

• 论 著 •

稽留流产与子宫蜕膜组织中 PSG1 mRNA、BMP-2、
Beclin-1 mRNA 的相关性分析*

龚净娴¹, 刘 敏¹, 杨 芳¹, 田春艳², 李 蓉³

绵阳市中心医院:1. 产科;2. 妇科, 四川绵阳 621000;3. 绵阳市第三人民医院妇产科, 四川绵阳 621000

摘 要:目的 探究稽留流产与子宫蜕膜组织中重组人妊娠特异性 $\beta 1$ 糖蛋白(PSG1)mRNA、重组人骨形态发生蛋白-2(BMP-2)、Beclin-1 mRNA 水平的相关性。方法 选取 2018 年 6 月至 2019 年 6 月绵阳市中心医院收治的稽留流产患者 50 例, 作为观察组; 另外, 选取同期未发生稽留流产的人工流产者 50 例, 作为对照组。观察并记录两组人群的一般资料[包括性别、年龄、体质量指数(BMI)、卵泡刺激素(FSH)/黄体生成素(LH)、人工流产次数、自然流产次数、不孕时间], 检测子宫蜕膜组织中 PSG1 mRNA、BMP-2 及 Beclin-1 mRNA 水平。对稽留流产的相关因素作单因素分析及多因素 Logistic 回归分析, 分析各因素与稽留流产的相关性。结果 观察组 PSG1 mRNA、BMP-2 水平低于对照组($P < 0.05$), 观察组 Beclin-1 mRNA 水平高于对照组($P < 0.05$); 单因素分析与多因素 Logistic 回归分析均显示, 人工流产次数、自然流产次数、不孕时间、PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与稽留流产具有一定的相关性($P < 0.05$)。结论 人工流产次数、自然流产次数、不孕时间、PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与稽留流产具有一定的相关性, 可为稽留流产的诊断提供参考。

关键词:稽留流产; 子宫蜕膜组织; 骨形态发生蛋白; 妊娠特异性糖蛋白; Beclin-1

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.010 **中图法分类号:**R714.2;R446.8

文章编号:1673-4130(2021)04-0430-04 **文献标志码:**A

The relationship between missed abortion and PSG1 mRNA, BMP-2,
Beclin-1 mRNA in decidual tissue of uterus*

GONG Jingxian¹, LIU Min¹, YANG Fang¹, TIAN Chunyan², LI Rong³

1. Department of Obstetrics; 2. Department of Gynecology, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, Sichuan, China; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, the Third People's Hospital of Mianyang City, Mianyang 621000, Sichuan, China

Abstract:Objective To explore the relationship between missed abortion and PSG1 mRNA, BMP-2, Beclin-1 mRNA in decidual tissue of uterus. **Methods** A total of 50 cases of missed abortion from June 2018 to June 2019 treated in Mianyang Central Hospital were enrolled as the observation group, meanwhile 50 cases of induced abortion without missed abortion were enrolled as the control group. The general data including sex, age, BMI, FSH/LH, number of induced abortions, number of spontaneous abortions, time of infertility, PSG1 mRNA, BMP-2 and Beclin-1 mRNA levels in decidual tissue of uterus were observed and recorded. Single-factor analysis and Logistic regression analysis were used to analyze the correlation between the factors and missed abortion. **Results** The levels of PSG1 mRNA and BMP-2 in the observation group were significantly lower than those in the control group($P < 0.05$), and the level of Beclin-1 mRNA in the observation group was significantly higher than that in the control group($P < 0.05$); the single-factor analysis and Logistic regression analysis both showed that, the number of induced abortions and the number of spontaneous abortions, the levels of PSG1 mRNA, BMP-2 and Beclin-1 mRNA were correlated with missed abortion($P < 0.05$). **Conclusion** The number of induced abortions and the number of spontaneous abortions, the level of PSG1 mRNA, BMP-2 and Beclin-1 mRNA are correlated with missed abortion, which can provide reference for the diagnosis of missed abortion.

