

①

解整合素-金属蛋白酶 12 在子痫前期患者胎盘组织中的表达及意义

唐 婕¹, 周昌菊¹, 谷永红², 马 薇¹

(中南大学湘雅三医院 1. 产科; 2. 病理科, 长沙 410013)

[摘要] 目的:探讨子痫前期患者胎盘组织中解整合素-金属蛋白酶 12(a disintegrin and metalloproteinase 12, ADAM12)蛋白和 mRNA 表达水平变化及其意义。方法 采用免疫组织化学方法检测 31 例子痫前期患者(子痫前期组包括子痫前期重度 16 例、子痫前期轻度 15 例)和 20 例正常足月孕妇(对照组)胎盘组织中 ADAM12 的蛋白表达水平。采用杂交组化方法检测各组孕妇胎盘组织中 ADAM12-S 和 ADAM12-L 的 mRNA 表达水平。结果:子痫前期组孕妇胎盘组织中 ADAM12 蛋白表达水平为 0.56 ± 0.14 , 对照组的为 0.39 ± 0.14 , 两者相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);子痫前期重度组与轻度组比较,差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。子痫前期组孕妇胎盘组织中 ADAM12-S mRNA 水平为 0.52 ± 0.09 , 对照组为 0.40 ± 0.15 , 两者相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$);子痫前期重度组与轻度组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);子痫前期组孕妇胎盘组织中 ADAM12-L mRNA 水平为 0.51 ± 0.09 , 对照组为 0.42 ± 0.18 , 两者相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);子痫前期重度组与轻度组比较,差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。结论:ADAM12 蛋白和 mRNA 水平在胎盘组织中的表达增高可能在子痫前期的发病过程中起重要作用。

[关键词] 子痫前期; 解整合素-金属蛋白酶 12; 免疫组化; 杂交组化

[中图分类号] R714.253 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2007)06-0481-04

Expression and significance of a disintegrin and metalloproteinase 12 in placenta of preeclampsia

TANG Jie¹, ZHOU Chang-ju¹, GU Yong-hong², MA Wei¹

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective** To study the mRNA and protein expressions of the ADAM12 in placenta of preeclampsia patients and their roles on pathogenesis of preeclampsia. **Methods** Immunohistochemistry and in-situ hybridization were used to investigate the expression of ADAM protein, ADAM12-S mRNA, and ADAM12-L mRNA in placenta of 31 women with preeclampsia (including 15 cases of mild preeclampsia, 16 cases of severe preeclampsia) and 20 cases normal full term pregnant women, respectively. **Results** The protein expressions of ADAM12 were significantly increased in placenta of preeclampsia patients ($P < 0.05$); but there was no significant difference between severe and mild preeclampsia groups ($P > 0.05$). The expression of ADAM12-L mRNA were significantly increased in placenta of preeclampsia patients ($P < 0.05$); and there was also no significant difference between severe and mild preeclampsia groups ($P > 0.05$). The expressions of ADAM12-S mRNA were significantly increased in placenta of preeclampsia patients ($P < 0.01$); and there were significantly difference between severe and mild preeclampsia groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The high expression of ADAM12 plays a crucial

①收稿日期:2007-02-02 修回日期:2007-04-16

作者简介:唐婕(1981-),女,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事围产方面的研究。

通讯作者:周昌菊, E-mail: zhouchanju8816@yahoo.com.cn

基金项目:湖南省卫生厅科研基金(B2006-084) This work was supported by grants from Hunan Provincial Public Health Bureau (B2006-084)

role in the pathogenesis of preeclampsia, and ADAM12-S directly connects with the level of preeclampsia.

