

·临床研究·

早发型与晚发型重度子痫前期患者胎盘绒毛组织代谢足迹差异的研究

刘大艳¹, 陈士岭¹, 王晨虹², 罗雪梅¹, 黄芳芳²¹南方医科大学南方医院生殖医学中心, 广东 广州 510515; ²南方医科大学附属深圳市妇幼保健院, 广东 深圳 518028

摘要:目的 探讨6%氧浓度下体外培养早发型及晚发型重度子痫前期患者胎盘绒毛组织培养液中代谢足迹的差异。方法 选择早发型重度子痫前期组(13例)及晚发型重度子痫前期组(14例)的胎盘, 胎盘母体面取绒毛组织, 在6%氧浓度下培养96 h, 采用高效液相质谱色谱仪检测培养液中代谢产物并使用标准品建立色氨酸及犬尿氨酸的色谱图库, 观察两组绒毛组织代谢足迹及培养液中代谢物色氨酸及犬尿氨酸浓度的差异。结果 6%氧浓度下培养的早发型及晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织代谢足迹比较, 发现36种代谢物有显著性差异($P<0.05$); 与晚发型重度子痫前期组相比, 早发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织培养液中犬尿氨酸的浓度显著升高($P<0.05$)。结论 早发型与晚发型重度子痫前期的发病机制可能不同, 代谢组学技术对其中的代谢产物进行定量分析, 为预测重度子痫前期的发病时机提供一个新的途径。

关键词:子痫前期; 胎盘; 代谢足迹; 犬尿氨酸

中图分类号: R714.56 文献标志码: A 文章编号: 1673-4254(2011)09-1547-04

Metabolic footprint in conditioned culture medium of placental explants: a comparison between early-onset and late-onset severe preeclampsia

LIU Da-yan¹, CHEN Shi-ling¹, WANG Chen-hong², LUO Xue-mei¹, HUANG Fang-fang²¹Center for Reproductive Medicine, Nanfang hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Shenzhen Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Southern Medical University, Shenzhen 518028, China

Abstract: Objective To explore the differences of metabolic footprint in the conditioned culture medium of placental explants between early-onset and late-onset severe preeclampsia. **Methods** In 13 cases of early-onset severe preeclampsia and 14 cases of late-onset severe preeclampsia, the placentas were sampled at the surface of the maternal placenta. High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) was used to determine the differences in the metabolites in the conditioned culture medium of the placental villous explants cultured in 6% atmospheric O₂ for 96 h. Standard samples were used to establish the tryptophan and kynurenine chromatography library by HPLC-MS to analyze the concentration of tryptophan and kynurenine in the conditioned culture medium. **Results** Thirty-six metabolites showed statistically significant differences between early-onset and late-onset severe preeclampsia ($P<0.05$). The concentration of kynurenine was significantly higher in early-onset severe preeclampsia than in late-onset severe preeclampsia ($P<0.05$). **Conclusion** Early-onset and late-onset severe preeclampsia may have different pathogeneses. By detecting the concentration of metabolites, metabolomic strategies provide a new means for predicting the onset time of severe preeclampsia.

Key words: preeclampsia; placenta; metabolic footprint; kynurenine

子痫前期(preeclampsia, PE)是妊娠期高血压疾病的一种类型, 发生率高达8%, 常伴有严重的母婴并发症, 子痫前期分为轻度和重度, 其中重度子痫前期严重威胁母儿健康, 使孕产妇和围生儿的死亡率明显升高^[1]。我国大多数学者将起病于34周前的重度子痫前期称为早发型, 在此后发病者称为晚发型重度子痫前

期。早发型重度子痫前期占重度子痫前期发病的20.4%, 发病早, 预后差, 是引起母体和胎儿死亡的重要原因^[2]。目前认为早发型与晚发型重度子痫前期可能存在不同的病因和发病机制^[3]。代谢组学是继基因组学、蛋白质组学、转录组学后出现的新兴组学, 它所研究的代谢物与机体的生理、病理、发育状态有关^[4]。代谢足迹技术是在分析系统中以培养液为介质, 检测由细胞和组织分泌的代谢产物或从环境中吸收代谢物的定性和半定量的分析方法^[5]。本研究旨在通过代谢组学技术检测早发型及晚发型重度子痫前期的代谢足迹和代谢产物浓度的差异, 了解两者发病机制的不同, 并评估代

