

胎盘绒毛 CD81、HIF-1 α 、VEGF 在早孕期复发性流产中的表达

余艳茹, 许雅娟, 翟闪闪, 班彦杰, 孙宗宗, 张婧喆, 张森, 洪腾, 柳蕊

摘要 目的 探讨四跨膜蛋白 CD81(CD81)、血管内皮生长因子(VEGF)及其低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 在复发性流产(RSA)患者胎盘绒毛中的表达及意义。方法 以60例患者为研究对象,其中RSA早孕停育组30例,正常早孕人流要求终止者30例。采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法和Western blot法对所有入组患者绒毛中CD81、VEGF及HIF-1 α 水平进行检测。采用Pearson相关性分析CD81、VEGF及HIF-1 α 之间的相关性,ROC曲线评估CD81、VEGF及HIF-1 α 对RSA的预测价值。结果 ① RSA组妇女绒毛组织中CD81、HIF-1 α mRNA水平高于正常早孕组,VEGF mRNA水平低于正常早孕组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。② RSA组妇女绒毛组织中CD81、HIF-1 α 蛋白水平高于正常早孕组,VEGF蛋白水平低于正常早孕组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。③ Pearson相关性分析: RSA组中VEGF与CD81呈负相关性,与HIF-1 α 呈正相关性;正常早孕组中各指标无相关性。④ ROC曲线分析CD81、HIF-1 α 、VEGF及三者联合对RSA的预测价值中:CD81、HIF-1 α 、VEGF表达量中任意两因子预测RSA的效果无明显差异性($P > 0.05$),任一因子与三者联合预测比较,均有统计学意义($P < 0.05$, $NRI < 0$)。结论 在RSA组中,VEGF表达与CD81呈负相关性,与HIF-1 α 呈正相关性;ROC曲线预测RSA发生中,CD81、VEGF及HIF-1 α 联合预测价值优于单一因子。

关键词 复发性流产; 四跨膜蛋白 CD81; 血管内皮生长因子; 低氧诱导因子-1 α

中图分类号 R 714.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)04-0611-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.022

早孕期复发性流产(recurrent spontaneous abortion, RSA)是发生2次或2次以上妊娠12周内的流产。研究^[1-2]表明,1%~5%的夫妇经历RSA,且流产的频率越高发病率就越高。诸如染色体异常、自身免疫、解剖异常、内分泌因素和感染等原因以及社

会心理因素都参与了RSA的发病^[3]。研究^[4]表明,在妊娠早期,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对于卵母细胞的成熟、滋养层细胞的增殖、胚胎的植入和发育、胎盘的血管生成以及母体和胎儿血管在子宫内的生长都是至关重要的。在早孕期低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)可作为氧张力的介质参与滋养层分化^[5]; Jauniaux et al^[6]发现妊娠子宫螺旋动脉重塑不足有关的胎盘缺陷是导致流产的主要原因。有研究^[7]证实高表达CD81可抑制滋养细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成,并影响与子痫(preeclampsia, PE)发病有关的螺旋动脉重塑过程,降低细胞滋养细胞的侵袭能力。RSA的发生是否与CD81有关,目前国内外尚罕见报道。该研究从血管新生的角度出发,通过比较RSA患者和正常早孕妇女绒毛组织中CD81、VEGF及HIF-1 α mRNA及蛋白水平的变化,探讨CD81、HIF-1 α 、VEGF与RSA的相关性及其在RSA发生中的预测作用。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2017年1月~2018年1月就诊于郑州大学第三附属医院产科门诊的RSA患者30例,同时筛选出30例同期正常早孕并要求终止妊娠的妊娠妇女。所有研究对象为汉族,年龄21~45(30.430 \pm 5.143)岁,孕周12周,孕前TORCH检测无异常,无肝炎、人类免疫缺陷等病毒感染。本研究通过郑州大学第三附属医院医学伦理委员会批准,且所有研究对象签署知情同意书。分组如下: RSA组: 纳入者均有 ≥ 2 次的无诱因自然流产史,就诊时B超确诊胚胎停育。均排除胎儿染色体异常、生殖器官异常、生殖道感染、抗心磷脂抗体阳性、TORCH检测结果示近期感染、甲状腺功能异常、凝血功能异常、近期接触过重金属等毒物、近期生活中发生重大事件。正常早孕组: 选择同期因非计划妊娠要求终止而就诊的早孕正常妇女,本次妊娠就诊时B超可见孕囊及原始心血管搏动,孕囊大小符合孕周,纳入者既往至少有1次正常妊娠史(包括足