[Key words] preeclampsia; a disintegrin and metalloproteinase 12; immunohistochemistry; in-situ hybridization

[Int J Pathol Clin Med, 2007,27(6):0481-04]

子痫前期是妊娠期特有的疾病,对母儿造成极大的危害,其发病的中心环节为滋养细胞功能紊乱。解整合素-金属蛋白酶12(a disintegrin and metalloproteinase 12; meltrin- α , ADAM12)也叫融合素- α ,是一个拥有多功能区域的蛋白,具有金属蛋白酶的特性,在细胞分化、黏附、融合和相互作用过程中发挥重要作用^[1],研究发现ADAM12在胎盘组织中有丰富的表达,参与了滋养细胞的生长、分化、融合及迁移等环节^[2],与子痫前期的发病关系密切。本研究通过比较ADAM12蛋白及mRNA在子痫前期患者胎盘组织中的表达水平变化,探讨其在子痫前期发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取2006年3月至12月在湘雅三医院住院分娩的子痫前期患者31例(其中子痫前期重度患者16例、子痫前期轻度患者15例)及正常足月孕妇20例,均为单胎妊娠。子痫前期组和对照组的年龄分别为23~34(30.56 \pm 3.26)岁、24~31(27.22 \pm 2.89)岁,差异无统计学意义($P > 0.05$);孕周分别为32⁺⁶~39⁺²(37.86 \pm 5.02)周、37⁺²~39⁺⁶(38.35 \pm 1.89)周,差异无统计学意义($P > 0.05$)。子痫前期的诊断标准按照全国高等学校教材《妇产科学》第6版妊娠期高血压疾病分类——子痫前期诊断标准^[3],排除妊娠期高血压、妊娠合并糖尿病、心脏病及肝肾疾病等。

1.2 试剂与仪器 试剂ADAM12为羊抗人单克隆抗体(晶美生物试剂有限公司),SABC试剂盒和DAB试剂盒,ADAM12-S,ADAM12-L杂交组织化学试剂盒(武汉博士德公司)。在光学显微镜下随机选取5个高倍视野($\times 400$),Motic B₅显微摄像系统(麦克奥迪实业集团公司)摄像,MIAS医学图象分析系统(北航生物软件公司)计算每个视野的平均吸光值(A)。

1.3 标本处理 取材方法参照Sabine Gack^[4]的方法,即胎盘娩出后15 min内取胎盘中央绒毛丰富部位母体面胎盘组织,避开出血、坏死、钙化的地方,

大小约1 cm \times 1 cm \times 1.5 cm(深度达到1 cm以上)。生理盐水清洗组织3次,4%的甲醛固定24~48 h后,石蜡包埋,制成4 μ m厚的切片备用。

1.4 免疫组织化学法检测胎盘组织中ADAM12蛋白的表达 应用SABC免疫组织化学法,一抗浓度为1:100,用PBS代替一抗作为空白对照,已知阳性的骨巨细胞瘤组织切片作为阳性对照。阳性结果根据Valm判断标准:标本组织细胞质和细胞膜中有黄色和(或)浅黄色颗粒^[5]。

1.5 杂交组化方法检测胎盘组织中ADAM12-S mRNA及ADAM12-L mRNA的表达水平 实验步骤按照试剂盒操作说明进行。阳性结果判断标准:标本组织细胞核和细胞质中有黄色和(或)浅黄色颗粒。

1.6 统计学处理 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS13.0统计软件包进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组孕妇胎盘组织中ADAM12蛋白的表达水平 胎盘组织中ADAM12蛋白表达阳性信号位于细胞滋养细胞和合体滋养细胞的胞浆和胞膜内,合体滋养细胞的细胞膜表达尤为丰富(图1)。子痫前期组的吸光值为0.56 \pm 0.14,正常组的吸光值为0.39 \pm 0.14,两组差异具有统计学意义($P < 0.05$)。子痫前期重度组的吸光值为0.57 \pm 0.12,子痫前期轻度组的吸光值为0.54 \pm 0.16,两者差异无统计学意义($P > 0.05$)(表1)。

