

AQP1 和 AQP3 在子痫前期患者胎盘和胎膜上的表达及意义

陈利琼 安慧敏 朱雪琼 翁秀琴 池银归 夏 康

摘 要 **目的** 研究 AQP1 和 AQP3 在子痫前期患者胎盘和胎膜上的表达及其与临床资料之间的相关性,探讨其在子痫前期发病中的作用。**方法** 选取 2009 年 3 月~2010 年 3 月笔者医院产科收住的孕妇 60 例,其中子痫前期轻度组 20 例(实验组 1),子痫前期重度组 20 例(实验组 2),正常足月妊娠孕妇 20 例(对照组)。采用免疫组化 SP 法,检测两组胎盘、胎膜组织中 AQP1 和 AQP3 的分布及表达,同时分析其与 24h 尿蛋白定量、羊水量、胎儿出生体重等临床资料之间的相关性。**结果** AQP1、AQP3 在子痫前期组胎盘上的表达较正常妊娠组上调。AQP1、AQP3 在子痫前期组羊膜组织上的表达强度弱于对照组。子痫前期组患者胎盘上的 AQP1、AQP3 表达强度越强,其 24h 尿蛋白定量越高,呈线性相关。子痫前期组胎盘上的 AQP1、AQP3 表达强度与胎儿出生体重不呈线性相关。子痫前期组羊膜上的 AQP1、AQP3 表达强度与羊水量不呈线性相关。**结论** 子痫前期组胎盘上 AQP1、AQP3 的表达较正常妊娠组明显上调,且与 24h 尿蛋白定量呈线性相关,提示胎盘组织中 AQP1、AQP3 表达与子痫前期疾病发生发展及病情轻重程度有关。

关键词 子痫前期 水通道蛋白 1 水通道蛋白 3 24h 尿蛋白定量

Expression and Role of Aquaporin 1 and Aquaporin 3 in Placenta and Fetal Membranes with Preeclampsia. Chen Liqiong, An Huimin, Zhu Xueqiong, Weng Xiuqin, Chi Yingui, Xia Kang. The Third Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To study the expression of aquaporin 1 (AQP1) and aquaporin 3 (AQP3) in placenta and fetal membranes in pregnant women with preeclampsia, and observe their clinical data, in order to explore the pathogenesis of preeclampsia. **Methods** From march 2009 to march 2010, 60 patients who had elective cesarean deliveries within Ruian people's hospital were studied, of whom 20 cases of mild preeclampsia and 20 cases of severe preeclampsia were studied for experimental group and 20 women with normal term pregnancy for control group. Immunohistochemistry was used to determine expression and localization of aquaporin 1 and aquaporin 3 in placenta and fetal membranes. Meanwhile, we analyzed their relevance with 24 hours urine protein, amniotic fluid and birth weight. **Results** In comparison to the normal pregnancies, there was increasing expression of AQP1 and AQP3 in placenta with preeclampsia. The expression of AQP1 and AQP3 in amnion with preeclampsia was down-regulated compared with that in normal pregnancies. The more expressions of AQP1 and AQP3 in placenta with preeclampsia, the more twenty-four hours urine protein sets up. They was linear dependence. There was no linear dependence between birth weight and the expressions of AQP1 and AQP3 in placenta. There was no linear dependence between amniotic fluid and the expression of AQP1 and AQP3 in amnion. **Conclusion** The expression of AQP1 and AQP3 in placenta with preeclampsia is up-regulated and has linear dependence with twenty-four hours urine protein. This may prompt the relationship between the expressions of AQP1 and AQP3 in placenta and development, progress and degree of preeclampsia.

