基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001218

线粒体自噬受损引起的 ROS 清除障碍导致子痫前期患者滋养细胞过度凋亡

周小波，石书明，张 华

（重庆医科大学附属第一医院产科、重庆医科大学中国-加拿大-新西兰联合母胎医学实验室，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：探讨胎盘组织中 Bcl-2 家族的前凋亡因子—腺病毒 E1B19 kD 相互作用蛋白 3（BCL2/adenovirus E1B 19 kD protein-interacting protein 3，BNIP3）的表达及其介导的线粒体自噬在子痫前期（preeclampsia，PE）胎盘滋养细胞凋亡调控中的作用。**方法**：应用 Western blot 方法检测 BNIP3 和 cleaved-caspase3 在对照及 PE 胎盘中的表达差异。以人绒毛外滋养细胞株 HTR8/SVneo 通过缺氧/复氧（hypoxia/reoxygenation，H/R）构建 PE 细胞模型。构建 BNIP3 小干扰 RNA，转染细胞后，H/R 处理各组细胞，DCFH-DA 法检测各组细胞活性氧（reactive oxygen species，ROS）生成，流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果**：与正常胎盘相比，在 PE 胎盘组织中 BNIP3 表达明显降低（P=0.015），而凋亡蛋白 cleaved-caspase3 明显增加（P=0.019）；在 PE 细胞模型中，BNIP3 敲低组较对照组的 ROS 产量显著增加（P=0.022），且凋亡增加（P=0.038）。**结论**：BNIP3 介导的线粒体自噬不足引起 ROS 清除障碍可能参与 PE 胎盘滋养细胞过度凋亡的发生。

【关键词】线粒体自噬；子痫前期；活性氧；凋亡

【中图分类号】R714.24 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-06-05

Impaired mitophagy is involved in the trophoblastic excessive apoptosis in preeclampsia caused by ROS

Zhou Xiaobo，Shi Shuming，Zhang Hua

（*Department of Obstetrics，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University，Canada-China-New Zealand Joint Laboratory of Maternal and Fetal Medicine of Chongqing Medical University*）

【Abstract】***Objective***：To characterize the expression of BCL2/adenovirus E1B 19 kD protein-interacting protein 3（BNIP3）in placenta and mitophagy induced by BNIP3 in regulation of apoptosis in preeclampsia. ***Methods***：The expressions of BNIP3 and cleaved-caspase3 protein were detected in placenta from normal pregnancies and pregnancies complicated with preeclampsia by Western blot. HTR8/SVneo were used as the preeclampsia cell model and treated with hypoxia/reoxygenation（H/R）. RNA interference technology was performed by using BNIP3 specific small interfering RNA（siRNA）；Western blot was used to identify the expression of BNIP3 after RNA interference. The experiments were divided into two groups：si-NC group and si-BNIP3 group，then treated with H/R，the production of reactive oxygen species（ROS）within cells was detected by 2'，7'-dichlorodi-hydro-fluorescein diacetate（DCFH-DA）and flow cytometry was used to detect the apoptotic cells. ***Results***：The expression of BNIP3 in placenta from preeclampsia was lower and the expression of cleaved-caspase3 was higher（P=0.015，P=0.019）. Within the preeclampsia cell model，the knock-down of BNIP3 by siRNA significantly increased the production of ROS and activities of apoptosis in HTR8/SVneo（P=0.022，P=0.038）. ***Conclusion***：Impaired mitophagy induced by BNIP3 within placenta participates in the excessive production of ROS and excessive apoptosis.

【Key words】mitophagy；preeclampsia；reactive oxygen species；apoptosis

子痫前期（preeclampsia，PE）是一种威胁孕产妇和胎儿生存的妊娠期特有疾病，以严重的高血压、蛋白尿、肾脏损害和胎儿生长受限等为显著特点，其自然发病率为 3%~5%[1-2]。关于 PE 的发病机制目前尚未完全阐明。已有研究证实，氧化应激反应参与 PE 发病[3-4]。在 PE 胎盘中，由于螺旋动脉重铸障碍造成的缺血再灌注会导致活性氧（reactive oxygen species，ROS）大量产生[5]，而 Bcl-2 家族的前凋亡因子—腺病毒 E1B19 kD 相互作用蛋白 3（BCL2/adenovirus E1B

作者介绍：周小波，Email：zhouxiaobo1989@sina.com，研究方向：围产医学。

通信作者：张 华，Email：zh2844@ gmail.com。

基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：81370732）。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1532.102.html（2017-03-13）