表1 胎盘组织中ADAM12蛋白表达水平的比较

Table 1 Comparison of expression level of ADAM12 protein in placenta between preeclampsia women and control group

组别	<i>n</i>	吸光值(A)
子痫前期组	31	0.56 \pm 0.14*
重度	16	0.57 \pm 0.12
轻度	15	0.54 \pm 0.16
对照组	20	0.39 \pm 0.14

与对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 各组孕妇胎盘组织中 ADAM12-S mRNA 的表达水平 胎盘组织中 ADAM12-S mRNA 的阳性信号位于细胞滋养细胞和合体滋养细胞的细胞核和细胞浆内(图2)。子痫前期组 ADAM12-S mRNA 的表达水平为 0.52 ± 0.09 ,对照组的表达水平为 0.40 ± 0.14 ,两者相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。子痫前期重度的表达水平为 0.55 ± 0.10 ,子痫前期轻度的表达水平为 0.49 ± 0.08 ,两者相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

2.3 各组孕妇胎盘组织 ADAM12-L mRNA 表达水平的分析 胎盘组织中 ADAM12-L mRNA 的阳性信号位于细胞滋养细胞和合体滋养细胞的细胞核和细胞浆内(图3)。子痫前期组孕妇胎盘组织中 ADAM12-L mRNA 水平为 0.51 ± 0.09 ,对照组为 $0.42 \pm$

0.18 ,两者相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。子痫前期重度组患者为 0.52 ± 0.10 ,子痫前期轻度组为 0.48 ± 0.23 ,两者相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)(表3)。

表2 胎盘组织中 ADAM12-S mRNA 表达水平的比较
Table 2 Comparison of expression level of ADAM12-S mRNA in placenta between preeclampsia woen and control group

组别	n	吸光值(A)
子痫前期组	31	$0.52 \pm 0.09^{**}$
重度	16	$0.55 \pm 0.10^{\Delta}$
轻度	15	0.49 ± 0.08
对照组	20	0.40 ± 0.14

与对照组比较, ** $P < 0.01$;与子痫前期轻度组比较, $\Delta P < 0.05$

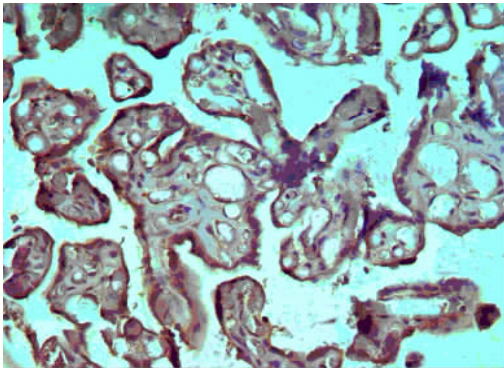


图1 ADAM12 蛋白在子痫前期重度胎盘组织中的表达 ($\times 400$)

Fig. 1 Expression of ADAM12 protein in placenta of severe preeclampsia ($\times 400$)

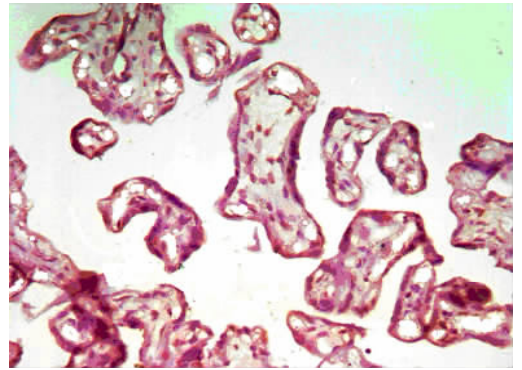


图2 ADAM12-S mRNA 在子痫前期重度胎盘组织中的表达 ($\times 400$)

Fig. 2 Expression of ADAM12-S mRNA in placenta of severe preeclampsia ($\times 400$)

