

NEDD4 基因多态性与瘢痕妊娠关联性研究

余 芹, 彭 翠, 何倩影, 王 丽, 望丹丹, 谭卫荷

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(编号:A2018476)

作者单位: 511518 广东, 广州医科大学附属第六医院, 清远市人民医院妇产科

作者简介: 余 芹(1982 -), 女, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 围产医学和胎儿医学。E-mail: 396721604@ qq. com

通讯作者: 谭卫荷(1968 -), 女, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 研究方向: 围产医学和胎儿医学。E-mail: tan6806@ 163. com

[摘要] **目的** 研究 NEDD4 基因多态性与瘢痕妊娠的关联性。**方法** 选择 2018-01 ~ 2019-09 在该院就诊的 40 例孕妇为研究对象, 根据超声结果分为瘢痕妊娠组和非瘢痕妊娠组, 每组 20 例。抽取肘静脉血, 提取 DNA 样本。对 NEDD4 基因的 rs2271289、rs2303579、rs10518830 位点进行测序。比较两组基因型及等位基因频率。**结果** rs2271289 位点的基因型及等位基因频率在两组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 rs2271289 位点 TT 基因型相比, CC 基因型是促进瘢痕妊娠发生的危险因素($OR = 24.00, 95\% CI: 1.74 \sim 330.80$); 与 rs2271289 位点 T 等位基因相比, C 等位基因是促进瘢痕妊娠发生的危险因素($OR = 3.12, 95\% CI: 1.25 \sim 7.78$)。rs2303579 和 rs10518830 位点的基因型及等位基因频率在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** NEDD4 基因 rs2271289 位点的 CC 基因型及 C 等位基因可能是促进瘢痕妊娠发生的危险因素。

[关键词] 瘢痕妊娠; 基因; 危险因素

[中图分类号] R 714.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674 - 3806(2020)08 - 0778 - 04

doi:10.3969/j.issn.1674 - 3806.2020.08.09

Study on the association between NEDD4 gene polymorphism and scar pregnancy SHE Qin, PENG Cui, HE Qian-ying, et al. Department of Obstetrics and Gynecology, the Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Qingyuan People's Hospital, Guangdong 511518, China

[Abstract] **Objective** To study the association between NEDD4 gene polymorphism and scar pregnancy.

Methods Forty pregnant women who visited our hospital from January 2018 to September 2019 were selected as the research subjects. According to their ultrasound results, the patients were divided into the scar pregnancy group and the non-scar pregnancy group, with 20 cases in each group. Blood samples were drawn from cubital veins for extraction of DNA samples. The genetic loci of rs2271289, rs2303579 and rs10518830 of the NEDD4 gene were sequenced. The genotype and allele frequencies were compared between the two groups. **Results** The genotype and the allele frequency of rs2271289 locus were significantly different between the two groups($P < 0.05$). Compared with the TT genotype at rs2271289 locus, CC genotype was a risk factor for promoting scar pregnancy($OR = 24.00, 95\% CI: 1.74 \sim 330.80$); compared with the T allele at rs2271289 locus, the C allele was a risk factor for promoting scar pregnancy($OR = 3.12, 95\% CI: 1.25 \sim 7.78$). The genotypes and allele frequencies of rs2303579 locus and rs10518830 locus were not significantly different between the two groups($P > 0.05$). **Conclusion** The CC genotype and the C allele at rs2271289 locus of NEDD4 gene may be the risk factors for promoting scar pregnancy.