收稿日期: 2011-05-13

基金项目: 深圳市科技计划项目(201003113)

作者简介: 刘大艳, 博士, E-mail: pinguolv@126.com

通讯作者: 陈士岭, 教授, 主任医师, 博士生导师, E-mail: chensl_92@163.com

谢组学技术在研究疾病方面的价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择2010年10月~2011年1月在南方医科大学附属深圳市妇幼保健院住院并分娩的孕妇,早发型重度子痫前期组13例,晚发型重度子痫前期组14例。重度子痫前期组患者均符合乐杰主编的第7版《妇产科学》诊断标准^[6]。

1.2 试剂与设备

1.2.1 主要试剂 AmnioMAX™-II 培养液购自美国 Gibco; 甲醇(色谱纯)购自美国 Tedia; 嵌套式培养板及培养皿购自美国 Corning; 色氨酸标准品购自中国药品生物制品检定所; 犬尿氨酸标准品购自美国 Sigma。

1.2.2 主要设备 3200QTRAP-LC/MS/MS system 为美国 AB SCIEX 产品; Symmetry WAT 色谱柱为美国 Waters 产品; SMZ800 体视显微镜为日本尼康产品; Mini Galaxy 40R 三气培养箱为德国 Eppendorf 产品; Cascada™ LS-water 超纯水系统为美国 PALL 产品。

1.3 研究方法

1.3.1 胎盘绒毛组织的培养 孕妇结束妊娠 20 min 内,从胎盘母体面的滋养层上取成簇的绒毛组织,在体视显微镜下,挑选湿重为 10~15 mg 的绒毛组织,放入嵌套式的培养皿中,加入 2 ml 培养液,放入 37 °C 6% 氧浓度的三气培养箱中培养,培养 48 h 后,将新鲜的培养液放入培养箱中进行氧平衡后,更换培养液,继续培养 48 h,吸取培养液入离心管中,使用冷冻离心机在 4 °C 条件下,1500 r/min 离心 15 min,取其上清液,并立刻在 -80 °C 条件下冻存。

1.3.2 标准品色谱图库的建立 取色氨酸及犬尿氨酸标准品,用色谱纯甲醇分别配制成 5 μg/ml 标准溶液,根据其相对分子质量确定实验条件,用 HPLC-MS 检测,再将两种标准溶液混合后取 100 μl 检测,建立色谱图库,混合后标准溶液中标准品浓度均为 1.25 μg/ml。

1.3.3 培养液样品的预处理 实验前 2 h 取出培养液样品,室温下解冻摇匀,吸取 100 μl 培养液样品于离心管中,加入 300 μl 甲醇沉淀蛋白,涡旋混匀 1 min,使用冷冻高速离心机,在 4 °C 的条件下,12000 r/min 离心 15 min,吸取上清液经水系针头过滤器过滤。取过滤后样品 120 μl 置于 96 孔板,待用 HPLC-MS 分析。

1.3.4 设置 HPLC-MS 分析条件 (1)液相色谱条件:色谱柱为 BEH C18 柱(2.1×100 mm, 3.5 μm),流动相 A 为 0.1% 甲酸水,流动相 B 为 0.1% 甲酸甲醇,流速 0.2 ml/min,起始梯度为 20% 甲醇并维持 10 s,在 6 min 内甲醇线性增加至 95% 并维持 4 min,甲醇含量降回 20% 后,平衡色谱柱 5 min。进样量为 10 μl,柱温 40 °C,自动进样器温度维持在 4 °C。(2)质谱条件:正离子模式;电喷雾 5500 V;去簇电压 30 V;离子源温度 550 °C;雾化气 55 psi。(3)工作模式:采用 Analyst 软件提供的相关信息扫描模式(IDA)和增强全扫描(EMS)对样品进行全扫描,质量数采集范围(m/z)50~500。

