

sFlt-1 基因 rs4769613 位点多态性与云南地区不同海拔子痫前期的相关性研究

艾 芳¹,董旭东¹,周凤仙²,赵飞飞¹,陆秦楠¹,杨祥群¹

(1. 云南省第一人民医院、昆明理工大学附属医院产科,昆明 650032;2. 迪庆藏族自治州人民医院产科,香格里拉 674000)

【摘要】目的:探讨可溶性 Fms 样酪氨酸激酶 1(soluble Fms-like tyrosine kinase 1,*sFlt-1*)基因 rs4769613 位点多态性与云南地区不同海拔子痫前期(preeclampsia,PE)的相关性。**方法:**选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在云南省第一人民医院产科分娩的 124 例汉族孕妇(低海拔组),其中 PE 孕妇 61 例,正常足月孕妇 63 例,同期在迪庆藏族自治州人民医院产科分娩的 122 例汉族孕妇(高海拔组),其中 PE 孕妇 61 例,正常足月孕妇 61 例,提取外周血 DNA,采用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术检测 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点基因型分布和等位基因频率。**结果:**①长期生活及居住在云南高原环境低海拔地区和高海拔地区的孕妇存在 *sFlt-1* 基因 rs4769613 位点多态性。②高海拔地区 PE 组 TT、CC、TC 基因型分别占 18.03%(11/61)、29.51%(18/61)、52.46%(32/61);高海拔地区对照组 TT、CC、TC 基因型分别占 34.43%(21/61)、21.31%(13/61)、44.26%(27/61);低海拔地区 PE 组 TT、CC、TC 基因型分别占 13.11%(8/61)、27.87%(17/61)、59.02%(36/61);低海拔地区对照组 TT、CC、TC 基因型分别占 30.16%(19/63)、25.40%(16/63)、44.44%(28/63)。③高海拔地区,PE 组 TT 基因型分布明显低于对照组(18.03% vs. 34.43%, $P=0.039$, $OR=0.419$,95%CI=0.181~0.970);但高海拔地区 PE 组 CC、CT 基因型相较于对照组无明显差异。在低海拔地区,PE 组 TT 基因型分布明显低于对照组(13.11% vs. 30.16%, $P=0.021$, $OR=0.349$,95%CI=0.139~0.875),但低海拔地区 PE 组 CC、CT 基因型相较于对照组无明显差异。高海拔地区 PE 组与低海拔地区 PE 组之间、高海拔地区对照组与低海拔地区对照组之间,TT、TC、CC 基因型表达无明显差异。**结论:***sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 C>T 可能与云南高原地区孕妇 PE 发病有关;*sFlt-1* 基因中 TT 基因型可能是云南高原地区孕妇 PE 的保护因素;同样处于云南高原低氧环境下,不同海拔地区的 PE 孕妇之间及正常孕妇之间 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点基因型分布无统计学差异。

【关键词】子痫前期;可溶性 Fms 样酪氨酸激酶 1;抗血管生成因子;单核苷酸多态性;高海拔**【中图分类号】**R714.24**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2020-08-13

Association of *sFlt-1* gene rs4769613 loci polymorphism with pre-eclampsia at different altitudes in Yunnan Province

Ai Fang¹, Dong Xudong¹, Zhou Fengxian², Zhao Feifei¹, Lu Qinnan¹, Yang Xiangqun¹

(1. Department of Obstetrics, The First People's Hospital of Yunnan Province/The Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology; 2. Department of Obstetrics, Diqing Tibetan Autonomous Prefectural People's Hospital)

【Abstract】Objective: To explore if any difference exists in genotypic distribution and allele frequency of *sFlt-1* gene rs4769613 loci polymorphism in patients with preeclampsia(PE) at relatively low and high altitudes in Yunnan Province. **Methods:** A total of 124 pregnant women of Han nationality who gave birth in the obstetrics department of Yunnan First People's Hospital from January 2018 to December 2019 were selected as the low altitude group, including 61 PE pregnant women and 63 normal full-term pregnant women, and 122 pregnant women of Han nationality who gave birth in the obstetrics department of Diqing Tibetan Autonomous Prefectural

作者介绍:艾 芳,Email:aifangyn@126.com,

研究方向:子痫前期的发病机制。

通信作者:董旭东,Email:dxmail@sohu.com。

基金项目:云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目[编号:2018FE001(-118)];云南省卫生科技计划资助项目(编号:2017NS219)。

优先出版:https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210325.1452.018.html (2021-03-28)

