

子痫前期孕妇外周血游离 DNA 的研究进展

周嘉怡, 吴逊伟, 戴莉娟, 赵瑰丽, 余波澜*

(广州医科大学附属第三医院 广东省产科重大疾病重点实验室 广东省母胎医学工程技术研究中心, 广东 广州 510150)

摘要:妊娠高血压疾病,尤其是子痫前期(PE),是世界范围内孕产妇和围产期发病率和病死率增加的主要原因之一。而孕妇血液胎儿游离的DNA(cff-DNA)可作为早期预测PE的发生发展。并且总结分析cff-DNA与PE的相关性及其可能存在的机制,进一步说明PE的发生可能与DNA甲基化相关,同时探讨其作为生物标志物的局限性,为有效预测子痫前期提供参考。

关键词:外周游离核酸;子痫前期;生物标志物

中图分类号:R714;R44 文献标志码:A

Research progress of peripheral blood free DNA in preeclampsia pregnancy

ZHOU Jia-yi, WU Xun-wei, DAI Li-juan, ZHAO Gui-li, YU Bo-lan*

(Guangdong Maternal-Fetal Medical Engineering Research Center, Guangdong Key Laboratory of Obstetrics and Major Diseases, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, China)

Abstract: Pregnancy-induced hypertension, especially preeclampsia (PE), is one of the leading causes of increased maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide. And the circulating cell free fetal nucleic acid (cff-DNA) analysis of pregnant women can be used as an early prediction of the occurrence and development of PE. By summarizing and analyzing the correlation between cff-DNA and PE and its possible mechanism, this paper further explained that the occurrence of PE may be related to DNA methylation, and discussed its limitations as a biomarker, so as to provide reference for the effective prediction of preeclampsia.

Key words: cell free fetal nucleic acid; preeclampsia; biomarker

1969年,孕妇血浆中发现了胎儿细胞^[1];1997年,通过PCR扩增携带男性胎儿的孕妇血浆和血清中Y染色体特异性序列,证实了母体血液中存在胎儿游离的DNA(cell free fetal nucleic acid, cff-DNA)^[2]。自此无创产前检测技术(non-invasive prenatal test, NIPT)伴随着胎儿特标志物不断的发展,在许多研究下,无论体外或者体内证据都证

明,cff-DNA来源于胎盘,并且可以通过cff-DNA检测胎盘的健康与相关的妊娠疾病,例如妊娠期高血压疾病、子痫前期、早产、胎儿宫内生长受限等。而妊娠期高血压疾病(hypertensive disorder complicating pregnancy, HDGP)是孕产妇发病率和病死率的主要原因,并且使6%~8%的妊娠期复杂化^[3]。据报道,全世界16%的孕产妇死亡是由高血压引起

收稿日期:2019-06-21 修回日期:2020-01-18

基金项目:国家科技部重点研发计划(2018YFC1004104);广州市科技计划重点项目(201804020057);广东省科技厅公益研究与能力建设项目(2019B030316023)

*通信作者(corresponding author):yubolan-q@qq.com

的;妊娠期高血压疾病的危险因素有年龄、多次妊娠、慢性高血压(chronic hypertension, cHTN)、其他外周血管以及妊娠期高血压病史等,但具体的发病机制仍不能确定^[4]。根据国际妊娠高血压研究学会(international society for the study of hypertension in pregnancy, ISSHP)妊娠期高血压(gestational hypertension, GH)定义为妊娠20周后新发高血压[血压140/90 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)以上],尿中无蛋白。子痫前期(preeclampsia, PE)定义为新发高血压,其特征是妊娠20周后24 h尿样尿液中蛋白含量为300 mg以上,血压为140/90 mmHg以上。PE基于严重程度可分为两类,第一是轻度到中度(mild preeclampsia, MPE)定义的血压140/90 mmHg和159/109 mmHg,24 h尿样尿液中蛋白含量大于300 mg但不超过2.0 g。第二类为重度子痫前期(sever preeclampsia, SPE),定义为收缩压大于160 mmHg或舒张压大于110 mmHg,24 h尿样尿液中蛋白含量大于2.0 g^[5]。

