维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2003)04 - 0428 - 04

胎盘瘦素 mRNA 表达水平及其与胎儿生长发育的相关性研究

漆洪波[1], 胡丽娜[2], 吴味辛[1]

(1. 重庆医科大学临床学院妇产科,重庆 400016;2. 重庆医科大学第二临床学院妇产科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨胎儿体内瘦素的来源,胎盘组织瘦素 mRNA 的表达水平与胎儿生长发育的关系。方法:收集 52 例正常产妇的胎盘组织,依据其新生儿出生体重分为:大于胎龄儿(LGA)14 例,适于胎龄儿(AGA)21 例,小于胎龄儿(SGA)17 例。采用逆转录聚合酶链反应(RT - PCR)技术结合荧光定量分析,检测胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平,分析胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平与胎盘重量、新生儿体重、新生儿 Ponderal 指数、孕妇体重、孕妇体重指数(BMI)、性别的关系。结果:LGA 胎盘组织瘦素 mRNA 的表达水平高于 AGA($P<0.001$),AGA 胎盘组织瘦素 mRNA 的表达水平高于 SGA($P<0.05$),胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平与胎盘重量($r=0.54$)、新生儿体重($r=0.59$)、新生儿 Ponderal 指数($r=0.56$)呈正相关,与孕妇体重($r=0.21$)和孕妇体重指数($r=0.18$)无明显相关。男婴和女婴胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平的差异无显著性($P>0.05$)。结论:胎盘组织表达和分泌的瘦素是胎儿体内瘦素的来源之一。胎盘瘦素 mRNA 表达水平与胎儿生长发育有关。

【关键词】瘦素;胎盘;胎儿;逆转录聚合酶链反应

【中国图书分类法分类号】R714.51 【文献标识码】A 【收稿日期】2002 - 09 - 10

Leptin - mRNA expression in placental tissues: relationship with fetal growth and development

QI Hongbo, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate whether placental tissues produce leptin and determine the relationship between expression levels of leptin - mRNA in placenta and fetal growth and development. *Methods*: 52 neonates were divided into 3 subgroups: (1) birth weight large for gestational age (LGA) ($n=14$), (2) birth weight appropriate for gestational age (AGA) ($n=21$), (3) birth weight small for gestational age (SGA) ($n=17$). Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR) technique was used to detect human leptin - mRNA derived from placental - RNA. The expression levels of leptin - mRNA were quantitated using fluorescence intensity analysis. The correlations of expression level of placental leptin - mRNA with placental weight, birth weight, newborn Ponderal index (PI), maternal weight, maternal body mass index (BMI) and gender were studied. *Results*: The expression levels of placental leptin - mRNA in LGA infants (119.7 ± 13.0) and SGA infants (76.8 ± 15.1) were significantly higher and lower respectively than those in the AGA infants (94.4 ± 17.4) ($P<0.001$ and 0.005). The significant positive correlations were observed between the leptin - mRNA expression in placenta and placental weight ($r=0.54$), birth weight ($r=0.59$) and Ponderal index ($r=0.56$). There were no correlations between the expression levels of placental leptin - mRNA and maternal weight ($r=0.21$) and maternal BMI ($r=0.18$). The difference in placental leptin - mRNA expression between female and male neonates was statistically not significant. *Conclusions*: The placenta is one of the major sources of leptin in the fetal circulation. We suggest that there are strong associations between the expression levels of placental leptin - mRNA and fetal growth. Placental leptin may play an important role in fetal growth as a regulator. Gender differences are not found in placental leptin - mRNA expression.

【Key words】 Leptin; Placenta; Fetus; Reverse transcription polymerase chain reaction

瘦素(leptin)是由肥胖基因(obese gene, Ob)表达的蛋白产物,瘦素对胎儿生长发育调控是目前研究的热点。瘦素 mRNA 表达水平与胎儿生长发育的关系有待研究,胎儿瘦素的来源尚有争议[1]。除脂肪组织外,胎儿肝脏、骨髓、脾脏及胎盘组织均有肥胖基因 mRNA 的表达[2]。本研究采用逆转录聚

作者介绍:漆洪波(1969 -),男,副教授,博士,主要研究方向:高危妊娠。

维普资讯 http://www.cqvip.com

合酶链反应(RT－PCR)技术结合荧光定量分析,检测胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平,分析其与胎儿生长发育的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择在重庆医科大学两所附属医院住院分娩的正常妊娠妇女 52 例,孕前无肥胖史,均为单胎妊娠,排除妊高征、糖尿病、胎儿窘迫等病理情况。孕周采用月经龄(以 28 天为 1 个月经周期),根据 1987 年中国 15 城市新生儿体格发育测量值标准,分为适于胎龄儿组(appropriate for gestational age, AGA)21 例,男性 9 例、女性 12 例;大于胎龄儿组(large for gestational age, LGA)14 例,男性 8 例,女性 6 例;小于胎龄儿组(small for gestational age, SGA)17 例,男性 10 例,女性 7 例。

