

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.25.019

胎盘葡萄糖转运蛋白3在胎儿生长受限胎盘中的表达和意义

李金艳¹,胡荣静¹,曾 敏^{2△}
(重庆市中医院:1.妇产科;2.病理科 400021)

[摘要] **目的** 探讨葡萄糖转运蛋白3(GLUT3)在胎儿生长受限(FGR)中的表达及意义。**方法** 收集正常妊娠胎盘($n=15$)和FGR胎盘($n=15$)。采用免疫组织化学法分析 GLUT3 在胎盘组织母体面和胎儿面表达情况,RT-qPCR 及 Western blot 检测胎盘组织母体面和胎儿面 GLUT3 mRNA 和蛋白表达情况。**结果** FGR 组胎儿体质量、胎盘质量、胎盘厚度分别为($2\,035.9\pm451.2$)g、(386.2 ± 55.3)g、(1.93 ± 0.6)cm 均低于对照组($3\,205.8\pm358.1$)g、(582.7 ± 77.4)g、(2.56 ± 0.4)cm,差异有统计学意义($P<0.05$)。FGR 组胎盘组织母体面 GLUT3 AOD, GLUT3 mRNA、蛋白表达水平(0.451 ± 0.121 、 2.12 ± 0.23 、 1.12 ± 0.23)明显高于对照组(0.277 ± 0.093 、 0.46 ± 0.13 、 0.48 ± 0.13),差异有统计学意义($P<0.05$)。FGR 组胎盘组织胎儿面 GLUT3 AOD, GLUT3 mRNA 和蛋白表达与对照组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** FGR 胎盘缺氧导致胎盘组织母体面 GLUT3 表达增高,胎盘因缺氧而过度消耗了葡萄糖,最终可能导致转运到胎儿的葡萄糖降低。

[关键词] 葡萄糖转运蛋白3;胎盘;胎儿生长受限
[中图法分类号] R714 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)25-3319-04

Expression and significance of placenta glucose transporter 3 in fetal growth restriction

LI Jinyan¹, HU Rongjing¹, ZENG Min^{2△}
(1. Department of Obstetrics and Gynecology; 2. Department of Pathology, Chongqing Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of placenta glucose transporter 3 (GLUT3) in normal pregnancy and fetal growth restriction (FGR) and to investigate its significance in FGR. **Methods** The placental tissues were collected from the normal pregnancy group ($n=15$) and FGR group ($n=15$). The expression of GLUT3 in placental maternal surface and fetal surface were analyzed by Immunohistochemical method. The expression levels of GLUT3 mRNA and protein in placental maternal surface and fetal surface were detected by adopting RT-qPCR and Western blot respectively. **Results** The fetal weight, placenta weight and placenta thickness in the FGR group were [$(2\,035.9\pm451.2)$ g, (386.2 ± 55.3) g and (1.93 ± 0.6) cm respectively], which were lower than the corresponding indicators in the control group ($3\,205.8\pm358.1$)g, (582.7 ± 77.4) g and (2.56 ± 0.4) cm, all $P<0.05$. The immunohistochemical results showed that the average optical density (AOD) level of GLUT3 in the placental maternal surface of FGR was 0.451 ± 0.121 , which was markedly higher than 0.277 ± 0.093 in the control group ($P<0.05$). The mRNA and protein levels of GLUT3 in placental maternal surface of FGR were 2.12 ± 0.23 and 1.12 ± 0.23 respectively, which were significantly higher than 0.46 ± 0.13 and 0.48 ± 0.13 in the control group (all $P<0.05$). AOD in the placental fetal surface of FGR, GLUT3 mRNA and protein expression had no significant difference between FGR and control group. **Conclusion** FGR placental anoxia causes GLUT3 expression increase in placental maternal surface, the placenta excessively consumes glucose due to placental anoxia, and finally leads to decrease of glucose transporting to fetus.