1 胎儿游离DNA在PE中的变化

PE的发病机制较为清楚,确切病因仍难以捉摸的。其中普遍认为PE的发病机制包括子宫胎盘灌注下降,导致缺氧胎盘^[6],同时循环促炎因子和血管生成因子的改变,以及系统性内皮功能障碍^[7]。婴儿分娩和胎盘排出后导致子痫前期的症状消失^[8],这现象表明了PE的发病机制中胎盘的作用。目前的理论主要支持孕妇血浆中cff-DNA的来源是胎盘滋养细胞的凋亡与坏死所释放出来的胎儿DNA。并且在PE患者血液中观察到cff-DNA和总循环游离DNA(circulating free DNA, cf DNA)的增加可能与胎盘螺旋动脉异常重构、氧化应激增加和缺血有关,导致胎盘源性颗粒或因子的释放^[9]。缺血性胎盘的概念导致细胞碎片的释放,这一概念被进一步细化,包括微泡和纳米泡、胎儿DNA以及最近的外泌体等颗粒,这些从胎盘释放的细胞碎片充当着危险相关分子模式(danger associated molecular patterns, DAMP),最近的实验研究证明,在小鼠体内,细胞外囊泡可引起小鼠胎盘无菌炎症反应和PE的类似症状^[10]。并且Toll样受体9(TLR9)最初被称为外源DNA片段的传感器,在小鼠妊娠模型中,胎儿提取的DNA和TLR9激动剂会使怀孕小鼠诱

发炎症反应,主要是通过增加炎症细胞因子IL-6、sENG和sFlt1分泌,引起妊娠小鼠出现PE样特征,如高血压、蛋白尿、胎盘炎症和胎儿生长受限^[11]。因cff-DNA的去甲基化的程度比母体的DNA高,特别是低甲基化的CpG DNA序列,这有可能是TLR9的强配体^[12]。有趣的是,妊娠期间发生子痫前期,其绒毛滋养细胞凋亡的异常增加和含有cff-DNA的细胞碎片的释放有关,刺激母体炎症反应发生,促使母体内皮功能障碍,而其中的原因可能要归因于妊娠疾病中嗜中性粒细胞的激活^[13]。活化的嗜中性粒细胞挤出染色质纤维网,称为嗜中性粒细胞胞外陷阱(neutrophil extracellular traps, NETs),以消除病原体。NET的主要结构是DNA和组蛋白。这些碎片激活中性粒细胞并释放DNA,从而形成PE中所见的cf DNA总量,并且在患有PE的妊娠妇女中已观察到NETs的过量产生^[13]。

另外在不同程度的PE,其总cf DNA和cff-DNA通过定量可反应其严重程度。在重症子痫前期和轻或中度子痫前期中的总cf DNA和cff-DNA都增加^[14]。但与MPE相比,SPE患者cff-DNA和总cf DNA均升高,而且SPE组循环cf DNA增加可能是由于这些疾病中胎盘病理的差异,同时SPE患者中的胎盘以合体结和梗死数量增加为特征,这可能与胎盘灌注减少有关^[15]。

2 胎儿分数与PE的关系

cff-DNA是由凋亡和坏死的胎盘合体滋养细胞释放而来,而胎儿分数是cff-DNA的数量除以总cf DNA,在大多数妇女怀孕10周时超过4%。研究发现胎儿分数与妊娠34、37周前PE风险存在显著负相关,即胎儿分数越低,妊娠发生PE的风险越高^[16]。这与先前报道的比较了发展成PE的女性和没有发展PE的女性的胎儿分数结果一致。其结果的差异可能是由于cff-DNA相对于母体cf DNA的增加不那么明显,从而导致胎儿分数的减少。同时PE的早期妊娠标志物与胎儿分数有密切的关系,如平均动脉压、妊娠相关血浆蛋白A、胎盘生长因子,子宫动脉搏动指数,胎儿分数与平均动脉压和子宫动脉搏动指数呈负相关,与妊娠相关血浆蛋白A和胎盘生长因子呈正相关。胎儿分数越低,发生PE的风险越高^[16]。因此cf DNA检测中胎儿分数

