

围产医学

DOI: 10.11699/cyxb20131014

Notch1 在先兆子痫胎盘组织中的表达

黄 静, 孙大光, 张 益, 杨 柳, 计 垣, 杨继高, 李 红

(重庆市人口和计划生育科学技术研究院出生缺陷与生殖健康重庆市重点实验室, 重庆 400020)

【摘要】目的:探讨 Notch 信号通路成员 Notch1 在人类先兆子痫发生机制中的作用。**方法:**获取正常妊娠胎盘组织和先兆子痫胎盘组织, 分别采用 real-time PCR 法、Western blot 法、免疫组织化学法检测两种胎盘组织中 Notch1 mRNA、蛋白表达及其分布水平。**结果:**Notch1 在两种胎盘组织中均有表达, 且主要集中在细胞膜上表达。Notch1 在先兆子痫胎盘组织(实验组)的表达水平明显低于正常胎盘组织(对照组)($P < 0.05$)。**结论:**推测 Notch1 可通过 Notch 信号通路介导胎盘的血管发生、血管形成, 影响胚胎滋养层细胞血管内的侵袭过程, 其表达下调与先兆子痫的发生有关。

【关键词】Notch1; 先兆子痫; 胎盘

【中国图书分类法分类号】R714.24+4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-20

Expression of Notch1 in pre-eclampsia complicated placentas

HUANG Jing, SUN Daguang, ZHANG Yi, YANG Liu, JI Yuan, YANG Jigao, LI Hong

(Key Laboratory of Birth Defects and Reproductive Health of Chongqing, Chongqing Science and Technology Research Institute for Population and Family Planning)

【Abstract】Objective: To explore the role of the Notch signaling members Notch1 in the mechanism of human pre-eclampsia. **Methods:** Placental tissues of normal pregnancy and pre-eclampsia were obtained respectively. Real-time PCR, Western blot and immunohistochemical method were used to detect the distribution and expression levels of Notch1 mRNA and Notch1 protein in both placental tissues. **Results:** Notch1 was expressed in both placental tissues and expression was localized in the membrane. Expression levels of Notch1 in placental tissues of pre-eclampsia (experiment group) were significantly lower than those in placental tissues of normal pregnancy (control group) ($P < 0.05$). **Conclusions:** Notch1 may mediate the occurrence and development of placental vasculogenesis and influence the endovascular invasion of embryonic cytotrophoblasts through the Notch signaling pathway and the reduced expression level of Notch1 may be associated with the occurrence of pre-eclampsia.

【Key words】Notch1; pre-eclampsia; placenta

先兆子痫是妊娠期特有和常见的疾病, 是孕产妇及围生儿死亡的重要原因之一, 究其发病机制仍不清楚。近年来, 随着分子生物学研究方法的进展, 对先兆子痫病因及发病机制的研究逐渐出现新的开拓点。越来越多的研究表明: 人类胎盘的血管发生以及血流调节对于维持胎儿正常发育和生长至关重要, 这些环节的任何失调均可能导致先兆子痫的发生, 并证实了 Notch 信号通路与血管发生、血管发育密切相关^[1]。本研究从基因和蛋白水平出发, 研究 Notch 信号通路的正性调节因子 Notch1 在人类先兆子痫胎盘中的表达, 探讨 Notch 信号通路在先

兆子痫发病机制中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

15 例正常胎盘组织作为对照组, 均来自 2010 年 11 月~2011 年 10 月重庆医科大学附属第一医院产科住院分娩正常孕妇, 妊娠经过正常, 无合并症及并发症, 年龄 23~38 岁, 孕 36~41 周; 无原发性高血压、心脏病、糖尿病、肾炎及肿瘤等病史, 无吸烟嗜好, 所有标本的获得均填写了知情同意书。15 例先兆子痫胎盘组织作为实验组, 均来自 2010 年 11 月~2011 年 10 月在重庆医科大学附属第一医院产科住院分娩先兆子痫患者, 年龄 23~39 岁, 孕 33~42 周, 诊断和分类标准参照《妇产科学》(第 6 版)^[2]; 无原发性高血压、心脏病、糖尿病、肾炎及肿瘤等病史, 无吸烟嗜好, 所有标本的获得均填写了知情同意书。实验组与对照组间年龄及孕周差异均无统计

