

体外受精-胚胎移植后妊娠早期合并 宫腔积血时氧化应激水平的分析

王 娅, 魏兆莲, 曹云霞

摘要 目的 探讨体外受精-胚胎移植(IVF-ET)后妊娠早期合并宫腔积血(IUH)的女性外周血氧化应激水平与正常妊娠时有无差异。方法 选取经IVF-ET助孕获宫内妊娠合并子宫腔积血者121例为宫腔积血组(IUH组),匹配孕囊数及周期类型,选取同期经IVF-ET助孕获宫内妊娠且无子宫腔积血者121例为对照组(N-IUH组)。采用ELISA法检测受试者外周血清中活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)及丙二醛(MDA)水平。结果 IUH组与N-IUH组各临床特征间差异无统计学意义。IUH组ROS水平高于N-IUH组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IUH组MDA水平高于N-IUH组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。IUH组与N-IUH组SOD及GPx水平的差异无统计学意义。结论 经IVF-ET后宫内早孕合并IUH的女性体内ROS和MDA水平高于N-IUH时提示体内存在较高的氧化状态,IUH与氧化应激间可能存在相关性。

关键词 氧化应激;活性氧;体外受精-胚胎移植;宫腔积血
中图分类号 R 345.41; R 321-33; R 714.2; R 715
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1164-04

子宫腔积血(intrauterine hematomas, IUH)指超声检查可见绒毛膜和(或)胎盘[包括绒毛膜下和(或)胎盘后]与子宫蜕膜之间出现新月形的低回声区^[1]。文献^[1-2]报道,宫腔积血在自然妊娠中发生率约为0.46%~39.50%,且经体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer, IVF-ET)妊娠者妊娠早期出现宫腔积血的概率显著高于自然妊娠者(22.4% vs 11.0%, $P = 0.035$)^[3]。自然妊娠孕早期出现的宫腔积血者妊娠期高血压、子痫前期、胎盘早剥、胎膜早破、早产以及新生儿窒息等妊娠期、分娩期并发症的发生率增加^[2]。前期研究^[4]显示IVF妊娠妇女孕早期出现的IUH与妊娠期高血压、子痫前期、早产等不良妊娠结局呈正相关性,

因此认为IUH可以作为一个不良妊娠结局的早期信号,警惕高位妊娠的发生,有助于减少妊娠并发症的发生。氧化应激(oxidative stress, OS)是指机体在遭受各种有害刺激时,体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)等产生过多,氧化系统和抗氧化系统失衡,继而导致细胞功能失调及组织损伤^[5]。现已明确自由基损伤与多种病理生理现象密切相关,如衰老、肿瘤、炎症、心脑血管、动脉粥样硬化、帕金森病等。文献^[5]报道,氧化应激与自然流产、早产、先兆子痫及胎儿宫内生长受限等的发生均有关联。该研究通过了解IUH患者氧化应激水平,旨在探索IUH的发生机制,以期对预防先兆流产、减少产科并发症及降低新生儿死亡率起到积极作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 选择2014年7月~2015年7月在安徽医科大学第一附属医院生殖中心因输卵管因素(排除明显输卵管积水者)行IVF-ET治疗,新鲜或者解冻第5天胚胎后35d经阴道B超检查证实为宫内早孕合并IUH的患者纳入IUH组。根据孕囊数与周期类型,匹配选取同期经IVF获宫内妊娠且无IUH发生的患者纳入对照组(N-IUH组)。根据孕囊数,将IUH组及N-IUH组分别分为单胎组及双胎组。受试者孕前均未合并原发性高血压、糖尿病、甲状腺、心肝肾等脏器功能异常,无自身免疫功能异常、复发性流产,无烟酒等不良嗜好,且排除单卵多胎、多胎自减及人工减胎术后患者。受试者临床基本资料根据临床病历记载及电话随访获得。本研究经医院伦理委员会批准,所有受试者已签署知情同意书。

1.1.2 试剂 人ROS、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)及丙二醛(malondialdehyde, MDA) ELISA试剂盒购自上海源叶生物技术有限公司。

1.2 方法

2016-05-04 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2012A146)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院生殖中心,合肥 230022

作者简介:王 娅,女,硕士研究生;

