

· 临床研究 ·

黏附连接蛋白在子痫前期患者胎盘血管内皮细胞中的表达及意义

吴双¹, 曹卉¹, 严芳¹, 陆晓媛²

1. 徐州医科大学附属淮海医院妇产科, 江苏 徐州 221004;

2. 徐州医科大学附属医院妇产科, 江苏 徐州 221002

摘要: **目的** 检测子痫前期患者胎盘血管内皮细胞中黏附连接蛋白[血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和 β -连环蛋白(β -catenin)]的表达水平,为临床诊断和治疗提供参考。**方法** 收集2017年3月至2018年10月在徐州医科大学附属淮海医院诊治的妊娠期高血压疾病患者90例为研究对象,其中妊娠期高血压组30例,轻度子痫前期组30例,重度子痫前期组30例,选择正常妊娠期孕妇(30例)作为对照组。采用免疫荧光法检测4组胎盘组织中胎盘绒毛血管胎盘内绒毛血管密度及直径和VE-cadherin的位置变化,采用Western blot法检测4组胎盘组织中VE-cadherin和 β -catenin的蛋白表达变化,RT-PCR法检测其mRNAs表达水平。**结果** 与对照组相比,妊娠期高血压组绒毛血管的密度和直径均有所变化,但差异并无统计学意义($P > 0.05$);四组中,重度子痫前期组绒毛血管密度最低,绒毛血管直径最长,差异有统计学意义($P < 0.01$)。免疫荧光结果示,依对照组→妊娠期高血压组→轻度子痫前期组→重度子痫前期组之序,VE-cadherin蛋白从细胞膜向细胞内转移;Western blot和qRT-PCR结果示,依对照组→妊娠期高血压组→轻度子痫前期组→重度子痫前期组之序,VE-cadherin及 β -catenin蛋白和mRNA表达逐步降低,其降低幅度呈重度子痫前期组>轻度子痫前期组>妊娠期高血压组和对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 子痫前期胎盘内绒毛血管密度降低,绒毛血管直径增长,这可能与VE-cadherin的位置内移以及VE-cadherin和 β -catenin表达水平的降低有关。

关键词: 子痫前期; 胎盘; 血管内皮细胞; 黏附连接蛋白

中图分类号: R 714.24⁺5 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)09-1219-05

Expression and significance of adherens junction proteins in placental vascular endothelial cells of patients with preeclampsia

WU Shuang*, CAO Hui, YAN Fang, LU Xiao-yuan

* Department of Obstetrics and Gynecology, Huaihai Hospital Affiliated to Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China

Corresponding author: LU Xiao-yuan, E-mail: 237345222@qq.com

Abstract: Objective To detect the expression levels of adherens junction proteins [vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) and β -catenin] in placental vascular endothelial cells of patients with preeclampsia to provide reference for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Ninety females with hypertensive disorders complicating pregnancy (HDPC) were selected as study subjects, who were treated in Huaihai Hospital from March 2017 to October 2018 and divided into HDPC group, mild preeclampsia group and severe preeclampsia group ($n = 30$, each). At the same period, 30 normal pregnant women were served as control group. The changes of density and diameter of placental villi vessels and the position of VE-cadherin were detected by immunofluorescence method. The protein and mRNA expressions of VE-cadherin and β -catenin were respectively detected by Western blot and RT-PCR. **Results** Compared with control group, the density and diameter of villi vessels changed in HDPC group, but there was no statistical difference between two groups ($P > 0.05$). Among four groups, the density of villi vessels was the lowest and the diameter of villi vessels was the longest in severe preeclampsia group ($P < 0.01$). The immunofluorescence showed that VE-cadherin protein was transferred from cell membrane to intracellular according to the order of control group → HDPC group → mild preeclampsia group → severe preeclampsia group. Western blot and qRT-PCR showed that the expression of VE-cadherin and β -catenin protein and mRNA decreased gradually according to the order of control group → HDPC group → mild preeclampsia group → severe

preeclampsia group, and their decreasing range was severe preeclampsia group > mild preeclampsia group > HDCP group and control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** In preeclampsia, the density of intraplacental villi vessels decreased, and its diameter increased, which may be related to the inward shift of VE-cadherin and the decreased expression of VE-cadherin and β -catenin.

