

GPR30在胎盘组织中的差异表达及其与子痫前期的关系

周丽媛, 张 华

(重庆医科大学附属第一医院妇产科、重庆医科大学中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨胎盘组织中新型雌激素受体 G-蛋白偶联受体 30(g-protein coupled receptor 30, GPR30)的表达及其与子痫前期(preeclampsia, PE)发病的关系。**方法:**收集重庆医科大学附属第一医院 2012 年 1 月至 2014 年 5 月分娩的 20 例 PE 和 19 例正常产妇的胎盘组织,应用免疫组化方法检测 GPR30 在胎盘组织中的表达。然后以人脐静脉血管内皮细胞建立 PE 细胞模型,以免疫荧光技术和蛋白印迹技术(Western blot)检测 GPR30 蛋白的表达情况。以流式细胞仪检测凋亡、以体外小管形成实验检测管腔成形能力、以迁移实验检测迁移能力等。**结果:**GPR30 在 PE 组胎盘组织中表达明显低于对照组($P=0.000$);而在细胞模型中,经缺氧/复氧处理后, GPR30 蛋白的表达降低($P=0.000$); GPR30 抑制剂-G15 处理使其凋亡增加($P=0.000$);而 GPR30 激动剂-G1 能促进其管腔成形($P=0.000$)和迁移($P=0.0015$),同时, G15 能抑制 17 β -雌二醇对其管腔成形($P=0.039$)和迁移($P=0.014$)的保护作用。**结论:**GPR30 表达下降可能与 PE 胎盘血管内皮细胞的功能异常相关。

【关键词】子痫前期; G-蛋白偶联受体 30; 血管内皮

【中图分类号】R714.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-06-29

Different expressions of GPR30 in placental tissues and their relationship with preeclampsia

Zhou Liyuan, Zhang Hua

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Canada-China-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate the different expressions of GPR30 in placenta tissues, and their relationship with the pathogenesis of preeclampsia. **Methods:** Twenty cases of preeclampsia and 19 cases of normal maternal placental tissues were collected in the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University from January 2012 to May 2014. Immunohistochemistry was used to detect the expression of GPR30 in the placental tissues. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were used as a cell model of preeclampsia. Immunofluorescence and Western blot were used to detect the expression of GPR30 protein in HUVECs. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of HUVECs. *In vitro* tube formation assay was used to detect capability of the tube formation of HUVECs and migration assay was used to detect the migration ability of HUVECs. **Results:** The expression of GPR30 in placental vascular endothelial cells was lower in the preeclamptic placentas than in normo-tensive controls. The expression of GPR30 protein was reduced in HUVEC after hypoxia/reoxygenation (H/R) treatment. The apoptosis of HUVECs was increased with the treatment of inhibitor of GPR30-G15. The GPR30 agonist-G1 and 17 β -estradiol (E2) exerted protective effects on H/R-exposed HUVECs by protecting the capabilities of the tube formation and migration; this effect was abolished by G15. **Conclusion:** Declined expression of GPR30 may play an important role in placental endothelial dysfunction in preeclampsia.

【Key words】 preeclampsia; g-protein coupled receptor 30; vascular endothelium

子痫前期(preeclampsia, PE)是一种严重的妊娠

作者介绍:周丽媛, Email: zly1006@foxmail.com,

研究方向: 围产医学。

通信作者: 张 华, Email: zh2844@gmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81100444); 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2011BB5121); 重庆市卫生局科研基金资助项目(2011-2-046)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150309.0011.001.html>
(2015-03-09)

期并发症, 虽然相关研究较多, 但其病因和发病机制尚未完全阐明。已有研究证明 PE 的临床症状和母体血清雌激素水平相关^[1], 且在正常未孕妇女中, 雌激素可通过其受体调节血管的舒缩功能^[2]; 目前认为, 雌激素在 PE 中主要通过其经典的雌激素受体(classical estrogen receptors, ERs), 即 ER α 和 ER β 起作用^[3-4]。然而新型雌激素 G-蛋白偶联受体 30(g-protein coupled receptor 30, GPR30)在 PE 病理生

