

稽留流产绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 的水平表达与氧化应激的相关性研究

李慧敏, 杨琳 (陕西省核工业二一五医院产科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 探讨稽留流产绒毛组织中蛋白亮氨酸拉链基序1 (leucine zipper motif 1, APPL1)、核因子E2相关因子2 (Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 和血红素加氧酶1 (haem oxygenase 1, HO-1) 的水平表达与氧化应激的相关性。方法 取46例稽留流产并行人流术治疗者为实验组, 取50例同期正常早孕并行人工流产术者为对照组, 收集两组绒毛组织标本, 用放射免疫沉淀法裂解缓冲液 (radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA) 提取绒毛组织蛋白。用免疫组织化学法检测绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达; 用 Western blot 检测绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白水平; 酶联免疫吸附法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 测定绒毛组织中氧化应激指标 [超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA)] 水平。Pearson 检验分析实验组绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白水平与氧化应激指标水平的相关性。结果 实验组绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 表达阳性率分别为 21.7%, 32.6% 和 26.1%, 明显低于对照组的 56.0%, 64.0%, 58.0%, 差异均有统计学意义 ($\chi^2=9.442 \sim 11.759$, 均 $P < 0.05$); APPL1 (3.2 ± 0.9), Nrf2 (3.7 ± 0.7) 和 HO-1 (3.5 ± 0.8) 表达免疫组化评分亦明显低于对照组 (4.6 ± 1.4 , 5.5 ± 1.7 , 5.1 ± 1.3), 差异有统计学意义 ($t=5.772 \sim 7.187$, 均 $P < 0.05$)。实验组绒毛组织中 APPL1 (1.3 ± 0.1), Nrf2 (0.7 ± 0.1) 和 HO-1 (1.1 ± 0.1) 蛋白表达水平明显低于对照组 (1.6 ± 0.2 , 1.1 ± 0.1 , 1.4 ± 0.1), 差异有统计学意义 ($t=9.171 \sim 19.579$, 均 $P < 0.05$)。实验组绒毛组织中 ROS (8.4 ± 1.5 U/ml), MDA (11.7 ± 2.3 nmol/ml) 水平明显高于对照组 (3.6 ± 0.5 U/ml, 5.6 ± 0.8 nmol/ml), SOD (23.9 ± 6.8 U/ml) 水平明显低于对照组 (28.1 ± 6.6 U/ml), 差异均有统计学意义 ($t=3.070 \sim 21.381$, 均 $P < 0.05$)。实验组绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达与 ROS 水平呈负相关 ($r=-0.628, -0.510, -0.575$, 均 $P < 0.05$); 与 MDA 水平呈负相关 ($r=-0.541, -0.489, -0.556$, 均 $P < 0.05$); 与 SOD 水平呈正相关 ($r=0.359, 0.423, 0.408$, 均 $P < 0.05$)。结论 APPL1, Nrf2 和 HO-1 在稽留流产绒毛组织中呈低表达, 且与氧化应激指标 ROS, MDA 和 SOD 水平具有显著相关性, 其三者异常表达可能通过介导氧化应激失衡进而诱导了稽留流产的发生。

关键词: 稽留流产; 蛋白亮氨酸拉链基序1; 核因子E2相关因子; 血红素加氧酶1; 绒毛组织; 氧化应激
中图分类号: R714.21; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 05-033-06
doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.008

Study on the Correlation between APPL1, Nrf2 and HO-1 Expression and Oxidative Stress in Villous Tissue of Aborted Abortion

LI Hui-min, YANG Lin (Department of Obstetrics, Shaanxi Provincial Nuclear Industry 215 Hospital, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the levels of leucine zipper motifs 1 (APPL1), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase 1 (HO-1) and oxidative stress in villi of aborted abortion. **Methods** 46 cases of delayed abortion and induced abortion were selected as the experimental group, and 50 cases of normal early pregnancy and induced abortion were selected as the control group. Villus tissue samples of the two groups were collected, and villus tissue protein was extracted by RIPA protein lysis method. The expressions of APPL1, Nrf2 and HO-1 proteins in villus were detected by immunohistochemistry. The protein levels of APPL1, Nrf2 and HO-1 in villus were detected by Western blot. The levels of oxidative stress indexes [superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA)] in villus were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pearson correlation test was used to analyze the correlation between APPL1, Nrf2 and HO-1 proteins expression and oxidative stress indexes in villous tissue of the study group. **Results** The positive rates of APPL1, Nrf2 and HO-1 in villi of experimental group were 21.7%, 32.6% and 26.1%, respectively, which were significantly lower than 56.0%, 64.0% and 58.0% in control group ($\chi^2=9.448 \sim 11.759$, all $P < 0.05$). The expression of

