

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.10.013

5 种 mRNA 和蛋白表达水平在宫缩乏力性产后出血诊断中的价值^{*}胡谢应,何丽梅,俞 菁,顾彦洁,龚 波[△]

(上海市长宁区妇幼保健院检验科,上海 200051)

摘 要:目的 探索热休克蛋白 27(Hsp27)、间隙连接蛋白 43(CX43)、RhoA、Rho 相关激酶(ROCK) I、ROCK II mRNA 和蛋白表达水平在宫缩乏力性产后出血诊断中的价值。方法 将 2015 年 9 月至 2018 年 4 月于该院分娩后发生宫缩乏力性产后出血的产妇纳入观察组($n=89$),未发生产后出血的产妇纳入对照组($n=90$)。比较两组产妇临床资料,子宫平滑肌收缩频率、幅度和活动力,子宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 与蛋白的表达量,并分析其与子宫平滑肌收缩活动力的相关性。结果 两组产妇年龄、体质指数、产次、新生儿体质量、孕周、凝血 4 项和国际标准化比值水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。观察组子宫平滑肌收缩频率、幅度和活动力小于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。观察组子宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 和蛋白表达量小于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 及蛋白表达量均与子宫平滑肌收缩活动力呈正相关($P<0.05$)。结论 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 及蛋白表达量的检测与子宫平滑肌的收缩能力相关,对诊断宫缩乏力性产后出血具有重要价值。

关键词:宫缩乏力性产后出血; 热休克蛋白 27; 间隙连接蛋白 43; RhoA; Rho 相关激酶

中图法分类号:R714.4

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)10-1358-04

The value of detecting Hsp27, CX43, RhoA, ROCK I, ROCK II mRNA and protein in the diagnosis of postpartum hemorrhage caused by uterine inertia^{*}

HU Xieying, HE Limei, YU Jing, GU Yanjie, GONG Bo[△]

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Changning District, Shanghai 200051, China)

Abstract: **Objective** To explore the value of mRNA and protein of heat shock protein 27 (Hsp27), connexin 43 (CX43), RhoA and Rho associated kinase (ROCK) I, ROCK II in the diagnosis of postpartum hemorrhage due to uterine inertia. **Methods** From September 2015 to April 2018, the patients with postpartum hemorrhage due to uterine weakness after deliver in Maternal and Child Health Hospital of Changning District were recruited into observation group ($n=89$) and patients without postpartum hemorrhage due to uterine weakness after deliver were recruited into control group ($n=90$). The clinical data, frequency, amplitude and activity of uterine smooth muscle contraction, expression of Hsp27, CX43, RhoA, ROCK I, ROCK II mRNA and protein in uterine smooth muscle were compared in them and the correlation between the expression of Hsp27, CX43, RhoA, ROCK I, ROCK II mRNA, protein and the contractile activity of uterine smooth muscle was examined. **Results** There were no significant differences on age, Body Mass Index, birth time, neonatal weight, gestational age, four items of coagulation and international standardized ratio in the two groups ($P>0.05$). The observation group's contractile frequency, amplitude and motility of uterine smooth muscle were smaller than those in the control group ($P<0.05$). The observation group's Hsp27, CX43, RhoA, ROCK I, ROCK II mRNA and protein in uterine smooth muscle were lower than those in the control group ($P<0.05$). The expression of Hsp27, CX43, RhoA, ROCK I, ROCK II mRNA and protein correlated positively with the contractile activity of uterine smooth muscle ($P<0.05$). **Conclusion** The detection of Hsp27, CX43, RhoA, ROCK I, ROCK II mRNA and protein expression related to the contractile activity of uterine smooth muscle, which is important for the diagnosis of postpartum hemorrhage due to uterine atony.

Key words: postpartum hemorrhage due to uterine inertia; heat shock protein 27; connexin 43; RhoA; Rho associated kinase

