

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.16.008

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20220224.1014.002.html\(2022-02-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20220224.1014.002.html(2022-02-28))

生长阻滞特异性蛋白 6 表达与胎儿生长受限的相关性分析*

张奕梅,覃嘉怡,宋鹏书,潘平山[△]

(广西壮族自治区妇幼保健院产科,南宁 530003)

[摘要] 目的 探讨胎盘及外周血中生长阻滞特异性蛋白 6(Gas6)的表达与胎儿生长受限(FGR)的相关性。方法 选取 2020 年 6 月至 2021 年 6 月该院产科收治的 50 例 FGR 孕妇作为试验组,同期选取 50 例新生儿出生体重正常的孕妇作为对照组。收取两组孕妇分娩前外周血及产后胎盘组织。首先通过 HE 染色观察两组胎盘组织内部的病理学差异,酶联免疫吸附试验检测两组孕妇血清 Gas6 的表达水平;然后采用免疫组织化学(IHC)法检测两组胎盘组织中 Gas6 蛋白的表达情况;最后结合 qPCR 技术检测两组胎盘组织中 Gas6 mRNA 的表达。结果 试验组孕妇胎盘组织内部细胞溶解,血管水肿破裂,绒毛间质纤维化及纤维蛋白样坏死,滋养层细胞肿胀,排列混乱。试验组孕妇外周血 Gas6 表达 $[(12.55 \pm 2.34) \text{ pg/mL}]$,明显高于对照组 $[(9.60 \pm 2.52) \text{ pg/mL}]$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,试验组胎盘组织 Gas6 相对表达强度和阳性表达率均明显增加。试验组胎盘组织中 Gas6 mRNA 的表达水平 (1.41 ± 0.23) 明显高于对照组 (1.03 ± 0.04) ,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 通过检测孕妇 Gas6 可初步预测 FGR 的发生。

[关键词] 胎儿生长受限;生长阻滞特异性蛋白 6;胎盘组织**[中图分类号]** R714.43+1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2022)16-2741-04

Correlation between expression of growth retardation specific protein 6 and fetal growth restriction*

ZHANG Yimei, QIN Jiayi, SONG Pengshu, PAN Pingshan[△]

(Department of Obstetrics, Maternal and Child Health Care Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530003, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the correlation between the expression of growth arrest specific protein 6 (Gas6) in placenta and peripheral blood with fetal growth restriction(FGR). **Methods** A total of 50 pregnant women with FGR admitted and treated in the obstetrics department of this hospital from June 2020 to June 2021 were selected as the experimental group, and 50 pregnant women with normal birth weight newborn during the same period were selected as the control group. The peripheral blood and placental tissue before delivery in the two groups were taken. First, the pathological differences in placental tissues of the two groups were observed by HE staining, and the expression level of serum Gas6 in pregnant women of the two groups was detected by ELISA. Then, the expression of Gas6 protein in placental tissues of the two groups was detected by IHC method. Finally, the expression of Gas6 mRNA in the placental tissues of the two groups was detected by qPCR. **Results** The cells in the placental tissues of the experimental group were dissolved, the blood vessels were edema and ruptured, there were villous interstitial fibrosis and fibrinoid necrosis, and the trophoblast cells were swollen and disordered in arrangement. The peripheral blood Gas6 expression value in the experimental group was $(12.55 \pm 2.34) \text{ pg/mL}$, which was significantly higher than $(9.60 \pm 2.52) \text{ pg/mL}$ in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative expression intensity and positive expression rate of Gas6 in the placental tissues of the experimental group were significantly increased. The Gas6 mRNA expression level in the placental tissue of the experimental group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically

* 基金项目:广西壮族自治区医疗卫生适宜技术开发与推广应用项目(S2017059);广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20200001)。作者简介:张奕梅(1971—),副主任医师,硕士,主要从事妊娠期并发症、羊水过少的研究。[△] 通信作者, E-mail: ppingshan@163.com。

significant (1.41 ± 0.23 vs. 1.03 ± 0.04 , $P < 0.05$). **Conclusion** Detecting Gas6 in pregnant women can preliminarily predict the occurrence of FGR.