Key words Preeclampsia; Aquaporin 1; Aquaporin 3; Twenty-four hours urine protein

子痫前期是妊娠期特有的疾病,据统计,在我国其发病率为 9.4%~10.4%,而国外报道为 7%~12%^[1]。水通道蛋白(AQPS)是近年来新分离出的一组跨膜转运水的通道蛋白质,主要介导自由水被动跨生物膜转运,对保持细胞内外环境的稳态平衡起重

要作用,也参与完成一些机体的生理功能,且与水平衡紊乱所造成的一些疾病密切相关^[2]。目前国内外诸多研究提示 AQP 参与母胎间的液体交换,与羊膜内吸收及羊水量的调节有关^[3~5]。本研究通过免疫组化方法检测子痫前期患者胎盘及胎膜中 AQP1、AQP3 的表达,同时观察患者 24h 尿蛋白定量及胎儿出生体重、羊水量等临床资料,探讨各指标与临床各项资料之间的相关性,继而进一步探讨子痫前期的发病机制,有望为治疗妊娠期高血压疾病提供一种新的思路,最终达到降低围生儿率和病死率。

基金项目:瑞安市科技局基金资助项目(201002049)

作者单位:温州医学院附属第三医院/浙江省瑞安市人民医院妇产科(陈利琼、翁秀琴、池银归);病理科(安慧敏、夏康);325027 温州医学院附属第二医院妇产科(朱雪琼)

通讯作者:朱雪琼,电子信箱:zjwzzxq@163.com

资料与方法

1. 一般资料:选取 2009 年 3 月~2010 年 3 月浙江省瑞安市人民医院产科收住的孕妇 60 例,其中子痫前期轻度组 20 例,子痫前期重度组 20 例,为实验组,正常足月妊娠孕妇 20 例,为对照组。孕妇年龄 20~34 岁,所有病例均为选择性剖宫产,系单胎、除外原发性高血压、糖尿病、心脏病、肾病、前置胎盘、胎盘早剥等并发症及合并症。子痫前期诊断标准按照第 7 版《妇产科学》中妊娠期高血压疾病的诊断标准。其中轻度子痫前期指妊娠 20 周以后出现 BP $\geq$ 140/90mmHg;尿蛋白 $\geq$ 0.3g/24h 或随机尿蛋白(+);可伴有上腹部不适、头痛等症状。重度子痫前期指血压 $\geq$ 160/110mmHg;尿蛋白 $\geq$ 2.0g/24h 或随机尿蛋白 $\geq$ (++);血清肌酐 $>$ 106 μ mol/L,血小板 $<$ 100 $\times 10^9$ /L;血 LDH 升高;血清 ALT 或 AST 升高;持续性头痛或其他脑神经或视觉障碍;持续性上腹不适。

2. 羊水量的测定:剖宫产术中先将羊膜破一小口,负压吸引收集羊水于玻璃瓶中,取出胎儿后,再吸尽羊水,测量收集的全部羊水量。取其中的 3ml 3000r/min 离心 30min,全自动细胞分析仪测量羊水中洗入的血细胞比容。根据术前孕妇的血细胞比容,按血细胞比容法计算洗入的血液量。收集的全部羊水量减去洗入的血液量即为实际羊水量^[5]。

3. 标本收集:3 组孕妇均系剖宫产术结束分娩,术中待胎盘娩出后,分别取胎盘组织母体面中央(避开钙化、肌化灶),大小约 2cm $\times$ 2cm $\times$ 2cm,胎膜组织 2cm $\times$ 2cm,经产妇知情同意,生理盐水漂洗后,置 10% 中性甲醛溶液中固定 24~48h,常规石蜡包埋,连续切片,制成 4 μ m 厚的切片备用。

4. 免疫组化方法:采用 SP 法进行免疫组化染色。一抗为浓缩型兔抗人 AQP1 和 AQP3 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),免疫组化试剂盒为即用型 SP-9000(北京中杉生物技术有限公司)。切片脱蜡入水,组织抗原微波修复,先中高火 7min,停 3min,再中高火 7min,停 5min;PBS5min,2 次;3% H₂O₂ 阻断过氧化物酶活性 10min;PBS3min,3 次;正常山羊血清于室温下孵育 10min;兔抗人 AQP1 和 AQP3 多克隆抗体(1:100 稀释),4℃ 过夜, PBS5min,3 次;生物素标记二抗室温孵育 30min, PBS3min,3 次;DAB 显色,显微镜观察,水洗终止;苏木素复染,淡氨水返蓝;树脂封片,光镜下观察。每次实验均设阴性和阳性对照。

