

双胎胎盘 HLA-G 第 8 外显子多态性与妊娠结局的相关性研究

陈敏玲 方群* 庄广伦 罗艳敏 陈宝江 何志明 陈筠虹 陈涌珍

(中山大学附属第一医院 妇产科胎儿医学中心, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的 探讨双胎胎盘 HLA-G 第 8 外显子基因多态性分布与妊娠结局的关系。**方法** 收集 2003 年 11 月至 2005 年 12 月在中山大学附属第一医院分娩的双胎病例共 125 例。采用多聚酶链反应-序列特异性引物法(PCR-SSP)检测双胎胎盘 HLA-G 该位点 14 bp 插入缺失多态性,并通过基因测序证实,对照双胎妊娠结局进行分析。**结果** ① 125 例双胎病例中,以 2 胎 HLA-G14bp 等位基因出现的总频数进行分组:总频数为 0(14-bp/14-bp 及 14-bp/14-bp 组合)47 对(37.6%),总频数为 1(14-bp/14+bp 及 14-bp/14-bp 组合)21 对(16.8%),总频数为 2(14-bp/14+bp 及 14-bp/14+bp 组合或 14+bp/14+bp 及 14-bp/14-bp 组合)44 对(35.2%),总频数为 3(14+bp/14+bp 及 14+bp/14-bp 组合)7 对(5.6%),总频数为 4(14+bp/14+bp 及 14+bp/14+bp 组合)6 对(4.8%);② 2 胎儿 14+bp 等位基因出现总频数与在子痫前期双胎病例中分布有显著性差异,子痫前期发生率与 2 胎 14+bp 等位基因总频数有关(95%可信区间 0.189~0.288, $P<0.05$);③ 双胎其他常见妊娠合并症发生率(如早产、双胎输血综合征、双胎不同一性等)与 HLA-G 第 8 外显子多态性分布无显著性关联($P>0.05$)。**结论** 双胎胎盘 HLA-G 第 8 外显子 14+bp 等位基因出现总频数可能与子痫前期发生有关,但与双胎其他常见合并症发病未见明显关联。

【关键词】 双胎妊娠; HLA-G; 第 8 外显子; 多态性; 妊娠结局

The Relationship between the Placental HLA-G 14bp Deletion/Insertion Polymorphism in Exon 8 and Outcome of Twin-Pregnancy

Chen Min-ling, Fang Qun*, Zhuang Guang-lun, Luo Yan-min, Chen Bao-jiang, He Zhi-ming, Chen Yun-hong, Chen Yong-zhen.

(Fetal Medicine Center, Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the HLA-G 14bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 and outcome of twin-pregnancy. **Methods** 125 sets of twins from November 2003 to December 2005 were recruited and the outcome of the pregnancy were followed up. The polymeric chain reaction/sequence specific primer (PCR-SSP) technique was applied to determine the placental HLA-G 14bp deletion/insertion polymorphism in exon 8, the gene sequences were aligned and analyzed. **Results**

① 125 sets of twins cases was grouped by the frequencies of 14+bp allele, 0 frequency group(14-bp/14-bp and 14-bp/14-bp genotype)47 sets(37.6%), 1 frequency group(14-bp/14+bp and 14-bp/14-bp genotype)21 sets(16.8%), 2 frequency group(14-bp/14+bp, 14-bp/14+bp or 14+bp/14+bp, 14-bp/14-bp genotype)44 sets(35.2%), 3 frequency group(14+bp/14+bp and 14+bp/14-bp genotype)7 sets(5.6%), 4 frequency group(14+bp/14+bp and 14+bp/14+bp genotype)6 sets (4.8%). ② In

* 通讯作者:方群. E-mail: fang_qun@163.com

the twin cases complicated of preeclampsia, the frequencies of 14+bp allele significantly increased (95% CI: 0.189~0.288, $P<0.05$). ③ There was no statistical significant difference of the placental HLA-G 14bp polymorphism genotype in exon 8 among the other complicate groups (premature labour, twin-twin transfusion syndrome and discordant twin, et al.) ($P>0.05$). **Conclusion** The frequencies of 14+bp allele in twin-pregnancy may have influence on the development of preeclampsia, and might not associated with the risk of the other complicated twins.