2019-01-02 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目(编号: 201403110)

作者单位: 郑州大学第三附属医院妇产科, 郑州 450052

作者简介: 余艳茹,女,硕士研究生;

许雅娟,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-

mail: cnzzsl@163.com

月分娩和要求终止妊娠) ,且均无早产、死产等不良妊娠史。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与储存 人工流产手术当日留取 RSA 组及正常早孕组妇女胎盘绒毛 ,将每个研究对象胎盘绒毛组织标本分为 2 部分 ,置于事先放有 RNA store 的冻存管和普通冻存管中 ,然后将冻存管迅速投入液氮中 ,再送至 -80 °C 冰箱中保存。

1.2.2 主要试剂 超纯 RNA 提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技公司; Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 购自日本 TaKaRa 公司; QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit 购自德国 Qia-gen 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; HRP 标记羊抗小鼠二抗购自武汉博士德生物工程有限公司; 显影定影试剂盒购自天津汉中摄影材料厂。

1.2.3 主要仪器 电泳仪电源(型号: DYY-7C) 、垂直电泳槽(型号 DYCZ-24DN) 购自北京六一仪器厂; 荧光定量 PCR 仪(型号 QuantStudio3) 、微量紫外线分光光度计(型号 Nanodrop 2000) 、酶标仪(型号 μHISKANMK3) 购自美国 Thermo 公司; 水平摇床(型号 TS-1) 购自江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(quantitative Real-time PCR ,qRT-PCR) 技术检测胎盘绒毛 CD81、HIF-1α、VEGF 的 mRNA 表达 采用超纯 RNA 提取试剂盒提取总 RNA ,用 Nanodrop 2000 微量紫外线分光光度计检测 RNA 在 260 nm、280 nm 处的纯度和浓度。Prime Script™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(用来获取 cDNA ,用 QuantiNova™ SYBR® Green PCR Kit 进行荧光定量 PCR(qPCR) ,qPCR 仪进行反应条件: 95 °C 预变性 2 min ,继而 95 °C 变性 5 s ,60 °C 退火 10 s ,72 °C 延伸 15 s ,40 个循环。以 β-actin 基因作为内参照 ,样品目的 mRNA 的表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。以上操作严格按照试剂盒说明书操作。引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 分析检测胎盘绒毛 CD81、HIF-1α、VEGF 的蛋白表达 将绒毛组织加 400 μl 含苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride ,PMSF) 单去污剂裂解液裂于匀浆器中进行匀浆 ,然后置于冰上。PBS 洗涤 ,提取蛋白 ,12 000 r/min 离心 ,吸取上清液备用。BCA 法测量总蛋白浓度 ,蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳约 2 h 后转膜 ,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液) 浸泡 PVDF 膜 ,用封闭液稀释

相应的一抗 ,使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中 4 °C 孵育过夜。然后使用封闭液稀释相应的 HRP 标记二抗(1 : 50 000 稀释) ,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中 ,37 °C 摇床孵育 2 h ,洗膜 ,ECL 显色 ,照相并分析结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 21.0 和 Medcalc 软件进行统计学分析。使用 Kolmogorov-Smirnov 检验数据的正态性($P > 0.05$ 为正态分布) 。不符合正态分布时使用 Kolmogorov-Smirnov Z 秩和检验 ,计量资料采用中位数(四分位间距) [$M(IQR)$] 描述; 正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各因子之间的关系采用 Pearson 相关性分析 ,对于 RSA 的预测价值应用受试者工作特征(ROC) 曲线进行分析 ,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物设计序列

基因	引物序列(5'-3')
CD81	F: AGTACCTGCTCTTCGCTCTCA R: GAACATCATGACAGCGCCCA
HIF-1α	F: GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTGG R: CCTTATCAAGATGCGAACTCACA
VEGF	F: AGGCCAGCACATAGGAGAGA R: TACCGGGATTTCTTGCCTT
β-actin	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTACGCACGAT

2 结果

2.1 一般资料比较 两组女性的年龄、停经时间、孕次、产次、收缩压、舒张压、体质指数(BMI) 等一般资料分别比较 ,差异均无统计学意义($P > 0.05$) 。见表 2。

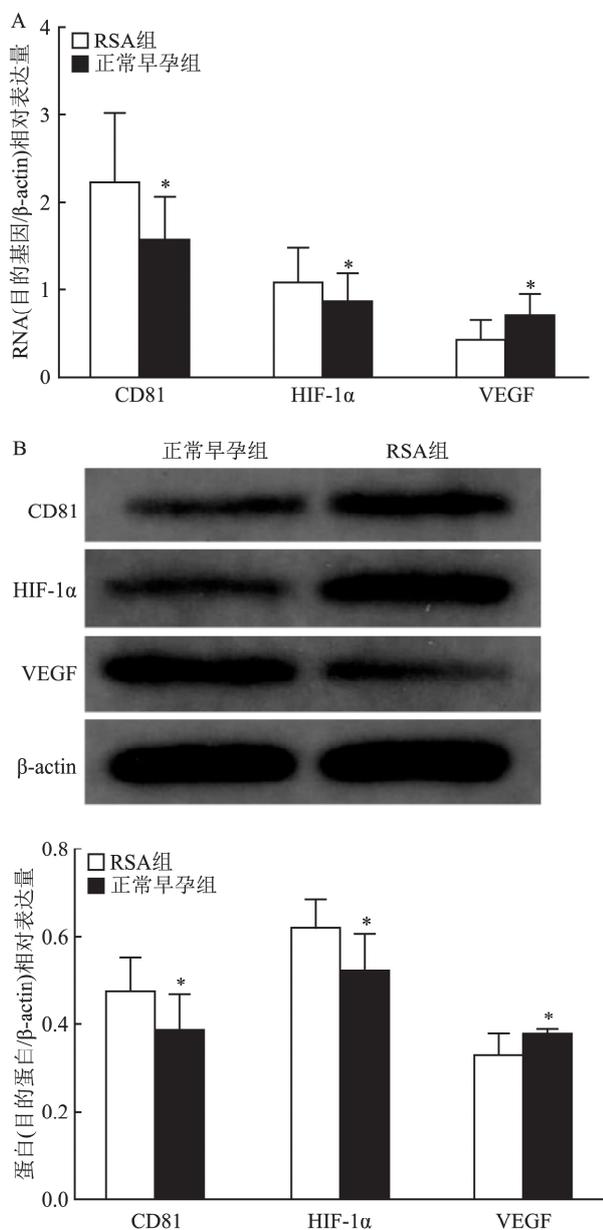
表 2 两组女性一般资料的比较 [$n = 30$, $\bar{x} \pm s$, $M(IQR)$]

项目	RSA 组	正常妊娠组	P 值	Z/t 值
孕妇年龄(岁)	31.630 ± 4.247	29.230 ± 5.728	0.070	1.844
停经时间(d)	61.50(10.00)	58.50(14.25)	0.071	1.291
孕次	4.00(3.00)	2.00(3.00)	0.236	1.033
产次	0.50(1.00)	1.00(2.00)	0.388	0.904
收缩压(mmHg)	112.27 ± 9.255	110.90 ± 8.543	0.555	0.594
舒张压(mmHg)	75.67 ± 8.040	77.90 ± 7.083	0.258	-1.142
BMI	21.919 ± 2.260	22.322 ± 2.755	0.538	-0.620

2.2 qPCR 和 Western blot 分析 CD81、HIF-1α、VEGF mRNA 和蛋白的表达 RSA 组妇女绒毛组织中 CD81 mRNA、HIF-1α mRNA、CD81 蛋白、HIF-1α 蛋白水平均高于正常早孕组 ,VEGF mRNA 和蛋白水平低于正常早孕组 ,差异有统计学意义($P < 0.05$) 。见图 1。