1.4 统计学方法

原始的色谱质谱数据文件,导入 HPLC-MS 仪器中的 MarkerView™ 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)及 *t* 检验。将 Analyst 软件中提取的数据导入 Excel 文档,根据计算公式:样品浓度(μg/ml)=样品峰面积×标准品浓度/标准品峰面积,计算出每个样品中代谢物色氨酸及犬尿氨酸的浓度,样品中代谢物色氨酸及犬尿氨酸的浓度及孕妇临床资料的比较应用 SPSS13.0 统计学软件分析,采用 *t* 检验及 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义,

2 结果

2.1 早发型重度子痫前期组与晚发型重度子痫前期组的临床资料

两组孕妇的年龄和初产妇比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);早发型重度子痫前期组的分娩孕龄及新生儿出生体质量显著小于晚发型重度子痫前期组($P < 0.001$,表1)。

2.2 早发型重度子痫前期组与晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织代谢足迹

HPLC-MS 分析得到两组的色谱质谱数据经过 MarkerView™ 软件程序的数据提取和前处理后,在 MarkerView™ 软件中进行 PCA 分析及 *t* 检验,PCA 分析发现在 PC1 得分图上以 Y 轴为分界,两组样本基本分离,仅有一个样本重叠,表明 6% 氧浓度下培养的早发型重度子痫前期组与晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织代谢足迹存在明显差异(图1)。*t* 检验结果显示,6% 氧浓度下培养的早发型重度子痫前期组与晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织代谢足迹中 36 种代谢物差异

表1 两组患者临床资料比较

Tab.1 Clinical data of patients with early-onset and late-onset severe preeclampsia

分组	<i>n</i>	年龄(岁)	初产妇(%)	分娩孕龄(d)	出生体质量(g)
早发型重度子痫前期组	13	30.77±4.23	10(77.8)	227.54±10.11	1658.46±445.10
晚发型重度子痫前期组	14	30.36±4.34	11(78.6)	265.00±9.03	3116.43±540.52
<i>P</i>		0.805	0.638	<0.001	<0.001

有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 色氨酸及犬尿氨酸标准品色谱图数据

应用高效液相色谱质谱标准品法,建立的色氨酸及

犬尿氨酸标准品色谱图库的相关数据:色氨酸浓度 $1.25 \mu\text{g/ml}$,峰面积 2.78×10^6 。犬尿氨酸 $1.25 \mu\text{g/ml}$,峰面积 1.59×10^6 。

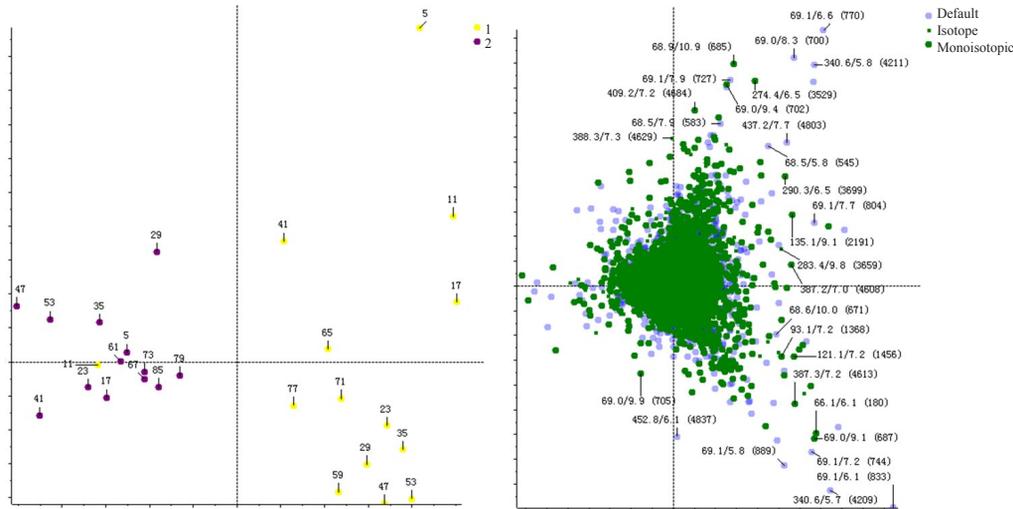


图1 早发型重度子痫前期组与晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织代谢足迹PCA分析图

●: 1代表晚发型重度子痫前期组的样本; ●: 1代表早发型重度子痫前期组的样本

Fig.1 PCA score plot of the metabolic footprint of early-onset and late-onset severe preeclampsia.