【Key words】 Twin pregnancy; Human leukocyte antigen-G; Polymorphism; Exon 8; Pregnancy outcome

近年来全社会双胎发生率呈明显上升趋势,究其原因与辅助生育技术发展、高龄孕妇增多以及促排卵药物使用有关。双胎妊娠与单胎妊娠比较,不良妊娠结局发生率明显增高。约83%的双胎妊娠合并有1种以上的妊娠并发症。迄今,对于双胎不良妊娠结局的原因尚不明确。近年研究发现 HLA-G 基因第8外显子上3'非翻译区的14bp缺失/插入(14-bp/14+bp)多态性对于妊娠维持具有重要作用,可能影响妊娠结局。本研究采用多聚酶链反应-序列特异性引物法(PCR-SSP)检测双胎胎盘该位点的多态性,探讨双胎 HLA-G 第8外显子基因多态性分布,并探讨其与双胎妊娠结局的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2003年11月至2005年12月在中山大学附属第一医院分娩的双胎病例共125例,追踪妊娠结局,各种产科合并症诊断标准参照乐杰主编的《妇产科学》(第6版)。孕妇平均年龄(30.1 ± 4.1)岁,平均孕次1次,产次2次,平均分娩孕周(35.3 ± 2.8)周(22~39周)。辅助生殖受孕66例(52.8%),自然受孕59例(47.2%);双绒毛膜双胎76例(60.8%),单绒毛膜双胎49例(39.2%,其中有1例为辅助生殖技术 ICSI 受孕,其余48例均为自然受孕)。

1.2 方法

1.2.1 胎盘标本取材及处理 在知情同意下,胎盘娩出后,立即在各胎儿脐带附着点对应处自胎盘母体面向胎儿面剪切胎盘组织约5g。在冰生理盐水中反复漂洗,去除血液,分装冻存管中,液氮冻存半小时后转移至-80℃冰箱保存。采用饱和酚、氯仿

的方法提取胎盘的基因组DNA。

1.2.2 PCR 扩增 HLA-G 第8外显子基因 参照文献设计引物,由大连宝生物技术有限公司合成,序列如下:GE14 HLA-G: 5'-GTG ATG GGC TGT TTA AAG TGT CAC C-3'; RHG4: 5'-GGA AGG AAT GCA GTT CAG CAT GA-3'; β -actin 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA - 3'; 5'-GTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC - 3', 扩增产物为548 bp。PCR反应体系为50 μ L,其中模板DNA 500 ng, 10 $\times$ PCR反应液5 μ L, 10 U/ μ L Taq 酶(TaKaRa 公司)0.5 μ L, 10 mmol/L dNTPs 4 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各1 μ L。PCR反应条件为:94℃ 5 min 预变性,94℃ 30 s, 58℃ 50 s, 72℃ 60 s, 循环35次,延伸72℃ 10 min。

1.2.3 PCR 扩增产物的电泳 ①选择合适的垂直电泳槽;②配置凝胶液:配方见试剂配制;③灌置凝胶:凝胶液配好后,充分混匀,凝胶液体沿着一侧玻璃板注入,渐及底部,乃至全部充盈两层玻璃板夹缝。胶液灌好后,在玻璃板上插入齿梳。在室温下让凝胶聚合约45 min;④配制电泳缓冲液:配制1XTBE电泳缓冲液1000 ml,分别加入到上下电泳槽中。将玻璃板插入电泳槽中,夹紧,倒入电泳液;⑤电泳:小心取出梳子,立即用缓冲液冲洗加样孔,取出PCR产物10 μ l,加入上样缓冲液2 μ l混匀,用移液枪将混合液加入预先制备好的8%聚丙烯酰胺凝胶的上样孔中,垂直电泳仪100 V 10 min, 60 V 电泳6小时;⑥根据指示剂迁移位置来判定是否终止电泳,下胶;⑦按常规硝酸银染色,固定:清洗洗槽,将有凝胶的玻璃板面向下,凝胶浸入固定液中,

使凝胶与玻璃板分离,固定 30 min;凝胶用蒸馏水清洗;1%硝酸浸泡 10 min,用蒸馏水清洗;染色:将凝胶浸入显色液中,出现电泳带,加入终止液,凝胶用蒸馏水清洗;⑧ 使用干胶仪制成易于保存的图片。

