

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.34.017

VEGF 在妊娠期糖尿病巨大儿胎盘及脐带中的变化及意义

李金艳¹, 曾敏², 王秦川^{1△}

(重庆市中医院:1. 妇产科, 2. 病理科 400011)

[摘要] **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)在妊娠期糖尿病巨大儿脐带动脉血及静脉血中水平及其在胎盘、脐带血管的表达情况及意义。**方法** 选取 2014 年 5 月至 2015 年 5 月该院妇产科住院分娩的确诊为妊娠期糖尿病并分娩巨大儿的初产妇为巨大儿组($n=30$), 同期分娩的正常体质量新生儿初产妇为对照组($n=30$)。用放射免疫分析法分别测定巨大儿组及对照组脐静脉血及脐动脉血中 VEGF 水平, 用免疫组化法分别测定 VEGF 在巨大儿组及对照组胎盘及脐动脉、脐静脉的表达情况。**结果** 巨大儿组脐静脉血和脐动脉血清中 VEGF 水平分别为 (30.74 ± 4.82) pg/mL 和 (22.67 ± 5.65) pg/mL, 明显高于对照组 ($P < 0.01$)。VEGF 在巨大儿组胎盘、脐动脉及脐静脉表达 A 值分别为 0.454 ± 0.024 、 0.381 ± 0.023 、 0.367 ± 0.049 , 较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。**结论** 妊娠期糖尿病巨大儿脐血中 VEGF 水平增高, VEGF 在妊娠期糖尿病巨大儿脐带及胎盘组织中表达增强。

[关键词] 糖尿病; 妊娠; 胎盘; 脐血; 血管内皮生长因子; 巨大儿**[中图分类号]** R714.256**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)34-4805-03

Differential expression of vascular endothelial growth factor in placenta and corn in macrosomia of gestational diabetes mellitus

Li Jinyan¹, Zeng Ming², Wang Qinchuan^{1△}

(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, The Hospital of Traditional Chinese Medicine of Chongqing city, Chongqing 400011, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the value of vascular endothelial growth factor(VEGF) in umbilical venous and arterial blood and the changes of VEGF in placenta and corn of macrosomia delivered by gestational diabetes mellitus mothers so that we can explore the role of vascular endothelial growth factor in the development of macrosomia. **Methods** We studied 60 cases between May 2014 and May 2015, including 30 cases of macrosomias who's mothers were gestational diabetes mellitus patients as observation group and 30 cases of normal weight newborns who's mothers were healthy as control group. The umbilical venous and arterial blood from all cases were collected for detecting the level of VEGF by the radioimmunoassay method; The method of immunohistochemistry was used to explore the expression of VEGF in which were placenta, umbilical venous and umbilical arterial in all cases. **Results** The levels of VEGF in umbilical vein and umbilical arterial in observation group were (30.74 ± 4.82) pg/mL and (22.67 ± 5.65) pg/mL, respectively. Those were significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$); The expressing of VEGF in placenta, umbilical vein and umbilical artery in observation group were (0.454 ± 0.024) , (0.381 ± 0.023) , and (0.367 ± 0.049) , Which were significantly higher than the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The change of VEGF has strong relationship with the development of macrosomia in gestation diabetes mellitus. The increased VEGF in umbilical vein blood and umbilical arterial blood can lead to the induction of macrosomia; the VEGF over expression in placenta and cord vessel are important factor to accelerate fetal overgrowth.

