

# 子痫前期患者胎盘组织 *PHLDA2* 基因印迹初步研究\*

黄桂琼, 胡雅毅, 王晓东<sup>△</sup>

四川大学华西第二医院 妇产科 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041)

**【摘要】** 目的 观察子痫前期患者胎盘组织母源性印迹基因 *PHLDA2* 印迹状态。方法 收集 21 例正常妊娠和 19 例子痫前期患者胎盘组织, 抽提样本 DNA, PCR 扩增, 选择 *PHLDA2* 基因组变异比例较高的单核苷酸多态性(SNP)位点: rs13390 为外显子 1 中 C/T 多态性 (*PHLDA2-1*), rs1056819 为外显子 2 中 G/A 多态性 (*PHLDA2-2*), 直接测序筛选杂合子。将杂合子样本的 RNA 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增直接测序判断 *PHLDA2* 基因印迹状态。结果 正常妊娠与子痫前期胎盘 *PHLDA2-1*(外显子 1) SNP 位点(C/T)均未发现杂合子, 全为 T/T 纯合子; 胎盘 *PHLDA2-2*(外显子 2) SNP 位点(G/A)在子痫前期有 4 例(4/19)、正常妊娠有 5 例(5/21)杂合子表达, 两组杂合子表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。 *PHLDA2-2* 杂合子胎盘组织 *PHLDA2* cDNA 均只表达 G 单等位基因。结论 子痫前期胎盘 *PHLDA2*(*PHLDA2-1* 及 *PHLDA2-2*)基因多态性与正常妊娠相似, 未发现 *PHLDA2* 基因印迹丢失现象。

**【关键词】** 基因印迹 杂合子 印迹状态 子痫前期胎盘 *PHLDA2*

**Placental *PHLDA2* Gene Imprinting in Patients with Pre-eclampsia** HUANG Gui-qiong, HU Ya-yi, WANG Xiaodong<sup>△</sup>. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: wangxd\_scu@sina.com

**【Abstract】 Objective** To observe the imprinting status of maternally expressed gene pleckstrin homology-like domain, family A, member 2 (*PHLDA2*) in placental tissues from patients with pre-eclampsia. **Methods** Samples of placental tissues were collected from women with normal pregnancy ( $n=21$ ) and pre-eclampsia ( $n=19$ ). We examined two single nucleotide polymorphism (SNPs) which are prone to variation in *PHLDA2*: the C/T polymorphism in exon 1 and the G/A polymorphism in exon 2, corresponding to rs13390 (*PHLDA2-1*) and rs1056819 (*PHLDA2-2*), respectively. DNA PCR-direct sequencing and cDNA RT-PCR-direct sequencing were applied to detect the special-allelic imprinting status of *PHLDA2*. **Results** No heterozygote was found in placental tissues in relation to C/T polymorphism in *PHLDA2* exon 1. Differences in heterozygote in relation to G/A polymorphism in *PHLDA2* exon 2 were found between pre-eclampsia (4/19) and normal pregnancy (5/21), but without statistical significance. *PHLDA2* cDNA from heterozygotes (*PHLDA2-2*) were all exclusively monoallelically expressed. **Conclusion** Similar gene polymorphism of *PHLDA2* (*PHLDA2-1* and *PHLDA2-2*) in placental tissues was found between pre-eclampsia and normal pregnancies. No loss of imprinting (LOI) of *PHLDA2* was found in this study.