低可能是胎盘发育不良和胎盘功能障碍的一个标志。

3 DNA 甲基化在 PE 中的表达差异

因为 cf-DNA 相对于背景较大的母体 DNA 浓度较低,缺乏普遍的胎特异性 DNA 标志物,限制了其在 NIPT 广泛的临床应用。表观遗传改变是细胞内基因组以外的其他可遗传物质发生的改变,使基因型未发生变化而表型却发生了改变。这种改变在有丝分裂时保持稳定,通过减数分裂代代相传。组织特异性 DNA 甲基化模式的差异可用于区分母体 DNA 和胎盘 DNA。在 2002 年发现母胎 DNA 之间存在表观遗传学差异^[17],随后发现位于 *ERG*、*RUNX3*、*LINE-1* 和 *HSD11B2* 基因等大量基因在母胎 DNA 上存在甲基化差异^[18-19],其后 *ERG* 被证实母体 DNA 为低甲基化,在胎儿 DNA 为高甲基化^[19],正常孕妇血浆中甲基化 *ERG* 基因的检出量随妊娠进展而呈升高趋势,提示 *ERG* 基因含量在母体血浆中随孕周增加而增加^[19]。而对于 *RUNX3*、*LINE-1* 和 *HSD11B2* 基因,研究发现 *HSD11B2* 基因编码在高血压中起关键作用的 11 β 羟基类固醇脱氢酶 2 型。其主要通过阻止睾丸和胎盘等组织中盐皮质激素受体的激活,在血压调节中起重要作用。与对照组相比,患有 PE 的母体中 *RUNX3*、*LINE-1* 和 *HSD11B2* 基因的甲基化下降,但这种降低并不明显。有趣的是,在 PE 患者中,*HSD11B2*、*RUNX3* 和 *LINE-1* 甲基化与儿童的出生体质量,胎龄和分娩呈正相关^[18]。

SERPINB5 基因定位于染色体 18q21.33 主要表达子宫胎盘组织^[20]。过往的研究报道 *SERPINB5* 基因在胎盘中呈现低甲基化状态,并在母体血液中呈现高甲基化^[21]。乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂 (mammary serine protease inhibitor, MASPIN) 是由 *SERPINB5* 基因编码的人类蛋白质,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂超家族^[22]。*SERPINB5* 的启动子的甲基化状态是影响妊娠早期绒毛外滋养层细胞迁移和侵袭的重要因素。甲基化状态的降低可以抑制绒毛外滋养层细胞 (extravillous trophoblasts, EVT) 的迁移和侵袭,从而影响胎盘形成,并可能导致胎盘缺血和缺氧^[22]。同时之前的研究已发现子痫前期孕妇血浆未甲基化的 *SERPINB5* 基因含量比正常妊娠孕

妇增加约 5.5 倍^[23]。因此,母体血浆中未甲基化 *SERPINB5* 可作为胎儿特异性标志物,可用于测定 cf DNA。SPE 孕妇母体血液中的未甲基化 *SERPINB5* 水平高于正常妊娠的孕妇,但因未甲基化 *SERPINB5* 在 MPE 与妊娠晚期正常孕妇的表达无明显差异性,因此未甲基化 *SERPINB5* 可能不是 MPE 的良好标志物^[23]。

近期发现在子痫前期的血浆中,*STAT5A* 启动子甲基化较正常妊娠晚期的血浆要低,提示 *STAT5A* 抗凋亡的作用下降,胎盘的滋养层细胞的凋亡率会增加,cf DNA 会增加^[24]。*STAT5A* 启动子区域,位于母体和胎盘 DNA 之间。*STAT5A* 在各组胎盘组织中均表现出较高的甲基化水平,提示它是一种更有效的表观遗传标记。并且也观察到在 PE 患者中最明显失调的是母体表达的转录因子 *DLX5*,约 70% 的 PE 样品中 *DLX5* 上调显著,其胎盘表达与 PE 的血清生物标志物水平相关,包括胎盘生长因子比上可溶性 Fms 样酪氨酸激酶。在滋养细胞细胞系中,*DLX5* 的过表达导致增殖减少,增加新陈代谢和激活内质网应激反应^[25]。这表明了表观遗传变化在 PE 疾病的发展和进程中起着至关重要的作用。不同途径中的每个表观遗传变化都会导致 PE 的发生,与 PE 相关的变化之一是 DNA 甲基化变化。因此使 DNA 甲基化用于 PE 的无创产前诊断成为可能,而且 DNA 甲基化不受性别和基因多态性影响。纵观表观遗传学研究,由于基因的表观遗传受较多因素的影响,如环境、遗传和营养等,使得其实验的重复性较差,稳定性也相对较弱。目前而言并不能完全作为一种诊断疾病的生物标志物。虽然如此,但通过了解 PE 中主要的表观遗传学变化,有助于在治疗研究方面上提出一个猜想——是否纠正这些表观遗传学的变化可预防或治疗对应的疾病,同时也为产前诊断提供了一个全新的思路。