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2018SF-155)。

作者简介: 李慧敏 (1981-), 女, 本科, 主治医师, 研究方向: 产前诊断, E-mail: geliwu419@163.com。

通讯作者: 杨琳 (1982-), 男, 本科, 副主任医师。

APPL1(3.2 ± 0.9), Nrf2 (3.7 ± 0.7) and HO-1 (3.5 ± 0.8) were also significantly lower than the control group (4.6 ± 1.4 , 5.5 ± 1.7 , 5.1 ± 1.3), the differences were statistically significant ($t=5.772 \sim 7.187$, all $P < 0.05$). The expression levels of APPL1 (1.3 ± 0.1), Nrf2 (0.7 ± 0.1) and HO-1 (1.1 ± 0.1) in the villus tissues of the experimental group were significantly lower than those of the control group (1.6 ± 0.2 , 1.1 ± 0.01 , 1.4 ± 0.1), the differences were statistically significant ($t=9.171 \sim 19.579$, all $P < 0.05$). The ROS (8.4 ± 1.5 U/ml) and MDA (11.7 ± 2.3 nmol/ml) levels in villous tissue of experimental group were significantly higher than those in control group (3.6 ± 0.5 U/ml, 5.6 ± 0.8 nmol/ml), while SOD (23.9 ± 6.8 U/ml) levels were significantly lower than those in control group (28.1 ± 6.6 U/ml), the differences were statistically significant ($t=3.070 \sim 21.381$, all $P < 0.05$). In the experimental group, the expressions of APPL1, Nrf2 and HO-1 were negatively correlated with ROS levels ($r=-0.628$, -0.510 , -0.575 , all $P < 0.05$). There was negative correlation with MDA level ($r=-0.541$, -0.489 , -0.556 , all $P < 0.05$). And SOD level were positively correlated ($r=0.359$, 0.423 , 0.408 , all $P < 0.05$). **Conclusion** APPL1, Nrf2 and HO-1 showed low expression in the villous tissue of delayed abortion, and were significantly correlated with the levels of oxidative stress indexes ROS, MDA and SOD. The abnormal expression of APPL1, Nrf2 and HO-1 may induce the occurrence of delayed abortion by mediating oxidative stress imbalance.

Keywords: missed abortion; APPL1; Nrf2/HO-1; villous tissue; oxidative stress

稽留流产是一种特殊的流产类型,也叫胎停育,指胚胎或胎儿已死亡滞留宫腔内尚未自然排出者。稽留流产比例呈逐年上升趋势,在早期正常妊娠中高达15%~20%,其与多种因素相关,如生活环境、感染、免疫及内分泌、染色体异常等,发病机制十分复杂,至今仍未明确^[1]。死亡的胚胎及病变的胎盘组织滞留于宫腔中释放凝血活酶,易引发凝血功能紊乱,严重威胁了女性的健康^[2]。因此,明确稽留流产的发病机制,有助于该病的早期预防和治疗。蛋白亮氨酸拉链基序1(leucine zipper motif 1, APPL1)是绒毛膜滋养细胞中的差异蛋白之一,APPL1蛋白可能是诱导稽留流产发生发展的关键因子^[3]。研究表明,稽留流产的发病机理与APPL1蛋白调节信号通路抑制氧化应激有关^[3]。核因子E2相关因子(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是一种对氧化还原敏感且广泛表达的蛋白,能够调节参与抗氧化作用。核因子E2相关因子/抗氧化反应元件(Nrf2/ARE)是最重要的内源性抗氧化应激通路,也是机体抗氧化应激的主要承担者,当机体遭受有害刺激时,其可抵抗外界氧化刺激导致的氧化应激反应,保护机体免受损伤^[4]。研究表明,当细胞受到活性氧(reactive oxygen species, ROS)等的刺激时,Nrf2可与其抑制剂Keap1结合活化,转运入核与ARE结合,激活靶基因调控抗氧化酶、II相代谢酶,如血红素加氧酶1(haem oxygenase 1, HO-1),醌氧化还原酶1及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等,发挥抗氧化损伤作用^[5]。研究表明,HO-1具有与ARE相似的抗氧化元件,可通过Nrf2调控ARE形成Nrf2/HO-1通路^[6]。因此本研究探究分析了稽留流产患者绒毛组织中APPL1, Nrf2和HO-1表达与氧化应激的相关性,探讨了其在稽留流产发生中的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取2020年6月~2021年6月在陕西省核工业二一五医院诊断为稽留流产并行人流手术的46例患者进行研究,另选取同期要求行人工流产的50例正常早孕妇女作为对照组,两组年龄23~36岁,月经规律,停经6~11周。实验组平均年龄 31.5 ± 2.9 岁,平均身体质量指数(body mass index, BMI) 23.4 ± 3.1 kg/m²,平均胎龄 6.7 ± 0.9 周,平均孕次 2.4 ± 0.6 次,平均流产次数 2.0 ± 0.4 次;对照组平均年龄 30.7 ± 2.8 岁,平均BMI 23.9 ± 3.2 kg/m²,平均胎龄 6.8 ± 0.9 周,平均孕次 2.3 ± 0.5 次,平均流产次数 2.1 ± 0.3 次。两组患者年龄、BMI,胎龄、孕次、流产次数等基线资料差异均无统计学意义($P > 0.05$)。医院伦理委员会批准本研究,患者及家属均知情同意。

