

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.02.015

· 临床研究 ·

自然流产患者绒毛和蜕膜中 ZEB1 的差异性表达及意义*

李三阳¹ 李 怡¹ 程 龙² 王 琚¹ 尹国武^{1Δ}

(1 第四军医大学唐都医院妇产科 陕西 西安 710038; 2 第四军医大学口腔医学系一队 陕西 西安 710038)

摘要 目的:检测锌指结合蛋白(zinc finger E-box-binding protein, ZEB1)在自然流产患者绒毛和蜕膜组织中的差异性表达。**方法:**选取 2010 年 3 月到 2011 年 3 月在我院妇产科门诊进行人工流产的患者,分为正常人工流产(对照组 50 例)和自然流产(实验组 50 例)两组,两组年龄和孕周间差异无统计学意义($P > 0.05$)。用荧光实时定量 PCR(qRT-PCR)技术检测在绒毛和蜕膜组织中 ZEB1 mRNA 的表达量。**结果:**自然流产患者绒毛(0.835 ± 0.047)中 ZEB1 的表达量低于对照组(1.942 ± 0.095),自然流产患者蜕膜(0.65 ± 0.058)中 ZEB1 的表达量低于对照组(1.13 ± 0.084),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**绒毛及蜕膜组织中 ZEB1 的异常表达可能参与自然流产的发生发展过程。

关键词:自然流产;锌指结合蛋白 1;蜕膜;绒毛

中图分类号:R714 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)02-261-04

Differential Expression of ZEB1 in Patients' Villi and Decidual with Spontaneous Abortion*

LI San-yang¹, LI Yi¹, CHENG Long², WANG Jun¹, YIN Guo-wu^{1Δ}

(1 Tangdu Hospital Obstetrics and Gynecology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 A team of the Department of Oral Medicine, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To explore the differential expression of ZEB1 in embryos damage patients decidual and villi tissue. **Methods:** The woman whoes embryos damage were Select (n=50) as the experimental group, the same period in normal early pregnancy voluntarily request the abortion of women (n=50) as a control group, respectively, leaving whichever villi and decidual tissue, using a real-time quantitative PCR (qRT-PCR) of specimens ZEB1 mRNA transcription level analysis. **Results:** Villus samples, ZEB1mRNA expression levels in the experimental group(0.835 ± 0.047) was significantly higher than that in the control group (1.942 ± 0.095). in the decidual specimens, ZEB1 mRNA expression levels of the experimental group (0.65 ± 0.058) was significantly higher than that in the control group (1.13 ± 0.084). **Conclusion:** The differences in the expression of ZEB1 in decidual and villi may be involved in the occurrence and development of the embryos damage.

Key words: Spontaneous abortion; ZEB1; Decidual; Villi

Chinese Library Classification: R714 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)02-261-04

前言

胚胎停育是指妊娠早期胚胎发育自然终止、胚胎丢失的病理过程,其妊娠结局常常为稽留流产和不全流产。近几年,自然流产患者有增加趋势,其原因主要有染色因素^[1]、免疫因素^[2,3]、感染因素、内分泌因素^[4,5]、环境因素等^[6,7]。有研究表明滋养细胞增殖不良、浸润异常可能是导致早期胚胎停育的原因之一^[8]。锌指结合蛋白在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。目前已证实 ZEB1 在肺癌、结肠癌等的浸润转移过程中发挥重要作用,ZEB1 在胚胎停育中的作用目前还没有相关的研究。本文应用荧光 Real time PCR (qRT-PCR)检测 ZEB1 mRNA 在自然流产患者绒毛和蜕膜组织中的表达情况,以探讨 ZEB1 在自然流产中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

按孕天随机选取 2010 年 3 月至 2011 年 3 月在我院妇产科门诊就诊的经 B 超证实为胚胎停育而行清宫术的 50 例患者为实验组。B 超检查表现为妊娠囊内未见胚芽、无胎心搏动,染色体检测均无异常。同时选取同期正常早孕要求人流者 50 例作为对照组。两组患者月经周期规律均为(28 ± 4)天,年龄及孕周均无统计学意义($P > 0.05$)。无自然流、死胎、染色体异常,近 3 个月未服用非甾体类抗炎药,并排除生殖道感染及自身免疫性疾病史,且夫妻双方均否认有遗传病史。