1.2.4 PCR 扩增产物的序列测定 选取-14 bp/-14 bp 和+14 bp/+14 bp 各 1 条带,切胶、纯化,送英韦创津公司测序。① PCR 产物直接纯化,纯化后的 PCR 产物测序,DNA 纯度要求:OD260/OD280 = 1.6 ~ 2.0、DNA 浓度要求:PCR 产物 10 ng/ μ L;② 测序 PCR 反应。配制 Master Mix 后在热循环仪 GeneAmp PCR 9600 上进行 DNA 扩增:

反应体系:

DNA(200 ng/ μ L)	1 μ L
BigDye Mix	8 μ L
Primer(3.2 pmol/ μ L)	1 μ L
灭菌去离子水	10 μ L
总体积	20 μ L

反应条件:先进行 98 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,再进行 25 个循环(96 $^{\circ}$ C 10 s 变性,50 $^{\circ}$ C 5 s 退火,60 $^{\circ}$ C 4 min 延伸),最后 4 $^{\circ}$ C 保温。③ 纯化测序 PCR 产物,电泳样品配制和变性,在上述乙醇挥发干的样品中加入 12 μ L 的 Hi-Di Formamide;上样毛细管电泳。④ 毛细管电泳。⑤ 使用 Sequence Analysis 软件对测序结果进行分析。

1.3 统计学方法 统计分析均使用 SPSS13.0 软件包完成,以 2 个胎盘 14+bp 等位基因出现总频数分组进行统计。以 $P < 0.05$ 为具有统计学显著差异。2 组间均数比较采用 t 检验,3 组间均数之间的比较采用 ANOVA 方法和分层分析。

2 结果

2.1 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺(PAGE)凝胶电泳结果 第 8 外显子存在 1 个 14 bp 删除/插入位点(14-bp/14+bp)多态性,14- bp 基因型可扩增出 210 bp 的片断,而 14+ bp 基因型产生 224 bp 的条带,杂合子可见 210 bp 和 224 bp 的 2 条片段。采用北京天为时代科技有限公司的 pBS DNA/ Hae III 作为 DNA marker(见图 1)。

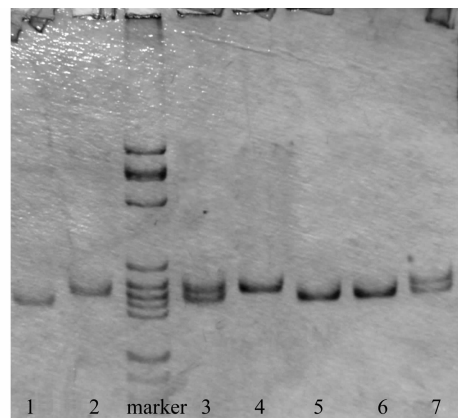


图 1 HLA-G 第 8 外显子基因 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果
marker: PBR DNA/Hae III ladder(213bp/234bp)

1、5、6 泳道:14-bp/14-bp 纯合子 2、4 泳道:14+bp/14+bp 纯合子
3、7 泳道:14-bp/14+bp 杂合子

2.2 PCR 扩增产物测序结果 与 GenBank Blast 比对,224 bp 产物比 210bp 产物多出了 1 个 14 bp 的基因序列:ATT TGT TCA TGC CT(见图 2)。与文献报道^[1]一致。

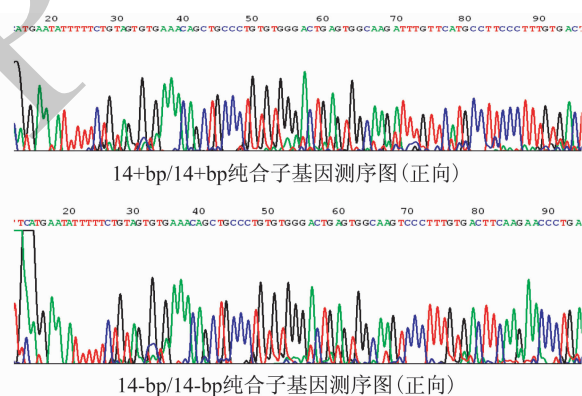


图 2 HLA-G 第 8 外显子测序图

2.3 不同基因型双胎妊娠合并症比较(见表 1)。双胎 14+bp 等位基因出现总频数与双胎妊娠结局的关系(见表 2)。

其他内科合并症包括:甲亢、肝炎、血小板减少性紫癜等从上面 2 个表可见羊水过多与双胎输血综合征与双胎间基因是否一致有显著性关系($P < 0.05$),这与单绒毛膜双胎双胎间基因一致性较高有关。其余合并症与双胎盘是否基因一致无关。2 个胎儿基因型分布顺序对统计结果无影响($P > 0.05$)。2 胎 14+bp 等位基因出现总频数在出现子痫前期双胎中有显著性差异,且经 Ridit 检验证实