**【Key words】** Gene imprinting Heterozygotes Imprinting status Pre-eclampsia placenta *PHLDA2*

子痫前期是妊娠期特有疾病, 影响全球 5%~10% 的孕妇, 是孕产妇及围生儿死亡的重要原因, 其病因和发病机制尚未阐明, 可能与早期绒毛外滋养细胞(extravillous cytotrophoblasts, EVT) 异常浅层侵袭致胎盘浅着床<sup>[1]</sup>有关, 细胞滋养细胞的分化状态可能影响 EVT 的侵袭能力。有研究报道子痫前期与细胞滋养细胞广泛凋亡有关<sup>[2]</sup>, 细胞滋养

细胞凋亡及分化不良可能导致螺旋小动脉重铸仅发生在子宫蜕膜层, 子宫肌层螺旋动脉重铸障碍<sup>[3]</sup>。1998 年, Graves 首先提出子痫前期系胚胎母源性印迹基因异常性疾病<sup>[4]</sup>, 母源性印迹基因 2 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 2, *PHLDA2*) 在胎盘滋养细胞凋亡<sup>[5]</sup>与分化<sup>[6-8]</sup>过程中起着重要作用。*PHLDA2* 在子痫前期患者胎盘组织中印迹状态目前尚未见相关研究报道。本研究希望通过观察子痫前期胎盘组织 *PHLDA2* 基因印迹状态, 初步了解 *PHLDA2* 与子痫前期之间的关

\* 四川省科技厅科技支撑计划项目(No. 2011SZ0151)资助

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: wangxd\_scu@sina.com

系。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

收集 2011 年 11 月至 2012 年 4 月四川大学华西第二医院产科住院孕产妇的资料, 纳入其中以剖宫产终止妊娠的子痫前期患者 19 例(子痫前期组), 以及因其它原因(如骨盆狭窄、胎儿巨大等)剖宫产终止妊娠的正常妊娠者 21 例作为对照组进行研究。本研究均征得患者知情同意。子痫前期诊断标准参照人民卫生出版社全国高等学校教材《妇产科学》(第 8 版)。两组孕妇在年龄、孕次、产次、孕周方面差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 1.2 胎盘组织标本的收集

剖宫产胎盘娩出后, 立即取母体面中央区胎盘组织(避开钙化区)约 200 mg, 用无菌纱布吸干血迹, 编号放入液氮罐, 转运置  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存备用抽提样本 DNA。

### 1.3 胎盘组织 *PHLDA2* 基因印迹状态检测

**1.3.1 *PHLDA2* 基因印迹状态判断原理** 单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)主要是指在基因组水平上由单个核苷酸的变异所引起的 DNA 序列多态性, 可由单个碱基的转换、颠换、缺失或插入引起, 在 CG 序列上出现最为

频繁。*PHLDA2* 为父系印迹、母系表达的印迹基因, 如果检测到单等位基因表达, 则为正常, 如果检测到双等位基因表达, 则为印迹丢失。本研究从 NCBI 网站 SNP 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)选择 *PHLDA2* 基因组变异比例较高的 SNP 位点: rs13390 为外显子 1 第 93 对碱基 C/T 多态性(*PHLDA2*-1), rs1056819 为外显子 2 第 562 对碱基 G/A 多态性(*PHLDA2*-2)。若发现目标 DNA 序列多态性 SNP 位点共同存在 C/T 碱基或 G/A 碱基, 则该基因型为杂合子, 直接测序存在双等位基因表达(共同表达 C/T 或 G/A), 则为印迹丢失; 其它为纯合子, 直接测序为单等位基因表达(C 或 T, G 或 A), 则印迹状态正常。

**1.3.2 *PHLDA2* 基因杂合子筛选** 取 25 mg 胎盘组织切成小块置于 1.5 mL 离心管中液氮研磨, 利用 DNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物技术有限公司)对胎盘组织的总 DNA 进行提取。参照 PCR 反应试剂盒(TaKaRa, 大连), 对 *PHLDA2* 基因的多态性区域进行聚合酶链反应(PCR)扩增。PCR 扩增引物序列用 Primer Premier 5 软件设计, 引物由成都金杰生物技术有限公司合成, PCR 引物序列及反应条件见表 1。纯化 PCR 扩增产物、测序(由上海英骏 Invitrogen 生物技术有限公司完成)分析筛选 *PHLDA2* 杂合子。