魏兆莲,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: weizhaolian_1@126.com

1.2.1 标本采集 采集受试孕妇清晨空腹外周静脉血 4 ml,分离血清后置 -80 ℃ 下保存待检。

1.2.2 ELISA 法 检测孕妇 ROS、SOD、GPx、MDA 水平,实验步骤严格按着试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用例数和百分数描述。两组间计量资料比较采用两独立样本 *t* 检验,两组间计数资料比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 单胎 IUH 组与单胎 N-IUH 组临床基本资料的比较 两组中各包含新鲜周期移植(IVF-ET) 者 15 例,自然周期解冻移植(NC-FET) 者 33 例,人工周期解冻移植(AC-FET) 者 20 例。受试者年龄、BMI、不孕年限、累计种植失败次数、移植日内膜厚度及胎龄间差异均无统计学意义。两组既往孕产史(流产史、先兆子痫、胎盘早剥、胎儿宫内生长受限及早产) 间的发生率差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 单胎 IUH 组与单胎 N-IUH 组临床基本资料的比较

| 项目 | IUH 组 (n=68) | N-IUH 组 (n=68) | <i>t</i> / χ^2 值 | <i>P</i> 值 |
|--|-----------------|-------------------|-----------------------|------------|
| 获孕方式[n(%)] | | | | |
| IVF-ET | 15(22.06) | 15(22.06) | - | - |
| NC-FET | 33(48.53) | 33(48.53) | - | - |
| AC-FET | 20(29.41) | 20(29.41) | - | - |
| 年龄(岁 $\bar{x} \pm s$) | 30.67 ± 4.34 | 30.13 ± 4.13 | 0.457 | 0.492 |
| BMI(kg/m ² $\bar{x} \pm s$) | 21.02 ± 2.85 | 22.15 ± 3.58 | 0.173 | 0.059 |
| 不孕年限(年 $\bar{x} \pm s$) | 3.90 ± 2.17 | 4.23 ± 2.37 | 2.523 | 0.423 |
| 累计种植失败次数(次 $\bar{x} \pm s$) | 0.80 ± 0.99 | 0.67 ± 1.02 | 0.415 | 0.468 |
| 内膜厚度(mm $\bar{x} \pm s$) | 11.20 ± 1.99 | 10.60 ± 1.73 | 0.571 | 0.078 |
| 胎龄(d $\bar{x} \pm s$) | 35.03 ± 1.94 | 34.90 ± 2.54 | 2.234 | 0.543 |
| 经产妇[n(%)] | 9(13.24) | 4(5.88) | 2.126 | 0.145 |
| 流产史[n(%)] | 27(39.71) | 31(45.59) | 0.481 | 0.488 |
| 先兆子痫史[n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |
| 胎盘早剥史[n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |
| 胎儿宫内生长受限史[n(%)] | 1(1.47) | 0(0) | - | 1.000 |
| 早产史(<37 周) [n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |

2.2 双胎 IUH 组与双胎 N-IUH 组临床基本资料的比较 两组中各包含新鲜周期移植者(IVF-ET) 10 例,自然周期解冻移植者(NC-FET) 25 例,人工周期解冻移植者(AC-FET) 18 例。两组受试者年龄、BMI、不孕年限、累计种植失败次数、内膜厚度及胎龄间差异均无统计学意义。两组既往孕产史(流产史、先兆子痫、胎盘早剥、胎儿宫内生长受限及早产) 间的发生率差异均无统计学意义,见表 2。