子痫前期发生率与2胎14+bp等位基因总频数有关(95%可信区间为0.189~0.288, $P<0.05$)。小于32周早产与14+bp等位基因总频率不同分组未见显著性关系($P=0.058$),但在胎儿携带4个14+bp等位基因组中比例较高(2例/6例)。考虑到不同的绒毛膜性质可能导致双胎基因分组和其他其他

变量的关系可能不同,故以绒毛膜性质为分层因素(协变量)筛选与双胎基因分组有统计学意义的因素,分析方法:分类变量按照CMH(Cochran-Mantel-Haenszel)法进行分析;连续性变量采用协方差分析进行分析。其中有统计学差异的变量为:子痫前期($P=0.0002$)。

表1 不同基因型双胎妊娠合并症比较(n)

	双胎基因一致组				双胎基因不一致组			
	-/-,-/- (47对)	-/+,-/+ (36对)	+/+,+/+ (6对)	n (89对)	-/+,-/+ (21对)	-/-,+/+ (8对)	-/+ ,+/+ (7对)	n (36对)
子痫前期	1	7	2	10	1	3	2	6
早产								
<32周	3	4	3	10	2	0	0	2
<37周	25	24	1	50	9	6	4	19
胎膜早破	3	6	0	9	4	0	1	5
胎盘早剥	0	1	0	1	0	0	0	0
前置胎盘	0	3	0	3	0	1	0	1
羊水过多*	4	6	1	11	0	0	0	0
糖尿病	4	10	0	14	2	1	0	3
其他内科合并症	2	2	0	4	1	1	0	2
产后出血	5	2	0	7	0	2	0	2
双胎输血综合征 JHJ	4	5	1	10	0	0	0	0
剖宫产	40	30	4	74	17	8	7	32

注:一致性组与非一致性组比较。*为 $P=0.033$,JHJ: $P=0.035$

表2 双胎14+bp等位基因总频数与双胎妊娠结局的关系[n(%)]

	两胎14+bp等位基因总频数					双胎对数 125
	0 47(37.6%)	1 21(16.8%)	2 44(35.2%)	3 7(5.6%)	4 6(4.8%)	
子痫前期*	1(6.3)	1(6.3)	10(62.5)	2(12.5)	2(12.5)	16
早产						
<32周	3(25.0)	2(16.7)	4(33.3)	0	3(33.3)	12
<37周	25(36.2)	9(13.0)	30(43.4)	4(5.8)	1(1.4)	69
胎膜早破	3(21.4)	4(28.6)	6(42.9)	1(7.1)	0	14
胎盘早剥	0	0	1(100.0)	0	0	1
前置胎盘	0	0	4(100.0)	0	0	4
羊水过多	4(36.4)	0	6(54.5)	0	1(9.1)	11
糖尿病	4(23.5)	2(11.8)	11(64.7)	0	0	17
其他内科合并症	2(33.3)	1(4.8)	3(6.8)	0	0	6
产后出血	5(55.6)	0	4(44.4)	0	0	9
双胎输血综合征	4(40.0)	0	5(50.0)	0	1(10.0)	10
剖宫产	40(37.8)	17(16.0)	38(35.8)	7(6.6)	4(3.8)	106