5. 染色结果判断:在光镜下观察细胞质和(或)细胞膜出现黄色或棕黄色颗粒为阳性细胞。每张切片光镜下随机观察 10 个高倍视野($\times 400$),每个视野观察 200 个细胞,分别进行阳性细胞数百分比及着色强度评分:阳性百分率评分: $\leq$ 5% 为 0 分,6%~24% 为 1 分,25%~49% 为 2 分,50%~74% 为 3 分, $\geq$ 75% 为 4 分。着色强度评分:无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,浅棕色为 2 分,深棕色为 3 分。将阳性细胞数百分比和着色强度两项评分的乘积进行统计学分析^[6]。

6. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件分析。两组研究对象一般情况,正态分布,方差齐性,比较采用 *t* 检验;免疫组化实验结果:方差不齐,多个样本比较采用 Kruskal-wallis *H*

秩和检验法,两样本比较采用 Mann-whitney *U* 检验和相关分析。本研究采用双尾检验,*P* $<$ 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. AQP1 和 AQP3 在正常妊娠组和子痫前期组胎盘胎膜中的表达及意义:AQP1 主要表达于人羊膜上皮细胞、绒毛膜滋养细胞、胎盘的血管内皮细胞中表达,在人胎盘滋养细胞中无表达。AQP3 主要表达于人羊膜上皮细胞、绒毛膜滋养细胞、胎盘滋养细胞上均有表达,在胎盘的血管内皮细胞中无表达。见表 1、表 2,图 1~图 4。

表 1 AQP1 在正常妊娠组、子痫前期组的胎盘胎膜的表达情况

组别	<i>n</i>	羊膜	绒毛膜	胎盘
正常组	20	5.05 $\pm$ 2.28	4.30 $\pm$ 2.05	5.30 $\pm$ 2.54
轻度组	20	3.65 $\pm$ 2.16	4.05 $\pm$ 2.14	5.60 $\pm$ 2.26
重度组	20	3.00 $\pm$ 1.84*	3.50 $\pm$ 1.93	8.70 $\pm$ 2.76*

与对照组相比,**P* $<$ 0.05

表 2 AQP3 在正常妊娠组、子痫前期组的胎盘胎膜的表达情况

组别	<i>n</i>	羊膜	绒毛膜	胎盘
正常组	20	4.60 $\pm$ 2.66	4.00 $\pm$ 1.86	4.10 $\pm$ 1.83
轻度组	20	3.70 $\pm$ 2.13	3.90 $\pm$ 1.45	4.80 $\pm$ 2.61
重度组	20	2.65 $\pm$ 1.60*	3.05 $\pm$ 1.36	6.79 $\pm$ 3.51*

与对照组相比,**P* $<$ 0.05

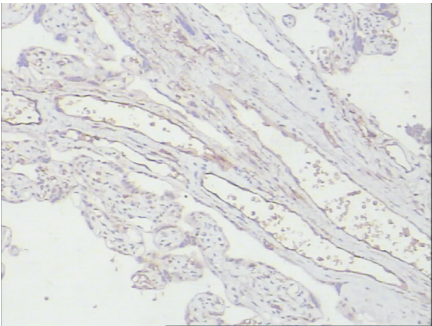


图 1 重度子痫前期胎盘血管内皮细胞 AQP1 的表达($\times 200$)

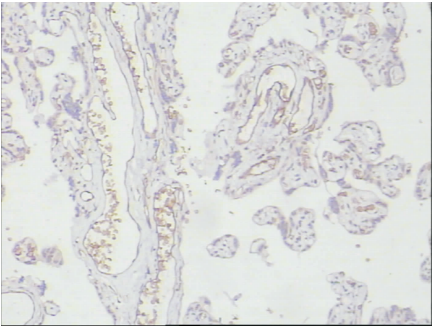


图 2 正常妊娠胎盘血管内皮细胞 AQP1 的表达($\times 200$)