19 kD protein-interacting protein 3，BNIP3）介导的线粒体自噬可通过清除受损线粒体抑制 ROS 产生[6]。目前，关于 BNIP3 介导的线粒体自噬与 PE 发病的关系尚无报道。因此，本研究旨在探讨 BNIP3 介导的线粒体自噬和 PE 胎盘处氧化应激的关系，以期为其发病机制提供新的理论依据。

1 材料及方法

1.1 材料

1.1.1 胎盘组织的收取 收集重庆医科大学附属第一医院 2015 年 1 月至 2015 年 10 月分娩的 15 例 PE 和 15 例正常剖宫产产妇的胎盘组织。其中，PE 的诊断标准参照第八版《妇产科学》。所有研究对象为单胎，采取相同的麻醉，既往无高血压、心脏病、肾脏疾病、糖尿病、甲状腺功能亢进及导致血管病变及缺氧性改变的其他并发症；且孕期无急、慢性感染性疾病。该研究获得重庆医科大学附属第一医院伦理委员会批准，所有受试者均知情并同意。

1.1.2 细胞培养及主要试剂 人早孕期绒毛外滋养细胞株（HTR8/SVneo）由加拿大 Graham 教授惠赠。在 37 ℃，21%O_2、5%CO_2 条件下，89%的 1640 培养基、10%的胎牛血清和 1%的青链霉素培养。子痫前期细胞模型采用缺氧/复氧处理，缺氧 4 h，复氧 18 h，氧浓度为 2%。

胎牛血清和 RIPM1640 培养基购自美国 Gibco 公司，0.25%胰蛋白酶、DCFH-DA 购于美国 Sigma 公司；Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司；BNIP3 干扰和阴性对照的 siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司提供，BNIP3 siRNA 由有效靶序列：5'-GAACUGCACUUCAGCAAUATT-3'构建。青链霉素抗生素、蛋白的提取试剂、定量试剂、凝胶、ECL 试剂盒购于江苏碧云天生物技术研究所。小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司；兔抗人 BNIP3 单克隆抗体购于美国 Abcam 公司；兔抗人 cleaved-caspase3 多克隆抗体购于美国 CST 公司；HRP 标记的山羊抗兔/鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 用 RIPA 裂解液提取胎盘组织或细胞蛋白，BCA 法测量蛋白浓度后配置 2 μg/μL 浓度蛋白液，蛋白上样量为 40 μg。经过电泳，转膜，封闭后，4 ℃敷育一抗过夜，2 抗室温敷育 1 h 后 ECL 试剂盒显影。一抗浓度 BNIP3 为 1:1 000，cleaved-caspase3 为 1:500，β-actin 为 1:2 000。

1.2.2 siRNA 干扰和验证 HTR8/SVneo 细胞接种于 6 孔板，培养于含 10%胎牛血清的 1640 培养基，待细胞长成 50%左右密度时，加入 50 nmol/L BNIP3-siRNA 和 NC-siRNA 转染液，培养 48 h 提取细胞蛋白，Western blot 验证 BNIP3 的干扰效率。实验重复 3 次。

1.2.3 DCFH-DA 法测定 HTR8/SVneo 内 ROS 水平 待 si-RNA 干扰 48 h 后，将细胞进行 H/R 处理，缺氧 4 h，复氧 18 h 后取出细胞，PBS 洗 3 次，配置终浓度为 10 μmol/L DCFH-DA 的无血清培养基，加入后 37 ℃敷育 30 min，于倒置荧光显微镜下观察 ROS 的荧光强度及拍照。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 H/R 处理 si-NC 组和 si-BNIP3 组细胞，胰酶消化收集后流式细胞仪分析 Annexin V+/PI-、Annexin V+/PI+细胞的百分率，即早期凋亡和晚期凋亡的总和。实验重复 3 次。

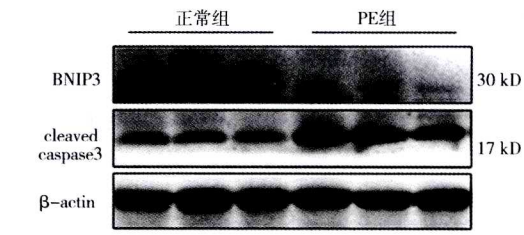
1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5.0 统计分析软件进行统计学分析。计量资料采用平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组均数间比较采用独立样本 t 检验分析。检验标准 α=0.05。