People's Hospital during the same period, including 61 PE pregnant women and 61 normal full-term pregnant women were selected into the high altitude group. We investigated the genotypic distribution and allele frequency of *sFlt-1* gene at rs4769613 locus by performing TaqMan probe real-time fluorescence PCR on them. **Results:** Firstly, we did find rs4769613 loci polymorphism of *sFlt-1* gene in PE and control groups for

both low and high altitude of Yunnan. Secondly, TT, CC and TC genotype in PE group at high altitude accounted for 18.03%(11/61), 29.51%(18/61) and 52.46%(32/61) respectively. Compared to control group at high altitude, TT, CC and TC genotype frequency accounted for 34.43%(21/61), 21.31%(13/61) and 44.26%(27/61). In the PE group at low altitude, TT, CC and TC genotype accounted for 13.11%(8/61), 27.87%(17/61) and 59.02%(36/61) respectively, and in the control group at low altitude, TT, CC and TC genotype accounted for 30.16%(19/63), 25.40%(16/63) and 44.44%(28/63). Thirdly, TT genotype distribution in the PE group were significantly lower than that in the control group (18.03% vs. 34.43%, $P=0.039$, $OR=0.419$, 95%CI=0.181–0.970), but there were no significant differences in CC and CT genotype between the PE group and the control group at high altitude area. The TT genotype distribution in the low altitude PE group were significantly lower than that in the control group (13.11% vs. 30.16%, $P=0.021$, $OR=0.349$, 95%CI=0.139–0.875), but there was no significant difference in CC and CT genotype between the low altitude PE group and the low altitude control group. There were no significant differences in the expression of TT, TC and CC genotype between PE group at high altitude and control group at low altitude. **Conclusion:** The SNP rs4769613 C>T of *sFlt-1* gene may be related to the pathogenesis of PE in pregnant women, and the TT genotype of *sFlt-1* gene may have protective effect on PE in pregnant women at Yunnan Plateau. There was no significant difference in the genotype distribution and allele frequency of The SNP rs4769613 of *sFlt-1* gene between pregnant women with PE nor normal pregnant women in Yunnan Plateau.

[Key words] pre-eclampsia; soluble Fms-like tyrosine kinase 1; antiangiogenic factor; single nucleotide polymorphism; high altitude

妊娠期高血压疾病是一种严重威胁孕产妇和围产儿健康的产科并发症,发病率为 5%~12%^[1]。子痫前期(preeclampsia, PE)是该疾病分类中较为严重的一类,其基本病理生理变化是全身小血管痉挛和血管内皮损伤,继而发生机体多器官功能障碍并导致一系列严重并发症^[2-3],是导致孕产妇和围产儿死亡的主要原因之一。PE 的发病机制复杂,目前尚未完全明了,对其进行深入研究对该疾病的防治有重要意义。

云南地处中高原低氧环境。昆明位于云南中部,平均海拔约为 1 900 m;迪庆位于云南西北部,平均海拔约为 3 500 m。根据《中国 1:1 000 000 地貌图制图规范(试行)》中对于海拔高度的分级指标,昆明属于中海拔地区(1 000~2 000 m),迪庆则属于高海拔地区(2 000~4 000 m)^[4]。高原地区的氧分压显著低于平原地区,其以低氧为机制的病理生理改变对处于高原的孕产妇各器官和神经内分泌调节有较大影响。研究发现,随着海拔的升高,PE 发病率呈明显上升趋势^[5-6]。不同研究团队对 PE 的发病机制与高海拔的相关性提出多种观点,目前普遍认为 PE 是一种多因素、多机制及多通路致病的疾病,受孕妇个体差异、胎盘、胎儿、环境等多方面因素的影响,而在这诸多影响因素中,进行性血管内皮损伤起重要作用,提示影响血管生成的相关因子与 PE 的发病密切相关^[7]。可溶性 Fms 样酪氨酸激酶 1 (soluble Fms-like tyrosine kinase 1, *sFlt-1*) 为一种抗血管生成因子,具有酪氨酸激酶活性,可抑制血管

内皮生长因子的活性,抑制血管新生并且加速血管内皮损伤^[8]。研究发现, *sFlt-1* 基因的启动区有一个低氧应答元件(hypoxia-responsive element, HRE),低氧环境可对 *sFlt-1* 的表达等方面产生影响^[9]。但目前尚未有研究从基因水平探索 *sFlt-1* 与处于不同海拔低氧环境下 PE 的相关性。

近年来,基因多态性与 PE 易感性的研究日益受到重视。通过大型全基因组关联研究发现,13 号染色体上(SNP rs4769613)C 等位与 PE 发生风险相关,携带 C 等位基因的孕妇 PE 发生概率比非携带者高 1.21 倍,但该研究结果在中国人群中尚未得到验证^[9-10]。本研究通过实时荧光 PCR 技术扩增 rs4769613 上下游基因序列并对扩增子序列测序来检测 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点表达,分析该基因位点多态性与云南地区不同海拔 PE 的相关性,探讨其在 PE 发病机制中可能的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2018 年 1 月至 2019 年 12 月在云南省第一人民医院产科分娩的 124 例汉族孕妇(居住地平均海拔 1 900 m 的昆明地区,海拔相对较低),将其设为“低海拔组”,其中包括 PE 孕妇 61 例(PE 组),正常足月孕妇 63 例(对照组);选取同期在迪庆藏族自治州人民医院产科分娩的 122 例汉族孕妇(居住地平均海拔 3 500 m 的迪庆地区,海拔相对较高),将其设为“高海拔组”,其中包括 PE 孕妇 61 例(PE 组),正常足月孕妇 61 例(对照组)。PE 的诊断标准参照《妇产科