[Key words] Scar pregnancy; Genes; Risk factors

剖宫产术后瘢痕妊娠是指胚胎着床于子宫切口瘢痕处并生长发育, 是异位妊娠的一种^[1], 目前发病率为 0.04% ~ 0.13%^[2]。瘢痕妊娠危害人类健康, 其发病机制不明^[3]。有研究^[4~6]认为子宫内膜与瘢痕之间的窦道是其潜在的诱发因素, 剖宫产瘢

痕增生过度、瘢痕挛缩, 可导致子宫切口憩室, 而子宫切口憩室又与瘢痕妊娠的发生有一定关联^[7,8]。因此推断瘢痕挛缩导致子宫切口憩室的形成, 进而导致瘢痕妊娠发生。瘢痕形成的过程存在着复杂的遗传学改变, 2010 年日本学者发现 NEDD4 基因上存

在一个与瘢痕组织遗传倾向相关的单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)^[9]。2014年Ogawa等^[10]研究发现, NEDD4基因上的rs8032158位点与瘢痕疙瘩的发病有一定相关性。瘢痕组织相关SNP位点的发现为剖宫产瘢痕妊娠机制研究提供了新的思路。因此, 本研究基于美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的SNP数据库, 根据数据库中提供的SNP位点信息, 在NEDD4基因上选择了3个具有功能的SNP位点, 探讨遗传因素在剖宫产瘢痕妊娠形成中的作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2018-01~2019-09在广州医科大学附属第六医院妇产科门诊就诊的40例孕妇为研究对象, 根据超声结果分为瘢痕妊娠组和非瘢痕妊娠组, 每组20例。纳入标准:(1)育龄妇女, 既往有剖宫产手术史;(2)病历资料齐全。排除标准:(1)合并心、肺、肝、肾等慢性疾病;(2)合并其他遗

传性疾病;(3)宫颈妊娠;(4)宫腔内妊娠囊下移。所有纳入对象知情同意参加本研究, 留取2 ml肘静脉血备用。

1.2 诊断标准 (1)瘢痕妊娠, 符合以下条件^[11]: ①宫腔内无妊娠囊; ②宫颈内无妊娠囊; ③妊娠囊或者混合性包块位于子宫前壁下段瘢痕处; ④妊娠囊前方的宫壁肌层薄; ⑤孕囊或包块周边血流丰富, 呈高速低阻血流频谱。(2)子宫切口憩室, 阴道超声示剖宫产切口处凸向浆膜层的楔形或囊状无回声区, 内可有积液, 内透声欠佳, 边界模糊。(3)瘢痕增生, 组织损伤后机体在修复的过程中, 结缔组织过度增生。

1.3 目的基因和位点的选择 根据NCBI的SNP数据库提供的SNP位点信息, 在NEDD4基因上选择了3个具有功能的SNP位点(rs2271289、rs2303579、rs10518830), 见图1。SNP位点的筛选遵循以下3个原则:(1)所选的SNP位点位于编码区或者启动子区;(2)SNP位点在人群中有一定比例的分布;(3)在中国的人群中有一定的分布。

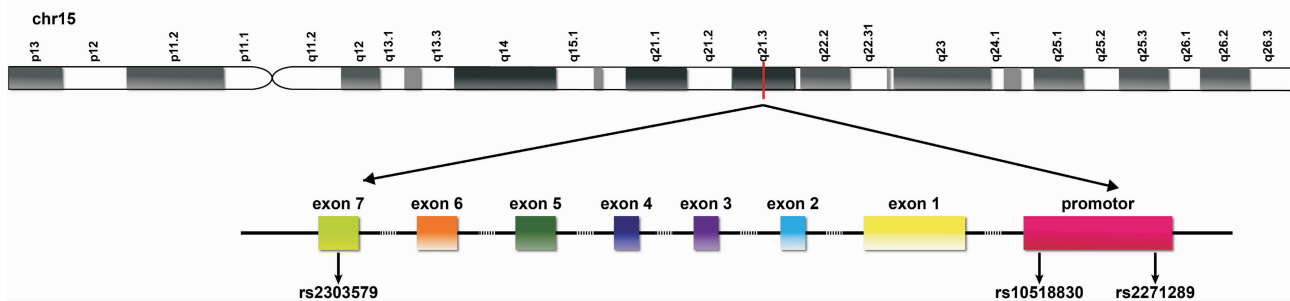


图1 rs2271289、rs2303579、rs10518830在NEDD4基因中的位置图

1.4 实验方法

1.4.1 提取DNA 取200 μl外周血, 应用QIAamp DNA Mini Kit DNA提取试剂盒(Qiagen公司)提取基因组DNA, 严格按照说明书进行操作。

