

缺氧诱导滋养细胞自噬参与子痫前期发病的实验研究*

秦兴发¹, 张 华^{1△}, 漆洪波¹, 陈国庆², 马海霞¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院产科 400016; 2. 广东省深圳市妇幼保健院妇产科 518000)

摘要:目的 探讨缺氧环境下滋养细胞自噬及子痫前期患者胎盘组织自噬发生情况。方法 将滋养细胞株 HTR-8/SVneo 分为低氧浓度 I、II 组及正常氧浓度组, 处理 48 h 后应用激光共聚焦显微镜检测细胞质内自噬体, PCR 分析自噬相关基因 LC3-II 的表达变化; 免疫组织化学检测 30 例子痫前期患者胎盘组织 LC3-II 表达水平。结果 低氧浓度组细胞质内可见红色自噬体染色结构, 而正常氧浓度 I、II 组则极少见, 低氧浓度 I、II 组细胞 LC3-II mRNA 表达量明显高于正常浓度组 ($P < 0.05$), 子痫前期患者胎盘组织 LC3-II 免疫染色阳性率为 67.12%, 而正常浓度组则为 9.14%, 两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 子痫前期患者胎盘组织细胞自噬活性增高, 缺氧可诱导滋养细胞株发生自噬现象。

关键词: 自噬; 缺氧; 子痫前期

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)05-0569-03

Experimental study of hypoxia-inducible trophoblastic autophagy involved in the pathogenesis of preeclampsia

Qin Xingfa¹, Zhang Hua^{1△}, Qi Hongbo¹, Chen Guoqing², Ma Haixia¹

(1. Department of Obstetrics, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Obstetrics, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To study hypoxia environment trophoblast cell autophagy and autophagy of the preeclampsia placental tissue. Methods Trophoblastic cell line HTR-8/SVneo were divided into three groups: low oxygen concentration group (group I and group II) and normal oxygen concentration group; 48 h after the application the confocal laser scanning microscopy was used for detection of cytoplasmic autophagosome, PCR technology analysis of autophagy-related gene expression change of LC3-II. LC3-II expression levels of 30 cases of preeclampsia placenta were detected by Immunohistochemistry. Results In low oxygen concentration group, there were visible red autophagosome chromatin structure in cytoplasm, which was extremely rare in the normal oxygen concentration group, in low oxygen concentration group cell LC3-II mRNA expression was significantly higher than that of normal concentration group. The preeclampsia placenta of patients with positive immunostaining of LC3-II was 67.12%, compared with 9.14% in the normal control, there was a significant difference between two groups. Conclusion Preeclampsia placenta autophagy activity increased, hypoxia can induce autophagy trophoblast cell line phenomenon.

Key words: autophagy; anoxia; preeclampsia

子痫前期是重要的妊娠期高血压疾病之一, 目前发病机制仍不明确。自噬是细胞在不利于自身生长的环境下, 自我吞噬细胞成分并将其消化成小分子物质, 最终供细胞在缺氧、感染等恶劣环境下生长, 介导细胞逃逸死亡^[1], 但过度自噬可导致 II 型程序性细胞死亡^[2]。最近有学者研究发现, 滋养细胞自噬在重度子痫前期发病机制中发挥着极为关键的作用^[3], 本研究以滋养细胞株 HTR-8/SVneo 为研究对象, 拟观察缺氧诱导滋养细胞自噬的发生情况, 并分析子痫前期胎盘组织中自噬分子的变化, 为进一步解释子痫前期发病机制提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 滋养细胞株 HTR-8/SVneo 由重庆医科大学细胞与组织工作研究室提供。胎牛血清为杭州四季青有限公司产品, PI 染料为江苏碧云天生物技术有限公司产品, RPMI-1640 为美国 GIBCO 公司生产, PCR 引物由大连生工合成。SP 免疫组织化学检测试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物有限公司, LC3-II 兔抗人一抗购自美国 Santa Cruz 公司。激光共聚焦显微镜为日本 Olympus 产品, PCR 相关仪器为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 细胞分组与缺氧培养 滋养细胞株 HTR-8/SVneo 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液进行培养, 使用 0.25% 胰酶进行消化传代。细胞分为 3 组: 正常氧浓度组 (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂); 低氧浓度 I 组 (8% O₂, 5% CO₂, 87% N₂); 低氧浓度 II 组 (2% O₂, 5% CO₂, 93% N₂), 培养 48 h。