学》第 9 版教材,排除慢性高血压、1 型或 2 型糖尿病、缺血性心脏病、心肺功能异常、合并慢性肾脏或肝脏疾病的孕妇。为排除民族因素对研究的影响,此次纳入的所有研究对象均为汉族,均为云南居民且长期居住在生产所在地区。

高海拔(迪庆)地区 PE 组和对照组年龄分别为 (30.93 ± 4.02) 岁和 (30.95 ± 4.12) 岁;低海拔(昆明)地区 PE 组和对照组年龄分别为 (31.50 ± 4.15) 岁和 (30.85 ± 3.96) 岁。本研究方案经云南省第一人民医院伦理委员会及迪庆州人民医院伦理委员会批准同意,并征得所有受试者知情同意。

1.2 实验流程及方法

1.2.1 标本采集 所有研究对象在入院后未经任何治疗前,采集早晨空腹外周静脉血 5 mL,置入含有 EDTA 抗凝剂的真空采血管中混匀,30 min 内保存在 -80°C 冰箱备用。孕妇外周血基因由 DNA 提取试剂盒(AxyPrep 基因组 DNA 小量制备试剂盒)提取,购于爱思进(Axygen)生物技术公司。

1.2.2 引物合成 引物参照文献,特异性引物序列由云南舜喜再生医学工程有限公司合成:上游引物 5'-CTCCTTCCA-GGGAACTCTA-3';下游引物 5'-TAAACTTAGCATCCCTG-ATTGTC-3'。

1.2.3 DNA 提取及 PCR 技术 离心管内加入 500 μL Buffer AP1 和 200~250 μL 孕妇抗凝全血进行裂解,加入 100 μL Buffer AP2 后沉淀,加入 700 μL Buffer W1A 及 800 μL Buffer A2 进行结合与洗涤,最后加入 80~200 μL Buffer TE 进行洗脱。在 DNA 提取完成后使用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 体系 25 μL ,包括目的 DNA 1 μL 、2 $\times$ PCR Master Mix 12.5 μL 、20 $\times$ SNP 探针 1.25 μL 及 DNA 无酶水 12.25 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。实验使用美国伯乐 PTC-200 型核酸扩增仪和 ABI7300 荧光定量检测仪进行检测。

1.3 统计学处理

使用 R 统计软件(version 3.6.1)进行统计分析。一般临床特征首先进行正态分布检验,符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有分组体质指数(body mass index, BMI)及高海拔地区 PE 组孕期体质量增加数据符合正

态分布,该数据如匹配则采用 Student t 检验,如不匹配则采用 Welch t 检验;偏态分布的计量资料以 $M_d(P_{25}, P_{75})$ 表示,所有分组年龄、孕次、产次、收缩压、舒张压、新生儿体质量、孕周,以及高海拔地区对照组孕期体质量增加数、低海拔地区对照组和 PE 组孕期体质量增加数均为偏态分布,如该数据匹配则采用 Wilcoxon 符号秩检验(W),若不匹配则采用 Mann-Whitney-Wilcoxon 检验(V),检验水准 $\alpha=0.05$ 。应用卡方 Hardy-Weinberg 遗传平衡进行检验,等位基因频率和基因型组间比较采用卡方检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般资料

PE 组和对照组的基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(卡方检验)($\chi^2 < 4.2018e-05, P=1.000$),不同海拔的 PE 组和对照组研究对象来自同一群体,样本具有良好代表性;高海拔 PE 组与对照组之间,以及低海拔 PE 组与对照组之间的年龄、孕次、产次、BMI 相比较无统计学差异(均 $P>0.05$);PE 的诊断按照上述标准,排除既往史对研究的干扰;而高海拔 PE 组与对照组相比较,组间的血压值、新生儿体质量及孕周存在统计学差异(均 $P<0.05$);低海拔 PE 组与对照组相比较,组间的血压值、孕期体质量增加、新生儿体质量及孕周存在统计学差异(均 $P<0.05$)(表 1、表 2)。此外,将高海拔 PE 组与低海拔 PE 组,以及高海拔对照组与低海拔对照组的临床资料进行组间比较,研究对象的年龄、孕次、产次、BMI、孕周无统计学差异(均 $P<0.05$)(表 1、表 2)。