1.4.2 引物设计及合成 通过NCBI-Gene数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)下载目的基因DNA序列, 采用Primer 5软件设计PCR引物, 将设计得到的扩增引物序列在加州大学圣克鲁斯分校(University of California Santa Cruz, UCSC)数据库(<http://genome.ucsc.edu>)中进行分析, 验证引物的特异性。所有引物序列送华大基因公司进行合成, 引物序列见表1。

表1 PCR引物序列

SNP 编号	引物序列
rs2271289	Primer F: 5' ACTGTACTGAGGAGGCG 3' Primer R: 5' ATCTGTGGGTGATGTTTA 3'
rs2303579	Primer F: 5' GTAAAGTCCCAAGGTCC 3' Primer R: 5' GCTGAGAATGGCAACA 3'
rs10518830	Primer F: 5' CTCGAGCTTCTTTCT 3' Primer R: 5' AGCATTAGGCATTCAG 3'

1.4.3 目的基因组扩增及测序 采用Sanger测序法对目的SNP位点进行测序。PCR反应总体积为30 μl, 包括3 μl 10 × Taq buffer、3 μl 2.5 Mm dNTP、3 μl 25 mM MgCl₂、1 μl Primer F引物、1 μl Primer R引物、1 μl Taq DNA Polymerase、1 μl DNA模板和17 μl ddH₂O。扩增反应条件: 94 °C 预变性3 min, 36个循环(94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s), 最后于72 °C延伸5 min, 4 °C保存。反应结束取5 μl PCR产物进行琼脂糖凝胶(2%)电泳鉴定PCR扩增产物。将扩增成功的PCR产物送华大基因公司进行DNA测序。

1.4.4 测序结果分析 采用Sequence Scanner v1.0软件分析测序峰图, 根据测序结果确定每个SNP位点的等位基因和基因型。

1.5 统计学方法 应用SPSS20.0统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用成组t检验; 计数资料以百分率(%)表示, 组间比较采用 χ^2 检验。采用二分类Logistic回归模

型分析各基因型及等位基因与瘢痕妊娠的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般情况比较 与非瘢痕妊娠组相比,瘢痕妊娠组年龄较小,瘢痕增生和子宫切口憩室发生率更高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组一般情况比较 $[(\bar{x} \pm s), n(\%)]$

组别	例数	年龄(岁)	瘢痕增生	子宫切口憩室
瘢痕妊娠组	20	32.35 ± 4.44	9(45.00)	15(75.00)
非瘢痕妊娠组	20	36.60 ± 4.01	2(10.00)	7(35.00)
t/χ^2	-	3.179	6.144	6.465
P	-	0.003	0.013	0.011

2.2 两组 rs2271289、rs2303579、rs10518830 位点基因型比较 瘢痕妊娠组 rs2271289 的 TT、CT、CC 基因型频率分别为 10.00% (2/20)、60.00% (12/20) 和 30.00% (6/20),非瘢痕妊娠组分别为 40.00% (8/20)、55.00% (11/20) 和 5.00% (1/20),两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。但两组在 rs2303579 和 rs10518830 位点的基因型比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。Logistic 回归分析结果显示,与 rs2271289 位点 TT 基因型相比,CC 基因型是促进瘢痕妊娠发生的危险因素($OR = 24.00, 95\% CI: 1.74 \sim 330.80$)。

表 3 两组 rs2271289、rs2303579、rs10518830 位点基因型比较(n)