2.4 早发型与晚发型重度子痫前期组培养液中代谢物色氨酸及犬尿氨酸的浓度

两组胎盘绒毛组织培养液中代谢物色氨酸的浓度差异无统计学意义($P > 0.05$);与晚发型重度子痫前期组相比,早发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织培养液中代谢物犬尿氨酸的浓度升高有显著性意义($P < 0.05$,表2)。

表2 早发型与晚发型重度子痫前期组培养液中色氨酸及犬尿氨酸浓度的比较

Tab.2 Concentration of tryptophan and kynurenine in the conditioned culture medium of placental explants in early-onset and late-onset severe preeclampsia (Mean±SD)

分组	n	色氨酸($\mu\text{g/ml}$)	犬尿氨酸($\mu\text{g/ml}$)
早发型重度子痫前期组	13	0.224±0.069	0.166±0.047
晚发型重度子痫前期组	14	0.223±0.110	0.121±0.030
P		0.971	0.007

3 讨论

代谢组学是通过测量生物体受病理生理刺激和基因修饰所产生的与时间相关的多元代谢产物,并跟踪其代谢路径来研究疾病的一种方法^[4,7]。代谢足迹技术是研究代谢组学的分析方法之一,随着代谢组学技术在临床疾病研究应用的推广,近十几年来,代谢组学已经应用在妊娠各种生理病理状态研究。本研究采用高效液相色谱质谱仪检测早发型及晚发型重度子痫前期胎盘绒毛组织培养液中代谢足迹和代谢产物浓度的差异,了

解两者发病机制的不同,并评估代谢组学技术在研究其发病机制方面的可行性。

本研究分析两组患者的临床资料,发现早发型重度子痫前期组的分娩孕龄较小,新生儿的出生体质量(1658.46 ± 445.10) g,而晚发型重度子痫前期的分娩孕龄达到或接近预产期,新生儿的出生体质量(3116.43 ± 540.52) g,两组的妊娠结局差异明显,早发型重度子痫前期母儿预后差,与以往学者的研究结论一致。本实验中6%氧浓度下培养的早发型及晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织代谢足迹中有36种代谢物差异有显著性,推测两组的胎盘绒毛组织在培养前可能已经存在不同的病理表型,考虑在疾病的早期阶段已经发生这种代谢的差异。近年来,一些研究者从不同的方面研究了早发型和晚发型重度子痫前期。Kårehed等^[8]比较早发型与晚发型子痫前期血浆及胎盘中的纤维蛋白原及富含精氨酸的糖蛋白,发现早发型子痫前期组表达更高,有可能是引起早发型子痫前期血液高凝状态及血管生成因子失衡的因素之一。Yuen^[9]分析了26个早发型及晚发型子痫前期的胎盘组织中807种基因的甲基化位点,发现早发型子痫前期的特异性基因的低甲基化现象普遍,这种去甲基化的表现可能与早发型子痫前期的胎盘缺氧状态有关。有学者研究表明血管内皮细胞功能受损的标志物在早发型重度子痫前期增加非常明显^[10]。还有学者研究发现早发性重度子痫前期患者胎盘形态学改变更明显,而且胎盘毒性物质释放增加^[11]。

这些学者的研究均证实早发型重度子痫前期的病理改变及胎盘缺氧状态更明显且更严重,我们的研究在代谢组学方面证实了这个结论,而且本研究检测出36种代谢物有显著性差异,如何鉴定这些代谢物的化学结构式,找到其代谢通路,从而探索疾病的发病机制,是我们下一步的研究方向。