产前测定所有孕妇的身高、体重,根据体重指数(body mas、index, BMI) =体重 (kg) /身高 $(m)^2$, 计算孕妇的 BMI,用于判断孕妇的肥胖程度。52 例孕妇平均体重为 66.0±7.4kg,BMI 平均为 26.2±2.7。新生儿出生后立即测量体重(BW)、身长(BL),根据 Ponderal 指数(PI)=体重(g)/身长$(cm)^3 \times 100$,并计算新生儿的 PI,用于判断新生儿的营养状态。52 例新生儿平均体重为 3124±668g,Ponderal 指数平均为 2.6±0.3。

1.2 研究方法

1.2.1 标本的采集 胎盘娩出后,称量胎盘的重量,然后取胎盘组织约 $1cm^3$,生理盐水冲洗,置－20℃保存。

1.2.2 胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平的检测 (1)总 RNA 的分离:采用美国 Promega 公司的高纯度 RNA 分离试剂盒,提取胎盘组织总 RNA,(2)逆转录聚合酶链反应(RT－PCR):采用美国 Promega 公司的 RT－PCR 试剂盒,根据文献报道的人肥胖基因 cDNA 序列,设计一对用于 PCR 扩增的引物[3]。扩增产物的长度为 487bp,引物由上海生工公司合成,核苷酸序列为引物 1:5ATGCATTGGGGAACCCTGTGCGG3′,引物 2:5′ TGAGGTCCAGCTGCCACAGCATG3′。RT－PCR 在 50μl 反应体系中进行,含 RNA 约 2μg,dNTP 各 200μmol,引物 1、2 各 50pmol,$MgSO_4$ 1 mmol,*TfI* DNA 聚合酶和 AMV 逆转录酶各 5U。按 48℃ 45min 进行逆转录,94℃ 2min 灭活逆转录酶和 PCR 预变性,94℃ 30s、60℃ 1min 和 68℃ 2min 完成 30 个循环的 PCR,最后 68℃ 放置 7 分钟。取 10μl 的反应液,在 TAE 缓冲液中进行 1%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5μg/ml、电压 80V)电泳 30min,紫外透射仪下观察结果。(3)PCR 扩增产物的定量:采用溴化乙锭－荧光分光光度法进行。取 20μl PCR 产物,用含 4μg/ml 溴化乙锭的 0.1×TBE 液(Tris 碱、硼酸和 EDTA)稀释至 1ml,在荧光分光光度计上(激发波长 260nm、狭缝宽度 10nm 和散射波长 600nm、狭缝宽度 20nm)测定荧光密度读数值。

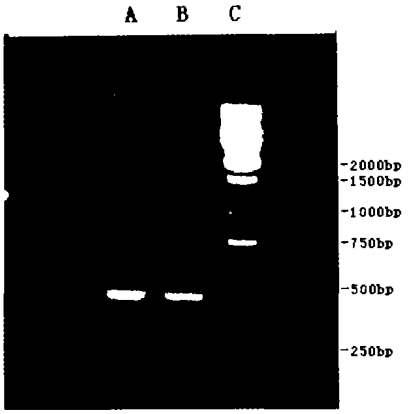
1.3 统计学处理

结果用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 统计学软件包(Windows 8.0)进行 t 检验和线性相关和回归分析,检验水准 a=0.05。

2 结 果

2.1 胎盘组织瘦素 mRNA 的表达

2.1.1 胎盘组织肥胖基因的 RT－PCR 结果 RT－PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳结果显示,在分子量标准 250～500bp 之间对应的位置呈现清晰的电泳带,与理论预计的扩增产物大小(487bp)相符合,见图 1。



Lane A、B: placental tissue

Lane C: 1kb Generuler™ marker

图 1 胎盘瘦素 RT－PCR 产物琼脂糖电泳

2.1.2 PCR 扩增产物的定量 将等量的胎盘总 RNA 进行 RT－PCR,采用人瘦素特异的引物,在限定循环次数的条件下,mRNA 越多,则 PCR 扩增产物量越多;荧光分光光度计读数值越大。PCR 扩增产物荧光密度值代表相应 mRNA 水平。

