

子痫前期早期诊断研究进展

徐家伟^{1,2}综述 赵欣之^{1,2}审校

(1. 复旦大学生物医学研究院,上海 200032; 2. 复旦大学出生缺陷研究中心,上海 200032)

【摘要】 子痫前期属于妊娠期高血压疾病,以高血压和蛋白尿为其主要症状,对母婴有很大伤害,因此加强孕妇早期监测,预测该病的发生发展,对减少并发症、降低母婴死亡率有重要的临床意义。大量研究表明子痫前期由遗传、表观遗传、母婴免疫不相容性等因素所致,如能发现这些病因的标志物,用于早期临床诊断,对于该病的治疗和保健具有重要意义。本文对子痫前期发病机制、相关的致病基因、相关分子标志物以及胎儿游离DNA在该病早期诊断中的应用做一综述和展望。

【关键词】 子痫前期; 早期诊断; 分子标志物; 胎儿游离DNA

子痫前期(Preeclampsia),属于妊娠期高血压病,发生于妊娠中晚期、分娩期及产后早期,它的主要特征是高血压、蛋白尿及全身代谢紊乱,以全身抽搐的子痫为疾病的终期阶段。目前对轻微子痫前期的诊断主要依据是:孕妇的舒张压 ≥ 90 mmHg,浸渍检查法检测蛋白尿 ≥ 30 mg/dl^[1],但此标准不能在该病未发生或将发生时检出。此病患者多在妊娠20周后才出现一系列由轻到重的临床症状。子痫前期发病机制至今不明,目前尚无子痫早期的诊断标准。一经检出,母婴已受到不同程度损伤。虽然对该病早期诊断方法有:翻身试验、超声检测子宫动脉血流、血清学指标测定尿酸、尿钙、-hCG等,但目前尚无有效的高灵敏度、特异度的预测方法应用于临床。因此发展一种特异、无创、快速的诊断方法,加强对孕妇的早期监测,早于临床症状出现之前预测疾病发生发展,筛查出高危患者并及时采取干预措施,对减轻该病对母婴伤害、减少并发症、降低母婴死亡率具有重要的临床意义。

1 子痫前期发病机制

子痫前期是孕产妇常见的严重并发症,国外子痫前期的发病率为7%~10%,笔者国大约为9.4%^[2,3]是笔者国孕产妇死亡原因的第二位,其死亡率约占发病率的15%^[4]。子痫前期还是胎盘早剥、急性肾衰竭、脑出血、弥散性血管内凝血(DIC)和循环衰竭的重要诱因^[5,6]。加深对子痫前期发病

机制的认识,发现其发病早期的特异性标志物,无疑对该病的早期诊断具有很重要的意义。

氧化应激、内皮功能障碍、母婴免疫不相容以及异常胎盘的植入等都是其发病的潜在诱因^[7],尽管诱发子痫前期的一些因素诸如未经产妇、孕妇年龄过大、肥胖、糖尿病和高血压等已得到证实,但是子痫前期的病因依旧不清楚^[7,8]。Napolitano等^[9]认为子痫前期是孕妇的一种血管病,可能是由于血管扩张剂和血管收缩剂之间失衡引起多个器官血管痉挛和血供不足而致,内皮素-1(ET-1)作为一种潜在的血管收缩剂,在患该病的孕妇中表达显著上调,然而NO(人子宫胎盘动脉舒张剂)的生成则减少。Cross^[10]认为胎儿或者说胎盘和母体的相互作用是该病的发病原因,在妊娠前3个月和胎盘的植入与发育有关,而研究者往往是在该病的症状很明显时才予以关注。同时作者认为该病的发生由3种独立的机制导致:在高血压边缘的妇女由于怀孕而致;由于胎盘产生肾素过多引起母体循环中血管紧张素升高而致该病发生;胎盘病理性病变而致。Roberts和Cooper^[11]认为胎盘和母体组织的不正常整合可能是该病的主要的发病诱因,但是其确切机制依然难以明确,其中有遗传易感性的因素,但是母体和胎儿基因型对该病相应的作用是不清楚。目前对该病发病机制的研究还不能达成共识,因此依据发病机制综合各种因素制定预防和临床诊断方法有待对该病研究的进一步深入。

