

血管内皮生长因子与妊娠期糖尿病围产儿结局关系的研究

汤栩文 林斯 谢晓斌

【摘要】 **目的** 探讨妊娠期糖尿病孕妇(GDM)血清血管内皮生长因子(VEGF)水平与围产儿结局间的关系,并观察 VEGF 受体(VEGFR)在胎盘组织中的蛋白表达。**方法** 招募在孕龄 24~28 周被诊断患有 GDM 的孕妇,总数为 100 例,另招募 50 例相应年龄的正常孕妇作为研究对照。抽取孕妇的血样,测量糖化指标:血糖、糖化血红蛋白(HbA1c)、VEGF。分娩后立即收集胎盘低温保存,用于分析组织中 VEGFR 蛋白的表达。并收集母婴临床信息,根据围产儿结局异常与否分为围产儿正常组和围产儿异常组。**结果** (1) GDM 组孕妇血清 VEGF 水平、HbA1c、空腹血糖值均明显高于正常孕妇组($P < 0.05$)。(2)同一 GDM 经干预治疗后妊娠晚期时血糖明显降低,HbA1c 与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但血清 VEGF 水平仍保持较高水平。(3)与围产儿正常的母亲相比,对于发生围产儿异常的 GDM 组母亲,二者血清当中的 VEGF 水平有显著性的差异($P < 0.05$)。(4)采用 Logistic 回归法对两组的 VEGF 表达水平进行分析,所得结果说明 VEGF 是 GDM 围产儿结局异常的危险因子($OR = 5.196, P < 0.001, 95\% CI: 1.845 \sim 14.610$)。(5)用 Western 印迹法测定胎盘组织中 VEGFR 蛋白表达量在 GDM 围产儿结局异常组亦较高。**结论** 孕妇高 VEGF 血症是 GDM 围产儿结局的一个不利因素,高 VEGF 水平可作为 GDM 不良围产儿结局的预测指标。

【关键词】 血管内皮生长因子类; 糖尿病,妊娠; 胎盘; 围产儿

The study of the relationship between vascular endothelial growth factor and perinatal outcome of gestational diabetes TANG Xu-wen, LIN Si, XIE Xiao-bin. Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China

Corresponding author: TANG Xu-wen, Email: tonghuiman@sina.com

【Abstract】 **Objective** To explore the relationship between serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level in gestation diabetic mother (GDM) and perinatal outcomes, and observe the VEGF protein expression in placenta. **Methods** The recruitment of pregnant women diagnosed with GDM between 24-28 weeks gestational age, a total of 100 cases. Recruitment of another 50 cases of normal pregnant women of corresponding age as the study control. Extracted blood samples of pregnant women, measure glycosylated index, blood glucose, HbA1c, VEGF. Collected immediately after delivery of placenta cryopreservation for the analysis of tissue expression of VEGFR protein. And collection of maternal and infant clinical information, perinatal abnormalities were divided into normal group of perinatal and perinatal abnormal group. **Results** (1) GDM groups had higher serum VEGF levels and fasting blood glucose compared with those of their respective controls ($P < 0.05$). (2) The same GDM in late pregnancy after intervention treatment, blood glucose was significantly lower HbA1c and the control group the difference was not statistically significant ($P > 0.05$), but the level of serum VEGF remained high. (3) Abnormal perinatal outcome in GDM had significantly higher maternal serum VEGF level than that in controls with normal perinatal outcome ($P < 0.05$). (4) Logistic regression analysis showed that VEGF was a predictor of adverse perinatal outcome in GDM ($OR = 5.196, P < 0.001, 95\% CI: 1.845-14.610$). (5) Determined Western blotting of VEGFR protein expression in the placenta was also higher in the GDM perinatal outcomes in the abnormal group. **Conclusions** High serum VEGF is negative factor for the GDM perinatal outcome, high levels of VEGF can be used as a GDM abnormal perinatal outcome predictor.