^{*} 基金项目:上海市长宁区卫生和计划生育委员会资助项目(20164Y012)。

作者简介:胡谢应,男,主管技师,主要从事产妇产后出血研究。 [△] 通信作者, E-mail:13661908202@163.com。

产后出血是造成世界范围内孕产妇死亡的主要原因,而子宫收缩功能受损引发宫缩乏力则是其主要原因^[1]。寻找引发宫缩乏力的分子发病机制可能有助于对宫缩乏力性产后出血的预防和治疗。热休克蛋白 27(Hsp27)可能在临产后子宫平滑肌中表达量增高,可通过作用于微丝结构等影响骨架动力学,从而影响平滑肌细胞^[2]。间隙连接蛋白 43(CX43)在多个组织器官中均有表达,可促进临近细胞间的信号传递,并参与子宫收缩的调控^[3]。Rho 相关激酶(ROCK)为 RhoA 效应分子,两者活化后可通过肌球蛋白轻链和肌球蛋白磷酸酶的磷酸化而影响平滑肌的收缩功能^[4]。上述因子均可参与子宫平滑肌收缩过程,为此,本研究就其 mRNA 和蛋白水平对宫缩乏力性产后出血的诊断价值进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将 2015 年 9 月至 2018 年 4 月于本院分娩后发生宫缩乏力性产后出血的 89 例产妇纳入观察组,同期于本院分娩未发生产后出血的 90 例产妇纳入对照组。排除合并妊娠期并发症、感染、凝血功能异常、精神异常,以及资料不全的产妇,所有研究对象均行剖宫产术,胎儿顺利娩出。所有研究对象均自愿参与本研究,并签署知情同意书。本研究通过了本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 于手术后将子宫下段切口上缘平滑肌切除一小部分,取其中约 10 mm×2 mm×2 mm 大小放入克亨氏液中进行张力检测,其余部分于一 80℃ 条件下保存。

1.2.2 临床资料收集 收集患者的临床资料,包括年龄、体质量指数(BMI)、产次、新生儿体质量、孕周,以及凝血 4 项,即凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB),并计算国际标准化比值(INR)。

1.2.3 肌张力检测 将所获 10 mm×2 mm×2 mm 大小子宫平滑肌组织置于温度设置为 37℃ 的浴槽中,槽内为克亨氏液,标本一端连接张力换能器,用张力换能器检测标本的收缩频率、幅度和活动力,前负荷为 2 g,操作于收集标本后 4 h 内进行。

1.2.4 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA

水平的测定 应用 qPCR 法检测,将标本于一 80℃ 冰箱中取出后采用美国 Biospec 珠磨式组织研磨器研磨,加入 TRIzol 试剂(Invitrogen 公司),离心后获得上清液,加异丙醇,离心后弃上清液,加入乙醇并轻轻晃动标本,离心,弃上清液并风干,获得总 RNA,采用 ThermoScientific 反转录试剂盒根据说明书操作进行反转录以获取 cDNA,采用德国 Eppendorf Mastercycler X50 梯度 PCR 仪进行基因扩增,参数设置:95℃ 120 s,95℃ 15 s,58℃ 60 s,上述为 1 个循环,循环数为 40 个,采用 2^{-ΔΔCt} 表示 mRNA 水平。Hsp27 F:5'-GCG ATC GCA TGG GAG CAG AAC TGC TTA G-3',R:5'-GGG TTT AAA CCA GGC GGC GAT CGG CTT TCC-3';CX43 F5'-TCT CGC CTA TGT CTC CTC C-3',R:5'-TGT AGT TCG CCC AGT TTT-3';RhoA F:5'-CAT CCG GAA GAA ACT GGT-3',R:5'-TCC CAC AAA GCC AAC TC-3';ROCK I F:5'-AAC CAT GTG ACT GAG TGC CC-3',R:5'-TCA GTG TGT TGT GCC AAA GC-3';ROCKII F:5'-CTC AGG CCC TTG ACT GCT AC-3',R:5'-TTT TGT GTT GGG GAA AGG AG-3'。引物序列由上海生工生物工程股份有限公司提供。

1.2.5 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II 蛋白表达 采用蛋白印迹法检测肌肉组织中 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II 蛋白水平,同上所述将标本取出后研磨,取上清液进行蛋白水平测定,调整好加样量。依次进行电泳、转膜、封闭、加入一抗封闭过夜、洗膜、二抗封闭、显影,得出蛋白条带图像。一抗及二抗由上海江莱生物科技有限公司提供。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。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;采用 Pearson 相关进行相关性分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料比较 两组产妇年龄、BMI、产次、新生儿体质量、孕周及凝血 4 项和 INR 比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

2.2 子宫平滑肌收缩频率、幅度和活动力 观察组产妇产后子宫平滑肌收缩频率、幅度和活动力小于对照组产妇,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

表 1 两组产妇临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	产次(次)	新生儿体质量(g)	孕周(周)
观察组	89	26.55±3.09	24.96±2.15	0.79±0.16	3 358.12±427.81	38.52±0.87
对照组	90	27.37±3.24	25.40±2.62	0.84±0.21	3 420.65±383.55	38.67±1.04
<i>t</i>		1.732	1.227	1.793	1.030	1.046
<i>P</i>		0.085	0.221	0.075	0.304	0.297