1.2 方法

1.2.1 器械的准备 剪刀镊子碗盘等耐高温器械 180℃ 干烤

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81100440);陕西省攻关项目(2011K15-02-04)

作者简介:李三阳(1985-),女,硕士研究生,医师,主要研究方向:生殖与围产医学

Δ 通讯作者:尹国武,电话:029-84777690, E-mail:tdgwyin@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-04-26 接受日期:2013-05-19)

表 1 不同程度 ACOP 患者临床症状及体征比较 1

Table 1 Different degrees of patients with clinical symptoms and signs comparison

基本资料 Basic detail	正常人流 Control (n=50)	自然流产 Spontaneous abortion (n=50)	t 值	P 值
年龄(year)	30.9± 4.49	28.6± 3.97	0.979	> 0.05
妊娠天数(day)	54.2± 6.2	56.5± 5.4	1.943	> 0.05
孕囊大小(cm)	2.28± 0.35	2.19± 0.38	1.232	> 0.05
妊娠次数(次)	1.6± 0.2	1.5± 0.2	0.974	> 0.05

注: $P > 0.05$ 差异无统计学意义。

8 h, 冻存管 1% DEPC 浸泡过夜, 在烤箱中烤干备用, 准备生理盐水及消毒的纱布。

1.2.2 标本的采集与处理 人流术中收集的绒毛和蜕膜组织用生理反复冲洗然后用消毒的纱布吸干表面的水分放入事先

准备好的冻存管中, 标记清楚迅速放入液氮, 过夜后放入 -80°C 保存备用。

1.2.3 qRT-PCR 反应引物 PCR 反应引物 ZEB1 及内参 GAPDH 的基因序列均有北京奥科设计及合成, 引物序列见表 2。

表 2 RT-PCR 引物序列

Table 2 Real-time PCR primer sequence

例数 Gene	引物序列 (5'-3') Prime sequence	PCR 产物(bp) PCR product
ZEB1	F 5' - GCACCTGAAGAGGACCAGAG-3' R 5' - TGCATCTGGTGTTCATTTT-3'	256
GAPDH	F 5' - CC-ATGTTTCGTCATGGGTGTG-3' R 5' - CAGGGGTGCTAAGCAGT-TGG-3'	296

1.2.4 样本 RNA 的提取 取出 -80°C 保存的绒毛和蜕膜组织, 剪取约 100 g 组织, 放入提前预冷的研钵中, 倒入液氮研磨至粉末状, 加入 1 mL RNAiso (TaKaRa 大连宝生), 严格按照试剂说明书进行操作, 提取的沉淀用 DEPC 水稀释, 吸取 1 μL 样本置于紫外分光光度计中检测 260 nm 和 280 nm 吸光光度值 (OD 值), OD 值在 1.8-2.0 之间, 表明 RNA 的质量好。

1.2.5 PCR 反应体系 应用 TaKaRa (大连宝生) 公司的 SYS-BII 反应液进行试验, 上下游引物各 1 μL , DNA 模板 1 μL , SYSB11 μL , 加 DEPC 水至 25 μL 。反应条件: 95°C 5 min, 95°C 30 s 57°C 30 s 72°C 30 s 30 个循环, 72°C 5 min。

1.3 统计学处理

用 SPSS13.0 软件分析数据, 组间差异比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常人流及自然流产患者绒毛和蜕膜组织中 ZEB1 mRNA 的表达

实验组绒毛和蜕膜中 ZEB1 的表达量低于对照组, 差异具有统计学意义 (蜕膜 $t=33.33$ $P < 0.05$, 绒毛 $t=73.85$, $P < 0.05$)。 (见表 3)。

表 3 ZEB1 在不同组间绒毛和蜕膜中的表达 ($\bar{X} \pm \text{SD}$)Table 3 The expression of ZEB1 between villi and decidual indifferent group ($\bar{X} \pm \text{SD}$)