表 2 双胎 IUH 组与双胎 N-IUH 组临床基本资料的比较

| 项目 | IUH 组 (n=53) | N-IUH 组 (n=53) | <i>t</i> / χ^2 值 | <i>P</i> 值 |
|--|-----------------|-------------------|-----------------------|------------|
| 获孕方式[n(%)] | | | | |
| IVF-ET | 10(18.87) | 10(18.87) | - | - |
| NC-FET | 25(47.17) | 25(47.17) | - | - |
| AC-FET | 18(33.96) | 18(33.96) | - | - |
| 年龄(岁 $\bar{x} \pm s$) | 30.00 ± 3.49 | 29.45 ± 3.87 | 0.353 | 0.489 |
| BMI(kg/m ² $\bar{x} \pm s$) | 22.24 ± 3.16 | 22.82 ± 3.29 | 0.473 | 0.406 |
| 不孕年限(年 $\bar{x} \pm s$) | 4.64 ± 2.87 | 4.41 ± 2.60 | 3.569 | 0.698 |
| 累计种植失败次数(次 $\bar{x} \pm s$) | 0.41 ± 0.95 | 0.55 ± 0.85 | 0.431 | 0.479 |
| 内膜厚度(mm $\bar{x} \pm s$) | 11.17 ± 1.92 | 11.13 ± 2.63 | 0.471 | 0.934 |
| 胎龄(d $\bar{x} \pm s$) | 36.55 ± 4.19 | 36.91 ± 2.83 | 3.231 | 0.635 |
| 经产妇[n(%)] | 5(9.43) | 8(15.09) | 0.789 | 0.374 |
| 流产史[n(%)] | 21(39.62) | 17(32.08) | 0.441 | 0.418 |
| 先兆子痫史[n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |
| 胎盘早剥史[n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |
| 胎儿宫内生长受限史[n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |
| 早产史(<37 周) [n(%)] | 0(0) | 0(0) | - | - |

2.3 IUH 组与 N-IUH 组外周血清 ROS、SOD、GPx、MDA 水平的比较 单胎 IUH 组中 ROS 水平高于单胎 N-IUH 组,单胎 IUH 组 MDA 水平高于单胎 N-IUH 组,且差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。SOD 及 GPx 水平差异无统计学意义,见表 3。双胎 IUH 组 ROS 高于双胎 N-IUH 组,双胎 IUH 组 MDA 水平高于双胎 N-IUH 组,且差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。双胎 IUH 组中 SOD 水平低于双胎 N-IUH 组,但差异无统计学意义。两组 GPx 水平间差异无统计学意义,见表 3。

表 3 单胎组与双胎组中外周血清 ROS、SOD、GPx、MDA 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

| 项目 | IUH 组 | N-IUH 组 | <i>t</i> 值 | <i>P</i> 值 |
|--------------|---------------|-----------------|-----------------|--------------|
| 单胎 | ROS(IU/ml) | 347.07 ± 125.28 | 312.41 ± 117.18 | 2.013 < 0.05 |
| | SOD(U/ml) | 118.04 ± 45.50 | 111.89 ± 58.40 | 0.854 > 0.05 |
| | GPx(U/g Hb) | 22.69 ± 9.93 | 22.77 ± 13.30 | 0.713 > 0.05 |
| 双胎 | MDA(nmol/ml) | 5.86 ± 3.64 | 4.46 ± 2.65 | 2.425 < 0.05 |
| | ROS(IU/ml) | 379.55 ± 169.12 | 311.76 ± 120.36 | 2.133 < 0.05 |
| | SOD(U/ml) | 121.23 ± 90.10 | 124.51 ± 41.42 | 0.578 > 0.05 |
| GPx(U/g Hb) | | 28.63 ± 10.80 | 26.06 ± 14.55 | 0.847 > 0.05 |
| | MDA(nmol/ml) | 7.42 ± 2.52 | 4.58 ± 3.42 | 2.596 < 0.05 |

3 讨论

ROS 是分子氧转化成水的过程中产生的中间代谢产物的总称。有机体内,ROS 的清除主要依靠内源性自由基清除系统,包括酶类抗氧化剂,如 SOD、GPx、过氧化氢酶(CAT) 等和非酶类抗氧化剂,如维生素 C、维生素 E、还原型谷胱甘肽等^[5]。当

ROS 的产生超过机体的清除能力,OS 随即发生。ROS 损伤机制主要涉及对脂质、DNA、蛋白质及多糖分子等生物大分子的氧化破坏。MDA 作为脂质过氧化的终产物,是了解脂质过氧化程度最常用的指标,其水平可间接反应生物膜系统受损程度。

正常妊娠中,囊胚着床后早期绒毛滋养细胞侵入子宫螺旋动脉管腔,闭合螺旋动脉,限制母体血液进入胎盘,使分化细胞免受大剂量活性氧损伤。胎盘形成后,母体与胎盘间血液循环完全建立,胎盘内氧气浓度迅速增加,线粒体呼吸作用增强,胚胎及胚外细胞暴露于 ROS 中^[6],胎盘发生 OS。随着胎盘细胞对氧化环境的适应,氧化水平回至基线状态^[7]。

