

胎膜早破患者胎膜组织中基质金属蛋白酶-9、环氧合酶-2 mRNA 的表达及意义

王素梅 陈玲 唐卉 黄玲玲 钟琳琳

【摘要】 目的 通过检测胎膜组织中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、环氧合酶-2(COX-2) mRNA 的表达,探讨 MMP-9,COX-2 在胎膜早破(PROM)中的表达及意义。**方法** 选择 2011 年 9 月至 2012 年 2 月在本院产科住院的 35 例 PROM 孕妇为研究对象,均为初产妇。根据不同类型 PROM,将其分为足月 PROM (tPROM)组($n=10$)和足月前(pPROM)组($n=25$)。tPROM 组平均年龄为(29.71 ± 4.63)岁,平均孕周为(38.04 ± 0.79)孕周;pPROM 组患者平均年龄为(30.67 ± 4.05)岁,平均孕周为(33.56 ± 0.82)孕周。随机选择同期在本院住院的正常足月未破膜初产妇 25 例纳入对照组,平均年龄为(30.46 ± 4.14)岁,平均孕周为(38.91 ± 0.99)孕周(本研究遵循的程序符合本院人体试验委员会制定的伦理学标准,得到该委员会批准,分组征得受试对象的知情同意,并为之签署临床研究知情同意书)。3 组受试者的年龄、孕周等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。利用实时荧光定量 PCR 法测定 tPROM 组,pPROM 组和对照组胎膜组织中 MMP-9,COX-2 mRNA 的表达水平。**结果** ① tPROM 组和 pPROM 组胎膜组织中 MMP-9,COX-2 mRNA 的表达显著高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),但 tPROM 组和 pPROM 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。② tPROM 组和 pPROM 组患者胎膜组织中 MMP-9 和 COX-2 mRNA 的表达水平呈正相关($r=0.732,0.820,P<0.05$),对照组胎膜组织中 MMP-9 和 COX-2 mRNA 的表达水平无相关性($r=0.244,P>0.05$)。**结论** MMP-9,COX-2 mRNA 可能相互促进,共同参与 PROM 的发生。

【关键词】 胎膜早破; 基质金属蛋白酶-9; 环氧合酶-2; 实时荧光定量 PCR

Expression and Significance of Matrix Metalloproteinase-9, Cyclooxygenase-2 mRNA in Patients With Premature Rupture of Membranes WANG Su-mei, CHEN Ling, TANG Hui, HUANG Ling-ling, ZHONG Lin-lin. Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China. (Corresponding author: WANG Su-mei, Email: wangsmei2003@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the expression and its significance of human metalloproteinase-9, cyclooxygenase-2 in membrane of premature rupture of membranes (PROM) and normal term pregnancy. **Methods** We selected 35 subjects from the pregnant women of PROM in our hospital from September 2011 to February 2012 as research group. All subjects were divided into term PROM group (tPROM group, $n=10$) and preterm PROM group (pPROM group, $n=25$). The average age of tPROM group was (29.71 ± 4.63) years old, and the average gestational age was (38.04 ± 0.79) weeks. The average age of pPROM group was (30.67 ± 4.05) years old, and the average gestational age was (33.56 ± 0.82) weeks. Meanwhile, we selected 25 subjects from the healthy term-pregnant women as control group. The average age was (30.46 ± 4.14) years old, the average gestational age was (38.91 ± 0.99) weeks. This study followed the procedures established by the committee meet human trials hospital ethical standards, obtained its approval. All grouping subjects were informed and consent, and signed clinical research informed consent. The messenger RNA(mRNA) of MMP-9, COX-2 in fetal membranes by using real-time PCR in different groups were examined and compared. **Results** ①The mRNA expressions of MMP-9 and COX-2 in fetal membranes were significantly high in pPROM group and tPROM group than those in control group ($P<0.01$), however, there were no significantly statistical difference between pPROM group and tPROM

group ($P > 0.05$). ② The relationship between MMP-9 and COX-2 in pPROM group and tPROM group was positively correlated ($r = 0.732, 0.820, P < 0.05$), there was no positive correlation in control group ($r = 0.244, P > 0.05$). **Conclusions** The mRNA expressions of MMP-9 and COX-2 in fetal membranes were significantly high in PROM, and they may play key roles in the occurrence of PROM.

