

# Notch1、Notch4、Jagged1、DLL4 在重度子痫前期胎盘组织中的表达及意义

张冠莉

烟台市烟台山医院 山东 烟台 264000

**摘要：目的：**本研究通过比较 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 在正常足月妊娠孕妇和重度子痫前期孕妇胎盘组织表达情况，初步探讨 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 在胎盘形成以及早发型重度子痫前期发病中的作用。**方法：**选择 2021 年 1 月至 2023 年 6 月在烟台市烟台山医院产科住院分娩的 30 例重度子痫前期患者为研究组，以同时期的正常足月妊娠孕妇 30 例为对照组，采用实时荧光定量 PCR 检测两组胎盘中 Notch4、DLL4 的 mRNA 的表达水平，以免疫组织化学法检测胎盘中 Notch4 和 DLL4 的表达部位。**结果** 1. Notch1 主要在绒毛外滋养细胞和血管内皮细胞中，Notch4 在血管内皮和合体滋养层细胞中，Jagged1 和 DLL4 主要在胎盘血管内皮细胞中。2. 实时荧光定量 PCR **结果：**重度子痫前期组中 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 mRNA 的表达水平均显著低于正常足月妊娠组 ( $P < 0.05$ )。**结论：**在对患有严重子痫前期的患者的研究中，发现胎盘内 Notch1、Notch4、Jagged1 以及 DLL4 的 mRNA 水平普遍降低。这一现象表明，Notch 信号传导途径可能与严重子痫前期的形成和进展密切相关。

**关键词：**Notch1；Notch4；Jagged1；DLL4；重度子痫前期

妊娠期特有的一种疾病，名为子痫前期，它是孕产妇和围生儿死亡率高的关键因素之一。全球的研究者们普遍认为子痫前期的发病根源在于胎盘，将其归类为一种胎盘缺血性疾病。这种疾病的发生是由于子宫与胎盘之间的血液循环出现障碍，以及胎盘功能的不足，进而导致胎盘持续性缺氧。这种状态不仅会引发母体多种临床症状，也会影响到胎儿的正常生长发育。科学研究揭示了 Notch 信号通路在细胞分化、增殖以及凋亡过程中的重要性<sup>[1]</sup>。Notch 信号分子的活性改变，无论是上调还是下调，都可能导致血管发育异常，从而影响到胚胎的正常发育。近期的研究进展表明，Notch 信号通路可能与子痫前期的发病机制有关。已有研究在胎盘组织中观察到 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 的表达，但关于这些分子在子痫前期中的作用研究还相对较少。本研究旨在分析子痫前期患者胎盘组织内 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 的表达模式，深化对子痫前期发生机制的理解，为科学界提供更加深入的理论支持。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 选择 2021 年 1 月至 2023 年 6 月在烟台市烟台山医院产科住院分娩的 30 例重度子痫前期患者为研究组，年龄 20 ~ 38 ( $29.3 \pm 4.7$ ) 岁，孕 1~3 ( $1.8 \pm 0.7$ ) 次；以同时期的正常足月妊娠孕妇 30 例为对照组，年龄 21~37 ( $29.7 \pm 3.6$ ) 岁，孕 1~3 ( $1.9 \pm 0.6$ ) 次；2 组孕妇年龄、孕次等差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。子痫前期诊断及分类标准参照谢幸、孔北华、段涛主编的第 9 版《妇产科学》诊断标准，所有孕妇均无慢性高血压、糖尿病、心脏病、免疫系统疾病、甲状腺功能异常等病史，孕期无特殊用药史，并均对本研究知情同意。

1.2 标本的收集及处理 2 组产妇在分娩后，从胎盘母体面的中心部位，绕开梗死和钙化区域，取出大约 1 立方厘米的组织样本两份。其中一份用生理盐水清洗后，放入 4 摄氏度的 40 克 / 升的多聚甲醛溶液中进行固定。另一份则放入无菌的冻存管里，储存在温度为零下 80 摄氏度的冰箱中<sup>[2]</sup>。

1.3 在研究胎盘组织中 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 蛋白的分布时，采用了免疫组化的 SP (Streptavidin-Peroxidase) 技术进行检测。首先将胎盘组织固定并采用传统的石蜡包埋方法，然后切割成 4 微米厚的连续切片。为了消除内源性过氧化物酶的干扰，研究使用了 3% 的过氧化氢处理切片。接下来使用了 Santa Cruz 公司提供的针对人

Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 的一抗，这些一抗的稀释比例均为 1:50。在整个检测过程中，实验严格遵循了 SP 技术的操作手册。作为实验的阴性对照，使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 替代了一抗。最后利用病理图像分析系统对染色后的组织切片进行了观察和摄影记录。