2 子痫前期相关基因在早期诊断的应用

传统的诊断方法往往在发病时期才能确诊,不能很好的预防和揭示子痫前期的发病,从基因水平在该病发病早期预测其是否发生有其独特的优点。Humphries^[12]、Chesley^[13]等研究发现,有子痫前期病史的产妇的女儿较正常产妇的女儿有较高的发病率,即子痫前期有较强遗传性。Berends^[14]等进一步研究表明遗传因素是子痫前期和宫内生长迟缓综合征的发病病因。NO合酶(NOS)及其亚型在子痫前期发病过程中与减少胎盘血供量、抑制胎儿-母体血循环相关。Arngrimsson等^[15]1997年证实子痫前期一易感基因位于7q36上,该基因编码一氧化氮合酶3(NOS3)。Moses等^[16]对34个家系,121个患有子痫前期的孕妇通过非参数连锁分析,研究发现该病在2号染色体有较强的连锁度(Lod = 2.58),与11号染色体长臂上23至24区的连锁度则较弱。GOPEC Consortium^[17]在对627个患有子痫前期的家系的研究中,分析了先前报道的7个该病的易感基因:血管紧张素原基因及其受体基因(AGT、AGTR1、AGTR2)、凝血因子V变体基因、亚甲基四氢叶酸还原酶基因(MTHF)、一氧化氮合酶3基因(NOS3)和肿瘤坏死因子-1基因(TNF)。通过传递不平衡分析研究发现这些基因的变体不影响该病的发展,为这些基因对子痫前期的影响提供了更为精细的定位和进一步的确定。Kanasaki等^[18]通过基因敲除鼠研究表明,儿茶酚胺氧位甲基转移酶基因(COMT)敲除引起2-甲氧基雌二醇(2-ME)的缺乏,导致孕鼠表现出子痫前期样症状,从而提示COMT在子痫前期发病过程中有很重要的作用,同时作者指出2-ME作为一种代谢中间体,可作为诊断标志物 and 治疗的补充物。

上述基因已有大量研究表明是子痫前期的易感基因甚或是重要致病基因,这些基因有很大潜力成为筛查子痫前期患者的标志物,通过检测这些基因的突变或表达的情况在孕妇中筛选易患者,会提高检出率,对该病早期的诊断和预测有重要意义。

3 子痫前期分子标志物在其早期诊断中的应用

对疾病相关分子标志物的寻找,并把分子标志

物用于临床对疾病的特异性诊断具有很好的应用前景。2004年Richard J等^[1]研究表明:sFlt-1与PIGF的水平变化可作为诊断和预测子痫前期发病程度的分子标志物,有望用于无创性早期诊断。血压正常的孕妇在怀孕最后两个月,sFlt-1的水平上升,PIGF的水平降低,但是在后来发展成为子痫前期的孕妇中这种变化更加明显并且较正常者提前。sFlt-1的水平大约在子痫前期发病前5周升高,孕妇血清水平为4382 pg/ml,正常对照组是1643 pg/ml;PIGF的水平在患病孕妇体内较正常对照组显著降低,在子痫前期发作时差异达到最大。

基因诊断又称DNA诊断或分子诊断,通过分子生物学和分子遗传学的技术,直接检测出分子结构水平和表达水平是否异常,从而对疾病做出判断,基因诊断在没有症状时通过对基因的检测,就可发现这个人是否会发病及预测疾病的严重程度。子痫前期已经对孕妇和胎儿产生了很大的危害,一旦发展到子痫,甚至危及母婴生命,因此如能通过基因诊断的方法来预测该病的发生和发展,对患者无疑是一大福音。Founds S. A.等^[19]对160个孕妇妊娠前3个月进行绒毛膜取样,并对其中4个发展成为子痫前期的患者和正常对照孕妇绒毛膜取样,用基因芯片进行相关的基因的表达分析,结果36个差别表达的基因在该病患者中被鉴别出来,其中31个基因表达下调,大多基因是炎症/免疫调节和细胞运动相关的,没有发现氧化应激和缺氧相关基因的差别表达,研究者进一步对其中的3个差别表达基因进行了深入的研究,LAIR2、CCK、CTAG2基因有望成为子痫前期早期诊断标志物。