【Key words】 premature rupture of membranes; matrix metalloproteinase-9; cyclooxygenase-2; real-time PCR

* Project No. Z2010355, supported by the Guangxi Health Department self-funded research projects

胎膜早破 (premature rupture of membranes, PROM) 是指临产前胎膜破裂, 包括足月 PROM (term PROM, tPROM) 和足月前 PROM (preterm PROM, pPROM), 是产科常见并发症, 亦是早产及围生儿死亡的常见因素, 可致宫内感染、产后感染及围生儿死亡率升高^[1], 但其发病机制迄今尚未明确。近年来有学者认为, 胶原合成、分泌和溶解过程中的代谢失衡导致 PROM, 基质金属蛋白酶 (metalloproteinase, MMP) 是主要降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 成分的蛋白酶, 环氧合酶 (cyclooxygenase, COX)-2 可调节 MMP 分泌, 在 PROM 中发挥重要作用。本研究旨在探讨 MMP-9, COX-2 与 PROM 的关系, 为临床治疗 PROM 提供参考。现将研究结果, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 2011 年 9 月至 2012 年 2 月在本院产科住院的 35 例 PROM 孕妇为研究对象, 均为初产妇, 按不同 PROM 类型, 将其分为 tPROM 组 ($n = 25$) 和 pPROM 组 ($n = 10$)。pPROM 组平均年龄为 (30.67 ± 4.05) 岁, 平均孕周为 (33.56 ± 0.82) 孕周; tPROM 组平均年龄为 (29.71 ± 4.63) 岁, 平均孕周为 (38.04 ± 0.79) 孕周。随机选择同期在本院住院的正常足月未破膜初产妇 25 例纳入对照组, 平均年龄为 (30.46 ± 4.14) 岁, 平均孕周为 (38.91 ± 0.99) 孕周 (本研究遵循的程序符合本院人体试验委员会制定的伦理学标准, 得到该委员会批准, 分组征得受试对象的知情同意, 并为之签署临床研究知情同意书)。3 组受试组年龄、孕周等基础临床资料比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。所有患者均行剖宫产分娩, 亦均排除临床感染征象、母体疾病、其他产科并发症及胎儿胎位异常。

1.2 方法

1.2.1 诊断标准 PROM 的诊断标准见文献^[2]。

①窥阴器检查: 见液体自宫颈口流出或阴道后穹隆较多的积液中见到胎脂样物质, 可作为诊断 PROM 的直接依据; ②阴道液 pH 试验呈碱性; ③阴道液涂片检查: 取阴道后穹隆积液置于干净载玻片上, 待其干燥后镜检, 显微镜下见到羊齿植物叶状结晶为羊水。

1.2.2 标本采集 取距离胎膜破口 > 2 cm 外的胎膜, 大小约为 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 冲洗掉血液, 放入经二乙基焦磷酸胺 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水处理过冻存管中, 尽快置于一 80°C 冰箱保存, 备用。

1.2.3 主要试剂和仪器 Trizol (Invitrogen 公司, 美国), cDNA 逆转录试剂盒, qPCR Mastermix-ROX 试剂盒、PCR 引物 (上海生物工程公司), $6 \times$ Loading Buffer (Takara 公司, 美国), ABI 型荧光定量 PCR 仪、凝胶成像分析系统 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2.4 Trizol 试剂法提取胎膜组织中总 RNA 100 mg 胎膜组织按 Trizol 法提取总 RNA。经凝胶电泳后, 使用紫外分光光度仪检测抽提总 RNA 的质量和浓度。要求 $A_{260}/A_{280} = 1.8 - 2.0$, 并计算 RNA 含量。

1.2.5 cDNA 第 1 链的合成 采用 cDNA 第 1 链合成逆转录试剂盒, 严格按说明书要求操作, 取 $5 \mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录 cDNA 第 1 链。总反应体系 $20 \mu\text{L}$, 42°C 温浴 60 min, 70°C 温浴 10 min, 终止反应, 置于一 20°C 保存, 待用。