1.4 采取实时荧光定量 PCR 技术，对胎盘组织内 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 的 mRNA 水平进行了测定，通过所提取的 RNA 被逆转录以形成 cDNA<sup>[3]</sup>。

1.5 PCR 引物的设计和合成是由北京博大泰克生物技术有限公司负责完成的。在研究 Notch 信号通路相关基因的表达时，专门为 Notch1 基因设计了一对特异性引物，其上游引物的序列为 5' -GCTGGACTGTGCGGAGCATGTA-3'，而下游引物的序列则为 5' -GGAAGATCATCTGCTGGCCGTG-3'。同样地，Notch4 基因的检测也采用了精心设计的引物，上游引物序列为 5' -CTTGAAGACCCCTTGCTCTCCC-3'，下游引物序列为 5' -ATGGGTTGGCTGAACAGAAGT-3'。Jagged1 基因的 PCR 检测引物序列也经过了精确设计，上游引物为 5' -GCGTCCACGGCATCTGTAAT-3'，下游引物为 5' -GGCTGATGAGTCCCACAGTAATT-3'。DLL4 基因的检测引物同样不例外，其上游引物序列为 5' -CGGGT-CATCTGCAGTGACAAC-3'，下游引物序列为 5' -AGTT-GACATCTTGGTCACAAAACAG-3'。作为内参基因，GAPDH 的引物序列也被一并设计，上游引物为 5' -AGCCT-CAAGATCATCAGCA-3'，下游引物为 5' -AGTCCTTC-CACGATACCAA-3'。PCR 反应的体系设置是根据实验的需要精心配比的，包括 CDNA0.8  $\mu$ L，2 $\times$ TransStart Top Green qPCR SuperMix 10  $\mu$ L，以及上游和下游引物各 0.4  $\mu$ L。为了保证反应的纯净性，还加入了去 RNase 水 8.4  $\mu$ L，使得总体积达到 20  $\mu$ L。在进行 PCR 扩增时，首先在 94 $^{\circ}$ C 下进行预变性 30 秒，以确保 DNA 模板完全变性，随后进行 1 个循环。这样的循环条件旨在确保引物能够特异性地结合并有效地扩增目标 DNA 片段。为了定量分析目的基因 mRNA 的表达水平，实验中通过比较 CT 值 (循环阈值) 的变化来反映 mRNA 的相对表达量，从而对基因表达的差异进行准确的量化。通过这种技术，可以对 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 等基因在不同样本中的表达水平进行比较，为进一步的生物学分析和疾病机理研究提供了重要的分子层面信息<sup>[4,5,6]</sup>。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析。

2 结果

2.1 胎盘组织中 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 的定位

免疫组织化学的分析手段揭示了在胎盘组织中，Notch1 蛋白在绒毛外滋养细胞和血管内皮细胞中的表达尤为显著。这种表达模式指出 Notch1 蛋白在这些细胞中可能发挥着重要的生物学功能。与此同时，Notch4 蛋白的存在主要集中在血管内皮细胞和合体滋养层细胞中，这种特定的表达分布暗示了 Notch4 在胎盘血管和滋养层细胞的生理过程中可能扮演着关键角色。对于 Jagged1 蛋白，其在胎盘的血管内皮细胞和绒毛滋养层细胞中也有着明显的表达，这一发现表明 Jagged1 蛋白在胎盘的血液循环和营养物质交换中可能具有重要作用。

表 1 胎盘组织 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 mRNA 表达水平比较

| 组别      | 例数 | Notch1      | Notch4      | Jagged1     | DLL4        |
|---------|----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 足月妊娠组   | 30 | 0.794±0.136 | 0.832±0.159 | 0.603±0.137 | 0.747±0.093 |
| 重度子痫前期组 | 30 | 0.469±0.105 | 0.671±0.142 | 0.461±0.094 | 0.592±0.073 |

3 讨论

在正常妊娠时，血管内的滋养层细胞通过一种特殊的逆流机制，沿着螺旋动脉的内壁移动，逐渐替换原有的血管内皮细胞。这种细胞的替换改变了血管的结构，将原本较为狭窄的肌性通道改造成了宽敞的低阻力血管。这样的改变对于建立起子宫与胎盘之间有效的血液循环至关重要，确保了胎儿能够获得充足的氧气和营养。然而，Fisher 和同事的研究揭示，在子痫前期的患者中，这一过程会受到明显的干扰。在这些病例中，滋养层细胞的侵入并不深入，仅仅停留在蜕膜层，而没有进一步渗透到子宫的浅层肌肉组织中。这种不充分的细胞侵入，被称作“胎盘浅植入”，它导致了滋养层细胞的侵袭能力和渗透性大大减弱，进而影响了血管内皮的正常成熟和子宫螺旋小动脉的适当重塑。这些变化会阻碍血液循环的建立，可能导致胎盘功能不全，进而引起胎儿的缺血和缺氧<sup>[7,8]</sup>。