2.2 3 组新生儿临床资料及瘦素 mRNA 的表达水平比较

LGA 组胎盘重量大于 AGA 组($t=3.1$, $P<0.005$),AGA 组胎盘重量大于 SGA 组($t=6.12$, $P<0.001$);LGA 组胎盘组织瘦素 mRNA 荧光密度读数值大于 AGA 组($t=4.57$, $P<0.001$),AGA 组胎盘组织瘦素 mRNA 荧光密度读数值大于 SGA 组($t=3.35$, $P<0.005$),见表 1。

2.3 男婴和女婴临床资料及瘦素 mRNA 的表达水平比较

男婴和女婴出生体重、新生儿 Ponderal 指数

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 3 组新生儿临床资料及 mRNA 的表达水平比较

组别	例数	新生儿体重(g)	PI	胎盘重量(g)	荧光密度值
LGA	14	3907 ± 337*	2.93 ± 0.13*	645 ± 95**	119.7 ± 13.0*
AGA	21	3194 ± 366	2.54 ± 0.20	562 ± 63	94.7 ± 17.4
SGA	17	2392 ± 223*	2.29 ± 0.11*	448 ± 43*	76.8 ± 15.1**

* 与 AGA 比较，$P<0.001$，** 与 AGA 比较，$P<0.005$

表 2 男婴和发婴临床资料及 mRNA 的表达水平比较

性别	例数	新生儿体重(g)	PI	胎盘重量(g)	荧光密度值
男婴	27	3177 ± 687	2.56 ± 0.32	561 ± 109	99.3 ± 19.8
女婴	25	3066 ± 656	2.57 ± 0.26	536 ± 93	96.9 ± 17.9

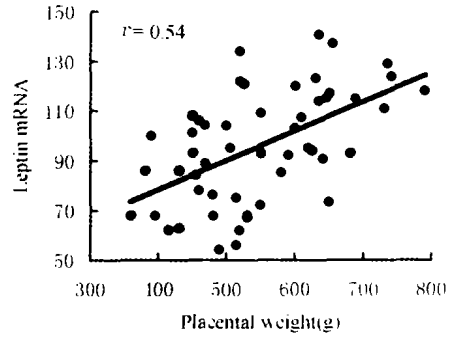


图 2 胎盘重量与胎盘瘦素 mRNA 表达水平的相关性

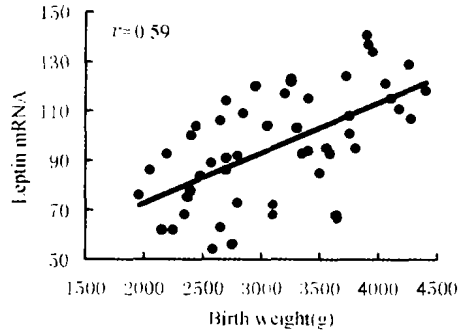


图 3 新生儿体量与胎盘瘦素 mRNA 表达水平的相关性

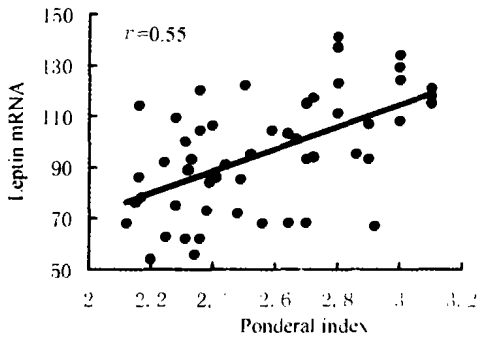


图 4 Ponderal 指数与胎盘 mRNA 表达水平相关性

表 3 胎盘瘦素 mRNA 表达水平的相关分析

相关因素	r	P
胎盘重量(g)	0.54	<0.001
新生儿体重(g)	0.59	<0.001
新生儿 PI	0.55	<0.001
孕妇体重(kg)	0.21	>0.05
BMI	0.18	>0.05

(PI)、胎盘重量及胎盘组织瘦素 mRNA 荧光密度值，差异均无显著性($P>0.05$)，见表 2。

2.4 瘦素 mRNA 表达水平与胎盘重量等因素的相关分析

对胎盘组织瘦素 mRNA 的表达水平与胎盘重量、新生儿体重、新生儿 Ponderal 指数(PI)、孕妇体重和孕妇体重指数(BMI)进行统计学相关分析，结果见表 3、图 2～4。

3 讨 论

瘦素(leptin)是由肥胖基因(obese gene, Ob)表达的蛋白产物，主要由脂肪细胞产生、分泌，进入血液，传递体内脂肪贮存量的信号到中枢神经系统，通过与下丘脑 leptin 受体结合，抑制下丘脑神经肽 Y (Neuropeptide Y, NPY)分泌，导致食欲降低、能量消耗增大，脂肪沉积减少，体重减轻，从而调节体重和能量代谢[4]。