【Key words】 Vascular endothelial growth factors; Diabetes, gestational; Placenta; Perinatal

目前临床上以血糖控制作为妊娠期糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM)治疗与追踪的主要依据。对GDM的治疗主要亦是通过对孕妇饮食控制或胰岛素治疗以防止妊娠期血糖过高。但国内外研究表明:血糖的控制可降低新生儿低血糖和巨大儿的发生率,但并未显著降低新生儿窒息、发育异常、转入监护病房或孕妇先兆子痫的发病率^[1-2]。随着这些研究结果的公布,我们不得不重新审视目前临床所采用的治疗方法和追踪手段是否能有效降低母婴并发症和不良结局。本研究旨在探讨GDM孕妇血中VEGF浓度与血糖指标、胎盘病变、母婴并发症的相关性及在预测不良妊娠结局中的价值,以求为GDM的治疗与追踪寻求更全面、更可靠的补充预测指标。

对象和方法

一、研究对象

选取于2011年1月1日至2011年12月31日在广州市妇女儿童医疗中心就诊并分娩的孕妇作为研究对象,招募在孕龄24~28周被诊断患有GDM的孕妇,总数为100例,另招募50例相应年龄的无妊娠合并症的正常孕妇作为研究对照。

根据“国际糖尿病与妊娠防治研究组”2010年最新发布的《妊娠期高血糖的分类与诊断建议》作为GDM诊断标准^[3]:(1)强调在妊娠期间尽早确诊显性糖尿病:所有妇女初次产检查空腹血糖(FPG)(妊娠前确诊为糖尿病患者除外): $FPG \geq 7.0$ mmol/L为显性糖尿病,治疗与随访同孕前糖尿病; 5.1 mmol/L \leq $FPG < 7.0$ mmol/L为GDM; $FPG < 5.1$ mmol/L正常,孕24~28周做OGTT检查。(2)IADPSG(The International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups)75 g OGTT诊断标准(孕24~32周): $FPG 5.1$ mmol/L;1 h血糖(1 h PG)10.0 mmol/L;2 h血糖(2 h PG)8.5 mmol/L。三点中任意一点血糖值达到或超过以上界值即诊断为妊娠糖尿病。

本次的研究对象中,入选对象排除:妊娠期高血压疾病、原有糖尿病、先天性心脏病、双胎妊娠、早产、肝炎、甲状腺功能异常等代谢性疾病、产前发热等炎症急性期孕妇。此研究已通过医院医学伦理委员会评审,参与者需签订知情书。

本次研究的两组对象间具有可比性,基本资料为:GDM组年龄(27.58 ± 3.25)岁与对照组年龄(28.3 ± 4.1)岁相比, $t = 0.781$, $P = 0.408$;GDM组孕周(29.35 ± 7.20)周与对照组孕周(31.35 ± 6.08)周相比, $t = 0.291$, $P = 0.732$;GDM组孕次(1.48 ± 0.69)次与对照组孕次(1.87 ± 0.86)次相比, $t = 0.132$, $P =$

0.912;各组年龄、孕周及孕次之间均无统计学差异($P > 0.05$)。

二、研究方法

对入选的GDM组孕妇采用监测轮廓血糖以判断其血糖控制情况,并指导其糖尿病饮食。观察血糖3~5 d,若血糖控制欠佳则予诺和锐(短效胰岛素)治疗。若血糖控制良好,则继续以营养饮食干预治疗。并分析正常对照组和GDM组患者治疗前和治疗后孕妇血清中糖化血红蛋白(HbA1c)、FPG数值以及比较两组胎盘组织中VEGFR蛋白的表达。入组的GDM组孕妇均在我院作定期产前检查,以发现胎儿发育异常、羊水过多或过少、妊娠期高血压等母婴并发症。GDM组孕妇的新生儿作为高危儿收入新生儿病区,对新生儿的出生体重(与孕周是否相符)、有无先天发育异常、产伤、新生儿有无窒息、新生儿有无低血糖及新生儿超声检查或新生儿心电图、新生儿神经行为评分等进行评估,有异常发现的和孕期出现母胎并发症的孕妇归为GDM围产儿异常组;新生儿评估、检查正常者孕妇归为GDM围产儿正常组。并比较两组孕妇血清VEGF水平。