理变化中的作用知之甚少。GPR30 于 2005 被清楚地确定为一种新型雌激素受体开始^[5],对其研究主要集中在心血管疾病和肿瘤^[6-8]。虽然有文献证实 GPR30 表达于血管内皮细胞^[9],且与内皮细胞介导的一些快速血管反应,如:收缩、舒张及自我调节功能有关^[2],但有关 GPR30 对 PE 患者内皮细胞功能影响的文献非常有限。该研究将在 PE 胎盘组织和细胞模型上着力研究 GPR30 的差异表达及对胎盘血管内皮细胞功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 胎盘组织 实验组选取 2012 年 1 月至 2014 年 5 月在重庆医科大学附属第一医院产科收治的 PE 患者胎盘 20 例,诊断标准参照文献^[10];正常组选取孕晚期血压正常孕妇胎盘 19 例;所有研究对象均为单胎,以剖宫产终止妊娠,麻醉方式相同;既往无高血压、心脏病、肾脏疾病、糖尿病、甲状腺功能亢进及导致血管病变及缺氧性改变的其他合并症;且孕期无急、慢性感染性疾病。该研究获得重庆人体实验伦理委员会批准,所有受试者均知情并同意。

1.1.2 细胞培养和缺氧复氧 人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)培养在加有 10% 胎牛血清(FBS; Gibco)的 1640(Gibco)培养基中,在 37℃, 21%O₂, 5%CO₂ 条件下培养。当细胞量达到 80%时开始各种实验。缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)处理的进行如前所述^[11]。简而言之, HUVEC 在三气培养箱(Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK)中,低氧环境(5%CO₂ 和 95%N₂)下培养 4 h,然后转移到标准培养箱中,常氧环境(21%O₂, 5%CO₂, 10% FBS)下培养 18 h。通过氧分析仪(Vascular Technology, N.H., USA)检测到低氧培养后的氧浓度为(0%~1%)。

1.1.3 主要试剂 17-β-雌二醇(17β-estradiol, E2)(Abcom, ab120657); GPR30 特异性的激动剂 G1(the selective GPR30 agonist G1, G1)(Sigma, G6798); GPR30 特异性的抑制剂 G15(the selective GPR30 Inhibitor G15, G15)(Sigma, G6748); 多克隆兔抗 GPR30 抗体(免疫组化用; Abcom, ab39742); 单克隆兔抗 GPR30 抗体(Western blot 和免疫荧光用; Abcom, ab154069)。

1.1.4 细胞实验分组 细胞实验的分组如表 1 所示:按处理措施不同分为 7 个组, E2、G1、G15 的加入是在 H/R 处理前进行的。E2、G1、G15 溶于二甲亚砜配成储存液,用完全培养液稀释至最终浓度 E2 为 100 nmol/L, G1 为 1 μmol/L, G15 为 2 μmol/L。

表 1 细胞的处理和分组

Tab.1 Cell treatments and cell groups

分组	常氧处理(22 h)	H/R	E2	G1	G15
Control	+	-	-	-	-
H/R	-	+	-	-	-
H/R+E2	-	+	+	-	-
H/R+G1	-	+	-	+	-
H/R+G15	-	+	-	-	+
H/R+E2+G15	-	+	+	-	+
H/R+G1+G15	-	+	-	+	+

注:“+”表示进行该项处理,“-”表示不进行该处理

1.2 方法

1.2.1 免疫组化 具体操作步骤按照辣根酶标记链酶卵白素免疫组化试剂盒说明书进行。一抗为多克隆兔抗人 GPR30 抗体(Abcom, ab39742, 1:150 稀释)。采用 Image J 图像处理软件分别随机计数 2 组 5 个视野下阳性细胞数,认为对照组阳性细胞百分比为 100%,并计算 PE 组阳性细胞与对照组的比值。

1.2.2 Western blot 具体操作同本课题组之前的操作^[11],一抗 GPR30(Abcom, ab154069)浓度为 1:1 000, β-actin 浓度为 1:500。ChemiDoc XRS 化学发光成像系统检测蛋白印记条带, Quantity One 图像分析软件进行分析。