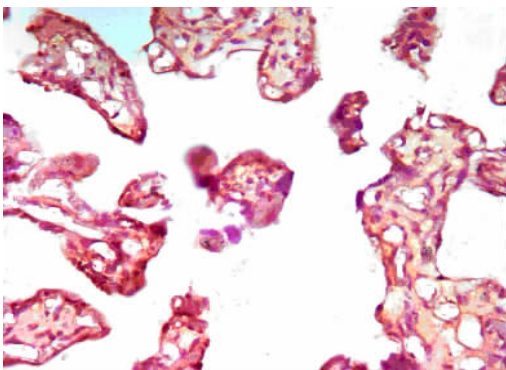


图3 ADAM12-L mRNA 在子痫前期重度胎盘组织中的表达 ($\times 400$)

Fig. 3 Expression of ADAM12-S mRNA in placenta of severe preeclampsia ($\times 400$)

表3 胎盘组织中 ADAM12-L mRNA 表达水平的比较

Table 3 Comparison of expression level of ADAM12-L mRNA in placenta between preeclampsia woen and control group

组别	n	吸光值(A)
子痫前期组	31	$0.51 \pm 0.09^*$
重度	16	0.52 ± 0.10
轻度	15	0.48 ± 0.23
对照组	20	0.42 ± 0.18

与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨 论

人的 ADAM12 具有两种形式,一种为膜结合/可溶性形式,称为 ADAM12-L;另一种为分泌性/可

溶性形式,称为 ADAM12-S。ADAM12-L 具有水解肝素表皮生长因子 (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF) 的功能^[5]。Richard 等^[6]发现,妊娠早期 HB-EGF 不仅具有提高滋养细胞增殖和浸润的能力,而且能够提高滋养细胞对缺氧的耐受性和促进血管形成。Leach 等^[5]研究表明,HB-EGF 在子痫前期胎盘组织中表达明显减少。本研究发现子痫前期胎盘中 ADAM12-L mRNA 水平明显高于对照组,由此推断 ADAM12-L 在胎盘组织中表达水平升高,可能导致了 HB-EGF 的脱落,使滋养细胞的浸润能力下降,参与子痫前期的发病过程。ADAM12-S 脱掉前结构域后具有金属蛋白酶的特性,Shi 等^[7]证实 ADAM12-S 为妊娠晚期孕母血清中胰岛素样生长因子结合蛋白-3 (insulin-like growth factor-binding protein-3, IGFBP-3) 主要的水解蛋白酶。IGFBP-3 能够调节血中游离胰岛素生长因子-1 (insulin-like growth factor, IGF-1),与 IGF-1 结合使其缓慢释放从而提高 IGF-1 的作用^[8]。IGF-1 可促进滋养细胞黏附到细胞外基质中,并呈剂量依赖性^[9],胎盘绒毛间叶细胞产生的 IGF-1 通过旁分泌方式刺激滋养细胞侵蚀^[10]。IGF-1 的降低导致滋养细胞浸润能力下降,进而引起螺旋小动脉重铸过程障碍,胎盘“浅着床”。ADAM12-S 将 IGFBP-3 水解为无活性的小分子片段后,将大大降低 IGF-1 在体内的水平及作用。本研究结果显示子痫前期胎盘组织中的 ADAM12-S mRNA 水平显著高于对照组,由此推测,子痫前期胎盘组织中 ADAM12-S 表达水平升高,使 IGFBP-3/IGF-1 比例失衡,从而影响 IGF-1 发挥功能。同时发现子痫前期重度组胎盘组织中的 ADAM12-S mRNA 水平高与子痫前期轻度组,表明 ADAM12-S 的表达水平与子痫前期的严重程度存在一定的相关性,提示胎盘组织中 ADAM12-S 水平可以作为判断子痫前期严重程度的辅助指标。本研究比较胎盘组织中子痫前期重度组与轻度组之间的 ADAM12 蛋白表达水平及 ADAM12-L mRNA 表达水平,结果无明显差异,提示 ADAM12-L 与 ADAM12-S 在子痫前期胎盘组织中表达变化程度并不一致;胎盘组织中 ADAM12 蛋白定位在滋养细胞及合体滋养细胞的细胞质和细胞膜上,其他部位表达缺失,与 Ito 等^[11]报道一致。本研究同时发现 ADAM12-S mRNA, ADAM12-L mRNA 也定位于滋养细胞,胎盘组织其他部位无表达,结合 ADAM12 本身具有介导细胞融合和黏附功能,提示 ADAM12 的表达异常可能直接参与了滋养细胞的融合和迁移过程。