纳入标准:①实验组:B超检查示宫内妊娠囊 > 2 cm,未见胎心管搏动,未见胚芽或胚芽长度 > 1 cm;有停经史;清宫术前宫口未开。②对照组:超声证实胚胎发育正常,有心管搏动;既往无死胎、自然流产及死产史;无腹痛、阴道流血等先兆流产症状。排除标准:①子宫肌瘤、宫腔黏连、子宫畸形、子宫腺肌症等;②母体伴有严重贫血、感染并发性慢性肝肾疾病、心血管疾病、多囊卵巢综合征、甲状腺功能减退症及糖尿病等;③孕期有药物、毒物、射线接触史等;④有家族遗传病史。

1.2 试剂与仪器 SP免疫组织化学试剂盒, DAB显色试剂盒(北京中杉金桥有限公司);兔抗人APPL1单抗, Nrf2单抗, HO-1单抗(英国Abcam公司);ROS, SOD, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物公司);电泳仪、凝胶图像分析仪(美国Bio-Rad公司);RIPA蛋白裂解液、PVDF膜(美国Sigma-Aldric公司);BCA蛋白检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);酶

标仪(美国 Thermo Fisher 科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集: 采用负压吸引术吸出孕囊后, 用无菌生理盐水洗掉黏液和血液, 剔除蜕膜组织, 医用滤纸吸去水分, 分离出绒毛组织冲洗干净, 分为3份, 2份置于高压灭菌冻存管, 迅速放入液氮管中-80℃超低温保存; 另1份用10g/dl 中性福尔马林溶液固定24h, 脱水、包埋, 制为样本蜡块。

1.3.2 免疫组织化学染色检测绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 表达: 取蜡块组织样本 4 μm 厚度切片, 脱蜡、脱水, 抗原高压修复; 3g/dl 过氧化氢去除内源性过氧化氢酶活性, 滴加 APPL1, Nrf2 和 HO-1 一抗覆盖组织, 4℃冰箱孵育过夜; 第2天滴加二抗, 室温孵育 20min, DAB 试剂盒避光显色, 苏木素复染, 脱水, 封片, 镜下观察拍照。

1.3.3 免疫组织化学结果判定: APPL1, Nrf2 和 HO-1 阳性染色呈黄色、棕黄色或棕褐色, 阴性对照无着色。随机选取高倍镜下6个视野, 根据染色强度和阳性细胞百分比进行计分, 着色强度: 以无着色(-)、黄色(+)、棕黄色(++)和棕褐色(+++)分别计为0~3分; 阳性细胞百分比: 以≤5%, 6%~25%, 26%~50%, 51%~75%和>75%分别计为0~4分。免疫组织化学总得分为两项计分的乘积, <4分定义为阴性, ≥4分定义为阳性。

1.3.4 蛋白免疫印迹(Western blot)检测: 取绒毛组织 100 mg, 加入 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度; 电泳分离蛋白, 转移到聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)上, 室温封闭1h, 加入对应蛋白一抗, 4℃过夜; 次日室温下加入二抗孵育1h, 洗膜3次, ECL 发光显色。采用 ImageJ 软件定量分析各条带的灰度值,

