

• 论 著 •

自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ 和 p62 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中的表达和临床意义*

宋鹏书, 张燕华, 张奕梅, 莫梅珍, 何 升, 张 莉[△]
广西壮族自治区妇幼保健院妇产科, 广西南宁 530003

摘要:目的 探讨自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ 和 p62 在不明原因复发性流产(URSA)患者绒毛组织中的表达和临床意义。方法 选取 2020 年 3—7 月在该院妇产科行清宫术的 URSA 患者及行人工流产术的正常妊娠者分别作为 URSA 组和对照组, 每组 10 例。采用 HE 染色观察两组绒毛组织形态学差异, 采用 Western blot 检测两组绒毛组织中 LC3-Ⅱ、p62 蛋白的表达水平, 并通过免疫组化实验观察两组患者绒毛组织中 LC3-Ⅱ、p62 的定位和表达情况。结果 HE 染色结果显示, URSA 组绒毛组织内部细胞出现皱缩, 颜色暗红, 细胞之间出现断离, 绒毛组织有破损。Western blot 检测结果显示, 与对照组比较, URSA 组中 LC3-Ⅱ 蛋白表达量上调、p62 的表达量下调, 差异均有统计学意义($P<0.01$)。免疫组化试验结果显示, LC3、p62 蛋白主要定位于细胞质, 表达情况与 Western blot 检测结果一致。结论 URSA 患者绒毛组织中 LC3-Ⅱ 蛋白表达上调, p62 蛋白表达下调, 提示细胞自噬可能参与 URSA 的发生。

关键词:不明原因复发性流产; 绒毛组织; LC3-Ⅱ; p62

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.13.016

中图法分类号:R714.21

文章编号:1673-4130(2021)13-1602-04

文献标志码:A

Expression and clinical significance of autophagic proteins LC3-Ⅱ and p62 in villus tissue of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion*

SONG Pengshu, ZHANG Yanhua, ZHANG Yimei, MO Meizhen, HE Sheng, ZHANG Li[△]
Department of Obstetrics and Gynecology, Guangxi Zhuang Autonomous Region Maternal and Child Health Hospital, Nanning, Guangxi 530003, China

Abstract: Objective To explore the expression and clinical significance of autophagic proteins LC3-Ⅱ and p62 in villus tissue of patients with unexplained recurrent spontaneous abortion. **Methods** Patients with URSA and normal pregnant women who underwent induced abortion in the department of obstetrics and gynecology of this hospital from March to July 2020 were selected as the URSA group and the control group, with 10 patients in each group. HE staining was used to observe the pathological differences of villus samples between the two groups, Western blot was used to detect the expression levels of LC3-Ⅱ and p62 proteins in the villus samples of the two groups, and immunohistochemical experiments was used to observe the localization and expression of LC3-Ⅱ and p62 in the villus tissues of the two groups. **Results** HE staining results showed that cells appeared wrinkled, dark red in color, there were disconnects between cells, villus tissue was damaged in the villus tissue of URSA group. Western blot results showed that compared with the control group, LC3-Ⅱ protein expression was significantly up-regulated and p62 expression was down-regulated in URSA group, with statistical significance ($P<0.01$). The results of immunohistochemistry showed that LC3 and p62 proteins were mainly localized in the cytoplasm, and their expression was consistent with that of Western blot. **Conclusion** LC3-Ⅱ protein expression is up-regulated and p62 protein expression is down-regulated in villus tissue of URSA patients, suggesting that autophagy may be involved in the occurrence of URSA.

Key words: unexplained recurrent spontaneous abortion; villus tissue; LC3-Ⅱ; p62

复发性流产是指 3 次或 3 次以上发生在 20 周之内的妊娠失败, 发生率达 3%~5%^[1]。复发性流产

* 基金项目: 广西卫健委自筹经费科研课题(Z20200654, Z20200001)。

作者简介: 宋鹏书, 男, 见习研究员, 主要从事生殖保健与妇幼健康研究。 [△] 通信作者, E-mail: 403660390@qq.com。

本文引用格式: 宋鹏书, 张燕华, 张奕梅, 等. 自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ 和 p62 在不明原因复发性流产患者绒毛组织中的表达和临床意义[J].