[Key words] glucose transporter protein 3; placenta; fetal growth restriction

胎儿生长受限(fetal growth restriction, FGR)增加新生儿的病死率,并且新生儿在成年后糖耐量异常及心血管疾病的发病率也随之增高。FGR 的发病机制目前尚不清楚。母胎间葡萄糖转运出现异常可能与 FGR 的发生有着密切关系。葡萄糖是生长发育的胎儿和胎盘中有氧代谢的必需物质^[1]。葡萄糖从母体血液中通过葡萄糖转运蛋白(glucose transporter, GLUT)介导转运到胎儿体内。GLUT 是一个蛋白家

族,目前发现共有 14 个异构体,主要负责葡萄糖通过细胞膜的双脂质层进入细胞内。人类胎盘滋养层上皮细胞中 GLUT 的主要成员包括 GLUT1、GLUT3 和 GLUT4^[2]。GLUT1 主要分布在哺乳动物胎盘的合体滋养层,在整个妊娠期间呈高表达^[3-4]。GLUT3 通常在代谢率高的组织如受精卵植入前胚胎中的神经元和滋养外胚层中有表达^[5]。GLUT3 对葡萄糖有着较高的亲和力,比 GLUT1 和 GLUT4 具有更高的葡萄糖转运能力^[6]。GLUT4 是对胰岛素敏感的异构体,GLUT4 主要负责妊娠早期在胰岛素存在条件下能够促进葡萄糖母胎间转运。研究表明 FGR 与先兆子痫有着相同的胎盘病因学,即胎盘滋养细胞不充分生长,导致子宫胎盘血流灌注减少使胎盘长期处于慢性缺氧状态从而引起 FGR 的发生。本文研究 FGR 胎盘中 GLUT3 的表达情况,以明确其作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 1—11 月在本院住院分娩的 FGR 孕妇 15 例作为研究对象,年龄(27.3±2.4)岁,孕周(38.8±1.6)周,无其他产科的合并症及并发症。FGR 的诊断标准参照谢幸主编《妇产科学》第 8 版。同期住院分娩的正常孕妇 15 例作为对照,无任何妊娠期合并症和并发症,年龄(26.8±1.6)岁,孕周(39.6±1.8)周。

1.2 药品和试剂 兔抗人 GLUT3 多克隆抗体、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显示剂购自武汉博士德生物公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、PVDF 膜、ECL 发光液购自上海碧云天生物公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;GLUT3 引物由上海生工设计引物序列并合成引物。

1.3 方法

1.3.1 测定新生儿、胎盘质量及标本采集 经阴道或剖宫产分娩的新生儿,娩出后擦干全身的羊水及血液称取体质量并记录。胎盘娩出后称取质量并记录。在胎盘中央靠近脐带处取大小为 2.0 cm×2.0 cm×2.0 cm 三角形的胎盘组织,测定胎盘组织厚度,将剪下胎盘分为两个水平片段,底蜕膜为胎盘母体面,顶部绒毛膜表面为胎儿面,分别用于以下研究。

1.3.2 免疫组化检测 GLUT3 的表达 胎盘母体面和胎儿面常温固定于 4%多聚甲醛中 24 h 后,常规石蜡包埋并连续切片。具体操作步骤如下:胎盘切片用二甲苯脱蜡至水,用柠檬酸缓冲液高温进行抗原修复,3%双氧水灭活内源性酶,山羊血清封闭后加入一抗 GLUT3,工作液浓度为 1:50,4℃过夜。加入 SABC 免疫组化试剂盒中生物素标记的羊抗兔 IgG,加入 HRP 标记链亲和素,DAB 显色后,苏木素复染,中性树脂封片。结果判定:以胞浆出现棕黄色颗粒为

阳性反应,阴性反应为除细胞核染成蓝色外,胞核和胞浆内无棕黄色反应物。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件系统对 GLUT3 在胎盘组织的表达进行定量分析,每张切片随机选取 10 个完整不重叠的高倍镜视野(×400)下阳性反应面积和阳性积分光密度,计算出平均光密度值(AOD),以每例 10 个视野 AOD 的平均值作为该例的测量值。

1.3.3 RT-qPCR 按照 RNA 提取试剂盒说明书分别提取胎盘母体面和胎儿面总 RNA,cDNA 的合成按照逆转录试剂盒说明操作。人 GLUT3 基因引物由上海生物工程合成,上游引物 5'-CAG GCA CAC GGT GCA GAT AG-3',下游引物 5'-GCA GGC TCG ATG CTG TTC AT-3'。反应体系 20 μL。退火温度为 65℃,38 次循环。用 GAPDH 作为内参照。每个样品复孔 3 次,最后分析溶解曲线,用 GLUT3 与内参基因 GAPDH 基因表达量的比值来表示相对表达量。