1. 孕妇血清VEGF水平的测定:入选对象孕28~32周和分娩时分别空腹抽取静脉血2 ml,采血后于3000 r/min条件下离心5 min,制备出血清于 -80 °C保存,测量糖化指标:血糖、HbA1c、VEGF。VEGF酶联免疫反应试剂盒购自R&D公司,采用竞争性酶联免疫法(ELISA)检测,重复2次取平均值。操作程序严格按照试剂盒使用说明书进行。

2. 胎盘组织中VEGFR蛋白表达量的测定(Western blot检测):(1)胎盘组织标本的获取:在胎儿以及胎盘被分娩出之后,标本应在胎盘的中央进行采集,样本的采集尺寸约为 1.5 cm \times 1.5 cm,要注意在采集的过程中,所采样本的厚度必须等于绒毛膜板的全厚度。(2)样品处理:固体组织置于培养皿中,手术剪剪碎成小块,加入1 ml冷Lysis Buffer,用玻璃匀浆器匀浆;取组织匀浆液转移到1.5 ml预冷的离心管,离心10 000 r/min,4 °C离心5 min;取上清转移至新的预冷的离心管中,即为全蛋白提取物,蛋白定量(Bradford法);分装保存于 -80 °C,避免反复冻融。(3)SDS-PAGE电泳:取样品各约20 μ g,进行9% SDS-PAGE电泳。(4)湿法转膜:胶在转膜液中浸泡5 min;装好转膜装置,进行90 V恒压电泳70 min。(5)封闭:将膜取出,加入5%脱脂奶粉PBS溶液;室温封闭30 min。(6)一抗、二抗结合:一抗:VEGFR1以1:250稀释,室温结合1 h;洗膜:PBS洗4次,15 min一次,5 min三次;二抗1:500稀释,室温结合1 h;0.1 mol/L NaOH洗脱

掉抗体后,进行β-actin反应,抗体以1:1000稀释,方法同上。(7)显影:取50 mg/ml NBT 20 μl, 25 mg/ml BCIP 20 μl 用pH 8.0的Tris-NaCl缓冲液稀释至10 ml,置于暗盒中,于摇床上室温反应5 min。结果用图像分析仪分析,以面积和光密度值的乘积为积分光密度表示。

三、统计学分析

全部资料用SPSS 11.5统计软件实现,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的方式来表示,两样本间的比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。多因素分析采用Logistic回归分析, $P < 0.05$ 表示差异存在统计学意义。

结 果

1. GDM组孕妇血清VEGF水平、HbA1c、FPG值与正常孕妇组比较(孕28~32周血液标本):结果见表1。

表1 GDM组孕妇与正常对照组孕妇血清VEGF水平、HbA1c、FPG值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FPG (mmol/L)	HbA1c (%)	VEGF (pg/ml)
GDM组	100	6.27 ± 0.88	6.45 ± 1.26	211.17 ± 27.19
正常对照组	50	4.81 ± 0.72	5.68 ± 0.52	94.35 ± 21.18
t值		2.87	2.61	13.34
P值		<0.05	<0.05	<0.01

2. 同一GDM经干预治疗后GDM组孕妇血清VEGF水平、HbA1c、FPG值与同一正常孕妇组比较(分娩期血液标本):结果见表2。

表2 同一GDM经干预治疗后GDM组孕妇与同一正常对照组孕妇血清VEGF水平、HbA1c、FPG值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	FPG (mmol/L)	HbA1c (%)	VEGF (pg/ml)
GDM组	100	5.69 ± 0.74	5.71 ± 0.92	204.27 ± 28.38
正常对照组	50	4.70 ± 0.69	5.47 ± 0.53	91.50 ± 20.42
t值		1.76	1.85	12.84
P值		>0.05	>0.05	<0.01

3. 围产儿正常组和围产儿异常组母亲血清VEGF水平比较:根据对围产儿结局的判断,GDM组患者中GDM围产儿正常组为66例,GDM围产儿异常组为34例。围产儿异常组母亲血清VEGF水平[(277.83 ± 17.11) pg/ml]高于围产儿正常组母亲VEGF水平[(192.13 ± 10.84) pg/ml],差异有统计学意义($t = 2.897, P < 0.05$)。