大量研究表明疾病的发生不仅受到遗传因素的影响,而且受到表观遗传因素的影响。表观遗传学(epigenetic)是与遗传学(genetic)相对应的概念:遗传学是指基于基因序列改变所致基因表达水平变化,而表观遗传学则是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化,这种改变在疾病发生的过程中起重要作用,这提示笔者表观遗传标志可作为疾病的诊断标志物。Wang等^[20]发现医学辅助生育增加子痫前期发病的风险,这提示笔者表观遗传的源头-配子的改变足以导致胎盘缺陷。Kanayama等^[21]

用单元型分析方法研究发现位于 10q21.1 的印迹基因 *STOX1* 对子痫前期的发病具有母源效应,并且小鼠模型表明印迹基因 *p57-Kip2* 的失活导致孕期母鼠高血压、蛋白尿等子痫前期样症状。尽管如此,此小鼠模型亦不能充分解释人子痫前期中的所有症状,近期的转录组学分析表明这些鼠的子痫前期样症状呈现环境依赖性,这提示有其他的表观遗传机制在起作用^[22]。Chim 等用胎盘-胎儿释放到母亲外周血内的 DNA 研究发现 *SERPINB5* 启动子区域子痫前期患者和正常对照相比被甲基化,Chelbi S. T 等^[23] 研究发现子痫前期患者 *SERPINA3* 近端启动子区域特定 CpG 岛显著低甲基化,这些去甲基化的 CpG 岛大都位于发育调节因子(如炎症因子:MAZF 和 RXR 等)的结合位点,而这些因子在胎盘滋养层细胞植入子宫内壁以及胎盘营养物质输送中起很重要的作用。由于表观遗传标志是在胎儿发育早期已经存在,并且在母亲外周血中可以检测,一些表观遗传标志已经被研究证明和子痫前期的病理过程具有很大相关性,这些提示笔者表观遗传标志可以被发展成为该病的无创性产前诊断标志物而用于临床。

microRNA (miRNA) 是近年来发现的生物体内源长度约为 20~23 个核苷酸的非编码小 RNA,通过与靶 miRNA 的互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控,导致 miRNA 的降解或翻译抑制。越来越多的证据显示,miRNA 在哺乳动物生长发育以及疾病过程中的基因表达调节起到非常重要的作用。miRNA 在基因调控中的重要作用为子痫前期早期诊断带来了新的启迪。Chim 等^[24] 在 2008 年检测并证实了孕妇血浆中存在有胎盘来源的 miRNA 这一发现提示 miRNA 可以作为分子标志物用于无创性产前诊断。2007 年, Pineles 等^[25] 分析了子痫前期并且足月小样儿的患者与正常孕妇之间胎盘组织中 157 种 miRNA 的表达变化情况。结果发现在子痫前期患者胎盘组织中 mir-210 的表达量上调。而已经证明在不同氧化条件下 mir-210 的过表达与血管内皮生长因子的调控相关,因此 microRNA 做为一种分子标志物在子痫前期的发病监测中有很好的应用前景^[26]。

4 胎儿游离 DNA 用于子痫前期早期诊断

孕妇外周血中胎儿游离 DNA 的发现为产前诊断开辟了一个新的途径。早在几十年前,研究者就发现人体外周血中存在微量游离核酸,后来多个课题组发现肿瘤患者外周血中发现了具有肿瘤特征的游离 DNA;妊娠过程中胎盘滋养层侵入子宫壁的机制类似肿瘤细胞的入侵。受此启发,LO 等^[27] 认为孕妇外周血中应该也存在胎儿的游离 DNA,并利用实时定量 PCR 的方法从孕妇血浆的总游离 DNA 中成功扩增出男性胎儿的 Y 染色体特异性序列 (SPY 基因序列),首次证实胎儿 DNA 可以进入母体外周血循环,并以游离 DNA 的形式稳定存在。目前胎儿游离 DNA 的释放机制、清除机制、动力学性质都得到了很好的研究,胎儿游离 DNA 的提取分离技术已相当成熟。胎儿游离 DNA 已在胎儿性别鉴定、胎儿 RhD 血型判断、染色质疾病的筛查和单基因疾病的筛查中进行了较多的研究^[28]。然而胎儿游离 DNA 在孕妇血浆中的含量占总体游离 DNA 比例很低,在很大程度上限制了其的应用。