1.2.6 引物的设计合成 根据 Genbank 基因序列设计, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列: MMP-9 上游: $5' \text{-AGTGGGCTACGTGACCTATGA-3'}$, 下游: $5' \text{-CGGCAAACCTGGCTCCTT-3'}$, 扩增长度 120 bp; COX-2 上游: $5' \text{-GTCCTGTATGCCCTTTTCTAA-3'}$, 下游: $5' \text{-CGGTTTCTATTTCTGAGCGT-3'}$, 扩增长度 79 bp; 3-磷酸甘油脱氢酶 (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) 上游: $5' \text{-TGGGTGTGAACCATGAGAA GT-3'}$, 下游: $5' \text{-TGAGTCCTTCCACGATACCAA-3'}$, 扩增长度 126 bp。

1.2.7 实时荧光定量 PCR ① PCR 反应体系: EVaGreen qPCR Master Mix $10 \mu\text{L}$, 上游引物、下游引物、CDNA 各 $1 \mu\text{L}$, ddH₂O 为 $7 \mu\text{L}$, 总反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 变性 10 min, 58.5°C 退火 60 s, 72°C 延伸 1 min, 共 40 个循环, 循环结束后 72°C 延伸 10 min, 每个标准品和标本均作复管 PCR 反应。② 结果判定: 每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时,

表 1 各组胎膜组织 MMP-9 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression level of MMP-9 mRNA in different fetal membrane tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-9 mRNA(ΔCT)	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
tPROM 组	25	3.0387 \pm 0.7987 ^a	-1.3094 \pm 0.7987	2.8117 \pm 1.4038
pPROM 组	10	2.6769 \pm 0.5015 ^{ab}	-1.6713 \pm 0.5015	3.3596 \pm 1.1400
对照组	25	4.3482 \pm 0.3803	0 \pm 0.3803	1.0372 \pm 0.3179

注:^a:vs. 对照组, $P < 0.01$; ^b:vs. tPROM 组, $P > 0.05$

表 2 各组胎膜组织 COX-2 mRNA 的表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The expression level of COX-2 mRNA in different fetal membrane tissues ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	COX-2 mRNA(ΔCT)	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
tPROM 组	25	-10.0103 \pm 4.0547 ^a	-1.5291 \pm 0.4055	2.9873 \pm 0.7401 ^a
pPROM 组	10	-10.1434 \pm 0.3799 ^{ab}	-1.6621 \pm 0.7799	3.2528 \pm 0.9559 ^{a,b}
对照组	25	-8.4812 \pm 0.7248	0 \pm 0.7247	1.1037 \pm 0.4384

注:^a:vs. 对照组, $P < 0.01$; ^b:vs. tPROM 组, $P > 0.05$

所经历的循环数被称为 CT 值(threshold value), 每个模板的 CT 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, CT 值越小。读取 CT 值, 参照 Livak 等^[3] 报道的比较阈值法计算: 首先按公式 $\Delta CT = CT$ 平均值(目的基因) - CT 平均值(GAPDH)”分别计算对照组和处理组的 ΔCT , 再按公式 $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ 处理组 - ΔCT 对照组, 最后计算, 改变的倍数 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 MMP-9, COX-2 的相对表达量。

1.3 统计学方法

本研究数据采用 SPSS 13.0 统计学软件包进行统计学处理, 呈正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实时荧光定量 PCR 的灵敏度和特异性