[Key words] diabetes, gestational; placenta; fetal blood; vascular endothelial growth factor; macrosomia

随着全球代谢疾病流行, 妊娠期糖尿病(GDM)的发生率逐年升高^[1]。GDM 诱导外周血处于异常环境, 引起血管结构改变, 从而进一步影响胎盘发育及功能。异常的胎盘功能对胎儿代谢有严重影响, 导致巨大儿、肩难产及围产儿死亡的发生率增加。妊娠期糖尿病孕妇分娩的新生儿在成年期较容易出现肥胖、心血管疾病及糖尿病^[2]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能促进血管内皮细胞的增殖分裂, 影响胎盘血管发育。本研究进一步探讨了 VEGF 在妊娠期糖尿病巨大儿发生中的作用, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 5 月至 2015 年 5 月在本院妇产科住院分娩的确诊为 GDM 并分娩巨大儿的初产妇为巨大儿组(共 30 例), 选取同期分娩的正常体质量新生儿的初产妇为对照组(共 30 例)。两组均为单胎妊娠, 无胎膜早破、妊娠期高

血压、前置胎盘、妊娠期肝内胆汁淤积症、胎盘早剥等其他妊娠合并症及并发症, 两组均无糖尿病家族史。所有新生儿 Apgar 评分均大于 7 分, 无新生儿畸形, 无宫内感染。GDM 诊断标准^[2]: 在妊娠 24~28 周对孕妇进行 75 g OGTT。75 g OGTT 的诊断标准: 空腹及服糖后 1、2 h 的血糖值分别为 5.1、10.0、8.5 mmol/L。任何一点血糖达到或超过上述标准即诊断为 GDM。巨大儿的诊断标准为: 足月出生体质量大于 4.00 kg。正常体质量儿指出生体质量在 2.50~4.00 kg。巨大儿组产妇年龄为 21~37 岁, 平均 (25.1 ± 3.4) 岁; 平均孕周为 (37.6 ± 2.4) 周; 新生儿平均出生体质量为 (4.30 ± 0.24) kg。对照组产妇年龄为 22~36 岁, 平均 (25.4 ± 3.1) 岁; 平均孕周为 (38.1 ± 1.9) 周; 新生儿平均出生体质量为 (3.00 ± 0.22) kg。两组产妇在年龄及孕周上差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 有可比性。

1.2 方法

1.2.1 脐动脉血及脐静脉血中 VEGF 水平测定 经得产妇同意后,当胎儿娩出断脐后用空针分别抽取脐静脉血和脐动脉血各 3 mL 将其注入不抗凝的玻璃管中,然后静置 30 min,在 4 000 r/min 下进行离心 10 min,使血清分离,放在 -20°C 的进行保存。按照放射免疫分析方法进行 VEGF 水平测定^[3]。

1.2.2 胎盘组织、脐动脉及脐静脉采集 胎盘娩出后,取母面中央部位组织避开肉眼可见的明显钙化区及坏死区取大小约 $1.5\text{ cm}\times 1.5\text{ cm}\times 1.0\text{ cm}$ 组织两块。用眼科剪先剪去脐血管周围的华通胶组织,然后分别剪下脐动脉长约 1.0 cm,脐静脉长约 1.0 cm,将以上组织分别放置在 10% 甲醛溶液固定,常规石蜡包埋切片。

1.2.3 VEGF 在胎盘、脐动脉及脐静脉表达及定位 全部石蜡切片均常规脱蜡,过梯度乙醇水化。使用兔抗人 VEGF 单克隆抗体免疫组化试剂盒(购自北京中杉金桥生物技术有限公司),采用免疫组化 SP 法,操作步骤严格按照说明书要求进行。结果判断标准:阳性细胞为细胞质染色为棕黄色颗粒即为 VEGF 阳性反应的细胞;阴性细胞为细胞质未着色。显微镜下肉眼评估制片质量合格后采用 TD2000 软件系统图像分析系统测每张切片的 5 个视野中阳性染色部位的积分吸光度值(A),及测量区域的面积(去除血管腔面积),计算出平均吸光度值(mean density),并取平均值来表示 VEGF 的相对表达量。

1.3 统计学处理 用 SPSS19.0 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组脐动脉及脐静脉血 VEGF 水平比较 分析比较发现巨大儿组 GDM 脐动脉血 VEGF 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);GDM 脐静脉血 VEGF 水平明显高