表3 ROC曲线分析 CD81、HIF-1 α 、VEGF 对 RSA 的预测价值

指标	ROC 曲线下面积	95% CI	Z 值	P 值	Youden 指数	敏感性(%)	特异性(%)
CD81 mRNA	0.720	0.589 ~ 0.828	3.292	<0.05	0.367	83.33	53.33
HIF-1 α mRNA	0.659	0.525 ~ 0.776	2.232	<0.05	0.333	50.00	83.33
VEGF mRNA	0.784	0.659 ~ 0.880	4.693	<0.000 1	0.533	86.67	66.67
CD81 蛋白	0.778	0.652 ~ 0.875	4.514	<0.000 1	0.500	70.00	80.00
HIF-1 α 蛋白	0.796	0.672 ~ 0.889	5.255	<0.000 1	0.433	43.33	100.00
VEGF 蛋白	0.686	0.553 ~ 0.799	2.689	<0.05	0.333	90.00	43.33
三者 mRNA 表达量联合预测	0.906	0.802 ~ 0.966	9.899	<0.000 1	0.767	93.33	83.33
三者蛋白表达量联合预测	0.910	0.808 ~ 0.968	10.541	<0.000 1	0.767	86.67	90.00

图1 qPCR和Western blot法检测 CD81、HIF-1 α 、VEGF 各因子 mRNA 和蛋白表达量

A: qPCR 法分别检测 RSA 组和正常早孕组 CD81、HIF-1 α 、VEGF 的 mRNA 表达量; B: Western blot 法分别检测 CD81、HIF-1 α 、VEGF 在 RSA 组和正常早孕组的蛋白表达量; 与正常早孕组比较:

* $P < 0.05$

2.3 CD81、HIF-1 α 、VEGF 在 RSA 中表达的相关性 RSA 组蛋白表达量中: VEGF 与 CD81 呈负相关性($r = -0.415$, $P < 0.05$), 与 HIF-1 α 呈正相关性($r = 0.560$, $P < 0.05$); RSA 组 mRNA 表达量中: VEGF 分别与 CD81 呈负相关性($r = -0.365$, $P < 0.05$), 与 HIF-1 α 呈正相关性($r = 0.608$, $P < 0.05$)。正常早孕组间各指标无相关性($P > 0.05$)。

2.4 ROC 曲线对 RSA 的预测价值

2.4.1 ROC 曲线分析 CD81、HIF-1 α 、VEGF 对 RSA 的预测价值 ROC 曲线分析各预测因子 ROC 曲线下面积、95% CI、Z 值、P 值、Youden 指数及预测的敏感性和特异性。见表 3。

2.4.2 CD81、HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达量及三者联合预测 RSA 的价值 CD81、HIF-1 α 、VEGF 表达量及三者联合中预测 RSA 发生的 ROC 曲线见图 2A。比较 CD81、HIF-1 α 、VEGF mRNA 及三者联合中任意两组因子的面积之间的差异、95% CI、Z 值、P 值、净重新分类指数(NRI)值,结果显示: CD81、HIF-1 α 、VEGF mRNA 表达量三者中任意两因子预测 RSA 的效果无明显差异($P > 0.05$),任一因子与三者联合预测比较,均有统计学意义($P < 0.05$, $NRI < 0$)。见表 4。

2.4.3 CD81、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量及三者联合预测 RSA 的价值 CD81、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量及三者联合预测 RSA 的 ROC 曲线见图 2B。比较 CD81、HIF-1 α 、VEGF 蛋白及三者联合中任意两组因子的面积之间差异、95% CI、Z 值、P 值、NRI 值,结果显示: CD81、HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达量三者中任意两因子预测 RSA 的效果无明显差异性($P > 0.05$),任一因子与三者联合预测比较,均有统计学意义($P < 0.05$, $NRI < 0$)。见表 5。

2.4.4 ROC 曲线分析 CD81、HIF-1 α 、VEGF mRNA 联合与 CD81、HIF-1 α 、VEGF 蛋白联合预测 RSA 的价值 CD81、HIF-1 α 、VEGF mRNA 联合与 CD81、HIF-1 α 、VEGF 蛋白联合预测 RSA 的 ROC 曲线见图 2C。