续表 1 两组产妇临床资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	INR	PT(s)	TT(s)	APTT(s)	FIB(g/L)
观察组	89	0.93±0.16	12.19±0.46	15.08±0.63	31.24±5.27	4.68±0.59
对照组	90	0.90±0.17	12.32±0.51	15.23±0.55	30.67±5.45	4.84±0.62
<i>t</i>		1.215	1.790	1.697	0.711	1.768
<i>P</i>		0.226	0.075	0.091	0.478	0.079

表 2 两组产妇产宫平滑肌收缩频率、幅度和活动力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	频率 (次/10 min)	幅度 (g)	活动力 (g·次/10 min)
观察组	89	2.26±0.40	2.17±0.35	6.12±1.14
对照组	90	2.69±0.51	2.50±0.49	7.73±1.22
<i>t</i>		6.280	5.189	9.120
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000

2.3 子宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 表达量 观察组产妇产宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 表达

量小于对照组产妇,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.4 子宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II 蛋白表达量 观察组产妇产宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II 蛋白相对表达量小于对照组产妇,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。

2.5 相关分析 Pearson 相关分析结果提示 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 及蛋白表达量均与子宫平滑肌收缩活动力呈正相关($P<0.05$),见表 5。

表 3 两组产妇产宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Hsp27	CX43	ROCK I	ROCK II	RhoA
观察组	89	0.83±0.14	0.79±0.20	0.75±0.22	0.76±0.15	0.87±0.24
对照组	90	1.01±0.03	1.03±0.09	0.99±0.06	1.01±0.12	1.00±0.13
<i>t</i>		11.863	10.333	9.933	12.305	4.499
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 4 两组产妇产宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	Hsp27	CX43	ROCK I	ROCK II	RhoA
观察组	89	0.31±0.05	0.07±0.02	0.32±0.08	0.30±0.06	0.40±0.11
对照组	90	0.36±0.07	0.11±0.04	0.37±0.05	0.34±0.07	0.53±0.14
<i>t</i>		5.504	8.476	5.008	4.103	6.912
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 5 各指标 mRNA 及蛋白表达量与子宫平滑肌收缩活动力的相关分析

统计值	mRNA					蛋白				
	Hsp27	CX43	ROCK I	ROCK II	RhoA	Hsp27	CX43	ROCK I	ROCK II	RhoA
<i>r</i>	0.615	0.384	0.718	0.656	0.337	0.394	0.631	0.337	0.409	0.563
<i>P</i>	0.000	0.016	0.002	0.024	0.008	0.031	0.000	0.038	0.000	0.014

3 讨 论

产后出血是分娩的诸多并发症之一,同时也是引起我国产妇死亡的最主要原因,其发病人数占分娩总人数的 3%左右。目前的研究认为,宫缩乏力、产道损伤、凝血与抗凝过程的失衡及胎膜或胎盘等因素均是造成出血的原因,而宫缩乏力则是最为常见的原

因^[6]。研究发现,ROCK 抑制剂可使宫缩乏力与非宫缩乏力性产后出血产妇的子宫收缩均受影响,且对非宫缩乏力性产后出血患者的影响更大,提示宫缩乏力的发生可能与 ROCK 水平的减少有关^[6]。Hsp27 可以与肌动蛋白相互作用,而对于 Hsp27 磷酸化的抑制可以影响子宫平滑肌的舒张和收缩^[7]。CX43 属于收

缩相关蛋白,对于 CX43 及其他收缩相关蛋白基因的调控有助于调节子宫肌层的收缩^[8]。动物实验表明,高龄母体的 CX43mRNA 表达水平较低龄母体低, CX43 的降低与子宫收缩时间和频率的改变有关^[9]。因此,本研究对比了发生与未发生宫缩乏力性产后出血产妇的 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 和蛋白表达水平,并且对这些指标与子宫收缩能力的相关性进行了探索。

本研究中,两组研究对象一般资料及凝血 4 项、INR 比较,差异无统计学意义($P>0.05$),提示两组研究对象具有较好的可比性。在此基础上,对两组研究对象子宫收缩情况进行了比较,结果发现观察组产妇产后子宫平滑肌收缩频率、幅度和活动力均小于对照组产妇,进一步说明了观察组产妇产后子宫收缩能力较差。而 qPCR 及蛋白水平检测结果表明,观察组产妇产后子宫平滑肌 Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 和蛋白表达量小于对照组产妇,提示上述指标可能参与了宫缩乏力性产后出血的发生,相关分析也验证了该假设。

