文章编号:1000-5404(2012)19-1949-04

论著

Syncytin 和 GCMa 在特发性胎儿生长受限胎盘中的表达

韩 笑,崔世红,张 婷,张林东,程国梅,赵岚岚 (450052 郑州,郑州大学第三附属医院妇产科)

[摘要] **目的** 探讨 Syncytin 及 glial cells missing(GCMa)在特发性胎儿生长受限(idiopathic fetal growth restriction, IFGR)患者胎盘组织中的表达及意义。**方法** 选取剖宫产分娩的 IFGR 孕妇 32 例为研究组,同期因社会因素剖宫产分娩的健康足月孕妇 30 例作为健康对照组。采用免疫组化 S-P 法和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 2 组胎盘组织中 Syncytin 和 GCMa 的表达。**结果** 免疫组化及 RT-PCR 结果均显示 Syncytin 和 GCMa 在研究组胎盘组织中表达水平低于健康对照组,差异均具有显著统计学意义($P<0.01$)。Syncytin 及 GCMa 在研究组胎盘组织中表达均降低,两者呈正相关($r=0.537$, $P<0.05$)。**结论** Syncytin 与 GCMa 在 IFGR 胎盘组织中均低表达,提示可能在该疾病的发生、发展过程中起重要作用。

[关键词] 特发性胎儿生长受限;合体滋养细胞;Syncytin;GCMa
[中图法分类号] R394.3; R446.8; R714.56 [文献标志码] A

Expression of syncytin and glial cells missing in idiopathic fetal growth restriction placenta

Han Xiao, Cui Shihong, Zhang Ting, Zhang Lindong, Cheng Guomei, Zhao Lanlan (Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of syncytin and glial cells missing (GCMa) in idiopathic fetal growth restriction (IFGR) placenta. **Methods** Thirty-two pregnant women who underwent cesarean delivery due to IFGR placenta served as an experimental group and 30 normal full-term pregnant women who underwent cesarean delivery due to social factors served as a control group in this study. Expressions of syncytin and GCMa in IFGR placenta tissue samples from two groups were detected by immunohistochemistry (IHC) and RT-PCR, respectively. **Results** IHC and RT-PCR showed that the expression levels of syncytin and GCMa were significantly lower in experimental group than in control group ($P<0.01$). The low expression levels of syncytin and GCMa in experimental group were positively correlated with each other ($r=0.537$, $P<0.05$). **Conclusion** The syncytin and GCMa expressions are down-regulated in IFGR placenta tissue, indicating that they play an important role in the occurrence and progress of IFGR placenta.

[**Key words**] idiopathic fetal growth restriction; syncytiotrophoblast; Syncytin; glial cells missing

Supported by the Tackling Project of Science and Technology of Department of Education of Henan Province (2010A320021). Corresponding author: Cui Shihong, E-mail: shihongcui@126.com

胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)是指胎儿受各种不利因素影响,未能达到其遗传增长潜力。表现为足月胎儿出生体质量 <2 500 g,或胎儿体质量低于同孕龄平均体质量的两个标准差,或低于同孕龄正常体质量的第 10 百分位数。其围生儿死亡率是正常体质量儿的 4~6 倍。FGR 患儿远期影响较多,如发育迟缓,心血管系统疾病、糖尿病等比正常体质量儿多见[1]。我国发病率平均为 6.39%,其病因复杂,常见原因包括:孕妇营养不良、胎盘功能障碍、妊娠期高血压疾病、胎儿染色体异常等,但约有 40% 患者病因尚不明确,称之为特发性胎儿生长受限(IFGR)。随着对这一疾病认识的不断深入,人们发现多种因素导致的胎盘生长发育障碍及胎盘免疫病理改变在 IFGR 的发病机制中起着十分重要的作用。Syncytin 和 glial cells missing (GCMa)是参与胎盘滋养细胞分化、融合的重要基因,与胎盘正常形态和功能的维持关系密切,因而可能与 IFGR 的发病密切相关。本研究应用免疫组化和 RT-PCR 方法检测 Syncytin 和 GCMa 在健康妊娠及患 IFGR 孕妇胎盘组织的表达,探讨 Syncytin 及