1.2.2 激光共聚焦显微镜检测 将滋养细胞株 HTR-8/SVneo 接种于盖玻片上置于 6 孔板中, 制作细胞玻片, 细胞分组同 1.2.1, 培养 48 h 后收集细胞, 后经固定后加入磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释的兔抗人 LC3-II 单克隆抗体 (一抗 1:500), 4℃ 冰箱孵育过夜, 次日清洗后加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG (二抗 1:200), 室温避光孵育 30 min, 用 10 g/mL 吖啶橙染液和 Rnase A 室温下染色细胞 30 min, 置于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.3 Q-PCR 检测 LC3-II mRNA 的表达 细胞培养 48 h 后提取各组 HTR-8/SVneo 细胞的总 RNA, 按 RT 试剂盒说明书反转录为 cDNA 后, 应用 Q-PCR 技术检测 LC3-II mRNA 的表达情况。LC3-II 基因的引物序列: 上游 5'-CAG GAG ACG TTC GCG ATG AAA TTG TCA-3'; 下游 5'-TGA CAA TTT CAT CGC GGA CGT CTC CTG-3'。内参 β-actin 引物序

列:上游 5'-ATG GAA GCT GCT GGA ATC CAT -3';下游 5'-CCT TGC TCA TAC GGT CAG CAA TAC -3'。反应总体积 20 μ L,运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

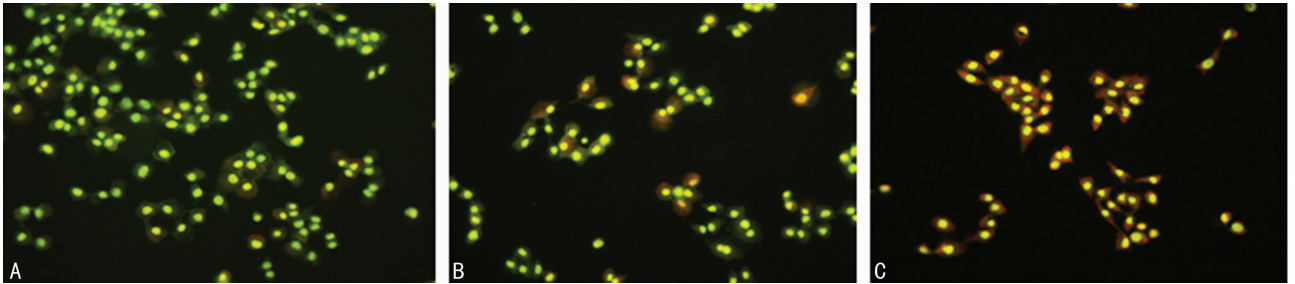
1.2.4 胎盘组织 LC3-II 免疫组织化学染色 选择 30 例重度子痫前期患者胎盘,年龄 21~34 岁,均于孕 34~36 周采取剖宫产终止妊娠,另取 30 例社会因素行剖宫产足月妊娠孕妇作为实验对照组,年龄 24~37 岁;术中胎儿娩出后,即取胎盘组织用于石蜡包埋后切片,进行常规 HE 染色与 SP 法免疫组化染色,其中 PBS 代替一抗作为阴性对照,LC3-II 一抗浓度为 1:200,山羊抗兔二抗浓度为 1:300。结果评判采用 Fromowitz 综合评分法,根据细胞质黄色颗粒的量,每张切片在高倍镜下随机盲取 5 个视野,共计数 1 000 个滋养细胞中的阳性

细胞数量。

1.3 统计学处理 采用 SAS9.1 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,计数资料率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

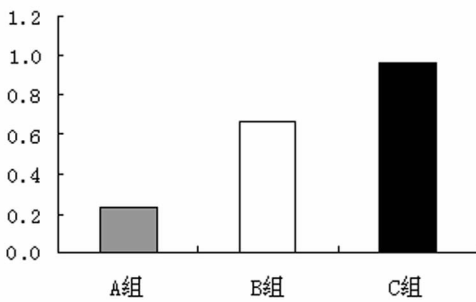
2.1 激光共聚焦显微镜检测结果 正常氧浓度组 HTR-8/SVneo 细胞在激光共聚焦显微镜下见细胞大小均匀,染色一致,均呈现绿色,而低氧浓度 I 组则见 27% 细胞呈现出细胞质红色,部分细胞质内可见点状红色,而低氧浓度 II 组可见 79% 细胞质均呈现红色,部分细胞质内可见大片点状染色物质,见图 1。



