

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.16.025

胎盘特异性基因 4 mRNA 基因在孕妇外周血中的检测及临床价值*

周 妮¹ 鄢晋芳^{1Δ} 闫桂花¹ 乞艳华² 麻妙艳²

(1 西安交通大学第二附属医院妇产科 陕西 西安 710004; 2 西安交通大学第二附属医院超声科 陕西 西安 710004)

摘要 目的:应用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)技术对不同孕周孕妇外周血浆胎盘特异性基因 4(PLAC4)mRNA 基因进行检测,寻找唐氏综合征产前诊断的可靠生物学标志物,为无创性产前诊断提供新的突破口。**方法:**按入组标准随机选取健康育龄未妊娠女性 5 例,正常健康妊娠孕妇 60 例(早期妊娠 20 例、中期妊娠 20 例、晚期妊娠 20 例),唐氏筛查高危孕妇 8 例,正常分娩 24 h 女性 5 例。共收集外周血浆样本 78 例。应用 RT-PCR 技术,检测样本中的 PLAC4 mRNA 基因含量,并进行相对定量分析。**结果:**健康育龄未妊娠女性及正常分娩后 24 h 女性外周血浆中均无游离胎儿 PLAC4 mRNA 基因的存在;正常健康妊娠孕妇不同孕周标本均检测到 PLAC4 mRNA 基因,以早期妊娠作为对照,中期妊娠是早期妊娠的 1.99 倍,晚期妊娠是早期妊娠的 3.73 倍;唐氏筛查高危孕妇均检出 PLAC4 mRNA 基因,含量是早期妊娠的 6.36 倍。**结论:**PLAC4 mRNA 基因有望成为唐氏综合征产前诊断的可靠生物学标志物。

关键词:实时荧光定量 PCR;孕妇;PLAC4 mRNA;唐氏综合征;无创产前诊断

中图分类号:R714.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)16-3128-04

Detection and Clinical Value of PLAC4 mRNA Gene in Peripheral Blood of Pregnant Women*

ZHOU Ni¹, WU Jin-fang^{1Δ}, YAN Gui-hua¹, QI Yan-hua², MA Miao-yan²

(1 Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Department of Ultrasound, Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

ABSTRACT Objective: Real-time fluorescence quantitative PCR(RT-PCR) was used to detect the placenta-specific gene 4 (PLAC4) gene in the peripheral plasma of pregnant women at different gestational weeks in order to find reliable biomarkers for prenatal diagnosis of Down's syndrome and provide a new breakthrough for non-invasive prenatal diagnosis. **Methods:** According to the standard, 5 healthy non-pregnant women, 60 normal pregnant women (including 20 early pregnancy, 20 medium-term pregnancy and 20 late pregnancy), 8 down syndrome screening high-risk pregnant women and 5 postpartum 24 h women were randomly selected. Then 78 peripheral blood samples were collected from them. Detection of PLAC4 gene content in samples by RT-PCR and relative quantitative analysis. **Results:** None of healthy non-pregnant women and postpartum 24 h women have detected the PLAC4 mRNA gene, Normal pregnancy at different gestational weeks has detected the PLAC4 mRNA gene. Early pregnancy as a control, PLAC4 mRNA gene content of the medium-term pregnancy was 1.99 times of early pregnancy and late pregnancy PLAC4 mRNA content was 3.73 times of early pregnancy. Down syndrome screening high-risk pregnant women has detected the PLAC4 mRNA gene and content was 6.36 times of early pregnancy. **Conclusion:** PLAC4 mRNA gene is expected to become the reliable biological indicator of prenatal diagnosis of Down's syndrome.

Key words: RT-PCR; Pregnant woman; PLAC4 mRNA; Down's syndrome; Non-invasive prenatal diagnosis

Chinese Library Classification(CLC): R714.15 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)16-3128-04

前言

唐氏综合征是最常见的出生缺陷类疾病,且已经证实随着孕妇年龄的增长该疾病的发生率呈逐年增长的趋势,该病目前无有效的治疗手段^[1-3],因此在我国二孩政策实施以来,高龄孕妇的逐年增加下,产前诊断唐氏综合征显的尤为重要^[4,5]。目前无创产前诊断作为一种非侵入性产检检测技术,花费高,能够被一部分人所接受,它主要是基于孕妇外周血中胎儿游