[基金项目] 河南省教育厅科技攻关项目(2010A320021)
[通信作者] 崔世红,E-mail: shihongcui@126.com

GCMa在IFGR发病中的作用,为IFGR病因的深入研究提供线索,也为今后采取相应的干预措施提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取郑州大学第三附属医院2010年12月至2011年12月住院分娩的孕妇,其中32例诊断为IFGR并行剖宫产分娩的孕妇为研究组,30例健康足月剖宫产分娩的孕妇为健康对照组。胎盘组织采取前均征得产妇知情同意,研究经医院伦理委员会批准。IFGR的诊断标准参照《妇产科学》第7版[2]。

孕妇均为单胎、初产妇、平素月经规律、末次月经清楚;无吸烟、酗酒、长期服药及营养不良史;排除肝肾功能异常;无任何妊娠合并症及并发症;未发现胎儿畸形;孕期无临床感染征象;无宫缩行剖宫产分娩者。2组孕妇的年龄、孕前体质量、孕周、孕次均无统计学意义($P>0.05$),新生儿体质量差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 2组孕妇一般临床资料($\bar{x}\pm s$)

组别	n	年龄(岁)	孕前体质量(kg)	孕周	孕次	新生儿体质量(g)
健康对照组	30	27.37±4.92	57.30±4.63	38.10±1.16	1.47±0.68	3 607±279
研究组	32	26.81±4.79	58.34±4.74	37.94±1.16	1.50±0.72	2 163±148[a]

a:$P<0.05$,与健康对照组比较

1.2 主要试剂

兔抗人Syncytin多克隆抗体(bs-2962R)和兔抗人GCMa多克隆抗体(bs-6306R)均购于北京博奥森生物工程公司,通用型S-P9000免疫组化染色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;RNAiso Plus总RNA提取剂TransZol(ET101)、RT-PCR试剂盒(AE301)、Easy *Taq* DNA聚合酶(AP111)、Trans DNA Marker Ⅰ(BM401)购自北京全式金生物技术有限公司;DEPC水购自Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学法检测Syncytin、GCMa蛋白的表达 2组胎盘处理均按如下操作:胎盘自然娩出后,无菌操作下避开钙化灶于胎盘母体面中央取1 cm×1 cm×1 cm的组织块,立即用0.9%氯化钠液洗净血液后置入10%甲醛溶液中固定,24 h后常规石蜡包埋,5 μm连续切片4张,60 ℃烤箱过夜,37 ℃温箱保存备用。免疫组化采用S-P法,严格按照试剂盒说明进行,微波抗原修复,DAB显色,苏木精复染。以PBS液代替一抗作为阴性对照,胎盘合体滋养细胞中细胞膜和/或细胞质呈棕黄色或黄褐色颗粒者为阳性表达,以阳性区平均灰度值为检测指标,每张切片随机选取5个具有代表意义的高倍镜视野(×400),计算其阳性区平均灰度值。

1.3.2 RT-PCR检测组织Syncytin及GCMa mRNA水平 总RNA提取后,选取合格的mRNA作为模板进行反转录反应,RT-PCR反转录条件严格按照说明书进行操作。PCR引物由北京博大泰克公司合成,Syncytin上游:5′-TAATCTCCCAACTCACCCG-3′,下游:5′-AGAGCCATTCAAACAACGA-3′,扩增产物为455 bp;GCMa上游:5′-GTTAGAAGCTGAGGCAAGAA-3′,下游:5′-TAAAGATTACCCGCTGGAT-3′,扩增产物为612 bp;GAPDH上游:5′-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3′,下游:5′-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3′,扩增产物为138 bp。Syncytin、GCMa两者反应体系均为94 ℃预变性2 min,1个循环;94 ℃变性30 s,退火55 ℃ 30 s,72 ℃延伸2 min,共计35个循环;72 ℃总延伸6 min。GAPDH反应体系中退火为58 ℃ 30 s,其余同上。扩增产物经凝胶电泳后,在D-140图像记录分析系统上进行分析。Syncytin和GCMa的mRNA表达量分别以Syncytin或GCMa扩增DNA条带的灰度值/GAPDH灰度值计算。