1.3.4 Western blot 胎盘组织称重后剪细,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,用匀浆机匀浆后,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。采用细胞裂解液配平各组之间蛋白浓度。加热使蛋白变性。蛋白样品上样量为 12 μL,行 SDS-PAGE 胶电泳分离,然后通过电转至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 30 min 后,放入 GLUT3 抗体(1:1 000)4℃过夜。PVDF 转至二抗羊抗兔 IgG 抗体(1:6 000)室温孵育 2 h。β-actin 作为内参。ECL 发光液发光显影检测目的蛋白条带的变化情况。采用 Bio-Rad 凝胶成像系统软件分析目的条带和内参条带的灰度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

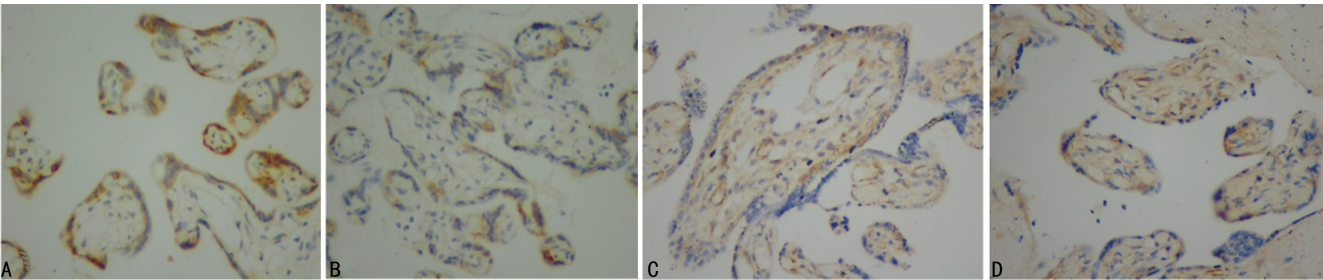
2 结果

2.1 两组新生儿出生体质量、胎盘质量、胎盘厚度 FGR 组新生儿出生体质量、胎盘质量、胎盘厚度明显低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 1。

表 1 两组新生儿出生体质量、胎盘质量、胎盘厚度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	体质量(g)	胎盘质量(g)	胎盘厚度(cm)
FGR 组	15	2 035.9±451.2	386.2±55.3	1.93±0.60
对照组	15	3 205.8±358.1	582.7±77.4	2.56±0.40

2.2 GLUT3 在胎盘组织表达情况 GLUT3 在胎盘细胞滋养细胞和合体滋养细胞上均有表达,主要表达于细胞膜和细胞质内。与对照组比较,FGR 组胎盘组织母体面 GLUT3 表达呈强阳性。FGR 组胎盘组织母体面 GLUT3 的 AOD 值(0.451±0.121)明显高于



A:FGR 组胎盘组织母体面;B:对照组胎盘组织母体面;C:FGR 组胎盘组织胎儿面;D:对照组胎盘组织胎儿面

图 1 GLUT3 在胎盘组织中表达情况(×400)

对照组(0.277 ± 0.093),差异有统计学意义($P < 0.05$)。GLUT3 在 FGR 胎盘组织胎儿面 AOD 值(0.252 ± 0.102)与对照组(0.246 ± 0.086)比较,差异无统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

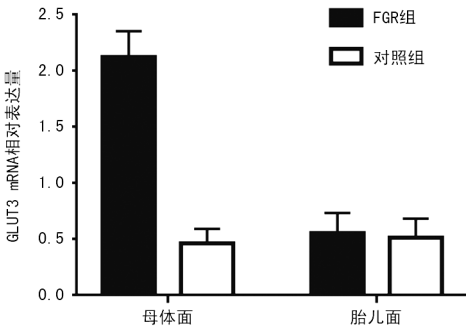
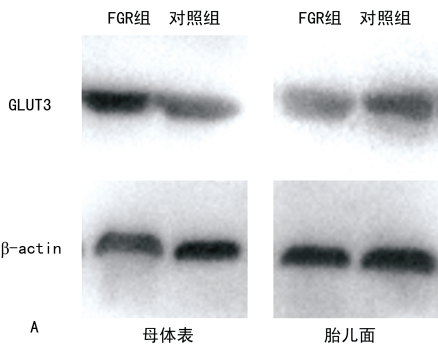
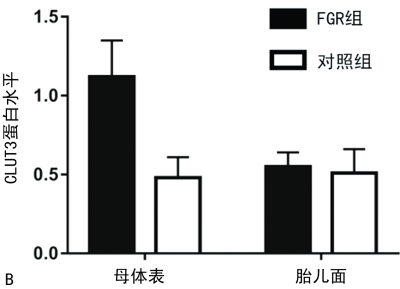


