

感染性早产患者血清、胎盘组织 TNFR II 的表达水平 及其与 TNFR II 196 基因多态性的关系

蒲 杰¹, 曾蔚越^{2△}, 廖 华²

1. 四川省妇幼保健院·四川省妇女儿童医院 妇产科(成都 610036); 2. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨肿瘤坏死因子 α 受体 II (TNFR II) 基因第 6 外显子 196T→G 多态性与早产合并绒毛膜羊膜炎遗传易感性的关系。**方法** 对 46 例早产患者(根据胎盘病检有无绒毛膜羊膜炎分为早产感染组 21 例和早产非感染组 25 例)母血、胎盘组织和同期 50 例足月正常产母血、20 例胎盘组织进行研究。应用 RT-PCR 技术测定胎盘组织中 TNFR II mRNA 的表达水平;采用 ELISA 法测定母血清可溶性 TNFR II (sTNFR II) 水平。采用 PCR-限制性片段长度多态性(RFLP)对 TNFR II 第 6 外显子 196 位点进行基因分型,分析该位点不同基因型间早产患者胎盘 TNFR II mRNA 和母血 sTNFR II 水平的差异。**结果** ①在早产患者中 TNFR II 基因 196 位点 TG (GG)基因型与 TT 基因型比较,其对应的 TNFR II mRNA、sTNFR II 均有增高的趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。②孕妇胎盘组织中 TNFR II mRNA 及血清中 sTNFR II 水平在早产感染组增高,差异有统计学意义($P<0.05$),在早产非感染组和正常足月产组间差异无统计学意义($P>0.05$)。早产组不同基因型与绒毛膜羊膜炎的相关性分析显示,TNFR II 基因 TG+GG 基因型与早产绒毛膜羊膜炎的发生可能相关($\chi^2=11.088, P<0.05$),TG+GG 基因型 OR 值为 12.65,95%CI 为 2.359~67.848,其发生绒毛膜羊膜炎的几率是 TT 基因型的 12.65 倍。**结论** TNFR II 基因第 6 外显子 196 位点突变不引起早产孕妇 TNFR II 转录、翻译水平改变,该基因 196 位点多态性却与感染性早产孕妇血清 sTNFR II、胎盘组织 TNFR II mRNA 表达水平的增高有关,该位点多态性可以成为早期预测、诊断感染性早产的指标。

【关键词】 早产 绒毛膜羊膜炎 肿瘤坏死因子 α 受体 II 基因多态性

Relationship Between the Levels of Maternal Serum sTNFR II and the mRNA Expression of Placental TNFR II in Preterm Labor with Chorioamnionitis and Polymorphism in -196 Site of Tumor Necrosis Factor- β Receptor II PU Jie¹, ZENG Wei-yue^{2△}, LIAO Hua². 1. Department of Obstetrics and Gynecology, Sichuan Provincial Hospital for Women and Children, Chengdu 610036, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: Zengweiyue@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of Tumor necrosis factor receptor II (TNFR II) in preterm labor with chorioamnionitis and their gene polymorphisms in genetic susceptibility to preterm labor with chorioamnionitis in Chengdu. **Methods** We collected 46 cases maternal serum and partial placental tissues of preterm labor (21 cases of infectious group with chorioamnionitis, 25 cases of noninfectious group without chorioamnionitis), and 50 cases maternal serum and 20 cases placental tissues of term labor in corresponding period. TNFR II mRNA in placental tissue were tested by RT-PCR, maternal serum levels of sTNFR II were measured by ELISA. According to preliminary studies on TNFR II -196 site of the gene type, we analyze the sites of different genotypes in patients with premature placental TNFR II mRNA and maternal blood levels of sTNFR II difference, and with different genotypes chorioamnionitis relevance. **Results** In patients with preterm labor, the results of placental TNFR II mRNA and serum sTNFR II were no statistically significant higher in TG (GG) than in TT ($P>0.05$). The levels of maternal serum sTNFR II and the mRNA expression of placental TNFR II in preterm labor with chorioamnionitis were significantly higher than those of preterm labor without chorioamnionitis and term labor ($P<0.05$). There were no significant difference between term labor and preterm labor without chorioamnionitis ($P>0.05$). Close correlation was observed between the different genotypes and the chorioamnionitis ($\chi^2=11.088, P<0.05$). The odds ratio (OR) for TG+GG genotype was 12.65, 95%CI 2.359-67.848, with more than 12.65 times probability of chorioamnionitis than that of TT genotype group. **Conclusion** It suggested that TNFR II -196 polymorphism might not play a role by affecting TNFR II production in preterm labor. The site polymorphism is associated with higher serum sTNFR II and placenta TNFR II mRNA expression in patient with chorioamnionitis. It can be a useful marker for early prediction and diagnosis of preterm labor with chorioamnionitis.