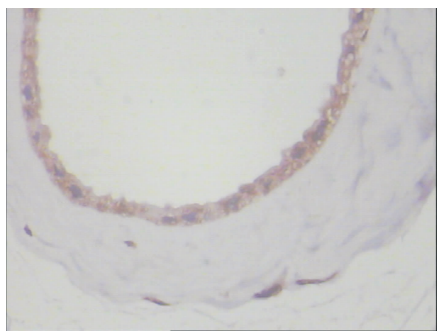


图3 正常妊娠羊膜上皮 AQP3 的表达 (×400)

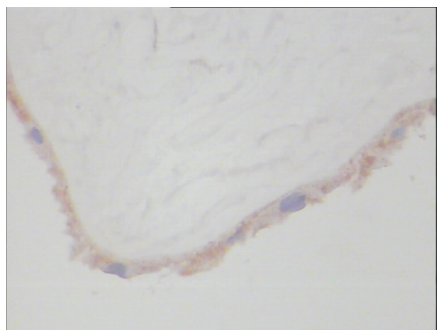


图4 重度子痫前期组羊膜上皮 AQP3 的表达 (×400)

由表1和表2可见,AQP1、AQP3在子痫前期组胎盘上的表达较正常妊娠组上调,其中重度子痫前期胎盘上的AQP1、AQP3表达强于子痫前期轻度组及正常妊娠组($P < 0.05$),子痫前期轻度组强于正常妊娠组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。AQP1、AQP3在子痫前期组羊膜组织上的表达强度弱于对照组,其中子痫前期重度组羊膜组织中AQP1、AQP3的表达强度,弱于正常妊娠组($P < 0.05$),重度子痫前期组的表达强度弱于轻度子痫前期组,但差异无统计学意义($P > 0.05$),轻度子痫前期的表达强度弱于正常妊娠组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。AQP1、AQP3在子痫前期组绒毛膜上的表达强度弱于对照组,但3组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2. AQP1和AQP3蛋白的表达与临床资料的关系:子痫前期患者羊膜上的AQP1和AQP3的表达强度与24h尿蛋白定量不呈线性相关。其中 $r_1 = -0.083$, $P_1 = 0.612$, $r_3 = -0.183$, $P_3 = 0.258$ 。子痫前期重度组患者胎儿出生体重 $2614 \pm 343.09\text{g}$,轻度组胎儿出生体重 $2957 \pm 441.78\text{g}$,子痫前期胎盘上的AQP1、AQP3表达强度与胎儿出生体重不呈线性相关。其中 $r_1 = -0.287$, $P_1 = 0.073$, $r_3 = -0.271$, $P_3 = 0.091$ 。子痫前期羊膜上的AQP1、AQP3表达强度与羊水量不呈线性相关。 $r_1 = 0.192$, $P_1 = 0.235$,

$r_3 = 0.282$, $P_3 = 0.078$ 。而子痫前期患者胎盘上的AQP1和AQP3的表达强度与24h尿蛋白成正相关性,随着24h尿蛋白定量的升高,其AQP1和AQP3的表达强度升高, $r_1 = 0.402$, $P_1 = 0.01$, $r_3 = 0.325$, $P_3 = 0.41$ 。