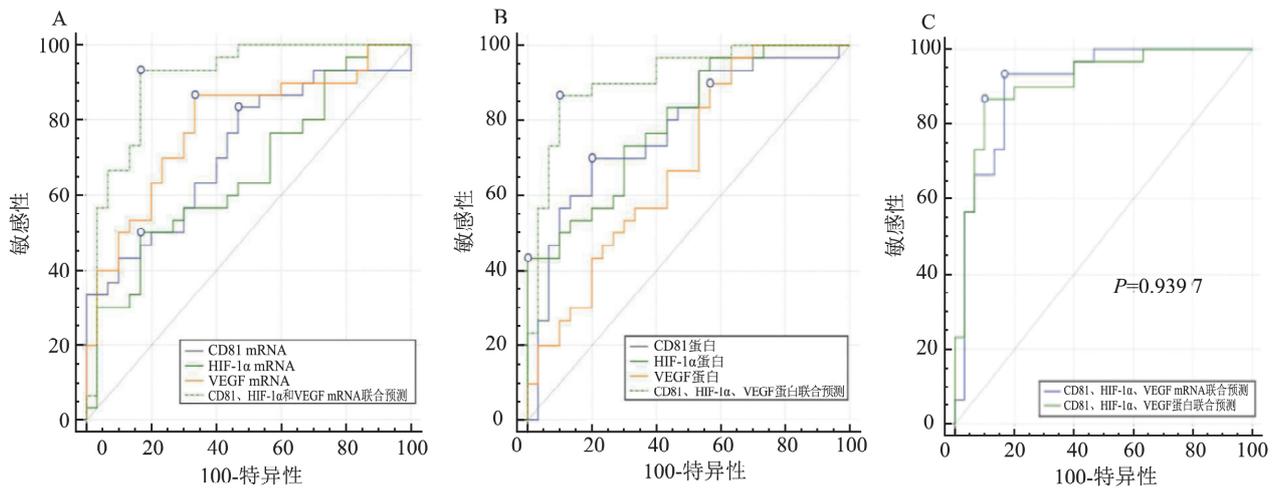


图2 ROC 曲线分析 CD81、HIF-1α、VEGF 对 RSA 的预测价值

A: CD81、HIF-1α、VEGF mRNA 表达量及三者表达量联合预测 RSA 的 ROC 曲线; B: CD81、HIF-1α、VEGF 蛋白表达量及三者联合预测 RSA 的 ROC 曲线; C: CD81、HIF-1α、VEGF mRNA 与 CD81、HIF-1α、VEGF 蛋白联合预测 RSA 的 ROC 曲线; o: Youden 指数

表4 CD81、HIF-1α、VEGF mRNA 表达量及三者联合预测 RSA 的价值比较

因子预测比较	面积之间的差异	95% CI	Z 值	P 值	NRI
CD81 vs HIF-1α	0.061	-0.152 ~ 0.274	0.562	0.574	>0
CD81 vs VEGF	0.064	-0.082 ~ 0.211	0.860	0.390	<0
HIF-1α vs VEGF	0.126	-0.079 ~ 0.330	1.203	0.229	<0
CD81 vs 联合预测	0.186	0.059 ~ 0.312	2.877	0.004	<0
HIF-1α vs 联合预测	0.247	0.109 ~ 0.384	3.511	<0.001	<0
VEGF vs 联合预测	0.121	0.016 ~ 0.226	2.260	<0.05	<0

表5 CD81、HIF-1α、VEGF 蛋白表达量及三者联合预测 RSA 的价值比较

因子预测比较	面积之间的差异	95% CI	Z 值	P 值	NRI
CD81 vs HIF-1α	0.018	-0.151 ~ 0.186	0.207	0.836	>0
CD81 vs VEGF	0.092	-0.058 ~ 0.242	1.204	0.229	>0
HIF-1α vs VEGF	0.110	-0.086 ~ 0.306	1.099	0.272	>0
CD81 vs 联合预测	0.132	0.028 ~ 0.236	2.494	0.013	<0
HIF-1α vs 联合预测	0.114	0.015 ~ 0.214	2.251	0.024	<0
VEGF vs 联合预测	0.224	0.093 ~ 0.356	3.342	0.001	<0