组织来源 Tissue sources	组别 Groups	例数(n) Cases	ZEB1/GAPDH
蜕膜 Decidual 绒毛 Villi	实验组 Experimental group	50	0.65± 0.058*
	对照组 Control group	50	1.13± 0.084
	实验组 Experimental group	50	0.835± 0.047*
	对照组 Control group	50	1.942± 0.095

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比。

2.2 qRT-PCR 结果验证

qRT-PCR 可能存在假阳性结果, 我们用凝胶成像仪验证 qRT-PCR 结果, 跑胶显示目的条带在预期条带处。应用软件 Image 进行灰度分析, 以目的基因的灰度值对应 GAPDH 的灰

度值之比作为该标本中 mRNA 的相对表达量, 以此比值进行半定量统计分析。其结果与 RT-PCR 结果相一致。

3 讨论

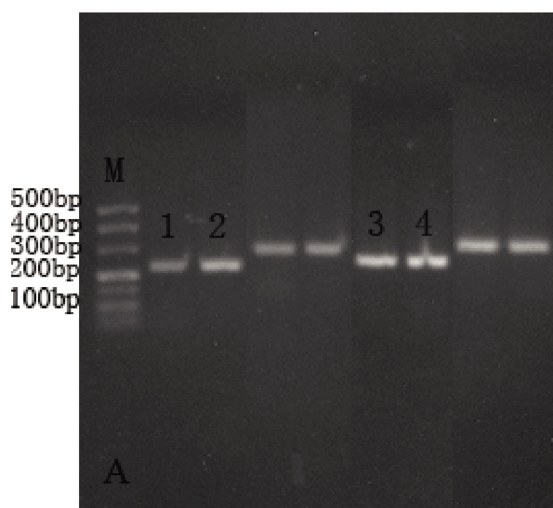


图 1 绒毛 (Fig.1 Villi)

A 自然流产与正常人流绒毛中 ZEB1 RT-PCR 结果后验证; M: marker 1、2 为自然流产者 3、4 为正常人流者

B 自然流产与正常人流蜕膜中 ZEB1 RT-PCR 结果后验证; M: marker 1、2 为自然流产者 3、4 为正常人流者

ZEB1 的分子量为 256bp GAPDH 分子量为 296bp

结果显示 ZEB1 在 256bp 出有清晰的条带, 在自然流产患者蜕膜和绒毛中 ZEB1 的表达量低于正常人工流产患者, 其结果与 RT-PCR 结果相一致。

A The verification of ZEB1 RT-PCR results in Spontaneous and the normal abortion villi tissues.

M: marker 1、2 Spontaneous abortion 3、4 normal abortion

B The verification of ZEB1 RT-PCR results in Spontaneous and the normal abortion decidual tissues.

M: marker 1、2 Spontaneous abortion 3、4 normal abortion

ZEB1 Molecular weight 256bp GAPDH Molecular weight 296bp

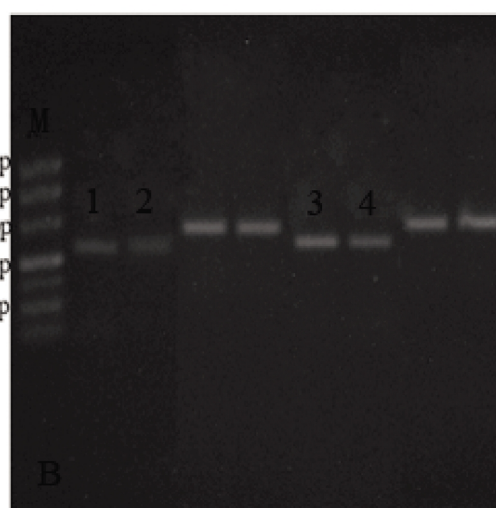


图 2 蜕膜 (Fig.2 Decidual)