讨 论

水通道蛋白(AQPS)是水及某些低分子物质跨膜转运的通道,对保持细胞内外环境的稳态平衡起重要作用,广泛分布于机体的组织细胞中,尤其在液体分泌和吸收有关的上皮细胞和内皮细胞含量丰富,参与水的分泌吸收及细胞内外的水平衡。迄今为止,哺乳动物细胞膜上已经发现了13种AQP_s(AQP0~AQP12)^[7]。子痫前期患者胎盘及胎膜组织上是否存在水通道蛋白的表达及意义,目前国内外对此研究不多,只有少量相关的报道^[3,8,9]。Daminano等^[10]对正常妊娠和子痫前期患者的胎盘研究发现,在子痫前期患者胎盘上AQP9表达增加,但国外尚无AQP1和AQP3与子痫前期的相关性研究。国内学者李留霞等^[9,11]分别报道了AQP1和AQP3在妊娠期高血压疾病患者胎盘和胎膜上的表达,认为其与妊娠期高血压疾病病情程度有关。而关于AQP1和AQP3在子痫前期患者胎盘和胎膜上的表达与羊水量、24h尿蛋白定量、胎儿出生体重等相关性的研究尚未见报道。

本研究通过免疫组化方法检测子痫前期患者胎盘及胎膜中AQP1、AQP3的表达,同时观察其与病情严重程度、患者羊水量、24h尿蛋白定量及胎儿出生体重等临床资料的关系,发现AQP1、AQP3在子痫前期患者胎盘上的表达较正常妊娠组上调,其中重度子痫前期组胎盘上的AQP1、AQP3的表达较轻度组升高,子痫前期轻度组强于正常妊娠组,提示可能是胎盘上的AQP1、AQP3表达增加,可能引起胎盘局部水分渗出而水肿,微血管内皮细胞损伤或功能紊乱,同时可能引起细胞凋亡增加,导致胎盘滋养细胞浅着床,而使血管重铸障碍,引起胎盘缺血缺氧,最终导致子痫前期的发生。尿蛋白的程度直接反映了肾小球缺氧,及胎盘缺血程度,尿蛋白越高,提示胎盘缺氧越明显,直接影响胎儿发育。本研究发现AQP1、AQP3与24h尿蛋白定量呈线性相关,可能是水通道蛋白表达越高,病情越重,蛋白渗出越多,导致低蛋白血症更严重,影响胎儿生长发育,导致胎儿出生体重下降。此外本研究发现重度组子痫前期患者胎儿出生体重较轻度组胎儿出生体重低,但两者比较无统计学意义及胎盘上的AQP1、AQP3表达强度与胎儿出生体重

(转第5页)

国高血压防治指南》(简称基层指南)。基层指南简明易懂,操作性强,适用于我国社区和乡村。首先要分期分批培训基层医生,让基层医生掌握高血压的防治知识和技能。主要掌握血压测量技术,高血压诊断评估标准,分级管理方法和规范化治疗的技能。合理使用常用降压药,降压治疗要达标,倡导对高危病人或血压水平 $\geq 160/100\text{mmHg}$ 者,开始即用小剂量两种药联合治疗,使病人长期血压达标,最大限度减少心脑血管病的发生和死亡风险。2011 年发布的 2010 年《中国高血压防治指南》(简称中国指南)适合于二、三级医院,建议和希望各地卫生部门、学术团体、医疗机构、媒体积极宣传推广落实,有社会责任的企业积极参与和支持。国外指南的先进理念可以在专家层面进行研讨,但不建议在基层宣传国外的高血压指南,尤其是不符合中国国情的外国指南。避免使基层医生的无所适从,引起高血压管理的尤其是操作程序的混乱,造成不良影响。

6. 加强对高血压患者的健康教育和自我管理:开展各种形式的高血压患者教育,提高对高血压危害的认识,更新防治知识。同时倡导患者自我管理,改善治疗的主动性和依从性。为完善和加强对高血压患

(接第 96 页)

不呈线性相关,可能因为胎儿出生体重影响因素较多,包括与孕妇营养、年龄、经济状况及健康状态等均有关。故根据 AQP1、AQP3 在胎盘上表达及其与 24h 尿蛋白定量呈线性相关性,提示 AQP1、AQP3 在胎盘中的表达量与子痫前期病情轻重程度相关。