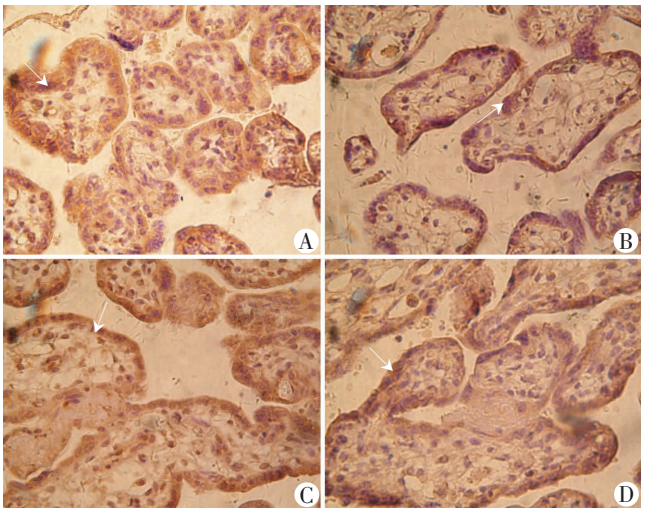
1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件,所得数据以$\bar{x}\pm s$表示,免疫组化及RT-PCR结果在正态性检验和方差齐性检验之后,采用两独立样本的t检验,相关性分析采用Spearman检验。

2 结果

2.1 Syncytin与GCMa在2组胎盘组织中的表达及相关性

2组胎盘组织中Syncytin和GCMa的定位和表达:Syncytin和GCMa在2组胎盘组织中均有不同程度的阳性表达,呈棕黄色或黄褐色染色,均主要定位于胎盘合体滋养细胞细胞膜及细胞质中,同时绒毛膜间质及血管内膜、绒毛外滋养细胞中有少许表达(图1)。Syncytin和GCMa在2组胎盘合体滋养细胞中的表达见表2。合体滋养细胞中,研究组Syncytin和GCMa蛋白的表达水平均低于健康对照组,差异具有显著统计学意义($P<0.01$)。对Syncytin和GCMa蛋白的相关性分析发现,两者表达呈正相关($r=0.537$,$P<0.05$)。



↑:合体滋养细胞

A:GCMa在健康对照组中表达;B:GCMa在研究组中的表达;C:Syncytin在健康对照组中表达;D:Syncytin在研究组中表达

图1 免疫组化观察2组胎盘组织中GCMa与Syncytin的表达 (S-P ×400)

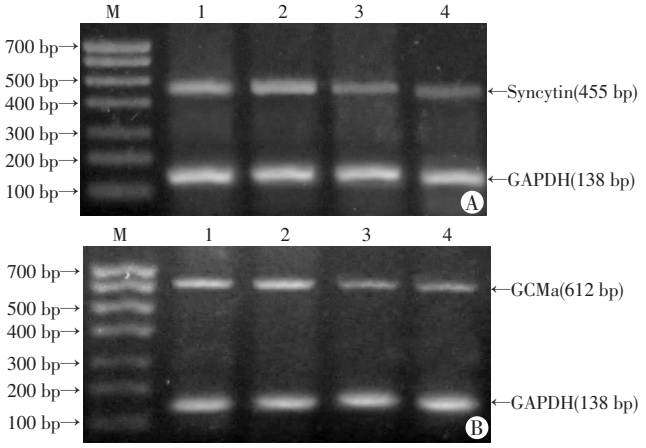
表2 免疫组化及RT-PCR分析Syncytin与GCMa在2组胎盘组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Syncytin		GCMa	
		免疫组化	RT-PCR	免疫组化	RT-PCR
健康对照组	30	148.65±5.94	0.552±0.021	160.45±8.13	0.429±0.017
研究组	32	111.52±8.55[a]	0.125±0.009[a]	121.28±5.41[a]	0.106±0.009[a]

a:$P<0.01$,与健康对照组比较

2.2 Syncytin 与 GCMa mRNA 在 2 组中的表达

如表 2,图 2 所示,在 mRNA 水平,Syncytin 与 GCMa 在 2 组中均有表达,Syncytin 与 GCMa mRNA 表达量在研究组中低于健康对照组,差异具有统计学意义($P<0.01$)。