1.2.3 迁移实验 用 24 孔板作为外室, Transwell 小室(8-μm pores, Transwell Chamberling Technology)作为内室。内室涂覆 60 μl, 10 μg/ml 的基质胶(BD Biosciences, San Jose, California)在 37℃孵箱内放置 2 h,每个小室内室内分别加入含 1% FBS 培养基悬浮的 HUVEC 1.0 × 10⁵ 个,然后按各种预处理分组。将含 10% FBS 的培养基加入到外室。H/R 处理 6 h 或正常培养 6 h^[11]。然后将迁移至内室下表面的细胞固定、染色、光学显微镜(IX51; Olympus, Japan)下计数迁移细胞数,实验重复 3 次,认为对照组迁移率为 100%,并计算其他处理组与对照组的比值。

1.2.4 体外小管形成实验 将基质胶(BD Biosciences, San Jose, California)在 4℃过夜解冻,然后用无血清培养基稀释至 50%,将其分布于 96 孔板(65 μl/孔),在 37℃孵箱内放置 1 h。每个孔分别接种 HUVEC 1.0 × 10⁴ 个,并按各种预处理分组,每组设 3 个复孔,然后进行 H/R 处理 22 h 或正常培养 22 h。通过相机(Olympus, Japan)和 Image-Pro Plus 6.0 软件来测量总管道长度。每孔取 5 个视野测量,计算平均值。小管形成指数表示为每平方毫米面积的管道长度。

1.2.5 免疫荧光 HUVEC 经过各种处理后进行免疫荧光,一抗是单克隆兔抗人 GPR30 抗体(1:80; Abcom, ab154069),二抗是 FITC 标记的山羊抗兔抗体(1:50; Santa Cruz Biotechnology)。碘化丙啶(PI, 3 mg/ml)用于细胞核染色。用激光共聚焦显微镜收集图像(FV10i; Olympus, Japan)。

1.2.6 细胞凋亡检测 采用流式细胞仪检测 HUVEC 的凋

亡,实验步骤按 Annexin-V-FITC 和 PI 试剂盒(凯基,生物技术)说明书进行。以流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)检测凋亡率。实验重复 5 次。

1.3 统计分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件(GraphPad Software, San Diego, California)进行统计学分析。所有数据表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$),两组均数间比较采用独立样本 t 检验分析,多组均数间比较采用单因素方差分析,并应用 Tukey 检验作两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 GPR30 在 PE 组胎盘中表达下降

GPR30 表达于孕晚期胎盘血管内皮细胞和滋养层细胞中,GPR30 在 PE 组(图 1B)胎盘血管内皮细胞和滋养层细胞中的表达均明显低于对照组(图 1A)(表 2, $P=0.000$)。以 CD31 标记胎盘血管内皮细胞(图 1C)。

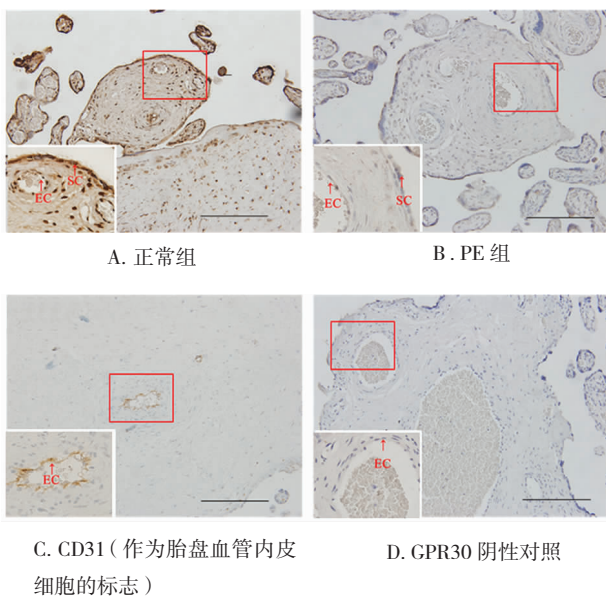


图 1 免疫组化,GPR30 在胎盘组织中的表达 (200 $\times$)

Fig.1 Immunohistochemistry for GPR30 in placenta tissues (200 $\times$)

表 2 GPR30 在胎盘组织中表达的半定量分析(免疫组化)