本研究也对 PE 组及对照组孕妇其他妊娠合并症进行了分析。除外上述研究对象的排除标准外,常见的合并症包括妊娠合并甲状腺疾病、妊娠期糖尿病、胎膜早破、子宫肌瘤以及其他合并症(妊娠合并血小板减少、前置胎盘、羊水量异常、系统性红斑狼疮等)。PE 组妊娠合并症统计(低海拔及高海拔地区总计 122 名孕妇)结果提示妊娠合并甲状腺疾病共 18 人,妊娠期糖尿病共 17 人,胎膜早破 15 人,子宫肌瘤 4 人,其他合并症 16 人。对照组妊娠合并症(低海拔及高海拔地区总计 124 名孕妇)统计结果提示妊娠合并甲状腺疾病

表 1 研究对象的一般临床特征 [$M_d(P_{25}, P_{75})$; $\bar{x} \pm s$]

参数	PE 孕妇($n=122$)		正常孕妇($n=124$)	
	高海拔(迪庆)地区($n=61$)	低海拔(昆明)地区($n=61$)	高海拔(迪庆)地区($n=61$)	低海拔(昆明)地区($n=63$)
年龄/岁 ^b	31 (28, 33)	32 (29, 34)	31 (28, 34)	30 (28, 34)
孕次 ^b	2 (1, 3)	2 (2, 3)	2 (1, 3)	2 (1, 3)
产次 ^b	1 (1, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 2)	1 (1, 2)
BMI/($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	28.32 $\pm$ 2.97	28.93 $\pm$ 3.27	28.39 $\pm$ 2.91	28.59 $\pm$ 2.99
收缩压/mmHg ^b	148 (143, 164)	144 (142, 160)	108 (106, 111) ^a	105 (102, 108) ^a
舒张压/mmHg ^b	95 (93, 102)	92 (90, 102)	70 (64, 74) ^a	69 (62, 71) ^a
孕期体质量增加/kg	16.61 $\pm$ 5.95	15 (12, 20) ^b	15 (13, 19) ^b	14 (11.5, 16) ^{ab}
新生儿体质量/kg ^b	3 100 (2 350, 3 440)	3 160 (2 410, 3 450)	3 280 (2 960, 3 630) ^a	3 310 (3 080, 3 470) ^a
孕周 ^b	37 (34, 38)	36.71 (34.14, 37.42)	38 (37.42, 40.57) ^a	38.14 (37.42, 40.42) ^a

注:a,与相同海拔的 PE 组比较, $P<0.05$;b 表示偏态分布的计量资料

共 6 人,妊娠期糖尿病共 2 人,胎膜早破 5 人,子宫肌瘤 2 人,其他合并症 8 人。妊娠合并甲状腺疾病、妊娠期糖尿病在不同海拔的 PE 组中出现频率高于对照组,但在高海拔 PE 组与低海拔 PE 组间、高海拔对照组与低海拔对照组间无统计学差异;其余妊娠合并症的组间比较无统计学差异(表 3、表 4)。

2.2 PE 组与对照组 *sFlt-1* 基因型分布

通过对所有研究对象的 *sFlt-1* 基因位点进行检测,结果提示 *sFlt-1* 基因的位点存在 TT、CC、TC 共 3 种基因型。PE 组总 TT 基因型占 15.57%(19/122),总 CC 基因型占 28.69%(35/122),TC 基因型占 55.74%(68/122);对照组 TT 基因型占

32.26%(40/124),CC 基因型占 23.39%(29/124),TC 基因型占 44.35%(55/124)。PE 组 *sFlt-1* 基因 TT 基因型分布低于对照组(15.57% vs. 32.26%, $P=0.000$, $OR=0.369$,95%CI=0.199~0.685),而 CC、TC 基因型分布在 2 组中表达相似(均 $P>0.05$)(表 5、表 6)。

2.3 相同海拔的 PE 组与对照组基因型频率比较

高海拔地区 PE 组 TT 基因型占 18.03%(11/61),CC 基因型占 29.51%(18/61),TC 基因型占 52.46%(32/61);高海拔地区对照组 TT 基因型占 34.43%(21/61),CC 基因型占 21.31%(13/61),TC 基因型占 44.26%(27/61);高海拔地区 PE 组 *sFlt-1* 基因 TT 基因型分布低于对照组($P=0.039$),而 CC、