作者介绍: 黄 静, Email: 693642094@qq.com,

研究方向: 出生缺陷和遗传学疾病的机制研究。

基金项目: 重庆市人口和计划生育科学技术研究院院级青年课题基金资助项目(编号: 院 09-07)。

学意义($P>0.05$)。

1.2 主要试剂

Trizol 试剂盒(美国 sigma 公司),real-time PCR 试剂盒(大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司),琼脂糖(西班牙),引物合成(大连 Takara 宝生物工程有限公司),山羊源 Notch1 多克隆抗体(美国 Santa cruz 公司),山羊源 β -actin 多克隆抗体(美国 Santa cruz 公司),山羊超敏二步法免疫组化检测试剂 PV-9003(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),Western blot 检测相关试剂(江苏碧云天生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集 各组胎盘娩出后,无菌状态下将胎盘母体面分为 4 象限,于各中心取 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$ 大小的组织块,尽量避开出血、梗死及钙化区。所有标本均分为 2 份,一份采用 4%多聚甲醛溶液固定备用,另一份置于液氮中保存,用于 RNA 和蛋白的提取。

1.3.2 Real-time PCR 法检测胎盘组织中 Notch1 mRNA 水平 RNA 提取和 cDNA 制备:按照 Trizol 试剂盒说明书,将液氮冻存的胎盘组织用于提取总 RNA。取 $5\text{ }\mu\text{l}$ 总 RNA 立即进行甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,判断其完整性。采用紫外分光光度计检测所得到的 RNA 浓度和纯度, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值均在 1.8~2.0。取 500 ng RNA,按照 PrimeScript[®] RT reagent Kit Perfect Real Time 试剂盒(大连 TaKaRa 公司)说明书进行逆转录。将上述已逆转录合成好的 cDNA 用于 real-time PCR 反应。引物序列分别为:Notch1 上游引物:5'-TGTCTGCC-GACGCACAAGGT-3',下游引物:5'-ACTTGCCAGGTCA-TCTACGG-3',扩增片段长度为 183 bp;GAPDH 上游引物:5'-CAAGATCATCAGCAATGCCTCCTGC-3',下游引物:5'-TCCACAGTCTTCTGGGTGGCAGTG-3',扩增片段长度为 135 bp。以上引物均由大连 TaKaRa 公司合成。所有反应均在 Bio-Rad IQ5 real-time PCR 仪上进行。Real-time PCR 反应总体积为 $25\text{ }\mu\text{l}$,包括 cDNA $2\text{ }\mu\text{l}$, $2 \times$ SYBR Green PCR MasterMix $12.5\text{ }\mu\text{l}$,5 pmol/L Notch1 和 GAPDH 引物各 $1\text{ }\mu\text{l}$,去离子水补足至 $25\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件为两步法:预变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min;变性 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,退火、延伸 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环;在延伸步骤采集荧光。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算方法对目的基因的表达式进行数据分析。

1.3.3 免疫组织化学法检测胎盘组织中 Notch1 蛋白的表达分布 收集胎盘组织,4%多聚甲醛液中固定 48 h 以上,石蜡包埋,制备 $6\text{ }\mu\text{m}$ 的连续组织切片。参照山羊免疫组化检测试剂盒说明书方法检测 Notch1 在胎盘组织中的表达部位。操作步骤如下:石蜡切片常规脱蜡,100%、95%、90%、80%、70%梯度酒精依次水化;3% H_2O_2 室温孵育 20 min;枸橼酸盐缓冲液微波加热抗原修复 5 min;滴加一抗(1:200)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h;滴加 Polymer Helper,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;滴加 poly- HRP anti-Goat IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min;DAB 显色后苏木精复染、脱水、透明、中性树脂封片。采用 NiKon TE-2000 成像系统摄像。Notch1 染色的阳性信号为细胞膜出现棕黄色颗粒,每张切片随机选取 5 个高倍视野(计数 200 个细胞/视野),观察阳性细胞染色强度。

1.3.4 Western blot 法检测胎盘组织中 Notch1 蛋白的表达水平 将冻存的组织用液氮研磨后,采用 RIPA 裂解液(江苏碧云天)提取胎盘组织总蛋白,以牛血清白蛋白作为标准品,参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(江苏碧云天)说明书测定蛋白浓度。取 $50\text{ }\mu\text{g}$ 等量蛋白进行上样,10% SDS-PAGE 分离胶,恒流 250 mA 电泳 1.5 h。采用湿转方法,将分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜($0.22\text{ }\mu\text{m}$)上,置于 5%的脱脂奶粉中室温封闭 1.5 h。然后采用 Notch1 抗体(1:100)和 β -actin 抗体(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日采用 PBST 洗涤 3 次,每次 10 min。采用兔抗山羊二抗(1:2 000)室温孵育 1 h 后,ECL 显影成像。运用 Quantity One 4.0 软件分析各条带强度的光密度值,以 Notch1 与 β -actin 的吸光度比值作为目的蛋白的相对含量。