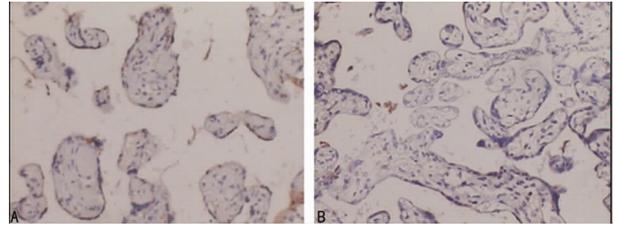
于对照组差异有统计学意义($P<0.01$);见表 1。

2.2 两组胎盘中 VEGF 的表达及定位 两组孕妇的胎盘中均有 VEGF 蛋白的表达。在胎盘中 VEGF 主要定位于胎盘的细胞滋养细胞,血管内皮细胞和绒毛间质细胞。巨大儿组胎盘滋养细胞、血管内皮细胞及绒毛间质细胞阳性着色明显增多。与巨大儿组比较,对照组的着色明显减少,见图 1。

表 1 两组脐静脉血及脐动脉血中 VEGF 水平对比($\bar{x}\pm s$, pg/mL)

组别	n	脐静脉血	脐动脉血
巨大儿组	30	22.67±5.65	30.74±4.82
对照组	30	12.38±1.89 ^a	14.91±2.75 ^a

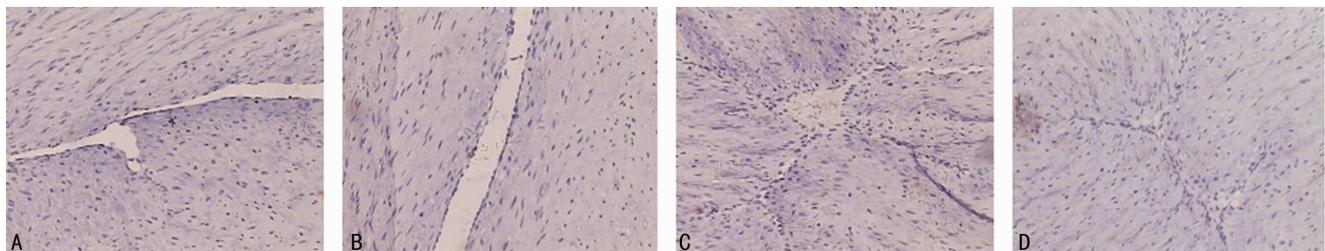
^a: $P<0.01$,与巨大儿组比较。



A: 巨大儿组; B: 对照组。

图 1 VEGF 在两组胎盘组织中的表达情况(免疫组织化学 $\times 200$)

2.3 两组脐带血管中 VEGF 的表达及定位 不论在脐静脉和脐动脉中 VEGF 的表达主要定位于血管内皮细胞和平滑肌细胞。巨大儿组脐静脉血管内皮细胞和平滑肌细胞阳性着色明显增多,与巨大儿组比较,对照组的着色明显减少,见图 2A、B。巨大儿组脐动脉血管内皮细胞和平滑肌细胞阳性着色明显增多,与巨大儿组比较,对照组的着色明显减少,见图 2C、D。



A: 巨大儿组脐静脉血管; B: 对照组脐静脉血管; C: 巨大儿组脐动脉血管; D: 对照组脐动脉血管。

图 2 两组脐带血管中 VEGF 的表达及定位(免疫组织化学 $\times 200$)

2.4 比较 VEGF 在两组中胎盘、脐静脉及脐动脉中表达平均 A 值比较 巨大儿组在胎盘、脐动脉及脐静脉中 VEGF 表达所测到的 VEGF 的平均 A 值均明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

表 2 两组胎盘、脐动脉及脐静脉中 VEGF 表达平均 A 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	胎盘	脐动脉	脐静脉
巨大儿组	30	0.454±0.024	0.367±0.049	0.381±0.023
对照组	30	0.245±0.026 ^a	0.202±0.040 ^a	0.222±0.041 ^a