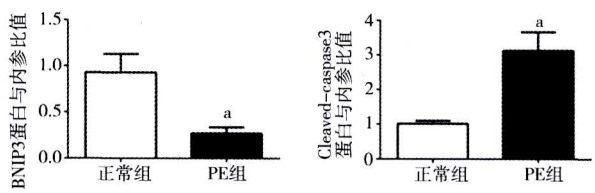
2 结 果

2.1 凋亡在 PE 胎盘中明显增加，但前凋亡因子 BNIP3 呈现相反的变化趋势

Western blot 方法检测正常孕妇和 PE 患者的胎盘组织中 BNIP3 和 cleaved-caspase3 的表达，结果与对照组相比，PE 胎盘组织中凋亡指标 cleaved-caspase3 显著增加（t=3.101，P=0.015）；而线粒体自噬标志物 BNIP3 表达明显下降（t=3.823，P=0.019），如图 1、表 1 所示。



A. BNIP3 和 cleaved-caspase3 在正常组和 PE 组中的表达



a表示 2 组之间的比较，P < 0.05

B. 胎盘组织中 BNIP3 和 cleaved-caspase3 的相对表达量

图 1 Western blot 检测正常孕妇和 PE 患者胎盘 BNIP3 和 cleaved-caspase3 的表达

Fig.1 Expression of BNIP3 and cleaved-caspase3 in placentas from normal and PE patients

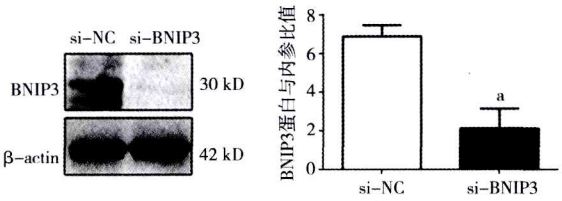
表 1 Western blot 检测正常孕妇和 PE 患者胎盘中 BNIP3 和 cleaved-caspase3 的平均吸光度值（$\bar{x} \pm s$）

Tab.1 Average positive absorbance of BNIP3 and cleaved-caspase3 by Western blot in placenta from normal term and pregnancies complicated with preeclampsia（$\bar{x} \pm s$）

组别	BNIP3表达	cleaved-caspase3表达
si-NC组	0.927 ± 0.201	1.017 ± 0.084
Si-BNIP3组	0.270 ± 0.067	3.123 ± 0.544
t 值	3.101	3.823
P 值	0.015	0.019

2.2 BNIP3-siRNA 干扰验证

通过 Western blot 验证干扰后 BNIP3 蛋白表达。结果显示，si-RNA 在蛋白水平明显抑制 BNIP3 的表达，差异具有统计学意义（t=4.075，P=0.015），表明基因干扰成功（图 2）。



a表示 2 组之间的比较，P < 0.05

图 2 Western blot 检测转染后细胞内 BNIP3 蛋白的表达

Fig.2 Expression of BNIP3 detected in the two groups by Western blot

2.3 HTR8/SVneo 细胞内 ROS 水平和凋亡情况

si-NC 组和 si-BNIP3 组经 H/R 处理后，采用 DCFH-DA 法检测细胞内 ROS 的产生。免疫荧光结果显示，si-BNIP3 组 H/R 处理后 ROS 水平明显高于 si-NC 组（t=3.625，P=0.022）；流式细胞检测术分析 2 组细胞的凋亡情况，结果显示 si-BNIP3 组细胞凋亡率较 si-NC 组明显增加（t=3.044，P=0.038），如图 3、表 2 所示。

表 2 不同处理组细胞 ROS 免疫荧光强度和凋亡水平

Tab.2 Relative immunofluorescence of ROS and apoptotic rates in HTR8/SVneo cells

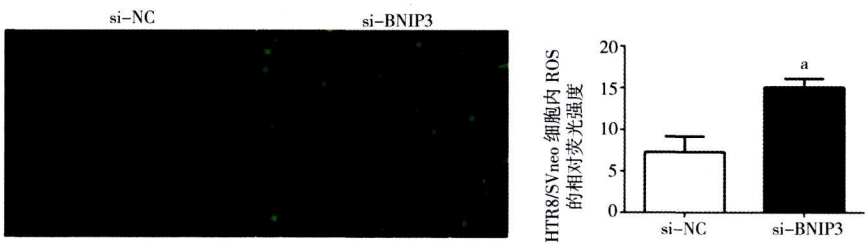
组别	ROS相对免疫荧光强度	细胞凋亡率
si-NC组	7.290 ± 1.879	10.070 ± 0.391
Si-BNIP3组	15.060 ± 1.030	13.980 ± 1.224
t 值	3.625	3.044
P 值	0.022	0.038