CD81、HIF-1α、VEGF mRNA 联合与 CD81、HIF-1α、VEGF 蛋白联合预测 RSA 的比较,两者之间 ROC 曲线下面积差异为 0.004, 95% CI: -0.111 ~ 0.120, Z = 0.0756, P = 0.9397, 说明两种联合预测的价值无差异性。

3 讨论

3.1 CD81 与 RSA 之间的关系 CD81 是四次跨膜蛋白,其在 B 细胞和 T 细胞突触形成中起重要作用,并调节 B 淋巴细胞中 CD19 的表达,参与细胞生长、运动、信号转导及骨髓归巢^[8]。有研究^[9]表明 CD81 可通过依赖性 Rac 通路抑制促炎性介质释放和激活细胞毒性 T 细胞或通过调节在血管发生中起重要作用的各种分子如 VEGF 进行免疫控制。此

外,Jauniaux et al^[6]发现导致流产的大多数妊娠被认为是胎盘有缺陷引起的,这与孕妇螺旋动脉未发生生理变化相关。RSA 病因学研究^[10]显示 RSA 组织滋养层细胞增殖和迁移受到抑制,可减少血管生成。Shen et al^[7]研究发现高表达 CD81 降低细胞滋养细胞的侵袭能力,可通过抑制滋养细胞的侵袭来影响子宫螺旋动脉重塑,从而导致胎盘浅着床。本研究中,RSA 患者绒毛组织中 CD81 mRNA 和蛋白表达均高于正常早孕组,且 RSA 组 CD81 mRNA 和蛋白表达量均与 VEGF 呈负相关性,基于上述,推测高表达 CD81 可能抑制 VEGF 的表达,从而抑制血管再生。此外,高表达 CD81 可降低细胞滋养细胞的侵袭能力,从而可导致血管直径显著减小,参与 RSA 的发病。因此,CD81 也可作为评估 RSA 发生

的重要检测指标。

3.2 VEGF 与 RSA 之间的关系 VEGF 是内皮细胞的特异性促分裂原和存活因子,也是生理和病理条件下血管生成的主要介质^[11]。VEGF 作为血管生成的主要因素,越来越多的研究^[12]表明血管形成和(或)功能异常在 RSA 的形成中发生重要作用。已有研究^[13-14]表明,VEGF 在妊娠初期的胚胎发育和生殖功能中参与生理性胎盘血管生成,并且与 RSA 发生和发展的多个步骤密切相关。先前的研究^[15]表明,早期妊娠丢失与低表达 VEGF 相关,并且 VEGF 表达改变可能有助于 RSA 的发生。本研究中,RSA 患者绒毛组织中 VEGF mRNA 和蛋白表达量均高于正常早孕组,与 Plaisier et al^[16]和对 RSA 病例的早期胎盘妊娠滋养层中 VEGF 的表达研究一致。提示 VEGF 可参与女性 RSA 的发病机制,绒毛组织中 VEGF 可作为一个预测流产发生的指标。

3.3 HIF-1 α 与 RSA 之间的关系 HIF-1 α 是一种转录因子,通过结合低氧反应元件来调节对低氧的适应性转录反应。在常氧条件下,HIF-1 α 也能调节人绒毛滋养层细胞中基质胶诱导的血管内分化。低氧时,可通过诱导 VEGF 等血管生成相关基因的表达^[17]。在妊娠早期,滋养层细胞的发育处于相对低氧的环境中,因此其适应低氧环境是成功妊娠的关键。如果过度低氧或合并炎症发展,这种调节可能会受损,导致细胞存活和绒毛外滋养细胞分化失败。这种失败不仅在侵袭性方面,而且表现在血管内分化方面^[18]。Fukushima et al^[17]对 HIF-1 α 在调节子宫内膜反应性 EVT 的血管内分化中的研究发现抑制 HIF-1 α 上调可抑制低氧反应元件转录活性、VEGF 诱导、ITGAV/ITGB3 聚集等最终抑制血管形成。有研究^[19]显示 HIF-1 α 在稽留流产中的表达量高于人工流产。本研究中,RSA 患者绒毛组织中 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达量高于正常早孕组,与其研究结果一致。谢华等^[20]对小鼠持续低氧模型建立研究中发现低氧前 4 周 HIF-1 α 表达水平增加,在低氧 4 周时达高峰,然后开始下降,低氧 6 周时的表达水平虽较前下降,但仍高于 0 周水平。本研究中 RSA 绒毛组织中 HIF-1 α 表达高于正常早孕组,提示 RSA 绒毛组织处于低氧状态。Pearson 相关性分析显示 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达量与 VEGF 均呈正相关性,提示 HIF-1 α 可能参与调控 VEGF 的表达。长期低氧时,虽然 HIF-1 α 水平高于正常,但是可严重影响绒毛血管生成,进而导致 RSA 的发生。因此,绒毛组织中 HIF-1 α 检测可能成为评估自然流