以 β-actin 为内参进行显影拍照, 蛋白定量表达采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 实验重复三次取平均值。

1.3.5 氧化应激指标检测: 从-80℃超低温冰箱取绒毛组织约100mg, 加入 RIPA 蛋白裂解液 1 ml, 充分匀浆后 4℃, 12 000 r/min 离心 30 min, 弃去沉淀, 将上清液转移至 EP 管, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 ROS, SOD 和 MDA 含量, 操作如下: 按 ELISA 检测说明书设置空白孔、标准孔和待测样品孔, 每组设3个平行孔, 除空白孔外在酶标板各孔加入制备的标准品 50 μl, 再加入辣根过氧化物酶标记抗体 100 μl, 封膜板覆盖酶标板, 37℃孵育 1h, 弃去孔内液体, 洗板 5 次, 于各孔加入显色底物, 避光孵育 15 min, 后加入终止液 100 μl/孔, 混匀后上机, 在酶标仪 450nm 处测定各孔吸光度值, 拟合标准曲线, 计算样品中 ROS, SOD 和 MDA 含量。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验; Pearson 分析 APPL1, Nrf2 和 HO-1 表达与氧化应激指标的相关性; 计数资料采用 χ^2 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白的定位表达 免疫组化法检测显示, 绒毛组织中 APPL1, HO-1 阳性表达定位主要分布于细胞胞浆, Nrf2 阳性表达定位主要分布于细胞胞浆或细胞核, 呈黄色、棕黄色或棕褐色, 见图 1。实验组绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达阳性率均低于对照组, 免疫组化染色评分亦低于对照组, 差异均有统计学意义(均 P < 0.05), 见表 1。

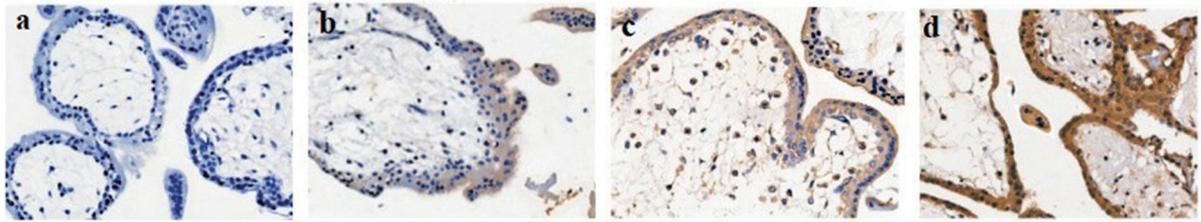
表 1 两组绒毛组织中 APPL1, Nrf2, HO-1 蛋白表达比较

蛋白	类别	实验组	对照组	χ^2/t	P
APPL1	表达强度占比 (-/+//+/+++)	36/4/5/1	22/5/9/14		
	阳性率 [n (%)]	10(21.7)	28(56.0)	11.759	0.001
	免疫组化评分	3.2 ± 0.9	4.6 ± 1.4	5.772	0.000
Nrf2	表达强度占比 (-/+//+/+++)	31/5/7/3	18/6/10/16		
	阳性率 [n (%)]	15(32.6)	32(64.0)	9.448	0.002
	免疫组化评分	3.7 ± 0.7	5.5 ± 1.7	7.048	0.000
HO-1	表达强度占比	34/7/4/2	21/3/8/18		
	阳性率 [n (%)]	12(26.1)	29(58.0)	9.972	0.002
	免疫组化评分	3.5 ± 0.8	5.1 ± 1.3	7.187	0.000

2.2 两组 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白定量表达及氧化应激指标水平分析 见表 2 和图 4。Western blot 检测结果显示, 与对照组相比, APPL1, Nrf2

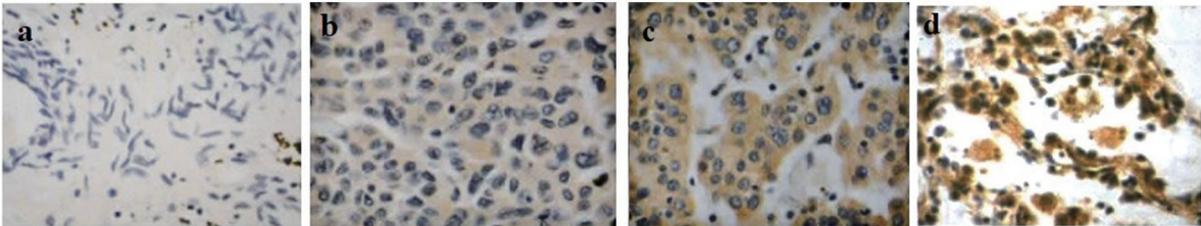
和 HO-1 蛋白在实验组绒毛组织中的表达显著降低, 差异有统计学意义(均 P < 0.05)。实验组绒毛组织中氧化应激指标 ROS, MDA 水平较对照组明