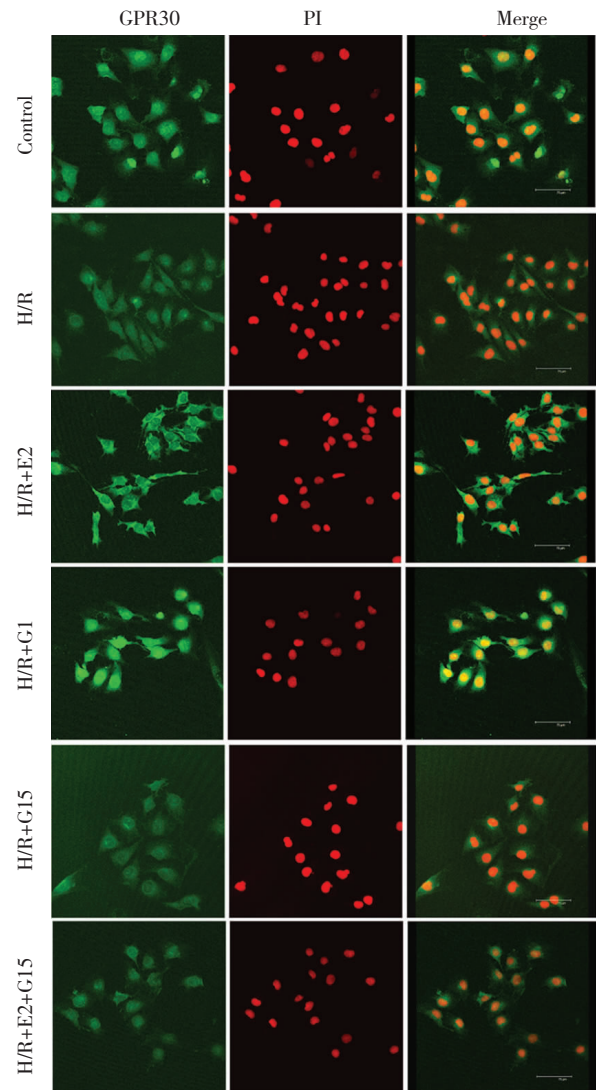
Tab.2 Semi quantitative analysis of GPR30 expression in the placenta (immunohistochemistry)

组别	例数	GPR30 (%)	t 值	P 值
正常组	19	100.000 $\pm$ 7.197	21.794	0.000
PE 组	20	8.034 $\pm$ 6.102		

注:认为对照组阳性细胞百分比为 100%,并计算 PE 组阳性细胞与对照组的比值

2.2 GPR30 在 HUVEC 不同处理组的表达

GPR30 蛋白可能同时表达于 HUVEC 细胞核和细胞质内(图 2 Control)。H/R 组(图 2H/R)比 Control 组细胞(图 2 Control)的荧光强度明显降低。此外,GPR30 激动剂 G1(图 2 H/R+G1)或 E2(图 2 H/R+E2)预处理组,荧光强度比 H/R 组明显增强,且这种作用被 GPR30 特异性的抑制剂 G15 抑制。

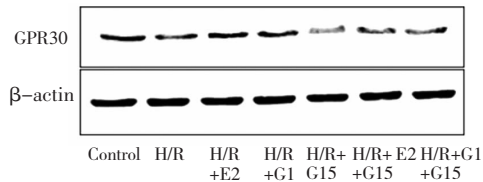


GPR30(ab154069,绿色)和细胞核(PI,红色),采用共聚焦显微镜收集图像;标尺为 75 μ m

图 2 GPR30 在 HUVEC 内的免疫荧光(400 $\times$)

Fig.2 Immunofluorescence staining of GPR30 in HUVEC(400 $\times$)

如图 3 所示,H/R 组的 GPR30 蛋白水平较对照组降低,而在被 GPR30 激动剂 G1 和 E2 预处理后,GPR30 的蛋白水平比 H/R 组高,且这种作用可被 GPR30 特异性的抑制剂 G15 抑制(H/R 组与 Control 组比较, $P=0.000$;H/R+E2 组与 H/R 组比较, $P=0.002$;H/R+G1 组与 H/R 组比较, $P=0.000$;H/R+E2+G15 组与 H/R+E2 组比较, $P=0.000$;H/R+G1+G15 组与 H/R+G1 组比较, $P=0.000$)。见图 3、表 3。