【Key words】 Preterm labor Chorioamnionitis TNFR II gene Gene polymorphism

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是介导炎症反应的重要前炎性细胞因子,具

有广泛的生物学活性, TNF- α 生物学活性是通过与之相适应的细胞膜上 TNF- α 受体(TNFR)特异性结合起作用, 其中与 TNFR Ⅱ结合更为密切。关于 TNF- α 基因多态性与早产的研究较多, 一些流行病学研究表明早产具有遗传易感性, 尤其是感染性早产^[1,2]。但目前国内外尚无 TNFR Ⅱ及其基因多态性与早产及早产合并绒毛膜羊膜炎的相关性研究。我们前期用 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测孕妇外周血 TNFR Ⅱ基因第 6 外显子 196 位点多态性与早产的关系的研究^[3]表明, TNFR Ⅱ基因第 6 外显子 196 位点多态性在成都地区汉族早产发病的遗传易感因素中不起主要作用, 但其与早产绒毛膜羊膜炎发生相关。本实验进一步采用 RT-PCR、ELISA 技术检测早产孕妇胎盘组织中 TNFR Ⅱ mRNA 及血清中可溶性 TNFR Ⅱ(sTNFR Ⅱ)水平在病例组、对照组以及病例组中两种基因型之间表达水平是否存在差异, 从 TNFR Ⅱ及其基因多态性方面研究我国早产发生的相关遗传学背景, 探讨其在预测早产及早产合并绒毛膜羊膜炎中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组

选择在四川大学华西第二医院、四川省妇幼保健院产科住院分娩的孕产妇 96 例, 其中正常足月妊娠妇女 50 例(对照组), 年龄(28.4 ± 3.1)岁, 孕龄(38.1 ± 1.7)周; 早产患者 46 例(早产组), 年龄(26.7 ± 2.8)岁, 孕龄(33.4 ± 2.8)周。其中早产感染组(有绒毛膜羊膜炎者)21 例, 早产非感染组(无绒毛膜羊膜炎者)25 例。

1.1.1 纳入标准 凡符合以下标准者纳入本研究: 孕周明确、单胎、分娩孕周为 $28 \sim 36^{+6}$ 周和(或)有胎膜早破, 分娩方式为自然分娩或临产后因产程异常或胎儿窘迫行剖宫产术, 产后经胎盘组织病理学检查有无绒毛膜羊膜炎再分为早产感染组和早产非感染组。足月组(对照组): 孕周明确、单胎、分娩孕周为 $37 \sim 41^{+6}$ 周和(或)有胎膜早破、无宫缩, 分娩方式均为因产科手术指征或社会因素行剖宫产术。

1.1.2 排除标准 病理妊娠如妊娠期高血压疾病、前置胎盘、胎盘早剥、妊娠期糖尿病、妊娠期肝内胆汁淤积症以及合并心脏病、糖尿病、甲亢等内外科疾病。

1.1.3 基因型分组 根据 TNFR Ⅱ基因第 6 外显子 196 位点基因型分型结果^[1], 进一步将早产患者分为 TT 基因型组(33 例)、TG+GG 基因型组[(10