1.4 统计学处理

运用 Excel 2003 录入数据和统计分析。实验组和病例组 real-time PCR 及 Western blot 数据为计量资料,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧检验)。

2 结果

2.1 Notch1 mRNA 在实验组和对照组中的表达

Notch1 在实验组和对照组均有表达,且实验组 Notch1 mRNA 表达水平明显低于对照组($t=6.081$, $P<0.05$,表 1)。

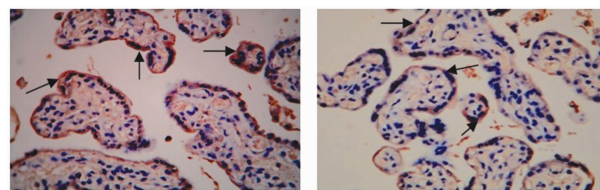
表 1 实验组和对照组 Notch1 mRNA 相对表达量

Tab.1 Relative mRNA expression of Notch1 in experiment group and control group

组别	例数(n)	Notch1 mRNA
对照组	15	5.491 ± 2.751
实验组	15	1.004 ± 0.777
t 值		6.081
P 值		< 0.05

2.2 Notch1 蛋白在实验组和对照组中的表达定位

Notch1 蛋白在实验组和对照组胎盘组织中均有表达,主要集中在细胞膜表达,且实验组 Notch1 蛋白的表达水平明显低于对照组(图 1)。



A. 对照组

B. 实验组

黑色箭头表示 Notch1 蛋白阳性表达部位

图 1 Notch1 蛋白的表达分布(PV-9000 二步法,200 $\times$)

Fig.1 Distribution of Notch1 protein expression(PV-9000 two-step method,200 $\times$)

2.3 Notch1 蛋白在实验组和对照组中的相对表达量

Western blot 检测结果显示,Notch1 蛋白在对照组和实

验组中均有表达,2 组均于 120 kD 处检测到 Notch1 目的条带,且实验组 Notch1 蛋白水平明显低于对照组($t=3.432, P<0.05$,表 2、图 2)。

表 2 Notch1 在对照组和实验组中的蛋白相对表达量
Tab.2 Relative protein expression of Notch1 in experiment group and control group

组别	例数(n)	Notch1/ β -actin
对照组	15	0.867 ± 0.323
实验组	15	0.524 ± 0.215
t 值		3.432
P 值		<0.05

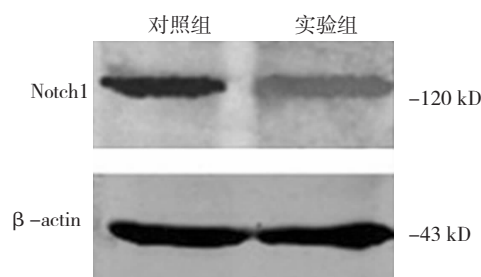


图 2 Western blot 检测对照组和实验组中 Notch1 蛋白的表达
Fig.2 Expression of Notch1 in experiment group and control group detected by Western blot

3 讨论

先兆子痫是一种威胁到母婴生命安全的严重妊娠并发症,影响到 7% 的首次妊娠^[3-4]。孕妇表现出广泛血管内皮细胞功能的改变,如高血压,蛋白尿和水肿^[5],此外,还可导致胎儿生长受限。目前,虽已预测出较多先兆子痫的候选因子,但确切病因未知,该病仍是不可预测和防治的。

Notch 信号传导通路广泛存在于脊椎动物和非脊椎动物中,在进化上具有高度保守性。该信号传导通路不仅参与胚胎发育及器官的形成,还参与细胞的分化、增殖、凋亡、黏附以及表皮细胞向间充质细胞的转化等过程^[6-7]。Notch 信号转导通路由 Notch 受体、Notch 配体和 GSL-DNA 结合蛋白 3 部分组成。Notch 受体通过与表达配体的相邻细胞间的相互作用转导信号,精确地调控各谱系细胞的增殖分化。Notch 信号还可作为一种通用的发育工具,决定细胞命运和某个器官的构建^[8-14]。Notch1 作为 Notch 信号通路中的重要受体蛋白,在哺乳动物组织器官中广泛表达,包括中枢神经系统、中胚层、胰腺、造血细胞、毛发、肾脏等。