[Key words] fetal growth restriction; growth retardation specific protein 6; placental tissue

胎儿生长受限(FGR)是指子宫内生长的胎儿的大小和重量减少,其发生率为所有妊娠的 5%~10%。与正常发育的胎儿相比,FGR 胎儿的围生期死亡率至少增加了 10 倍^[1]。FGR 是产科常见并发症之一,不仅出生时 FGR 婴儿有更高的胎儿窒息和神经发育障碍的风险,而且儿童期及青春期体能和智能发育均受影响,成人后更易发生代谢综合征^[2]。FGR 的成因大致可分为三大类:母体因素、胎儿因素和胎盘因素。胎盘因素是 FGR 最常见的病因之一,但其潜在机制尚不清楚^[3]。生长阻滞特异性蛋白 6(Gas6)可表达于胎盘组织、内皮细胞等,是促进血管生成的因子。有研究发现 Gas6 可增强血小板脱颗粒,促进血小板聚集功能,从而介导血栓的形成,Gas6 上调组织因子的表达,启动凝血过程^[4]。

现临床有关胎盘 Gas6 水平检测在 FGR 患者产前诊断中的作用研究尚不多见,鉴于此,本研究通过探讨 FGR 患者胎盘 Gas6 的表达水平,寻找引起 FGR 的相关机制,为指导临床对 FGR 的预防、诊治提供一定的理论与临床依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2020 年 6 月至 2021 年 6 月本院产科诊断为 FGR 孕妇 50 例作为试验组,同期选取 50 例妊娠正常孕妇作为对照组。纳入标准:(1)出生体重低于同孕龄同性别胎儿平均体重两个标准差或第十百分位数或孕 37 周后胎儿出生体重小于 2 500 g;(2)胎龄大于或等于 28 周;(3)自然妊娠且单胎;(4)剖宫产终止妊娠。排除标准:(1)过期妊娠、多胎妊娠或胎儿畸形;(2)合并内、外科疾病,如阑尾炎、血液系统性疾病、高血压、糖尿病等;(3)胎盘肿瘤及胎盘血管瘤;(4)明确脐带因素导致的 FGR;(5)明确胎儿染色体异常导致的 FGR。本研究经本院伦理委员会批准,两组孕妇均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 资料采集

收集孕妇社会人口统计学资料(年龄、孕前体重、身高、教育程度、职业、受孕方式等)和生活习惯(孕期是否抽烟、饮酒等)。记录孕前体重指数(BMI)、脐血流 S/D 值和妊娠期并发症。待分娩后,从住院病历系统收集母婴结局资料。

1.2.2 实验试剂

Gas6 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,ml060423,ml038196)、多聚甲醛固定液(美国 Sigma 公司,P-6148)、Gas6 抗体(美国 Abcam 公司,ab223738)、TRIzol、反转录试

剂盒和荧光定量试剂盒(美国 ThermoFisher 公司,15596026,4368813,A25742)等。引物由上海生工生物技术公司合成,见表 1。

表 1 合成引物

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
Gas6	上游 GAACGGAGAAGACACCACCATC	119
	下游 CCAGGCTGTAGAAGCGCAAG	
GAPDH	上游 TGGGTGTGAACCATGAGAAGT	126
	下游 TGAGTCCTTCCACGATACCAA	

1.2.3 胎盘组织病理学检查

取胎盘母体面中央约 1 cm³ 组织块,用生理盐水漂洗血液,置于 4% 的多聚甲醛液中固定 24 h。然后组织块脱水,行石蜡包埋,切成 4 μm 厚度薄片,放入 37 ℃ 温水表面贴到载玻片上,再依次浸入二甲苯和梯度乙醇脱蜡。蒸馏水冲洗,将载玻片放入苏木精溶液中染色,流水冲洗,放入 37 ℃ 温水中进行反蓝,晾干,中性树胶封固保存,显微镜观察 HE 染色情况。

1.2.4 ELISA 检测外周血 Gas6 表达

采集两组孕妇外周血 3 mL,室温放置 1 h 后 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min,取上清液,使用对应的试剂盒通过 ELISA 检测两组孕妇血清 Gas6 的表达情况,所有操作均严格按试剂盒说明书进行。