对照组细胞正常培养 22 h, 在 H/R 组: 缺氧 4 h 后, 再复氧 18 h; β -actin 被用作内参

图 3 Western blot 检测 HUVEC 的 GPR30 蛋白表达

Fig.3 Western blot for GPR30 protein expression in HUVEC

表 3 HUVEC 中 GPR30 蛋白水平的比较分析

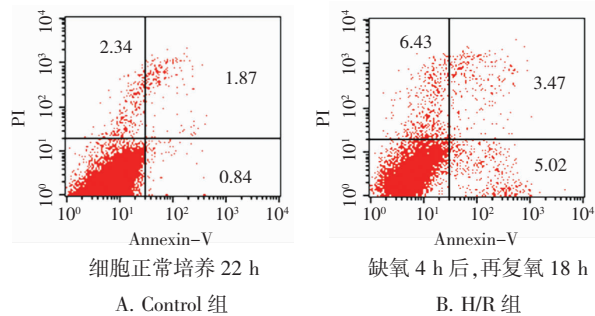
Tab.3 Comparative analysis of GPR30 protein level in HUVEC

组别	例数	GPR30 (%)	<i>q</i> 值	<i>P</i> 值
Control 组	3	0.331 ± 0.031	—	—
H/R 组	3	0.128 ± 0.010 ^a	10.090	0.000
H/R+E2 组	3	0.273 ± 0.043 ^b	7.232	0.002
H/R+G1 组	3	0.302 ± 0.060 ^b	8.633	0.000
H/R+G15 组	3	0.063 ± 0.005 ^b	3.244	0.311
H/R+E2+G15 组	3	0.101 ± 0.036 ^c	8.620	0.000
H/R+G1+G15 组	3	0.119 ± 0.024 ^d	9.084	0.000
<i>F</i> 值		29.830		
<i>P</i> 值		0.000		

注: a, 与 Control 组比较; b, 与 H/R 组比较; c, 与 H/R+E2 组比较; d, 与 H/R+G1 组比较; —, 无此项目

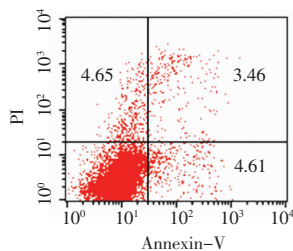
2.3 H/R 或 G15 预处理均使 HUVEC 凋亡增加

H/R 组 HUVEC 凋亡率为 $5.02 \pm 3.47 = 8.49$ (图 4B), 高于对照组 $0.84 \pm 1.87 = 2.71$ (图 4A) (表 4, H/R 组与对照组比较, $P=0.000$), GPR30 特异性的抑制剂 G15 处理组凋亡率为 $4.61 \pm 3.46 = 8.07$ (图 4C), 明显高于对照组 (表 4, G15 组与对照组比较, $P=0.000$)。