表 2 研究对象一般临床特征间的统计学分析

参数	高海拔 PE 组与低海拔 PE 组对比		高海拔对照组与低海拔对照组对比		高海拔地区 PE 组与低海拔地区 PE 组与对照组对比		低海拔地区 PE 组与对照组对比	
	统计量值	<i>P</i> 值	统计量值	<i>P</i> 值	统计量值	<i>P</i> 值	统计量值	<i>P</i> 值
年龄/岁	$V=792$	0.484	$W=1\ 958$	0.856	$V=824.5$	0.990	$W=2\ 128.5$	0.300
孕次	$V=664$	0.818	$W=1\ 832.5$	0.647	$V=487$	0.729	$W=2057.5$	0.483
产次	$V=150$	0.716	$W=1\ 961.5$	0.810	$V=177$	0.762	$W=1861.5$	0.716
BMI/($\text{kg}\cdot\text{m}^2$)	$t=1.028$	0.307	$t=-0.373$	0.709	$t=0.833$	0.407	$t=0.602$	0.548
收缩压/mmHg	$V=727$	0.431	$W=1\ 766$	0.501	$V=1\ 891$	0.000	$W=3\ 843$	0.000
舒张压/mmHg	$V=1\ 054$	0.203	$W=1\ 579$	0.086	$V=1\ 891$	0.000	$W=3\ 817$	0.000
孕期体质量增加/kg	$t=-0.525$	0.601	$W=1\ 664.5$	0.220	$V=943.5$	0.354	$W=2\ 339.5$	0.036
新生儿体质量/kg	$V=911$	0.807	$W=1\ 792.5$	0.520	$V=1\ 891$	0.000	$W=3\ 562$	0.000
孕周	$V=826$	0.641	$W=1772.5$	0.455	$V=290$	0.000	$W=835.5$	0.000

表 3 PE 组及对照组合并症频率统计表

合并症	PE 孕妇 ($n=122$)		正常孕妇 ($n=124$)	
	高海拔地区	低海拔地区	高海拔地区	低海拔地区
妊娠合并甲状腺疾病	7	11	4	2
妊娠期糖尿病	8	9	1	1
子宫肌瘤	1	3	—	2
胎膜早破	7	8	2	3
前置胎盘	2	1	—	—
羊水量异常	6	4	2	6
血小板减少	—	2	—	—
系统性红斑狼疮	—	1	—	—

表 4 PE 组及对照组合并症统计学分析表

参数	高海拔 PE 组与低海拔 PE 组对比		高海拔对照组与低海拔对照组对比		高海拔地区 PE 组与低海拔地区 PE 组与对照组对比		低海拔地区 PE 组与对照组对比	
	χ^2 值	<i>P</i> 值	χ^2 值	<i>P</i> 值	χ^2 值	<i>P</i> 值	χ^2 值	<i>P</i> 值
妊娠合并甲状腺疾病	1.043	0.307	0.770	0.380	0.899	0.343	7.290	0.007
妊娠期糖尿病	0.068	0.794	0.001	0.982	5.878	0.015	7.247	0.007
子宫肌瘤	1.034	0.309	1.968	0.161	1.008	0.315	0.243	0.622
胎膜早破	0.076	0.783	0.176	0.675	2.999	0.083	2.675	0.102
前置胎盘	0.342	0.559	—	—	2.033	0.154	1.041	0.308
羊水量异常	0.436	0.509	2.003	0.157	2.140	0.143	0.368	0.544
血小板减少	2.033	0.154	—	—	—	—	2.099	0.147
系统性红斑狼疮	1.008	0.315	—	—	—	—	1.041	0.308

TC 基因型分布在 2 组间无统计学差异(均 $P>0.05$)。

低海拔地区 PE 组 TT 基因型占 13.1%(8/61),CC 基因型占 27.87%(17/61),TC 基因型占 59.02%(36/61);低海拔地区对照组 TT 基因型占 30.16%(19/63),CC 基因型占 25.40%(16/63),TC 基因型占 44.44%(28/63)。与高海拔地区相似,低海拔地区 PE 组与对照组间在 TT 基因型分布上存在统计学差异($P=0.021$),而 2 组间在 CC、TC 基因型分布上无统计学差异(均 $P>0.05$)。

将 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点等位基因频率数据按高海拔(迪庆)地区和低海拔(昆明)地区进行细分,不论是高海拔地区还是低海拔地区,SNP rs4769613 C>T 的等位基因和基因型的分布在 PE 组与对照组间比较均有统计学差异(表 5、表 6)。

2.4 不同海拔的 PE 组及对照组基因型频率比较

将 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点等位基因频率数据在高海拔 PE 组和低海拔 PE 组,高海拔对照组和低海拔对照组之间进行比较,rs4769613 位点 TT、TC、CC 基因型频率均无统计学差异(均 $P>0.05$)。这一结果提示同样处于云南高原低

氧环境下,不同海拔地区的 PE 孕妇之间及正常孕妇之间 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点基因型分布无统计学差异(表 7、表 8)。

