元、海马神经元和中脑多巴胺能神经元等具有保护作用^[14-17]。研究发现 PEDF还具有抑制血管生成的作用。PEDF是目前已知的最为有效的血管抑制剂,其不仅可抑制新生血管的形成,还对已形成的新生血管具有逆转作用。目前已知血管重铸可能参与了子痫前期的发病,且 VEGF 在子痫前期发病中的作用已基本明确^[18,19],然而子痫前期患者胎盘组织中是否存在 PEDF 的表达及意义如何,目前对此研究还很少。

本研究首先通过 Western blot 的方法观察了 PEDF 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在子痫前期患者胎盘组织中的表达情况,发现,健康对照组和子痫前期组胎盘组织中均有 PEDF 和 VEGF 的表达,而相比健康对照组而言,子痫前期组胎盘组织中 PEDF 表达显著升高($P<0.05$),而 VEGF 表达则降低($P<0.05$)。随后我们通过免疫荧光的方法对胎盘组织中 PEDF 和 VEGF 的表达进行共定位,发现 PEDF 和 VEGF 在胎盘组织中的表达位置大致相同。相关性分析结果显示,子痫前期病情越重, PEDF 表达量越高,且 PEDF 表达量同 VEGF 和胎盘微血管密度(MVD)呈负相关,而 VEGF 表达量与 MVD 呈正相关。据此,我们的实验结果提示, PEDF 可能是通过抑制 VEGF,从而减少胎盘组织的新生血管形成,进而参与了子痫前期的发病过程。然而, PEDF 也可能是直接作用于胎盘组织中的滋养细胞,从而影响滋养细胞的功能而参与子痫前期的发病过程。因此, PEDF 在子痫前期发病过程中的作用还需进一步的深入研究。

参考文献(References)

- [1] 王桂锋,王晓红,尹国武,等. miR-19a 在正常妊娠及重度子痫前期患者胎盘中的表达[J]. 现代生物学进展,2011,11(12):2335-2337
Wang Gui-feng, Wang Xiao-hong, Yin Guo-wu, et al. Expression of MiR-19a in Placentas From Women with Preeclampsia and Normal Pregnancy [J]. Progress in Modern Biomedicine,2011,11(12):2335-2337
- [2] 曹慧芳,孙敬霞,吴春风,等. 子痫前期胰岛素抵抗相关因素研究进展[J]. 现代生物学进展,2013,13(5):980-982
Cao Hui-fang, Sun Jing-xia, Wu Chun-feng, et al. Study Progress of Insulin Resistance in Preeclampsia [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013,13(5):980-982
- [3] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia[J]. Science, 2005, 308(5728):1592-1594
- [4] 戚婷婷,邹艳芬,张媛媛,等. 热休克蛋白 27 和热休克因子 1 在子痫前期胎盘表达及意义 [J]. 现代生物学进展,2013,13(12):2269-2272
Qi Ting-ting, Zou Yan-fen, Zhang Yuan-yuan, et al. Expression and Significance of HSP27 and HSF1 in Preeclampsia [J]. Progress in Modern Biomedicine,2013,13(12):2269-2272
- [5] 乐杰,主编. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:92-95
Yue Jie, ed. Obstetrics and gynecology [M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008:92-95
- [6] Lee SM, Romero R, Lee YJ, et al. Systemic inflammatory stimulation by microparticles derived from hypoxic trophoblast as a model for inflammatory response in preeclampsia [J]. Am J Obstet Gynecol, 2012,207(4):337.e1-8
- [7] Wagner SJ, Craici IM, Grande JP, et al. From placenta to podocyte: vascular and podocyte pathophysiology in preeclampsia [J]. Garovic VD Clin Nephrol,2010,78(3):241-249
- [8] Kweider N, Fragoulis A, Rosen C, et al. Interplay between vascular endothelial growth factor (VEGF) and nuclear factor erythroid 2-related factor-2(Nrf2): implications for preeclampsia[J]. Biol Chem, 2011,286(50):42863-42872
- [9] Plunkett BA, Fitch P, Doll JA, et al. Decreased expression of pigment epithelium derived factor (PEDF), an inhibitor of angiogenesis, in placentas of unexplained stillbirths[J]. Reproduction Biology,2008, 8(2):107-120
- [10] Tombran-Tink J, Johnson LV. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1989,30(8):1700-1707
- [11] Ek ET, Dass CR, Choong PF. PEDF:a potential molecular therapeutic target with multiple anti-cancer activities [J]. Trends Mol Med, 2006,12(10):497-502
- [12] Rychli K, Huber K, Wojta J. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) as a therapeutic target in cardiovascular disease [J]. Expert Opin Ther Targets, 2009,13(11):1295-302
- [13] Tombran-Tink J, Chader GG, Johnson LV. PEDF:a pigment epithelium-derived factor with potent neuronal differentiative activity [J]. Exp Eye Res,1991, 53(3):411-414
- [14] Bilak MM, Corse AM, Bilak SR, et al. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects motor neurons from chronic glutamate-mediated neurodegeneration[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1999,58(7):719-728
- [15] DeCoster MA, Schabelman E, Tombran-Tink J, et al. Neuroprotection by pigment epithelial-derived factor against glutamate toxicity in developing primary hippocampal neurons [J]. J Neurosci Res,1999,56(6):604-610
- [16] Falk T, Zhang S, Sherman SJ. Pigment epithelium derived factor (PEDF) is neuroprotective in two in vitro models of Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett,2009,458(2):49-52
- [17] Sanagi T, Yabe T, Yamada H. Adenoviral gene delivery of pigment epithelium-derived factor protects striatal neurons from quinolinic acid-induced excitotoxicity[J]. J Neuropathol Exp Neurol,2010,69(3):224-233
- [18] Aref S, Goda H, Abdelaal E. Circulating Vascular Growth Factor (VEGF) Angiopoietin-1 (Angi-1) and Soluble Tie-2 Receptor in Pregnancy Complicated with Pre-eclampsia: A Prospective Study[J]. J Obstet Gynaecol India,2013,63(5):316-320
- [19] Weissgerber TL, Rajakumar A, Myerski AC, et al. Vascular Pool of Releasable Soluble VEGF Receptor-1 (sFLT1) in Women with Previous Preeclampsia and Uncomplicated Pregnancy [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013: jc20133277