实时荧光定量 PCR 的熔解曲线显示, 特异性产物出现单一的熔解峰, 峰值之前曲线平滑, 可反映出扩增产物的特异性强(图 1~图 6)。

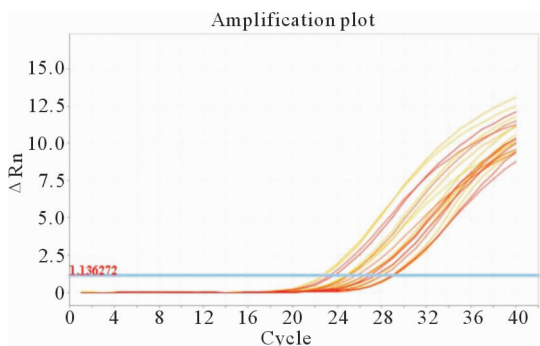


图 1 GAPDH 扩增曲线

Figure 1 The amplification curve of GAPDH

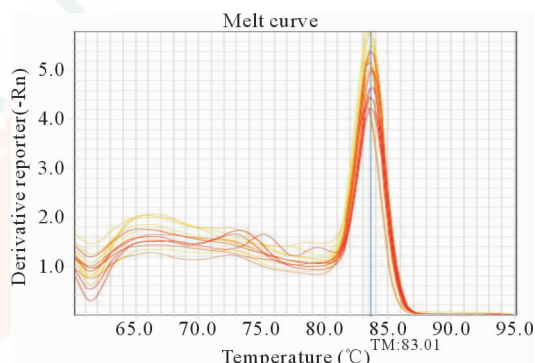


图 2 GAPDH 熔解曲线

Figure 2 The melting curve of GAPDH

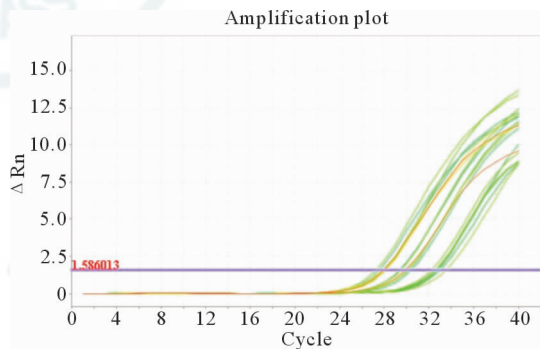


图 3 MMP-9 扩增曲线

Figure 3 The amplification curve of MMP-9

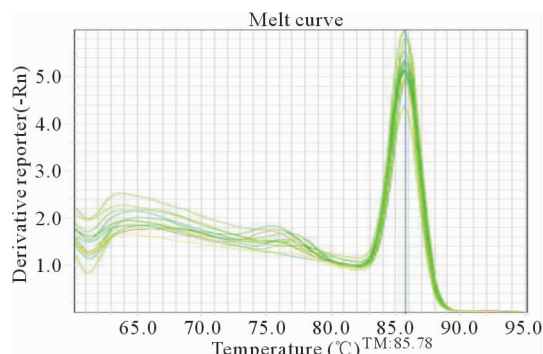


图 4 MMP-9 熔解曲线

Figure 4 The melting curve of MMP-9

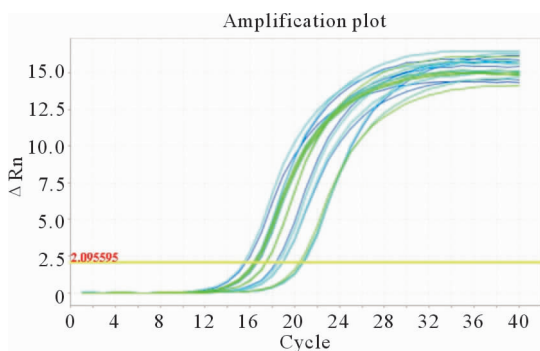


图 5 COX-2 扩增曲线

Figure 5 The amplification curve of COX-2

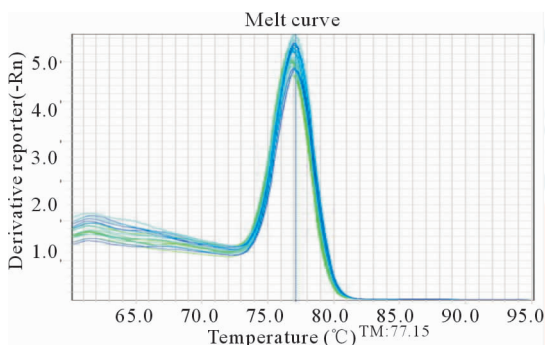


图 6 COX-2 熔解曲线

Figure 6 The melting curve of COX-2

2.2 各组胎膜组织基质金属蛋白酶-9 mRNA 表达水平的比较

3 组间胎膜组织 MMP-9 mRNA 表达水平的比较 (表 1)。

2.3 各组胎膜组织环氧合酶-2 mRNA 表达水平的比较

3 组间胎膜组织 COX-2 mRNA 表达水平的比较 (表 2)。

2.4 各组胎膜组织中基质金属蛋白酶-9 mRNA 和环氧合酶-2 mRNA 间的关系

tPROM 组和 pPROM 组患者胎膜组织中 MMP-9 和 COX-2 mRNA 的表达水平呈正相关 ($r = 0.732, 0.820, P < 0.05$), 对照组胎膜组织中 MMP-9 和 COX-2 mRNA 的表达水平无相关性 ($r = 0.244, P > 0.05$)。