子痫前期患者的血浆游离 DNA 是对照组的 5 倍,结果发展成为子痫前期的孕妇胎儿游离 DNA 的浓度是对照组的 2.39 倍。Lau 等^[29,30] 发现在子痫前期孕妇中胎儿游离 DNA 的半衰期 (114 min) 明显高于对照组 (28 min)。由于之前研究证明胎儿游离 DNA 的来源是胎盘,而子痫前期发病过程中伴随胎盘的剥离和细胞的凋亡,导致更多的 DNA 进入母亲外周血,可能是该病患者血浆胎儿游离 DNA 升高的机制。由于患者血浆中较为丰富的胎儿游离 DNA 降低了其被检出的难度,使之更适合被应用于临床。通过检测胎儿游离 DNA 的甲基化状态与孕妇血浆 DNA 甲基化程度存在差异可能是一种较好的检测途径。2005 年 Chim 等^[31] 研究发现, *maspin* 基因启动子在胎盘细胞中处于低甲基化,而在母血细胞中处于高甲基化,子痫前期患者血浆胎儿游离 DNA 的低甲基化的 *maspin* 启动子 (U-*maspin*) 片段的浓度是对照组的 5.7 倍,这提示笔者胎儿游离 DNA 的 U-*maspin* 有望作为子痫前期无创诊断的标志物。但是进一步的研究需要阐明 U-*maspin* 的

浓度在子痫前期发作前是否升高。

胎儿和母体 DNA 不同甲基化状态为其作为母亲血浆中胎儿游离 DNA 的筛选标记提供了可能。提示笔者胎儿游离 DNA 的甲基化情况有望作为无创性诊断的标志。这些都暗示子痫前期患者胎儿游离 DNA 很有潜力优先成为诊断该病的重要筛查物。

综上所述,子痫前期是一种对母婴伤害严重的疾病,加强对孕妇的早期筛查和诊断对防治该病具有很重要的意义,因此一种快速有效的无创性产前诊断方法亟待出现。对该病的发病机制、潜在致病基因的寻找、分子标志物的鉴定以及胎儿游离 DNA 的应用需要更深入的研究,对子痫前期早期诊断中相关的标志物的应用需要更多的验证,以期早日应用于临床诊断。

参 考 文 献

- [1] Levine RJ, Maynard SE, Qian C, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(7): 672-683.
- [2] Friedman SA. Mild gestational hypertension and preeclampsia. In: Sibai BM, ed. *Hypertensive disorders in women*[M]. Philadelphia: WB Saunders, 2001:9-24.
- [3] 苏莉,黄醒华,翟桂荣. 围产保健与人高症发病及其母儿并发症[J]. *中国妇女保健杂志*, 2001,16:97-99.
- [4] Gary C, Norman FG, Kenneth JL, et al. Hypertensive disorders of pregnancy[M]. *Williams Obstetrics*, McGraw-Hill, 2001, 21: 569-619.
- [5] Vedernikov Y, Saade GR, Garfield RE. Vascular reactivity in preeclampsia[J]. *Semin Perinatol J T*, 1999, 23:34-44.
- [6] Speake PF, Glazier JD, Ayuk PT, et al. L-Arginine transport across the basal plasma membrane of the syncytiotrophoblast of the human placenta from normal and preeclamptic pregnancies[J]. *J Clin Endocrinol Metab J T*, 2003, 88:4287-4292.
- [7] Ravi Thadhani, Caren G. Solomon. Preeclampsia-A Glimpse into the Future[J]? *N Engl J Med*, 2009, 359(8): 858-859.
- [8] Lyell DJ, Lambert-Messerlian GM, Giudice LC. Prenatal screening, epidemiology, diagnosis, and management of preeclampsia[J]. *Clin Lab Med*, 2003, 23: 413-442.
- [9] Napolitano M, Miceli F, Calce A, et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas[J]. *J Clin Endocr Metab*, 2000, 85: 2318-2323.
- [10] Cross JC. The genetics of pre-eclampsia: a fetoplacental or maternal problem[J]? *Clin Genet*, 2003, 64: 96-103.
- [11] Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of preeclampsia[J]. *Lancet*, 2001, 357: 53-56.
- [12] Harrison GA, Humphrey KE, Jones N, et al. A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 60: 1158-1167.
- [13] Chesley LC, Anntito JE, Cosgrove RA. The familial factor in toxemia of pregnancy[J]. *Obstet Gynec*, 1968, 32: 303-311.
- [14] Berends AL, Steegers EA, Isaacs A, et al. Familial aggregation of preeclampsia and intrauterine growth restriction in a genetically isolated population in the Netherlands[J]. *Europ J Hum Genet*, 2008, 16: 1437-1442.
- [15] Arngrimsson R, Hayward C, Nadaud S, et al. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region[J]. *Am J Hum Genet*, 1997, 61: 354-362.
- [16] Moses EK, Lade JA, Guo G, et al. A genome scan in families from Australia and New Zealand confirms the presence of a maternal susceptibility locus for preeclampsia, on chromosome 2[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 67: 1581-1585.
- [17] Chelbi ST, Mondon F, Jammes H, et al. Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia [J]. *Hypertension*, 2007, 49: 76-83.
- [18] Keizo Kanasaki, Kristin Palmsten, Hikaru Sugimoto, et al. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with preeclampsia [J]. *Nature*, 2008, 453:1117-1121.
- [19] Founds SA, Conley YP, Lyons-Weiler JF, et al. Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia[J]. *Placenta*, 2009, 30(1): 15-24.
- [20] Wang JX, Knottnerus AM, Schuit G, et al. Surgically obtained sperm, and risk of gestational hypertension and preeclampsia[J]. *Lancet*, 2002, 359: 673-674.
- [21] Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, et al. Deficiency in p57 Kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice[J]. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8: 1129-1135.
- [22] Knox KS, Baker JC. Genome-wide expression profiling of