离 DNA 的提取来诊断胎儿的发育状况^[6-8]。与胎儿游离 DNA 相比,RNA 作为另一个母体血清中胎儿标记物,具备以下优点^[9-11]:可以利用反转录技术和扩增技术相结合对其进行检测和扩增;胎盘分泌的 mRNA 具有胎儿特异性,可免受母体 DNA 背景的干扰;远远高于胎儿游离 DNA 的绝对含量^[12]。胎盘特异性基因 4(PLAC4)mRNA 基因来自胎盘,仅在胎盘表达,母体细胞不表达,具有胎儿特异性,且 PLAC4 mRNA 基因定位于 21q22.2,位于唐氏综合征的关键区域,在外周血浆中

* 基金项目:陕西省社会发展科技攻关项目(2016SF-014)

作者简介:周妮(1987-),女,硕士,住院医师,研究方向:优生优育、产前诊断及围产医学,E-mail: 537039406@qq.com

Δ 通讯作者:鄢晋芳(1963-),女,硕士,主任医师,研究方向:优生优育、产前诊断及母胎医学,E-mail: wj2yuan@126.com

(收稿日期:2019-02-06 接受日期:2019-02-28)

具有稳定性^[13-15]。本实验选用 PLAC4 mRNA 基因进行唐氏综合征的研究具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

按照“知情同意及知情选择”原则,本实验共收集样本 78 例,来源于 2017 年 11 月至 2018 年 6 月就诊于我院的健康未妊娠女性志愿者 5 例,平均年龄(26.53±0.79)岁;正常分娩后 24 h 女性 5 例,平均年龄(25.28±1.60)岁;正常健康妊娠孕妇 60 例[早期妊娠 20 例,平均年龄(26.53±0.79)岁,平均孕周(11.00±2.63)周;中期妊娠 20 例,平均年龄(26.61±1.47)岁,平均孕周(11.00±2.63)周;晚期妊娠 20 例,平均年龄(27.33±1.58)岁,平均孕周(38.00±1.25)周],妊娠中期唐氏筛查高危孕妇 8 例,平均年龄(26.36±1.23)岁,平均孕周(17.00±2.40)周。入组标准:① 妊娠组:首次、单胎妊娠、自然受孕、无妊娠并发症、无放射线、毒物、药物等接触;② 健康未妊娠组:无孕产史;③ 产后组:正常分娩。所有研究对象均无内外科及无肿瘤相关疾病,年龄<35 岁,体质量<100 kg。其中将各组年龄进行单因素方差分析,差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 研究方法

(1)血清学筛查:孕中期采用以 AFP+β-HCG 为母体筛查标记物的二联的血清学筛查法。使用 Au-to-DELFIA 自动时光分辨检测系统,试剂盒源于 PekinElmer 公司,采用 LifeCycle 统计软件处理分析,以大于 1/270 为阳性切断值^[16-18]。(2)标本的采集和处理(二步离心法):抽取研究对象空腹、肘前静脉血

2 mL,EDTA 抗凝(在获得血浆之前 4℃保存不超过 6h)。4℃下 1600×g 离心 10 min,将上层淡黄色液体全部转移至一无 DNA 酶的 1.5 mL 无菌 Ep 管内,再在 4℃下 16000×g 离心 10 min,收集上层淡黄色液体转移至无 DNA 酶的 1.5 mL 无菌 Ep 管内,-70℃保存待用。(3)血浆中总 RNA 的提取(购于西安依科生物技术有限公司的游离 RNA 血清血浆提取试剂 50 mL (cw2281A)):每 1 mL 的血浆加入 3 倍体积的游离 RNA 提取试剂,充分混匀后,室温静置 5 分钟;加入 0.6 mL 的氯仿,剧烈振荡 15 秒,室温放置 2 分钟,4℃ 12000 rpm 离心 20 分钟;取上清加入等体积的异丙醇,颠倒混匀,室温放置 30 分钟,4℃ 12000 rpm 离心 20 分钟,弃上清;加入 3 mL 75%乙醇洗涤沉淀,4℃ 12,000 rpm 离心 3 分钟;小心吸弃上清,室温放置 3 分钟,晾干;加入 30 μL 无 RNase 的水,充分溶解 RNA。-70℃保存。并应用紫外分光光度计对 RNA 质量浓度和纯度进行检测。(4)总 RNA 的逆转录(ExScript™ RT Reagent Kit(Perfect Real Time) (DRR037S)):反应体系为 20 μL,其成分为 5× PrimeScript Buffer (for Real Time) 4 μL,PrimeScript RT Enzyme MixI 1 μL,Oligo dT Primer (50 μM) 1 μL,Random 6 mers (100 μM) 1 μL,Total RNA 7 μL,RNase Free dH₂O 6 μL;反应条件:37℃ 15 分钟,85℃ 5 秒钟,-20℃保存。见表 1。(5)PLAC4 mRNA 基因检测:普通 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳的定性检测(主要购于西班牙 Agarose 公司及西安润德生物技术有限公司)和实时荧光定量 PCR 定量检测(美国 ABI 公司实时定量 PCR 仪 Step one)。(6)随访唐氏筛查高危孕妇的妊娠结局。