产发生风险的潜在工具。

成功的妊娠取决于足够的绒毛血管生成,只有这样才能提供充足的血供。对 RSA 新型生物标志物的发现不仅对 RSA 的诊断和临床随访具有重要意义,而且对于确定新的治疗策略也具有重要意义。本研究中对 CD81、VEGF、HIF-1 α mRNA 及三者联合进行 ROC 曲线分析显示,CD81、VEGF、HIF-1 α 在预测 RSA 发生中无明显差异性,但 CD81、VEGF、HIF-1 α 三者联合在预测 RSA 发生中优于任一单一因子。因此,单个预测因子诊断 RSA 的预测价值较联合预测 RSA 的价值低,说明 RSA 的病因与多个因子有关,单个因子预测 RSA 的发生,准确性较低。此外,绒毛组织中 CD81、VEGF 及 HIF-1 α 对妊娠结局的预测价值尚需进一步的大样本量研究来证实。

综上,RSA 的发生和 CD81、VEGF 及 HIF-1 α 的异常表达相关,当机体正常的胎盘血管网络形成受阻时,易影响胚胎着床,进而导致流产的发生;另一方面,关于 CD81、HIF-1 α 、VEGF 在 RSA 中的作用机制,本实验未进行相关研究,此为实验的局限性。本研究将在此基础上,通过进一步的功能调控性实验探索上述各细胞因子在 RSA 中的具体作用机制,为临床治疗提供新的视角。

参考文献

- [1] 刘云云,向卉芬,曹云霞. ANXA5 单核苷酸多态性 rs2306413 在中国汉族人群中不明原因性复发性流产的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(10): 1517-20.
- [2] Qian Y, Wang X, Ruan H, et al. Circular RNAs expressed in chorionic villi are probably involved in the occurrence of recurrent spontaneous abortion[J]. *Biomed Pharmacother* 2017, 88: 1154-62.
- [3] 韩慧敏,舒明明,揣云海,等. 胚胎植入前遗传学筛查在复发性流产及高龄患者中的应用[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(12): 1951-5.
- [4] Xu X, Du C, Li H, et al. Association of VEGF genetic polymorphisms with recurrent spontaneous abortion risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One* 2015, 10(4): e0123696.
- [5] Cowden Dahl K D, Fryer B H, Mack F A, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(23): 10479-91.
- [6] Jauniaux E, Poston L, Burton G J. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution[J]. *Hum Reprod Update* 2006, 12(6): 747-55.
- [7] Shen L, Diao Z, Sun H X, et al. Up-regulation of CD81 inhibits cytotrophoblast invasion and mediates maternal endothelial cell dysfunction in preeclampsia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114(8): 1940-5.
- [8] Binder M, Bacher U. The role of CD81 for plasma cell dyscrasias[J]. *Leuk Res* 2014, 38(3): 292-3.
- [9] Martínez del Hoyo G, Ramírez-Huesca M, Levy S, et al. CD81 con-