3 讨论

3.1 孕周及 PE 严重程度与 *sFlt-1* 表达的相关性

PE 是妊娠期特有的疾病,其病情复杂、变化快,临床上根据患者病情轻重进行个体化治疗,密切监测母胎情况并及时合理干预。适时终止妊娠是治疗 PE 的重要措施,故医源性早产率随之增加。在本研究中,无论是高海拔地区,还是低海拔地区,PE 组孕周均低于正常对照组,PE 组新生儿体质量也低于正常对照组。在探讨不同海拔低氧环境下 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点基因型分布与 PE 的相关性时,为排除孕周对结果造成干扰,本研究将高海拔 PE 组

表 5 高海拔地区 PE 组与对照组中 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 基因型分型(基因型和等位基因频率)

基因型/等位基因	PE 组 (n=61)	对照组 (n=61)	χ^2 值	P 值	OR 值 (95%CI)
TT	11	21	4.236	0.039	0.419 (0.181~0.970)
CC	18	13	1.081	0.298	1.545 (0.678~3.521)
TC	32	27	0.820	0.365	1.389 (0.681~2.833)
T	54	69		—	—
C	68	53		—	—

表 6 低海拔地区 PE 组与对照组中 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 基因型分型(基因型和等位基因频率)

基因型/等位基因	PE 组 (n=61)	对照组 (n=63)	χ^2 值	P 值	OR 值 (95%CI)
TT	8	19	5.285	0.021	0.349 (0.139~0.875)
CC	17	16	0.096	0.755	1.134 (0.511~2.518)
TC	36	28	2.635	0.104	1.800 (0.882~3.669)
T	52	66		—	—
C	70	60		—	—

表 7 低海拔地区对照组与高海拔地区对照组中 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 基因型分型(基因型和等位基因频率)

基因型/等位基因	低海拔 (n=63)	高海拔 (n=61)	χ^2 值	P 值	OR 值 (95%CI)
TT	19	21	0.258	0.611	0.823 (0.360~1.870)
CC	16	13	0.288	0.591	1.254 (0.503~3.178)
TC	28	27	0.814	0.366	0.713 (0.317~1.591)
T	66	69		—	—
C	60	53		—	—

表 8 低海拔地区 PE 组与高海拔地区 PE 组中 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 基因型分型(基因型和等位基因频率)

基因型/等位基因	低海拔 (n=61)	高海拔 (n=61)	χ^2 值	P 值	OR 值 (95%CI)
TT	8	11	0.561	0.453	0.688 (0.220~2.056)
CC	17	18	0.040	0.841	0.923 (0.390~2.179)
TC	36	32	0.531	0.465	1.302 (0.600~2.842)
T	52	54		—	—
C	70	68		—	—

和低海拔 PE 组的孕周、高海拔对照组和低海拔对照组的孕周进行分析,结果提示无统计学差异,从而增加了结论的可靠性。

此外,有研究发现 *sFlt-1* 水平的变化与孕周相关,其在妊娠 15 周后显著升高,且差异随孕周增加而增大^[11-12]。但在 *sFlt-1* 水平与 PE 严重程度相关性方面,学术界的观点不一。有研究认为 *sFlt-1* 水平与 PE 的严重程度呈正相关^[13]。但徐郁^[14]提出不同观点,认为血清 *sFlt-1* 水平在轻度、重度 PE 患者之间无统计学差异,与病情严重程度关系不大。本研究仅涉及 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 C>T 的表达变化,未对 *sFlt-1* 的水平进行研究,PE 的病情轻重、PE 组与对照组间的孕周差异对 *sFlt-1* 基因的表达不产生影响,进一步增加了结论的可靠性。

3.2 *sFlt-1* TT 基因型与 PE 的相关性

有学者提出,PE 发病与海拔有相关性,其发病率随着海拔的升高呈明显上升趋势^[5-6]。本研究结果提示,在云南相对低、高海拔地区中,均发现 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 C>T 与孕妇 PE 的发病有关;研究结果与美国国家生物信息中心 (US National Center for Biotechnology Information,NCBI)dbSNP 数据库 dbGaP 研究计算总等位基因和基因型频率进行比对,发现 rs4769613 C 和 T 等位基因频率与东亚、欧洲等人群相似 (C=0.519,T=0.480),但 C 和 T 等位基因频率与非洲及非裔人群有较大的差异 (C=0.818,T=0.182)。rs4769613 位于 *FLT1* 附近的胎盘增强子区域,该区域的突变可能会通过影响基因转录从而影响 *FLT1* 的表达^[9-10]。Maris Laan 团队收集了爱沙尼亚 PE 孕妇和正常孕妇的胎盘组织和外周血,分析 rs4769613 基因型对胎盘 *FLT1* 表达及母体 *sFlt-1* 水平的影响,结果发现 PE 孕妇 CC、CT 基因型相对于正常孕妇显著升高,表明 rs4769613 是条件表达量性状位点,当启动子有 C 等位基因时能促进 *FLT1* 基因转录最终导致不良的胎盘结局,提出 *FLT1* rs4769613 C 等位基因增加了 PE 的发病风险^[9]。本研究结果发现在高海拔地区和低海拔地区虽然 PE 组 CC、CT 基因型相对于对照组没有统计学差异,但是在 PE 组 CC、CT 基因型相较于对照组还是升高的,这种升高的趋势在增加样本数量后或许能得到统计学差异。此外,在 rs4769613 T 等位基因与 PE 的相关性方面目前还鲜少有团队进行报道。Gray 团队对 PE 患者及正常孕妇胎盘 *FLT1* rs4769613 基因型及 *sFlt-1* 的水平进行评估,发现正常妊娠晚期 *sFlt-1* 水平与风险基因型有关,但 PE 却不同,因其