目前人们已发现，瘦素的作用不仅限于增加能量代谢和调节脂肪贮存的范畴。而其与胎儿生长发育的关系日益引起人们的重视。最初的研究曾认为，白色脂肪细胞是瘦素的唯一来源，但随后的研究表明并非如此，脐静脉血瘦素水平高于脐动脉血瘦素水平；胎儿娩出后，来源于胎盘的瘦素中断供应，新生儿瘦素水平在产后 24h 快速下降；瘦素分子量为 16,000，母体产生的瘦素不能通过胎盘屏障进入胎儿血中，均提示胎盘可能是胎儿瘦素产生和分泌的主要来源[5]。

促使胎儿生长发育最重要的因素是营养物质的摄取和利用，这一过程需要多种激素和细胞因子的调控才能实现。胎盘合成许多激素和细胞因子：hCG、孕酮、hPL、胰岛素样生长因子(IGF)等，都对胎儿的生长发育进行调控。瘦素对营养物质的摄取和利用起着关键作用。作为胎盘分泌的激素，瘦素

维普资讯 http://www.cqvip.com

可能影响胎儿营养物质的摄取和利用、调控胎儿的生长发育,可能与胎儿生长发育有着密切关系。同时胎盘功能的状态影响胎儿营养的供给及转化,与胎儿生长发育关系密切。胎盘组织瘦素 mRNA 的表达水平以及与胎儿生长发育的确切关系目前尚有待研究。

本研究结果显示:胎盘组织有瘦素 mRNA 的表达,表明除胎儿自身脂肪组织产生和分泌瘦素外,胎盘也是胎儿瘦素的重要来源。AGA 胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平高于 SGA,LGA 胎盘胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平又高于 AGA。进一步对胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平与胎盘重量、新生儿体重、新生儿 Ponderal 指数(PI)进行相关分析,显示胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平与胎盘重量、新生儿体重、新生儿 Ponderal 指数(PI)正相关。提示胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平与胎儿生长发育相关,胎盘合成和分泌的瘦素可能参与胎儿生长发育的调控。胎儿较重时,胎盘分泌的瘦素增加,进入胎儿体内,抑制下丘脑神经肽 Y(NPY)的分泌,防止胎儿脂肪组织的过度沉积、胎儿体重增长减缓;胎儿体重较低时,胎盘瘦素的产生减少,下丘脑神经肽 Y(NPY)的分泌增加,有利于胎儿脂肪组织的积聚和生长发育,胎儿体重增加,减少低体重儿的发生,从而调节胎儿的生长发育。因此,胎盘瘦素 mRNA 表达水平可以反映胎儿生长发育状况,胎儿生长受限与胎盘瘦素 mRNA 的表达减少有关。

本研究还显示瘦素 mRNA 的表达水平亦与胎盘重量有关。胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平可能与胎盘功能有关,胎盘功能好,胎儿的生长发育良好,胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平高;胎盘功能减退,影响胎儿的生长发育,胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平减少。胎盘组织瘦素 mRNA 的表达水平间接反映胎盘状况(功能和重量)。

有研究发现女胎的血清瘦素水平高于男胎,原因可能与两性脂肪含量(包括脂肪组织瘦素 mRNA 表达水平)、体脂分布以及激素水平差异有关[6]。本研究通过对男婴和女婴胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平的比较,显示胎盘组织瘦素 mRNA 表达水平无性别差异。

参 考 文 献

[1] Gomez L, Carrascosa A, Yeste D, et al. Leptin values in placental cord blood of human newborns with normal intrauterine growth after 30 - 42 weeks of gestation[J]. Horm Res, 1999; 51:10 - 14.

[2] Sabogal JC, Munoz L. Leptin in obstetrics and gynecology: a review[J]. Obstet Gynecol Surv, 2001;56:225 - 230.

[3] Senaris R, Garcia - Caballero T, Casabiell X, et al. Synthesis, of leptin in human placenta[J]. Endocrinology, 1997; 138:4501 - 4504.

[4] Zhang Y, Proence R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese and its human homologue[J]. Nature, 1994; 372:425 - 432.

[5] Kirel B, Tekin N, Tekin B, et al. Cord blood leptin levels: relationship to body weight, body mass index, sex and insulin and cortisol levels of maternal - newborn pairsat delivery [J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2000;13:71 - 77.

[6] Laml T, Preyer O, Schulz - Lobmeyr I, et al. Umbilical venous leptin concentration and gender in newborns[J]. J Soc Gynecol Investig, 2001;8:94 - 97.