Hsp27 是小分子热休克蛋白家族成员,可影响血管平滑肌细胞及子宫平滑肌细胞的增殖与生理功能,并且通过磷酸化与脱磷酸化发挥不同的作用^[10]。CX43 和 MAPK 信号通路是参与子宫收缩过程的重要通路,其中,MAPK 通路可以促使生物信号从细胞表面传导至细胞内,进而引起转录因子的活化,而活化的转录因子可以通过结合并调控 CX43 基因,使细胞间信号传递通路受影响,子宫平滑肌收缩时协调性受影响^[11]。RhoA 和 ROCK 均对机械刺激敏感,在牵张作用下可促使细胞骨架重塑,并且可以在受到刺激情况下在多种肌细胞中表达升高,可通过影响肌球和肌动蛋白促使干细胞的分化^[12],对于 ROCK 的抑制则有助于促使子宫平滑肌舒张^[13], RhoA、ROCK I、ROCK II 在子宫腺肌症患者中均高表达,且活性增强,而 RhoA/ROCK 信号通路的增强可能与患者子宫收缩异常有关^[14-15]。Hsp27 可以直接影响子宫平滑肌细胞的数量和生理功能, CX43、MAPK 和 RhoA/ROCK 信号通路则可以直接影响子宫收缩过程,从而通过不同的机制影响子宫平滑肌收缩,并参与其调控。

综上所述, Hsp27、CX43、RhoA、ROCK I、ROCK II mRNA 和蛋白水平均与子宫平滑肌收缩活动力呈正相关,均可调节子宫收缩过程,对于宫缩乏力性产后出血具有重要的诊断意义。

参考文献

[1] BISCHOFF K, NOTHACKER M, LEHANE C, et al. Lack of controlled studies investigating the risk of postpartum haemorrhage in cesarean delivery after prior use

of oxytocin: a scoping review[J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2017, 17(1): 1-13.

[2] 马薇, 周昌菊, 张卫社. 临产后子宫体部平滑肌高表达 HSP27 和 α B-crystallin[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(2): 334-340.

[3] 杨柳, 尹宏. 连接蛋白 43 介导机械应力刺激下骨重建的研究进展[J]. 广东医学, 2015, 36(19): 3075-3077.

[4] DOMOKOS D, DUCZA E, FALKAY G, et al. Alteration in expressions of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats; their roles in uterine contractions and onset of Labour[J]. J Physiol Pharmacol, 2017, 68(3): 439-451.

[5] 张方芳, 徐永莲, 刘兴会, 等. 产后出血原因及相关危险因素 135 例临床分析[J]. 实用妇产科杂志, 2014, 30(2): 144-146.

[6] 颜建英, 周志梅, 廖秋萍, 等. 蛋白激酶 $C\alpha$ 、 β 及 Rho 激酶对宫缩乏力性产后出血产妇产后子宫平滑肌收缩功能影响研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2015, 31(3): 235-238.

[7] YANG L, CHAI C Z, YAN Y, et al. Spasmolytic mechanism of aqueous licorice extract on Oxytocin-Induced uterine contraction through inhibiting the phosphorylation of heat shock protein 27[J]. Molecules, 2017, 22(9): 1-16.

[8] LI Y, LI H L, XIE N, et al. HoxA10 and HoxA11 regulate the expression of Contraction-Associated proteins and contribute to regionalized myometrium phenotypes in women[J]. Reprod Sci, 2018, 25(1): 44-50.

[9] PATEL R, MOFFATT J D, MOURMOURA E, et al. Effect of reproductive ageing on pregnant mouse uterus and cervix[J]. J Physiol, 2017, 595(6): 2065-2084.

[10] 张亚云, 林超, 孙鑫, 等. 雌激素介导的 HSP27 在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(2): 159-162.

[11] 丁平, 田友清, 陈国胜. 香附油滴丸抗痛经作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(1): 57-60.

[12] 马林, 唐康来, 周兵华, 等. 机械牵伸对体外大鼠肌腱干细胞 RhoA/Rho 相关蛋白激酶分子表达的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2014, 28(5): 639-643.

[13] 张新庄, 柯志鹏, 李娜, 等. 从网络角度研究元胡止痛胶囊治疗头痛与痛经的分子作用机制[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(20): 2323-2330.

[14] WANG S, DUAN H, ZHANG Y, et al. Abnormal activation of RhoA/ROCK- I signaling in junctional Zone smooth muscle cells of patients with adenomyosis[J]. Reprod Sci, 2016, 23(3): 333-341.

[15] SUN F Q, DUAN H, WANG S, et al. 17-Estradiol induces overproliferation in adenomyotic human uterine smooth muscle cells of the junctional Zone through hyperactivation of the estrogen Receptor-Enhanced RhoA/ROCK signaling pathway[J]. Reprod Sci, 2015, 22(11): 1436-1444.