A. Control 组

B. H/R 组



C. G15 组

图 4 H/R 和 G15 对 HUVEC 凋亡的作用

Fig.4 Effects of H/R and G15 on apoptosis of HUVEC

表 4 HUVEC 凋亡的对比分析

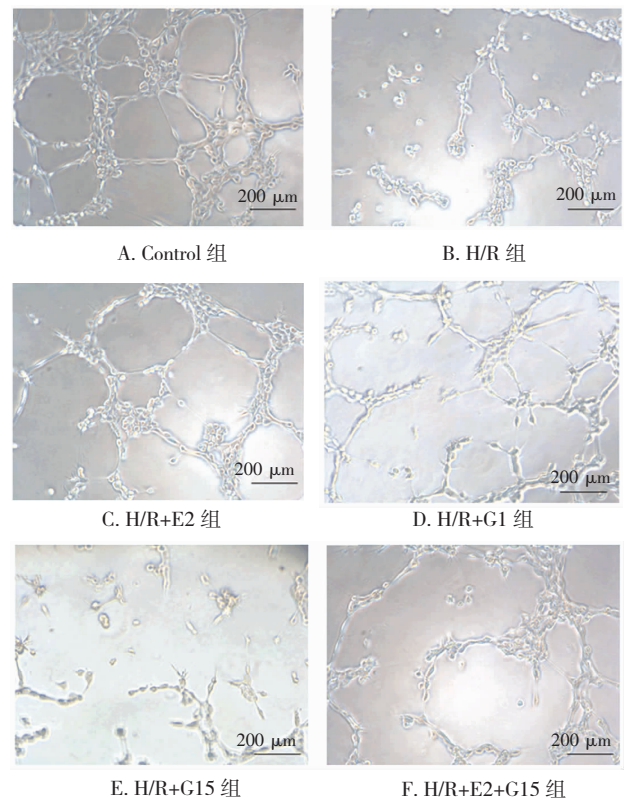
Tab.4 Comparative analysis of HUVEC apoptosis

组别	例数	凋亡率 (%)	<i>q</i> 值	<i>P</i> 值
Control 组	5	3.238 ± 0.764	—	—
H/R 组	5	7.924 ± 0.690	13.320	0.000
G15 组	5	7.668 ± 0.892	12.590	0.000
<i>F</i> 值		56.110		
<i>P</i> 值		0.000		

注: 与 Control 组比较; —, 无此项目

2.4 不同处理组 HUVEC 的体外管腔成形能力和迁移能力的变化

H/R 组 HUVEC 体外小管形成 (图 5B) 和迁移 (图 6B) 率均比对照组 (图 5A, 6A) 低。而 GPR30 激动剂 G1 (图 5C, 6C) 和 E2 (图 5D, 6D) 预处理后, HUVEC 的体外管样结构形成和迁移能力比 H/R 组高, 且这种作用被 GPR30 特异性的抑制剂 G15 抑制 (图 5E, F, 图 6E, F)。具体数据见表 5, H/R 组与对照组比较, $P=0.000$; H/R+E2 组与 H/R 组比较, $P=0.007$; H/R+G1 组与 H/R 组比较, $P=0.000$; H/R+E2+G15 组与 H/R+E2 组比较, $P=0.039$ 。表 6, H/R 组与对照组比较, $P=0.000$; H/R+E2 组与 H/R 组比较, $P=0.002$; H/R+G1 组与 H/R 组比较, $P=0.002$; H/R+E2+G15 组与 H/R+E2 组比较, $P=0.014$ 。



所有细胞均培养 22 h, 分组如表 1 所示

图 5 HUVEC 体外管腔成形能力的变化 (100 ×)

Fig.5 Changes in capability of in vitro tube formation of HUVEC (100 ×)

表 5 HUVEC 体外管腔形成的对比分析

Tab.5 Comparative analysis of HUVEC in vitro tube formation

组别	例数	小管形成指数 (mm/mm ²)	q 值	P 值
Control 组	5	9.927 ± 0.925	—	—
H/R 组	5	4.514 ± 0.781 ^a	13.110	0.000
H/R+E2 组	5	6.814 ± 1.423 ^b	5.569	0.007
H/R+G1 组	5	7.866 ± 0.603 ^b	8.116	0.000
H/R+G15 组	5	3.684 ± 0.758 ^b	2.010	0.715
H/R+E2+G15	5	4.940 ± 0.830 ^c	4.538	0.039
F 值		32.540		
P 值		0.000		