图 2 RT-qPCR 检测两组胎盘组织 GLUT3 mRNA 表达变化



A 母体表 胎儿面



B 母体表 胎儿面

A:Western blot 蛋白条带;B:两组 GLUT3 灰度值与 β -actin 灰度值的比值柱形图

图 3 Western blot 检测两组胎盘组织 GLUT3 蛋白表达变化

2.3 两组胎盘组织 GLUT3 mRNA 的表达 FGR 组胎盘组织母体面 GLUT3 mRNA 的表达水平(2.12 ± 0.23)明显高于对照组(0.46 ± 0.13),差异有

统计学意义($P < 0.05$)。FGR 组胎盘组织胎儿面 GLUT3 mRNA 的表达水平(0.55 ± 0.18)与对照组(0.51 ± 0.14)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 2。

2.4 两组胎盘组织 GLUT3 蛋白的表达 与对照组比较,FGR 组胎盘组织母体面 GLUT3 蛋白的表达(1.12 ± 0.23)明显高于对照组(0.48 ± 0.13),差异有统计学意义($P < 0.05$)。FGR 组胎盘组织胎儿面 GLUT3 蛋白(0.55 ± 0.09)与对照组(0.51 ± 0.15)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

3 讨论

FGR 在我国发病率为 3%~7%,是一种严重的妊娠并发症,围产儿的病死率是正常胎儿的 4~6 倍,其新生儿远期和近期并发症均明显升高^[7]。葡萄糖是胎儿和胎盘主要的能量来源,是维持胎儿正常的代谢和生长的必需物质。葡萄糖转运受到复杂的机制调控。葡萄糖通过胎盘组织从母体转运到胎儿体内,而胎盘本身也会消耗葡萄糖^[8],当胎盘处于缺氧状态时会过度消耗葡萄糖。胎儿组织摄取葡萄糖受葡萄糖转运体的调控。GLUT3 的分布有组织特异性,主要表达在代谢活跃的组织中如胎盘、大脑、视网膜的神经元。GLUT3 对葡萄糖具有较低的 K_m ,当底物的活性降低时 GLUT3 仍然可以保持活性。随着妊娠增加,GLUT3 在胎盘葡萄糖转运中起着更重要的作用,影响胎盘滋养细胞的植入、分化^[9],参与妊娠早期和妊娠晚期胚胎发育的调控^[10-11],在妊娠晚期 GLUT3 逐渐代替 GLUT1,随着妊娠进展 GLUT3 在胎盘转运葡萄糖方面起着更重要的作用。FGR 时葡萄糖转运体随胎儿血糖浓度急性或慢性改变而出现相应的增加或降低。当胎盘中 GLUT 表达异常时,葡萄糖的转运或利用受损,使胎儿葡萄糖摄取不足,通过研究发现 FGR 胎盘的 GLUT3 表达出现明显改变。

本研究显示,GLUT3 主要表达于细胞滋养层细胞,部分表达于合体滋养层细胞。这与许多学者发现妊娠早期 GLUT3 在合体滋养层细胞中表达相一致^[12]。GLUT3 在 FGR 胎盘组织母体面表达呈强阳性,FGR 胎盘组织母体面 GLUT3 mRNA 和蛋白明