注:*为精确概率检验 $P=0.0009$

3 讨论

3.1 HLA-G 第 8 外显子多态性与妊娠维持 无论是单胎抑或双胎妊娠,成功妊娠的维持与母胎间正常的免疫耐受密切相关。早在 20 世纪 50 年代英国学者 Medawer 就提出胎儿为半异体移植物的概念。HLA-G 维持妊娠的机制包括:① 直接或间接抑制蜕膜自然杀伤(dNK)细胞;② 与蜕膜组织中的 T 细胞结合,抑制 T 细胞杀伤;③ 调节 T 辅助性细胞因子分泌,促使 Th2 偏移;④ 可溶性 HLA-G 分子通过激活 Fas/FasL 旁路,引起活化母体 CD8⁺T 细胞的凋亡^[2]。HLA-G 多态性部位呈“成簇”趋势,主要分布在 5 个区域,包括由外显子 2、3、4 所编码的具有抗原结合功能的结构域、5'端上游调节区(5'URR)和外显子 8 的 3'非转录区(3'UTR),而在其他基因编码区核苷酸序列变异较少,相对比较保守。1993 年由 Harrison 首次报道了 HLA-G 第 8 外显子(14-bp/14+bp)多态性,在对灵长类动物的 MHC-G 进化过程研究中发现,这种 14bp 多态性属于缺失性多态,而非插入性多态。研究发现 14+bp 等位基因表达时,外显子 8 起始处 1 个 92bp 片段被切除,结果表明被切除的 HLA-G mRNA (92-bp)可能比完整的 HLA-G mRNA 更稳定而影响选择性剪切。推测这一区域参与 HLA-G 转录后调控,其多态性变化和 HLA-G mRNA 表达水平和 HLA-G 的蛋白水平密切相关。近年来发现 HLA-G 第 8 外显子中的 14bp 缺失/插入位点(14-bp/14+bp)多态性与妊娠维持的关系密切,成为关注热点。越来越多报道该位点多态性与单胎自然流产、子痫前期、胎盘早剥等不良妊娠结局有关。但哪一种多态性有利于维持妊娠的结论有所不同。2002 年 Hviid 等^[3]发现孕妇 14+bp/14+bp 多态性与 RSA 明显相关;而 2004 年 Tripathi 等^[1]则认为孕妇 14-bp/14+bp 基因型与 RSA 关系更加密切;2000 年 Bermingham 等^[4]发现子痫前期患者子代 14-bp/14+bp 基因型比率较高;2001 年 O'Brien 及 2004 年 Hylenius 等^[5]认为胎盘 14+bp/14+bp 基因型与子痫前期发病有关。

3.2 双胎妊娠的维持 约 83%的双胎妊娠合并有

1 种以上的妊娠并发症。双胎妊娠早期流产发生率为 5%,是单胎的 2~3 倍;和单胎妊娠相比,双胎合并子痫前期,相对危险率为 2.04~4,且一旦并发子痫前期,病情往往较为严重,以中、重度为主;双胎胎盘早剥发生率较单胎增高(4.7%比 0.7%);胎儿发育受限发生率是单胎妊娠的 10 倍;单绒毛膜双胎孕 32 周前的早产率为 9.2%,双绒毛膜双胎为 5.5%,而单胎妊娠仅为 1%~2%。但迄今,对于双胎容易发生子痫前期等不良妊娠结局的原因尚不明确。既往认为双胎妊娠由于子宫腔过大,引起子宫张力增高,容易引发流产和早产,其次由于子宫腔增大后使胎盘严重缺血缺氧,胎盘抗氧化酶减少和活性下降,胎盘局部出现氧化应激,引起脂质过氧化和绒毛间隙的白细胞活化,加剧氧化应激,从而造成血管内皮细胞激活功能障碍和结构损伤,使双胎妊娠较单胎更易发生母儿严重并发症。但是这一理论并不完善,有学者对羊膜腔内压力进行研究,发现双胎妊娠过程中子宫腔内压力并没有明显增加^[3]。因此双胎妊娠的维持机制尚未明了,其妊娠期的免疫耐受状况目前也尚不清楚,但早在 20 世纪 70 年代,就有学者提出双胎妊娠较单胎妊娠携带的组织相容性抗原量明显增高,推测这种特殊的胎儿抗原超负荷对妊娠结局有一定的影响。从关于基因多态性的研究中也发现双胎妊娠胎儿某些基因的多态性对妊娠结局可产生影响,如胎儿携带 IL-1 拮抗受体第 2 等位基因(IL1RN*2)的总频数与双胎发生胎膜早破相关,且显著增加围产儿死亡率。若第 1 胎胎儿 Fas 基因启动子出现第 670 位的 A→G 的单核苷酸突变(TNFRSF6),则双胎发生未足月胎膜早破(PPROM)的几率显著性增高^[4]。单胎妊娠中 HLA-G 第 8 外显子多态性与妊娠结局相关的研究结果是否在双胎妊娠上适用,目前尚未见相关报道,是值得探讨的问题。