4 问题与展望

过去 20 年来,母体血浆游离胎儿核酸分析取得了快速进展。该领域始于 1997 年使用 PCR 进行单基因检测,并已发展成研究者可以分析整个胎儿全基因组,并且不断研究循环 cf-DNA 在胎儿全基因组的作用,这将有助于将来确定胎儿每个基因的完整 DNA 序列。这些发展的方面已经影响了临床实

践,对于子痫前期的研究在不断的深入并且可能在不久的将来会出现相关的非侵入性产前诊断方法。随着技术的进一步发展和成本的降低,胎儿甲基组

学和转录组学分析有可能最终成为常规临床试验。因此,外周游离核酸基因组分析可能在未来的产前医学实践中发挥越来越重要的作用。

参考文献:

- [1] Walknowska J, Conte FA, Grumbach MM. Practical and theoretical implications of fetal-maternal lymphocyte transfer[J]. *Lancet*, 1969, 1: 1119-1122.
- [2] Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. *Lancet*, 1997, 350: 485-487.
- [3] Gillon TE, Pels A, von Dadelszen P, *et al.* Hypertensive disorders of pregnancy: a systematic review of international clinical practice guidelines [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e113715.doi: 10.1371/journal.pone.0113715.
- [4] Bender WR, Koelper NC, Sammel MD, *et al.* Association of fetal fraction of cell-free DNA and hypertensive disorders of pregnancy[J]. *Am J Perinatol*, 2019, 36: 311-316.
- [5] Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, *et al.* The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: a revised statement from the ISSHP [J]. *Pregnancy Hypertens*, 2014, 4: 97-104.
- [6] Granger JP, Alexander BT, Bennett WA, *et al.* Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension[J]. *Am J Hypertens*, 2001, 14: 178s-185s.
- [7] Tjoa ML, Levine RJ, Karumanchi SA. Angiogenic factors and preeclampsia [J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 2395-2402.
- [8] Mol BWJ, Roberts CT, Thangaratinam S, *et al.* Pre-eclampsia[J]. *Lancet*, 2016, 387: 999-1011.
- [9] Naljayam MV, Karumanchi SA. New developments in the pathogenesis of preeclampsia [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2013, 20: 265-270.
- [10] Kohli S, Ranjan S, Hoffmann J, *et al.* Maternal extracellular vesicles and platelets promote preeclampsia via inflammasome activation in trophoblasts[J]. *Blood*, 2016, 128: 2153-2164.
- [11] He B, Yang X, Li Y, *et al.* TLR9 (Toll-Like Receptor 9) agonist suppresses angiogenesis by differentially regulating VEGFA (vascular endothelial growth factor A) and sFLT1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor 1) in preeclampsia [J]. *Hypertension*, 2018, 71: 671-680.
- [12] van Boeckel SR, Davidson DJ, Norman JE, *et al.* Cell-free fetal DNA and spontaneous preterm birth[J]. *Reproduction*, 2018, 155: R137-R145.
- [13] Sur Chowdhury C, Hahn S, Hasler P, *et al.* Elevated levels of total cell-free DNA in maternal serum samples arise from the generation of neutrophil extracellular traps[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2016, 40: 263-267.
- [14] Eche S, Mackraj I, Moodley J. Circulating fetal and total cell-free DNA, and sHLA-G in black South African women with gestational hypertension and pre-eclampsia [J]. *Hypertens Pregnancy*, 2017, 36: 295-301.
- [15] Vinnars MT, Nasiell J, Ghazi S, *et al.* The severity of clinical manifestations in preeclampsia correlates with the amount of placental infarction [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90: 19-25.
- [16] Rolnik DL, da Silva Costa F, Lee TJ, *et al.* Association between fetal fraction on cell-free DNA testing and first-trimester markers for pre-eclampsia[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2018, 52: 722-727.
- [17] Poon LL, Leung TN, Lau TK, *et al.* Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma[J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 35-41.
- [18] Majchrzak-Celinska A, Kosicka K, Paczkowska J, *et al.* HSD11B2, RUNX3, and LINE-1 methylation in placental DNA of hypertensive disorders of pregnancy patients[J]. *Reprod Sci*, 2017, 24: 1520-1531.
- [19] Chen X, Xiong L, Zeng T, *et al.* Hypermethylated ERG as a cell-free fetal DNA biomarker for non-invasive prenatal testing of Down syndrome[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 444: 289-292.
- [20] Dokras A, Gardner LM, Kirschmann DA, *et al.* The tumour suppressor gene maspin is differentially regulated in cytotrophoblasts during human placental development [J]. *Placenta*, 2002, 23: 274-280.