本研究提示子痫前期重度组羊膜组织中 AQP1、AQP3 的表达强度,弱于正常妊娠组,差异无统计学意义。其中重度子痫前期组的表达强度弱于轻度子痫前期组,轻度子痫前期的表达强度弱于正常妊娠组,但差异无统计学意义。羊膜的 AQP1、AQP3 的表达与羊水量不呈线性相关,但子痫前期重度组羊水量少于轻度组,可能提示随着子痫前期病情加重,胎盘缺血缺氧程度加重,引起胎盘老化,导致羊水量减少,而机体为了维持羊水平衡而下调 AQP1、AQP3 的表达,所以可以说 AQP1、AQP3 在子痫前期羊膜的表达下降,可能是机体对羊水量减少而发生的一种代偿反应。

参考文献

- 1 Ronsmans C, campbell O. Quantifying the fall in mortality associated with interventions related to hypertensive diseases of pregnancy[J]. BMC Public Health, 2011, Suppl 3: S8
- 2 Verkman As. Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and

者的教育, 2012 年, 我们正在组织制定《中国高血压患者教育指南》, 预期 2013 年发布。

高血压防治是一项社区系统工程, 政府主导、专家指导、基层实施, 是做好高血压防治工作的基本模式。有条件的地区应进行高血压社区网络化管理。相信在全社会共同努力下, 高血压防治工作会取得更大进步。

参考文献

- 1 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病杂志, 2011, 39(7): 579-616
- 2 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告 2006[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2008: 1-2
- 3 李立明. 中国居民营养与健康状况调查报告之四. 2002 高血压[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 37-48
- 4 卫生部心血管病防治研究中心. 中国心血管病报告 2010[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2011: 32-33
- 5 王增武, 王馨, 张林峰, 等. 社区高血压控制: 血压管理效果的评价[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(1): 1-4
- 6 卫生部疾病控制局, 国家心血管病中心, 高血压联盟(中国). 2009 年基层版中国高血压防治指南[J]. 北京: 人民卫生出版社, 2010
- 7 王文, 张维忠, 孙宁玲, 等. 中国血压测量指南[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19(12): 1101-1115
- 8 王文, 王增武, 陈伟伟. 我国高血压防治的关键在基层[J]. 中华高血压杂志, 2010, 18(6): 501-503 (收稿: 2012-03-06)

potential clinical significance[J]. Expert Rev MolMed, 2008, 10: e13

- 3 Bell MH, Wang S, Yang B, *et al.* Placental and membrane aquaporin water channels correlation with amniotic fluid volume and composition [J]. Placenta, 2007, 28: 421-428
- 4 Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, *et al.* Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(3): 884-887
- 5 朱雪琼, 蒋珊珊, 王玉环, 等. 水通道蛋白 1 和水通道蛋白 3 在羊水过少孕妇胎盘和胎膜的表达及其意义[J]. 中华围产医学杂志, 2009, 12(5): 333-337
- 6 Hao XP, Pretlow TG, Rao Js, *et al.* B-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci [J]. Res, 2002, 61(2): 8085-8088
- 7 Damiano AE. Review: water channel proteins in the human placenta and fetal membranes [J]. Placenta, 2011, 32(Suppl 2): S207-S211
- 8 龚洵, 王小帅, 刘海意, 等. 水通道蛋白 9mRNA 在子痫前期患者胎盘中的表达及意义[J]. 中国妇幼保健, 2008, 23(1): 4902-4903
- 9 李留霞, 刘月玲, 文建国, 等. 水通道蛋白 1 在妊娠高血压疾病患者胎盘、胎膜及胎膜组织中的表达及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(7): 497-501
- 10 Daninano AE, Zbarra EC. Functional and molecular expression of AQP9 channel and UTA transporter in normal and preeclamptic human placentas [J]. Placenta, 2006, 27(11-12): 1073
- 11 刘月玲, 李留霞, 文建国, 等. 妊娠期高血压疾病患者胎盘、胎膜及腹膜组织中水通道蛋白 3 的表达 [J]. 郑州大学学报, 2009, 44(6): 1268-1270 (收稿: 2011-07-13) (修回: 2011-08-23)