病因复杂多样,可能与遗传因素、感染因素、免疫学因素、内分泌因素等有关,且约 50% 的复发性流产为不明原因复发性流产(URSA)^[2]。

自噬是一种高度保守的细胞行为,其通过泛素蛋白酶系统维持细胞内稳定,是由双层膜性结构对细胞内成分进行包裹,之后通过与溶酶体结合从而将包裹的内容物进行分解、再利用的过程^[3-4]。近年研究发现,自噬反应活性失调对妊娠期并发症的发生存在不可忽视的影响^[5]。但有关复发性流产与自噬的相互关系报道较为少见。本研究探讨了自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ、p62 在 URSA 患绒毛组织中的表达情况,分析 URSA 结局与绒毛组织发生自噬反应的相关性,旨在研究 URSA 的发生机制,为进一步寻找新的临床干预方法提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 3—7 月在本院妇产科行清宫术 URSA 患者及行人工流产术的正常妊娠者分别作为 URSA 组和对照组,每组 10 例。两组患者诊断标准均参照第 9 版《妇产科学》。URSA 组平均年龄(32±6)岁,平均孕周(10±2)周,纳入标准:(1)超声检查子宫发育正常;(2)夫妇染色体核型检查正常;(3)甲状腺功能检查正常;(4)无血栓形成倾向;(5)自然流产次数≥3 次;(6)排除免疫及感染因素影响。对照组平均年龄(30±4)岁,平均孕周(10±2)周,无不良孕产史,正常妊娠次数≥1 次。本研究获本院伦理委员会批准,所有研究对象自愿签署知情同意书。

1.2 主要试剂 多聚甲醛固定液购自 Sigma 公司;兔抗人 LC3 单抗隆抗体购自 CST 公司;兔抗人 p62 多克隆抗体购自 SAB 公司;兔抗人 β-actin 多克隆抗体购自北京博奥森公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;山羊抗兔荧光二抗购自 Abcam 公司;显影液购自 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 绒毛组织留取 在人工流产术或清宫术中妊娠组织清出后 3 min 内,迅速于无菌状态下挑选绒毛组织,用无菌生理盐水冲洗干净,将其分为三份:两份分别置于已备制好的体积分数为 4% 的多聚甲醛液中固定 24 h,用于 HE 染色和免疫组化实验;另一份置于冻存管中,将其迅速放入液氮内,然后移至-80℃冰箱保存,用于目的蛋白表达量检测。

1.3.2 绒毛组织病理学观察 取固定 24 h 的绒毛组织,组织块脱水,石蜡包埋,切成厚度 4 μm 薄片,放入 37℃温水使切片伸展,贴至载玻片上,依次浸入二甲苯、乙醇脱蜡,蒸馏水冲洗,然后将载玻片放入苏木精溶液中染色,流水冲洗,放入 37℃温水中进行返蓝,晾干,中性树胶封固保存,电子显微镜观察染色情况。

1.3.3 Western blot 检测绒毛组织中自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ、p62 的表达 取-80℃冰箱保存的绒毛组

织,称质量后剪碎放入 EP 管中,用电动匀浆机研磨碎,加入组织裂解液,放在冰盒上裂解 40 min,4℃,12 000×g 离心 20 min,提取组织总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白浓度。采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离样品蛋白,转至 PVDF 膜,脱脂奶粉室温封闭 30 min,TBST 冲洗 3 次,每次 5 min。加入 LC3 和 p62 单克隆一抗(1:500)4℃摇晃孵育过夜,TBST 冲洗 3 次,每次 5 min,加入二抗室温孵育 1 h,然后于显影液中孵育 5 min,上机检测。采用 Quantity One 软件分析目的蛋白相对表达水平。

1.3.4 免疫组化实验检测绒毛组织中自噬相关蛋白 LC3、p62 的表达 取固定 24 h 的绒毛组织,组织块脱水,石蜡包埋,切成厚度 5 μm 薄片,放入 37℃温水表面便于切片伸展容易贴到载玻片上,再依次浸入二甲苯、乙醇脱蜡,高压修复,3%过氧化氢溶液中孵育。用 PAP 笔在组织切边画圈,然后滴加封闭液。一抗 LC3 和 p62(1:200)孵育过夜,二抗孵育 20 min,二氨基联苯胺(DAB)显色液显色 5 min。苏木精染色 1 min,分化返蓝,梯度乙醇脱水,树胶封片,电子显微镜观察阳性面积大小。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,各组间两两比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组绒毛组织的病理学结果 HE 染色结果显示,对照组绒毛组织内部细胞形态饱满,细胞核呈梭子型,绒毛组织外部完整,URSA 组绒毛组织内部细胞出现皱缩,颜色暗红,细胞之间出现断离,绒毛组织有破损。见图 1。