3 讨论

3.1 胎膜的结构变化

胎膜张力强度是由 ECM 合成和降解的平衡维持, ECM 由胶原蛋白、蛋白聚糖、糖胺聚糖、糖蛋白等组成, 其主要成分是胶原。胶原的含量、结构和代谢改变的结果可导致 PROM。已有研究发现, PROM 的发生不仅是因子宫收缩引起, 而是一部分胎膜薄弱导致^[4]。子宫中胶原含量随妊娠及分娩而变化, 随着妊

娠进展, 宫颈和胎膜中胶原的含量逐渐减少。因此, 胶原的代谢在妊娠的进展和结局中, 具有重要作用。

3.2 基质金属蛋白酶-9 与胎膜早破

MMP-9 是一种锌依赖性肽链内切酶, 属于 IV 型胶原酶, 且又具有明胶酶的活性, 在体内可由多种细胞合成, 以无活性的酶原形式分泌, 经血浆酶切断其 N2 端被激活, 主要参与 ECM 的降解与重塑, 是降解 IV, V 型胶原和弹力蛋白的主要酶。胎膜的 ECM 主要由 I, III, V 型胶原组成, 而 IV 型胶原是羊膜基底膜的主要成分。MMP-9 能特异性地降解胎膜的主要成分, 即 IV 型胶原, 促进包括 IV 型胶原在内的 ECM 的快速崩解, 引起细胞发生形态学变化和引发凋亡。Lei 等^[5]研究孕鼠在妊娠和分娩过程中羊水、胎膜中 MMP-9 水平和孕鼠基底膜中 IV 型胶原含量的变化, 结果显示, 基底膜 IV 型胶原的丧失与 MMP-9 水平的改变密切相关, 发现 MMP-9 在胶原降解、胎膜结构的弱化中有重要作用。MMP-9 在胎膜的高表达导致局部胶原降解加速, 基底膜破坏, 胎膜强度、韧性下降, 从而发生局部破裂。Maymon 等^[6]通过对 PROM 患者和正常妊娠者胎膜中胶原含量的比较, 发现 PROM 组胶原含量明显低于正常组, 并且与 MMP-9 水平上升一致。伍玲等^[7]研究表明, 早产组孕妇血清及羊水中 MMP-9 含量均高于对照组, 两组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 孕妇血清及羊水中 MMP-9 的水平与早产具有相关性。

陈春莹等^[8]研究发现, MMP-9 主要表达于胎膜滋养层细胞质中, 在 PROM 组滋养层中高表达, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但 tPROM 组与 pPROM 组中的表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这与本研究结果一致。本研究结果显示, tPROM 组和 pPROM 组胎膜组织中 MMP-9 mRNA 的表达较对照组高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明 MMP-9 表达增高与 PROM 有关。因此, MMP-9 水平异常升高促使胎膜中胶原降解的量和速度增加, 通过加速局部胶原的降解, 使基底膜受到破坏, 改变胎膜本身的结构, 使胎膜的脆弱性增加, 强度和韧性下降而发挥作用。

3.3 环氧合酶-2 与胎膜早破

COX 是前列腺素合成酶, 是花生四烯酸从膜磷脂转化为炎性因子前列腺素类物质的关键限速酶。COX 具有 2 种类型: COX-1 和 COX-2。COX-1 是结构型酶, 主要维持正常的生理功能; COX-2 是诱导型异构酶, 正常情况下多数组织不表达, 当细胞受各种刺激因素, 如激素、炎性递质、生长因子、细胞因子等作用时, 其表达迅速上调。目前, 关于 COX-2 在产科领域