综上所述,ADAM12 可能从多个途径影响滋养

细胞的生长、浸润能力,在子痫前期的发病过程中发挥了重要作用,为进一步深入研究抗细胞因子抗体、抗黏附分子抗体指导临床治疗子痫前期提供了新的思路。有学者认为孕妇血清中的 ADAM12-S 有望成为一个有效、无创预测子痫前期发生的候选因子。但是目前国外对子痫前期孕妇血清中 ADAM12-S 表达变化研究结果并不完全一致^[4,12],可能与不同学者选取不同妊娠阶段的孕妇作为研究对象有关。子痫前期孕妇血清中 ADAM12-S 在整个妊娠期间的变化趋势不清,尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 田保玲,文剑明. ADAM12 (融合素- α) 基因研究[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2000,20(5):411-414. TIAN Bao-ling, WEN Jian-ming. Study of ADAM12 (meltrin- α) gene[J]. Foreign Med Sci Sect Pathophysiol Clin Med, 2000, 5(20):411-414.
- [2] Gilpin B J, Loechel F, Mattei M G, et al. A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo[J]. Biol Chem, 1998, 273(1):157-166.
- [3] 乐杰. 妇产科学[M]. 第6版. 北京:人民卫生出版社,2004:97-106. LE Jie. Gynecology and obstetrics[M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004:97-106.
- [4] Gack S, Marmé A, Marmé F, et al. Preeclampsia: increased expression of soluble ADAM 12[J]. J Mol Med, 2005, 83(11):887-896.
- [5] Leach R E, Romero R, Kim Y M, et al. Pre-eclampsia and expression of heparin-binding EGF-like growth factor[J]. Lancet, 2002, 360(9341):1215-1219.
- [6] Leach R E, Khalifa R, Ramirez N D, et al. Multiple roles for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor are suggested by its cell-specific expression during the human endometrial cycle and early placentation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1999, 84(9):3355-3363.
- [7] Shi Z D, Xu W Z, Loechel F, et al. ADAM12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3[J]. J Biol Chem, 2000, 275(24):18574-18580.
- [8] 陈红珊,杜敏联. 生长激素-胰岛素样生长因子 I 轴对儿童生长和代谢调控[J]. 国外医学·儿科学分册,1999,26(4):194-196. CHEN Hong-shan, DU Min-lian. The regulation to children growth and metabolism of the shank growth hormone-insulin-like growth factor I[J]. Foreign Med Sci · Sect Paedol, 1999, 26(4):194-196.
- [9] Kabir S M, Shiokawa S, Akimoto Y, et al. Characterization of morphological and cytoskeletal changes in trophoblast cells induced by insulin-like growth factor-I[J]. Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(12):5751-5759.
- [10] Helen L, Teresa H, Melissa W, et al. Mesenchymally-derived Insulin-like growth factor-I provides a paracrine stimulus for trophoblast migration[J]. BMC Dev Biol, 2002, 2(1):5-15.
- [11] Ito N, Nomur D, Iwase S, et al. Mizutani, ADAMs, a disintegrin and metalloproteinases, mediate shedding of oxytocinase[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(4):1008-1013.
- [12] Laigaard J, Sarensen T, Placing S, et al. Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in preeclampsia[J]. Obstet Gynecol, 2005, 106(1):144-149.