显升高, SOD 水平则明显降低, 差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。



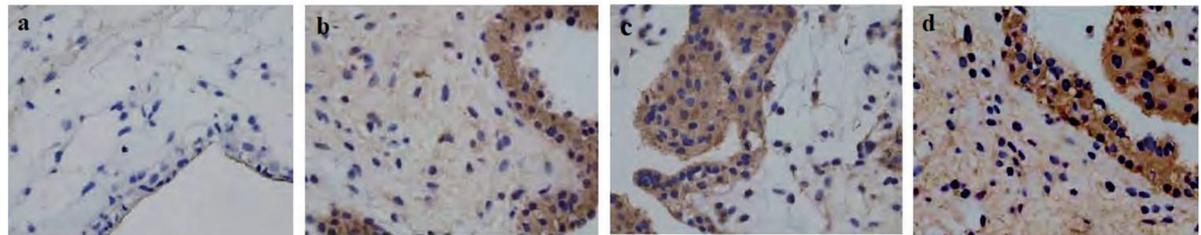
a: 阴性; b: 弱阳性, 棕黄色, 阳性细胞 6% ~ 25%; c: 阳性, 棕褐色, 阳性细胞 26% ~ 50%; d: 强阳性, 棕褐色, 阳性细胞 51% ~ 75%。

图 1 绒毛组织中 APPL1 蛋白免疫组化图 ($\times 200$)



a: 阴性; b: 弱阳性, 黄色, 阳性细胞 26% ~ 50%; c: 阳性, 棕黄色, 阳性细胞 51% ~ 75%; d: 强阳性, 棕褐色, 阳性细胞 51% ~ 75%。

图 2 绒毛组织中 Nrf2 蛋白免疫组化图 ($\times 400$)



a: 阴性; b: 弱阳性, 棕褐色, 阳性细胞 26% ~ 50%; c: 阳性, 棕褐色, 阳性细胞 51% ~ 75%; d: 强阳性, 棕褐色, 阳性细胞 > 75%。

图 3 绒毛组织中 HO-1 蛋白免疫组化图 ($\times 400$)

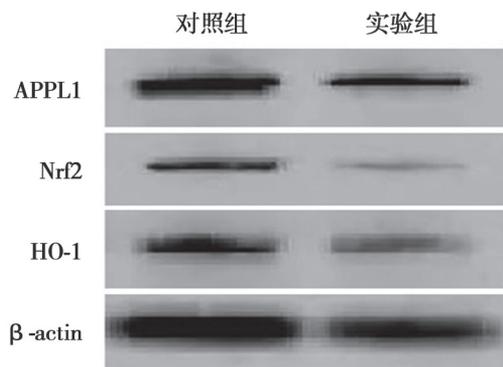


图 4 Western blot 电泳蛋白表达图谱条带图

表 2 两组 APPL1, Nrf2, HO-1 蛋白定量表达及氧化应激指标水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	实验组 (n=46)	对照组 (n=50)	t	P
APPL1 蛋白	1.3 ± 0.1	1.6 ± 0.2	9.171	0.000
Nrf2 蛋白	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	19.579	0.000
HO-1 蛋白	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1	14.684	0.000
ROS (U/ml)	8.4 ± 1.5	3.6 ± 0.5	21.381	0.000
MDA (nmol/ml)	11.7 ± 2.3	5.6 ± 0.8	17.637	0.000
SOD (U/ml)	23.9 ± 6.8	28.1 ± 6.6	3.070	0.000

2.3 稽留流产绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白表达与氧化应激的相关性 见表 3。稽留流产绒毛组织中 APPL1, Nrf2, HO-1 蛋白表达与 ROS, MDA 水平均呈负相关 (均 $P < 0.05$), 与 SOD 水平均呈正相关 (均 $P < 0.05$)。