A:正常氧浓度组;B:低氧浓度 I 组;C:低氧浓度 II 组。

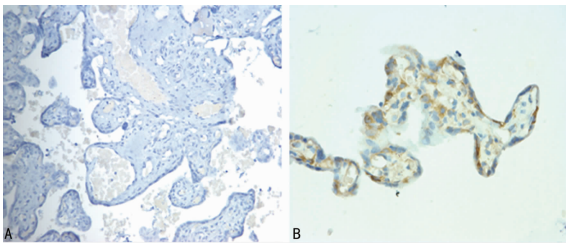
图 1 不同氧浓度处理 48 h 后的 HTR-8/SVneo 细胞(激光共聚焦 $\times 300$)

2.2 PCR 结果 低氧浓度组 HTR-8/SVneo 细胞经处理 48 h 后,细胞内 LC3-II mRNA 表达量明显上升,均高于正常氧浓度组,其中低氧浓度 II 组细胞的 LC3-II mRNA 低于低氧浓度 I 组,差异有无统计学意义($P<0.05$),见图 2。



A 组:正常氧浓度组;B 组:低氧浓度 I 组;C 组:低氧浓度 II 组。

图 2 3 组 HTR-8/SVneo 细胞经处理 48 h 后 LC3-II mRNA 相对表达量



A:对照组 LC3-II 无表达(SP $\times 100$);B:实验组 LC3-II 阳性表达(SP $\times 400$)。

图 3 正常胎盘与重度子痫前期滋养细胞 Beclin-1、LC3-II 免疫组织化学染色

2.3 免疫组织化学结果 LC3-II 蛋白在实验组胎盘组织中表达明显,棕黄色颗粒遍布于两种滋养细胞的细胞质中,部分呈黄色块状分布,而细胞核内无表达(图 3),少部分正常滋养细胞胞质中,偶见有淡黄色颗粒形成,实验组整体阳性率为

67.12%,而对照组整体阳性率为 9.14%,两者差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

作为妊娠期常见并发症之一,子痫前期常造成孕产妇全身各细胞、组织、器官严重甚至不可逆转的损伤,从而诱发心力衰竭、肾衰竭、全身多器官功能衰竭等严重的并发症,临床治疗效果并不理想,常严重影响孕产妇和围生儿的健康^[4-6]。因此,预防和治疗子痫前期是产科的重要任务之一,为制订子痫前期更好的临床防治策略,必须明确其发病机制。本病发病机制复杂,伴随诸多基因及相应蛋白表达变化,其明确的发病机制至今仍未完全阐明,目前对子痫前期发病机制的解释主要集中在滋养细胞病变,但滋养细胞受到何种因素的影响,发生何种具体病变从而参与子痫前期发病,目前仍然值得深入研究。

自噬是最近发现的细胞自我吞噬现象,研究表明,自噬现象与多种疾病均有密切关系,因而自噬已成为医学科学与生命科学领域的研究热点之一^[7]。在不利于细胞生长的环境中,如缺氧、药物影响,电离辐射等环境下,细胞能启动程序性自我吞噬,即表达大量自噬相关分子,在细胞内形成自噬膜状结构,不断的包围细胞质内物质,最终形成类圆形的双层膜结构体,即自噬体。自噬体与细胞质内溶酶体结合,形成自噬性溶酶体,后者包括诸多消化酶,遂将自噬体所吞噬的自我物质在细胞内消化,将蛋白质等生命大分子降解为小分子物质,此类小分子物质为细胞在紧急情况下提供内源性直接生化反应的底物,包括产生能量,合成新的生命分子,以使细胞在不利于生长的环境中继续保持生命^[8]。然而,当自噬程度过于严重,细胞自我吞噬的物质过多或吞噬了细胞生长关键分子时,将导致细胞死亡,因此自噬对细胞而言,具有双重生物学作用,即适度自噬有利于细胞生长,而过度自噬则可导致细胞死亡。

本研究表明,体外缺氧可诱导滋养细胞发生自噬,而重度子痫前期胎盘组织中,也可检出明显的自噬发生率。大量研究表明,子痫前期患者胎盘缺血缺氧严重,细胞常处于氧化应激状态,而这种环境可促使自噬发生^[9-10]。当胎盘绒毛膜滋养细