人类胎盘的血管发生、血流调节以及滋养层功能与 Notch 信号通路密切相关^[15],参与上述生理过

程的 Notch 信号通路的配体/受体是关注的焦点。目前,已有大量证据表明 Notch 信号通路在血管发生各个阶段中的重要性^[10],Notch 受体配体系统的缺陷对胎盘的形成功能产生不利影响^[16]。然而,Notch 信号通路在先兆子痫发病机制中的具体作用尚不清楚,Notch 与其他信号通路之间是否存在相互作用及其作用机制也尚不明确。

本研究从探讨 Notch1 mRNA、蛋白质表达水平出发,发现 Notch1 在人类正常胎盘组织和先兆子痫胎盘组织中存在差异性表达。real-time PCR 结果显示 Notch1 mRNA 在对照组中的表达丰度明显高于实验组。免疫组织化学结果表明 Notch1 蛋白主要集中在细胞膜上表达。其中,对照组的表达水平明显高于实验组。Western blot 同样印证了上述结果。这与 Sahin 等^[17]的结果一致,他们提出:先兆子痫胎盘血管内皮细胞中 Notch1 表达减少反映了胎儿-胎盘血管系统的功能紊乱,究其原因可能与 Notch 蛋白在胎盘血管发生和血管形成中的作用失调有关。正常胎盘的形成功能要求滋养层功能、血管发生以及血管形成三要素之间的高度协调配合^[18]。一方面,需要细胞滋养细胞(cytotrophoblasts,CTBs)完成增殖和分化^[19];另一方面,通过 CTBs 主动侵袭以及母体血管口径的不断膨胀,维持和补充了胎盘母体面的血流量^[20]。正常情况下 CTBs 间质入侵的范围虽广,但较为表浅,故血管内的侵袭起着决定性作用^[21-23]。然而,先兆子痫患者子宫壁活组织检查显示:CTBs 不能上调促进侵袭和(或)表达内皮细胞样表型的受体^[24],从而可能导致侵袭过程中血管阻力的增加以及胎盘灌注量的减少。Zhao 等^[25]学者研究发现:Notch 信号通路参与了 CTBs 侵袭和母体脉管系统重塑等重要环节,Villa 等^[26]进一步发现 Notch 信号在重塑脉管的过程中,调节原始内皮细胞的分化,并使其进入血管网中分化为动脉类细胞。Jagged 1,作为 Notch1 的重要配体之一,与血管重塑密切相关。同样,先兆子痫患者体细胞以及 CTBs 中通常不表达 Jagged 1,提示 Notch 信号在人类螺旋动脉重塑中起着重要的功能性作用。Notch 信号通路的缺陷可能造成血管重塑失败,从而导致了先兆子痫的发生^[27]。研究还发现,Notch 信号通路控制细胞分化,在组织细胞间接触时的血管形成中起重要作用^[28-30]。Notch 信号可上调脉管系统中某些特异性因子的表达^[24,31]。Notch 基因敲除小鼠表现为多种脉管缺损且血管口径减小,动脉脉管系统无法成功汇入循环中,导致小鼠在胚胎发育阶段死亡^[32]。由此可见,Notch

在 CTBs 的侵袭过程中,维持各种脉管系统的完整性,扮演着重要的角色^[24,33]。因此,本文推测 Notch1, 作为 Notch 信号通路重要受体之一,在先兆子痫胎盘组织中的低表达,可能与 Notch 信号通路的抑制有关,其表达下调影响了滋养层细胞的侵袭过程以及胎盘脉管系统的重塑,减少了胎盘灌注及母体面血流量,并最终导致了先兆子痫的发生。