3 讨 论

PE 是一种妊娠期严重疾病，因发病早、病情重、临床预后不良成为围产医学领域关注的重点。而关于 PE 的发病机制尚不清楚，据已有文献报道，氧化应激、过度炎症、免疫及遗传失衡、血管内皮损伤等可能参与 PE 发病。其中，氧化应激导致的一系列细胞功能障碍更是 PE 发病机制研究的热点。

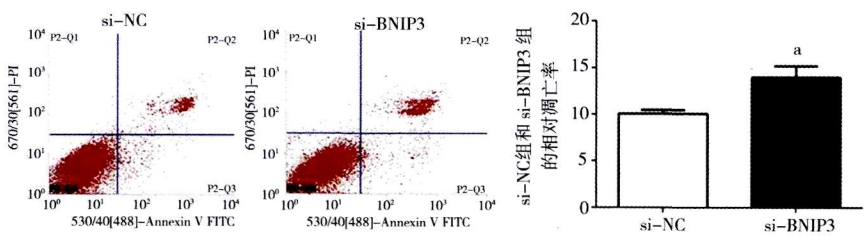
PE 患者在早中孕期，由于螺旋动脉重铸障碍导致胎盘处于低血流灌注、低氧状态。线粒体作为对低氧反应最为敏感的细胞器，其功能将发生重大调整以适应低氧环境。细胞电子传递链最后的电子受体氧分子供应不足，将导致 ROS 大量产生。若这些 ROS 不能得到及时清除，将恣意攻击细胞内大分子物质和细胞器，使它们发生氧化损伤[7]。而线粒体自噬作为细胞内自噬的一种形式，是新近被发现的重要调控途径，线粒体自噬能清除受损线粒体及过度堆积的 ROS，从而确保细胞内线粒体功能稳定，保障应激环境中细胞的存活；反之，线粒体自噬的防御功能得不到充分发挥时，ROS 清除障碍将导致其过度堆积，引起细胞功能障碍[8-9]，最终引起细胞过度凋亡[10]。

BCL2 和 BNIP3 作为 Bcl-2 蛋白超家族一员，定位于线粒体外膜，作为线粒体自噬的标志物，参与细胞线粒体自噬和凋亡相关调控[11-12]。研究表明，



a表示 2 组之间的比较，P < 0.05

A. 免疫荧光检测 ROS 在 si-NC 组和 si-BNIP3 组的产生情况



a表示 2 组之间的比较，P < 0.05

B. 流式细胞术检测 si-NC 组和 si-BNIP3 组的细胞凋亡情况

图 3 ROS 和凋亡在 si-NC 和 si-BNIP3 处理组的情况

Fig.3 Production of ROS and apoptosis in si-NC and si-BNIP3 group

BNIP3 基因敲除小鼠体内呈现受损线粒体堆积的现象[13]；同时，阿尔茨海默病及心脏疾病等被证实与受损线粒体在细胞中的积累相关[14-15]；在肺癌、胶质母细胞瘤及乳腺癌细胞中，线粒体自噬可通过清除受损线粒体而保证癌细胞在恶劣环境中的生存率[16-17]。然而，线粒体自噬与 PE 的关系几乎未见报道。本研究结果显示，BNIP3 表达在子痫前期患者明显低于正常孕产妇，提示 BNIP3 的差异表达可能与 PE 发病相关。同时也证实在 PE 细胞模型中敲低 BNIP3 的表达后，将导致 ROS 过度堆积，进一步证实 BNIP3 可能通过介导线粒体自噬活动在 ROS 调控中发挥重要作用。

有学者发现，与正常孕妇相比，PE 患者胎盘组织中凋亡水平异常增高[18-19]，且细胞内凋亡水平的增加及其所导致的副反应在 PE 发病中发挥重要作用[20-21]。研究指出，应激条件下细胞通过自噬水平的调节来避免凋亡通路的激活[22]；同时，线粒体自噬通过清除受损的线粒体而避免细胞功能的紊乱和程序性死亡的发生[23]。本研究结果显示，PE 胎盘较正常胎盘凋亡明显增加；在 PE 细胞模型中，随着BNIP3 的表达下降、线粒体自噬水平降低、ROS 堆积增加，细胞凋亡率明显增高，提示线粒体自噬保护效能不足时，细胞由于过度氧化应激损伤而致凋亡发生。

综上所述，BNIP3 介导的线粒体自噬活动在 PE 患者体内明显降低，且这一活动的降低导致 ROS 清除障碍，参与 PE 胎盘滋养细胞过度凋亡的发生。后续研究中，将进一步探讨该基因在 PE 动物模型中所起的作用，为 PE 发病机制的探讨及发现治疗靶点提供理论依据。

参 考 文 献

[1] Mol BW, Roberts CT, Thangaratinam S, et al. Pre-eclampsia[J]. Lancet, 2016, 387(10022): 999-1011.