表 1 DNA-PCR 扩增引物序列及反应条件

Table 1 The specific primers and reaction conditions for DNA-PCR

Gene	Primer sequences	PCR product (bp)	Annealing temperature/cycle times
<i>PHLDA2</i> -1	F: 5'-TCGGCAGCATGAAATCC- 3' R: 5'-TCCACGCAGTCCACCTTG- 3'	195	61 $^{\circ}\text{C}$ /34 cycles
<i>PHLDA2</i> -2	F: 5'-GGACCGGGGCTTTGGGAAAAA- 3' R: 5'-CCTCTGGGGAGGCTGCTTGAAA- 3'	621	64 $^{\circ}\text{C}$ /30 cycles
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CGCTCTCTGCTCCTCTGTT- 3' R: 5'-CCATGGTGTCTGAGCGATGT- 3'	81	—

**1.3.3 *PHLDA2* 基因印迹状态检测** 将 *PHLDA2* 杂合子胎盘组织进行 SNP 位点检测。采用 Trizol(Invitrogen 公司)一步法从胎盘组织中提取总 RNA, 变性琼脂糖凝胶检测 RNA 有无降解。采用 TaKaRa 公司逆转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA。*PHLDA2* 基因目的片段扩增引物上游 5'-GTCGGACCGAGGCTAGGA-3', 下游 5'-GGCGCCCGTGCAACGGAG- 3'(扩增长度 94 bp), 反应体系按试剂盒说明配制, 扩增反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 然后 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 63  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 循环 40 次, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。对 RT-PCR 扩增产物进行纯化、测序, 根据测序结果判定

*PHLDA2* 基因印迹状态。

### 1.4 统计学方法

计量资料经正态性检验, 数据呈正态性分布, 用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较采用  $t$  检验; 计数资料采用  $\chi^2$  及 Fisher 确切概率法检验,  $\alpha_{\text{双侧}} = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 子痫前期胎盘 *PHLDA2* 基因多态性

胎盘组织 *PHLDA2*-1 基因组 DNA(gDNA)测序图谱显示, 所有标本 *PHLDA2* 外显子 1 SNP 位点(C/T)均未发现杂合子, 全为 T/T 纯合子。见图 1A、表 2。

胎盘组织 *PHLDA2-2* 基因组 DNA(gDNA)测序图谱显示,19 例子痫前期胎盘组织中筛查出 4 例(21.1%)杂合子,21 例正常妊娠胎盘组织中筛选出 5 例(23.8%)杂合子,Fisher 确切概率法检验,子痫

前期与正常胎盘组织 *PHLDA2-2* 外显子 2 SNP (G/A)杂合表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见图 1B~1D、表 2。