- [21] Chim SS, Tong YK, Chiu RW, *et al.* Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102: 14753-14758.
- [22] Shi X, Liu H, Cao J, *et al.* Promoter hypomethylation of maspin inhibits migration and invasion of extravillous trophoblast cells during placentation [J]. PLoS One, 2015, 10: e0135359.doi:10.1371/journal.pone.0135359.
- [23] Qi YH, Teng F, Zhou Q, *et al.* Unmethylated-maspin DNA in maternal plasma is associated with severe pre-eclampsia[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2015, 94: 983-988.
- [24] Rahat B, Thakur S, Bagga R, *et al.* Epigenetic regulation of STAT5A and its role as fetal DNA epigenetic marker during placental development and dysfunction[J]. Placenta, 2016, 44: 46-53.
- [25] Zadora J, Singh M, Herse F, *et al.* Disturbed placental imprinting in preeclampsia leads to altered expression of DLX5, a human-specific early trophoblast marker [J]. Circulation, 2017, 136: 1824-1839.

新闻点击

保持心脏健康可预防认知能力下降

一篇研究显示,罹患心血管疾病风险较高的人认知能力加剧下降,包括阿尔茨海默病的典型标志物增多,这表明监测和控制心脏病可能是维持和改善生命后期认知健康的关键。

先前的研究已经报道了心血管疾病的危险因素与较小的特定大脑区域(如白质、灰质和海马体)的关系,但研究结果并不一致。本研究的研究人员试图将弗雷明汉综合心血管疾病风险评分(FGCRS)与个人长期在整体和特定领域的认知功能下降方面进行比较,该评分将人口统计信息与传统的心血管疾病危险因素结合在一起以评估未来的风险。

研究人员追踪了 Rush Memory and Aging Project 的 1 588 名无痴呆症参与者 21 年。平均年龄为 79.5 岁。对他们的 FGCRS 基线进行了评估,并根据心脏病风险分为最低、中等和最高组。对每年参与者的情节记忆(日常事件的记忆)、语义记忆(长期记忆)、工作记忆(短期记忆)、视觉空间能力(识别物体之间视觉和空间关系的能力)和感知速度(准确、完整地比较字母、数字、物体、图片或图案)用 19 种测试进行了评估,以得出综合评分。

在研究期结束时,研究人员发现,心血管病风险负担增加与情景记忆、工作记忆和知觉速度的下降较快有关。研究人员还查看了一部分患者的 MRI 数据,发现 FGCRS 较高与海马体体积较小、皮层灰质和全脑相关。海马和灰质的减少是阿尔茨海默病相关神经变性的典型标志。MRI 还显示出大量的白质高信号,这是大脑上的白斑,导致某个区域的功能下降。间歇性记忆和工作记忆与海马体体积有关,但知觉速度与白质高信号有关,表明记忆测试和 MRI 的结果是相辅相成的。

该研究刊登于《美国心脏病学院学报》。

运动中和运动后高血压可能是人生后期疾病的标志

有研究称,运动期间血压升高和运动后血压恢复延迟与中年至老年人患高血压、临床前和临床心血管疾病以及死亡的风险较高有关。运动对血压的反应是年轻到中年成年人心血管疾病和死亡风险的重要标志。但是,很少有研究检查中年血压反应与运动(小于个人最大运动能力)之间的相关性,并可能导致心血管疾病的后果和晚年死亡。

波士顿大学医学院(BUSM)的研究人员在 Framingham 心脏研究的参与者(平均年龄 58 岁,女性占 53%)中评估了血压变化和恢复与临床前疾病指标的关联。然后,他们跟随这些参与者评估这些血压变化是否与患高血压、心血管疾病的风险有关。

他们观察到较高的运动收缩压(SBP)和运动舒张压(DBP)与患高血压的风险较高相关。此外,运动后 SBP 和 DBP 恢复延迟均与心血管疾病和死亡的较高风险相关。

研究人员称,运动期间和运动后血压的变化为将来是否会发生疾病提供了重要信息;这可能有助于研究人员评估该信息是否可以用来更好地识别出罹患高血压和 CVD 较高风险的人。

该研究刊登于《美国心脏协会杂志》。