多项研究提示:OS 与流产之间存在相关性。有学者发现:自然流产患者体内母胎循环的建立早发生于孕 8~9 周^[8],而非正常的 10~12 周^[7],胎盘细胞过早暴露于高氧化环境,合体滋养细胞发生逆行性改变,导致妊娠丢失。El-Far et al^[9] 也发现自然流产患者体内 GPx、SOD 水平显著降低,MDA 水平显著升高。此外,多种妊娠并发症的发生与 OS 密切相关。研究^[10]显示:先兆子痫患者中细胞内 HO-1、HO-2、SOD、GPx 和 CAT mRNA 表达水平的降低。Krishna Mohan et al^[11] 的实验结果显示:先兆子痫患者体内谷胱甘肽及抗氧化维生素浓度的降低及脂质过氧化产物的增加,支持了 OS 是先兆子痫的致病因素这一假说。Plessinger et al^[12] 的研究结果显示:暴露于次氯酸的羊膜上皮细胞和 I 型胶原受损,据此认为活性氧可以损伤羊膜上皮细胞和 I 型胶原,胎膜胶原的广泛降解最终导致胎膜早破的发生。

本研究中纳入受试者均为移植第 5 天胚胎后 35 d(约孕 8 周),生理状态下,此时螺旋小动脉重铸尚未开始,胚胎处于低氧化环境。本研究结果显示:IUH 组 ROS 水平高于 N-IUH 组($P < 0.05$);IUH 组 MDA 水平显著高于 N-IUH 组($P < 0.05$)。ROS 作为 OS 反应底物,MDA 作为脂质过氧化的终产物,两者浓度的显著升高说明 IUH 组患者存在更高的氧化状态。但两组间 SOD 及 GPx 水平均无显著差异,推测其可能原因是 SOD 及 GPx 作为人体内源性抗氧化系统的重要组成部分,两者均定位于组织细胞内,只有当大量组织细胞严重受损时才会出现外周血中酶浓度的显著变化。

综上所述,本研究通过检测行 IVF 后早孕合并 IUH 患者外周血中 ROS、SOD、GPx 及 MDA 的水平,

根据实验结果可推论出 IVF 后妊娠早期合并 IUH 的女性较无 IUH 者处于更高的氧化状态。预防性适度的抗氧化治疗,或将有助于提高此类患者的产科安全和新生儿质量。

参考文献

- [1] Johns J, Hyett J, Jauniaux E. Obstetric outcome after threatened miscarriage with and without a hematoma on ultrasound [J]. *Obstet Gynecol*, 2003, 102(3): 483-7.
- [2] Seki H, Kuromaki K, Takeda S, et al. Persistent subchorionic hematoma with clinical symptoms until delivery [J]. *Int J Gynecol Obstet*, 1998, 63(2): 123-8.
- [3] Asato K, Mekar K, Heshiki C, et al. Subchorionic hematoma occurs more frequently in *in vitro* fertilization pregnancy [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 181: 41-4.
- [4] Xiang L, Wei Z, Wu J, et al. Clinical significance of first-trimester intrauterine hematomas detected in pregnancies achieved by IVF-embryo transfer [J]. *Reprod Biomed Online*, 2014, 29(4): 445-51.
- [5] Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar B J, et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2012, 10: 49.
- [6] Alcolea M P, Colom B, Llado I, et al. Mitochondrial differentiation and oxidative phosphorylation system capacity in rat embryo during placentation period [J]. *Reproduction*, 2007, 134(1): 147-54.
- [7] Jauniaux E, Watson A L, Hempstock J, et al. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(6): 2111-22.
- [8] Jauniaux E, Gulbis B, Burton G J. Physiological implications of the materno-fetal oxygen gradient in human early pregnancy [J]. *Reprod Biomed Online*, 2003, 7(2): 250-3.
- [9] El-Far M, El-Sayed I H, El-Motwally Ael G, et al. Tumor necrosis factor-alpha and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2007, 45(7): 879-83.
- [10] Aris A, Benali S, Ouellet A, et al. Potential biomarkers of preeclampsia: inverse correlation between hydrogen peroxide and nitric oxide early in maternal circulation and at term in placenta of women with preeclampsia [J]. *Placenta*, 2009, 30(4): 342-7.
- [11] Krishna Mohan S, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy-induced hypertension [J]. *Indian J Physiol*, 2007, 51(3): 284-8.
- [12] Plessinger M A, Woods J R Jr, Miller R K. Pretreatment of human amnion-chorion with vitamin C and E prevents hypochlorous acid-induced damage [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2000, 183(4): 979-85.