M:标准;1、2:健康对照组;3、4:研究组
A:Syncytin;B:GCMa

图 2 Syncytin、GCMa mRNA 在 2 组胎盘组织中的表达

3 讨论

3.1 IFGR 病因

IFGR 的病因与自身免疫异常、胎盘功能障碍、感染、糖代谢等多因素有关,多数病例有 2 个或 2 个以上的异常因素[3]。目前关于 IFGR 可能的病因及发病机制报道不多,本课题组相关基础研究发现 IFGR 胎盘组织中 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 蛋白表达增加,可能通过增强母胎非特异性免疫功能参与发病[4];对 IFGR 患者母血和脐血相关因子的研究发现,滋养细胞的过度凋亡可能引起胎盘功能障碍,导致疾病发生[5-6];IFGR 患者胎盘组织中缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)和半胱天冬氨酸蛋白-3(caspase-3)的异常表达,还可能通过缺氧调节通路影响胎盘正常功能,参与 IFGR 的发生[7]。本研究证实与胎盘功能密切相关的 Syncytin 和 GCMa 在 IFGR 的发生、发展过程中起着重要作用,进一步丰富了 IFGR 可能的病因及发病机制,为我们以后进行相应的个体化干预治疗提供理论依据。

3.2 胎盘滋养细胞中 Syncytin 表达意义及与 IFGR 的关系

Syncytin 是人内源性逆转录缺陷病毒(HERV)系列中 HERV-W 编码的糖包膜蛋白,具有融合细胞膜成分的功能,它可以介导细胞滋养层细胞(cytotrophoblast, CT)向合体滋养层细胞(syncytiotrophoblast, ST)的生长分化,对维持正常胎盘的发育和功能有着十分重要的作用[8-10]。有学者通过 Northern blot 技术检测 23 种人体组织 Syncytin 基因的表达,发现其含量在人胎盘合体滋养层细胞中表达最高[9]。法国学者 Malassine 等[10]发现早孕期的胎盘绒毛滋养细胞中可检测到 Syncytin mRNA 及其基因表达产物 Syncytin 蛋白,由此认为 Syncytin 蛋白是人类滋养细胞的特异性标志,在滋养细胞融合中起着重要的作用。

本研究发现 Syncytin 的表达在研究组胎盘组织中明显低于健康对照组,提示 Syncytin 的表达可能与 IFGR 的发病有关。其内在机制可能包括以下三方面:①Syncytin 表达的降低,影响了合体滋养层细胞的形成,进而导致胎盘绒毛的不良发育,使绒毛侵袭子宫血管的能力降低,造成母-胎间不能建立起良好的血液交换体制,胎儿不能从母血中获得充足的营养成分,从而造成胎儿缺血缺氧,使胎儿在宫内发育不良,导致 IFGR 的发生。Ruebner 等[11]通过免疫印迹、免疫组化等技术证明了在 FGR 患者胎盘组织中 Syncytin 蛋白的表达是降低的,并且观察到胎盘合体滋养层细胞排列紊乱、细胞核少,进一步的体外研究发现 Syncytin 表达减少伴随着 CT 融合成 ST 的指数降低。②在正常胎盘形成过程中,生理性的细胞凋亡发挥重要作用,它可以平衡 CT 向 ST 的分化和融合过程。有研究用 Syncytin 转染 HEK293-52 细胞系和 CHO-52 细胞系,证明了 Syncytin 有抗凋亡的作用,可能的作用机制是细胞色素 c 释放的减少导致了 caspase-9 活化降低以及 bcl-2 活化的增加[12-13]。因此,我们推测 Syncytin 蛋白在维持细胞凋亡的平衡中起到了一定的作用。在 IFGR 胎盘中 Syncytin 表达的降低,可能会通过激活凋亡途径引起滋养细胞凋亡增加,使胎盘绒毛侵袭能力下降,出现血管重铸异常和胎盘血流量减少,进而导致胎盘功能障碍[14],同时激活的凋亡途径也会抑制一些维持正常妊娠所必需激素和细胞因子的释放,最终导致 IFGR 的发生。③母-胎间免疫耐受是维持正常妊娠的关键。胎盘合体滋养细胞表面有一层带有负电荷的糖蛋白,与表面同样带有负电荷的母体淋巴细胞互相排斥,这样使滋养细胞表面抗原被覆盖,使胎儿避免母体免疫攻击。Dupressoir 等[15]和 Knerr 等[12]等提到 Syncytin 蛋白在维持母胎间免疫耐受方面有着重要意义,但具体机制仍不详。那么 Syncytin 蛋白在 IFGR 胎盘中表达的降低,有可能会打破这种母-胎天然免疫屏障,介导一系列免疫途径,引起免疫损伤,导致 IFGR 的发生。