注:a,与 Control 组比较;b,与 H/R 组比较;c,与 H/R+E2 组比较;—,无此项目;小管形成指数表示为每平方毫米面积的管道长度

表 6 HUVEC 迁移率的对比分析

Tab.6 Comparative analysis of HUVEC mobility

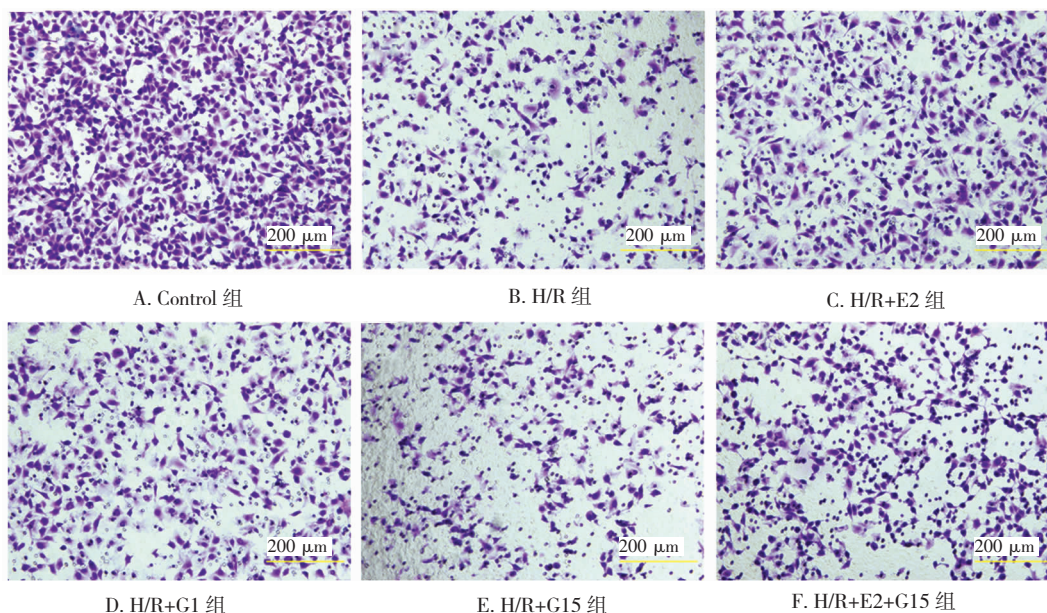
组别	例数	迁移率 (%)	q 值	P 值
Control 组	3	100.000 ± 9.271	—	—
H/R 组	3	34.070 ± 3.635 ^a	18.770	0.000
H/R+E2 组	3	61.333 ± 5.607 ^b	7.762	0.002
H/R+G1 组	3	61.333 ± 5.292 ^b	7.762	0.002
H/R+G15 组	3	20.050 ± 1.790 ^b	3.990	0.121
H/R+E2+G15 组	3	40.967 ± 7.766 ^c	5.798	0.014
F 值		63.800		
P 值		0.000		

注:a,与 Control 组比较;b,与 H/R 组比较;c,与 H/R+E2 组比较;—,无此项目;认为对照组的迁移率为 100%,处理组的迁移率均为与对照组比较的百分率

3 讨论

PE 是妊娠特发性疾病,随着妊娠结束,症状大多会消失。PE 病因迄今尚不明确,但全身小动脉痉挛,特别是胎盘血管病变,是许多临床症状和并发症发生的重要原因。且有研究证实,胎盘血管病变可引起和加剧全身小动脉损伤,由此进一步加重 PE 症状^[12]。同时,由于小动脉痉挛使胎盘发生缺血再灌注,导致血管内皮细胞遭受氧化应激损伤^[13],进而导致血管内皮功能失调,血管生成的不利因素增加,如:血管内皮生长因子和胎盘生长因子的下降及其可溶性受体的增加,从而会导致 PE 的发病或进一步加重 PE 症状^[14]。因此,本研究以 H/R 处理 HUVEC 建立 PE 的血管内皮细胞模型,来初步探讨 PE 的发病机制。

GPR30 自 90 年代后期被克隆后,直到 2005 年被确定为雌激素的膜受体^[5],一直是研究的热点。其中最受关注的是 GPR30 与肿瘤发生的关系,其与具有雌激素敏感性而 ERs 阴性的乳腺癌的发病关系密切^[8]。而在心血管系统中,则主要集中于研究其与慢性高血压疾病之间的关系,在动物实验中发现 GPR30 表达的下降能引起血管收缩,从而导致高血



所有细胞均培养 6 h, H/R: 在低氧条件下培养 4 h, 然后再复氧 2 h

图 6 HUVEC 迁移能力的变化(200 ×)

Fig.6 Changes in capability of migration of HUVEC (200 ×)