Key words: Preeclampsia; Placenta; Vascular endothelial cells; Adherens junction protein

妊娠期高血压疾病(HDCP)是妊娠期严重、危急且常见的产科合并症之一,其中子痫前期属于HDCP,是导致孕产妇死亡的主要原因^[1]。目前对于HDCP,临床上仍然缺乏有效的防治措施。因此,研究其发病机制势在必行。有研究表明,胎盘组织中的血管内皮细胞过度凋亡导致子宫螺旋小动脉重铸不良从而引起胎盘缺血缺氧,是子痫前期发病的核心环节^[2]。但内皮细胞的黏附连接是否在HDCP过程中发生变化尚不清楚。内皮细胞之间的黏附连接是由黏附连接蛋白[血管内皮钙黏蛋白(VE-cadherin)和 β -连环蛋白(β -catenin)]来完成的,其主要作用为维持血管内皮屏障的半透膜功能^[3-5]。既往研究指出,早发型重度子痫前期中存在上皮间质转化^[6],但VE-cadherin和 β -catenin与子痫前期的相关研究较少。本研究以HDCP患者为研究对象,重点研究子痫前期患者胎盘血管内皮细胞中VE-cadherin和 β -catenin的变化,以探讨HDCP可能的发病机制。

1 资料与方法

1.1 病例选择 收集2017年3月至2018年10月在徐州医科大学附属淮海医院诊治的HDCP患者90例,其中未发生子痫前期的妊娠期高血压组30例,轻度子痫前期组30例,重度子痫前期组30例。选择正常妊娠孕妇且排除其他妊娠合并症及并发症者30例作为对照组。4组孕妇均无慢性高血压、糖尿病、自身免疫性疾病、血管性疾病、母体或胎儿感染、胎儿先天性疾病及胎膜早破等疾病,4组孕妇均为单胎妊娠,均行剖宫产分娩。本研究经徐州医科大学附属淮海医院医学伦理委员会讨论并同意,所有研究对象均签署知情同意书。4组孕妇的年龄、孕次、产次、孕周均无统计学差异($P > 0.05$)。见表1。子痫前期的诊断标准参照《妇产科学》(第8版)^[7]。

表1 4组孕妇一般资料的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄(岁)	孕次	产次	检测孕周 ^a
妊娠期高血压组	30	28.2±4.5	2.5±1.3	1.7±0.7	38.2±1.5
轻度子痫前期组	30	30.2±5.3	2.2±1.2	1.7±0.6	37.9±2.4
重度子痫前期组	30	29.2±5.8	2.7±1.4	1.2±0.3	36.7±2.8
对照组	30	28.6±4.5	1.9±1.0	1.5±0.4	39.3±0.7
F值		0.0888	0.2414	0.9681	0.8390
P值		0.9642	0.8652	0.4538	0.5096

注:^a指ELISA法检测时的孕周。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集与制备 胎盘组织:胎儿娩出后立即取新鲜胎盘组织面的中央区域,剪除底蜕膜层,并且注意避开钙化坏死区,取丛密绒毛膜层组织2块,组织块大小为1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm,取出后4℃生理盐水冲洗,然后用10%中性甲醛固定过夜,石蜡包埋组织块用于切片,切片厚度为4 μm,切好的切片用于免疫组化法检测。