3.3 胎盘滋养细胞中 GCMa 表达意义及与 Syncytin、IFGR 的关系

GCM 蛋白是一种具有保守 DNA 结合区域的转录因子。GCM 基因首先在黑腹果蝇突变细胞系中发现,在哺乳类动物中与果蝇 GCM 同源的基因已被确定,被称为 GCMa 和 GCMb。人类的 GCMa 主要在胎盘组织中表达并参与胎盘形成过程[16]。在胎盘发育过程中,滋养细胞的分化和融合是需要多种转录因子介导的,GCMa 是其中必需的转录因子,它能够调控多种相关基因的表达参与合体滋养层细胞的分化和融合[17]。

GCMa 基因的表达可通过 cAMP 途径而活化[18]，同时作为转录因子的 GCMa 能够识别 HERV-W 家族 Syncytin 基因 5'-LTR 上游区域的 2 个 GCMa 结合位点(GBSs)，从而激活 Syncytin 基因的表达并增强 Syncytin 调控滋养细胞融合的作用[11,16,19]。Yu 等[19]实验检测到 GCMa 能够调控 Syncytin 基因的表达，并且刺激Syncytin 调控细胞融合。Wich 等[20]在低氧条件下观察到 GCMa 和 Syncytin 在滋养细胞中的表达均降低，推测在低氧环境下，环磷酸腺苷-蛋白激酶 A(cAMP-PKA)途径活化降低，使 GCMa 基因的表达产物减少，从而对 Syncytin 基因的调控不足造成多种病理妊娠，如子痫前期等。本研究中 IFGR 胎盘中 GCMa 蛋白的表达下降，有可能降低对 Syncytin 基因的调控作用，使其蛋白量表达下降，从而使 Syncytin 蛋白不能发挥正常的生物学功能，导致 IFGR 的发生；另外，GCMa 的低表达还可以降低胎盘生长因子(placental growth factor, PLGF)启动子的活化，使 PLGF 基因表达下调[21]。PLGF 主要在胎盘局部表达，对胎盘滋养细胞和血管内皮细胞的生长和功能起着重要的调节作用，保证胎盘血管网络充分形成。GCMa 表达的降低，可能通过下调 PLGF 表达，造成胎盘血管发育障碍，使血管阻力增加，影响胎盘血流灌注，胎儿不能从母体摄入充足的营养物质，造成 IFGR。

综上所述，IFGR 患者胎盘组织 Syncytin 和 GCMa 的表达降低，可能是 IFGR 发病机制中的关键环节之一，为我们更好地研究 IFGR 病因机制提供了相关线索，也为今后采取相应的预防、治疗干预措施甚至潜在的靶向治疗提供了理论依据。IFGR 的发生是多种异常病理因素综合作用的结果，Syncytin 及 GCMa 在 IFGR 发生、发展中的具体机制仍需要进一步的研究。

参考文献：

[1] Stanley J L, Andersson I J, Hirt C J, *et al*. Effect of the anti-oxidant tempol on fetal growth in a mouse model of fetal growth restriction[J]. Biol Reprod, 2012, 87(1): 25.