表 3 APPL1, Nrf2, HO-1 蛋白表达与氧化应激指标的相关性分析

项目	ROS		MDA		SOD	
	r	P	r	P	r	P
APPL1	-0.628	0.000	-0.541	0.001	0.359	0.031
Nrf2	-0.510	0.014	-0.489	0.012	0.423	0.008
HO-1	-0.575	0.000	-0.556	0.020	0.408	0.000

3 讨论

稽留流产的处理较为困难, 由于胎盘组织机化, 与子宫壁紧密条件下黏连, 导致刮宫困难。一般月份稍大的流产物滞留宫腔时间较长会导致机体凝血功能障碍, 引发相关并发症的发生, 而清宫会使子宫内膜损伤诱发宫腔黏连, 甚至不孕, 严重影响患者身心健康^[7]。研究表明, 稽留流产的发生与机体氧化应激状态密切相关^[3]。APPL1 是一种介导脂联素信号转导的调节蛋白, 研究表明, APPL1 通过调

节多个信号通路参与各种生物学行为,如细胞黏附、代谢、迁移、凋亡和增殖等^[8-9]。有研究发现,脂联素通过激活 AdipoR1/APPL1/LKB1/AMPK 信号通路的促进细胞内抗氧化系统来清除 ROS,降低由于缺血缺氧诱导的神经元凋亡^[10]。研究表明,APPL1 过表达可促进瘦素诱导的癌细胞中 STAT3, ERK1/2 和 Akt 磷酸化,增强癌细胞的增殖和迁移,反之可抑制癌细胞增殖和迁移,揭示了瘦素促进癌细胞运动和生长的新机制^[11]。APPL1 参与组成的脂联素可增强细胞的抗氧化能力,通过 AdipoR1/APPL1 信号传导抑制细胞凋亡水平和 ROS 水平。Nrf2 在正常状态下存在于细胞质中,与 KEAP1 相结合后降解,当机体存在氧化应激状态时,Nrf 和 KEAP1 无法被蛋白酶体降解,积累在细胞质中并向细胞核内转移,激活 HO-1 在内的下游抗氧化基因。研究证实 APPL1-AdipoR1 复合物脂联素可促进 Nrf2 核易位,激活 Nrf2 相关抗氧化信号通路进而抑制氧化应激反应^[12]。

在正常妊娠 11 周之前,胚胎和胚盘生长于低氧(氧浓度 2% ~ 5%)环境中。为维持低氧环境,降低有氧代谢产生的 ROS,大量抗氧化剂及抗氧化信号通路被激活,平衡氧化还原状态,以维持正常妊娠^[13]。孕早期处于低氧状态的绒毛间隙可使胎儿免受 ROS 的侵害,而过量 ROS 具有细胞毒性,逸入细胞内可造成滋养细胞的细胞膜、染色液、蛋白及 DNA 损伤,或者对细胞基质胶原蛋白造成损伤,导致滋养细胞功能下降或部分细胞死亡,母体血提前流入容腔间隙,对母胎界面造成不可逆的损伤,胎儿受 ROS 侵害而死亡^[14]。稽留流产患者的绒毛组织中 ROS,MDA 水平显著升高,使胚胎细胞处于高氧状态,从而抑制了 SOD 生成,介导胚胎停育。既往研究表明,当 ROS 异常升高或快速波动时会干扰滋养细胞的正常功能,从而导致多种类型的早期流产,如反复性流产、自发性流产和葡萄胎等^[15-16]。SOD 是一种重要的抗氧化金属酶,发挥抗氧化剂的作用,可将氧离子转化为 H₂O₂ 和氧分子。稽留流产患者绒毛组织中 ROS 水平升高,SOD 活性降低,氧化应激是稽留流产的发病机理之一^[17]。当绒毛组织中 ROS 的大量产生会造成组织中的滋养细胞、内皮细胞发生氧化损伤,细胞结构中的脂质成分被氧化所形成的 MDA 能够反映氧化损伤的程度^[15]。SOD 是机体内天然存在的超氧自由基清除因子,存在于氧代谢细胞中,可有效清除自由基,降低 MDA 对细胞及组织的破坏作用。细胞内存在一些复杂的抗氧化防御系统,目的是对抗 ROS 积累和氧化应激损伤,其中 Nrf2 被认为是一种对氧化还原敏感且在机体内广泛表达的蛋白,调节并参