1.2.2 免疫荧光法检测 4组胎盘组织中胎盘绒毛血管胎盘内绒毛血管密度及直径和VE-cadherin的位置变化 PBS冲洗已经切好的石蜡切片3遍,每次5 min。后用3% BSA+0.1% Triton 室温孵育30 min,后用PBS冲洗3遍,每次5 min。加入1:400浓度的兔抗人VE-cadherin多克隆抗体(ab205336,购自Abcam公司)和CD31(血管内皮细胞标志物)多克隆抗体(ab76533,购自Abcam公司)50 μl在4℃冰箱里孵育过夜。第二天取出切片后,室温下放置30 min,带切片恢复到室温后,PBS冲洗3次,每次5 min。后以1:500的比例使用荧光二抗驴抗兔(绿色荧光标记)避光室温孵育2 h,PBS冲洗3次,每次5 min。使用DAPI染液(D9542,购自Sigma-Aldrich公司,蓝色荧光标记)在室温下孵育20 min,PBS冲洗3遍,每次5 min,快速使用荧光显微镜进行拍照。

1.2.3 Western Blot法检测 胎盘组织中VE-cadherin和 β -catenin的蛋白表达 将各组所提取组织置于冰上,加入4℃预冷的RI-PA细胞蛋白裂解液,蛋白定量检测采用二喹啉甲酸法。蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后用恒流湿法转膜。转膜成功后,将NC膜转入5%脱脂奶粉-TBST封闭液于室温摇床上封闭1 h。封闭结束后,NC膜转移到加入稀释的VE-cadherin(1:500,购自Abcam公司,ab205336), β -catenin(1:500,购自Cell Signaling Technology公司,#8480)和 β -actin(1:1 000,购自Abcam公司,ab8226)的一抗,4℃轻摇过夜;随后加入相应的二抗(1:10 000稀释),37℃恒温摇床孵育1 h。蛋白的表达量以 β -actin作为参照,待测蛋白与 β -actin的灰度比值即为蛋白相对表达量。

1.2.4 RT-PCR检测 VE-cadherin和 β -catenin mRNA的表达水平 细胞总RNA采用RNA快速抽提试剂

盒(北京百泰克生物技术)提取。VE-cadherin 基因引物序列,上游:5'-ATG GCA GGC CCT AAC TTT CC-3',下游:5'-GTG CGA AAA CAC AGG CCA AT-3',扩增片段长度为 387 bp;β-cadherin 基因引物序列,上游:5'-CAT AAC CTT TCC CAT CAT CGT-3',下游:5'-TGT GGA GAG TTG TAA TGG CA-3',扩增片段长度为 127 bp;扩增条件为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次,72 °C 延伸 5 min。内参照 β 肌动蛋白(β-actin)基因引物序列,上游:5'-CGG GAA ATC GTG CGT GAC AT-3',下游:5'-CGG ACT CGT CAT ACT CCT GCT TG-3',扩增片段长度为 481 bp;扩增条件为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,64 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,循环 30 次,72 °C 延伸 5 min。具体步骤按照 RT-PCR 检测试剂盒(购自北京中杉金桥生物技术)说明书进行操作。取 PCR 产物进行 DNA 琼脂糖电泳,凝胶成像系统观察并拍照,测定每个样本 PCR 扩增产物的吸光度(A)值与内参照 β-actin 的 A 值,以两者的比值作为待测样本 VE-cadherin 和 β-catenin mRNA 的相对表达水平。

1.3 统计学方法 用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。计数资料以百分比或率表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