2.2 子痫前期胎盘 *PHLDA2* 基因印迹状态

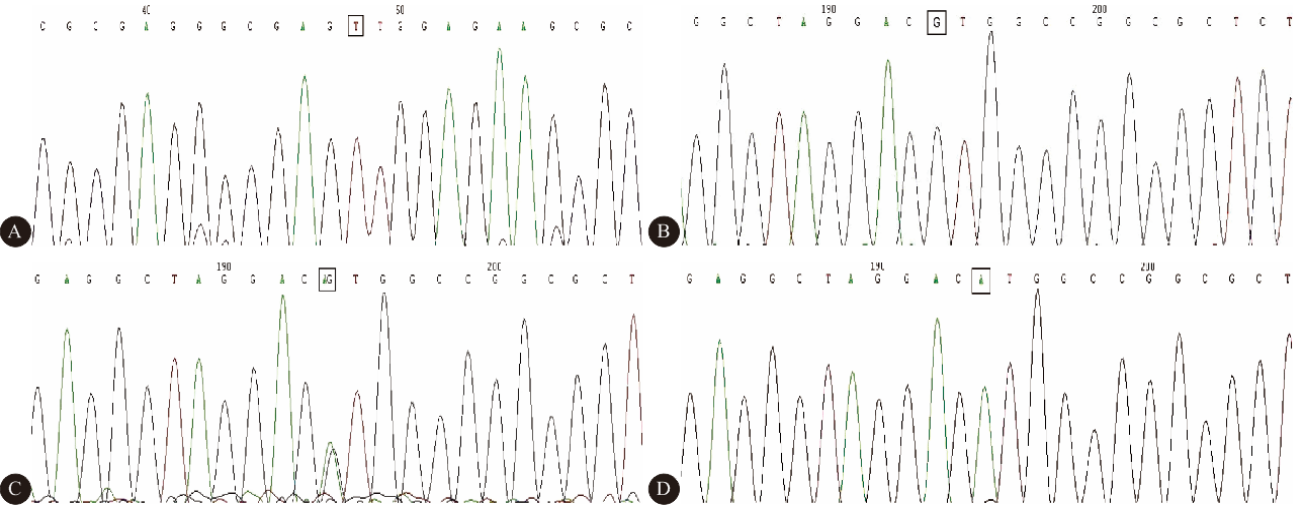


图 1 胎盘组织 *PHLDA2* 基因多态性分析

Fig 1 Analysis of *PHLDA2* polymorphism in placental tissues

A: Genomic placental DNA is homozygous for the T allele; B: Genomic placental DNA is homozygous for the G allele; C: Genomic placental DNA is heterozygous for the G and A alleles; D: Genomic placental DNA is homozygous for the A allele

表 2 胎盘组织 *PHLDA2* 基因多态性

Table 2 Genepolymorphism of *PHLDA2* in placental tissues

Group	n	Exon 1			Exon 2		
		C/T	C/C	T/T	G/A	G/G	A/A
Pre-eclampsia	19	0	0	19 (100%)	4 (21.1%)	15 (78.9%)	0
Control	21	0	0	21 (100%)	5 (23.8%)	15 (71.4%)	1(4.8%)

见图 2。4 例子痫前期及 5 例正常胎盘组织 *PHLDA2-2*(外显子 2)SNP(G/A)杂合子对应的胎盘组织 *PHLDA2* cDNA 直接测序,均只表达 G 单等位基因。结合子痫前期与正常胎盘组织 *PHLDA2* 外显子 1 SNP 位点(C/T),均未发现杂合子,全为 T/T 纯合子,说明本研究纳入的子痫前期和正常妊娠胎盘组织 *PHLDA2* SNP 位点均无双等位基因(C/T或G/A)表达,无 *PHLDA2* 基因印

迹丢失。

3 讨论

由于亲代父系和母系来源的染色体存在结构上的差异,仅来源于亲代一方的等位基因选择性地表达,另一方等位基因不表达或表达极弱,这种现象被称为基因印迹(genomic imprinting),具有基因印迹现象的基因被称作印迹基因(imprinted genes)。印迹基因常分为两大类:母源性印迹基因,即父系等位基因被印迹失活而沉默,母系等位基因表达;父源性印迹基因,即母系等位基因被印迹而沉默,父系等位基因发生表达<sup>[9]</sup>。

Graves<sup>[4]</sup>根据子痫前期特有的家族聚集现象首先提出子痫前期可能系胚胎父系印迹、母系表达的印迹基因突变所引起。Cnatingius 等<sup>[10]</sup>通过家族遗传连锁分析,筛选出一些与子痫前期显著相关的基因位点,并指出印迹基因的表达或沉默与子痫前期发病可能存在很大的关联。*PHLDA2* 为重要的

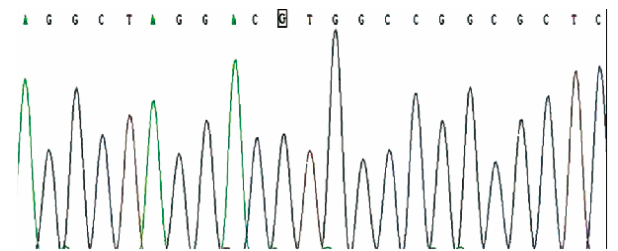


图 2 胎盘组织 *PHLDA2* 杂合子 *PHLDA2-2* cDNA 直接测序检测: G 单等位基因表达

Fig 2 Imprinting analysis of *PHLDA2-2* in placental tissues. The cDNA sequence shows monoallelic expression of G allele