+3)例]。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 所有孕妇在分娩前抽取肘静脉血 8 mL, 3 mL 置于含 EDTA 抗凝的试管中, 轻轻摇匀后, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用提取 DNA。另 5 mL 静置 5 min 后离心(3000 r/min)10 min, 留取血清后置入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用用于 ELISA 检测。在胎盘娩出后, 立即于胎盘旁中央区取绒毛组织约 50 mg, 生理盐水漂洗后, 滤纸吸干水分, 再装入经 DEPC 处理过的 EP 管, 快速放入液氮中, 24 h 后再转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用用于总 RNA 的提取。

1.2.2 RT-PCR 检测 96 例胎盘组织中 TNFR Ⅱ mRNA 的表达

1.2.2.1 RNA 反转录合成 cDNA 第一链 按下列组成配制反转录反应体系: MgCl_2 $2\text{ }\mu\text{L}$, $10\times\text{RT Buffer}$ $1\text{ }\mu\text{L}$, $\text{Rnase Free H}_2\text{O}$ $3.75\text{ }\mu\text{L}$, dNTP Mixture (各 10 mmol/L) $1\text{ }\mu\text{L}$, Rnase Inhibitor $0.25\text{ }\mu\text{L}$, $\text{AMV Reverse Transcriptase}$ $0.5\text{ }\mu\text{L}$, $\text{Oligo dT-Adaptor Primer}$ $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 以上反应体系共 $9\text{ }\mu\text{L}$ 。用微型离心机混匀上述反应体系, 以转速 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 短暂离心, 加入胎盘组织提取标本的 RNA $1\text{ }\mu\text{L}$, 每标本共 $10\text{ }\mu\text{L}$ 总反应体系, 混匀并以转速 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 短暂离心, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, 将 RNA 反转录合成 cDNA 第一条链, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2.2 PCR 扩增 在 0.2 mL PCR 管壁内依次加入: $10\times\text{PCR buffer}$ $3.75\text{ }\mu\text{L}$, TaqDNA 合成酶 ($5\text{ IU}/\mu\text{L}$) $0.3\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 (25 mmol/L) $2.25\text{ }\mu\text{L}$, dNTP (各 150 mmol/L) $6\text{ }\mu\text{L}$, 引物 P1 (20 pmol/L) $0.75\text{ }\mu\text{L}$, 引物 P2 (20 pmol/L) $0.75\text{ }\mu\text{L}$, 灭菌 ddH_2O $21.7\text{ }\mu\text{L}$, cDNA $2\text{ }\mu\text{L}$, 总体积 $37.5\text{ }\mu\text{L}$ 。 $\beta\text{-actin}$ 的 PCR 反应管内除引物为 $\beta\text{-actin}$ 外, 余均不变。 $12\text{ }000\text{ r/min}$ 短暂离心, 在 PCR 仪上按照 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 55 s 循环 32 次, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。然后各样本取 $6\text{ }\mu\text{L}$ 扩增产物, 与 $3\text{ }\mu\text{L}$ 上样缓冲液混匀后, 经 20 g/L 琼脂糖 5 V/cm 电泳 25 min 后, 凝胶成像系统照相, 分析各产物的光密度值与 $\beta\text{-actin}$ 的光密度值之比作为其 mRNA 表达水平的定量指标。

1.2.3 ELISA 检测 96 例母血清 sTNFR Ⅱ水平 人 sTNFR Ⅱ ELISA 试剂盒, 购自上海森雄科技实业有限公司, 按试剂盒操作步骤检测母血 sTNFR Ⅱ水平。

1.2.4 统计学方法 两组间计量资料比较应用独立样本 t 检验; 3 组间计量资料比较应用方差分析,

F 检验;进一步两两比较用 SNK-q 检验。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 胎盘组织 *TNFR II* mRNA 的 RT-PCR 分析