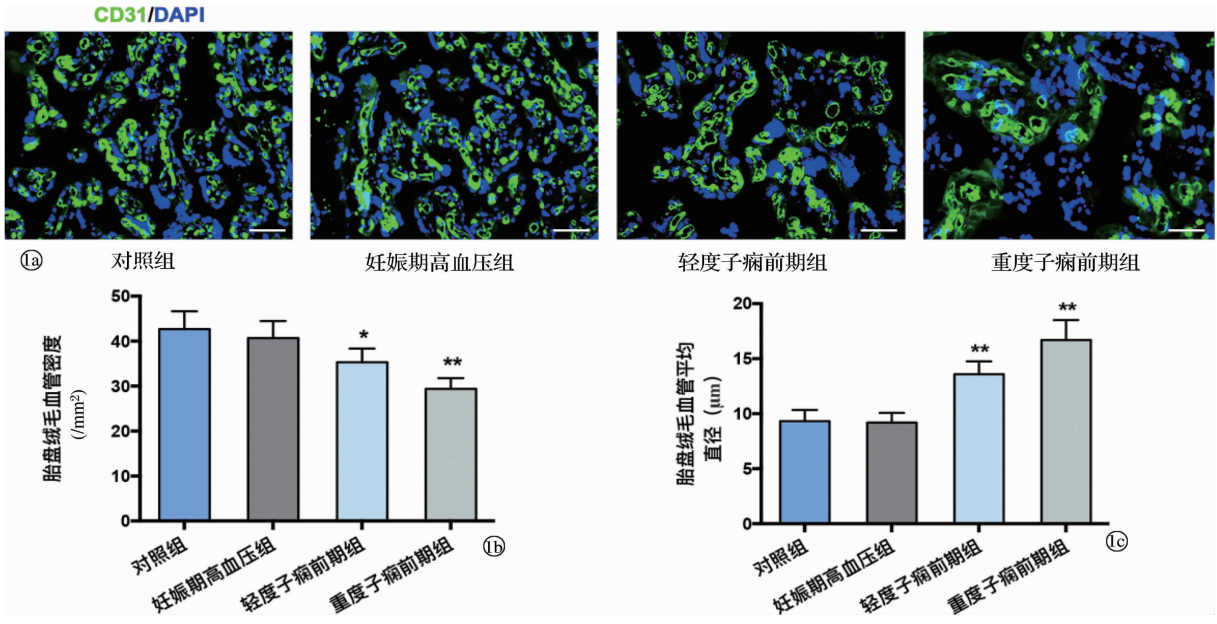
2.1 胎盘内绒毛血管密度在子痫前期的变化 免疫

荧光法结果显示(图 1),作为血管内皮细胞标志物的 CD31 阳性表达呈绿色荧光, DAPI 染色后细胞核呈蓝色荧光。妊娠期高血压组绒毛血管的密度和直径与对照组相比均有所变化,但差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比,轻度子痫前期的绒毛血管密度降低($P < 0.05$),胎盘绒毛血管平均直径增加($P < 0.01$)。而在 4 组结果中,重度子痫前期组的绒毛血管密度最低,绒毛血管平均直径最长,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 VE-cadherin 蛋白表达位置及 VE-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达量的变化 免疫荧光法检测蛋白表达位置变化示,VE-cadherin 蛋白从主要存在于细胞膜(对照组)→细胞膜减少、细胞内少量(妊娠期高血压组)→细胞膜更少、细胞内增多(轻度子痫前期组)→细胞膜几无、主要细胞内(重度子痫前期组),显示胎盘内皮细胞中 VE-cadherin 的内吞,依上述四组之序,逐步明显。见图 2a。