- placentas in the p57 Kip2 model of pre-eclampsia [J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13: 251-263.
- [23] Chelbi ST, Mondon F, Jammes H, et al. Expressional and epigenetic alterations of placental serine protease inhibitors: SERPINA3 is a potential marker of preeclampsia [J]. Hypertension, 2007, 49: 76-83.
- [24] Chim SS, Shing TK, Hung EC, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma [J]. Clin Chem. 2008, 54:482-490.
- [25] Pineles BL, Romero R, Montenegro D, et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia [J]. Am J Obstet Gynecol, 2007, 196:261-263.
- [26] Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia [J]. PLoS ONE, 2006, 1: 1-13.
- [27] LO Y M, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum [J]. Lancet, 2007, 369:440-442.
- [28] 王文博,张毅,孙树汉. 孕妇外周血中胎儿游离 DNA 在产前诊断中的应用 [J]. 第二军医大学学报, 2009, 4: 442-445.
- [29] Lo YMD, Leung TN, Tein MSC, et al. Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia [J]. Clin Chem, 1999, 45: 184-188.
- [30] Lau TW, Leung TN, Chan LY, et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia [J]. Clin Chem, 2002, 48: 2141-2146.
- [31] Chim SSC, Tong YK, Chiu RWK, et al. Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(1): 14753-14758.

(收稿日期:2009-06-27)

读者 · 作者 · 编者

本刊对照片及图像的要求

照(图)片每 3 张图单独占 1 页,集中附于文后,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每张照(图)片均应有必要的图题及说明性文字置于图的下方,并在注释中标明图中使用的全部非公知公用的缩写;图中箭头标注应有文字说明。大体标本照片在图内应有尺度标记,病理照片要求注明特殊染色方法和高、中、低倍数。照片要求有良好的清晰度和对比度,并在背面标明图号、作者姓名及图的上下方向。说明文字应简短,不应超过 50 字,所有的图在文中相应部分应提及。电子图片采用 jpg 格式,分辨率不低于 300 像素/英寸,并应经过剪切后充分显示关键部分。

动态图像分别按其在正文中出现的先后次序连续编码,文中应标记为“动态图 ×”。视频资料要求图像清晰稳定,剪接顺畅,保持可能获得的最高清晰度模式,视频文件采用 AVI 格式,大小在 5M 以内。每个文件名均应与文中的名称相符,如“动态图 ×”。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部

欢迎来稿 欢迎订阅

地址:上海市长乐路 536 号中国产前诊断杂志编辑部(200040)

电话:021-54045772 网上投稿:CJ PD2008 @gmail.com