与抗氧化机制,诱导一系列抗氧化蛋白基因转录;HO-1 是受 Nrf2 调节的最重要的基因之一,在细胞中发挥重要的抗炎、抗氧化调节作用。HO-1 可通过胆绿素还原酶将血红素降解为胆绿素、CO 和 Fe²⁺,胆绿素及其还原型胆红素具有直接清除 ROS 的能力,构成内源性保护物质来调节细胞氧化、凋亡等多种生物学细胞活动^[18]。

基于既往研究报道,本研究结果显示,实验组绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白阳性率及表达水平较对照组显著降低,提示三者的异常表达可能与稽留流产有关,Nrf2/HO-1 信号通路在稽留流产者中受到抑制,与 XIE 等^[19]报道一致。ELISA 法检测结果显示,实验组绒毛组织中 ROS,MDA 水平均高于对照组,SOD 水平低于对照组,提示机体氧化/抗氧化物质失衡参与了稽留流产的发生及病情进展。进一步分析发现,实验组绒毛组织中 APPL1, Nrf2 和 HO-1 表达与 ROS,MDA 水平均呈负相关,与 SOD 水平呈正相关,提示 APPL1, Nrf2 和 HO-1 蛋白的异常表达与氧化应激的发生相关。本研究从氧化应激失衡角度探究表明,APPL1, Nrf2 和 HO-1 的异常表达可能通过介导氧化应激反应的发生,从而诱导了稽留流产的发生,为稽留流产的发病、诊治提供了思路。然而本研究结果较为表浅、局限,APPL1 调控 Nrf2/HO-1 通路参与氧化应激介导稽留流产发生的机制还有待通过细胞学实验探究验证。

综上所述,APPL1, Nrf2, HO-1 在稽留流产绒毛组织中低表达,且与氧化应激指标 ROS,MDA 和 SOD 水平具有显著相关性,三者异常表达可能通过介导氧化应激失衡进而诱导了稽留流产的发生。

参考文献:

- [1] 郑崢,顾向应,刘欣燕,等.早期妊娠稽留流产治疗专家共识[J].中国实用妇科与产科杂志,2020,36(1):70-73.
ZHENG Zheng, GU Xiangying, LIU Xinyan, et al. Expert consensus on treatment of early pregnancy delayed abortion [J]. Chinese Journal of Practical Gynecology and Obstetrics, 2020,36(1):70-73.
- [2] 崔亚美,张媛媛,冯旺琴,等.稽留流产的现状及影响因素分析[J].生殖医学杂志,2020,29(7):919-924.
CUI Yamei, ZHANG Yuanyuan, FENG Wangqin, et al. Analysis of current status and influencing factors of missed abortion [J]. Journal of Reproductive Medicine, 2020,29(7):919-924.
- [3] LUAN Xiaojin, YAN Yidan, ZHENG Qianwen, et al. Excessive reactive oxygen species induce apoptosis via the APPL1-Nrf2/HO-1 antioxidant signalling pathway in trophoblasts with missed abortion[J]. Life Sciences,