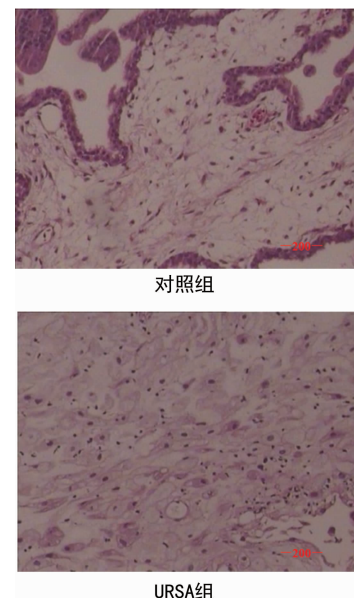
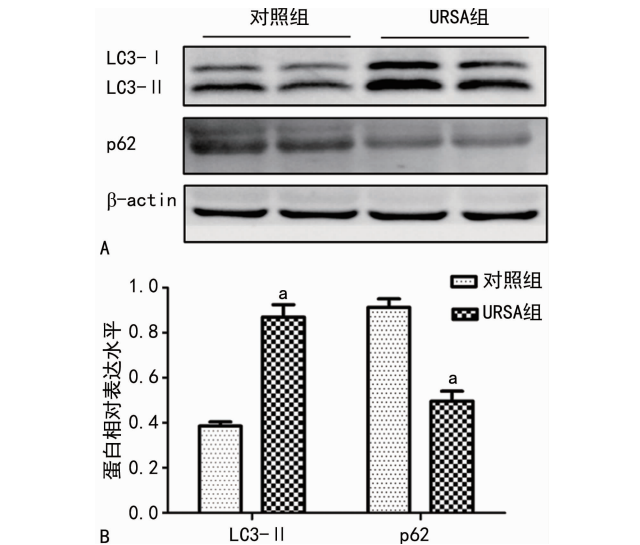


图 1 两组流产绒毛组织 HE 染色结果(×200)

2.2 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ和 p62 在流产绒毛组织中的表达 Western blot 检测结果显

示,与对照组相比,URSA 组的绒毛组织中 LC3-Ⅱ 的蛋白表达量显著增加;同时,p62 蛋白的表达量显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。



注:A为 Western blot 检测结果;B为蛋白定量分析;与对照组比较,^a $P<0.05$ 。

图 2 两组产绒毛组织 LC3-Ⅱ 和 p62 蛋白表达情况

2.3 免疫组化实验分析自噬相关蛋白 LC3 和 p62 在绒毛组织中的表达 免疫组化实验结果显示,LC3 和 p62 蛋白主要定位于细胞质中。与对照组相比,URSA 组 LC3 蛋白表达量上升, p62 蛋白表达量降低,结果与 Western blot 检测结果一致。见图 3。

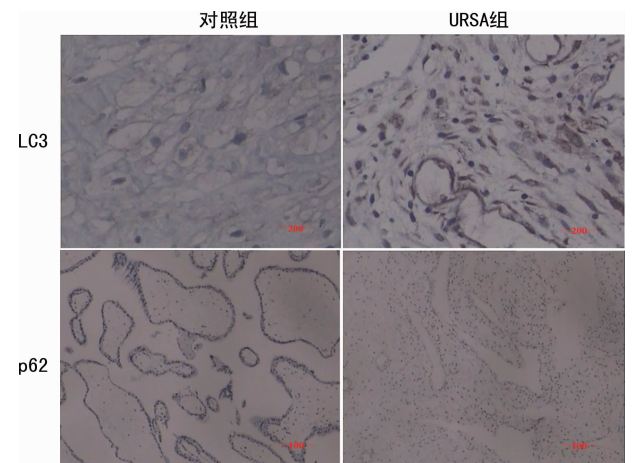


图 3 LC3 和 p62 蛋白在两组绒毛组织中的表达情况($\times 200$)

3 讨 论

流产常发生在妊娠早期,其发生率随孕妇年龄的增长而升高。导致流产常见的因素包括免疫功能障碍、染色体异常、内分泌疾病及子宫畸形等。URSA 是流产中的一种特殊类型,近年因其发病率呈上升趋势而受到广泛关注^[6]。目前,URSA 的发病机制尚不明确,且病因复杂,临床治疗尚处于探索阶段,因此成为妇产科领域的研究重点与难点。