凝胶电泳结果显示(附图),在 349 bp 左右处显示一特异性条带。21 例早产感染组的 *TNFR II* mRNA 表达量(2.2020 ± 0.3767)高于 25 例早产非感染组(1.9888 ± 0.2447)和 50 例足月产组(1.8135 ± 0.3759)($P<0.05$),早产非感染组与足月产组相比其差异无统计学意义($P>0.05$)。

附图 胎盘组织中 *TNFR II* mRNA 表达

Fig *TNFR II* mRNA expression in placenta tissue RT-PCR electrophoretogram

M: Marker; 1-10: Placenta tissue (preterm labor with chorioamnionitis;1,3,4,8; preterm labor without chorioamnionitis; 5,6,9; term labor;2,7,10)

2.2 血清 sTNFR II 水平的变化

21 例早产感染组患者 sTNFR II 水平[(3.7810 ± 0.0844) pg/mL]均高于 25 例早产非感染组[(3.4602 ± 0.1237) pg/mL]和 50 例足月产组[(3.3620 ± 0.4593) pg/mL]($P<0.05$),早产非感染组与足月产组相比其差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 不同基因型早产患者胎盘 *TNFR II* mRNA 和母血 sTNFR II 水平的比较

按基因型分类,在早产患者的胎盘和母血中 *TNFR II* 基因第 6 外显子 196 位点 13 例(10+3)TG+GG 基因型组 *TNFR II* mRNA、sTNFR II 表达虽高于 33 例 TT 基因型组,但其差异无统计学意义($t=0.765$, $P=0.449$; $t=1.158$, $P=0.253$),见附表。

附表 早产组 *TNFR II* 基因第 6 外显子 196 位点不同基因型患者胎盘 *TNFR II* mRNA、母血 sTNFR II 水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Table The levels of *TNFR II* mRNA in placenta and sTNFR II in maternal serum of *TNFR II* 196 among TG+GG and TT($\bar{x}\pm s$)

<i>TNFR II</i> 196 genotype	<i>n</i>	<i>TNFR II</i> mRNA	sTNFR II (pg/mL)
TG+GG	10+3	2.1485 ± 0.3059	3.6592 ± 0.1899
TT	33	2.0661 ± 0.3374	3.5861 ± 0.1942

2.4 早产组不同基因型与绒毛膜羊膜炎的相关性分析

46 例早产患者中 TG+GG 基因型组有(10+3)例,TT 基因型组有 33 例,其中 TG+GG 基因型组中有绒毛膜羊膜炎者(8+3)例,TT 基因型组中有 10 例。提示在本样本量条件下,*TNFR II* 196 基因 TG+GG 基因型与早产绒毛膜羊膜炎的发生可能相关($\chi^2=11.088$, $P<0.05$),TG+GG 基因型 OR 值为 12.65,95%CI 为 2.359~67.848。

3 讨论

早产因其较高的发病率、死亡率和住院费用以及长期残疾而成为世界一个主要的公共卫生问题。研究显示早产主要与细胞因子诱导的绒毛膜羊膜炎有关。其中,细胞因子 *TNF- α* 基因多态性与早产的研究较多,其在母胎之间的免疫调节早产发生中起重要作用^[4-6]。已有研究^[7]分析表明母亲 *TNF- α* 308 位点基因多态性可能不是一个强大的早产独立危险因素,可能是结合细胞因子受体、早产危险因素,包括胎儿的基因型等的相互影响而在早产的发生发展中发挥作用。