表 1 引物设计和合成

Table 1 Primer design and synthesis

Gene	Primer sequence	Amplified product length
PLAC4	(forward)5'-TGGGACACGCTTTCCTAAC-3'	147bp
	(reverse)5'-GAGACAGTGGCATGTGGGAA-3'	
β-actin	(forward)5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'	318bp
	(reverse)5'-CATCT CTT GCTCGAAGTCCA-3'	

1.3 统计学处理

应用 SPSS18.0(PASW statistics)统计软件,数据用均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)描述,样本间均数比较采用单因素方差分析(并做方差齐性检验), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Delta-deltaCt 法对每组样本 Ct 值进行相对定量分析,最终结果表示:目的基因 PLAC4 mRNA 在每组样本中的含量相对于对照组含量的倍数。计算公式如下: $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因 PLAC4 mRNA}) - Ct(\text{内参基因})$; $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$; $2^{-\Delta \Delta Ct}$ = 各组目的基因相对于对照组目的基因含量的倍数。

2 实验结果

2.1 定性结果

目的基因 PLAC4 mRNA、内参基因扩增后进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,观察两基因的表达情况,结果显示 PLAC4 mRNA 基因和 β-actin 基因均可以在血浆中得以表达,且两基因分别

与其设计的碱基长度对相符合,说明扩增结果真实可靠。如图 1 所示。

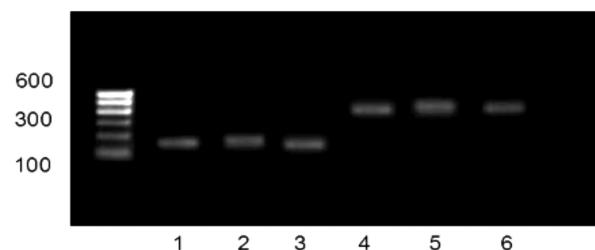


图 1 目的基因的凝胶电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of target genes

Note: 1, 2, 3: Electrophoretic bands of PLAC4 mRNA in plasma of pregnant women in early, middle and late pregnancy;
4, 5, 6: Electrophoretic bands of β-actin in plasma of pregnant women in early, middle and late pregnancy