卵母细胞受精、胚胎植入前后的发育,以及妊娠期并发症均涉及自噬的诱导,当滋养细胞早期处于缺氧和营养有限的环境下,自噬对其有重要的保护作

用,利于其适应早期发育的微环境^[7-8]。虽然自噬可以为细胞修复损伤的细胞器提供能量,但当其超过一定限度后,也可能破坏细胞结构,影响能量供应,引发自噬性细胞死亡^[9-10]。近年研究显示,与正常妊娠孕妇胎盘绒毛组织相比,流产、子痫前期、胎儿生长受限、妊娠期糖尿病等病理妊娠的孕妇胎盘组织中均出现自噬过程受损^[11-12]。此外,KHIDER 等^[13]研究发现,无论是胎儿早产还是足月分娩,均与胎盘自噬活性降低有关。分娩实际上是一个炎症持续过程,无论早产还是足月分娩,自噬活性的降低都会导致炎症因子清除不足,从而导致促炎细胞因子释放过多,最终引发不良分娩结局^[14]。

细胞自噬是多种自噬相关基因和关键蛋白参与的动态过程,可通过这些分子的表达水平来评估自噬活性。在自噬循环过程中,LC3 分子经酶切反应后形成胞质型 LC3-Ⅰ,后与磷脂酰乙醇胺反应转化为脂质型 LC3-Ⅱ,该亚型附着在自噬体上直至与溶酶体融合形成自噬溶酶体^[15-16]。LC3-Ⅱ 是监测自噬水平稳定可靠的特异性标志物,其含量在一定程度上反映了自噬体的数量。p62 也是自噬反应发生过程中的重要衔接分子,其水平变化与自噬强弱呈负相关,常与 LC3 共同用于判断自噬反应活性^[17]。本研究中,Western blot 和免疫组化实验结果均显示,与正常妊娠孕妇相比,URSA 患者的绒毛组织中自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ 上调,p62 蛋白下调,差异有统计学意义($P<0.05$),提示在 URSA 患者绒毛组织中自噬水平增强。推测自噬与 URSA 发生的关系可能为:(1)滋养层细胞受到环境强烈刺激时,细胞中的自噬水平过度会直接导致自噬性细胞死亡;(2)过度自噬可通过自噬溶酶体途径降解细胞中生存素等抗凋亡因子,导致细胞凋亡,从而引发 URSA。自噬是一把“双刃剑”。在妊娠早期滋养层细胞处于相对缺氧的环境中,缺氧环境可以诱导自噬的发生,细胞内的自噬体通过收集受损、老化的细胞器,产生新的能量以维持细胞正常增殖分化。如果滋养层细胞受的刺激过度,同样会使细胞自噬反应激烈,使细胞中的细胞器大量受损从而使细胞死亡,最终导致复发性流产。谢冰等^[18]研究发现,Bcl-2 mRNA 及蛋白、LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 蛋白表达水平在稽留流产的绒毛及蜕膜组织中均上调,提示细胞自噬参与了稽留流产的发生,其主要原因是绒毛及蜕膜组织发生炎症反应。王婧瑶^[19]研究发现,IGF2 在胚胎停止发育绒毛组织中表达降低,mTOR 通路调节自噬的作用缺失,导致自噬活动紊乱,进而使胚胎停止发育。本研究结果提示,自噬相关蛋白在 URSA 患者绒毛组织中高度表达也有可能是妊娠早期的绒毛组织发生炎症反应,绒毛组织细胞通过自噬过度激活以应对炎症反应,最终使得细胞发生自噬性死亡。

本研究为 URSA 发病机制的阐明提供了一定理论依据,可考虑将自噬相关蛋白 LC3-Ⅱ、p62 作为

URSA 早期诊断的标志物。但复发性流产的致病原因复杂, 还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] AUSBECK E B, BLANCHARD C, TITA A T, et al. Perinatal outcomes in women with a history of recurrent pregnancy loss[J]. *Am J Perinatol*, 2021, 38(1): 10-15.
- [2] 王芸. 中西医结合疗法治疗不明原因复发性流产的效果研究[J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(8): 1487-1489.
- [3] 李枫, 袁永旭. 国内外细胞自噬研究相关主题分析[J]. *医学信息学杂志*, 2019, 40(9): 59-63.
- [4] 庞歆桥, 曹邦伟. 细胞自噬与 EGFR 抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(5): 681-689.
- [5] ZHAO X, JIANG Y, JIANG T, et al. Physiological and pathological regulation of autophagy in pregnancy[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2020, 302(2): 293-303.
- [6] 李爱金, 章伟丽, 向园花, 等. 复发性流产生化妊娠发病的危险因素分析[J]. *中国妇幼保健*, 2020, 35(12): 2289-2291.
- [7] JIANG S T, CHANG A N, HAN L T, et al. Autophagy regulates fungal virulence and sexual reproduction in *Cryptococcus neoformans*[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 374.
- [8] KAUR J, DEBNATH J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(8): 461-472.
- [9] KANG C, ELLEDGE S J. How autophagy both activates and inhibits cellular senescence[J]. *Autophagy*, 2016, 12(5): 898-899.
- [10] 成梦群, 尹健彬, 张旋. 巨噬细胞自噬在炎症性疾病中的作用研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(21): 35-38.