* 基金项目:四川省卫生健康委员会科研课题(18PJ175)。

作者简介:龚净娴,女,护师,主要从事妇产科学的相关研究。

本文引用格式:龚净娴,刘敏,杨芳,等.稽留流产与子宫蜕膜组织中 PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 的相关性分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(4):430-433.

Key words: missed abortion; decidua of uterus; bone morphogenetic proteins; pregnancy specific glycoprotein; Beclin-1

稽留流产又称为过期流产或死胎不下^[1],胚胎停止发育后 2 个月尚未自然排出者为稽留流产。阴道流血及腹痛是稽留流产的常见症状,同时患者可伴有先兆流产症状。先兆流产若不及时处理,不仅影响患者健康,而且可能会影响患者再次生育^[2]。为此,早期诊断并采取针对性措施显得尤为重要。目前,关于稽留流产的病因并无定论,可能与生活环境、内分泌水平、精神压力、基因等因素有关^[3]。随着分子生物学技术的不断发展,各种分子生物学指标的检测为临床疾病的诊断提供了新的方法。重组人妊娠特异性 $\beta 1$ 糖蛋白 (PSG1) mRNA、重组人骨形态发生蛋白-2 (BMP-2)、Beclin-1 mRNA 是近年来研究较多的稽留流产相关指标。有研究报道,稽留流产患者子宫蜕膜组织中 PSG1 mRNA、BMP-2 水平显著降低,而 Beclin-1 mRNA 水平显著升高^[4]。为此,笔者对比分析了稽留流产患者及健康人工流产者的一般资料及子宫蜕膜组织中 PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平,旨在探讨稽留流产的相关因素,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6 月至 2019 年 6 月绵阳市中心医院收治的稽留流产患者 50 例作为观察组,均符合第八版妇产科学稽留流产的诊断标准^[5]。另外,选取同期因意外怀孕于绵阳市中心医院行人工流产的健康女性 50 例作为对照组。排除标准:合并神经系统疾病者;有严重传染性疾病者;长期服用免疫抑制剂者;合并盆腔肿瘤者;有急性上呼吸道感染者;物质滥用者。本研究经该院伦理委员会批准,患者及家属均知情并同意本研究。

1.2 方法

1.2.1 资料与数据的记录和比较 观察并记录两组患者一般资料[包括性别、年龄、体质量指数 (BMI)、卵泡刺激素 (FSH)/黄体生成素 (LH)、人工流产次数、自然流产次数、不孕时间)、PSG1 mRNA、BMP-2 及 Beclin-1 mRNA 水平]。mRNA 水平以相对表达量表示,BMP-2 水平以表达分数表示,比较两组间 PSG1 mRNA、BMP-2 及 Beclin-1 mRNA 水平差异。

1.2.2 mRNA 的检测 两组患者均进行人工流产术,术中取子宫蜕膜组织,经磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 冲洗血迹后,于 -80°C 冰箱中保存待检。取子宫蜕膜组织 20 mg,采用 Magzol 试剂结合过柱法提取总 RNA,检测总 RNA 纯度、浓度及完整性,用 Thermo Scientific RevertAidTM 第一链 cDNA 合成试剂盒,以 2 μg RNA 作为模板进行反转录,得到 cDNA。然后以 cDNA 为模板,以无 RNA 酶的 DEPC 水作阴性对照,待测样品及阴性对照均设 3 个复孔进行检测。采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测蜕膜组织中 PSG1 mRNA、

NA、Beclin-1 mRNA 水平。qPCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。PSG1 上游引物序列为 5'-TGCACACAGCGCATCAAA-3',下游引物序列为 5'-CTCCTCTAGTCCCATCATCTCC-3';Beclin-1 上游引物序列为 5'-AACCAACGTCTTTAATGCAACCTTC-3',下游引物序列为 5'-AGCAGCATTAATCTCATTTCCATTCC-3'; β -actin 上游引物序列为 5'-GCCGCCAGCTCACCAT-3',下游引物序列为 5'-AATCCTTCTGACCCATGCCC-3'。反应体系为 10 μL 。应用 Bio-Rad qPCR 仪进行 PSG1 mRNA、Beclin-1 mRNA 的检测。PSG1 mRNA qPCR 检测的反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,共 40 个循环;Beclin-1 mRNA qPCR 检测的反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环。记录扩增曲线和熔解曲线,根据扩增曲线,得到每个样本的循环阈值 (Ct) 值,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 PSG1 mRNA、Beclin-1 mRNA 的相对表达量,重复 3 次检测,取平均值。