母源性印迹基因,在胚胎期高度表达,尤其在人细胞滋养细胞、鼠迷路层滋养细胞,对滋养细胞分化过程起着重要调节作用<sup>[8]</sup>。由于其基因序列与促凋亡基因 *TDAG51* 高度相似,可诱导 Fas 表达及 Fas 介导的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。母源性印迹基因 *PHLDA2* 与细胞滋养细胞分化及凋亡存在关联。Constancia 等<sup>[11]</sup> 也认为子痫前期是母源性印迹基因异常相关性疾病。孕鼠模型敲除印迹基因 *CDKN1C*,会出现类似于子痫前期的临床症状<sup>[12]</sup>;子痫前期胎盘组织中存在 *H19* 印迹丢失,且印迹丢失与血压水平有关<sup>[13]</sup>; *PHLDA2* 与 *CDKN1C*、*H19* 均为母源性印迹基因且功能相近,参与细胞滋养细胞分化、细胞凋亡等。

印迹丢失(loss of imprinting, LOI)即印迹基因被印迹沉默不表达的父系或母系等位基因被激活,呈现双等位基因表达,导致印迹基因 mRNA 及蛋白水平的表达改变。印迹基因常通过印迹丢失参与疾病过程。滋养细胞过度增生的葡萄胎组织 *PHLDA2* 基因表达下降或缺失<sup>[14]</sup>,胎儿宫内发育迟缓胎盘组织 *PHLDA2* 的表达增加<sup>[15]</sup>,并有报道生长受限胎盘存在 *PHLDA2* 印迹丢失,且与其 mRNA 过度表达有关<sup>[16]</sup>。

前期研究发现,子痫前期胎盘组织 *PHLDA2* mRNA 和蛋白水平表达(论文待发表),但胎盘组织 *PHLDA2* 印迹状态与子痫前期之间的相关性尚无文献报道,为此,我们首次进行了此方面的研究。通过对胎盘组织 *PHLDA2*-1(外显子 1)、*PHLDA2*-2(外显子 2)基因组 DNA(gDNA)测序,发现正常妊娠与子痫前期胎盘 *PHLDA2* 外显子 1 SNP 位点(C/T)均未发现杂合子,全为 T/T 纯合子,子痫前期与正常妊娠胎盘 *PHLDA2*-2(外显子 2)SNP 位点(G/A)杂合表达无明显差异。说明子痫前期胎盘 *PHLDA2*(*PHLDA2*-1 及 *PHLDA2*-2)基因多态性与正常妊娠相似。对所有 *PHLDA2* 杂合子(*PHLDA2*-2)胎盘组织 *PHLDA2* cDNA 直接测序,均只表达 G 单等位基因,未发现子痫前期与正常妊娠胎盘存在 *PHLDA2* 基因印迹丢失现象。

而这一结论与 Apostolidou 等<sup>[17]</sup> 的研究结果一致。其通过研究 200 个来自足月妊娠的胎盘标本,发现 *PHLDA2* 的表达水平与出生体质量呈负相关,但没有发现 *PHLDA2* 基因印迹丢失;Diplas 等<sup>[18]</sup> 亦报道,胎儿宫内发育迟缓胎盘组织 *PHLDA2* 高表达,但未发现印迹丢失。