Notch 信号通路在这一过程中扮演着至关重要的角色。它是一种在进化过程中高度保守的信号传递机制，而且 Notch 信号通路不仅参与细胞的增殖、分化和凋亡的调控，而且在多种组织和细胞的正常发育中发挥着核心作用。在整个妊娠期间，Notch 信号通路活跃在从子宫内膜和蜕膜到早期胚胎、早期绒毛组织以及中晚期胎盘组织的多个阶段。在这些不同的发育阶段，Notch 家族的成员各司其职，发挥着关键的生物学功能。特别是在胎盘的形成功能维持中，Notch 信号的正常调控对于确保母体和胎儿的健康至关重要<sup>[9,10]</sup>。因此，当 Notch 信号通路的功能受到干扰时，如在子痫前期患者中所观察到的那样，可能会对妊娠的正常进程产生深远的影响。

在本项研究中，发现 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 在健康胎盘中有显著的表达，这与 FiuzaUM 的研究结果相符。而在重度子痫前期的胎盘中，Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 的表达水平显著降低。Sahinz 也指出，在妊娠期高血压疾病的患者胎盘中，Notch 信号的表达减少，这暗示了母胎血液循环的平衡被破坏，内皮细胞功能受损，可能导致内皮素和血栓素的过量合成，引起孕妇全身血管的过度收缩，从而导致血压上升。

参考文献

[1]王雪淞,周林,李林材等.Notch 信号通路调控间充质干细胞的增殖与分化[J].中国组织工程研究,2024,28(19):3076-3083.

而 DLL4 蛋白的表达则主要在胎盘的血管内皮细胞中被观察到，这表明 DLL4 蛋白在胎盘血管的形成和功能维持中可能起着至关重要的作用。

2.2 胎盘组织中 Notch1、Notch4、Jagged1 和 DLL4 mRNA 表达水平的检测

正常足月妊娠组的 Notch1 mRNA 表达水平为 0.794±0.136，；Notch4 mRNA 的表达水平为 0.832±0.159；Jagged1 mRNA 的表达水平为 0.603±0.137；DLL4 mRNA 的表达水平为 0.747±0.093。相比之下，重度子痫前期组的 Notch1 mRNA 表达水平 0.469±0.105；Notch4 mRNA 的表达水平为 0.671±0.142；Jagged1 mRNA 的表达水平为 0.461±0.094；DLL4 mRNA 的表达水平为 0.592±0.073。两组比较差异均具有显著性意义（P<0.05）。见表 1。

[2]Perlman B E , Merriam A A , Lemenze A ,et al.Implications for preeclampsia: hypoxia-induced Notch promotes trophoblast migration[J].Reproduction: The official journal of the Society for the Study of Fertility, 2021(6):161.

[3]Fisher S J .The placental problem: Linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia[J].Reproductive Biology and Endocrinology, 2004, 2(1):53.DOI:10.1186/1477-7827-2-53.

[4]Zhan C , Sun Y , Pan J ,et al.Effect of the Notch4/Dll4 signaling pathway in early gestational intrauterine infection on lung development.[J].Experimental and Therapeutic Medicine, 2021(3).DOI:10.3892/ETM.2021.10404.

[5]Duan L , Schimmelmann M , Wu Y ,et al.CCN3 Signaling Is Differently Regulated in Placental Diseases Preeclampsia and Abnormally Invasive Placenta[J].Frontiers in endocrinology, 2020, 11:597549.DOI:10.3389/fendo.2020.597549.

[6]Wang R , Zou L .Downregulation of LncRNA-MEG3 promotes HTR8/SVneo cells apoptosis and attenuates its migration by repressing Notch1 signal in preeclampsia[J].Reproduction: The official journal of the Society for the Study of Fertility, 2020(1):160.

[7]Haider S , Pollheimer J , Knoefler M .Notch signalling in placental development and gestational diseases[J].Placenta, 2017(56-):56.

[8]Moldovan G E , Miele L , Fazleabas A T .Notch signaling in reproduction[J].Trends in Endocrinology and Metabolism, 2021.DOI:10.1016/j.tem.2021.08.002.

[9]Acar N , Soylu H , Avci S ,et al.Expressions of Notch signalling pathway members during early pregnancy in mice[J].Journal of Molecular Histology, 2023, 54(4):297-312.DOI:10.1007/s10735-023-10132-x.

[10]Sahin Z , Acar N , Ozbey O , et al. Distribution of Notch family proteins in intrauterine growth restriction and hypertension complicated human term placenta[J]. Acta Histochemica, 2011, 113(3): 270-276.