1.2.3 BMP-2 的免疫组化检测 (1)取蜕膜经生理盐水漂洗后置于 10% 甲醛溶液中固定 6~12 h 后水洗 10~20 min,经梯度酒精脱水后浸蜡、石蜡包埋,5 μm 切片;(2)pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液中加热至 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 修复抗原,冷却后至 3% H_2O_2 溶液中浸泡 20 min,平衡盐缓冲液 (TBS) 洗 2 次;(3)加一抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,TBS 缓冲液洗 2 次;(4)加 HRP 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min,TBS 缓冲液洗 2 次;(5)DAB 显色 15 min,自来水冲洗、苏木素复染、冲洗;(6)脱水干燥、透明、封片。BMP-2 抗体均为兔多克隆抗体(试剂购自博奥森生物有限公司)。BMP-2 表达分数判定标准:应用计算机辅助显微图像分析系统,每次随机抽取 5 个高倍镜视野进行观察;以细胞内出现黄色颗粒为阳性细胞,无着色为阴性细胞;细胞染色强度从棕黄色、橘黄色、淡黄色染色至无着色依次减弱,分别计 3、2、1、0 分,同时按阳性细胞百分率计分:>75% 计 4 分,>50%~75% 计 3 分,>25%~50% 计 2 分,5%~25% 计 1 分,<5% 计 0 分,染色分数和阳性细胞百分率计分相乘得到表达分数。

1.5 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料采用频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;对稽留流产的影响因素做单因素分析,然后对相关因素进一步做 Logistic 回归分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间 PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平比较 观察组 PSG1 mRNA、BMP-2 水平低于对

照组($P<0.05$), Beclin-1 mRNA 水平高于对照组($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组间 PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	PSG1 mRNA	BMP-2(分)	Beclin-1 mRNA
观察组	50	2.23±0.72	4.32±1.72	2.21±0.78
对照组	50	9.33±0.76	7.72±1.98	1.02±0.31
<i>t</i>		11.65	13.32	12.29
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

2.2 稽留流产单因素分析 年龄、BMI、FSH/LH、人工流产次数、自然流产次数、不孕时间、PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与稽留流产具有相关性($P<0.05$),见表 2。

表 2 稽留流产的单因素分析[$n(\%)$, $n=50$]

项目	发生稽留流产	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)			
≥35	38(76)	9.34	<0.05
<35	12(24)		
BMI(kg/m ²)			
≥26	16(32)	2.49	<0.05
<26	34(64)		
FSH/LH			
≥2	32(64)	6.21	<0.05
<2	18(36)		
人工流产(次)			
≥2	34(68)	5.62	<0.05
1	3(6)		
0	13(26)		
自然流产(次)			
≥2	10(20)	7.93	<0.05
1	31(62)		
0	9(18)		
不孕时间(年)			
≥4	36(72)	8.38	<0.05
<4	14(28)		
PSG1 mRNA			
≥6	17(34)	7.32	<0.05
<6	33(66)		
BMP-2(分)			
≥7	12(24)	5.65	<0.05
<7	38(76)		
Beclin-1 mRNA			
≥2	34(68)	7.65	<0.05
<2	16(32)		

2.3 稽留流产的多因素 Logistic 回归分析 经 Logistic 回归分析,人工流产次数、自然流产次数、不孕时间、PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与稽留流产具有相关性($P<0.05$),见表 3。