上述研究提示,除了印迹丢失外,*PHLDA2* 表达水平的改变可能存在其他调控机制,如

*PHLDA2* 基因启动子调控<sup>[19]</sup>、印迹调控区域(imprinting control region, ICR)低甲基化或突变失活<sup>[20]</sup>等。Plushch 等<sup>[21]</sup> 学者评估人自然流产和死胎印迹基因的甲基化水平时发现,遗传调控缺陷与无原因的妊娠丢失明显相关,尤其在孕中期。Doria 等<sup>[22]</sup> 报道自然流产和死胎 *PHLDA2* 在孕早期和孕中期明显上调,孕晚期与正常对照组相比无明显差异。子痫前期是不完全自然流产的一种形式,而子痫前期的胎盘病理生理基础发生在妊娠早期,临床症状多发生在 20 周后,且印迹基因对周围环境变化特别敏感,这是否暗示:在子宫螺旋动脉重铸活跃期,胎盘 *PHLDA2* 父系等位基因印迹丢失激活而异常表达,细胞滋养细胞凋亡及分化不良,子宫蜕膜层、子宫肌层螺旋小动脉重铸障碍,导致子痫前期发生;随着妊娠进展,*PHLDA2* 父系等位基因可能通过甲基化或组蛋白乙酰化而被重新印迹,*PHLDA2* 在妊娠中晚期恢复单等位基因表达? 在子痫前期发生发展过程中,胎盘 *PHLDA2* 印迹丢失可能只发生在子宫螺旋动脉重铸活跃期<sup>[17]</sup>? 由于 *PHLDA2* 在细胞滋养细胞中高度表达,在其它滋养细胞中少量表达或不表达<sup>[11]</sup>,也有可能随妊娠进展,细胞滋养细胞尤其是绒毛外滋养细胞减少,*PHLDA2* 杂合子发现率很低,可能导致 *PHLDA2* 印迹丢失出现假阴性现象。因此,子痫前期胎盘组织母源性印迹基因 *PHLDA2* 是否存在印迹丢失尚需进一步研究证实。

## 参 考 文 献

- Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*, 2005;60(12):807-816.
- DiFederico E, Genbacev O, Fisher SJ. Preeclampsia is associated with widespread apoptosis of placental cytotrophoblasts within the uterine wall. *Am J Pathol*, 1999;155(1):293-301.
- Fisher SJ. The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004;2:53.
- Graves JA. Genomic imprinting, development and disease—is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod Fertil Dev*, 1998;10(1):23-29.
- Qian N, Frank D, O'Keefe D, et al. The *IPL* gene on chromosome 11p15.5 is imprinted in humans and mice and is similar to *TDAG51*, implicated in Fas expression and apoptosis. *Hum Mol Genet*, 1997;6(12):2021-2029.
- Dunwoodie SL, Bedington RS. The expression of the imprinted gene *Ipl* is restricted to extra-embryonic tissues and embryonic lateral mesoderm during early mouse development. *Int J Dev Biol*, 2002;46(4):459-466. (下转第 128 页)

- p57<sup>kip2</sup> expression in prostate cancer. *Mol Cancer*,2014 Sep 12; 13;212. doi: 10.1186/1476-4598-13-212.
- 16 Jia H, Cong Q, Chua JF, *et al.* p57<sup>kip2</sup> is an unrecognized DNA damage response effector molecule that functions in tumor suppression and chemoresistance. *Oncogene*,2014 Sep 8. doi: 10.1038/onc.2014.287. [Epub ahead of print].
- 17 Avrahami D, Li C, Yu M, *et al.* Targeting the cell cycle inhibitor p57<sup>kip2</sup> promotes adult human  $\beta$  cell replication. *J Clin Invest*,2014;124(2):670-674.
- 18 Li X, Yang Z, Zeng Y, *et al.* Cell cycle-related genes p57<sup>kip2</sup>, Cdk5 and Spin in the pathogenesis of neural tube defects. *Neural Regen Res*,2013;8(20):1863-1871.
- 19 Lo HW. Akt destabilizes p57 (Kip2) : Akt at the converging crossroad? *Cell Cycle*,2013;12(6):870-871.
- 20 Chen CP. Syndromes and disorders associated with omphalocele ( I ): Beckwith-Wiedemann syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol*,2007;46(2):96-102.
- 21 Giurgescu C, Sanguanklin N, Engeland CG, *et al.* Relationships among psychosocial factors, biomarkers, preeclampsia, and preterm birth in African American women: a pilot. *Appl Nurs Res*,2014 Sep16. pii: S0897-1897(14)00118-9. doi: 10.1016/j.apnr.2014.09.002. [Epub ahead of print].
- 22 Jadoon A, Cunningham P, McDermott LC. Regulation of fatty acid binding proteins by hypoxia inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  in the placenta: relevance to pre-eclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*,2014 Sep 28. pii: S0952-3278(14)00148-3. doi: 10.1016/j.plefa.2014.09.004. [Epub ahead of print].