^a: $P<0.01$,与巨大儿组比较。

3 讨 论

妊娠期胎盘是胎儿和母亲进行循环、物质交换的重要基础。糖尿病的环境对胎盘的形成功能有显著影响^[4-5]。母亲

和胎儿的高血糖不仅影响着胎盘蛋白的产生同时影响着胎盘的代谢、生长及发育^[6-7];而血管的形成和重塑对胎儿及胎盘生长是至关重要的。血管形成主要被许多前血管形成因子和抗血管形成因子调控。其中血管内皮生长因子起着重要作用。VEGF 在结构上是一个二聚体蛋白,它在血管内皮细胞增殖、存活和迁移中起着重要作用。血管内皮生长因子的生物作用主要通过结合在细胞膜上的酪氨酸激酶受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 介导。在妊娠早期,VEGF 是胎盘血管发育的驱动者,负责内皮细胞前体的分化、生长、聚集及脐带形成。VEGFR-2 在胎儿、胎盘的血管内皮细胞表达并介导细胞的有丝分裂,而 VEGFR-1 则位于胎盘的巨噬细胞和滋养细胞,并且是 VEGFR-2 信号重要的调控者^[8-9]。研究发现,在妊娠 6 周至妊娠 20 周时,VEGF 水平随着孕周逐渐增加至妊娠 26 周至妊娠 30 周。从妊娠 26~30 周至分娩时,VEGF 水平逐渐下降。在孕

早期人胎盘发育处于缺血/缺氧环境,从而引起了 VEGF 水平升高以满足胎盘生长需求。在孕中、晚期随着新陈代谢增加,VEGF 升高以促进胎盘血管生成和胎盘滋养细胞的增长。胎盘高度血管化是为了胎儿能从母亲得到足够的氧和营养物质,同时带走胎儿代谢^[10-11]。在 GDM 中,胎盘绒毛基质轻度水肿伴有过度表达的霍夫包尔细胞(即胎盘固有巨噬细胞),随着这些细胞数量增加引起了胎盘细胞因子(如瘦素、TNF2,白细胞介素)的大量释放,从而调整胎盘的代谢和内分泌功能。

为了满足胎儿生长需要,在整个妊娠期间胎盘血管快速扩张。胎盘或胎儿循环中各种生长因子刺激和调控血管发生和生长。缺氧是血管发生重要调控者。当血管中氧供应不能满足代谢需求时,缺氧通过调控多个前血管物质的转录水平、mRNA 稳定性及翻译来影响其表达。缺氧通过诱导 VEGF 表达来影响 VEGF 的行为。VEGF 不仅在血管形成和血管通透性中起重要作用,同时维持内皮细胞的生长。在 GDM 中胎儿高血糖和高胰岛素血症引起胎儿慢性缺氧。在 GDM 中胎盘处于高血管化提示因糖尿病代谢紊乱使胎盘血管具有较高的可塑性,高血糖和高胰岛素水平会引起激素、生长因子和促炎性细胞因子改变,从而影响胎盘血管的生成和血管发育。经研究已明确在 GDM 中母亲胎盘氧供是减少的。除了受损的氧供,胎儿氧需求是增加的,这是因为母亲的高血糖导致胎儿高血糖,致使胎儿代谢和激素发生改变^[12]。一旦胎儿胰腺开始分泌胰岛素,胎儿的高血糖导致了胎儿高胰岛素血症,两者同时影响胎儿代谢,随之发生的是胎儿氧需求增加引起胎儿慢性缺氧。通过测定胎儿脐血氧、脐血中促红细胞生成素及脐血中血红蛋白表面胎儿处于缺氧状态,这样胎儿的低氧水平上调了前血管生成因子(如 VEGF 或 FGF2)的转录合成。在 GDM 中胎儿慢性缺氧潜在的调控因子包括 VEGF、PIGF/FGF2^[13],这些因子促进了胎盘内皮细胞增殖、胎盘毛细血管增生和提高新形成血管的渗透性,从而增加了毛细血管表面积^[14]。GDM 中胎盘血管高度增生、血管化使交换面积增加能促进胎盘中氧扩散以代偿氧的供应不足。在妊娠中晚期,GDM 对胎盘影响主要表现在微血管重建,在 GDM 中毛细血管表面积增长是通过提高绒毛毛细血管的分支。进一步研究发现,GDM 对胎儿血管生长和血管发生的影响表现在 GDM 中脐带长度更长并伴发更高的脐带缠绕^[15]。本研究发现,巨大儿组脐血中 VEGF 水平明显高于对照组,说明因 GDM 中缺氧和高血糖上调了 VEGF 的水平。研究进一步发现巨大儿组在脐静脉和脐静脉的内皮细胞、平滑肌细胞中 VEGF 表达均高于对照组;同时巨大儿组胎盘中细胞滋养细胞、血管内皮细胞和绒毛间质细胞中 VEGF 的表达明显高于对照组。