显高于对照组,两组间胎盘组织胎儿面差异无统计学意义($P>0.05$)。以上研究结果表明,FGR 胎盘的母体面和胎儿面对葡萄糖的转运能力不同。既往研究表明从足月胎盘分离培养的滋养细胞处于缺氧状态时 GLUT3 mRNA 表达增加^[11]。来源于绒毛膜癌的滋养叶细胞随着供氧压力降低,GLUT3 表达呈剂量依赖性增高,同时伴随着上皮细胞的葡萄糖转运增加^[13]。因为 FGR 的胎盘绒毛血管发育异常,胎盘血流处于低灌注状态,使胎盘绒毛间气体交换下降,胎盘处于缺氧状态,故推测因为 FGR 胎盘处在缺氧状态导致胎盘组织母体面 GLUT3 表达增加,从而提高了葡萄糖从母体到胎盘的转运,增加胎盘组织内葡萄糖以提供更多能量来适应胎盘缺氧状态,但胎盘因缺氧过度消耗葡萄糖,导致转运到胎儿体内的葡萄糖减少,从而 FGR。另一方面,FGR 胎盘组织母体面 GLUT3 表达增加可能与糖皮质激素增高有关系^[14]。FGR 发生时胎儿处于高水平的糖皮质激素环境中,胎盘组织母体面 GLUT3 表达增高是提高胎盘对葡萄糖的供应,以减轻胎儿暴露于糖皮质激素引起的胎儿低血糖^[15],但是胎盘过度消耗葡萄糖损害了葡萄糖向胎儿转运,从而导致生长受限。

FGR 严重程度与胎盘缺氧受损程度密切相关。FGR 胎盘组织母体面 GLUT3 表达增高提示胎盘发生缺氧程度。胎盘因缺氧而过度消耗了葡萄糖,最终可能导致转运到胎儿的葡萄糖降低,影响胎儿的生长发育。

参考文献

- [1] NOVAKOVIC B, GORDON L, ROBINSON W P, et al. Glucose as a fetal nutrient; dynamic regulation of several glucose transporter genes by DNA methylation in the human placenta across gestation[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(1):282-288.
- [2] MUECKLER M, THORENS B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters [J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2/3):121-138.
- [3] ACOSTA O, RAMIREZ V I, LAGER S, et al. Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers[J]. Am J Obstet Gynecol, 2015, 212(2):e1-7.
- [4] CHANDRASIRI U P, CHUA C L, UMBERS A J, et al. Insight into the pathogenesis of fetal growth restriction in placental malaria; decreased placental glucose transporter isoform 1 expression[J]. J Infect Dis, 2014, 209(10):1663-1667.
- [5] GANGULY A, COLLIS L, DEVASKAR S U. Placental glucose and amino acid transport in calorie-restricted wild-type and Glut3 null heterozygous mice[J]. Endocrinology, 2012, 153(8):3995-4007.
- [6] STANIROWSKI P J, SZUKIEWICZ D, PYZLAK M, et al. Impact of pre-gestational and gestational diabetes mellitus on the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in human term placenta[J]. Endocrine, 2017, 55(3):799-808.
- [7] EL A M, JARREAU P H, VAN REEMPTS P, et al. Does the antenatal detection of fetal growth restriction (FGR) have a prognostic value for mortality and short-term morbidity for very preterm infants? Results from the MOSAIC cohort[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2016, 29(4):596-601.
- [8] DEVASKAR S U, CHU A. Intrauterine growth restriction; hungry for an answer[J]. Physiology (Bethesda), 2016, 31(2):131-146.
- [9] GANGULY A, MCKNIGHT R A, RAYCHAUDHURI S, et al. Glucose transporter isoform-3 mutations cause early pregnancy loss and fetal growth restriction[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(5):E1241-1255.
- [10] GANGULY A, CHEN Y, SHIN B C, et al. Prenatal caloric restriction enhances DNA methylation and MeCP2 recruitment with reduced murine placental glucose transporter isoform 3 expression[J]. J Nutr Biochem, 2014, 25(2):259-266.
- [11] MIMURA I, NANGAKU M, KANKI Y, et al. Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(15):3018-3032.
- [12] BROWN K, HELLER D S, ZAMUDIO S, et al. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation[J]. Placenta, 2011, 32(12):1041-1049.
- [13] BAUMANN M U, ZAMUDIO S, ILLSLEY N P. Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 293(1):C477-485.
- [14] BELKACEMI L, JELKS A, CHEN C H, et al. Altered placental development in undernourished rats; role of maternal glucocorticoids[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2011, 9:105.
- [15] KIPMEN-KORGUN D, OZMEN A, UNEK G, et al. Triamcinolone up-regulates GLUT 1 and GLUT 3 expression in cultured human placental endothelial cells[J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(1):47-53.