(2014 - 10 - 27 收稿,2014 - 11 - 14 修回)

编辑 余琳

(上接第 107 页)

- 7 Saxena A, Frank D, Panichkul P, *et al.* The product of the imprinted gene *IPL* marks human villous cytotrophoblast and is lost in complete hydatidiform mole. *Placenta*,2003;24(8-9):835-842.
- 8 Takao T, Asanoma K, Tsunematsu R, *et al.* The maternally expressed gene *Tssc3* regulates the expression of *MASH2* transcription factor in mouse trophoblast stem cells through the AKT-Sp1 signaling pathway. *J Biol Chem*,2012;287(51):42685-42694.
- 9 Swales AK, Spears N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction*,2005;130(4):389-399.
- 10 Cnattingius S, Reilly M, Pawitan Y, *et al.* Maternal and fetal genetic factors account for most of familial aggregation of preeclampsia: a population-based Swedish cohort study. *Am J Med Genet A*,2004;130A(4):365-371.
- 11 Constancia M, Kelsey G, Reik W. Resourceful imprinting. *Nature*,2004;432(7013):53-57.
- 12 Kanayama N, Takahashi K, Matsuura T, *et al.* Deficiency in p57<sup>Kip2</sup> expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol Hum Reprod*,2002;8(12):1129-1135.
- 13 Yu L, Chen M, Zhao D, *et al.* The *H19* gene imprinting in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Placenta*,2009;30(5):443-447.
- 14 Kato H, Wake N. Differential diagnosis between complete and partial mole using a *TSSC3* antibody: correlation with DNA polymorphic marker analysis. *J Reprod Med*,2006;51(11):861-867.
- 15 McMinn J, Wei M, Schupf N, *et al.* Unbalanced placental expression of imprinted genes in human intrauterine growth restriction. *Placenta*,2006;27(6-7):540-549.
- 16 Salas M, John R, Saxena A, *et al.* Placental growth retardation due to loss of imprinting of *Phlda2*. *Mech Dev*,2004;121(10):1199-1210.
- 17 Apostolidou S, Abu-Amero S, O'Donoghue K, *et al.* Elevated placental expression of the imprinted *PHLDA2* gene is associated with low birth weight. *J Mol Med (Berl)*,2007;85(4):379-387.
- 18 Diplas AI, Lambertini L, Lee MJ, *et al.* Differential expression of imprinted genes in normal and IUGR human placentas. *Epigenetics*,2009;4(4):235-240.
- 19 Ishida M, Monk D, Duncan AJ, *et al.* Maternal inheritance of a promoter variant in the imprinted *PHLDA2* gene significantly increases birth weight. *Am J Hum Genet*,2012;90(4):715-719.
- 20 Li Y, Meng G, Guo QN. Changes in genomic imprinting and gene expression associated with transformation in a model of human osteosarcoma. *Exp Mol Pathol*,2008;84(3):234-239.
- 21 Pliushch G, Schneider E, Weise D, *et al.* Extreme methylation values of imprinted genes in human abortions and stillbirths. *Am J Pathol*,2010;176(3):1084-1090.
- 22 Doria S, Sousa M, Fernandes S, *et al.* Gene expression pattern of *IGF2*, *PHLDA2*, *PEG10* and *CDKN1C* imprinted genes in spontaneous miscarriages or fetal deaths. *Epigenetics*,2010;5(5):444-450.

(2014 - 10 - 10 收稿,2014 - 11 - 02 修回)

编辑 沈进