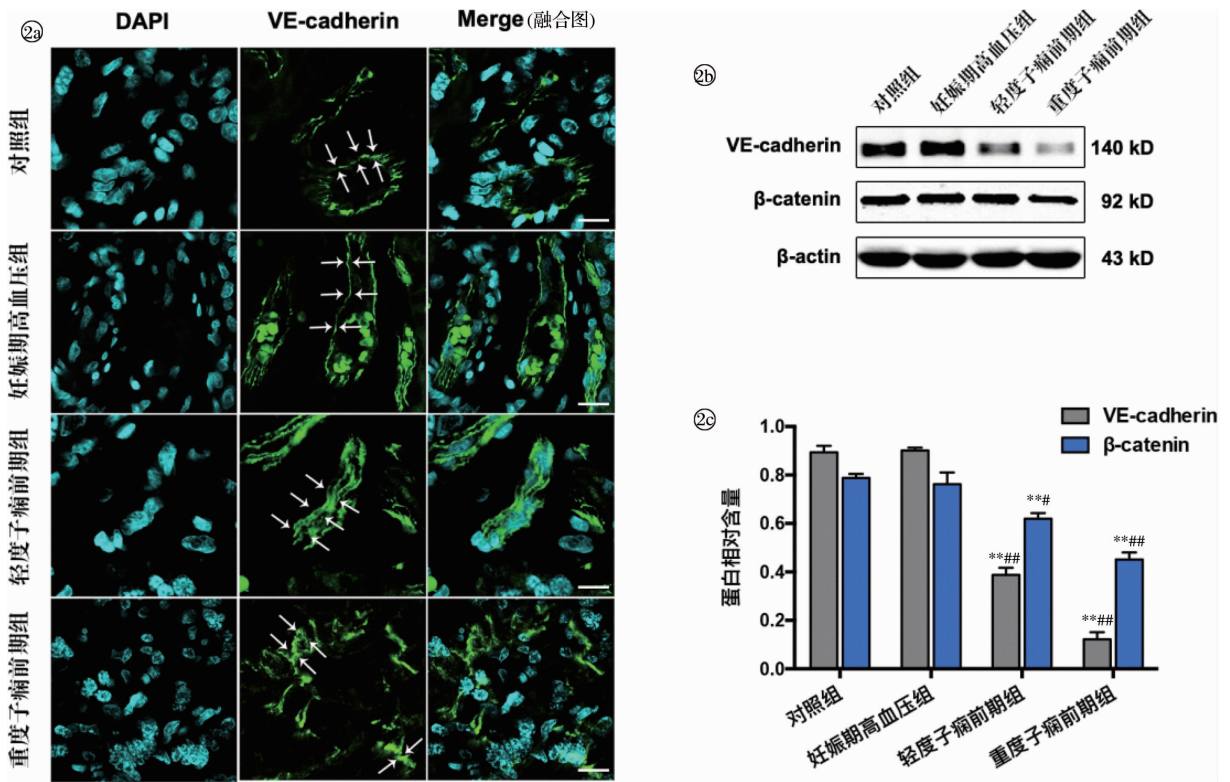
Western Blot 检测 VE-cadherin 和 β-catenin 的蛋白量变化结果显示,VE-cadherin 和 β-catenin 在对照组中表达量最高,妊娠期高血压组中表达量相对降低,但与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$);轻度子痫前期组和重度子痫前期组中 VE-cadherin 和 β-catenin 蛋白表达量下降,与高血压组和对照组差异有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),其中重度子痫前期蛋白表达量最低。见图 2b、2c。

2.3 VE-cadherin 和 β-catenin 的 mRNA 表达变化 RT-PCR 技术检测显示,轻度子痫前期组和重度子痫前期组两组 VE-cadherin 和 β-catenin 的 mRNA 表达



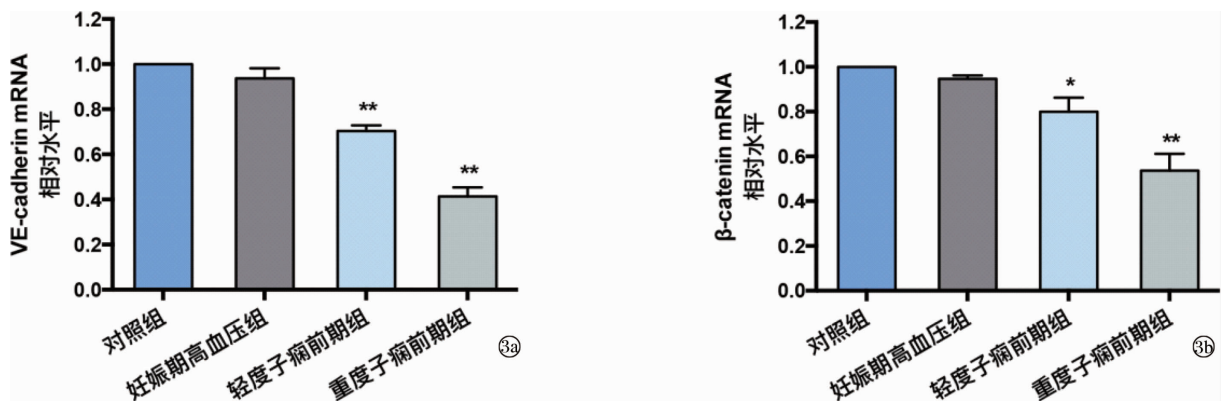
注:1a:免疫荧光染色法显示不同组中 CD31 表达含量的变化(bar = 250 µm);1b:4 组胎盘绒毛血管的密度比较;1c:4 组中胎盘内绒毛血管的平均直径比较;与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 子痫前期胎盘组织中绒毛血管的密度和直径变化