ESM-1 乳腺癌组织中的表达及其临床意义

颜蕴文¹, 徐晓军¹, 陈 樱¹, 张素梅², 汪 渊², 张敬杰¹

摘要 目的 研究内皮细胞特异性分子-1 (ESM-1) 作为敏感分子标志物对乳腺癌预后的预测及复发的判断。方法 选取 133 例乳腺癌患者石蜡标本, 进行癌组织和癌旁组织切片, 采用免疫组化法研究 ESM-1 蛋白的表达, 分析 ESM-1 与肿瘤生物学行为及患者预后之间的关系。结果 ESM-1 的表达在乳腺癌组织中弱, 而在癌旁组织中强; 在分期早的肿瘤中表达高于分期晚的肿瘤。ESM-1 和乳腺癌的预后有着密切的关系, 在腋窝转移阳性患者中 ESM-1 表达低于腋窝阴性患者且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 人类表皮生长因子受体 2 (HER-2) 过表达患者中 ESM-1 的表达低于 HER-2 无扩增患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其他相关因素差异无统计学意义。结论 ESM-1 可以成为判断乳腺癌患者预后的一个分子标志物, ESM-1 在组织中的高表达往往预示着该患者有较好的预后和长期的生存。

关键词 乳腺癌; 分子标志物; 内皮细胞特异性分子; 预后
中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1167-04

近些年来随着人们生活水平的提高, 乳腺癌目前已经成为了女性最为常见的恶性肿瘤, 多年来医学科研工作者一直致力于早期发现乳腺癌患者在长期随访过程中发生的转移复发, 预测患者的长期预后的分子标志物, 其中包括内皮细胞特异性分子-1 (endothelial cell specific molecule-1, ESM-1), 1996 年克隆于人脐静脉内皮细胞 cDNA 文库, 由法国巴士德研究所 Lassalle et al^[1-2] 发现, 其编码的蛋白质主要在血管内皮细胞表达, 因此被称为 ESM-1。既往利用组织芯片的方法大规模地检测 ESM-1 的表达, 研究^[3-5] 显示 ESM-1 在许多类型的恶性肿瘤中都呈过表达, 例如乳腺癌、甲状腺癌、肺癌、卵巢癌、肾癌和恶性淋巴瘤等, 并且表达水平和疾病严重程度呈正相关性。该研究检测 133 例乳腺癌患者癌组织和癌旁组织 ESM-1 的表达, 分析其临床意义。

2016-05-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81201907)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院乳腺外科, 合肥 230022

²安徽医科大学分子生物学实验室, 合肥 230032

作者简介: 颜蕴文, 女, 博士研究生;

张敬杰, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: 13956948654@yeah.net

Detailed analysis of oxidative stress level in IVF-pregnancies with intrauterine hematoma in the first trimester

Wang Ya, Wei Zhaolian, Cao Yunxia

(Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract *Objective* To investigate oxidative stress level in the *in vitro* fertilization (IVF) -pregnancies diagnosed with intrauterine hematoma (IUH). *Methods* A matched case-control study was performed on 242 women including 121 women with intrauterine hematomas and 121 controls without intrauterine hematomas. ELISA was used to measure the maternal serum reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) levels in cases and controls. *Results* There was no difference in maternal clinical characteristics between the cases and controls. Elevated maternal serum ROS level was found to be significantly much higher in pregnancies with IUH, regardless of singleton or twin pregnancies. And so was MDA. But no significant differences were found in the SOD and GPx levels between the cases and controls. *Conclusion* IVF-pregnancies with intrauterine hematomas during the first trimester show changes in oxidative stress level, which suggests a possible association with intrauterine hematoma and oxidative stress.

Key words oxidative stress; reactive oxygen species; *in vitro* fertilization and embryo transfer; intrauterine hematoma