表 3 稽留流产的多因素 Logistic 回归分析

指标	<i>B</i>	<i>SE</i>	<i>Wald</i>	<i>P</i>	<i>OR</i>	95% <i>CI</i>
年龄	0.343	0.165	4.492	0.122	1.341	1.021~1.458
BMI	0.332	0.139	4.434	0.192	1.361	1.141~1.532
FSH/LH	0.319	0.184	4.423	0.083	1.741	1.325~1.927
人工流产次数	0.345	0.164	4.223	0.013	1.231	1.0325~1.784
自然流产次数	0.375	0.189	3.232	0.023	1.133	1.021~1.983
不孕时间	0.385	0.138	5.718	0.031	1.372	1.042~1.578
PSG1 mRNA	0.434	0.154	6.434	0.015	1.294	0.965~2.171
BMP-2	0.495	0.185	6.419	0.029	1.464	0.965~2.171
Beclin-1 mRNA	0.433	0.175	7.528	0.014	1.983	1.287~2.573

3 讨 论

稽留流产不仅危害母体健康,而且死胎长期留在体内可能会影响下次妊娠及胚胎着床。为此,及时识别稽留流产并采取相应干预措施在稽留流产的防治中显得尤为重要^[6]。稽留流产的发生过程:早期妊娠囊胚着床后,绒毛滋养细胞侵入母体螺旋动脉,形成“滋养细胞栓”,闭合了螺旋动脉,限制母血流入,导致胎盘在低氧状态中发育,最终导致流产。由于低氧状态会提高滋养细胞的应激水平,介导细胞自噬的产生,子宫蜕膜组织中的胚胎相关因子水平也会受到显著影响。

PSG1 是孕期母体中发现的主要胎盘蛋白,胎盘合体滋养层是 PSG1 的主要来源。PSG1 具有一定的免疫功能,能通过调节巨噬细胞的表达来增强胚胎的免疫功能。有研究发现,在胎儿缺血、缺氧等应激状态时,PSG1 的水平有明显波动^[7]。在保护胎儿的同时,PSG1 对母体也有一定的免疫增强功能。骨形成蛋白(BMP)是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白,属于转化生长因子-β 家族。BMP-2 能刺激 DNA 的合成和复制,从而促进间充质细胞定向分化为成骨细胞。它还是体内诱导骨和软骨形成的主要因子,并在肢体生长、软骨内骨化、骨折早期、软骨修复时表达,对骨骼的胚胎发育和再生修复起重要作用。在胚胎发育的早期,BMP-2 表达水平较为稳定,当出现胎儿宫内窘迫时 BMP-2 水平受到显著影响,呈下降趋势^[8]。有研究发现,稽留流产患者胎盘细胞自噬功能显著增强,可能与胎盘细胞的自我保护有关,而其中自噬相关蛋白 Beclin-1 在这个过程中发挥着重要的作用^[9-10]。

本研究中,观察组患者 PSG1 mRNA、BMP-2 水平均低于对照组,观察组 Beclin-1 mRNA 水平高于对

照组,可能与稽留流产患者胎盘系统应激反应及自噬的激活有关^[10-11]。单因素分析和多因素 Logistic 回归分析显示,人工流产次数、自然流产次数、不孕时间、PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与稽留流产具有一定的相关性。有研究发现,首次流产患者子宫蜕膜组织 PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与再次妊娠时子宫蜕膜组织上述指标的水平具有一定的相关性^[12-14],这意味着若首次妊娠时上述指标的水平异常则下次妊娠时这些指标水平异常风险会增加,这对于想再次妊娠的患者具有一定的意义。

综上所述,人工流产次数、自然流产次数、不孕时间、PSG1 mRNA、BMP-2、Beclin-1 mRNA 水平与稽留流产具有一定的相关性,可为稽留流产的诊断提供参考。

参考文献

[1] 龙取云,汤欣欣,顾莹,等.稽留流产细胞遗传学病因分析及生化指标检测的临床意义[J].中国计划生育学杂志,2019,27(7):902-904.

[2] 吴小青,李英,安刚,等.88例稽留流产组织的 SNP-array 检测结果分析[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(6):923-925.

