

过氧化物还原酶 3 在早孕妇女血清中的水平

隋 蕾 梁爱华 李连芹

摘 要 **目的** 探讨过氧化物还原酶 3(PRX3)在妊娠早期的抗氧化作用。**方法** 收集 90 例在门诊行人工流产的患者血清和流产后的绒毛组织,采用酶联免疫吸附测定法,检测 PRX3 的血清值,采用实时定量 PCR 和蛋白质印迹法,检测绒毛中 PRX3 的表达水平。**结果** 自妊娠 8 周以后开始,孕妇的血清 PRX3 值显著高于非孕女性($P < 0.05$),绒毛组织中 PRX3 的表达随着孕周增长逐渐升高。**结论** 妊娠女性体内存在氧化应激状态,并且随着孕周的增长而加重。PRX3 在绒毛组织中具有重要的抗氧化功能。

关键词 过氧化物还原酶 妊娠 活性氧簇 氧化应激

中图分类号 R714

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.026

Serum Peroxiredoxin 3 in Early Pregnant Women. Sui Lei, Liang Aihua, Li Lianqin. Binzhou Medical University, Shandong 264003, China

Abstract Objective To investigate the role of peroxiredoxin 3 (PRX3) in early pregnancy. **Methods** We collected serum and villus tissues from ninety patients at first trimester. Enzyme-linked immunosorbent assay, real-time PCR, and Western Blotting were applied to examine the PRX3 level in above samples. **Results** The serum PRX3 in pregnant women was significantly higher than in non-pregnant controls. The expression of PRX3 in villus tissues was increased with gestational progression. **Conclusion** The oxidative stress was increased in pregnant women. PRX3 plays an active role in antioxidant defense of villus tissues.

Key words Peroxiredoxin; Pregnancy; Reactive oxygen species; Oxidative stress

细胞活动所需要的能量来自于线粒体。线粒体在提供能量的同时,会产生类似于废气的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)。虽然低剂量的 ROS 可以作为一种信号分子,参与细胞的增殖、分化、凋亡等生理活动。但过量的 ROS 会对细胞组分如核酸、脂质、蛋白质造成氧化损伤^[1]。过氧化物还原酶(peroxiredoxin, PRX)是一组具有抗氧化功能的蛋白,可以利用自身的半胱氨酸残基,将 H_2O_2 还原成水,并且通过调控细胞内的活性氧水平和信号转导,参与胚胎发育、老化、肿瘤、炎症疾病等生理病理过程^[2-4]。

在妊娠状态下,由于所需要的能量增多,细胞代谢产生的 ROS 也会增多。当孕妇出现病理状态时

(如妊娠期高血压病、妊娠期糖尿病等),细胞产生的 ROS 过多,而抗氧化功能能力相对不足,细胞内 ROS 的水平超出了抗氧化系统的清除能力,氧化和抗氧化之间的平衡被打破,就会形成所谓的氧化应激状态(oxidative stress)^[5-7]。过氧化物还原酶 3(peroxiredoxin 3, PRX3)作为 PRX 家族中的成员之一,PRX3 主要存在于线粒体中,并且作为线粒体内主要的抗氧化蛋白,可以清除线粒体内 90% 左右的过氧化氢,对于维持线粒体的状态稳定作用重大^[8-10]。在此之前,笔者利用 PRX3 基因敲除型小鼠,对 PRX3 的抗氧化功能进行了研究。结果发现,PRX3 基因敲除型雌鼠虽然可以正常妊娠,但发生死产的概率很高,胎盘处于严重的氧化应激状态,说明 PRX3 在胎盘中具有不可或缺的抗氧化作用^[11]。本研究检测早孕女性血清中的 PRX3 水平,以及 PRX3 在绒毛中的表达特点,以探讨其在早孕中的作用。

材料与方法

1. 研究对象:选定自 2016 年 12 月~2017 年 2 月约 3 个月期间内,在笔者医院实施人工流产或者药物流产的患者,详细记录患者的年龄、身高、体重、孕产次、停经天数、孕囊及胎芽大小,根据停经天数和胎芽

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划基金资助项目(2015WS0478);滨州医学院校级科研启动基金资助项目(BY2015KYQD28)

作者单位:264003 烟台,滨州医学院(隋蕾);252000 聊城市第四人民医院妇科(隋蕾);264100 滨州医学院烟台附属医院妇科(梁爱华),生殖医学科(李连芹)

通讯作者:李连芹,主任医师,教授,硕士生导师,电子信箱:lilq2005@bzmc.edu.cn

大小确定孕周,其中 6 周 + 1 ~ 2 天归为 6 周,6 周 + 3 ~ 4 天归为 6.5 周,6 周 + 5 ~ 6 天归为 7 周,以此类推。同期接受健康体检的年龄相当的非孕女性作为对照组。