sFlt-1 水平升高,掩盖了风险等位基因对 *sFlt-1* 水平的影响^[10]。本研究结果提示不论在低海拔地区抑或高海拔地区,PE 组 TT 基因型分布明显低于对照组,*sFlt-1* 基因中 TT 基因型可能是云南相对低、高海拔地区孕妇 PE 的保护因素,提示在云南地区人群中 T 等位基因的敏感性可能大于 C 等位基因,这为今后云南地区的 PE 防治工作提供了新思路:*sFlt-1* rs4769613 T 等位基因也许能成为 PE 筛查的有效指标。

3.3 低氧高海拔环境与 *sFlt-1* 表达的相关性

本研究发现同样处于云南高原低氧环境下,低海拔地区和高海拔地区的 PE 孕妇和正常孕妇中 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点基因型分布无统计学差异,原因可能与长期生活在高原的人群其基因为适应高原低氧环境而产生适应及调节机制相关^[15]。近年来,不少学者提出 PE 的发病与 *sFlt-1* 高表达及血管生成失衡相关^[16-17]。*sFlt-1* 基因的启动区有一个 HRE,低氧环境可对 *sFlt-1* 的表达等方面产生影响^[18]。Nevo O 等^[19]通过体内和体外的研究也证实了胎盘在低氧条件下和高海拔条件中培养会产生大量 *sFlt-1*。此外,有文献报道在低氧浓度环境中,与缺氧相关的重要因子容易被激活,如低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 通过调节一氧化氮功能导致血管舒张功能受损从而引发血压升高^[20]。因此,关于缺氧环境、血管内皮损伤、血管生成因子等与 PE 发病的相关性越来越得到重视。

在低氧环境中,人群的生理功能会发生顺应性变化,而人群的基因型频率也会因长期生活在该环境下而发生改变。基于繁殖适度的理论,设想在高海拔低氧环境下,因环境造成的 *sFlt-1* 高表达可能会导致 rs4769613 C 风险等位基因频率下降。本研究通过对不同海拔地区孕妇 *sFlt-1* 基因的 rs4769613 位点基因型分布和等位基因频率进行比较,发现在云南低海拔地区 PE 组和高海拔地区 PE 组间的数据无统计学差异;同样的,低海拔地区对照组和高海拔地区对照组间的数据也无统计学差异。研究结果提示 *sFlt-1* 基因 SNP rs4769613 C>T 可能与云南地区孕妇 PE 发病有关,但可能受海拔因素的影响不大。海拔可能是 PE 的独立风险因素。

3.4 展望

有研究提出,除了 *sFlt-1* 基因之外,内皮 PAS 区域蛋白 1 (endo-thelial PAS domain protein 1,EPAS1) 基因、脯氨酸羟化酶 2 (prolyl hydroxylase domain 2 gene, EGLN1) 基因、 β 2 肾上腺素受体 (β 2 adrenergic

receptor, *ADRB2*)rs1042713; A>G/*ADRB2* rs1042714; G>C、酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, *TH*) 基因 rs6356G>A 及血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor-A, *VEGFA*) 基因 rs3025039; C>T 均与高原低氧环境中的氧气传送及低氧环境中适应性相关^[20-22]。*EPAS1* 与 *EGLN1* 均为重要的低氧反应元件;*ADRB2* 影响血管收缩并与高原低氧环境中的氧气传送相关;*TH* 基因与在低氧环境中适应性相关;*VEGF* 是一个受缺氧调节的强大的通透性因子。在未来的研究中,除 *sFlt-1* 基因外,还可探讨在不同海拔环境下的 PE 孕妇体内与低氧适应相关基因如 *EPAS1*、*EGLN1*、*ADRB2*、*TH*、*VEGFA* 等的表达和调控,分析其是否处于相似水平并对几个基因在高海拔 PE 患者中的共同作用进行研究。近年来,*sFlt-1* 在 PE 早期筛查中的价值已得到关注^[23],今后可尝试将 rs4769613 基因型与其他临床参数相结合,深入研究将 *sFlt-1* 的表达作为早期筛查的方式来预测 PE 发生率的可行性。