4. 可能导致出现GDM围产儿结局异常的危险因素分析:利用逻辑多元回归运算法进行数据分析,研究

如下几个因素可能影响或导致围产儿出现异常结局的情况:(1)GDM孕妇的年龄,记为X1;(2)孕妇血清的VEGF水平,记为X2;(3)空腹状态下的血糖,记为X3;(4)孕妇胰岛素治疗状况,记为X4;(5)孕妇对血糖的控制情况,记为X5;(6)孕妇HbA1c的水平,记为X6。本研究对上诉6种因素采取相应的控制,避免各因素之间产生相互影响。由分析结果可得,孕妇体内的VEGF水平(X2)是GDM围产儿结局异常的危险因素($OR = 5.196, P < 0.001, 95\% CI: 1.845 \sim 14.610$)。Logistic回归模型: $P = [1/1 + e]^{-(-15.130 + 1.838X2)}$ 。

5. 胎盘组织中VEGFR蛋白表达量:GDM围产儿异常组(0.274 ± 0.085)高于GDM围产儿正常组(0.127 ± 0.047)及正常对照组(0.052 ± 0.018),差异均有统计学意义($P < 0.01$)。胎盘组织中VEGFR蛋白表达的Western blot电泳图见图1。

讨 论

近年来,随着GDM诊断标准的优化,从全球流行病学方面的相关调查结果可以看出,GDM患者的数量在迅速增多。GDM属于高危妊娠的一种,在这种恶劣环境中孕育的胎儿,其遗传基因会受到很大的影响,这对孩子之后的正常生长发育是不利的^[4]。GDM常并发许多母胎并发症,影响母胎结局。如何能预测及降低这些母胎不良并发症的发生,是GDM临床研究的关注焦点^[5]。

在母体处于持续GDM的状态下,胎盘在诸如组织形态、细胞功能和超微结构等方面都会遭到巨大的不良刺激和影响。VEGF是血管生成的关键因子,是一种对血管内皮细胞有特异性的高效的促有丝分裂因子^[6]。VEGF控制血管的再生和内皮细胞的渗透性。它通过与高亲和力和酪氨酸激酶受体VEGFR结合,能特异性地刺激血管内皮细胞增殖、迁移,可引起胎盘形态学和分子生物学的改变。VEGF-R1属于酪氨酸激酶受体的一种,它与VEGF具有很高的结合反应亲和力,二者经过结合能够刺激血管内皮细胞的增殖和迁移,并最终参与形成新生血管。胎盘是一个充满微细血管网络的器官,在胎盘血管发育、胎儿的宫内生长过程中,VEGF发挥着重要的作用。国外研究发现,VEGF在受精卵着床过程中发挥重要作用,并参与整个妊娠期间胎盘生长过程的血管形成,妊娠后胎盘组织VEGF mRNA表达与胎盘VEGF水平均明显上升^[7]。胎盘是一个充满微细血管网络的器官,在胎盘血管发育、胎儿的宫内生长过程中,VEGF发挥着重要的作用。

目前对GDM的治疗主要亦是通过对孕妇饮食控

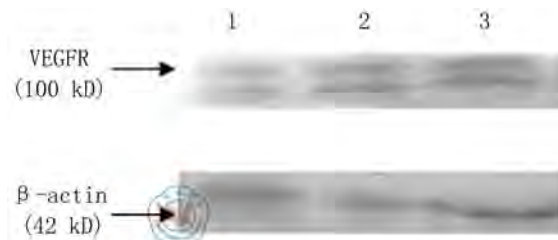


图1 胎盘组织中VEGFR蛋白的表达结果。1是正常对照组胎盘组织标本的蛋白印迹电泳图像；2是GDM围产儿结局正常组胎盘组织标本的蛋白印迹电泳图像；3是GDM围产儿结局异常组胎盘组织标本的蛋白印迹电泳图像