[3] 刘丹,丁翔,唐国栋,等.200例稽留流产绒毛染色体的间期 FISH 分析[J].生殖医学杂志,2019,28(5):548-552.

[4] 张羽,张钗红,唐丹,等.稽留流产高危因素的相关研究进展[J].临床误诊误治,2017,30(12):113-116.

[5] 范小玲,刘姿.孕早期稽留流产的病因分析及清宫术后用药评价[J].湖南师范大学学报(医学版),2017,14(1):72-74.

(上接第 429 页)

[17] LING Y H, WONG C C, LI K W, et al. CCHCR1 interacts with EDC4, suggesting its localization in P-bodies [J]. Exp Cell Res, 2014, 327(1): 12-23.

[18] LORENZONI P J, KAY C S K, AMDT R C, et al. Congenital myasthenic syndrome due to DOK7 mutation in a cohort of patients with 'unexplained' limb-girdle muscular weakness[J]. J Clin Neurosci, 2020, 75: 195-198.

[19] VON HUTH S, MOELLER J B, SCHLOSSER A, et al. Immunohistochemical localization of fibrinogen C domain containing 1 on epithelial and mucosal surfaces in human tissues[J]. J Histochem Cytochem, 2018, 66(2): 85-97.

[20] YAN W, SUN M J, LIU J B, et al. FIBCD1 overexpression predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Lett, 2019, 19(1): 795-804.

[6] 罗树玲,郑春艳,曹锦慧.肝素结合表皮生长因子的高表达与稽留流产病因的相关性研究[J].中国性科学,2016,25(9):101-104.

[7] BESPALOVA O, BAKLEICHEVA M, KOVALEVA I, et al. Expression of vitamin D and vitamin D receptor in chorionic villous in missed abortion[J]. Gynecol Endocrinol, 2019, 35(sup1): S49-S55.

[8] ROONEY J. Abortion in Northern Ireland: a missed opportunity to consider article 3 [J]. J Soc Welf Fam Law, 2019, 41(2): 225-228.

[9] JIN Z, YAO X Y, TANG Y H, et al. Analysis of clinicopathologic classification features of hydatidiform mole misdiagnosed as missed abortion preoperatively[J]. Rep Dev Med, 2019, 3(2): 97.

[10] 薛慧琴,周岩,卢洪涌,等. NOG 基因与不明原因自然流产相关性的初步探讨[J].中国优生与遗传杂志,2018,26(2):71-73.

[11] 王鹤, REDDY R, NGUYEN N M P, et al. 骨形态发生蛋白 15 基因多态性与复发性葡萄胎和习惯性流产的相关性研究[J].中国妇幼保健,2017,32(11):2432-2435.

[12] ALI M K, BOTROS H A, MOSTAFA S A. Foley's catheter balloon for induction of mid-trimester missed abortion with or without traction applied: a randomized controlled trial[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2020, 33(2): 198-205.

[13] 谢冰,陈霞,于骏,等. Beclin-1 在稽留流产中的表达模式及临床意义[J].医学研究生学报,2019,32(1):78-81.

[14] WOOD S L, BRAIN P H. Medical management of missed abortion: a randomized clinical trial[J]. Obstet Gynecol, 2002, 99(4): 563-566.

(收稿日期:2020-04-02 修回日期:2020-09-05)

[21] ZHOU H J, LIN C, ZHANG X P, et al. ARHGEF39 promotes tumor progression via activation of Rac1/P38 MAPK/ATF2 signaling and predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer patients[J]. Lab Invest, 2018, 98(5): 670-681.

[22] XU B J, WU L, LI X Y, et al. Prognostic genes of hepatocellular carcinoma based on gene coexpression network analysis[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(7): 11616-11623.

[23] NEETA L V, HUI L S. Next-generation sequencing and prenatal 'omics: advanced diagnostics and new insights into human development[J]. Genet Med, 2018, 20(8): 791-799.

(收稿日期:2020-06-12 修回日期:2020-12-18)