2.2 定量结果质量评估

目的基因 PLAC4 mRNA 的熔解曲线和内参基因 β -actin 的熔解曲线如图 2、图 3 所示,两者的熔解曲线均为单一峰,无

其他杂峰,说明 PLAC4 mRNA 基因及 β -actin 基因扩增的特异性良好,定量准确。

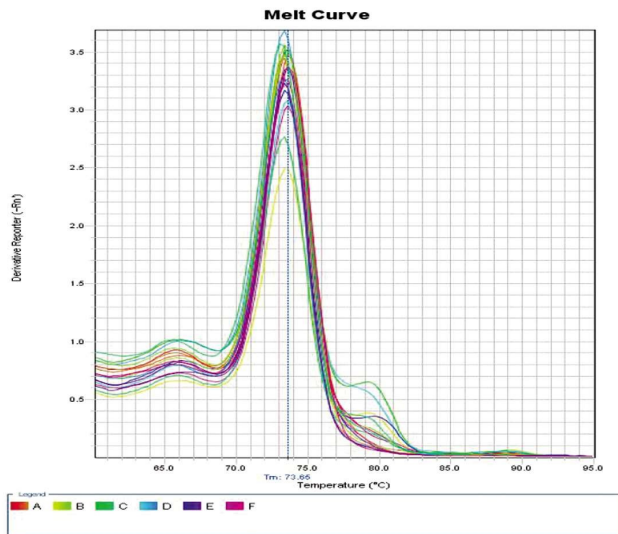


图 2 PLAC4 mRNA 的熔解曲线
Fig.2 Melting Curve of PLAC4 mRNA

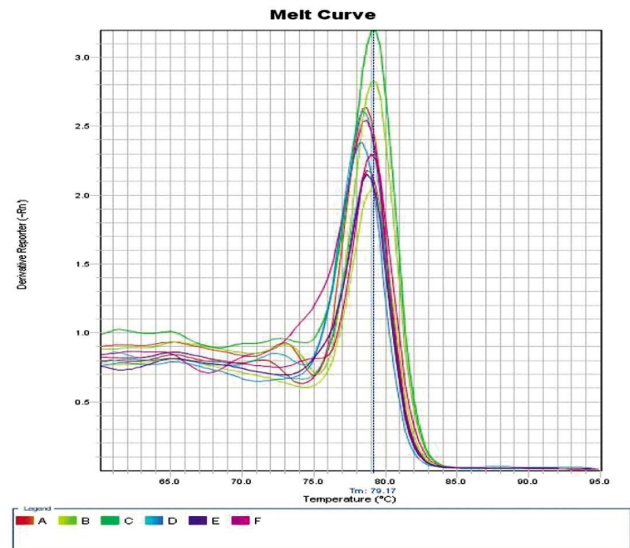


图 3 β -actin 的熔解曲线
Fig. 3 Melting Curve of β -actin

2.3 定量结果

健康女性及正常分娩产后 24 小时女性均未检出 PLAC4mRNA 基因, 正常健康妊娠孕妇 56 例检出了 PLAC4mRNA 基因,早、中、晚期的检出率分别为 90%(18/20)、95%(19/20)、95%(19/20), 唐氏筛查高危孕妇均检出了 PLAC4mRNA 基因, 检出率为 100%(8/8)。应用统计学软件 SPSS18.0(PASW statistics)对早期妊娠、中期妊娠、晚期妊娠、

唐氏筛查高危组 4 组样本的 Δ Ct 值做单因素方差分析显示差异有显著性 ($F=22.286, P=0.000$)。以早期妊娠为对照组,用 Delta-deltaCt 法相对定量计算 PLAC4 mRNA 基因在中期妊娠、晚期妊娠、唐氏筛查高危妊娠组的含量是早期妊娠组含量的倍数,结果显示中期妊娠是早期妊娠的 1.99 倍,晚期妊娠是早期妊娠的 3.73 倍; 唐氏筛查高危是早期妊娠的 6.36 倍, 见表 2。

表 2 不同妊娠组基因表达情况

Table 2 Gene expression in different pregnancy groups

Indexes	Early pregnancy	Medium-term pregnancy	Late pregnancy	Down syndrome screening high-risk
Average Δ Ct	8.24 $\pm$ 0.70	7.25 $\pm$ 0.55	6.34 $\pm$ 0.70	5.57 $\pm$ 1.18
Δ Δ Ct	0.00 $\pm$ 0.70	-0.99 $\pm$ 0.55	-1.90 $\pm$ 0.70	-2.67 $\pm$ 1.18
$2^{-\Delta\Delta Ct}$		1.99	3.73	6.36

2.4 随访结果

本实验收集的 8 例妊娠中期唐氏筛查高危患者中,其中 6 例唐氏筛查高危、孕期超声未见明显异常的孕妇未做染色体核型分析,追踪至分娩后,均为正常胎儿;2 例唐氏筛查高危及合并 1 例产前 B 超提示胎儿全身水肿的孕妇做羊水穿刺后行染色体核型分析,结果为 21- 三体综合征患儿,于孕中期引产。

3 讨论

长期以来,产前筛查技术在不断进步的同时,也存在着一一定的缺陷,这使得国内外研究者一直致力于寻找无创性产前筛查方法进行染色体疾病的遗传性分析,为寻找确诊的无创性产前诊断提供新的思路^[19-21]。目前对于孕妇血浆中 PLAC4 mRNA 的表达水平及检测方法存在争议^[22-24]。本实验选择 β -actin 基因