组别	例数	rs2271289			rs2303579			rs10518830		
		TT	CT	CC	TT	CT	CC	GG	CG	CC
瘢痕妊娠组	20	2	12	6	5	10	5	3	9	8
非瘢痕妊娠组	20	8	11	1	6	10	4	4	11	5
P	-	0.029			1.000			0.693		

注: P 值为 Fisher's 确切概率法所得值

2.3 两组 rs2271289、rs2303579、rs10518830 位点等位基因比较 瘢痕妊娠组 rs2271289 位点 C 等位基因频率为 60.00% (24/40)、T 等位基因频率为 40.00% (16/40),非瘢痕妊娠组分别为 32.50% (13/40) 和 67.50% (27/40),差异有统计学意义($P < 0.05$)。rs2303579、rs10518830 位点等位基因在两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 4。Logistic 回归分析结果显示,与 rs2271289 位点 T 等位基因相比,C 等位基因是促进瘢痕妊娠发生的危险因素($OR = 3.12, 95\% CI: 1.25 \sim 7.78$)。

表 4 两组 rs2271289、rs2303579、rs10518830 位点等位基因比较(n)

组别	rs2271289		rs2303579		rs10518830	
	T	C	T	C	G	C
瘢痕妊娠组	16	24	20	20	15	25
非瘢痕妊娠组	27	13	22	18	19	21
χ^2	6.084		0.201		0.818	
P	0.014		0.654		0.366	

3 讨论

3.1 随着二胎政策的开放,许多既往剖宫产生育过一孩的妇女选择再次妊娠,导致瘢痕妊娠发病率逐年上升。该病常常合并子宫破裂及难以控制的大出血,严重危及孕妇的生命^[12]。因此,探寻瘢痕妊娠的发病机制也就显得非常重要。廖农等^[13]研究认为 p53 基因 codon 72 C 等位基因与剖宫产术后病理性瘢痕的发生有一定的关联性,提示剖宫产术后瘢痕形成与基因多态性有关,而剖宫产术后瘢痕增生与瘢痕妊娠的发生又有一定关联性。因此推断瘢痕妊娠也有可能和基因多态性相关。鉴此,本课题组对 20 例瘢痕妊娠孕妇和 20 例非瘢痕妊娠孕妇进行了研究。

3.2 本研究结果显示,相对于非瘢痕妊娠组,瘢痕妊娠组的子宫切口憩室和腹部切口瘢痕增生的发生率明显增高,再次验证瘢痕妊娠与子宫切口憩室及瘢痕增生存在关联。另外,本研究结果显示瘢痕妊娠组与非瘢痕妊娠组的年龄存在显著差异($P < 0.05$),但目前暂无研究报道提示年龄和瘢痕妊娠的发生有关联性,考虑与本研究纳入的病例数较少有关。

3.3 在本研究中,我们对 NEDD4 基因 3 个功能性 SNP 位点进行了筛选,发现相比于 rs2271289 位点的 TT 基因型人群,携带 CC 基因型的人群发生瘢痕妊娠的风险更高。另外,通过对等位基因频率进行统计分析发现,rs2271289 位点 C 等位基因是促进瘢痕妊娠发生的危险因素。NEDD4 基因编码的蛋白质是泛素连接酶家族的一员,主要负责编码泛素连接酶 E3。泛素连接酶 E3 由三部分组成,分别是 C2 结构域、WW 结构域和 HECT 结构域。C2 结构域位于氨基末端,HECT 结构域位于羧基末端^[14]。rs2271289 位于 NEDD4 基因的启动子区,该 SNP 位点碱基的改变(T > C)可能影响 NEDD4 基因的转录,进而影响 NEDD4 的表达水平,最终导致 NEDD4 蛋白水平的变化。有文献^[15]报道 NEDD4 蛋白表达水平下降可