利用标准品建立色谱图库的代谢组学技术是寻找未知代谢产物并对其定量研究的一种方法,本研究使用标准品法测量早发型和晚发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织培养液中的代谢物色氨酸及犬尿氨酸浓度,发现与晚发型重度子痫前期组相比,早发型重度子痫前期组胎盘绒毛组织培养液中色氨酸的浓度无差异,而犬尿氨酸的浓度显著升高。犬尿氨酸是色氨酸代谢途径的产物,其浓度随着色氨酸浓度变化而改变,本研究中两组色氨酸浓度无差异,不排除培养液成分里色氨酸含量较高,而绒毛组织代谢对其含量影响较小。近年来的研究表明,母胎界面是导致子痫前期发病的关键部位,母胎免疫耐受平衡失调可能也是重度子痫前期发病的因素之一。吡啶胺-2,3-双加氧酶是肝外组织催化色氨酸沿犬尿氨酸途径分解代谢的第一限速酶,其广泛表达于母胎界面,在诱导母胎免疫耐受中发挥着重要的调节作用。Nishizawa等^[12]报道,给正常妊娠小鼠注射吡啶胺-2,3-双加氧酶抑制剂后,小鼠体内犬尿氨酸降低,出现了类似子痫前期的表现。正常妊娠时孕妇血清犬尿氨酸会明显升高,若胎盘供血不足或胎盘发育迟缓则抑制吡啶胺-2,3-双加氧酶表达,可使血浆中犬尿氨酸含量远远低于正常孕妇^[13]。Nicholls等^[14]对羊胎进行研究发现,胎盘的损害会影响犬尿氨酸的代谢,从而导致羊胎大脑发生缺氧性损害。这些学者的研究表明研究重度子痫前期胎盘组织中色氨酸和犬尿氨酸的代谢可能是其发病的因素之一。但是目前国内尚无早发型与晚发型重度子痫前期色氨酸和犬尿氨酸的代谢差异的相关报道。本研究中早发型重度子痫前期胎盘绒毛组织培养液中犬尿氨酸浓度较高,是否可以通过对犬尿氨酸进行定量测定,作为预测子痫前期发病时机的指标之一,需要我们更换培养条件并扩大样本量进一步研究。

综上所述,本研究结果表明代谢组学在研究疾病的发病机制方面有潜在的价值,并支持早发型与晚发型重度子痫前期有不同发病机制的假说,将来有必要联系基因组学、蛋白质组学、转录组学、代谢组学以及它们的相

互作用对重度子痫前期进行更广泛而系统的研究。

参考文献:

- [1] Belinda J, Shuchita S, Tewabe K, et al. Hypertension in pregnancy [J]. *Card in Review*, 2010, 18(4): 178-89.
- [2] Duley L. The global impact of preeclampsia and eclampsia [J]. *Semin Perinatol*, 2009, 33(3): 130-7.
- [3] Crispi F, Domínguez C, Llurba E, et al. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2006, 195(1): 201-7.
- [4] Nordström A, Lewensohn R. Metabolomics: moving to the clinic [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2010, 5(1): 4-17.
- [5] Kell DB, Brown M, Davey HM, et al. Metabolic footprinting and systems biology: the medium is the message [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(7): 557-65.
- [6] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 94-101.
- [7] Brown M, Dunn WB, Dobson P, et al. Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics [J]. *Analyst*, 2009, 134(7): 1322-32.
- [8] Kårehed K, Wikström AK, Olsson AK, et al. Fibrinogen and histidine-rich glycoprotein in early-onset preeclampsia [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2010, 89(1): 131-9.
- [9] Yuen RK, Peñaherrera MS, von Dadelszen P, et al. DNA methylation profiling of human placentas reveals promoter hypomethylation of multiple genes in early-onset preeclampsia [J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(9): 1006-12.
- [10] Vaisbuch E, Romero R, Mazaki-Tovi S, et al. Retinol binding protein 4-a novel association with early-onset preeclampsia [J]. *J Perinat Med*, 2010, 38(2): 129-39.
- [11] Ma RQ, Sun MN, Yang Z. Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestational stage on fetoplacental outcomes in a mouse model [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(6): 707-12.
- [12] Nishizawa H, Hasegawa K, Suzuki M, et al. Mouse model for allogeneic immune reaction against fetus recapitulates human pre-eclampsia [J]. *Obstet Gynaecol Res*, 2008, 34(1): 1-6.
- [13] Mosnier E, Dourmad JY, Etienne M, et al. Feed intake in the multiparous lactating sow: its relationship with reactivity during gestation and tryptophan status [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(4): 1282-91.
- [14] Nicholls T, Lacey B, Nitsos I, et al. Regional changes in kynurenic acid, quinolinic acid, and glial fibrillary acidic protein concentrations in the fetal sheep brain after experimentally induced placental insufficiency [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 184(2): 203-8.

(编辑:陈望忠)