综上所述,当发生 GDM 时,胎儿糖尿病环境来自于母亲,宫内环境受到破坏,胎儿高血糖引起胎儿高胰岛素血症和缺氧。缺氧是血管发生重要的调控者再加上糖尿病环境刺激了胎儿血循环中 VEGF 水平,导致脐带血管及胎盘血管中 VEGF 表达增强,诱导胎盘血管过度形成,加速胎儿发育,增加巨大儿发生的风险。

参考文献

[1] Kaaja R, Rönnemaa T. Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring[J]. Rev Diabet Stud, 2008, 5(4): 194-202.

[2] American Diabetes Association. Executive summary: standards of medical care in diabetes-2011 [J]. Diabetes Care,

2011, 34 Suppl 1: S4-10.

- [3] Stolz D, Christ-Crain M, Bingisser R, et al. Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procaldinin-guidance with standard therapy[J]. Chest, 2007, 131(1): 9-19.
- [4] Kim SY, Sharma AJ, Callaghan WM. Gestational diabetes and childhood obesity: what is the link? [J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2012, 24(6): 376-381.
- [5] Hiden U, Glitzner E, Ivanisevic M, et al. MT1-MMP expression in first-trimester placental tissue is upregulated in type 1 diabetes as a result of elevated insulin and tumor necrosis factor-alpha levels [J]. Diabetes, 2008, 57(1): 150-157.
- [6] Desoye G, Hauguel-de Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network [J]. Diabetes Care, 2007, 30 Suppl 2: S120-126.
- [7] Jirkovská M, Kucera T, Kaláb J, et al. The branching pattern of villous capillaries and structural changes of placental terminal villi in type 1 diabetes mellitus [J]. Placenta, 2012, 33(5): 343-351.
- [8] Taricco E, Radaelli T, Nobile de Santis MS, et al. Foetal and placental weights in relation to maternal characteristics in gestational diabetes [J]. Placenta, 2003, 24(4): 343-347.
- [9] Mandl M, Haas J, Bischof P, et al. Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human first trimester trophoblast cell models [J]. Histochem Cell Biol, 2002, 117(5): 391-399.
- [10] Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease [J]. Genome Biol, 2005, 6(2): 209.
- [11] Brouillet S, Hoffmann P, Benharouga M, et al. Molecular characterization of EG-VEGF-mediated angiogenesis: differential effects on microvascular and macrovascular endothelial cells [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(16): 2832-2843.
- [12] Escobar J, Teramo K, Stefanovic V, et al. Amniotic fluid oxidative and nitrosative stress biomarkers correlate with fetal chronic hypoxia in diabetic pregnancies [J]. Neonatology, 2013, 103(3): 193-198.
- [13] Pietro L, Daher S, Rudge MVC, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women [J]. Placenta, 2010, 31(9): 770-780.
- [14] Olszewska-Pazdrak B, Hein TW, Olszewska P, et al. Chronic hypoxia attenuates VEGF signaling and angiogenic responses by downregulation of KDR in human endothelial cells [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 296(5): 1162-1170.
- [15] Georgiadis L, Keski-Nisula L, Harju M. Umbilical cord length in singleton gestations: a finnish population-based retrospective register study [J]. Placenta, 2014, 35(4): 275-280.