作为内参基因,采用实时荧光定量 RT-PCR 技术对不同孕周孕妇外周血浆中的 PLAC4 mRNA 进行定量检测,健康孕龄未妊娠女性及产后 24 小时女性外周血浆中均检测不到 PLAC4 mRNA 基因,同时以早期妊娠为对照,中期妊娠组的 PLAC4 mRNA 基因含量是早期妊娠的 1.99 倍,晚期妊娠组的 PLAC4 mRNA 基因含量是早期妊娠的 3.73 倍,研究表明孕妇外周血浆中 PLAC4 mRNA 基因的检出量随妊娠的进展表现出升高趋势,且具有妊娠特异性^[25-27]。

前文提到 PLAC4 mRNA 基因定位于 21q22.2,位于唐氏综合征的关键区域^[28-30],但是 PLAC4 mRNA 基因与唐氏综合征二者之间的关系尚无定论,故本文收集了唐氏筛查高危孕妇样本,以早期妊娠为对照,唐氏筛查高危组的 PLAC4 mRNA 基因含量是早期妊娠的 6.36 倍,表明唐氏筛查高危孕妇组中

PLAC4 mRNA 基因含量较正常孕妇组升高明显。跟踪唐氏筛查高危孕妇的妊娠结局,回顾性的发现唐氏筛查高危的孕妇分娩唐氏儿的这部分孕妇外周血浆中 PLAC4 mRNA 的基因含量明显高于唐氏筛查高危但妊娠结局正常者,异常高于正常健康妊娠组,提示 PLAC4 mRNA 基因与唐氏综合征疾病相关,有望成为唐氏综合征产前诊断的分子生物学指标,本实验收集的 8 例唐氏筛查高危样本,均为孕中期采用二联筛查法而获得,因此结果具有可靠性,后期还有望于我们大样本量的研究证实及进一步的发现应用 PLAC4 mRNA 基因无创诊断唐氏综合征的横断面截点。

综上所述,本研究对于唐氏筛查高危孕妇外周血的标本收集相对较少,特别是没有收集到唐氏筛查正常而超声所见唐氏综合征临床表现的样本,所以我们期待大样本量、多方位的研究关于 PLAC4 mRNA 基因与唐氏综合征的关系,更深入的了解 PLAC4 mRNA 基因在唐氏综合征患者中的表达水平,有助于我们发现唐氏综合征新的确诊的无创的经济产前诊断手段,造福广大患者。

参考文献(References)