[2] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京：人民卫生出版社, 2008: 130-132.

[3] 赵峻, 吴连方. 特发性胎儿生长受限的病因研究[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(5): 229-333.

[4] 崔世红, 田燕妮, 许雅娟, 等. TLR2、TLR4 在特发性胎儿生长受限患者胎盘组织的表达及意义[J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(4): 262-264.

[5] 崔世红, 张婷, 刘萍萍, 等. 激活素 A、Bax 和 XIAP 在特发性胎儿生长受限患者的表达及意义[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(3): 211-214.

[6] 崔世红, 张婷, 韩笑, 等. 肿瘤坏死因子 α、X-连锁凋亡抑制蛋白在特发性胎儿生长受限中的表达[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(2): 107-109.

[7] 崔世红, 刘萍萍, 张婷, 等. HIF-1α 及 caspase-3 在特发性胎儿生长受限胎盘组织中的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(33): 5243-5245.

[8] Knerr I, Huppertz B, Weigel C, *et al*. Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis[J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(8): 581-588.

[9] Mi S, Lee X, Li X, *et al*. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis[J]. Nature, 2000, 403(6771): 785-789.

[10] Malassine A, Blaise S, Handschuh K, *et al*. Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (Syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells[J]. Placenta, 2007, 28(2/3): 185-191.

[11] Ruebner M, Strissel P L, Langbein M, *et al*. Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes[J]. J Mol Med, 2010, 88(11): 1143-1156.

[12] Knerr I, Soder S, Licha E, *et al*. Response of HEK293 and CHO cells overexpressing fusiogenic syncytin-1 to mitochondrion-mediated apoptosis induced by antimycin A[J]. J Cell Biochem, 2008, 105(3): 766-775.

[13] Knerr I, Schnare M, Hermann K, *et al*. Fusiogenic endogenous-retroviral syncytin-1 exerts anti-apoptotic functions in staurosporine-challenged CHO cells[J]. Apoptosis, 2007, 12(1): 37-43.

[14] Longtine M S, Chen B, Odibo A O, *et al*. Villous trophoblast apoptosis is elevated and restricted to cytotrophoblasts in pregnancies complicated by preeclampsia, IUGR, or preeclampsia with IUGR[J]. Placenta, 2012, 33(5): 352-359.

[15] Dupressoir A, Heidmann T. Syncytins - retroviral envelope genes captured for the benefit of placental development[J]. Med Sci (Paris), 2011, 27(2): 163-169.

[16] Chang C W, Chuang H C, Yu C, *et al*. Stimulation of GCMa transcriptional activity by cyclic AMP/protein kinase A signaling is attributed to CBP-mediated acetylation of GCMa[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(19): 8401-8414.

[17] Chou C C, Chang C, Liu J H, *et al*. Small ubiquitin-like modifier modification regulates the DNA binding activity of glial cell missing Drosophila homolog a[J]. J Biol Chem, 2007, 282(37): 27239-27249.

[18] Delidaki M, Gu M, Hein A, *et al*. Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 332(1/2): 213-220.

[19] Yu C, Shen K, Lin M, *et al*. GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion[J]. J Biol Chem, 2002, 277(51): 50062-50068.

[20] Wich C, Kausler S, Dotsch J, *et al*. Syncytin-1 and glial cells missing a: hypoxia-induced deregulated gene expression along with disordered cell fusion in primary term human trophoblasts[J]. Gynecol Obstet Invest, 2009, 68(1): 9-18.

[21] Chang M, Mukherjea D, Gobble R M, *et al*. Glial cell missing 1 regulates placental growth factor (PGF) gene transcription in human trophoblast[J]. Biol Reprod, 2008, 78(5): 841-851.

(收稿:2012-04-05;修回:2012-05-20)

(编辑 吴培红)