1.2.5 免疫组织化学(IHC)检测胎盘组织中 Gas6 蛋白的表达

剪取分娩胎盘母体面约 1 cm³ 组织块,用 PBS 冲洗血液,置于 4% 的多聚甲醛液中固定 24 h。然后组织块脱水,石蜡包埋,切成 4 μm 厚度薄片贴到载玻片上,再依次经过脱蜡,高压修复,3% 双氧水中孵育和封闭。滴加一抗孵育过夜,二抗孵育 20 min,DAB 显色 5 min。苏木素染色 1 min,分化反蓝,梯度乙醇脱水,树胶封片,用电子显微镜观察阳性面积大小。

1.2.6 qPCR 检测胎盘组织中 Gas6 mRNA 的表达

取分娩胎盘母体面约 1 cm³ 组织块,用 PBS 冲洗血液,将组织放在 -80 ℃ 冰箱保存。根据 TRIzol-Reagent 试剂盒提取 RNA,采用 ND2000 分光光度计测定 RNA 浓度,按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA,参照 TaKaRa 公司说明书进行 qPCR。反应程序设置为 95 ℃ 预变性 3 min;95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环;72 ℃ 延伸 2 min。以 GAPDH 为内参,每次检测设定 3 个复孔。根据 PCR 扩增曲线,得到每个样本的循环周期数(Cq 值),使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般资料

两组孕妇均无吸烟/饮酒史。试验组孕妇孕周、新生儿体重均明显少于对照组,脐血流 S/D 值、BMI 值、羊水过少发生率、妊娠期并发症发生率、胎儿窘迫、急诊剖宫产率均明显大于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

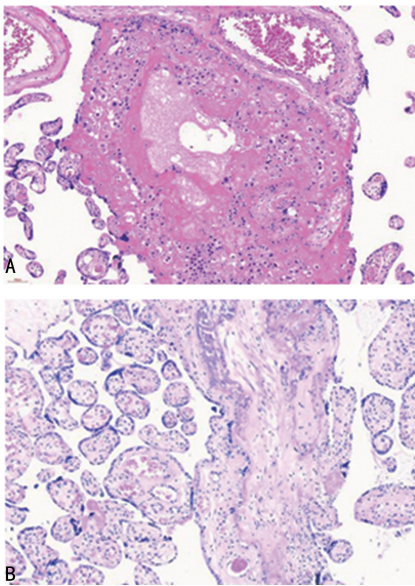
表 2 两组孕妇一般资料比较

项目	对照组 ($n=50$)	试验组 ($n=50$)	t/χ^2	P
年龄($\bar{x} \pm s$, 岁)	28.40 $\pm$ 4.70	29.60 $\pm$ 5.20	2.352	0.681
身高($\bar{x} \pm s$, cm)	158.20 $\pm$ 2.62	157.30 $\pm$ 2.84	6.924	1.474
孕周($\bar{x} \pm s$, 周)	39.00 $\pm$ 0.96	36.90 $\pm$ 1.10	9.900	0.000
脐血流 S/D 值	2.77 $\pm$ 0.26	3.73 $\pm$ 0.37	8.462	0.000
BMI ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	25.32 $\pm$ 1.42	32.8 $\pm$ 1.38	-26.700	0.000
羊水过少	0	47(94.0)	88.679	0.000
妊娠期并发症 ^a [n (%)]	7(4.0)	18(36.0)	6.453	0.020
胎儿窘迫 ^a [n (%)]	1(2.0)	13(26.0)	11.960	0.001
急诊剖宫产 ^a [n (%)]	7(14.0)	25(50.0)	14.890	0.000
新生儿体重($\bar{x} \pm s$, g)	3 317.40 $\pm$ 327.20	2 175.80 $\pm$ 287.20	18.540	0.000

^a: 并发症为糖尿病、高血压、贫血。

2.2 胎盘组织病理学检查结果

对照组胎盘组织内部细胞排列整齐,绒毛组织几乎无破损。试验组胎盘组织内部出现细胞溶解,血管有水肿破裂,绒毛间质纤维化及纤维蛋白样坏死,滋养层细胞肿胀,排列混乱,见图 1。