- trols immunity to *Listeria* infection through rac-dependent inhibition of proinflammatory mediator release and activation of cytotoxic T cells[J]. *J Immunol*, 2015, 194(12): 6090–101.
- [10] Hu Y, Li P, Hao S, et al. Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(8): 923–9.
- [11] Bautch V L. VEGF-directed blood vessel patterning: from cells to organism[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2(9): 2196–207.
- [12] Torry D S, Hinrichs M, Torry R J. Determinants of placental vascularity[J]. *Am J Reprod Immunol* 2004, 51(4): 257–68.
- [13] Meher A, Sundrani D, Joshi S. Maternal nutrition influences angiogenesis in the placenta through peroxisome proliferator activated receptors: a novel hypothesis [J]. *Mol Reprod Dev*, 2015, 82(10): 726–34.
- [14] Bardin N, Murthi P, Alfaidy N. Normal and pathological placental angiogenesis[J]. *Biomed Res Int* 2015, 2015: 354359.
- [15] Amirchaghmaghi E, Rezaei A, Moini A, et al. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Cell J*, 2015, 16(4): 538–45.
- [16] Plaisier M, Dennert I, Rost E, et al. Decidual vascularization and the expression of angiogenic growth factors and proteases in first trimester spontaneous abortions [J]. *Hum Reprod*, 2009, 24(1): 185–97.
- [17] Fukushima K, Murata M, Hachisuga M, et al. Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates matrigel-induced endovascular differentiation under normoxia in a human extravillous trophoblast cell line [J]. *Placenta*, 2008, 29(4): 324–31.
- [18] Genbacev O, Zhou Y, Ludlow J W, et al. Regulation of human placental development by oxygen tension[J]. *Science* (New York, NY), 1997, 277(5332): 1669–72.
- [19] Fang Y, Yu S, Ma Y, et al. Association of Dll4/Notch and HIF-1 α -VEGF signaling in the angiogenesis of missed abortion [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70667.
- [20] 谢 华. 持续低氧致慢性鼻-鼻窦炎小鼠 HIF-1 α 、IL-17、VEGF、NF- κ B 因子表的时序性及解剖部位差异性和机制研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.

The expression of tetraspanin CD81 ,hypoxia-inducible factors-1 α and vascular endothelial growth factor in recurrent spontaneous abortion

Yu Yanru ,Xu Yajuan ,Zhai Shanshan ,et al

(*Dept of Obstetrics and Gynecology ,The Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University ,Zhengzhou 450052*)

Abstract Objective To explore the expression and significance of tetraspanin CD81 , hypoxia-inducible factors-1 α , vascular endothelial growth factor(VEGF) in placental villus of recurrent spontaneous abortion(RSA) patients. **Methods** Sixty patients were enrolled in the study , including 30 patients diagnosed RSA early pregnancy and abortion of 30 patients of early pregnancy. The levels of CD81 , HIF-1 α and VEGF in placental villus were determined by real-time PCR and Western blot. Pearson correlation analysis was used to understand the correlation between CD81 , VEGF and HIF-1 α . The ROC curve was used to evaluate the predictive value of CD81 , VEGF and HIF-1 α for recurrent spontaneous abortion. **Results** ① The levels of CD81 and HIF-1 α mRNA in the villus tissues of RSA group were higher than that in the normal early pregnancy group. the level of VEGF mRNA was lower than that of the normal early pregnancy group , and the differences were statistically significant($P < 0.05$) , respectively. ② The levels of CD81 and HIF-1 α protein in women's villus tissues in RSA group were higher than those in normal early pregnancy group. In the normal early pregnancy group , the VEGF protein level was lower than that in the normal early pregnancy group , and the difference was statistically significant($P < 0.05$) , respectively. ③ In the Pearson correlation analysis , VEGF was negatively correlated with CD81 in the RSA group and positively correlated with HIF-1 α . There were no correlations between the factors in the normal early pregnancy group. ④ ROC curve analysis showed that CD81 , HIF-1 α , VEGF and the combination of the three had a predictive value for RSA: there was no significant difference in the effect of any two factors on the expression of CD81 , HIF-1 α , and VEGF($P > 0.05$) . The factors were meaningful compared with the three-way combination prediction($P < 0.05$, $NRI < 0$) . **Conclusion** In the RSA group , VEGF expression is negatively correlated with CD81 and positively correlated with HIF-1 α . ROC curve predicts the occurrence of RSA , and the combined predictive value of CD81 , VEGF and HIF-1 α is better than single factor.

Key words recurrent spontaneous abortion; CD81; VEGF; HIF-1 α