3.3 HLA-G 第 8 外显子基因多态性与双胎妊娠合并症的关系 文献报道双胎妊娠合并子痫前期发生率约为 11.8%~37%^[5],与本文结果相符。子痫前期的发生与胎盘滋养细胞侵蚀功能降低有关,妊娠初期,当滋养干细胞分化为细胞滋养层后,由增殖表型转化为侵蚀表型,标志为 HLA-G、基质金属蛋

白酶及黏附分子受体类型的改变,之后其生理性血管重铸发生异常。因此子痫前期的发生与 HLA-G 密切相关。体外培养的子痫前期患者胎盘滋养细胞发现 HLA-G 的表达下降,本研究亦证实 HLA-G 第 8 外显子多态性与双胎子痫前期的发生可能有关。本研究中双胎妊娠合并子痫前期发病率为 12.8%,在子痫前期组中 14+bp/14+bp 基因型比率显著增高,此结果与 2008 年国外的研究结果^[6]相一致,该文献报道单胎胎盘 HLA-G 第 8 外显子 14+bp 序列的存在与子痫前期的发生有关,认为此序列的存在影响 HLA-GmRNA 的类型和蛋白表达,从而对子痫前期的发病起重要作用。

双胎妊娠特有的合并症(如双胎输血综合征、双胎不同一性等)与胎盘 14 bp 基因多态性未见明显关系。羊水过多与双胎输血综合征与双胎间基因是否一致有显著性关系($P<0.05$),这与单绒毛膜双胎双胎间基因一致性较高有关。因为双胎输血综合征、羊水过多与单绒毛膜性质有关,所以在双胎基因一致组中多见。双胎不同一性与胎盘 14 bp 基因多态性无关,推测不同一性双胎胎儿的体重和表型的不一致与免疫因素关系不大,需从另外角度探讨,可能和双胎间遗传异质性、X 染色体失活偏离、胎盘血供和宫内环境差异有关。

参 考 文 献

- [1] Tripathi P, Abbas A, Naik S, et al. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy[J]. Tissue Antigens, 2004, 6:706-710.
- [2] Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, et al. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2004, 2:93-119.
- [3] Fisk NM, Ronderos-Dumit D, Tannirandorn Y, et al. Normal amniotic pressure throughout gestation [J]. Br J Obstet Gynaecol, 1992, 1:18-22.
- [4] Kalish RB, Nguyen DP, Vardhana S, et al. A single nucleotide A>G polymorphism at position -670 in the Fas gene promoter: relationship to preterm premature rupture of fetal membranes in multifetal pregnancies [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 1:208-212.
- [5] Fischer RL, Weisberg LS, Hediger ML. Etiology of third-trimester maternal hyperuricemia in nonpreeclamptic twin gestations[J]. Obstet Gynecol, 2001, 1:62-65.
- [6] Moreau P, Contu L, Alba F, et al. HLA-G Gene Polymorphism in Human Placentas: Possible Association of G*0106 Allele with Preeclampsia and Miscarriage[J]. Biol Reprod, 2008, 79: 459-467.

编辑:郑枫芸

(收稿日期:2010-3-24)

读 者 · 作 者 · 编 者

本刊对文稿撰写的要求

文稿应具科学性、实用性,论点明确,资料可靠,数据准确,层次清楚,文字精练,用字规范,文稿附图量不限,提倡多附图片和视频(音频)内容。论著性文章 4000 字左右,综述、讲座 5000 字左右,论著摘要、经验交流、病例报告等一般不超过 2000 字,欢迎以图像为主的来稿,并贯穿文字说明和评析,专家视频讲座为 30~40 分钟(分成 3~4 段)。当报告是以人为研究对象的试验时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制定的伦理学标准并得到该委员会的批准,是否取得受试对象的知情同意。文题力求简明,且能反映出文章的主题。中文文题一般不超过 20 个汉字。

中国产前诊断杂志(电子版)编辑部