今后,期望有更大的样本量及更低海拔和更高海拔的样本来验证 *sFlt-1* 的表达即使在不同海拔下也能作为一个 PE 潜在预防和检测的准确靶点,并探讨高海拔环境中低氧适应基因对 PE 孕妇的保护作用,为研究 PE 可能的发病机制提供新的思路 and 理论依据。

参 考 文 献

- [1] 谢 幸,孔北华,段 涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京:人民卫生出版社,2018:83.
- [2] Ngene NC, Moodley J. Role of angiogenic factors in the pathogenesis and management of pre-eclampsia[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2018, 141(1):5-13.
- [3] Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, et al. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(5):275-289.
- [4] 李炳元,潘保田,韩嘉福. 中国陆地基本地貌类型及其划分指标探讨[J]. 第四纪研究, 2008, 28(4):535-543.
- [5] Tal R. The role of hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha in preeclampsia pathogenesis[J]. Biol Reprod, 2012, 87(6):134.
- [6] Julian CG. High altitude during pregnancy[J]. Clin Chest Med, 2011, 32(1):21-31.
- [7] Verbeurg L, Chantraine F, De Marchin J, et al. Use of *sFlt-1*/PIGF ratio in preeclampsia: a monocentric retrospective analysis[J]. Rev Med Liege, 2017, 72(9):393-398.
- [8] Palmer KR, Tong S, Kaitu'u-Lino TJ. Placental-specific *sFLT-1*: role in pre-eclampsia pathophysiology and its translational possibilities for clinical prediction and diagnosis[J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(2):69-78.
- [9] Kikas T, Inno R, Ratnik K, et al. C-allele of rs4769613 Near *FLT1* represents a high-confidence placental risk factor for preeclampsia[J]. Hypertension, 2020, 76(3):884-891.
- [10] Gray KJ, Saxena R, Karumanchi SA. Genetic predisposition to preeclampsia is conferred by fetal DNA variants near *FLT1*, a gene involved in the regulation of angiogenesis[J]. Am J Obstet Gynecol, 2018, 218(2):211-218.
- [11] Khalil A, Maiz N, Garcia-Mandujano R, et al. Longitudinal changes in maternal serum placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase-1 in women at increased risk of preeclampsia[J]. Ultra-sound Obstet Gynecol, 2016, 47(3):324-331.
- [12] Tomimatsu T, Mimura K, Matsuzaki S, et al. Preeclampsia: maternal systemic vascular disorder caused by generalized endothelial dysfunction due to placental antiangiogenic factors[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(17):4246.
- [13] Cui LF, Shu C, Liu ZT, et al. The expression of serum sEGFR, *sFlt-1*, sEndoglin and PLGF in preeclampsia[J]. Pregnancy Hypertens, 2018, 13:127-132.
- [14] 徐 郁. 子痫前期患者血清 sEng 与 *sFlt-1* 的表达水平及意义[J]. 实用临床医药杂志, 2016, 20(5):174-175.
- [15] Galhardo RS, Hastings PJ, Rosenberg SM. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2007, 42(5):399-435.
- [16] Sánchez-Aranguren LC, Espinosa-González CT, González-Ortiz LM, et al. Soluble Fms-like tyrosine kinase-1 alters cellular metabolism and mitochondrial bioenergetics in preeclampsia[J]. Front Physiol, 2018, 9:83.
- [17] Veisani Y, Jenabi E, Delpisheh A, et al. Angiogenic factors and the risk of preeclampsia: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Reprod Biomed, 2019, 17(1):1-10.
- [18] McGinnis R, Steinhorsdottir V, Williams NO, et al. Variants in the fetal genome near *FLT1* are associated with risk of preeclampsia[J]. Nat Genet, 2017, 49(8):1255-1260.
- [19] Nevo O, Lee DK, Caniggia I, et al. Attenuation of VEGFR-2 expression by *sFlt-1* and low oxygen in human placenta[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e81176.
- [20] Ahmed SIY, Ibrahim ME, Khalil EAG. High altitude and pre-eclampsia: adaptation or protection[J]. Med Hypotheses, 2017, 104:128-132.
- [21] Sun CJ, Li L, Li XY, et al. Novel SNPs of WNK1 and AKR1C3 are associated with preeclampsia[J]. Gene, 2018, 668:27-32.
- [22] Depoix CL, de Selliers I, Hubinont C, et al. HIF1A and EPAS1 potentiate hypoxia-induced upregulation of inhibin alpha chain expression in human term cytotrophoblasts *in vitro*[J]. Mol Hum Reprod, 2017, 23(3):199-209.
- [23] Bian XM, Biswas A, Huang XH, et al. Short-term prediction of adverse outcomes using the *sFlt-1* (soluble fms-like tyrosine kinase 1) PLGF (placental growth factor) ratio in Asian women with suspected preeclampsia[J]. Hypertension, 2019, 74(1):164-172.

(责任编辑:冉明会)