A: 对照组; B: 试验组。

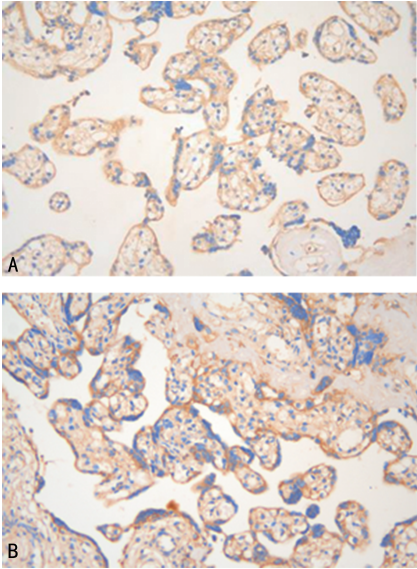
图 1 两组胎盘组织病理检查结果比较(HE 染色, $\times 200$)

2.3 外周血 Gas6 表达水平

对照组孕妇外周血 Gas6 表达水平为(9.60 $\pm$ 2.52)pg/mL,试验组为(12.55 $\pm$ 2.34)pg/mL。试验组孕妇外周血 Gas6 表达水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 胎盘组织中 Gas6 蛋白表达情况

与对照组比较,试验组胎盘组织中 Gas6 蛋白的棕色阳性区域表达水平明显上升,见图 2。



A: 对照组; B: 试验组。

图 2 两组胎盘组织中 Gas6 蛋白表达情况比较(IHC, $\times 200$)

2.5 胎盘组织中 Gas6 mRNA 表达情况

对照组胎盘组织中 Gas6 mRNA 的表达水平为1.03 $\pm$ 0.04,试验组为1.41 $\pm$ 0.23。试验组胎盘组织中 Gas6 mRNA 表达水平较对照组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨 论

FGR 的发生是由于胎盘功能的损害,胎儿没有达到其宫内生长和发育的标准^[5]。FGR 是围生期死亡的第二大原因,造成 30% 的死产婴儿,也是早产和产时窒息的最常见原因。美国妇产科学院将 FGR 定义为胎龄低于 10% 的胎儿体重,并指出其与胎盘循环障碍有关^[6]。胎盘循环障碍多与胎盘发育异常密切相关,FGR 患者的胎盘多存在血管病变、胎盘血液循环阻力过高,导致胎盘血液循环受阻,胎盘血流量降低,引发严重胎儿缺血、缺氧、死亡的不良结局^[7]。

本研究发现 FGR 患者的胎盘组织内部血管破裂溶解,绒毛间质纤维化及纤维蛋白样坏死,滋养层细胞肿胀,排列混乱,说明 FGR 患者的胎盘组织中血管压力过大导致组织损伤出现纤维化状态。纤维化是由于重复的组织损伤和修复过程失调而导致细胞外基质过度沉积的结果。Gas6 基因是一种维生素 k 依赖的生长因子,表达于许多细胞类型,包括血管平滑肌细胞、系膜细胞和内皮细胞^[8]。BELLAN 等^[9]指出 Gas6 在炎症控制和纤维化疾病进展中扮演了重要角

色,推测 Gas6 可能成为减少纤维化损伤的潜在治疗靶点。有研究发现 Gas6 也在血小板中表达,可以加强血小板脱颗粒,促凝聚,促进血栓形成^[10]。一项 Gas6 抗体抑制血小板功能研究表明,Gas6 特异性抗体能有效作用于 Gas6 蛋白结构中负责将其与受体结合的 C 端,从而抑制血小板的活化^[11]。陈宣辰^[12]发现 Gas6 可能通过调节炎症反应、肾功能损害、脂肪形成、血管生成以及血栓形成参与子痫前期的发生、发展。FGR 患者的胎盘多存在血管病变、循环阻力过高等问题,导致胎盘血液循环受阻,胎盘血流量降低,导致 FGR,随着胎盘血液循环阻力的不断升高,可引发严重胎儿缺血、缺氧、死亡的不良结局^[13]。为了验证 Gas6 因子与 FGR 患者发病存在相关性,本研究收集了 FGR 患者分娩前的外周血和分娩后的胎盘组织,检测了 Gas6 在其中的表达水平与正常孕妇相应表达水平的差别,结果发现 Gas6 分子表达与 FGR 存在相关性,Gas6 在 FGR 患者外周血和胎盘组织中均高表达,可以初步推断 Gas6 分子在 FGR 发病和疾病发展中存在一定的协同作用。