中的研究较少,Olson等^[9]报道,COX-2主要与炎症反应、妊娠维持、分娩发动相关。COX-2表达的增加促进花生四烯酸代谢,使前列腺素大量合成,前列腺素可刺激多形核白细胞释放胶原酶及增加其活性。此外,COX-2可通过肌醇酯循环和对细胞膜上Ca通道的调节使细胞内Ca²⁺浓度发生变化,从而调节MMP分泌^[10]。Mogami等^[11]研究表明,胎儿纤维连接蛋白(fetal fibronectin, fFN)的增加可导致老鼠胎膜组织中MMP和COX-2增加,进而导致早产和PROM发生。但Khanprakob等^[12]通过循证医学研究发现,抑制COX并不能预防早产发生。

本研究比较tPROM组,pPROM组和对照组孕妇胎膜组织中COX-2 mRNA的表达,发现3组中均有COX-2 mRNA表达,但tPROM组和pPROM组COX-2 mRNA的表达均显著高于对照组,说明胎膜中COX-2的表达增多与PROM的发生机制有关。本研究结果尚显示,tPROM组和pPROM组胎膜组织中COX-2与MMP-9的表达具有相关性($r = 0.732, 0.820, P < 0.05$),说明二者共同参与PROM的发生。

综上所述,COX-2的表达增加使MMP-9的表达增加,从而使胎膜的ECM降解,胎膜变得薄弱;同时COX-2的表达增加使前列腺素的合成增加,促进子宫收缩,二者相互作用,导致PROM的发生。因此,通过抑制COX-2和MMP-9的表达,阻止PROM的发生,可为临床PROM的防治提供一新的研究方向。

参 考 文 献

- Pan CH. Analysis of related factors of premature rupture of membranes and its impact on maternal and child[J]. Chin Med Herald, 2009, 6(36): 153-154. [潘春红. 早产胎膜早破相关因素及其对母婴影响的分析[J]. 中国医药导报, 2009, 6(36): 153-154.]
- Yue J. Obstetrics and gynecology[M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008, 137-139. [乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社, 2008, 137-139.]
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression W素梅,陈玲,唐卉,等. 胎膜早破患者胎膜组织中基质金属蛋白酶-9、环氧合酶-2 mRNA表达及意义[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版, 2013, 9(4): 451-455.
- data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method[J]. Nat Protoc, 2001, 25(4): 402-408.
- Moore RM, Mansour JM, Redlin RW, et al. The physiology of fetal membrane rupture: Insight gained from the determination of physical properties[J]. Placenta, 2006, 27: 1037-1051.
- Lei H, Kalluri R, Furth EE, et al. Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: Implication for membrane breakdown [J]. Biol Reprod, 1999, 60(1): 176-182.
- Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence of in vivo differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection [J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(4): 887-894.
- Wu L, Hou HY, Chen XJ, et al. The levels and significance of MMP-9 in serum and amniotic fluid of preterm women with premature rupture of membranes[J]. Chin Pract Med, 2010, 5(22): 34-35. [伍玲,侯红瑛,陈新娟,等. 基质金属蛋白酶 MMP-9 在胎膜早破早产孕妇血清、羊水含量及意义[J]. 中国实用医药, 2010, 5(22): 34-35.]
- Chen CY, Li L, Huang HY, et al. Expressions and significances of Ets-1 and MMP-9 in premature rupture of membrane [J]. Matern Child Health Care China, 2012, 27(24): 3796-3798. [陈春莹,李丽,黄海玉,等. Ets-1 和 MMP-9 在胎膜早破中的表达和意义[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(24): 3796-3798.]
- Olson DM, Ammann C. Role of the prostaglandins in labour and prostaglandin receptor inhibitors in the prevention of preterm labour[J]. Front Biosci, 2007, 12: 1329-1343.
- Premyslova M, Li W, Alfaidy N, et al. Differential expression and regulation of microsomal prostaglandin E (2) synthase in human fetal membranes and placenta with infection and in cultured trophoblast cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88: 6040-6047.
- Mogami H, Kishore AH, Shi H, et al. Fetal fibronectin signaling induces matrix metalloproteinases and cyclooxygenase-2 (COX-2) in amnion cells and preterm birth in mice[J]. J Biol Chem, 2013, 288(3): 1953-1966.
- Khanprakob T, Laopaiboon M, Lumbiganon P, et al. Cyclooxygenase (COX) inhibitors for preventing preterm labour [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2012, 10: CD007748.

(收稿日期:2013-04-16 修回日期:2013-07-19)