胞发生过度自噬时,将导致滋养细胞死亡。由于滋养细胞一半遗传物质来源于父系,因此细胞自噬所致的细胞裂解,将释放出具有父源性物质的部分,而这部分物质作为抗原,可诱发母体免疫反应,从而使母体血液淋巴细胞被激活,进而攻击滋养细胞,滋养细胞受损将导致胎盘着床过浅、微细梗死灶、小面积早剥点等。从而导致胎儿与母体营养交换障碍,进而导致子痫前期患者胎儿宫内一系列发育问题。本研究应用激光共聚焦检测的方法,证实了经缺氧处理后,滋养细胞可发生明显的自噬,这也为自噬与子痫前期发病关系的研究奠定了一定的理论基础。

激光共聚焦显微检测是自噬研究的重要手段^[10-11],由于自噬体本身呈现酸性,与细胞质物质及细胞质内其他亚细胞器的酸碱度不一致,因此在染料染色后所呈现的颜色也不同,而普通荧光显微镜波长有限,不能很好地区分两种不同颜色的物质成分,因而也不能很好地将自噬体与亚细胞器等正常结构区别开来,而激光共聚焦显微检测则很好地解决了这一问题。同时 LC3 是自噬的标志物之一,其中 LC3-I 是 LC3 的细胞质形式,通过翻译后修饰转变为 LC3-II。而 LC3-II 是自噬体膜构成的关键蛋白^[12-13]。本研究激光共聚焦显微检测结果与 LC3-II 的 PCR 测试结果相符合。因此,激光共聚焦显微检测是自噬研究的重要形态学方法之一,随着自噬研究的广泛开展,激光共聚焦显微检测也必将得到进一步发展及价值体现,将激光共聚焦显微检测技术应用于子痫前期重度的发病机理和病理生理的应用研究,有利于探索子痫前期重度的临床诊疗效果。

参考文献:

- [1] Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells[J]. *World J Biol Chem*, 2012, 3(1): 1-6.
- [2] Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2405-2419.
- [3] 陈国庆, 张华, 漆洪波, 等. 滋养细胞自噬在重度子痫前期发病中的作用与分子机制[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(3): 294-296.
- [4] Papageorghiou AT, Yu CK, Bindra R, et al. Multicenter screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by transvaginal uterine artery Doppler at 23 weeks of gestation[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2001, 18(2): 441-449.
- [5] Plasencia W, Maiz N, Bonino S, et al. Uterine artery

Doppler at 11⁺⁰ to 13⁺⁶ weeks in the prediction of pre-eclampsia[J]. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2007, 30(4): 742-749.

- [6] Yu CK, Smith GC, Papageorghiou AT, et al. An integrated model for the prediction of pre-eclampsia using maternal factors and uterine artery Doppler velocimetry in unselected low-risk women[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193(1): 429-436.
- [7] Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, et al. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1 [J]. *Oncogene*, 2010, 29(19): 2831-2842.
- [8] Yu J, Deshmukh H, Payton JE, et al. Array-based comparative genomic hybridization identifies CDK4 and FOXM1 alterations as independent predictors of survival in malignant peripheral nerve sheath tumor [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(7): 1924-1934.
- [9] Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy[J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914-922.
- [10] Indelicato M, Pucci B, Schito L, et al. Role of hypoxia and autophagy in MDA-MB-231 invasiveness[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 223(2): 359-368.
- [11] Han J, Pan XY, Xu Y, et al. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage[J]. *Autophagy*, 2012, 8(5): 812-825.
- [12] Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion[J]. *Cell*, 2007, 130(6): 165-178.
- [13] Kimura S, Noda T, Yoshimori T. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3 [J]. *Autophagy*, 2007, 3(5): 452-460.

(收稿日期: 2013-09-09 修回日期: 2013-11-04)

(上接第 568 页)

- 2008, 118(1): 61-68.
- [11] Slade MJ, Smith BM, Sinnott HD, et al. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(3): 870-879.
- [12] Slade M, Singh A, Smith BM, et al. Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years [J]. *Int J Cancer*, 2005, 14(1): 94-100.
- [13] Manhani AR, Manhani R, Soares HP, et al. CK-19 expression by RT-PCR in the peripheral blood of breast

cancer patients correlates with response to chemotherapy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 66(3): 249-254.

- [14] Zheng ZD, Yu GZ, Wang JJ. Research on changes of PIP mRNA expression in the peripheral blood of patients with breast cancer before and after adjuvant chemotherapy[J]. *Chinese Clin Oncol*, 2009, 14(3): 203-206.
- [15] Zhang JL, Wang L, Ling R, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood of patients with breast cancer before and after neoadjuvant chemotherapy[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2008, 15(1): 44-46.

(收稿日期: 2013-09-15 修回日期: 2013-11-04)