众所周知,*TNF- α* 是通过与靶细胞膜上的特异性受体 *TNFR* 结合而发挥效应,其中 *TNFR II* 的亲合力较强,*TNFR I* 的亲合力相对弱一些。已有研究发现 *TNFR II* 基因第 6 外显子 196 位的碱基变化(T→G)可能会导致它的生物学活性的改变,而我们前期的研究^[3]并未发现 *TNFR II* 基因 196 位点变异基因型(TG+GG)分布频率在成都地区汉族早产患者和足月正常产人群中具有明显差异($P>0.05$),但发现其变异基因型(TG+GG)与早产患者绒毛膜羊膜炎的发生密切相关,其发生绒毛膜羊膜炎的几率是 TT 基因型的 12.65 倍。

TNF- α 受体在胎盘组织中有丰富的表达,sTNFR II 是细胞膜外部分通过蛋白水解后形成的可溶性 *TNFR*,是非常稳定的蛋白质,可在血、尿中测定到。因此,*TNF- α* 受体的表达水平发生改变可以预示着妊娠结局。*TNFR II* 在早产中的作用可能是通过与 *TNF- α* 结合后,激活核因子- κ B(NF- κ B)活性,诱导 IL-6、IL-1 生成,再进一步促使前列腺素(PG)的合成与释放而诱发早产、加重炎症程度。Menon 等^[8]通过分析自发早产患者 *TNF- α* 及其受体基因(*TNFR I*、*TNFR II*)的 34 种单核苷酸多态与羊水中 *TNF- α* 和可溶性 *TNF* 受体(sTNFR I 和 sTNFR II)浓度的研究显示,非洲裔美国人羊水中细胞因子及其受体浓度与不良妊娠结局如早产、单核苷酸多态性和感染有关,但此结果似乎并不会出

现在白人中,也解释了不同种族早产发病率差异性的原因。本研究显示早产患者胎盘和母血中 TG+GG 基因型组 TNFRⅡ mRNA、sTNFRⅡ 表达虽高于 GG 基因型组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。提示 TNFRⅡ 基因第 6 外显子 196 位点多态性在成都地区汉族早产发病的遗传易感因素中不起主要作用,但其与早产绒毛膜羊膜炎发生密切相关。当发生绒毛膜羊膜炎时, TNFRⅡ mRNA 表达量显著增加,与 TNF- α 共同作用而导致分娩启动,诱发早产。本实验还发现早产非感染组胎盘组织中 TNFRⅡ mRNA 表达水平略高于足月组,在早产合并绒毛膜羊膜炎时,胎盘组织中的表达增高($P<0.05$)。说明发生感染时,胎盘组织中 TNFRⅡ mRNA 的表达水平明显升高。炎性细胞因子对中性粒细胞等炎性细胞产生趋化作用,吸引其浸润胎盘绒毛及蜕膜组织, TNFRⅡ mRNA 表达明显增加,与 TNF- α 共同作用而导致分娩启动,妊娠终止,提示当发生绒毛膜羊膜炎时, TNF- α 通过其受体发挥作用,两者在胎盘组织中表达异常升高时,则促使分娩发动,诱发感染性早产的发生。

有研究观察到正常孕妇血中和新生儿血中 sTNFR 水平显著升高,特别是新生儿尿中含有极高水平的 sTNFRⅠ和 sTNFRⅡ,因此推测怀孕时体内 sTNFR 水平升高可能有一定的自我保护和自我稳定的生理意义。但当 TNF- α 病理性升高时, sTNFR 则作为 TNF- α 载体,减少 TNF- α 的自然降解而维持其细胞毒作用,进而影响妊娠进展。而伴随正常足月妊娠出现的 TNF- α ,对 sTNFR 的释放无影响, sTNFR 的缓冲机制可在很大范围内中和 TNF- α 活性,这对预防早产可能有保护作用。本实验结果显示,早产合并绒毛膜羊膜炎孕妇血清 sTNFRⅡ水平高于无绒毛膜羊膜炎早产组和足月组($P<0.05$),说明宫内感染激活母体单核-巨噬细胞系统,产生更多 sTNFRⅡ。