- [1] 韦稚. 血清学检查在高龄孕妇产前唐氏综合征筛查中价值的探讨[J]. 中国计划生育学杂志, 2016, 24(3): 187-189
- [2] 张艳珍,陈益明,程琪辉,等. 杭州市 124 例唐氏综合征胎儿产前诊断结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(20): 4698-4700
- [3] 叶强,韦懿. 孕中期 NIPT 应用于唐氏综合征筛查的效果分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(7): 984-986
- [4] 赵雅勤,冯美宁. 唐氏筛查在孕中期高龄孕妇产前检查中的应用价值[J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(21): 141-142
- [5] 黄德芳,刘党英. 某市 31216 例孕中期唐氏综合征血清筛查结果分析[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(23): 3560-3562
- [6] 吴玥丽,张琳琳,赵玲,等. 外周血胎儿游离 DNA 检测在无创性产前诊断中的价值[J]. 中国计划生育学杂志, 2018, 26(12): 1220-1222
- [7] Horton RH, Wellesley DG. Extending non-invasive prenatal testing to non-invasive prenatal diagnosis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2019, 104(1): F6-F7
- [8] 史云芳,张颖. 无创产前诊断单基因遗传病的研究进展[J]. 天津医药, 2018, 46(12): 1347-1351
- [9] 邹耀霜,晏强,睦维国,等. 环状 RNA 在孕妇 18-三体综合征的鉴定与分析[J]. 中国产前诊断杂志(电子版), 2018, 10(1): 15-19
- [10] 谭三勤,王华,唐华,等. 唐氏综合征胎儿孕早期母体血清 miRNA 表达谱的研究[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(2): 214-217
- [11] 朱莎莎. 母体血清 MicroRNAs 可作为胎儿先天性心脏病产前检查的非侵入性生物标记物[J]. 中国继续医学教育, 2016, 8(36): 59-61
- [12] 崔岚,辛力,张颖. 无创性产前诊断染色体病的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 19(2): 125-127
- [13] 许雅娟,张莹莹,罗晓华,等. 孕妇血浆中胎儿特异性 C21 orf105、PLAC4 mRNA 的检测 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2016, 51(2): 200-204
- [14] Yang L, Sun HY, Chen DZ, et al. Explore the dynamic alternation of gene PLAC4 mRNA expression levels in maternal plasma in second trimester for noninvasive detection of trisomy 21 [J]. Obstet Gynecol Sci, 2015, 58(4): 261-267
- [15] Yang L, Sun H, Chen D, et al. Application of multiplex SNaPshot assay in measurement of PLAC4 RNA-SNP allelic ratio for noninvasive prenatal detection of trisomy 21 [J]. Prenat Diagn, 2014, 34(2): 139-144
- [16] 谭春英,戚红,张爱青,等. 孕早期胎儿颈部透明带增厚在产前诊断中的价值与现状分析 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2012, 28(1): 56-58
- [17] Grinshpun-Cohen J, Miron-Shatz T, Ries-Levavi L, et al. Factors that affect the decision to undergo amniocentesis in women with normal Down syndrome screening result: it is all about the age [J]. Health Expect, 2015, 18(6): 2306-2317
- [18] 丁海耀. 超声及血清学筛查在高龄孕妇唐氏综合征产前诊断中的应用[J]. 创伤与急危重病医学, 2016, 4(6): 377-379
- [19] Hui L, Barclay J, Poulton A, et al. Prenatal diagnosis and socioeconomic status in the non-invasive prenatal testing era: A population-based study [J]. Aust N Z J Obstet Gynaecol, 2018, 58(4): 404-410
- [20] Chun Feng, Zhaobo He, Bo Cai, et al. Non-invasive Prenatal Diagnosis of Chromosomal Aneuploidies and Microdeletion Syndrome Using Fetal Nucleated Red Blood Cells Isolated by Nanostructure Microchips[J]. Theranostics, 2018, 8(5): 1301-1311
- [21] 熊诗谔,杨颖俊,陈建平,等. 35827 例单胎无创产前检测性染色体非整倍体病例的产前诊断及妊娠选择[J]. 中华围产医学杂志, 2018, 21(1): 18-23
- [22] 黄睿,贾婵维,贾兴元,等. 北京地区汉族人群 21 号染色体 PLAC4 基因上 SNP 位点多态性的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 19(4): 11-12, 19
- [23] Lan Yang, Hai-Yan Sun, Dao-Zhen Chen, et al. Explore the dynamic alternation of gene PLAC4 mRNA expression levels in maternal plasma in second trimester for noninvasive detection of trisomy 21 [J]. Obstet Gynecol Sci, 2015, 58(4): 261-267
- [24] 刘红英,杨利丽,王刚. 两种胎儿特异性 mRNA 在母血中的表达研究[J]. 现代妇产科进展, 2014, 26(10): 821-822
- [25] 刘红英,杨利丽,厉锋,等. 孕妇外周血中胎儿特异性 mRNA 的筛选及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(9): 655-657
- [26] uohey L, Macintire K, Ye L, et al. PLAC4 is upregulated in severe early onset preeclampsia and upregulated with syncytialisation but not hypoxia[J]. Placenta, 2013, 34(3): 256-260
- [27] Strauss JF. PLAC4 is upregulated in severe early onset preeclampsia and upregulated with syncytialisation but not hypoxia [J]. Placenta, 2013, 34(6): 512
- [28] 许雅娟,翟闪闪,罗晓华,等. 孕妇血浆中胎儿特异基因 PLAC4 和 COL6A2 等位基因杂合频率检测用于产前筛查 21 三体的可行性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2015, 63(8): 568-575
- [29] 胡春风,王翠艳,刘红英. PLAC4 基因用于 21 三体综合征无创性产前诊断的可行性分析[J]. 医药前沿, 2018, 8(34): 155-157
- [30] 杨岚,孙磊,江静颖,等. 中孕期孕妇血浆胎儿 PLAC4 基因含量的动态变化[J]. 江苏医药, 2015, 41(4): 396-399