- [11] YANG P, LI Z, TYE K D, et al. Effects of an orally supplemented probiotic on the autophagy protein LC3 and Beclin1 in placentas undergoing spontaneous delivery during normal pregnancy[J]. *BMC Pregnancy Childb*, 2020, 20(1): 216.
- [12] 李亚梅, 杨星宇, 赵雪娅, 等. 早发型和晚发型子痫前期自噬与凋亡水平差异及相互关系研究[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2019, 11(11): 38-43.
- [13] EL-KHIDER F, MCDONALD C. Links of autophagy dysfunction to inflammatory bowel disease onset[J]. *Dig Dis*, 2016, 34(1/2): 27-34.
- [14] DE ANDRADE RAMOS B R, WITKIN S S. The influence of oxidative stress and autophagy cross regulation on pregnancy outcome[J]. *Cell Stress Chaperon*, 2016, 21(5): 755-762.
- [15] CHEN Y, YU L. Recent progress in autophagic lysosome reformation[J]. *Traffic*, 2017, 18(6): 358-361.
- [16] STREETER A, MENZIES F M, RUBINSZTEIN D C. LC3-II tagging and western blotting for monitoring autophagic activity in mammalian cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1303: 161-170.
- [17] 林海凤, 陈智伟, 刘芳芳. p62/SQSTM1 与自噬在胃癌组织中表达及临床意义[J]. *莆田学院学报*, 2020, 27(2): 57-61.
- [18] 谢冰, 陈霞, 于骏, 等. Beclin-1 在稽留流产中的表达模式及临床意义[J]. *医学研究生学报*, 2019, 32(1): 78-81.
- [19] 王婧瑶. IGF2 及自噬相关蛋白在早期胚停育绒毛组织中的表达和意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2019.

(收稿日期: 2020-10-07 修回日期: 2021-05-10)

(上接第 1601 页)

- [12] 周雨, 张智伟, 王京奇. 从“二次打击”学说探讨中药防治非酒精性脂肪肝的研究进展[J]. *中医药导报*, 2017, 23(18): 109-111.
- [13] MESNAGE R, RENNEY G, SÉRALINI G E, et al. Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of roundup herbicide[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 39328.
- [14] 王艳霞, 熊友珍, 刘丽. 某高校体检人群脂肪肝患病情况及其影响因素分析[J]. *华南预防医学*, 2018, 44(6): 575-577.
- [15] 熊玲玲. 脂肪肝影响因素的调查浅析[J]. *中国医药指南*, 2015(18): 82-83.
- [16] 索明果, 亚冰玉, 常云丽. 健康体检人群脂肪肝危险因素分析[J]. *河南预防医学杂志*, 2020, 31(4): 288-290.
- [17] 崔杏芳. 中老年脂肪肝相关因素分析[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(3): 646-647.
- [18] 叶俊荣, 李格, 钟汉声. 4 735 例机关人员体质指数及相关指标现况分析[J]. *解放军预防医学杂志*, 2017, 35(8): 889-891.
- [19] 李玉花, 林金蕊, 徐艳芳, 等. 成人脂肪肝与体重指数和血脂水平的关系研究[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15

- (24): 4680-4682.
- [20] ZHANG Y, CHEN M L, ZHOU Y, et al. Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(8): 1443-1457.
- [21] 李敬, 杨敏, 林静, 等. 某学院飞行员脂肪肝与体重指数相关性分析及健康指导[J]. *航空航天医学杂志*, 2016, 27(12): 1538-1539.
- [22] 曹男, 林连捷, 郑长青, 等. 脂肪肝相关危险因素的研究[J]. *中国全科医学*, 2013, 16(10): 1115-1119.
- [23] 王彦人, 罗毅, 张玫媚, 等. 杭州市某体检中心脂肪肝现状调查及危险因素分析[J]. *赣南医学院学报*, 2018, 38(12): 1222-1227.
- [24] 王培, 李奇观, 陈晓彤, 等. 广州地区老年居民脂肪肝患病趋势及相关因素[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(5): 1240-1242.
- [25] 张晓红. 肝功与血脂血清学指标水平检验在脂肪肝诊断中的应用分析[J]. *中外医学研究*, 2015, 13(10): 56-58.
- [26] 辛晟梁, 徐可树. 非酒精性脂肪性肝病发病机制新认识[J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(8): 1581-1583.

(收稿日期: 2020-10-21 修回日期: 2021-05-17)