本研究对与 TNF- α 结合密切的受体 TNFRⅡ 基因 196 位点多态性与 TNFRⅡ 的表达水平进行研究,显示在本样本量下 TNFRⅡ 基因第 6 外显子 196 位点的突变未能引起早产患者 TNFRⅡ 转录、翻译水平的显著改变,但该位点的突变却可通过引起早产合并绒毛膜羊膜炎,使其孕妇 TNFRⅡ 转录、翻译水平的改变,孕妇血清 sTNFRⅡ、胎盘组织 TNFRⅡ mRNA 表达水平显著增高,提示在本样本量下 TNFRⅡ 基因 196 位点多态性特异性的决定早产绒毛膜羊膜炎的易感性。

虽然人体生理学与病理生理学的发病机制非常

复杂,但研究表明^[2]早产,尤其是感染性早产是涉及多个器官系统的生物通路、截然不同的遗传学个体和一个不断变化的环境因素相互作用的结果,继而出现相应的临床表型。目前已有细胞因子基因与早产相关性的研究回顾总结提出通过在一定人群中筛选检测突变细胞因子基因可望在常规产前实验室进行,待评估后可用于早产的筛查和治疗。

本研究样本量有限,研究结果仅提示中国成都妇女细胞因子基因多态性可能是感染性早产的危险因素,但是否是一个强大的早产独立危险因素,还是结合细胞因子、细胞因子受体、早产危险因素和早产胎儿的基因型等的交互影响而在早产的发生发展中发挥作用则需要将来进一步的研究。

因此,我们期望提出通过全基因组扫描来候选早产易感的基因或基因群并尽可能探索早产的生物途径。据本实验研究结果我们进一步提出一些临床研究设想,包括用非侵入性手段通过临床监测母血清 sTNFRⅡ的变化,结合 TNF- α 来早期诊断早产、预测感染性早产并通过人体外试验和体内试验考虑给予重组的 sTNFR 以中和 TNF- α 的炎性作用,从而达到治疗感染性早产或/和减少感染性早产并发症改善预后的作用,为早产预测、诊断和治疗提供线索。

参 考 文 献

- 1 Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, *et al.* Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*, 2008;371(9606):75-84.
- 2 Himes KP, Simhan HN. Genetic susceptibility to infection-mediated preterm birth. *Infect Dis Clin N Am*, 2008;22(4):741-753.
- 3 蒲杰,曾蔚越. 肿瘤坏死因子 α 受体Ⅱ196 基因多态性与成都地区汉族早产的相关性研究. *四川大学学报(医学版)*, 2010;41(1):125-127.
- 4 Sato TA, Keelan JA, Mitchell MD. Critical paracrine interactions between TNF-alpha and IL-10 regulate lipopolysaccharide-stimulated human chorionic decidua cytokine and prostaglandin E2 production. *J Immunol*, 2003;170(1):158-166.
- 5 Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, *et al.* Murine stress triggered abortion is mediated by increase of CD8⁺ TNF-alpha decidual cell via substance P. *Am J Reprod Immunol*, 2002;45(5):303-309.
- 6 Jones NM, Holzman C, Friderici H, *et al.* Inflammation-related gene polymorphisms and preterm delivery subtype in the Pregnancy Outcomes and Community Health Study. *J Reprod Immunol*, 2010;87(1-2):82-89.
- 7 Menon R, Merialdi M, Betrán AP, *et al.* Analysis of association between maternal tumor necrosis factor- α promoter polymorphism(-308), tumor necrosis factor concentration, and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*, 2006;195(5):1240-1248.
- 8 Menon R, Velez DR, Morgan N, *et al.* Genetic regulation of amniotic fluid TNF-alpha and soluble TNF receptor concentrations affected by race and preterm birth. *Hum Genet*, 2008;124(3):243-253.

(2012-04-11 收稿, 2012-08-13 修回)

编辑 吕熙