2. 血清 PRX3 的检测:在患者实施手术(或者药物流产)前,抽取血液 2ml,离心后冻存于 - 70℃,待样本收集齐全后,利用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法,检测 PRX3 的水平。ELISA 试剂盒购自美国的 NeoScientific 公司,操作方法严格按照厂家提供的说明书进行。

3. 绒毛组织过氧化物还原酶 3 的检测:留取流产后的绒毛组织,洗净后冻存于 - 70℃,待样本收集齐全后,利用实时定量 PCR 方法(qRT - PCR)检测绒毛中 PRX3 的 mRNA 水平。PRX3 引物序列:Forward 5' - CAGCCGTTGTCAATGGAGAG - 3'; Reverse 5' - TCACATCGTGAAATTCGTTAGC - 3'。内参(- actin 引物序列:Forward 5' - CGGCCAGGTCATCACCATTG - 3'; Reverse 5' - CCGCCAGACAGCACTGTGTTG - 3'。相对表达量计算如前所述^[11]。同时采用蛋白质印迹法,检测绒毛中 PRX3 的蛋白水平。抗 PRX3 抗体购自英国的 Abcam 公司,β - actin 作为内参。对于蛋白质印迹法的相对表达量,采用 Gel - Pro Analyzer 读取

条带的积分吸光度值(integrated optical density, IOD)。

4. 统计学方法:采用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析,所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对于血清中的 PRX3 值,采用 *t* 检验法;对于 qRT - PCR 和蛋白质印迹实验结果,通过单因素方差分析,比较不同样本之间的表达差异,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况:本研究共纳入 9 周以内的流产病例 90 例,其中人工流产 62 例,药物流产 28 例。对照组 90 例。早孕组患者平均年龄 27.0 ± 2.1 岁,体重指数为 21.77 ± 3.10,非孕组患者平均年龄 26.0 ± 2.7 岁,体重指数为 20.9 ± 2.2,两组间患者年龄、体重指数比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2. 血清中 PRX3 的水平:早孕组女性血清中的 PRX3 平均值为 11.92 ± 3.51ng/ml,非孕女性血清中的 PRX3 平均值为 7.63 ± 1.56ng/ml,两组比较差异有统计学意义(*P* < 0.05),而且随着孕周增加,PRX3 值逐渐升高,孕 8 周以后的血清 PRX3 值显著高于孕 6 周时的 PRX3 值(*P* < 0.05,表 1)。

表 1 早孕女性不同孕周的 PRX3 血清值

孕周(<i>n</i>)	6(13)	6.5(17)	7(15)	7.5(13)	8(11)	8.5(11)	9(10)
PRX3(ng/ml)	8.6 ± 2.1	9.2 ± 2.6	10.5 ± 2.9	11 ± 3.5	13.1 ± 3.6	14.5 ± 3.8	16.9 ± 4.2

3. 绒毛中 PRX3 的表达:如表 2 所示,绒毛中 PRX3 的 mRNA 水平随着孕周的增加而逐渐升高,孕

9 周时的 PRX3 表达水平与孕 6 周时的表达水平之间比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

表 2 早孕女性不同孕周绒毛中的 PRX3 相对表达值

孕周(<i>n</i>)	6(13)	6.5(17)	7(15)	7.5(13)	8(11)	8.5(11)	9(10)
PRX3(ng/ml)	2562 ± 82	2631 ± 116	2810 ± 127	3129 ± 135	3414 ± 147	3652 ± 188	4099 ± 202

同样,蛋白质印迹实验表明,绒毛组织中 PRX3 的蛋白水平随着孕周增长逐渐升高,妊娠 8 周以后的 PRX3 蛋白水平显著升高(8 周 vs 6 周,*P* < 0.01)。图 1 为代表性的蛋白质印迹实验结果,其中上方为不同孕周 PRX3 和内参 β - actin 的条带,下方为与条带对应的积分吸光度值即 IOD 值。

讨 论

随着孕周的增长,母体所需要的能量逐渐增多,由此产生的活性氧自由基也会相应增加,给体内抗氧

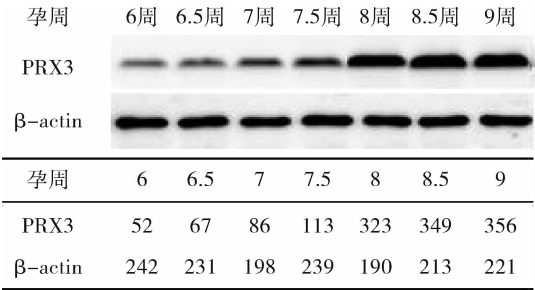


图 1 不同孕周绒毛组织中 PRX3 的蛋白水平

化系统带来的负担加重。笔者的研究结果表明, PRX3 在孕妇中的血清水平以及在绒毛组织中的表达水平,随着孕周的增长逐渐升高,说明 PRX3 在应对孕妇的氧化应激状态方面,发挥积极作用。