[2] Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia[J]. Science, 2005, 308(5728): 1592-1594.

[3] Ouyang YQ, Li SJ, Zhang Q, et al. Interactions between inflammatory and oxidative stress in preeclampsia[J]. Hypertens Pregnancy, 2009, 28(1): 56-62.

[4] Silva DM, Marreiro Ddo N, Moita Neto JM, et al. Oxidative stress and immunological alteration in women with preeclampsia[J]. Hypertens Pregnancy, 2013, 32(3): 304-311.

[5] Huang QT, Chen JH, Hang LL, et al. Activation of PAR-1/NADPH oxidase/ROS signaling pathways is crucial for the thrombin-induced sFlt-1 production in extravillous trophoblasts: possible involvement in the pathogenesis of preeclampsia[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(4): 1654-1662.

[6] Bin-Umer MA, Mclaughlin JE, Butterly MS, et al. Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(32): 11798-11803.

[7] Bhogal RH, Weston CJ, Curbishley SM, et al. Autophagy: a cytoprotective mechanism which prevents primary human hepatocyte apoptosis during oxidative stress[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 545-558.

[8] Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging[J]. Science, 2011, 333(6046): 1109-1112.

[9] Yang S, Xia C, Li S, et al. Defective mitophagy driven by dysregulation of rheb and KIF5B contributes to mitochondrial reactive oxygen species(ROS)-induced nod-like receptor 3(NLRP3) dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity[J]. Redox Biol, 2014, 3: 63-71.

[10] Liu X, Mu H, Luo X, et al. Expression of Gadd45α in human early placenta and its role in trophoblast invasion[J]. Placenta, 2014, 35(6): 370-377.

[11] Zhang J, Ney PA. Mechanisms and biology of B-cell leukemia/lymphoma 2/adenovirus E1B interacting protein 3 and Nip-like protein X[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(10): 1959-1969.

[12] Edinger AL, Thompson CB. Defective autophagy leads to cancer [J]. Cancer Cell, 2003, 4(6): 422-424.

[13] Dorn GN. Mitochondrial pruning by Nix and BNip3: an essential function for cardiac-expressed death factors[J]. J Cardiovasc Transl Res, 2010, 3(4): 374-383.

[14] Palikaras K, Tavernarakis N. Mitophagy in neurodegeneration and aging[J]. Front Genet, 2012, 3: 297.

[15] Dimauro S, Schon EA. Mitochondrial disorders in the nervous system[J]. Annu Rev Neurosci, 2008, 31: 91-123.

[16] Vijayalingam S, Pillai S G, Rashmi R, et al. Overexpression of BH3-only protein BNIP3 leads to enhanced tumor growth[J]. Genes Cancer, 2010, 1(9): 964-971.

[17] Pratt J, Annabi B. Induction of autophagy biomarker BNIP3 requires a JAK2/STAT3 and MT1-MMP signaling interplay in Concanavalin-A-activated U87 glioblastoma cells[J]. Cell Signal, 2014, 26(5): 917-924.

[18] Can M, Guven B, Bektas S, et al. Oxidative stress and apoptosis in preeclampsia[J]. Tissue Cell, 2014, 46(6): 477-481.

[19] He G, Xu W, Chen Y, et al. Abnormal apoptosis of trophoblastic cells is related to the up-regulation of CYP11A gene in placenta of preeclampsia patients[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59609.

[20] Austgulen R, Isaksen CV, Chedwick L, et al. Pre-eclampsia: associated with increased syncytial apoptosis when the infant is small-for-gestational-age[J]. J Reprod Immunol, 2004, 61(1): 39-50.

[21] Sharp AN, Heazell AE, Crocker IP, et al. Placental apoptosis in health and disease[J]. Am J Reprod Immunol, 2010, 64(3): 159-169.

[22] Li M, Tan J, Miao Y, et al. The dual role of autophagy under hypoxia-involvement of interaction between autophagy and apoptosis[J]. Apoptosis, 2015, 20(6): 769-777.

[23] Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy [J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(4): 775-795.

（责任编辑：冉明会）