注:2a:激光共聚焦显微镜拍摄显示不同组中 VE-cadherin 蛋白的聚集情况(箭头表示 VE-cadherin 的聚集位置,bar = 100 μm);2b:Western blot 法检测胎盘组织中 VE-cadherin 和 β -catenin 的蛋白水平;2c:Western blot 结果的柱状统计图;与对照组比较, ** $P < 0.01$;与妊娠期高血压组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 孕妇胎盘组织中 VE-cadherin 蛋白表达位置及 VE-cadherin 和 β -catenin 蛋白表达量的变化。



注:3a:不同组中 VE-cadherin 的 mRNA 表达变化;3b:不同组中 β -catenin mRNA 的表达变化;与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 RT-PCR 检测胎盘组织中 VE-cadherin 和 β -catenin 的 mRNA 表达

水平低于妊娠高血压组和对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);而妊娠高血压组中 VE-cadherin 和 β -catenin 的 mRNA 表达水平与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

3 讨论

子痫前期是妊娠期女性一种常见的内科并发症^[8-9],可增加其他潜在致死性并发症发生的风险,严重者可威胁孕产妇和围生儿的生命。目前其研究主要集中于胎盘低灌注、氧化应激、免疫、遗传等几个方面,而现今已经有研究表明子痫前期的发病与胎盘中的内皮细胞损伤有关^[10]。

内皮细胞之间的黏附连接是血管新生和维护血管完整及稳定的重要基础。这种连接主要是由有多种黏附连接蛋白参与黏附连接及其调控,包括 VE-cadherin、神经细胞钙黏连蛋白(N-cadherin)、SHP2 等^[11-12]。在黏附连接蛋白中,VE-cadherin 在其中起重要作用。VE-cadherin 是一种内皮细胞膜蛋白,主要分布在内皮细胞间的连接处,与 β -catenin 和 F-actin 等多个蛋白扎堆后相互连接形成合力,增加内皮细胞稳定性和牢固性,最终维持血管稳定^[13-14]。而当内皮细胞损伤时,血液中白细胞被激活从而释放多种趋化因子,使 VE-cadherin 内吞或降解,破坏内皮细胞黏附连接,最终血管通透性增加^[15]。

此外,现在有研究认为子痫前期的发生与滋养细胞缺血缺氧密切相关^[16]。各种原因导致胎盘内绒毛血管密度降低,子宫-胎盘血流量减少会引起胎盘缺血缺氧,机体在缺血缺氧状态下会产生代偿性改变,如促进缺氧诱导因子-1(HIF-1)和转化生长因子-3(TGF-3)等因子的产生和释放,以促进细胞内错误蛋白的降解,减少血管内皮细胞的缺血缺氧损伤^[17]。在子痫前期患者的胎盘滋养细胞中 HIF-1 和 TGF-3 的表达均显著升高^[18]。但这种代偿性适应不足以抵消缺血缺氧导致的滋养细胞损害,最终仍然会发生子痫前期。