线粒体是提供能量的细胞器,同时也是细胞内活性氧自由基产生的主要场所。PRX3 作为线粒体内的抗氧化蛋白,与硫氧还蛋白 2 (thioredoxin II, TRX2)、硫氧还蛋白还原酶 2 (thioredoxin reductase II, TrxR2) 构成抵御线粒体内活性氧自由基的第一道防线^[12]。笔者之前的研究证实,PRX3 基因敲除型小鼠从 8 月龄开始即出现老化现象,表现为体力和协调能力下降,骨骼肌细胞中的线粒体 DNA 复制数明显减少,脑细胞发生凋亡^[13]。同样,妊娠也是活性氧自由基不断增加的过程,尤其当妊娠女性出现子痫前期等并发症时,胎盘的氧化应激状态进一步加重,而 PRX3 的表达也显著升高^[14]。反之,下调 PRX3 的表达,可以加重滋养细胞的氧化应激状态,加快细胞的老化^[15]。本研究结果表明,PRX3 在孕早期即开始发挥抗氧化作用。

胎盘是连接母子的特殊器官,母子之间的物质交换在此进行。因此,胎盘的氧化应激状态也会反映在母体血液中。Shaker 等^[16]研究发现,在子痫前期患者中,胎盘的脂质过氧化物与外周血的脂质过氧化物之间存在相关性。本研究中孕妇的血清 PRX3 值在妊娠 8 周以后开始显著升高,与绒毛组织中 PRX3 升高的时间基本一致。因此,通过测定血清 PRX 水平,可以判断胎盘乃至孕妇整体的氧化应激状态。

综上所述,妊娠 8 周及以后的孕妇开始出现氧化应激状态,PRX3 作为线粒体内重要的抗氧化蛋白,在绒毛组织中的表达反应性升高,而且与孕妇血清的 PRX3 值呈正相关。

参考文献

- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbins pathologic basis of disease[M]. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994:11-13
- Pirson M, Knoops B. Expression of peroxiredoxins and thioredoxins in the mouse spinal cord during embryonic development[J]. J Comp Neurol, 2015, 523(17):2599-2617
- Li L, Yu AQ. The functional role of peroxiredoxin 3 in reactive oxygen species, apoptosis, and chemoresistance of cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 41(12):2071-2077
- Park MH, Jo M, Kim YR, et al. Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases[J]. Pharmacol Ther, 2016, 163:1-23
- Shang M, Zhao J, Yang L, et al. Oxidative stress and antioxidant status in women with gestational diabetes mellitus diagnosed by IADPSG criteria[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2015, 109(2):404-410
- D'Souza V, Rani A, Patil V, et al. Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia[J]. Clin Exp Hypertens, 2016, 38(2):225-232
- Li H, Yin Q, Li N, et al. Plasma markers of oxidative stress in patients with gestational diabetes mellitus in the second and third trimester[J]. Obstet Gynecol Int, 2016, 2016:3865454
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling[J]. Biochem J, 2009, 425(2):313-325
- Lee KP, Shin YJ, Cho SC, et al. Peroxiredoxin 3 has a crucial role in the contractile function of skeletal muscle by regulating mitochondrial homeostasis[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 77:298-306
- Rhee SG, Kil IS. Mitochondrial H₂O₂ signaling is controlled by the concerted action of peroxiredoxin III and sulfiredoxin: Linking mitochondrial function to circadian rhythm[J]. Free Radic Biol Med, 2016, 100:73-80
- Li L, Shoji W, Oshima H, et al. Crucial role of peroxiredoxin III in placental antioxidant defense of mice[J]. FEBS Lett, 2008, 582(16):2431-2434
- Rabilloud T, Heller M, Rigobello MP, et al. The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress[J]. Proteomics, 2001, 1(9):1105-1110
- Zhang YG, Wang L, Kaifu T, et al. Accelerated decline of physical strength in peroxiredoxin - 3 knockout mice[J]. Exp Biol Med, 2016, 241(13):1395-1400
- D'Souza V, Rani A, Patil V. Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia[J]. Clin Exp Hypertens, 2016, 38(2):225-232
- Wu WB, Menon R, Xu YY, et al. Downregulation of peroxiredoxin - 3 by hydrophobic bile acid induces mitochondrial dysfunction and cellular senescence in human trophoblasts[J]. Sci Rep, 2016, 6:38946
- Shaker OG, Sadik NA. Pathogenesis of preeclampsia: Implications of apoptotic markers and oxidative stress[J]. Hum Exp Toxicol, 2013, 32(11):1170-1178

(收稿日期:2017-03-30)

(修回日期:2017-03-31)