综上所述,本文认为 Notch 信号通路中 Notch1 在先兆子痫胎盘组织中的下调表达可能是导致先兆子痫发生的重要因素之一。同时,先兆子痫的病因异常复杂,胎盘形成的过程除与 Notch 信号通路密切相关外,还受到其它信号通路的影响,可能存在多种信号的参与,阐明这些信号通路之间的相互关系有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sibai B, Dekker G, Kupfermine M. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2005, 365(9461): 785-799.
- [2] 乐 杰. 妇产科学[M]. 6 版, 北京: 人民卫生出版社, 2004.
- [3] Levine R J, Hauth J C, Curet L B, et al. Trial of calcium to prevent preeclampsia[J]. N Engl J Med, 1997, 337(2): 69-76.
- [4] Redman C W, Sargent I L. Latest advances in understanding preeclampsia[J]. Science, 2005, 308(5728): 1592-1594.
- [5] Brosens I, Renaer M. On the pathogenesis of placental infarcts in pre-eclampsia[J]. J Obstet Gynaecol Br Commonw, 1972, 79(9): 794-799.
- [6] 梁 洁. Notch 信号通路与血管发育[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(12): 1225-1226.
- [7] Liang J. Notch signaling pathway and vascular development[J]. Cellular and Molecular Immunology, 2008, 24(12): 1225-1226.
- [8] Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa J L. Notch signaling in development and cancer[J]. Endocr Rev, 2007, 28(3): 339-363.
- [9] Wang Z, Li Y, Kong D, et al. The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(6): 745-751.
- [10] Bettenhausen B, Hrabe de Angelis M, Simon D, et al. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to Drosophila Delta[J]. Development, 1995, 121(8): 2407-2418.
- [11] Henrique D, Adam J, Myant A, et al. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in the chick[J]. Nature, 1995, 375(6534): 787-790.
- [12] Lindsell C E, Shawber C J, Boulter J, et al. Jagged2: a mammalian ligand that activates Notch1[J]. Cell, 1995, 80(6): 909-917.
- [13] Nye J S, Kopan R. Developmental signaling: vertebrate ligands for Notch[J]. Curr Biol, 1995, 5(9): 966-969.
- [14] Myat A, Henrique D, Ish-Horowitz D, et al. A chick homologue of Serrate and its relationship with Notch and Delta homologues during central neurogenesis[J]. Dev Biol, 1996, 174(2): 233-247.
- [15] Shawber C, Boulter J, Lindsell C E, et al. Jagged2: a serrate like gene expressed during rat embryogenesis[J]. Dev Biol, 1996, 180(1): 370-376.
- [16] Carbillon L. First trimester uterine artery Doppler for the prediction of preeclampsia and foetal growth restriction[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2012, 25(7): 877-823.
- [17] Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, et al. Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis[J]. Circ Res, 2007, 100(3): 363-371.
- [18] Sahin Z, Acar N, Ozbey O, et al. Distribution of Notch family proteins in intrauterine growth restriction and hypertension complicated human term placentas[J]. Acta Histochemica, 2011, 113(3): 270-276.
- [19] Lunghi L, Ferretti M E, Medici S, et al. Control of human trophoblast function[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2007, 5: 6.
- [20] Naicker T, Khedun S, Moodley J, et al. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003, 82(8): 722-729.
- [21] Zhou Y, Bianco K, Huang L, et al. Comparative analysis of maternal-fetal interface in preeclampsia and preterm labor[J]. Cell Tissue Res, 2007, 329(3): 559-569.
- [22] Chakraborty C, Gleeson L M, McKinnon T, et al. Regulation of human trophoblast migration and invasiveness[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2002, 80(2): 116-124.
- [23] Matijevic R, Johnston T. In vivo assessment of failed trophoblastic invasion of the spiral arteries in pre-eclampsia[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1999, 106(1): 78-82.
- [24] Naicker T, Khedun S, Moodley J, et al. Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003, 82(8): 722-729.
- [25] Swift M R, Weinstein B M. Arterial-venous specification during development[J]. Circ Res, 2009, 104(5): 576-588.
- [26] Zhao W X, Lin J H. Notch signaling pathway and human placenta[J]. Int J Med Sci, 2012, 9(6): 447-452.
- [27] Villa N, Walker L, Lindsell C E, et al. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels[J]. Mech Dev, 2001, 108(1-2): 161-164.
- [28] Hunkapiller N M, Gasperowicz M, Kapidzic M, et al. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia[J]. Development, 2011, 138(14): 2987-2998.
- [29] Bianchi S, Dotti M T, Federico A, et al. Physiology and pathology of notch signalling system[J]. J Cell Physiol, 2006, 207(2): 300-308.
- [30] Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer[J]. Curr Mol Med, 2006, 6(8): 905-918.
- [31] Roca C, Adams R H. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling[J]. Genes Dev, 2007, 21(20): 2511-2524.
- [32] Lawson N D, Scheer N, Pham V N, et al. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development[J]. Development, 2001, 128(19): 3675-3683.
- [33] Swift M R, Weinstein B M. Arterial-venous specification during development[J]. Circ Res, 2009, 104(5): 576-588.
- [34] Zhong T P, Childs S, Leu J P, et al. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery[J]. Nature, 2001, 414(6860): 216-220.

(责任编辑:唐秋姝)