本研究表明,轻度子痫前期组胎盘内绒毛血管密度较妊娠期高血压组和对照组显著降低,重度子痫前期组绒毛血管密度较轻度子痫前期组又进一步下降;胎盘内皮细胞中 VE-cadherin 的内吞程度,呈重度子痫前期组 > 轻度子痫前期组 > 妊娠期高血压组和对照组;VE-cadherin 及 β -catenin 蛋白和 mRNA 表达的降低幅度,也呈重度子痫前期组 > 轻度子痫前期 > 妊娠期高血压组和对照组。这些结果说明子痫前期孕妇胎盘内绒毛血管内 VE-cadherin 和 β -catenin 发生内吞和降解,内皮细胞的黏附连接和稳定性降低,造成内皮损伤和绒毛血管密度降低,最终导致滋养细胞缺血缺氧和子痫前期发生。由此,本研究发子痫前期的发生与发展与 VE-cadherin 和 β -catenin 的黏附连接作用有关,但抑制 VE-cadherin 和 β -catenin 的细胞内吞及降解是否可缓解子痫前期的症状尚不清楚,具体的研究有待进一步展开。

综上所述,本研究提示 VE-cadherin 的内吞及 VE-cadherin 和 β -catenin 的内吞和降解可能参与子痫前期的发生发展,且其内吞和降解程度与子痫前期的严重程度(血压)相关,VE-cadherin 和 β -catenin 等黏附连接蛋白在子痫前期病理生理中的重要作用对子痫前期的诊断和治疗策略可能提供有益的参考依据。

参考文献

[1] Cisse CT, Thiam M, Moreau JC. Preeclampsia; current aspects of physiopathology, clinic and treatment [J]. Dakar Med, 2004, 49 (3):152-161.

[2] Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia [J]. Pregnancy Hypertens, 2012, 2(2):72-83.

[3] Tinsley JH, Wu MH, Ma WY, et al. Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in

coronary venular endothelial cells [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (35):24930-24934.

[4] Huo ZH, Kong Y, Meng M, et al. Atorvastatin enhances endothelial adherens junctions through promoting VE-PTP gene transcription and reducing VE-cadherin-Y731 phosphorylation [J]. Vascul Pharmacol, 2019, 117:7-14.

[5] Zhang YZ, Wang L, Zhang JJ, et al. Vascular peroxide 1 promotes ox-LDL-induced programmed necrosis in endothelial cells through a mechanism involving β -catenin signaling [J]. Atherosclerosis, 2018, 274:128-138.

[6] Vićovac L, Aplin JD. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation [J]. Acta Anat (Basel), 1996, 156(3):202-216.

[7] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:64-71.

[8] Xiao JP, Yin YX, Gao YF, et al. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia [J]. Cytokine, 2012, 60(3):856-860.

[9] Zhou Q, Liu HY, Qiao FY, et al. VEGF deficit is involved in endothelium dysfunction in preeclampsia [J]. J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci], 2010, 30(3):370-374.

[10] Guller S. Role of the syncytium in placenta-mediated complications of preeclampsia [J]. Thromb Res, 2009, 124(4):389-392.

[11] Dejana E, Orsenigo F. Endothelial adherens junctions at a glance [J]. J Cell Sci, 2013, 126(12):2545-2549.

[12] Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability [J]. Curr Opin Hematol, 2012, 19(3):218-223.

[13] Brasch J, Harrison OJ, Ahlsen G, et al. Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin, a divergent classical cadherin [J]. J Mol Biol, 2011, 408:57-73.

[14] Oas RG, Nanes BA, Esimai CC, et al. P120-catenin and β -catenin differentially regulate cadherin adhesive function [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24(6):704-714.

[15] Herwig MC, Tsokos M, Hermanns MI, et al. Vascular endothelial cadherin expression in lung specimens of patients with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome and endothelial cell cultures [J]. Pathobiology, 2013, 80(5):245-251.

[16] Stella CL, Sibai BM. Preeclampsia: Diagnosis and management of the atypical presentation [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2006, 19 (7):381-386.

[17] Muschol-Steinmetz C, Friemel A, Keris NN, et al. Function of survivin in trophoblastic cells of the placenta [J]. PLoS One, 2013, 8 (9):e73337.

[18] Jadoon A, Cunningham P, McDermott LC. Regulation of fatty acid binding proteins by hypoxia inducible factors 1 α and 2 α in the placenta; Relevance to pre-eclampsia [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2015, 93:25-29.

收稿日期:2019-01-05 修回日期:2019-02-01 编辑:周永彬