- 2020, 254: 117781.
- [4] 吴亚茹, 刘师伟, 段瑞雪, 等. Vaspin 通过 Nrf2/ARE 信号通路对高糖高脂诱导的 INS-1 细胞氧化应激的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45 (3): 324-330.
WU Yaru, LIU Shiwei, DUAN Ruixue, et al. Effect of vaspin on high glucose and lipid induced oxidative stress in INS-1 cells via the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2020, 45(3):324-330.
- [5] 曾梦莹, 马晓丽. 基于 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路研究牛磺酸对胰岛素抵抗模型大鼠氧化应激的影响 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22):2703-2707.
ZENG Mengying, MA Xiaoli. Effects of taurine on oxidative stress in rats with insulin resistance based on Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2020, 37(22):2703-2707.
- [6] QIAO Yanan, SUN Yong, SHEN Tao, et al. Diterpenoids from the Chinese liverwort *Frullania hamatiloba* and their Nrf2 inducing activities[J]. *Phytochemistry*, 2019, 158: 77-85.
- [7] 程蓓蕾, 王福祥, 杨丹蓉. 血清 hs-CRP, β -HCG 和孕酮的联合检测在预测先兆流产中的临床应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(1):51-54.
CHENG Beilei, WANG Fuxiang, YANG Danrong. Clinical application of combined detection of hs-CRP, β -HCG, and progesterone in predicting threatened abortion [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2019, 34(1):51-54.
- [8] 李波, 郑植, 陈芑曩. APPL1 减轻 LPS 诱导的心肌细胞损伤的实验研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35 (8):1526-1531.
LI Bo, ZHENG Zhi, CHEN Pengyuan. APPL1 reduces injury of H9c2 cardiomyocytes induced by LPS [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2019, 35(8):1526-1531.
- [9] 刘宏涛, 郭小琦, 梁英平. APPL1 对体外胃癌细胞增殖、侵袭的影响 [J]. 医学临床研究, 2020, 37 (6): 912-914.
LIU Hongtao, GUO Xiaoqi, LIANG Yingping. Effect of APPL1 on proliferation and invasion of gastric cancer cells in vitro [J]. *Journal of Clinical Research*, 2020, 37(6):912-914.
- [10] LEI Xiaotian, WU Qinan, LENG Weiling, et al. Exenatide reduces cardiomyocyte apoptosis by stimulating adiponectin secretion and activating APPL1-AMPK-PPAR α axis[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2019, 7(14): 326.
- [11] XU Ningbo, ZHANG Yixin, DOYCHEVA D M, et al. Adiponectin attenuates neuronal apoptosis induced by hypoxia-ischemia via the activation of AdipoR1/APPL1/LKB1/AMPK pathway in neonatal rats[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 133: 415-428.
- [12] 李媛莉, 赵继波, 张三明. 脂联素通过 Nrf2/HO-1 通路对急性心肌梗死大鼠心功能和心肌细胞凋亡作用的机制研究 [J]. 中国循证心血管医学杂志, 2020, 12(5): 606-608, 611.
LI Yuanli, ZHAO Jibo, ZHANG Sanming. Effective mechanism of adiponectin on heart function and cardiomyocyte apoptosis through Nrf2/HO-1 pathway in rats with acute myocardial infarction [J]. *Chinese Journal of Evidence-Based Cardiovascular Medicine*, 2020, 12(5):606-608,611.
- [13] 张星星, 李甜甜, 杨春娜, 等. 过氧化物还原酶在生殖与妊娠并发症中作用机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2019, 59(1):94-97.
ZHANG Xingying, LI Tiantian, YANG Chunna, et al. Research progress on the mechanism of peroxidase reductase in reproductive and pregnancy complications[J]. *Shandong Medical Journal*, 2019, 59 (1): 94-97.
- [14] JAYASENA C N, RADIA U K, FIGUEIREDO M, et al. Reduced testicular steroidogenesis and increased semen oxidative stress in male partners as novel markers of recurrent miscarriage[J]. *Clinical Chemistry*, 2019, 65(1): 161-169.
- [15] 肖文霞, 王会芝, 周广杰, 等. 绒毛组织氧化应激状态与稽留流产的相关性研究 [J]. 中国生育健康杂志, 2018, 29(4):358-359.
XIAO Wenxia, WANG Huizhi, ZHOU Guangjie, et al. Study on the correlation between oxidative stress state of villus tissue and delayed abortion[J]. *Chinese Journal of Reproductive Health*, 2018, 29(4):358-359.
- [16] 林娟, 关红琼, 王洪伟. TIPE2 在稽留流产患者血清、绒毛与蜕膜组织中的表达及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(18):2280-2283.
LIN Juan, GUAN Hongqiong, WANG Hongwei. Expression and clinical significance of TIPE2 in serum, villi and decidua tissues of patients with delayed abortion[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2019, 40(18):2280-2283.
- [17] 陈芳仙. 8-异构前列腺素、超氧化物歧化酶、血浆总抗氧化能力、转录因子 κ B 及诱导型一氧化氮合酶在复发性流产患者中的表达和意义 [J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(9):1705-1708.
CHEN Fangxian. Expression and significance of 8-isomeric prostaglandin, superoxide dismutase, plasma total antioxidant capacity, transcription factor κ B and inducible nitric oxide synthase in patients with recurrent abortion [J]. *Maternal and Child Health Care of China*, 2020, 35(9):1705-1708.
- [18] SZADE A, SZADE K, MAHDI M, et al. The role of heme oxygenase-1 in hematopoietic system and its microenvironment[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(10): 4639-4651.
- [19] XIE Juan, ZHOU Xuan, FANG Lin, et al. Evaluation of diagnosis and prognosis with anti-mullerian hormone level in early missed abortion[J]. *American Journal of Translational Research*, 2021, 13(5): 5350-5355.

收稿日期: 2021-10-11

修回日期: 2022-03-22