ZEB1 是指含有通过结合 Zn^{2+} 稳定的短的可以自我折叠形成“手指”结构的一类蛋白质, 由于其自身的结构特点, 可以选择性的结合特异地靶结构, 使锌指蛋白在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用^[9-11]。ZEB1 是上皮向间质转换 (epithelial-mesenchymal transitions, EMT) 诱导基因之一, 在基因的表达调控、细胞分化、胚胎发育等生命过程中发挥重要作用。EMT 是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程。有文献报道, 在胚胎发育的早期阶段, 胚胎的植入及早期胎盘的形成都和 EMT 相关^[12-13]。在 EMT 过程中上皮细胞获得成纤维细胞的特性, 如细胞极性丧失、细胞间粘着降低、运动性增强。通过 EMT, 上皮细胞失去了极性, 失去了与基底膜的连接等上皮表型, 可获得较高的迁移与侵袭、抗凋亡和降解细胞外基质的能力等间质表型。ZEB1 主要在 EMT 的形成过程中起关键作用, 因此被称为 EMT 控制基因^[14-15]。近年来, 大量的研究结果表明, ZEB1 在生理和病理条件下都参与了 EMT 的调节过程, ZEB 家族成员能在转录水平调节 E-钙粘蛋白等细胞粘附分子或细胞极性分子的表达, 增强细胞的迁移能力, 进而影响 EMT 的发生与维持^[16]。

胚胎的成功着床取决于胚泡的侵入性和子宫内膜的容受性, 这两个方面与细胞的分化和发育状态相关^[7]。胚胎植入母体后, 滋养细胞与子宫内膜细胞、滋养细胞与细胞外基质粘附及相互作用在胚胎发育过程中起重要作用。胚泡外围的滋养细胞外胚层细胞经过 EMT 使胚胎侵入到子宫内膜并锚定在胎盘上, 利于母体和胎儿之间进行营养和气体交换^[17], 合体滋养层细胞主要是以上皮细胞的形式存在, 而绒毛外滋养层细胞则经

历 EMT 过程, 使其获得迁移和侵入的特性, 从而可深度侵入到母体蜕膜基质和血管中, 这个过程使得胎儿与母体之间建立联系, 完成了母胎之间的物质交换。这个过程对于妊娠的成功起至关重要的作用^[18]。本研究用 Real time PCR 技术检测出 ZEB1 在胚胎停育绒毛中低表达。新近的研究报道: ZEB1 促进肿瘤的侵袭及转移^[19]。在乳腺癌、结肠癌中均出现 ZEB1 的表达增加^[20]。有研究用慢病毒 RNA 干扰技术敲除骨转移性非小细胞肺癌细胞 (SBC-5 株) 的 ZEB1 表达, 发现 siRNA 干扰 ZEB1 后能抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移能力。滋养细胞的植入与肿瘤侵袭作用在机制上有许多相似之处。ZEB1 的低表达导致 EMT 受到抑制, 细胞的浸润能力明显下降。因此我们推测 ZEB1 在胚胎停育患者绒毛中的低表达引起滋养细胞浸润能力下降, 无法有效完成血管重铸, 造成胎盘浅着床, 从而导致自然流产等妊娠结局。

子宫中早期蜕膜化过程中发生的 MET 可使胚胎更好地锚定在子宫中。子宫内膜的蜕膜和蜕膜功能的正常表达, 对胚胎着床、妊娠建立与维持, 以及分娩发动均起着极为重要的作用。ZEB1 通过影响 E 钙蛋白诱导 EMT 的发生, E 钙蛋白即为子宫内膜细胞表达的一种粘附分子, 在钙离子存在的条件下, 通过胞外区结构域之间的相互作用介导细胞与细胞的粘附。刘芸等^[21]证明在增殖期到分泌期, 子宫内膜腺上皮细胞表达 E 钙蛋白逐渐增加, 分泌晚期及蜕膜期表达降低, 揭示 E 钙蛋白与子宫内膜容受性有密切关系。本研究用实时 Real time PCR 技术检测出 ZEB1 在胚胎停育绒毛中低表达, ZEB1 在蜕膜中的低表达, 可能通过影响 E 钙蛋白诱导 EMT 的发生进而影响子宫

内膜的容受性,从而参与了的发生。

妊娠早期绒毛滋养层细胞对子宫内膜的浸润性及子宫内膜的容受性决定着妊娠胚胎能否成功着床。绒毛滋养层细胞对子宫内膜的浸润不足,可能引起流产,侵袭过度可能会引发绒毛癌。ZEB1在绒毛及蜕膜组织中的低表达,导致滋养细胞浸润深度不足同时通过影响E-钙蛋白进而影响子宫内膜的容受性,从而参与自然流产的发生。