制或胰岛素治疗以防止妊娠期血糖过高。2008年,高血糖和不良妊娠结局HAPO(Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome)研究结果表明:随着孕妇血糖逐渐升高,妊娠结局风险是连续缓慢增加的^[8]。然而,关于治疗是否能改善孕产结局,尚无定论。经统计,2011年内在本院进行产检及分娩的孕妇共有11 295例,其中孕周在24~28周,并同时被确诊为患有GDM的孕妇共有784例。本研究结果显示GDM组孕妇血清VEGF水平、HbA1c、FPG值均明显高于正常孕妇组($P < 0.05$)。同一GDM经干预治疗后妊娠晚期时血糖明显降低,HbA1c与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),但血清VEGF水平仍保持较高水平。这提示:如果对GDM孕妇在妊娠中期加以适当的治疗,则其血糖就会在妊娠晚期时降至正常范围内;但VEGF情况则不同,其表达在妊娠中期和晚期都处于较高水平,并没有明显的下调。因为导致VEGF发生高度表达的最重要的因素就是缺氧缺血,而糖尿病患者的生理特征就是血糖以及糖基化终末产物处于较高的水平,并伴随着程度严重的缺氧缺血,所有上述因素共同促发了VEGF产生过度表达^[9]。VEGF-R1作为可与VEGF进行高亲和力结合的酪氨酸激酶的受体,在与VEGF结合后,通过刺激血管内皮细胞的增殖与迁移,参与到新生血管最终形成的过程中,可引起胎盘形态学和分子生物学的改变^[10],与胎盘血管病变密切相关。所以,GDM孕妇的高VEGF血症可能会造成胎儿出现生长发育的异常,并引起很高的新生儿患病率。

本研究的统计结果说明,较之正常围产儿结局的母亲,GDM组中发生不良围产儿结局的母亲,其血清中的VEGF表达水平有统计学差异。Logistic回归分析法提示,VEGF是GDM不良围产儿结局的危险因子。用蛋白印迹法测定胎盘组织中VEGFR蛋白表达量在GDM围产儿结局异常组亦较高。这提示了高VEGF血症是GDM围产儿结局的一个不利因素,胎盘的检测也

证实了GDM不良围产儿结局的胎盘组织VEGFR蛋白呈高表达。因此我们认为:高VEGF水平可作为GDM不良围产儿结局的预测指标。由于本次研究受到时间以及经费等方面的条件限制,无法做到追踪和随访全部GDM病例,今后有待进一步推进应用VEGF追踪和预测糖尿病的临床研究。

参 考 文 献

- [1] Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med*, 2005, 352:2477-2486.
- [2] Rowan JA. A trial in progress: gestational diabetes. Treatment with metformin compared with insulin (the Metformin in Gestational Diabetes [MiG] trial). *Diabetes Care*, 2007, 30:S214-219.
- [3] Gestational diabetes mellitus; NICE for the U. S. A comparison of the American Diabetes Association and the American College of Obstetricians and Gynecologists guidelines with the U. K. National Institute for Health and Clinical Excellence guidelines. *Diabetes Care*, 2010, 33:34-37.
- [4] 曹筱佩, 肖海鹏, 陈松锦, 等. 妊娠期糖尿病妇女产后糖代谢异常与胰岛β细胞功能缺陷的关系[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2007, 1:452-455.
- [5] 宋滇平, 李斌. 糖尿病基因靶向治疗研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4:1477-1479.
- [6] Marini M, Vichi D, Toscano A, et al. Effect of impaired glucose tolerance during pregnancy on the expression of VEGF receptors in human placenta. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20:789-801.
- [7] Salim MD, Al-Matubi HY, El-Sharakly AS, et al. The levels of vascular endothelial growth factor-A and placental growth factor-2 in embryopathy associated with experimental diabetic gestation. *Growth Factors*, 2009, 27:32-39.
- [8] Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study Cooperative Research Group. *N Engl J Med*, 2008, 358:1991-2002.
- [9] 李丽丹, 冯玲. 血管内皮生长因子(VEGF)与妊娠的研究进展. *中国优生与遗传杂志*, 2007, 15:46.
- [10] Wathén KA, Sarvela J, Stenman F, et al. Changes in serum concentrations of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 after pregnancy. *Hum Reprod*, 2011, 26:221-226.

(收稿日期:2012-04-12)

(本文编辑: 戚红丹)