压的发生^[6-7]。然而,GPR30 与 PE 的关系几乎未见报道。本研究发现,GPR30 在孕晚期胎盘血管内皮细胞和滋养层细胞中均有表达,其表达量在 PE 组胎盘血管内皮细胞和滋养层细胞中均明显降低,故推测 GPR30 与 PE 可能存在关系。

GPR30 作为一种新型的雌激素膜受体,其在细胞的亚定位也一直存在争议,大量研究表明,GPR30 表达在许多其他细胞的内质网上^[5,15],并参与介导雌激素的一些快速作用。本研究在激光共聚焦显微镜下发现 GPR30 可能同时表达在 HUVEC 的细胞核和细胞质内,与之前的研究结果一致^[16]。

有学者发现,GPR30 可能与血管平滑肌细胞的增殖、凋亡^[2]以及血管的舒张反应有关^[6]。本研究发现,GPR30 的特异性抑制剂 G15 能导致 HUVEC 的凋亡增加。H/R 在使 HUVEC 内 GPR30 表达下降的同时其凋亡亦相应增加,且体外小管形成和迁移率也随之明显降低。而被 GPR30 激动剂 G1 和 E2 处理后,HUVEC 的体外管样结构形成和迁移能力明显恢复;且这种作用可被 GPR30 选择性抑制剂-G15 抑制。

综上所述,GPR30 表达于孕晚期胎盘组织的血管内皮细胞和滋养细胞中,并在 PE 组胎盘血管内皮细胞和滋养细胞中的表达均明显低于对照组。GPR30 表达下降可能与 PE 胎盘血管内皮细胞的功能异常相关。GPR30 可能作为治疗子痫前期以及由于胎盘内皮功能障碍引起的各种妊娠并发症的潜在治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Jobe SO, Tyler CT, Magness RR. Aberrant synthesis, metabolism, and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia implications for vascular dysfunction[J]. Hypertension, 2013, 61(2): 480-487.
- [2] Feldman RD, Gros R. Rapid vascular effects of steroids - a question of balance?[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2010(26): 22A-26A.
- [3] Molvarec A, Ver A, Fekete A, et al. Association between estrogen receptor α (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia[J]. Hypertension Research, 2007, 30(3): 205-211.
- [4] Maruyama A, Nakayama T, Sato N, et al. Association study using single nucleotide polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene for preeclampsia[J]. Hypertension Research, 2004, 27(12): 903-909.
- [5] Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling[J]. Science, 2005, 307(5715): 1625-1630.
- [6] Lindsey SH, da Silva AS, Silva MS, et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation[J]. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 2013, 305(1): E113-E118.
- [7] Murata T, Dietrich HH, Xiang C, et al. G protein-coupled estrogen receptor agonist improves cerebral microvascular function after hypoxia/reoxygenation injury in male and female rats[J]. Stroke, 2013, 44(3): 779-785.
- [8] Lappano R, Pisano A, Maggiolini M. GPER function in breast cancer: an overview[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2014(5): 66.
- [9] Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, et al. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30[J]. Annu Rev Physiol, 2008(70): 165-190.
- [10] ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists[J]. International Journal of Gynaecology and Obstetrics, 2002, 77(1): 67.
- [11] Luo X, Yao Z, Qi H, et al. Gadd45 α as an upstream signaling molecule of p38 MAPK triggers oxidative stress-induced sFlt-1 and sEng upregulation in preeclampsia[J]. Cell Tissue Res, 2011, 344(3): 551-565.
- [12] Roland L, Gagné A, Bélanger MC, et al. Existence of compensatory defense mechanisms against oxidative stress and hypertension in preeclampsia[J]. Hypertension in Pregnancy, 2010, 29(1): 21-37.
- [13] Dhar-Masareño M, Cárcamo JM, Golde DW. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2005, 38(10): 1311-1322.
- [14] Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, et al. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease[J]. Disease Models & Mechanisms, 2012, 5(1): 9-18.
- [15] Otto C, Rohde-Schulz B, Schwarz G, et al. G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol[J]. Endocrinology, 2008, 149(10): 4846-4856.
- [16] Chakrabarti S, Davidge ST. G-protein coupled receptor 30 (GPR30): a novel regulator of endothelial inflammation[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52357.

(责任编辑:冉明会)