为了明确 FGR 症状发生危险性及其发生机制与胎盘组织病理的相关性,本研究收集了 FGR 孕妇与健康孕妇的一般资料和妊娠期情况进行比较,结果显示,FGR 孕妇脐血流 S/D 值、BMI 值均明显高于健康孕妇,说明 FGR 孕妇机体本身出现了异常,如羊水量较少,发生妊娠期高血压、妊娠期糖尿病和严重贫血,这些并发症也均与胎盘发育异常有关。羊水量的多少反映胎盘的功能,羊水过少与宫内慢性缺氧导致胎儿体内的血液重新分布,使得胎儿肾脏血流量下降,所生成的尿液减少有关^[14]。脐血流 S/D 值增加后外周小动脉阻力增加、小动脉发生痉挛,使得胎盘螺旋小动脉的血容量减少,引起胎盘缺血、缺氧和灌注不足、胎盘绒毛膜坏死梗阻均会导致妊娠期高血压^[15]。所以胎盘组织中血管的损伤病变均会导致胎儿对营养物质和氧气摄入不足而发生 FGR。

目前,已知胎盘及脐带、胎儿遗传性疾病等与 FGR 的发病密切相关,但其作用机制复杂,与 FGR 的关系尚未明确。Gas6 有抗血管生成的作用,导致血流供应受阻,本研究中 FGR 孕妇外周血检测 Gas6 表达水平高于正常孕妇。本研究总结,Gas6 可以与超声检测指标、临床诊断相结合,发挥其辅助诊断作用才能有效提高 FGR 的早期诊断效率。

参考文献

[1] 乔娟,陈瑞欣,漆洪波.《2020 版美国母胎医学会专家共识:胎儿生长受限的诊断和管理》解读[J].中国实用妇科与产科杂志,2021,37(6):692-696.

[2] COLELLA M,FRÉROT A,NOVAIS A R B,et al. Neonatal and long-term consequences of fetal growth restriction[J]. Curr Pediatr Rev, 2018,14(4):212-218.

[3] 姬力群,盛晓滨,林经萍,等. 胎儿生长受限的原因分析和孕妇分娩方式的选择[J]. 临床医学研究与实践,2021,6(23):30-32.

[4] 潘平山,覃嘉怡. 胎盘循环与胎儿生长受限的研究进展[J]. 实用妇科内分泌杂志:电子版,2018,5(20):13-14.

[5] 李晔. 防治胎儿生长受限的核心结局指标: COS-GROVE 研究[J]. 中华围产医学杂志,2019(6):433.

[6] Fetal Growth Restriction: ACOG Practice Bulletin, Number 227 [J]. Obstet Gynecol, 2021, 137(2):e16-28.

[7] BURTON G J,JAUNIAUX E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction[J]. Am J Obstet Gynecol,2018,218(2S):S745-761.

[8] WU G,MA Z,CHENG Y,et al. Targeting gas6/TAM in cancer cells and tumor microenvironment [J]. Mol Cancer,2018,17(1):20.

[9] BELLAN M,CITTONE M G,TONELLO S,et al. Gas6/TAM system:a key modulator of the interplay between inflammation and fibrosis [J]. Int J Mol Sci,2019,20(20):5070.

[10] 杜伟平,张瑞. 子痫前期孕妇血清 Gas6、SDF-1 水平变化及其临床意义[J]. 山东医药,2019,59(31):1-4.

[11] LAW L A, GRAHAM D K, DI PAOLA J, et al. GAS6/TAM pathway signaling in hemostasis and thrombosis[J]. Front Med (Lausanne), 2018,5:137.

[12] 陈宣辰. Gas6 与子痫前期的相关性研究[J]. 中国医药指南,2021,19(13):76-77.

[13] ZUR R L, KINGDOM J C, PARKS W T, et al. The placental basis of fetal growth restriction[J]. Obstet Gynecol Clin North Am, 2020,47(1):81-98.

[14] SPINILLO A,CESARI S,BARISELLI S,et al. Placental lesions associated with oligohydramnios in fetal growth restricted (FGR) pregnancies[J]. Placenta,2015,36(5):538-544.

[15] 曹英姿. 定期监测血压联合胎心监护、脐血流阻力 S/D 比值在子痫前期不良围产儿预后中的预测价值分析[J]. 智慧健康,2021,7(8):88-90.