参考文献(References)

- [1] Kroon B, Harrison K, Martin N, et al. Miscarriage karyotype and its relationship with maternal body mass index, age and mode of conception[J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(5): 1827-1829
- [2] Xu L, Liu X M, Zhang H Y, et al. Relationship between three thmbophilic gene mutations and unexplained recurrent early spontaneous abortion [J]. *Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2007, 42(3): 180-183
- [3] Gioman C, Coulam C, Jeyendran R S, et al. Association of apolipoprotein E polymorphisms and l-cuTent pregnancy loss [J]. *Fertil Steril*, 2010, 93(4): e19
- [4] Berger D S, Hogge W A, Barmada M M, et al. Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion [J]. *Reprod Sci*, 2010, 17(4): 331-338
- [5] Zammiti W, Mtiroui N, Khairi H, et al. Associations between tumor necrosis factor- α and lymphotoxin- α poly-morphisms and idiopathic recurrent miscarriage[J]. *Reproduction*, 2008, 135(3): 397-403
- [6] Schweikert A, Rau T, Berkholz A, et al. Association of progesterone receptor polymorphism with recurrent abortions [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2004, 113(1): 67-72
- [7] Tiefert C H, Ying Z H, Sun Qian, et al. Study of relationship between anticardiolipin antibody and recurrent miscarriages [J]. *Chin J Birth Health Heredity*, 2008, 16(1): 67-68
- [8] Campbell S, Rowe J, Jackson CJ, et al. In vitro migration of cytotrophoblasts through a decidual endothelial cell monolayer: the role of matrix metalloproteinases[J]. *Placenta*, 2003, 24(4): 306-315
- [9] Murray D, Precht P, Balakir R, et al The transcription factor deltaEF1 is inversely expressed with Type II collagen mRNA and can repress Col2a1 promoter activity in transfected chondrocytes [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(5): 3610-3618
- [10] Remacle JE, Kraft H, Lerchner W, et al. New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites[J]. *EMBOJ*, 1999, 18(18): 5073-5084
- [11] Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): 6566-6578
- [12] Vicovac L, and Aplin J.D. Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation[J]. *Acta Anat. (Basel)*, 1996, 156 (3): 202-216
- [13] Liu Y, El-Naggar S, Darling DS, et al. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence [J]. *Development*, 2008, 135(3): 579-588
- [14] C. Vandewalle, F. Van Roy, G. Berx. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(5): 773-787
- [15] E. Batlle, E. Sancho, C. Franci, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells [J]. *Nat. Cell Bio*, 2000, 2(2): 84-89
- [16] 沈灵, 辛天驰, 李明发. ZEB家族调节上皮-间质转化的作用[J]. *细胞生物学*, 2009, 31(6): 779-184
Shen Ling, Xin Tian-chi, Li Ming-fa. The function of ZEB family in the epithelial-mesenchymal transition. [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2009, 31(6): 779-184
- [17] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Clin Invest*, 2009, 119(6): 1420-1428
- [18] Fu J, Lv X, Lin H, et al. Ubiquitin ligase cullin7 induces epithelial-mesenchymal transition in human choriocarcinoma cells [J]. *Biol Chem*, 2010, 285(14): 10870-10879
- [19] Chang CJ, Chao CH, Xia W, et al. P53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 372-323
- [20] Spaderna S, Schmalhofer O, Hlubek F, et al. A transient, EMT-linked loss of basement membranes indicates metastasis and poor survival in colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3): 830-840
- [21] 刘芸, 陈世玲, 邢福祺, 等. 钙粘蛋白在子宫内膜及蜕膜的表达 [J]. *福州总医院学报*, 2002, 9(2): 87-89
Liu Yun, Chen Shi-ling, Xing Fu-qi, et al. Cadherin expression in Endometrium and deciduas[J]. *General hospital of Fuzhou*, 2002, 9(2): 87-89