能会影响成纤维细胞的生物学行为,而成纤维细胞生物学行为的异常是瘢痕增生的重要病理特点。其机制可能为 NEDD4 蛋白表达水平变化影响 β -Catenin 蛋白的表达,从而对 TGF- β 信号调节产生影响,促进 I 型胶原蛋白的合成,抑制胶原酶的转录。因此,rs2271289 可能通过影响 NEDD4 基因的表达,而影响成纤维细胞的功能,最终导致瘢痕妊娠的发生。另外,NEDD4 基因还会影响其下游基因的表达,其中可能有与瘢痕妊娠相关的蛋白及其相应的信号通路,但这需要进一步实验验证。

综上所述,NEDD4 基因的 rs2271289 位点可能与瘢痕妊娠存在关联,为制定相应干预对策,减少瘢痕妊娠的发生提供了理论依据。但本研究纳入样本量较小,其具体机制和结论仍有待进一步的实验研究验证。

参考文献

- 1 Fei H, Jiang X, Li T, et al. Comparison of three different treatment methods for cesarean scar pregnancy [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2019, 15:1377-1381.
- 2 李锦波,陈淑琴,孔凌智,等.经阴道手术治疗剖宫产疤痕妊娠的临床分析[J].*中山大学学报(医学科学版)*,2016,37(6):886-892.
- 3 Qian ZD, Weng Y, Wang CF, et al. Research on the expression of integrin β 3 and leukaemia inhibitory factor in the decidua of women with cesarean scar pregnancy [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2017, 17(1):84.
- 4 周漫天,吴坚,胡李男,等.剖宫产切口瘢痕妊娠26例的影像学特点与治疗分析[J].*中国临床新医学*,2016,9(3):223-227.
- 5 刘惠萍,王若光,彭桂华,等.剖宫产术后子宫切口瘢痕处妊娠13例的临床治疗分析[J].*中国临床新医学*,2013,6(9):863-865.
- 6 胡锐,朱俊勇,袁昊,等.剖宫产术后子宫瘢痕妊娠发病机制

的研究进展[J].*中华妇产科杂志*,2014,49(1):61-63.

- 7 Cheng XY, Cheng L, Li WJ, et al. The effect of surgery on subsequent pregnancy outcomes among patients with cesarean scar diverticulum [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2018, 141(2):212-216.
- 8 Fylstra DL. Ectopic pregnancy within a cesarean scar: a review [J]. *Obstet Gynecol Surv*, 2002, 57(8):537-543.
- 9 Nakashima M, Chung S, Takahashi A, et al. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(9):768-771.
- 10 Ogawa R, Watanabe A, Than Naing B, et al. Associations between keloid severity and single-nucleotide polymorphisms: importance of rs8032158 as a biomarker of keloid severity [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(7):2041-2043.
- 11 Sugawara J, Senoo M, Chisaka H, et al. Successful conservative treatment of a cesarean scar pregnancy with uterine artery embolization [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2005, 206(3):261-265.
- 12 Abdelazim IA, Abu-Faza M, Zhurabekova G, et al. Successful pregnancy outcome immediately after methotrexate treatment for cesarean section scar pregnancy [J]. *Gynecol Minim Invasive Ther*, 2019, 8(4):185-187.
- 13 廖农,鲁峰,赵伟,等. p53 基因第 72 位密码子多态性与剖宫产术后病理性瘢痕的相关性 [J]. *中华整形外科杂志*, 2013, 29(3):206-210.
- 14 Fotia AB, Cook DI, Kumar S. The ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2 show similar ubiquitin-conjugating enzyme specificities [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006, 38(3):472-479.
- 15 Chung S, Nakashima M, Zembutsu H, et al. Possible involvement of NEDD4 in keloid formation; its critical role in fibroblast proliferation and collagen production [J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2011, 87(8):563-573.

[收稿日期 2020-03-01][本文编辑 余军 吕文娟]

本文引用格式

余芹,彭翠,何倩影,等. NEDD4 基因多态性与瘢痕妊娠关联性研究 [J]. *中国临床新医学*, 2020, 13(8):778-781.